

JOANNA KOBUS-CISOWSKA<sup>1</sup>, EWA FLACZYK<sup>1</sup>, PAWEŁ JUSZCZAK<sup>2,3</sup>, DOMINIK KMIECIK<sup>1</sup>,  
BARTOSZ KULCZYŃSKI<sup>1</sup>, MARZENA GRDEŃ<sup>1</sup>, JUSTYNA PIECHOCKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Technologii Żywienia Człowieka  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

<sup>2</sup>Katedra Higieny Żywienia Człowieka  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

<sup>3</sup>Katedra i Klinika Chirurgii, Traumatologii i Urologii Dziecięcej  
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

## WPLYW OKRESU WEGETACJI NA ZAWARTOŚĆ BILOBALIDU I GINKGOLIDÓW W EKSTRAKTACH Z LIŚCI MIŁORZĘBU DWUKLAPOWEGO (*GINKGO BILOBA* L.)

THE INFLUENCE OF THE VEGETATION PERIOD  
ON THE CONTENT OF BILOBALIDE AND GINKGOLIDES IN *GINKGO BILOBA*  
(*GINKGO BILOBA* L.) LEAF EXTRACTS

### Abstrakt

**Wstęp.** Miłorząb dwuklapowy (*Ginkgo biloba* L.) budzi duże zainteresowanie ze względu na swój wielokierunkowy wpływ na układ nerwowy i sercowo-naczyniowy, potwierdzony w licznych badaniach farmakologicznych i klinicznych. Farmakologia szeroko wykorzystuje ekstrakt z zielonych liści miłorzębu, pozyskany w drodze ściśle zdefiniowanego procesu wytwarzania. Celem pracy była ocena wpływu warunków ekstrakcji różnymi ekstrahentami na zawartość bilobalidu i ginkgolidów w ekstraktach sporządzonych z suszu liści żółtych i zielonych miłorzębu dwuklapowego.

**Materiał i metody.** Materiałem poddanym analizom chemicznym był susz z liści zielonych i żółtych miłorzębu dwuklapowego, który poddano ekstrakcji z wykorzystaniem wody, acetonu i alkoholu etylowego. Zawartość ginkgolidów i bilobalidu w otrzymanych ekstraktach oznaczono z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej [HPLC Agilent 1100 z detekcją DAD (High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector)], a tożsamość badanych związków potwierdzono poprzez porównanie z substancją referencyjną.

**Wyniki.** Stwierdzono, że zawartość bilobalidu i ginkgolidów w ekstraktach z miłorzębu dwuklapowego zależała zarówno od metody ekstrakcji, jak i od rodzaju liści. Wykazano, że ogólna zawartość terpenoidów była większa w ekstraktach etanolowych z liści zielonych. Dominującym

terpenoidem w ekstraktach z liści żółtych był bilobalid, a w ekstraktach z liści zielonych – ginkgolid A i B. W analizowanych ekstraktach z miłorzębu nie stwierdzono obecności ginkgolidu C.

**Wnioski.** W efekcie wykonanych analiz potwierdzono wpływ okresu wegetacji oraz warunków procesu ekstrakcji na zawartość bilobalidu i ginkgolidów w ekstraktach z liści miłorzębu dwuklapowego.

**Słowa kluczowe:** miłorząd dwuklapowy, bilobalid, terpenoidy, ginkgolidy

## Wstęp

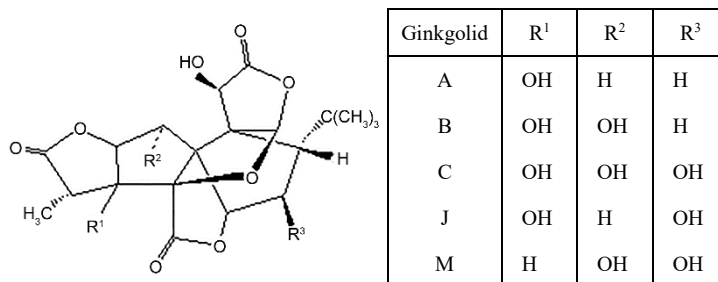
Miłorząd dwuklapowy budzi duże zainteresowanie ze względu na swoje wielokierunkowe działanie, w tym aktywność przeciwutleniającą (Kobus-Cisowska i in., 2014, 2015). Badania farmakologiczne i kliniczne potwierdziły aktywność ekstraktów sporządzonych z liści miłorzębu na układ nerwowy i sercowo-naczyniowy. Obecnie ekstrakt z zielonych liści miłorzębu (Egb 761) jest powszechnie stosowanym w farmakologii wyciągiem uzyskanym w drodze ściśle zdefiniowanego procesu wytwarzania. W tabeli 1 przedstawiono jego podstawowy skład chemiczny (O'Reilly, 2006). Metoda sporządzania acetonowo-wodnego wyciągu jest tak opracowana, aby wyeliminować substancje niepożądane. Ponadto dokonuje się standaryzacji, stosując metodę dwukierunkowej cienkowarstwowej chromatografii oraz wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej i określa ilościowo zawartość substancji biologicznie czynnych (van Beek, 2005; Boeker i in., 2016; Hasler, 2006; Nishida i Satoh, 2004; O'Reilly, 2006).

Tabela 1. Skład chemiczny wyciągu z miłorzębu (O'Reilly, 2006)

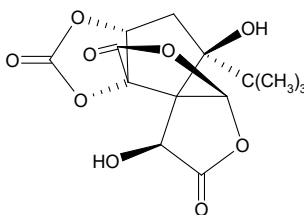
Związek	Zawartość
Glikozydy flawonoli	21,6–26,4%
Trilaktony terpenów	5,4–6,6%
Ginkgolidy A + B + C	2,8–3,4%
Bilobalid	2,6–3,2%
Proantocyjanidyny	< 9,5%
Kwasy ginkgolowe	< 5 ppm
Woda	< 3,0%
Popiół	< 1,5%

Ginkgolidy oraz bilobalid stanowią ważną grupę farmakologicznie czynnych związków *Ginkgo biloba* (ok. 6%). Spośród nich na szczególną uwagę zasługują specyficzne laktony diterpenowe (ginkgolidy) oraz seskwiterpen trilaktonowy – bilobalid (rys. 1, 2). Związki te występują tylko w miłorzębie dwuklapowym (Hasler i Meier, 1992).

Związki diterpenowe miłorzębu wykazują swoistą budowę chemiczną, nieznaną dotąd w świecie roślinnym. Ginkgolidy są 20-węglowymi diterpenami o strukturze pierścieniowej. Różnią się pozycją i liczbą grup hydroksylowych przy C-1, C-3, C-7.



Rys. 1. Struktura chemiczna ginkgolidów miłorzębu



Rys. 2. Struktura chemiczna bilobalidu miłorzębu

Podstawowy układ stanowi sześć pięcioczłonowych pierścieni (trzy pierścienie butanolidowe – laktonowe, dwa cyklopentanowe i jeden tetrahydrofuranowy) skondensowanych do tzw. struktur klatkowych (Zhang i in., 2016). Charakterystyczną cechą jest również obecność w cząsteczce tych związków trzeciorzędowej grupy tert-butyłowej, rzadko występującej naturalnie. Zidentyfikowano siedem różnych ginkgolidów: A, B, C, J, K, L, M, przy czym pięć z nich: A, B, C, J, M jest obecnych w ekstraktach z liści. W liściach ginkgolidy A, B i C występują w największych ilościach. Poszczególne związki różnią się podstawnikami. Oprócz posiadania wielu korzystnych właściwości farmakologicznych ginkgolidy są odpowiedzialne za gorzki posmak liści i ekstraktów z nich sporządzonych (van Beek, 2002).

Bilobalid (C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>) występujący w liściach miłorzębu, należący do seskwiterpenów, ma strukturę 15-węglową. Jest on produktem oksydatywnej degradacji biologicznej ginkgolidu, prowadzącej do powstania struktury seskwiterpenowej. W budowie chemicznej bilobalidu wyróżnia się cztery pierścienie (trzy butanolidowe i jeden cyklopentanowy z grupą t-butyłową). Izolacji tego związku oraz określenia jego struktury po raz pierwszy dokonano w 1969 roku.

Poza wymienionymi związkami w surowcu występują triterpeny: sitosterol i jego glikozyd, kampesterol i 22-dihydrobrassicasterol (van Beek, 2005; Zhang i in., 2016). Liście miłorzębu zawierają relatywnie mało terpenoidów: od 0,1% do 0,9% zawartości wymaganej w preparatach farmaceutycznych (5–7%), przy czym ginkgolidy stanowią powinny 2,8–3,4%, a bilobalid 2,6–3,2% (van Beek, 2005). Wielokierunkowe badania nad miłorzębem wykazały, że za efekt terapeutyczny jest odpowiedzialny zespół związków

ków flawonoglikozydów oraz pochodnych terpenowych. Udowodniono, że właściwy efekt terapeutyczny jest możliwy dzięki zachowaniu odpowiedniej proporcji poszczególnych zespołów związków czynnych (van Beek, 2002, 2005).

W pracy zbadano wpływ wybranych rozpuszczalników (woda, aceton i woda, etanol) na zawartość bilobalidu oraz ginkgolidów w ekstraktach sporządzonych z suszu liści żółtych i zielonych miłorzębu dwuklapowego.

## Material i metody

Materiał do badań stanowiły liście miłorzębu dwuklapowego pochodzące z dwóch okresów wegetacji: z sierpnia (liście zielone – A) oraz z października (liście żółte – B). Liście pozyskano z upraw Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu znajdujących się w Baranowie (gmina Tarnowo Podgórne). Materiał wysuszono w temperaturze 40°C, rozdrobniono, a do dalszych analiz wyodrębniono frakcję o wielkości cząstek 0,8–0,09 mm (tab. 2).

Tabela 2. Charakterystyka liści miłorzębu

Rodzaj liści	Wygląd	Barwa	Zapach
Zielone (A)	Gładkie	Jednolita, ciemna	Delikatny, specyficzny
Żółte (B)	Gładkie	Jednolita, intensywna	Delikatny, specyficzny

Susz liści poddano rozdrobnieniu, a następnie ekstrakcji: wodą, roztworem acetonu i wody (w stosunku 3 : 2 v/v) oraz alkoholem etylowym (96-procentowym) zgodnie z metodyką opisaną wcześniej (Kobus-Cisowska i in., 2014). Proporcja suszu liści do rozpuszczalnika wynosiła 2 g na 100 ml, a ekstrakcja była jednokrotna. Ekstrakcję wodą prowadzono w temperaturze 90°C w czasie 15 min, acetonem i wodą – przez 1,5 h w temperaturze 40°C oraz etanolem – 16 h w temperaturze 20°C. Ekstrakty odwirowywano przez 5 min przy 4500 rpm (wirówka – typ K 70, Janetki, Niemcy). Do dalszych etapów badań wykorzystywano klarowny roztwór z nad osadu, który odparowano i/lub liofilizowano i przechowywano pod azotem w ciemnych pojemnikach w temperaturze 4 ± 1°C do czasu oznaczeń (tab. 3).

Zawartość ginkgolidów i bilobalidu oznaczono na aparacie HPLC Agilent 1100 z detekcją DAD na kolumnie Lichrospher 100 RP 18 endcapped w 30-minutowym gradiencie (farmakopea). Tożsamość badanych związków potwierdzono przez porównanie ze wzorcem.

W celu identyfikacji poszczególnych ekstraktów zastosowano oznaczenia: AW – ekstrakt wodny z liści zielonych, AA – ekstrakt acetonowo-wodny z liści zielonych, AE – ekstrakt etanolowy z liści zielonych, BW – ekstrakt wodny z liści żółtych, BA – ekstrakt acetonowo-wodny z liści żółtych, BE – ekstrakt etanolowy z liści żółtych miłorzębu dwuklapowego.

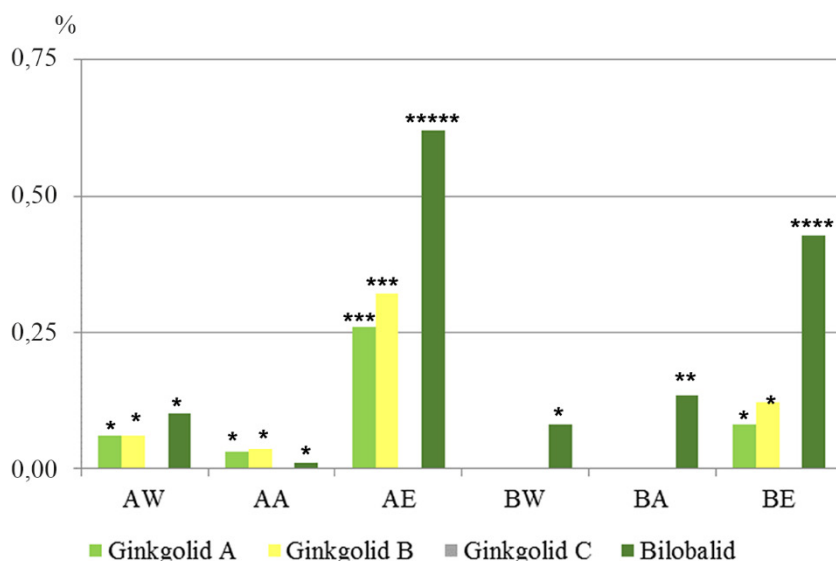
Tabela 3. Charakterystyka sensoryczna ekstraktów z liści miłorzębu

Ekstrakt	Barwa	Zapach	Smak
Wodny z liści zielonych (AW)	Zielono-żółta, dość klarowna	Delikatny	Łagodny
Acetonowo-wodny z liści zielonych (AA)	Zielona, klarowna	Intensywny	Dość intensywny
Etanolowy z liści zielonych (AE)	Zielona, klarowna	Intensywny	Intensywny
Wodny z liści żółtych (BW)	Jasnożółta, dość klarowna	Delikatny	Łagodny
Acetonowo-wodny z liści żółtych (BA)	Żółta, klarowna, mocna	Intensywny	Dość intensywny
Etanolowy z liści żółtych (BE)	Żółta, klarowna, mocna	Intensywny	Intensywny

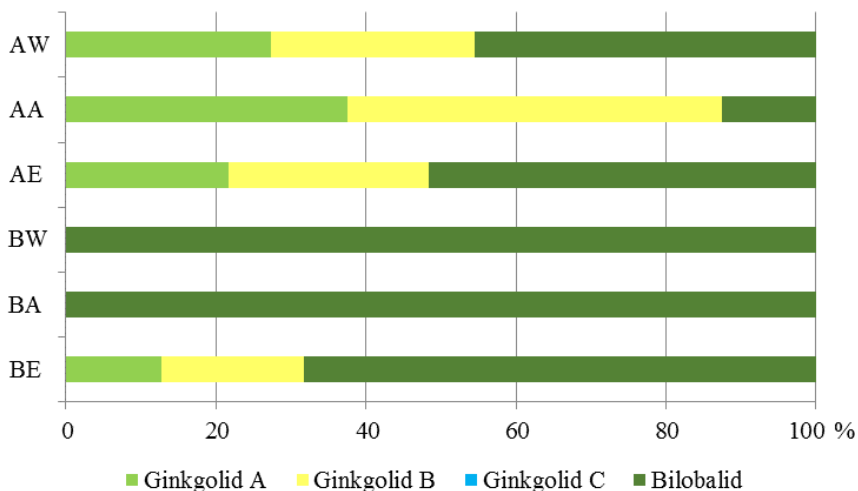
## Wyniki i dyskusja

Wyniki dotyczące analizy ilościowej zawartości terpenoidów wyrażono w procentach i przedstawiono na rysunkach 3 i 4.

Wykazano, że zarówno ekstrahent, jak i rodzaj wykorzystanych w procesie liści wpływały na obecność poszczególnych terpenoidów w ekstrakcie. Największą ich zawartością charakteryzował się ekstrakt etanolowy z liści zielonych (1,2%), a najmniejszą wodny – z liści żółtych (0,08%). Ekstrakty wodny i acetonowo-wodny z liści żółtych nie zawierały w swoim składzie ginkgolidu A i B, co mogło wynikać z ich rozkładu podczas żółknięcia liści. Ponadto w żadnej z prób nie stwierdzono ginkgolidu C.



Rys. 3. Zawartość ginkgolidów i bilobalidu w ekstraktach z liści miłorzębu. Objaśnienia symboli literowych – jak w tabeli 3. Różnice statystycznie istotne dla badanych stężeń w obrębie danej próby zostały zaznaczone różną liczbą gwiazdek ( $p \leq 0,05$ )



Rys. 4. Zawartość analizowanych terpenoidów w ekstraktach z liści miłorzębu. Objasnienia symboli literowych – jak w tabeli 3

Zawartość ginkgolidów zależała od użytego rozpuszczalnika i była największa w ekstraktach etanolowych, odpowiednio 0,58 i 0,20% w ekstraktach z liści zielonych i liści żółtych. Ponadto stwierdzono różnice w zawartości bilobalidu, który był dominującym terpenoidem we wszystkich próbach z wyjątkiem ekstraktu acetonowo-wodnego z liści zielonych, gdzie jego poziom był trzykrotnie niższy niż ginkgolidu A i czterokrotnie niższy niż ginkgolidu B. Bilobalid zidentyfikowano we wszystkich badanych ekstraktach, a w największej ilości znajdował się w ekstraktach etanolowych (odpowiednio 0,62% w AE i 0,43% w BE).

W badaniach Laurain (2006) wykazano, że zawartość ginkgolidów w liściach miłorzębu zmieniała się kilkakrotnie w trakcie okresu wegetacji rośliny: wzrastała od maja do czerwca, następnie gwałtownie spadała, po czym od sierpnia ponownie wzrastała, a w listopadzie ginkgolidy oznaczono w najmniejszej ilości.

W danych literaturowych znaleziono wiele publikacji dotyczących metod analizy i zawartości terpenoidów w miłorzębie, jednak zdecydowana większość z nich charakteryzuje zawartość terpenoidów już w gotowych produktach. Jest to konieczne z uwagi na standardyzację składu ekstraktów, który może być zróżnicowany ze względu na skład surowca wyjściowego. Proporcje występowania tych kluczowych substancji czynnych wynikają m.in. z warunków klimatycznych, odmianowych albo z terminu zbioru liści. W pracy w ekstrakcie etanolowym AE uzyskano 1,2% terpenoidów. Była to pięciokrotnie mniejsza zawartość niż w Egb, lecz – jak wynika z publikacji Bookera i in. (2016) – była ona i tak dwukrotnie większa niż w niektórych dostępnych na rynku preparatach, w których oznaczono zaledwie 0,55% czy 0,76% udziału frakcji terpenoidowej. Van Beek (2002) zwrócił za to uwagę, że niektóre preparaty dostępne w handlu nie zawierały wszystkich typowych dla miłorzębu terpenoidów, lecz tylko niektóre z nich. Wynikało to z zastosowanego ekstrahenta. Autor stwierdził, że terpenoidy są najlepiej ekstrahowane podczas ekstrakcji nadkrytycznej lub maceracji alkoholem. Ponadto Booker

Kobus-Cisowska, J., Flaczyk, E., Juszczak, P., Kmiecik, D., Kulczyński, B., Grdeń, M., Piechocka, J. (2017). Wpływ okresu wegetacji na zawartość bilobalidu i ginkgolidów w ekstraktach z liści miłorzębu dwuklapowego (*Ginkgo biloba* L.). *Nauka Przyn. Technol.*, 11, 2, 115–122. <http://dx.doi.org/10.17306/J.NPT.00190>

i in. (2016) wykazali, że zawartość ginkgolidów i bilobalidu w analizowanych preparatach zawierających ekstrakt z miłorzębu była znacznie zróżnicowana i zależała od partii produkcyjnej.

## Podsumowanie

W pracy wykazano, że zarówno okres wegetacji, jak i rodzaj rozpuszczalnika wpływały na zawartość poszczególnych terpenoidów w ekstraktach z liści miłorzębu. Ekstrakty z liści zebranych w późniejszym okresie – żółtych – charakteryzowały się istotnie mniejszą zawartością terpenoidów w porównaniu z ekstraktami z liści zielonych. Największą zawartość badanych związków zanotowano w ekstraktach etanolowych, zarówno w przypadku liści zielonych, jak i żółtych, najmniejszą natomiast w ekstraktach wodnych. W efekcie wykonanych analiz potwierdzono wpływ okresu wegetacji na zawartość bilobalidu i ginkgolidów w ekstraktach z liści miłorzębu dwuklapowego.

## Literatura

- van Beek, T. A. (2002). Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts. *J. Chromatogr. A*, 967 1, 21–55.
- van Beek, T. A. (2005). Ginkgolides and bilobalide: their physical, chromatographic and spectroscopic properties. *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 17, 5001–5012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2005.05.056>
- Booker, A., Frommenwiler, D., Reich, E., Horsfield, S., Heinrich, M. (2016). Adulteration and poor quality of *Ginkgo biloba* supplements. *J. Herb. Med.*, 6, 2, 79–87. <http://doi.org/10.1016/j.hermed.2016.04.003>
- Hasler, A. (2006). Chemical constituents of *Ginkgo biloba*. W: T. A. van Beek (red.), *Ginkgo biloba* (s. 109–143). Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
- Hasler, A., Meier, B. (1992). Determination of terpenes from *Ginkgo biloba* L. by capillary gas chromatography. *Pharm. Pharmacol. Lett.*, 2, 187–190.
- Kobus-Cisowska, J., Flaczyk, E., Rudzińska, M., Kmiecik, D. (2014). Antioxidant properties of extracts from *Ginkgo biloba* leaves in meatballs. *Meat Sci.*, 97, 2, 174–180. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.01.011>
- Kobus-Cisowska, J., Flaczyk, E., Siger, A., Kmiecik, D. (2015). Wpływ warunków ekstrakcji na wydajność i skład wybranych ekstraktów z liści zielonych i żółtych miłorzębu dwuklapowego. *Nauka Przyn. Technol.*, 9, 1, #9. <http://dx.doi.org/10.17306/J.NPT.2015.1.9>
- Laurain, D. (2006). Cultivation of *Ginkgo biloba* on a large scale. W: T. A. van Beek (red.), *Ginkgo biloba* (s. 267–278). Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
- Nishida, S., Satoh, H. (2004). Comparative vasodilating actions among terpenoids and flavonoids contained in *Ginkgo biloba* extract. *Clin. Chim. Acta*, 339, 1–2, 129–133. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cccn.2003.10.004>
- O'Reilly, J. (2006). *Ginkgo biloba* – large scale extraction and processing. W: T. A. van Beek (red.), *Ginkgo biloba* (s. 99–109). Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
- Zhang, Ch.-W., Wang, Ch.-Zh., Tao, R. (2016). Analysis on the physicochemical properties of *Ginkgo biloba* leaves after enzymolysis based ultrasound extraction and Soxhlet extraction. *Molecules*, 21, 1, 97, 1–11. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules2101097>

## THE INFLUENCE OF THE VEGETATION PERIOD ON THE CONTENT OF BILOBALIDE AND GINKGOLIDES IN GINKGO BILOBA (*GINKGO BILOBA* L.) LEAF EXTRACTS

### Abstract

**Background.** At present ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.) is being widely researched. Its multi-directional impact on the nervous and cardiovascular system was proved by numerous pharmacological investigations and clinical trials. The ginkgo green leaf extract, which is produced in a strictly defined manner, is widely used in pharmacology. The aim of the study was to assess the influence of different extractants on the content of bilobalide and ginkgolides in extracts made from dried yellow and green ginkgo tree leaves.

**Material and methods.** Dried green and yellow ginkgo tree leaves were chemically analysed. This material was extracted with water, acetone and ethyl alcohol. The content of ginkgolides and bilobalide in the extracts was measured by means of High Performance Liquid Chromatography (HPLC Agilent 1100 with Diode Array Detector). The compounds under analysis were identified by comparison with the reference substance.

**Results.** The analysis revealed that the content of bilobalide and ginkgolides in the maidenhair tree extracts depended on the extraction method and type of leaves. There was higher overall content of terpenoids in ethanol extracts from green leaves. Bilobalide was the predominant terpenoid in the yellow leaf extracts, whereas ginkgolides A and B were predominant in the green leaf extract. There was no ginkgolide C in the ginkgo extracts under analysis.

**Conclusions.** The research proved the influence of the vegetation period and the extraction conditions on the content of bilobalide and ginkgolides in the ginkgo tree leaf extracts.

**Keywords:** ginkgo biloba, bilobalide, terpenoids, ginkgolides

*Adres do korespondencji – Corresponding address:*

Joanna Kobus-Cisowska, Katedra Technologii Żywności Człowieka, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 31/33, 60-624 Poznań, Poland, e-mail: [joanna.kobus@up.poznan.pl](mailto:joanna.kobus@up.poznan.pl)

*Zaakceptowano do opublikowania – Accepted for publication:*

19.04.2017

*Do cytowania – For citation:*

Kobus-Cisowska, J., Flaczyk, E., Juszcak, P., Kmiecik, D., Kulczyński, B., Grdeń, M., Piechocka, J. (2017). Wpływ okresu wegetacji na zawartość bilobalidu i ginkgolidów w ekstraktach z liści miłorzębu dwuklapowego (*Ginkgo biloba* L.). *Nauka Przym. Technol.*, 11, 2, 115–122. <http://dx.doi.org/10.17306/J.NPT.00190>