



DOI 10.22363/2313-2310-2017-25-3-414-430

УДК 615.7

## О НЕОБХОДИМОСТИ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ КОНТРОЛЯ БЕЗОПАСНОСТИ И КАЧЕСТВА ЭКСТРАКТОВ ИЗ ЛИСТЬЕВ ГИНКГО БИЛОБА

В.Г. Васильев, Г.А. Калабин, Букаса Митео Иван, Д.Д. Рудачевский

Российский университет дружбы народов  
ул. Миклухо-Маклая, 6, Москва, Россия, 117198

Вопрос экспертизы безопасности и качества природных пищевых добавок и лекарственных средств рассмотрен на примере экстрактов из листьев гинкго билоба — ноотропа, наиболее популярного в мире как по объему потребления и научному интересу. Охарактеризованы требования к составу препаратов и методы их контроля. Предложена новая оригинальная методология определения методом ЯМР  $^1\text{H}$  содержания в коммерческих препаратах отдельных терпеновых лактонов, флавоногликозидов различных групп и их агликонов. Выявлен ряд фальсифицированных и/или низкокачественных препаратов. Предложены пути совершенствования их экспертизы, включающие определение содержания минорных компонентов.

**Ключевые слова:** гинкго билоба (ГБ), биологически активные добавки (БАД), лекарственные средства (ЛС), спектроскопия ЯМР, контроль качества, подлинность, флавоногликозиды (ФГ), терпеновые лактоны (ТЛ), гинкголевые кислоты (ГК), гинкготоксины (ГТ)

### Введение

Оборот опасной для жизни человека фальсифицированной и контрафактной продукции, в частности, продуктов питания, пищевых добавок с биологически активными композициями природного происхождения, лекарственных средств в последние годы в России не уменьшается, как следует из информационных бюллетеней Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ). Принятие ряда Федеральных законов («Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2016 г. № 61-ФЗ с изменениями от 22.12.2014 г. № 429-ФЗ; «О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации в части противодействия оборота фальсифицированных лекарственных средств, медицинских изделий и фальсифицированных биологически активных добавок; от 31.12.2014 г. 2532-ФЗ) и вступление в действие с 01.01.2016 г. Государственной фармакопеи РФ Издание XIII (ГФ XIII), в которую вошло много новых методов контроля ЛС, возможно улучшат ситуацию. Однако для многих ЛС и БАДов она остается критической, поскольку соответствующие частные статьи ГФ XIII для многих ЛС несовершенны, а контроль БАДов, осуществляемый аккредитованными Роспотребнадзором организациями, недостаточно эффективен. При регистрации новых БАДов для выхода на потребительский рынок достаточно минимального контро-

ля состава (соответствия требованиям по содержанию радиоактивных изотопов, тяжелых металлов, пестицидов, микробиологической безопасности). Многочисленные угрозы здоровью обусловлены использованием в БАДах недеklarированных синтетических или чужеродных природных компонентов, присутствием неконтролируемых токсинов, безосновательными медицинскими рекомендациями и отсутствием информации о противопоказаниях.

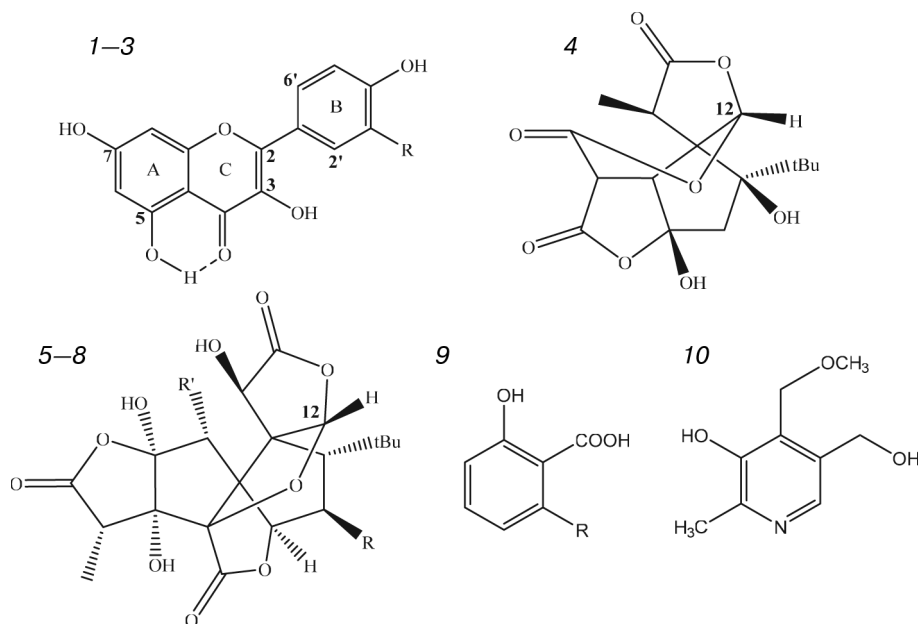
**Сложившаяся ситуация в РФ** и некоторые пути ее улучшения на примере наиболее популярного природного ноотропа — экстрактов из листьев гинкго билоба, производимого в форме ЛС, так и БАД.

Гинкго билоба (*Ginkgo biloba*) — реликтовое голосемянное двудомное растение, единственный сохранившийся представитель класса Гинкговых, листопадное дерево высотой до 40 м, произрастающее в диком виде на востоке Китая. Следы этого уникального растения — «живого ископаемого» [1] обнаружены на каменных отпечатках мелового и юрского периодов, т.е. оно существует около 200 млн лет [2]. В традиционной медицине Китая используется около 5 тыс. лет, более 800 лет назад интродуцировано в Японии, около 200—300 лет назад — в Европе и Северной Америке. Лекарственные препараты в форме экстрактов из листьев ГБ используются для профилактики церебральной недостаточности, потери памяти, слабоумия, замедления нейродегенеративных расстройств типа болезни Альцгеймера [3], воздействия на сосудистые и метаболические нарушения, неврологическую и поведенческую активность [2], эффективны при гипертензии [4], астме [5], нарушениях слуха [6]. Однако есть исследования, отрицающие его эффективность [7,8], что, возможно, обусловлено ненадлежащей технологией изготовления препаратов, т.е. присутствием в них нежелательных компонентов, в первую очередь гинголевых кислот и/или гинкготоксина.

Популярность ЛС и БАД на основе экстрактов из листьев ГБ на мировом рынке можно оценить по объему их продаж. Например, в Германии он ежегодно составляет в последние годы 400 и более млн евро [9]. Подобных сведений для России найти не удалось, хотя по данным из Интернета следует, что на российском рынке предлагается более 30 различных препаратов, являющихся лекарствами (например, «Танакан» или «Гинкгоум») или парафармацевтиками.

Наиболее объективный показатель мирового интереса к экстрактам ГБ — постоянно возрастающий поток научных исследований. За последние 15 лет опубликовано более 2000 статей, посвященных химии, фармакологии, клиническим испытаниям, безопасности, методам контроля качества экстрактов ГБ, в том числе около 30 обзоров, цитируемых в работе [10]. Пик активности пришелся на 2006—2007 гг., когда было опубликовано или заявлено 1930 статей и патентов, т.е. более двух ежедневно. Основная их цель — химический анализ, контроль качества и лекарственные свойства листьев, экстрактов и фитофармацевтических препаратов из ГБ, в которых содержатся сотни соединений — флавоногликозидов, терпеновых лактонов, изофлавоноидов, бифлавонов, алкилфенолов, проантоцианидинов, карбоновых кислот, полипренолов [11]. Доказанной во многих исследованиях медицинской эффективностью обладают ФГ и ТЛ, улучшающие циркуляцию крови в периферической и центральной системе. Неразделенный, т.е. полный водно-этанольный экстракт из листьев ГБ содержит большое разно-

образии флавоногликозидов (более 100), имеющих от одного до трех углеводных остатков и их ацилированных производных, агликонами которых преимущественно являются кверцетин (1), кемпферол (2) и изорамнетин (3). Состав доминирующих ТЛ включает билобалид (4) и четыре гинкголида — А, В, С и J (5–8). Структурные формулы агликонов ГФ и этих ТЛ представлены на рисунке 1.



**Рис. 1.** Структурные формулы: 1 — кверцетина ( $R = OH$ ); 2 — кемпферола ( $R = H$ ); 3 — изорамнетина ( $R = OCH_3$ ); 4 — билобалида; 5 — гинкголида А (ГА) ( $R' = H, R = H$ ); 6 — гинкголида В (ГБ) ( $R' = OH, R = H$ ); 7 — гинкголида С (ГС) ( $R' = OH, R = OH$ ); 8 — гинкголида J (ГJ) ( $R' = H, R = OH$ ); 9 — гинкголевые кислоты ( $R = C_{13}H_{27}(C13:0), C_{15}H_{31}(C15:0), C_{15}H_{29}(C15:1), C_{17}H_{33}(C17:1)$  или  $C_{17}H_{31}(C17:2)$ ); 10 — гинкготоксин

**(Fig. 1.** Structural formulas of: 1 — quercetin ( $R_1 = OH$ ); 2 — kaempferol ( $R_1 = H$ ); 3 — isorahmnetin ( $R_1 = OCH_3$ ); 4 — bilobalide; 5 — ginkgolide A (GA) ( $R_1 = H, R_2 = H$ ); 6 — ginkgolide B (GB) ( $R_1 = OH, R_2 = H$ ); 7 — ginkgolide C (GC) ( $R_1 = OH, R_2 = OH$ ); 8 — ginkgolide J (GJ) ( $R_1 = H, R_2 = OH$ ); 9 — ginkgolic acids ( $R = C_{13}H_{27}(C13:0), C_{15}H_{31}(C15:0), C_{15}H_{29}(C15:1), C_{17}H_{33}(C17:1)$  or  $C_{17}H_{31}(C17:2)$ ); 10 — ginkgotoxin

Кроме них полный экстракт содержит много других компонент, среди которых наибольшее внимание заслужили гинкголевые кислоты, строение доминирующих представителей которых также представлены на рисунке 1. Если содержание ФГ и ТЛ в листьях ГБ составляет около 0,5 и 0,1%, соответственно, то содержание ГК во много раз больше (до 2%). В обзоре [11] охарактеризованы положительные и отрицательные свойства этих кислот. Среди положительных — противораковые, противострессовые, противодепрессивные, антигрибковые, инсектицидные. Среди отрицательных — аллергические, цитотоксические, эмбриотоксические, иммунотоксические, мутагенные, слабые нейротоксические. Последние обуславливают требование практического отсутствия этих кислот в составе ЛС и БАДов, что нормировано в фармакопеях США, Европы и Китая.

Полный водно-спиртовой экстракт из листьев ГБ используется для детального изучения его состава, который значительно варьируется от условий культивирования и возраста деревьев, климата и времени сбора сырья [12; 13]. Поэтому

он не нормируется по содержанию компонентов. Для производства ЛС и БАДов, напротив, используют стандартизированные экстракты, свойства и состав которых нормированы для обеспечения дозирования приема. Примерные требования к ним представлены в таблице 1.

Таблица 1

**Примерные требования для стандартизированного экстракта гинкго билоба [11]**

Описание	Коричневый порошок с характеристичным запахом
Идентификация	Зелено-коричневый цвет после добавление $\text{FeCl}_3$ к 0,1% раствору в смеси этанол : вода (1:1)
Тяжелые металлы	Не более 20 м.д.
Мышьяк	Не более 2 м.д.
Гинголевые кислоты	Не более 5 м.д. (ВЭЖХ/УФ)
Потеря при высушивании	Не более 5,0% (80 °С, вакуум)
Содержание золы	Не более 1,0%
Суммарное содержание ФГ	Не менее 24,0% (ВЭЖХ/УФ)
Суммарное содержание ТЛ	Не менее 6,0% (ВЭЖХ/РМ)

Table 1

**Exemplary requirements for a standardized ginkgo biloba extract [11]**

Description	Brown powder with characteristic smell
Identity	Green-brown colour after adding $\text{FeCl}_3$ to a 0,1% solution (g/v) in alcohol-water (1:1)
Heavy metals	Not more than 20 ppm
Arsenic	Not more than 2 ppm
Ginkgolic acid	Not more than 5 ppm (HPLC/UV)
Loss on drying	Not more than 5,0% (80 °C, vacuum)
Residue on ignition	Not more than 0,1%
Total flavonoid content	Not less than 24,0% (HPLC/UV)
Total terpen trilactone content	Not less than 6,0% (HPLC/RI)

Такие экстракты получают различными многоступенчатыми процессами, имеющими целью обогащение продукта ТЛ и ФГ и удаление некоторых других групп веществ (бифлавоны, ГК). Компаундированием экстрактов с разным соотношением ФГ и ТЛ достигается требуемый состав. Производители экстрактов осуществляют его контроль по методикам, изложенным в фармакопеях США, Китая, Европы, требующих стандартных образцов отдельных компонентов. Определяется содержание в экстрактах суммы ФГ, основных ТЛ и остаточных ГК. ФГ определяются после гидролиза экстракта по сумме содержания агликонов — кверцетина, кемпферола и изорамнетина. Измерения выполняются методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с рефрактометрическим (РМ), ультрафиолетовым (УФ) или масс-спектрометрическим (МС) детектором. При определении гинголевых кислот используют обращено-фазовую ВЭЖХ с УФ-детектированием. Кроме этих трех анализов для выявления фальсифицированных препаратов Фармакопея США [14] предусматривает определение (до гидролиза) содержания в стандартизированном экстракте кверцетина (*I*) и рутина (кверцетин, в котором атом водорода гидроксильной группы у  $\text{C}_3$  замещен на рутинозид). Первого в аутентичном экстракте практически нет, а рутин не является доминирующей компонентой и его содержание обычно не превышает 5% от суммы ФГ.

Кроме того, Фармакопея США предусматривает определение в продукте кислотного гидролиза отношения агликонов (1:2:3), которое ожидается приблизительно равным 1:1:0.1.

Поскольку детальный анализ для оценки содержания около 50% индивидуальных ФГ в стандартизированном экстракте требует наличия большого набора (около 20) стандартных образцов (СО) отдельных флавоногликозидов, используемые ныне подходы (содержание суммы и отношения отдельных агликонов, выявления содержания рутина и кверцетина) недостаточны для надежного доказательства подлинности препаратов, содержащих экстракт ГБ. Что касается Фармакопеи РФ, то в ГФ XIII фармакопейная статья по ГБ введена впервые в 2015 г. (ФС. 2.5.0010.15). Она ограничивается качественным анализом подлинности ЛС методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) и спектрофотометрическим количественным определением суммы флавоноидов после гидролиза. Других требований к ЛС, аналогичных другим фармакопеям она не содержит. Это открывает возможность попадания на рынок ЛС и БАДов России любых фальсификатов, именуемых экстрактами из листьев ГБ. Для регистрации БАД Роспотребнадзор использует (неофициальные сведения) метод ВЭЖХ/УФ с определением наличия и соотношения содержания агликонов, а содержание ТЛ и ГК не определяется.

Анализ недавних публикаций показывает, что для рынка экстрактов ГБ характерно очень значительное количество фальсификатов. Они обычно содержат рекомендованное количество подлинных ТЛ, как трудносинтезируемых уникальных компонентов, а ФГ добавляют из «чужого» природного (например, флавоноиды гречихи) или синтетически модифицированного сырья для сокращения расходов на достижение рекомендованного (>24%) содержания ФГ. Так, в работе Буккера и др. [15] методами ТСХ и ЯМР  $^1\text{H}$  установлено, что из 35 препаратов ГБ, приобретенных в магазинах Лондона и через Интернет, 33 содержали либо повышенное количество рутина и/или кверцетина, либо пониженное содержание флавоноидов по сравнению со стандартным образцом. В работе [16], выполненной в США методом ВЭЖХ/УФ установлено, что из серии 18 коммерческих препаратов ГБ три фальсифицировано добавлением рутина, четыре — кверцетина, а один содержал неидентифицированный ФГ. Выявление фальсификации ГБ на рынке Японии (8 образцов из 17) опубликовано в работе [17]. Некоторые подходы к выявлению таких препаратов содержит обзор [10]. Все эти работы выполнены с использованием хроматографических методов и требуют наличия труднодоступных разнообразных СО. Представленные факты обуславливают необходимость проведения жесткого контроля ЛС и БАДов, содержащих экстракты ГБ на рынке РФ независимо от информации, представленной в сопроводительной документации. Для этих целей желательно использовать методы, не требующие СО, отличающиеся простотой пробоподготовки и обладающие большой информативностью. Всем этим требованиям соответствует количественная спектроскопия ЯМР  $^1\text{H}$ , позволяющая без СО и сложной пробоподготовки одновременно идентифицировать состав сложных смесей.

## Материалы и методы

*Объекты.* Исследован ряд ЛС и БАДов на основе экстракта ГБ в форме таблеток и капсул, приобретенных на российском рынке лекарственных средств и парафармацевтиков: I. БАД «Гинкго билоба»; II. ЛС «Гинкгоум»; III. БАД «Острум» (все — продукция ЗАО «Эвалар», Россия); IV. ЛС «Танакан» (IPSEN, Франция); V. БАД «Доппельгерц актив Гинкго Билоба+В1+В2+В6» (QueisserPharma, Германия); VI. БАД «Билобил» (КРКА, Словения); VII. БАД «Гинкго билоба» (ООО «Натурофарм», Россия); VIII. БАД «Гинос» (ПАО «Верофарм», Россия). По информации производителей разовая доза (таблетка или капсула) препаратов I, II, IV, VI, VII, VIII содержит 40 мг экстракта, препарата V — 30 мг и препарата III — 20 мг. Кроме них исследован экстракт из листьев ГБ, любезно предоставленный ЗАО «Эвалар» (IX).

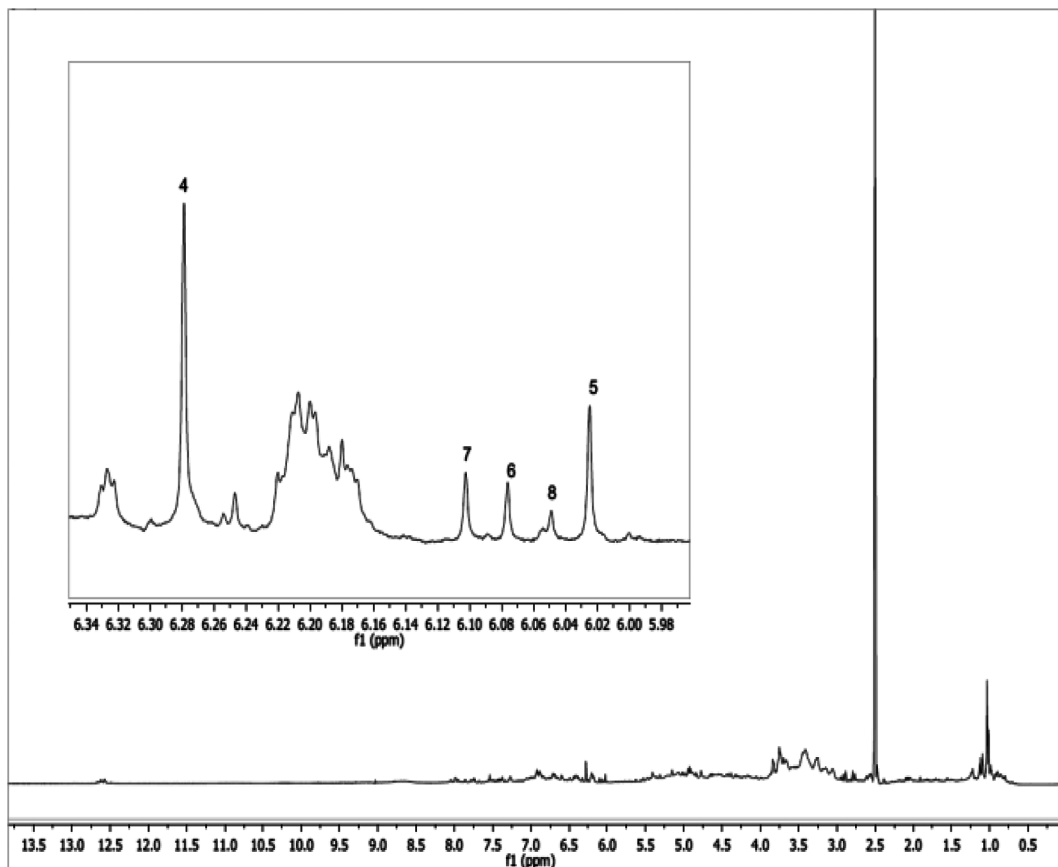
*Пробоподготовка.* Таблетку растирают в ступке до образования порошка, навеску которого, предварительно взвесив (точная навеска), помещают в эппендорф и заливают 1 мл дейтерированного растворителя. Навески содержимого капсул взвешивают (точная навеска), помещают в эппендорф и также заливают 1 мл дейтерированного растворителя. Эппендорфы в течение 10 мин встряхивают на Vortex, 10 мин обрабатывают ультразвуком и на 5 мин помещают в центрифугу (14 000 об/мин). Надосадочную жидкость переносят в стандартную ампулу для ЯМР диаметром 5 мм и регистрируют спектр ЯМР  $^1\text{H}$ . Для каждого препарата готовится три параллельных образца, т.е. три таблетки или капсулы.

*Растворители.* Для регистрации спектров ЯМР  $^1\text{H}$  использованы дейтерированные растворители: ацетон- $\text{d}_6$  (99,9%, Sigma-Aldrich) и ДМСО- $\text{d}_6$  (99,9%, Sigma-Aldrich). Содержание в них изотопомеров ацетона- $\text{d}_5$  и ДМСО- $\text{d}_5$  определялось путем измерения количественных спектров раствора стандартных образцов бензоата натрия и бензойной кислоты в этих растворителях в качестве внутренних эталонов (1 мг в 1 мл ацетона- $\text{d}_6$  и ДМСО- $\text{d}_6$ ). Найдено, что используемый ацетон- $\text{d}_6$  имеет обогащение 99,92%, а ДМСО- $\text{d}_6$  — 99,91. Это несколько выше гарантированного производителем. Знание точного содержания остаточных протонов в выбранных растворителях позволяет использовать в спектре их сигналы  $^1\text{H}$  в качестве сигналов внутреннего стандарта при количественных измерениях содержания компонентов в препаратах.

*Спектры ЯМР  $^1\text{H}$ .* Использован ЯМР высокого разрешения со сверхпроводящим магнитом JNM-ECX (JEOL, Япония) с рабочей частотой для протонов 600 МГц. Условия измерений: импульс —  $90^\circ$ , развертка спектра — 18 м.д., центр спектра — 7 м.д., точек на спектр — 32 К, время считывания сигнала — 3,64 с, время задержки между импульсами — 15 с, количество накоплений — 16, затраты времени на каждый спектр около 5 мин, температура измерений  $23^\circ\text{C}$ . Коррекция фазы и базовой линии проводится автоматически, интегрирование — вручную. Специальными экспериментами с индивидуальными флавоноидами и их добавками в коммерческие препараты установлено, что погрешности определения ТЛ не превышают 0,3%, а ФГ — 0,5%.

### Обсуждение результатов

Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  в ДМСО- $d_6$  гинкголидов впервые были зарегистрированы в работе [18], а билобалида — [19]. Для целей их количественного определения всегда использованы сигналы синглетные протона у С-12, которые в гинкголидах А, J, В, С и в билобалиде имеют химическими сдвиги 6,02, 6,03, 6,07, 6,10 и 6,21 м.д., соответственно.



**Рис. 2.** Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  препарата VIII в ДМСО- $d_6$  и его выделенный фрагмент, содержащий сигналы ТЛ 4—8

**(Fig. 2.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of preparation VIII in DMSO- $d_6$  and its isolated fragment containing signals of TL 4—8)

Для определения содержания ТЛ в препаратах I — VIII указанные методики использованы авторами с некоторыми изменениями (выбор внутреннего стандарта, условия регистрации и обработки спада свободной индукции). Количественное содержание отдельных ТЛ определялось сравнением интегральных интенсивностей их сигналов Н-12 и сигнала остаточных протонов (ОП) ДМСО- $d_5$  (2,5 м.д.) и рассчитывалось по формуле

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

где  $m$  — масса ТЛ, мг;  $n(\text{ОП})$  — количество вещества ДМСО- $d_6$ , моль;  $I(\text{ТЛ})$  — интегральная интенсивность сигнала Н-12 ТЛ;  $I(\text{ОП})$  — интегральная интенсивность сигнала ОП;  $M(\text{ТЛ})$  — молярная масса ТЛ, г/моль.

Результаты определения содержания ТЛ в изученных препаратах представлены в таблице 2. Суммарное содержание их доли в препаратах I—III и VI близки к показателю для стандартизированного образца, но для IV и VIII существенно ниже.

Все без исключения ФГ, входящие в состав экстрактов ГБ, содержат в положении 5 кольца А гидроксильную группу (5-ОН), а все гликозидные и иные заместители, как правило, располагаются в положениях 3 и/или 7 колец С и А, а также 3' и 4' кольца В.

Таблица 2

**Содержание терпеновых лактонов и флавоногликозидов в препаратах гинкго билоба**

Препарат	ББ, мг	ГА, мг	ГВ, мг	ГС, мг	ГJ, мг	ΣТЛ, мг	ΣТЛ, %	ΣФГ, мг	ΣФГ, %
I	0,9	0,55	0,26	0,25	0,12	2,08	5,2	10,45	26,1
II	0,98	0,65	0,28	0,29	0,17	2,36	5,9	10,45	26,1
III	0,43	0,43	0,17	0,16	0,06	1,26	6,2	5,35	26,8
IV	0,6	0,28	0,14	0,22	0,06	1,29	3,2	9,45	23,6
V	0,59	0,22	0,15	0,2	0,04	1,2	4,0	7,71	25,7
VI	0,95	0,38	0,23	0,4	0,17	2,12	5,3	13,19	32,9
VII*	1,01	0,61	0,42	0,34	0,11	2,49	6,2	—	—
VIII	0,45	0,22	0,14	0,18	0,03	1,02	2,6	10,45	26,1
IX	1,89	0,96	0,37	0,46	0,31	3,99	6,8	17,47	29,8

\* Образец VII в растворителе ДМСО- $d_6$  образует суспензию, что не позволяет получение спектра ЯМР  $^1\text{H}$ . Представлены результаты для раствора в ацетоне- $d_6$ .

Table 2

**Content of terpene lactones (TL) and flavonoglycosides (FG) in preparations of ginkgo biloba**

Preparation	BB, mg	GA, mg	GB, mg	GC, mg	GJ, mg	ΣTL, mg	ΣTL, %	ΣFG, mg	ΣFG, %
I	0,9	0,55	0,26	0,25	0,12	2,08	5,2	10,45	26,1
II	0,98	0,65	0,28	0,29	0,17	2,36	5,9	10,45	26,1
III	0,43	0,43	0,17	0,16	0,06	1,26	6,2	5,35	26,8
IV	0,6	0,28	0,14	0,22	0,06	1,29	3,2	9,45	23,6
V	0,59	0,22	0,15	0,2	0,04	1,2	4,0	7,71	25,7
VI	0,95	0,38	0,23	0,4	0,17	2,12	5,3	13,19	32,9
VII*	1,01	0,61	0,42	0,34	0,11	2,49	6,2	—	—
VIII	0,45	0,22	0,14	0,18	0,03	1,02	2,6	10,45	26,1
IX	1,89	0,96	0,37	0,46	0,31	3,99	6,8	17,47	29,8

\* Sample VII forms a suspension in a DMSO- $d_6$  solvent, which did not allow the registration of the  $^1\text{H}$  NMR spectrum. Results for the solution in acetone- $d_6$

Возможно количественное определение групп ФГ в экстракте ГБ после гидролиза методом спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  [20]. В исследуемом образце при этом остаются только три агликона: кемпферол, кверцетин и изорамнетин, что существенно упрощает интерпретацию спектра ЯМР  $^1\text{H}$ . Идентификацию и количественное определение кверцетина и изорамнетина проводят по интенсивности сигналов

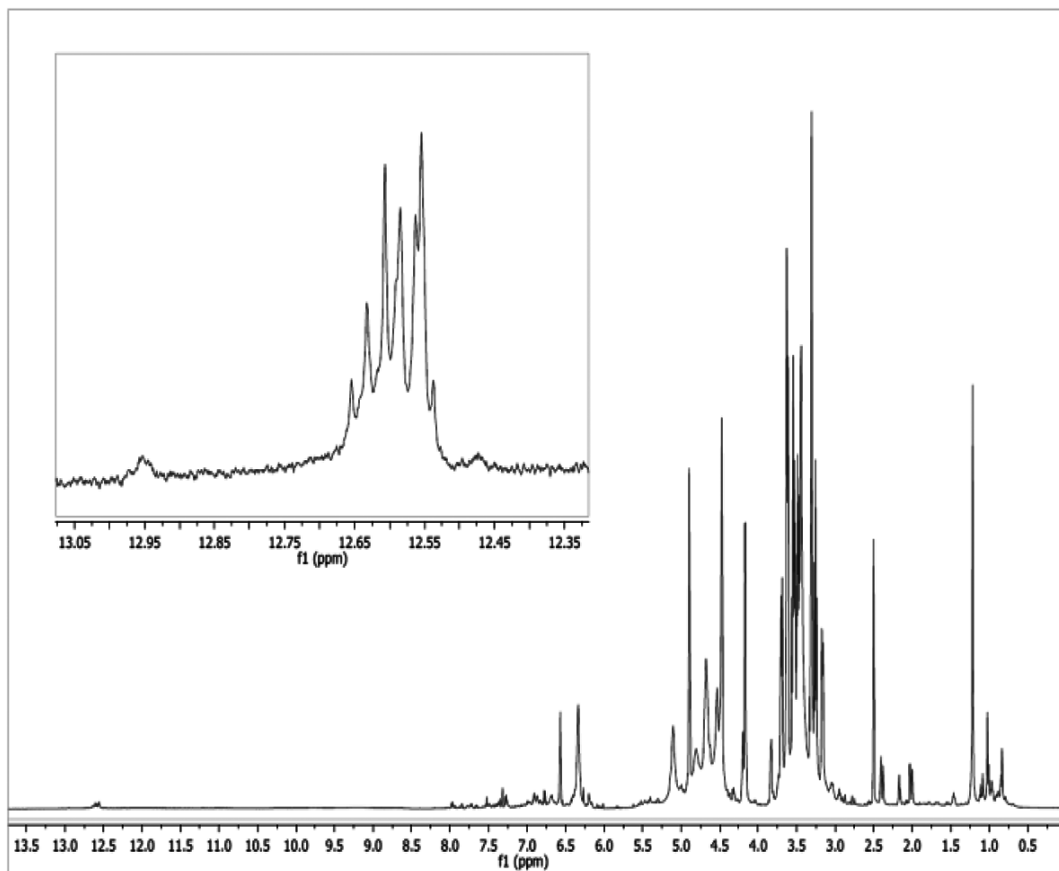


ароматических протонов Н-2', кемпферола — по интегральной интенсивности сигналов протонов Н-2' и Н-6'. Однако такой подход «по останкам ФГ» немногим лучше методик ВЭЖХ/УФ.

Полный анализ спектров ЯМР  $^1\text{H}$  модельных соединений (пять ТЛ, три агликона, рутин) и серии из 6 коммерческих препаратов ГБ без проведения гидролиза показал [21], что суммарное количество в них агликонов не превосходит 1,1% вес., а содержание изорамнетина ниже предела детектирования. Рутин составляет от 0,65 до 3,33% в пяти случаях, а в одном образце 12%. Последний, по-видимому, фальсифицирован. Для определения суммы ФГ в натуральных объектах разработанный алгоритм неэффективен, хотя может быть полезен для выявления фальсификатов, обогащенных агликонами или рутином, что достигается ВЭЖХ/УФ.

Авторами впервые разработан принципиально новый метод количественного определения как суммы флавоноидов, так и их классификации, и индивидуализации в препаратах ГБ по интегральной интенсивности сигналов протона ОН-группы в положении 5 (5-ОН) кольца А. Неизвестно ни одного ФГ, образующего гликозидную связь через кислород 5-ОН, поскольку эта гидроксильная группа образует сильную внутримолекулярную водородную связь с кислородом карбонильной группы (см. рис. 1). Поэтому в спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  ФГ протон 5-ОН наименее экранирован относительно протонов всех иных гидроксильных групп. В зависимости от строения агликона, положения и особенностей строения гликозидной части его сигнал проявляется в области от 11,8 до 13,20 м.д. Это установлено авторами при изучении вариации его положения в растворителе ДМСО- $d_6$  в флавоноидах различного строения: кверцетине, дигидрокверцетине, рутине, гесперидине и диосмине. Для них определены химические сдвиги 12,46 м.д., 11,87 м.д., 12,56 м.д., 12,03 м.д., 12,93 м.д., соответственно. Основываясь на этих и ранее опубликованных данных [22; 23] установлено, что вне зависимости от наличия гликозидной части вместо атома водорода одной или нескольких гидроксильных групп флавоногликозида, сигнал протона 5-ОН проявляется в одной из четырех указанных далее областей. Первая (11,80–12,20 м.д.) соответствует ФГ с насыщенной связью в положении 2-3 и гидроксильной группой в положении 3. Вторая (12,0–12,20 м.д.) — ФГ с насыщенной связью в положении 2-3 и без гидроксильной группы в положении 3. Третья (12,45–12,65) — ФГ с кратной связью в положении 2-3 и группами ОН или ОР в положениях 3 и 7. Четвертая (12,80–13,10) — ФГ с кратной связью в положении 2-3 и без гидроксильной группы в положении 3. Из полученных авторами в растворителе ДМСО- $d_6$  спектров ЯМР  $^1\text{H}$ , изученных препаратов следует, что почти все идентифицированные ФГ экстракта ГБ относятся к третьей группе и содержат в положении 3 группу ОН либо гликозидный фрагмент.

В состав экстракта ГБ входят флавоноиды с различным размером гликозидной части (1–3 углеводных остатка), т.е. и молекулярной массой. Усредненное отношение молекулярной массы ФГ и их агликонов близко к 2,5 [10; 24]. Отсюда необходимое для расчета суммарного содержания ФГ по интегральной интенсивности сигнала протона 5-ОН значение средней молекулярной массы найдено в количестве 759 г/моль.



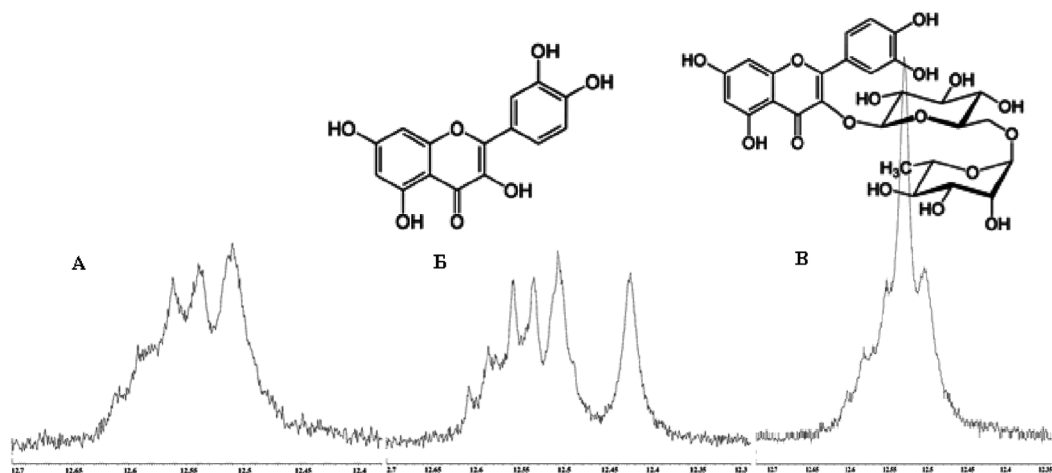
**Рис. 3.** Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  препарата VI в ДМСО- $d_6$  и его фрагмент, содержащий сигналы протонов 5-ОН (Fig. 3.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of preparation VI in DMSO- $d_6$  and its fragment, containing signals of 5-OH protons)

Предлагаемая методика количественного определения типов и суммы ФГ в экстрактах ГБ базируется на результатах изучения серии индивидуальных флавоноидов. На рисунке 3 представлено увеличенное изображение области спектра ЯМР  $^1\text{H}$  препарата VI, в которой проявляются сигналы протонов 5-ОН. Видно, что в этом образце содержится не менее десяти доминирующих ФГ в области 12,50–12,65 м.д., а также небольшие сигналы около 12,47 и 12,95. Количественное содержание их суммы определяется сравнением интегральной интенсивности суперпозиции этих сигналов с сигналом остаточных протонов (ОП) ДМСО- $d_5$  (2,5 м.д.) по уравнению, аналогичному приведенному ранее для ТЛ.

Результаты определения содержания суммы ФГ из спектров ЯМР  $^1\text{H}$  в препаратах I–VI и VIII показывают, что во всех препаратах, кроме VI, они близки к показателю для стандартизованного образца (см. табл. 2).

Возможность разработанной методики выявлять фальсификацию препаратов ГБ индивидуальными агликонами или рутином оценена путем добавления в препарат VIII 1,1 мг кверцетина или 4,7 мг рутина. Фрагменты спектра (рис. 4) в области 12,4–12,7 м.д. демонстрируют ее эффективность. Характерно, что хотя в

препарате VI содержание ФГ несколько выше, чем в других образцах и выходит за границы типичного диапазона (22–27%), вид сигнала 5-ОН (см. рис. 3) не выявляет в нем искусственных примесей, если не учитывать небольшой уширенный сигнал агликонов в области 12,45–12,50 м.д., площадь которого менее 1% от общей.



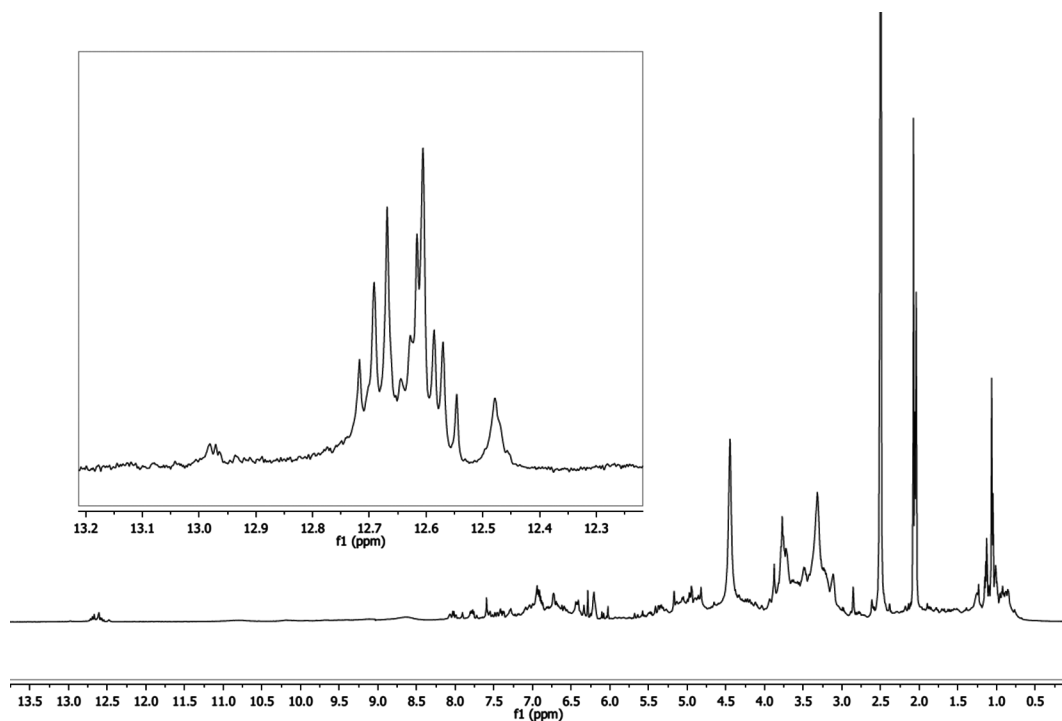
**Рис. 4.** Фрагмент спектра ЯМР  $^1\text{H}$  препарата VIII (А), препарата VIII с добавкой кверцетина 1,1 мг (Б), препарата VIII с добавкой рутина 4,7 мг (Б)  
**(Fig. 4.** A fragment of the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of preparation VIII (A), preparation VIII supplemented with quercetin 1,1 mg (B), preparation VIII supplemented with rutin 4,7 mg (B))

Регистрация спектров ЯМР  $^1\text{H}$  экстрактов ГБ в растворителе ацетон- $\text{d}_6$  показала несколько пониженную относительную интенсивность сигналов протонов 5-ОН групп по сравнению с раствором в ДМСО- $\text{d}_6$ , что можно объяснить частичным их дейтерированием за счет протонного обмена. Однако качественная информативность такого спектра несколько выше. Во фрагменте спектра ЯМР  $^1\text{H}$  экстракта ГБ IX в смеси ДМСО- $\text{d}_6$ :ацетон- $\text{d}_6$  (60:40) (рис. 5) проявляются более 15 сигналов отдельных ФГ, в том числе присутствие агликонов. При наличии стандартных образцов в таких спектрах могут быть идентифицированы и полуколичественно определены содержания иных ФГ. Такой прием целесообразен для выявления фальсификации экстрактов ГБ путем добавления «чужеродных» более доступных по цене композиций аналогичных флавоноидов (например, из гречихи посевной или серпухи венценосной).

В изученной серии препаратов три (IV, V, VIII) содержат пониженное содержание ТЛ, один (V) содержит значительную примесь агликонов, два (IV, VII) имеют аномально неразрешенные сигналы протонов 5-ОН. Только спектры ЯМР  $^1\text{H}$  препаратов I–III и VI соответствуют нормативным требованиям (см. табл. 1) однако, отсутствие для них сведений по содержанию гинкголевых кислот не позволяет признать их соответствующими характеристикам для стандартизованного экстракта.

Полученные результаты по определению содержания ФГ имеют более широкую область применения, чем экспресс-экспертиза препаратов ГБ без химиче-

ского преобразования при пробоподготовке и без использования стандартных образцов. Разработанный метод выявления, структурного и количественного анализа флавоноидов может быть успешно адаптирован для многих других растительных экстрактов, содержащих подобные флавоноиды. В настоящее время авторами изучаются экстракты из шлемника байкальского (*Scutellariae baicalensis*) и расторопши пятнистой (*Silybum marianum*).



**Рис. 5.** Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  в смеси растворителей ДМСО- $\text{d}_6$ :Ацетон- $\text{d}_6$  (60:40) экстракта гинкго билоба  
**(Fig. 5.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of ginkgo biloba extract in a mixture of DMSO- $\text{d}_6$  and Acetone- $\text{d}_6$  (60:40))

В заключении следует отметить, что предложенный новый и наиболее информативный подход на основе спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  позволяет быстро и без использования СО определить содержание в экстрактах ГБ отдельных ТЛ и ФГ. Однако с позиции требования безопасности следует дополнительно определять в экстрактах ГБ содержание ГК и гингготоксина. в возможного остаточного содержания [25]. Хотя он более характерен для семян ГБ, но возможно его присутствие при неправильной технологии получения экстрактов из листьев. В силу недостаточной чувствительности метода для этого следует привлекать иные известные методики оценки.

## Выводы

1. Установлено несовершенство аналитической базы, используемой для доказательства подлинности экстрактов ГБ, лекарственных препаратов и пищевых добавок на их основе.

2. Предложена методика одновременного определения ТЛ и ФГ в ЛС и БАДах на основе экстрактов ГБ методом спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$ , превосходящая по простоте, скорости и информативности любые ранее известные.

3. Использование ЛС и БАДов, содержащих препараты из экстрактов ГБ, целесообразно только при условии их предварительного анализа на подлинность и предельное содержание гинкгоидных кислот и гинкготоксинов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] *Jensen A.G., Ndjoko K., Wolfender J.L., Hostettmann K., Camponovo F., Soldati F.* Liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation/mass spectrometry: a rapid and selective method for the quantitative determination of ginkgolides and bilobalide in Ginkgo leaf extracts and phytopharmaceuticals // *Phytochem. Anal.* 2002. V. 13. P. 31–38.
- [2] *Singh B., Kaur Gopichand P., Singh R.D., Ahuja P.S.* Biology and chemistry of Ginkgo biloba // *Fitoterapia.* 2008. V. 79. P. 401–418.
- [3] *Solfrizzi V., Panza F.* Plant-based nutraceutical interventions against cognitive impairment and dementia: meta-analytic evidence of efficacy of a standardized Ginkgo biloba extract // *J. Alzheimers Dis.* 2015. V. 43. P. 605–611.
- [4] *Xiong X.J., Liu W., Yang X.C., Feng B., Zhang Y.Q., Li S.J., Li X.K., Wang J.* Ginkgo biloba extract for essential hypertension: a systemic review // *Phytomedicine.* 2014. V. 21. P. 1131–1136.
- [5] *Chu X., Ci X., He J., Wei M., Yang X., Cao Q., Li H., Guan S., Deng Y., Pang D., Deng X.* A novel anti-inflammatory role for ginkgolide B in asthma via inhibition of the ERK/MAPK signaling pathway // *Molecules.* 2011. V. 16. P. 7634–7648.
- [6] *Hilton M.P., Zimmermann E.F., Hunt W.T.* Ginkgo biloba for tinnitus, Cochrane Db // *Syst. Rev.* 2013. V. 3.
- [7] *DeKosky S.T., Williamson J.D., Fitzpatrick A.L., Kronmal R.A., Ives D.G., Saxton J.A., Lopez O.L., Burke G., Carlson M.C., Fried L.P., Kuller L.H., Robbins J.A., Tracy R.P., Woolard N.F., Dunn L., Snitz B.E., Nahin R.L., Furberg C.D.* Ginkgo biloba for prevention of dementia: a randomized controlled trial // *J. Am. Med. Assoc.* 2008. V. 300. P. 2253.
- [8] *Schneider L.S.* Ginkgo biloba extract and preventing Alzheimer disease // *J. Am. Med. Assoc.* 2008. V. 300. P. 2306.
- [9] *Van Beek T.A.* Chemical analysis of Ginkgo biloba leaves and extracts // *J. Chromatogr. A.* 2002. V. 967. P. 21–55.
- [10] *Liu X.G., Wu S.Q., Li P., Yang H.* Advancement in the chemical analysis and quality control of flavonoids in Ginkgo biloba // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2015. V. 113. P. 212–225.
- [11] *T.A. van Beek, Montoro P.* Chemical analysis and quality control of Ginkgo biloba leaves extracts, and phytopharmaceuticals // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. P. 2002–2032.
- [12] *Drieu K., Jaggy H.* History, development and constituents of EGb 761. in: T.A. van Beek (Ed.), *Ginkgo biloba*, Harwood. Amsterdam. 2000. P. 265.
- [13] *O'Reilly J., in: T.A. van Beek (Ed.)* Ginkgo biloba — large scale extraction and processing. *Ginkgo biloba*, Harwood. Amsterdam. 2000. P. 99.
- [14] USP 38 — NF 33: United States Pharmacopeia. 2015.
- [15] *Booker A., Frommenwiler D., Reich E., Horsfield S., Heinrich M.* Adulteration and Poor Quality of Ginkgo Biloba Supplements // *Journal of Herbal Medicine.* 2016. V. 6. P. 79–87.
- [16] *Harnly J.M., Luthria D., Chen P.* Detection of Adulterated Ginkgo biloba Supplements Using Chromatographic and Spectral Fingerprints // *Journal of AOAC International.* 2012. V. 95 (6). P. 1579–1587.
- [17] *Kakigi Y., Nakamatsuka T., Icho T., Goda Y., Mochizuki N.* Investigation of Biologically Active Components in Ginkgo Leaf Products on the Japanese Market // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* V. 75 (4). P. 777–779.

- [18] Weinges K., Hepp M., Jaggy H. Isolierung und Structuraufklarung eines neuen Ginkgolids // *Liebigs Ann. Chem.* 1987. P. 521–526.
- [19] Weinges K., Bahr W. Bilobalid A, ein neues Sesquiterpen mitt ret-Butyl-Gruppe aus den Blattern von Ginkgo biloba L. // *Liebigs Ann. Chem.* 1969. P. 214–216.
- [20] Li Ch. Y., Lin Ch. H., Wu Ch. Ch., Lee K. H., Wu T. Sh. Efficient  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance Method for Improved Quality Control Analyses of Ginkgo Constituents // *J. Agric. Food Chem.* 2004. V. 52. P. 3721–3725.
- [21] Napolitano J.G., Godecke T., Rodrigues-Brasco M.F., Jaki B.U., Chen Sh.N., Lankin D.C., Pauli G.F. The tandem of Full Spin Analysis and qHNMR for the Quality Control of botanicals exemplified with Ginkgo Biloba // *J. Nat. Prod.* 2012. V. 75. P. 238–248.
- [22] Charisiadis P., Kontogianni V.G., Tsiafoulis C.G., Tzakos A.G., Siskos M., Gerathanassis I.P.  $^1\text{H}$ -NMR as a structural and analytical tool of intra- and intermolecular hydrogen bonds of phenol-containing natural products and model compounds // *Molecules.* 2014. V. 19. P. 13643–13682.
- [23] Шейченко В.И., Шейченко О.П., Ануфриев В.В., Толкачев О.Н., Дюмаев К.М., Сокольская Т.А. Изучение состава фенольного компонента метаболома растений методом ЯМР // *Химико-фармацевтический журнал.* 2016. Т. 50. № 2. С. 51–57.
- [24] Gray D.E., Upton R., Chandra A., Porter A., Harris R.K. Quantitative analysis of flavonol glycosides in Ginkgo Biloba: a comparison of two analytical methods // *Phytochem Anal.* 2006. V. 16(1). P. 56–62.
- [25] Choi Y.H., Choi H.-K., Peltenburg-Looman A.M.G., Lefeber A.W.M., Verpoorte R. Quantitative Analysis of Ginkgolic Acids from Ginkgo Leaves and Products Using  $^1\text{H}$ -NMR // *Phytochem. Anal.* 2004. V. 15. P. 325–330.

© Васильев В.Г., Калабин Г.А.,  
Букаса Митео Иван, Рудачевский Д.Д., 2017

#### История статьи:

Дата поступления в редакцию: 12.04.2017

Дата принятия к печати: 28.08.2017

#### Для цитирования:

Васильев В.Г., Калабин Г.А., Букаса Митео Иван, Рудачевский Д.Д. О необходимости совершенствования контроля безопасности и качества экстрактов из листьев гинкго билоба // *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности.* 2017. Т. 25. № 3. С. 414–430. DOI 10.22363/2313-2310-2017-25-3-414-430

#### Сведения об авторах:

Васильев Василий Геннадьевич — аспирант кафедры системной экологии Российского университета дружбы народов. E-mail: vasiliev\_vg@rudn.university

Калабин Геннадий Александрович — доктор химических наук, профессор, профессор кафедры системной экологии Российского университета дружбы народов. E-mail: kalabin\_ga@rudn.university

Букаса Митео Иван — аспирант кафедры системной экологии Российского университета дружбы народов.

Рудачевский Дмитрий Дмитриевич — бакалавр экологии и природопользования кафедры системной экологии Российского университета дружбы народов.

## ON THE NEED TO IMPROVE THE SAFETY AND QUALITY CONTROL OF EXTRACTS FROM THE LEAVES OF GINKGO BILOBA

V.G. Vasil'ev, G.A. Kalabin, Bucasa Miteo Ivan, D.D. Rudachevskiy

Peoples' Friendship University of Russia  
Miklukho-Maklaya str., 6, Moscow, Russia, 117198

The issue of safety and quality examination of natural food additives and medicinal products is considered on the example of extracts from leaves of ginkgo biloba — nootropics, the most popular in the world both in terms of consumption and scientific interest. The requirements to the composition of preparations and methods of their control are characterized. A new original methodology for the determination of the content in commercial preparations of individual terpene lactones, flavonoglycosides of various groups and their aglycones by  $^1\text{H}$  NMR is proposed. A number of adulterated and/or low-quality preparations have been identified. The ways of expertise improving are proposed, including the definition of the minor components content.

**Key words:** Ginkgo biloba, dietary supplements, medicines, NMR spectroscopy, quality control, authenticity, flavonoglycosides, terpene lactones, ginkgolic acids, ginkgotoxine

### REFERENCES

- [1] Jensen A.G., Ndjoko K., Wolfender J.L., Hostettmann K., Camponovo F., Soldati F. Liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation/mass spectrometry: a rapid and selective method for the quantitative determination of ginkgolides and bilobalide in Ginkgo leaf extracts and phytopharmaceuticals. *Phytochem. Anal.* 2002; 13: 31–38.
- [2] Singh B., Kaur Gopichand P., Singh R.D., Ahuja P.S. Biology and chemistry of Ginkgo biloba. *Fitoterapia.* 2008; 79: 401–418.
- [3] Solfrizzi V., Panza F. Plant-based nutraceutical interventions against cognitive impairment and dementia: meta-analytic evidence of efficacy of a standardized Ginkgo biloba extract. *J. Alzheimers Dis.* 2015; 43: 605–611.
- [4] Xiong X.J., Liu W., Yang X.C., Feng B., Zhang Y.Q., Li S.J., Li X.K., Wang J. Ginkgo biloba extract for essential hypertension: a systemic review. *Phytomedicine.* 2014; 21: 1131–1136.
- [5] Chu X., Ci X., He J., Wei M., Yang X., Cao Q., Li H., Guan S., Deng Y., Pang D., Deng X. A novel anti-inflammatory role for ginkgolide B in asthma via inhibition of the ERK/MAPK signaling pathway. *Molecules.* 2011; 16: 7634–7648.
- [6] Hilton M.P., Zimmermann E.F., Hunt W.T. Ginkgo biloba for tinnitus, Cochrane Db. *Syst. Rev.* 2013; 3.
- [7] DeKosky S.T., Williamson J.D., Fitzpatrick A.L., Kronmal R.A., Ives D.G., Saxton J.A., Lopez O.L., Burke G., Carlson M.C., Fried L.P., Kuller L.H., Robbins J.A., Tracy R.P., Woolard N.F., Dunn L., Snitz B.E., Nahin R.L., Furberg C.D. Ginkgo biloba for prevention of dementia: a randomized controlled trial. *J. Am. Med. Assoc.* 2008; 300: 2253.
- [8] Schneider L.S. Ginkgo biloba extract and preventing Alzheimer disease. *J. Am. Med. Assoc.* 2008; 300: 2306.
- [9] Van Beek T.A. Chemical analysis of Ginkgo biloba leaves and extracts. *J. Chromatogr. A.* 2002; 967: 21–55.
- [10] Liu X.G., Wu S.Q., Li P., Yang H. Advancement in the chemical analysis and quality control of flavonoids in Ginkgo biloba. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2015; 113: 212–225.
- [11] T.A. van Beek, P. Montoro, Chemical analysis and quality control of Ginkgo biloba leaves extracts, and phytopharmaceuticals. *J. Chromatogr. A.* 2009; 1216: 2002–2032.

- [12] Drieu K., Jaggy H. History, development and constituents of EGb 761. in: T.A. van Beek (Ed.), *Ginkgo biloba*, Harwood. Amsterdam. 2000: 265.
- [13] O'Reilly J., in: T.A. van Beek (Ed.), *Ginkgo biloba — large scale extraction and processing*. Ginkgo biloba, Harwood. Amsterdam. 2000: 99.
- [14] USP 38 — NF 33: United States Pharmacopeia. 2015.
- [15] Booker A., Frommenwiler D., Reich E., Horsfield S., Heinrich M. Adulteration and Poor Quality of Ginkgo Biloba Supplements. *Journal of Herbal Medicine*. 2016; 6: 79–87.
- [16] Harnly J.M., Luthria D., Chen P. Detection of Adulterated Ginkgo biloba Supplements Using Chromatographic and Spectral Fingerprints. *Journal of AOAC International*. 2012; 95 (6):1579–1587.
- [17] Kakigi Y., Nakamatsuka T., Icho T., Goda Y., Mochizuki N. Investigation of Biologically Active Components in Ginkgo Leaf Products on the Japanese Market. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 75 (4): 777–779.
- [18] Weinges K., Hepp M., Jaggy H. Isolierung und Structuraufklärung eines neuen Ginkgolids. *Liebigs Ann. Chem*. 1987; 521–526.
- [19] Weinges K., Bahr W. Bilobalid A, ein neues Sesquiterpen mitt ret-Butyl-Gruppe aus den Blättern von Ginkgo biloba L. *Liebigs Ann. Chem*. 1969; 214–216.
- [20] Li Ch.Y., Lin Ch.H., Wu Ch.Ch., Lee K.H., Wu T.Sh. Efficient <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Method for Improved Quality Control Analyses of Ginkgo Constituents. *J. Agric. Food Chem*. 2004; 52: 3721–3725.
- [21] Napolitano J.G., Godecke T., Rodrigues-Brasco M.F., Jaki B.U., Chen Sh.N., Lankin D.C., Pauli G.F. The tandem of Full Spin Analysis and qHNMR for the Quality Control of botanicals exemplified with Ginkgo Biloba. *J. Nat. Prod*. 2012; 75: 238–248.
- [22] Charisiadis P., Kontogianni V.G., Tsiafoulis C.G., Tzakos A.G., Siskos M., Gerothanassis I.P. <sup>1</sup>H-NMR as a structural and analytical tool of intra- and intermolecular hydrogen bonds of phenol-containing natural products and model compounds. *Molecules*. 2014; 19: 13643–13682.
- [23] Sheichenko V.I., Sheichenko O.P., Anufrieva V.V., Tolkachev O.N., Dyumaev K.M., Sokol'skaya T.A. NMR study of the phenolic component composition of plant metabolomes. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016; 50(2): 51–57.
- [24] Gray D.E., Upton R., Chandra A., Porter A., Harris R.K. Quantitative analysis of flavonol glycosides in Ginkgo Biloba: a comparison of two analytical methods. *Phytochem Anal*. 2006; 16(1): 56–62.
- [25] Choi Y.H., Choi H.-K., Peltenburg-Looman A.M.G., Lefeber A.W.M., Verpoorte R. Quantitative Analysis of Ginkgolic Acids from Ginkgo Leaves and Products Using <sup>1</sup>H-NMR // *Phytochem. Anal*. 2004. V. 15. P. 325–330.

#### Article history:

Received: 12.04.2017

Revised: 28.08.2017

#### For citation:

Vasil'ev V.G., Kalabin G.A., Bucasa Miteo Ivan, Rudachevskiy D.D. (2017) On the need to improve the safety and quality control of extracts from the leaves of ginkgo biloba. *RUDN Journal of Ecology and Life Safety*, 25 (3), 414–430. DOI 10.22363/2313-2310-2017-25-3-414-430

#### Bio Note:

Vasiliev Vasily Gennadievich — post-graduate student of the Department of System Ecology of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “Peoples' Friendship University of Russia”. E-mail: vasiliev\_vg@rudn.university



*Kalabin Gennady Aleksandrovich* — Doctor of Chemical Sciences, Professor, Professor of the Department of System Ecology of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “Peoples’ Friendship University of Russia”. E-mail: kalabin\_ga@rudn.university

*Bukasa Miteo Ivan* — a graduate student of the Department of System Ecology of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “Peoples’ Friendship University of Russia”.

*Rudachevsky Dmitry Dmitrievich* — Bachelor of Ecology and Nature Management, Department of System Ecology of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “Peoples’ Friendship University of Russia”.