

JOANNA KOBUS-CISOWSKA<sup>1</sup>, EWA FLACZYK<sup>1</sup>, ALEKSANDER SIGER<sup>2</sup>, DOMINIK KMIECIK<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Katedra Biochemii i Analizy Żywności  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

## WPLYW WARUNKÓW EKSTRAKCJI NA WYDAJNOŚĆ I SKŁAD WYBRANYCH EKSTRAKTÓW Z LIŚCI ZIELONYCH I ŻÓŁTYCH MIŁORZĘBU DWUKŁAPOWEGO

EFFECT OF THE EXTRACTION PROCESS ON YIELD AND COMPOSITION  
OF SELECTED EXTRACTS FROM MAIDENHAIR TREE  
GREEN AND YELLOW LEAVES

**Streszczenie.** Celem pracy była ocena wpływu warunków ekstrakcji na wydajność i skład wybranych ekstraktów z liści zielonych i żółtych miłorzębu dwukłapowego (*Ginkgo biloba* L.). Wykonano trzyetapowe ekstrakcje do których użyto wody, roztworu acetonu i wody oraz alkoholu etylowego. Efektywność ekstrakcji oznaczono poprzez ocenę zawartości polifenoli ogółem. Następnie oceniono wydajność wybranych procesów ekstrakcji, widma otrzymanych ekstraktów oraz zawartość w nich kwasów fenolowych. Badanie zawartości związków fenolowych w kolejnych ekstraktach pozwoliło na stwierdzenie bardzo dużej wydajności procesu jednokrotnej ekstrakcji, a analiza widm UV pozwoliła wnioskować o obecności związków fenolowych we wszystkich badanych ekstraktach. Maksima absorpcji odnotowano przy długości fal 290-350 nm. Badane ekstrakty charakteryzowały się dużą zawartością kwasów fenolowych. Największą ich sumę stwierdzono w ekstrakcie acetonowo-wodnym z liści zielonych oraz wodnym z żółtych liści. W ekstraktach z liści zielonych dominującym kwasem był kwas protokatechowy, natomiast w ekstraktach z żółtych liści oznaczono największą ilość kwasu *p*-hydroksybenzoowego.

**Słowa kluczowe:** przeciwutleniacze, miłorząd dwukłapowy, kwasy fenolowe, widma ekstraktów, polifenole

### Wstęp

Miłorząd dwukłapowy (*Ginkgo biloba* L., synonim: miłorząd japoński lub chiński), jest obecnie jedynym żyjącym gatunkiem należącym do gromady nagozalążkowych

(*Gymnospermae*) i klasy miłorzębowych (*Ginkgoopsida*). Nazywany jest żyjącą skamieliną, ponieważ reprezentuje jedyny żyjący gatunek rzędu *Ginkgoales* (Chen i in., 2012; Satoh i Nishida, 2004). Jest gatunkiem reliktowym i endemicznym, jedynym, jaki pozostał z ery kenozoicznej (Boonkaew i Camper, 2005). Wiele źródeł literaturowych wskazuje, że najstarsze drzewa tego gatunku, mające ponad 4 tysiące lat, znajdują się na terenie Chin i przekraczają wysokość 40 m. Z Chin miłorząd trafił prawdopodobnie do Japonii i Korei, gdzie okazy mają odpowiednio 1250 i 1100 lat, a ich wysokość sięga 30 m. Do Europy miłorząd został sprowadzony z Japonii na przełomie XVII i XVIII wieku. Obecnie wielkie plantacje miłorzębu zakłada się w USA i Francji ze względu na jego lecznicze właściwości (Boonkaew i Camper, 2005). Współcześnie miłorząd dwuklapowy uważany jest za „fabrykę biochemiczną”, zawierającą wiele składników bioaktywnych. Do najważniejszych związków biologicznie aktywnych miłorzębu zaliczono flawonoidy, połączenia diterpenowe specyficzne dla tej rośliny – ginkgolidy (A, B, C, J, M) oraz kwasy fenolowe (Boonkaew i Camper, 2005; Kobus i in., 2009; Liu i in., 2006; Pietta i in., 1991; Sati i in., 2013; van Beek i in., 1991).

Wyciąg z liści stosuje się przy nadmiernej nerwowości, zaburzeniach krążenia i kłopotach z koncentracją. Badania farmakologiczne dotyczące miłorzębu koncentrują się głównie na określaniu wpływu całego wyciągu, a także wydzielonych frakcji lub pojedynczych związków, na układ nerwowy i sercowo-naczyniowy. Wielokierunkowe badania biologiczne wykazały, że za efekt terapeutyczny odpowiedzialna jest frakcja związków flawonoglikozydów oraz pochodnych terpenowych (Pereira i in., 2013). Udowodniono, że właściwy efekt terapeutyczny jest możliwy dzięki zachowaniu odpowiedniej proporcji poszczególnych zespołów związków czynnych (van Beek, 2002; Ding i in., 2008). Obecnie w celach farmakologicznych wykorzystuje się liście zielone miłorzębu. Liście żółte, które po okresie wegetacji opadają z drzew, były przedmiotem nielicznych badań, a ich właściwości nie są do końca poznane (Kobus-Cisowska i in., 2014), dlatego w pracy postanowiono ocenić wpływ warunków ekstrakcji prowadzonej kilkuetapowo na wydajność, widma UV i zawartość kwasów fenolowych w ekstraktach sporządzonych z użyciem różnych rozpuszczalników z liści żółtych oraz zielonych.

## Material i metody

### Material

Materiałem do badań były liście zielone (A) i żółte (B) miłorzębu dwuklapowego odmiany ‘Herkules’ z drzew pochodzących z upraw Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu w Baranowie. Liście zebrano w sierpniu (liście zielone – A) oraz październiku (liście żółte – B), wysuszono w temperaturze 40°C, a następnie rozdrobniono w młynku laboratoryjnym. Do badań wydzielono frakcję o stopniu rozdrobnienia 0,8-0,09 mm.

### Ekstrakcja

Ekstrakcje przeprowadzono trzykrotnie tym samym rozpuszczalnikiem w taki sposób, że pozostałość po pierwszej ekstrakcji ekstrahowano ponownie, a pozostałość po

drugiej ekstrahowano po raz trzeci. Jako ekstrahentów użyto wody, roztworu acetonu i wody (w stosunku 3:2, v/v) oraz alkoholu etylowego (96%) w proporcji 2 g rozdrobnionego suszu liści na 100 ml rozpuszczalnika. Ekstrakcję prowadzono według metodyki opisanej przez Kobus i Flaczyk (2007), gdzie proces optymalizowano, zmieniając czas i temperaturę dla wymienionych rozpuszczalników. Całość wytrząsano w określonej temperaturze i czasie (ekstrakcja wodą: 15 min w temperaturze 95°C, mieszaniem acetonu i wody: 1,5 h w temperaturze 40°C, etanolem: 16 h w temperaturze 20°C), a następnie odwirowywano przez 5 min przy 4500 rpm (wirówka – typ K 70, Janetzki, Niemcy). Do dalszych etapów badań wykorzystywano klarowny roztwór z nad osadu, który odparowywano i/lub liofilizowano i przechowywano pod azotem w ciemnych pojemnikach w temperaturze  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  do czasu oznaczeń. W celu identyfikacji poszczególnych ekstraktów zastosowano symbole: 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.

### Ogólna zawartość związków fenolowych

Oznaczenie wykonano, korzystając z metody, którą opisali Cheung i in. (2003). Polegało to na spektrofotometrycznym (Metertek SP-830, Tajwan) pomiarze absorbancji barwnego kompleksu powstałego w wyniku reakcji grup fenolowych w danym ekstrakcie z reagentem – odczynnikiem Folina-Ciocalteu, przy długości fali 765 nm. Wyniki przedstawiono jako ekwiwalent stężenia kwercetyny w miligramach na 1 g s.m. ekstraktu lub liści.

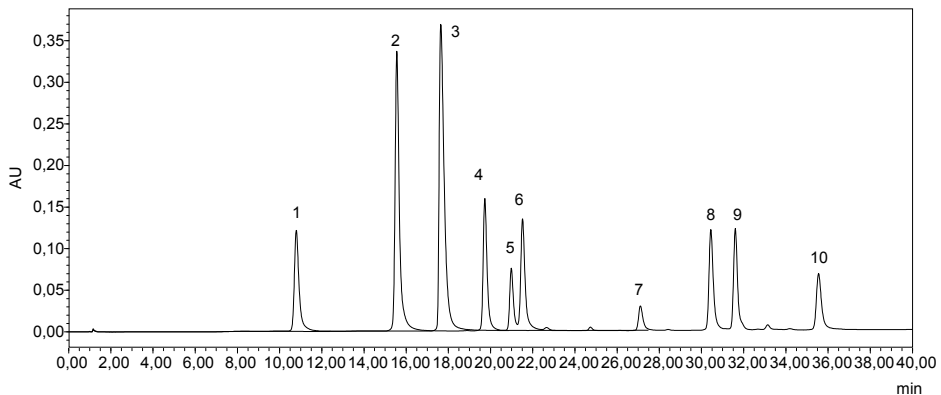
### Widma ekstraktów

Widma absorpcji w zakresie długości fal 260-400 nm zmierzono z użyciem spektrofotometru dwuwiązkowego UV-VIS 1202 (Shimadzu, Japonia). Do pomiaru użyto kuwety kwarcowej o długości drogi optycznej 1 cm. Ekstrakty rozpuszczono w 60-procentowym alkoholu etylowym.

### Zawartość kwasów fenolowych

Charakterystyki jakościowej oraz ilościowej poszczególnych fenolokwasów w badanych ekstraktach dokonano metodą analizy gradientowej HPLC, opierając się na metodzie opisanej przez Siger i in. (2004). Kwasy fenolowe z etanolowych roztworów ekstraktów izolowano poprzez ekstrakcje do fazy stałej. Zastosowano System Chromabond (Macherey Nagle, Niemcy) sprzężony z kolumnienkami SPE Bakerbond spe<sup>TM</sup> wypełnionymi czwartorzędową aminą (500 mg). Proces składał się z czterech etapów: I – kondycjonowanie kolumnienki ( $10\text{ cm}^3$  metanolu,  $10\text{ cm}^3$  wody destylowanej i  $10\text{ cm}^3$  0,15-procentowego roztworu  $\text{NaHCO}_3$ ), II – nanoszenie próby ( $5\text{ cm}^3$ ), III – przemywanie kolumnienki ( $15\text{ cm}^3$  0,15-procentowego roztworu  $\text{NaHCO}_3$ ), IV – elucja mieszaniną 0,2 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  i metanolu (2:1 v/v) ( $10\text{ cm}^3$ ). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono za pomocą chromatografu cieczowego Waters Milford, (MA, USA) na kolumnie NovaPak C<sub>18</sub> ( $3,9 \times 150\text{ mm}$ ;  $5\text{ }\mu\text{m}$ ). Zastosowano nieliniowy gradient stężeń w układzie: woda zakwaszona do pH 2,6 kwasem ortofosforowym (A), aceton-

tryl/woda (1:1, v/v) (B) przy przepływie 1 ml/min. Program gradientu rozpoczynał się od 100% roztworu A i kończył na 50% roztworu B w 50. minucie rozdziału. Detekcji rozdzielonych związków dokonywano przy długości fali 250 i 320 nm (detektor UV-VIS Waters Milford, MA, USA). Do identyfikacji związków wykorzystano metanolewe roztwory wzorcowe 10 kwasów: protokatechowego, *p*-hydroksybenzoesowego, wanilinowego, kawowego, ferulowego, chlorogenowego, sinapowego, *p*-kumarowego, *o*-kumarowego oraz kynureninowego nabyte w Sigma-Aldrich. Otrzymane chromatogramy opracowano, identyfikując kwasy zgodnie z czasami retencji z wykorzystaniem posiadanych wzorców i obliczając powierzchnie pików chromatograficznych w zakresach wybranych czasów retencji charakterystycznych dla poszczególnych związków (rys. 1).



Rys. 1. Chromatogram rozdziału mieszaniny wzorców kwasów fenolowych: 1 – kwas protokatechowy, 2 – kwas *p*-hydroksybenzoesowy, 3 – kwas kinurenowy, 4 – kwas wanilinowy, 5 – kwas chlorogenowy, 6 – kwas kawowy, 7 – kwas *p*-kumarowy, 8 – kwas ferulowy, 9 – kwas sinapowy, 10 – kwas *o*-kumarowy

Fig. 1. Chromatogram of the phenolic acids patterns mixture distribution: 1 – protocatechuic acid, 2 – *p*-hydroxybenzoic acid, 3 – kinurenic acid, 4 – vanillin acid, 5 – chlorogenic acid, 6 – caffeic acid, 7 – *p*-coumaric acid, 8 – ferulic acid, 9 – sinapic acid, 10 – *o*-coumaric acid

### Analiza statystyczna

Analizy statystycznej dokonano za pomocą programu STATISTICA<sup>TM</sup>PL firmy StatSoft. Wykonano podstawowe statystyki opisowe dla poszczególnych parametrów. Porównano wartości średnie badanych cech z wykorzystaniem analizy wariancji dla układów czynnikowych o zróżnicowanej liczbie obserwacji, a różnice międzygrupowe oceniano testem Tukeya.

## Wyniki i dyskusja

### Określenie zawartości polifenoli ogółem w ekstraktach z liści miłorzębu po trzykrotnej ekstrakcji

Określenie całkowitej zawartości polifenoli po ekstrakcji wielokrotnej miało na celu wyznaczenie zależności wartości tego potencjału od krotności ekstrakcji dla badanego materiału roślinnego we wszystkich zastosowanych rozpuszczalnikach. Ekstrakcje przeprowadzono trzykrotnie tym samym rozpuszczalnikiem w taki sposób, że pozostałość po pierwszej ekstrakcji ekstrahowano ponownie, a pozostałość po drugiej ekstrahowano po raz trzeci. Wyniki dotyczące ogólnej zawartości związków polifenolowych w przeliczeniu na kwercetynę zamieszczono w tabeli 1.

Tabela 1. Zawartość związków polifenolowych w liściach oraz ekstraktach wodnych, acetonowo-wodnych i etanolowych z liści miłorzębu (mg/g s.m.)

Table 1. Content of polyphenolic compounds in leaves and water, acetone-water and ethanol extracts of ginkgo leaves (mg/g d.m.)

Etap ekstrakcji Step of extraction	Liście zielone (A) Green leaves (A)		Liście żółte (B) Yellow leaves (B)	
	ekstrakt – extract	liście – leaves	ekstrakt – extract	liście – leaves
Ekstrakcja wodna – Water extraction				
1	56,86 <sup>c,A</sup> ±2,35	12,86 <sup>c,A</sup> ±2,86	179,96 <sup>c,B</sup> ±3,48	51,90 <sup>c,B</sup> ±1,00
2	4,28 <sup>b,A</sup> ±0,34	0,97 <sup>b,A</sup> ±0,08	16,71 <sup>b,B</sup> ±0,57	4,82 <sup>b,B</sup> ±0,06
3	0,93 <sup>a,A</sup> ±0,00	0,21 <sup>a,A</sup> ±0,00	5,20 <sup>a,B</sup> ±0,00	1,50 <sup>a,B</sup> ±0,01
Ekstrakcja acetonowo-wodna – Acetone-water extraction				
1	203,50 <sup>c,A</sup> ±4,47	63,31 <sup>c,A</sup> ±1,45	247,54 <sup>c,B</sup> ±1,04	93,25 <sup>c,B</sup> ±0,39
2	6,91 <sup>b,A</sup> ±0,35	2,15 <sup>b,A</sup> ±0,00	16,87 <sup>b,B</sup> ±0,56	6,35 <sup>b,B</sup> ±0,08
3	1,79 <sup>a,A</sup> ±0,00	0,56 <sup>a,A</sup> ±0,00	7,33 <sup>a,B</sup> ±0,00	2,76 <sup>a,B</sup> ±0,00
Ekstrakcja etanolowa – Ethanol extraction				
1	204,44 <sup>c,A</sup> ±0,64	72,21 <sup>c,A</sup> ±0,23	137,28 <sup>c,B</sup> ±1,46	49,05 <sup>c,B</sup> ±0,45
2	12,54 <sup>b,A</sup> ±0,54	4,43 <sup>b,A</sup> ±0,03	5,87 <sup>b,B</sup> ±0,01	2,10 <sup>b,B</sup> ±0,00
3	0,02 <sup>a,A</sup> ±0,00	0,00 <sup>a,A</sup> ±0,00	0,43 <sup>a,B</sup> ±0,00	0,15 <sup>a,B</sup> ±0,00

Dane przedstawiają wartości średnie z trzech powtórzeń oraz odchylenie standardowe. Wartości średnie oznaczone różnymi małymi literami oddzielnie dla ekstraktu i oddzielnie dla liści w tej samej kolumnie świadczą o istotności różnic ( $p \leq 0,05$ ). Wartości średnie oznaczone różnymi dużymi literami oddzielnie dla ekstraktów i oddzielnie dla liści w tym samym wierszu świadczą o istotności różnic ( $p \leq 0,05$ ).

Data represent the mean values of three replicates and the standard deviation. The mean values marked with different lowercase letters separately for the extract and separately for the leaves in the same column indicate the significance of differences ( $p \leq 0.05$ ). The mean values marked with different capital letters separately for the extracts and separately for the leaves in the same row indicate the significance of differences ( $p \leq 0.05$ ).

Zawartość związków fenolowych w trzech następujących po sobie ekstraktach wykonanych z tych samych liści charakteryzowała się dużym zróżnicowaniem ( $p < 0,05$ ). Stwierdzono, że ogólna ilość związków polifenolowych w ekstraktach po pierwszej ekstrakcji była największa, a w drugich i trzecich istotnie mniejsza. Pierwsze ekstrakcje z liści zielonych wykonane z użyciem etanolu oraz mieszaniny acetonowo-wodnej pozwoliły na uzyskanie zbliżonych ilości związków fenolowych tj. odpowiednio 203,50 oraz 204,44 mg/g s.m., stwierdzono natomiast istotną różnicę w zawartości polifenoli w ekstraktach z liści żółtych, gdzie etanol ekstrahował o 45% mniej polifenoli niż mieszanina acetonu i wody. Prawdopodobnie podczas żółknięcia liści nastąpił szereg zmian, obejmujących epimeryzację i zmianę struktury polifenoli, szczególnie tych, które przechodziły do roztworu alkoholowego, stąd też oznaczono ponad trzykrotnie większą zawartość związków fenolowych w ekstraktach z liści żółtych niż z zielonych.

Stwierdzono, że w ekstraktach wykonanych po raz drugi zawartość polifenoli była istotnie mniejsza niż w ekstraktach pierwszych, i stanowiła od 3,4% (ekstrakt etanolowy z liści zielonych) do 9,3% (ekstrakt wodny z liści żółtych) ilości związków polifenolowych wyekstrahowanych za pierwszym razem. Jednak wykazano, że użycie wody jako ekstrahenta w najmniejszym stopniu uwalniało związki polifenolowe z liści. W trzecim ekstrakcie (ostatnim etapie ekstrakcji trzykrotnej) etanolowym oraz acetonowo-wodnym polifenole stanowiły zaledwie do 3% zawartości polifenoli z pierwszej ekstrakcji, co wskazało na bezcelowość prowadzenia procesu wielokrotnie. O tak dużej wydajności ekstrakcji pierwszej prawdopodobnie zadecydowała niska proporcja materiału ekstrahowanego do rozpuszczalnika (2%), co uniemożliwiło powstanie roztworu przesyconego, a polifenole swobodnie przechodziły do ekstraktu w czasie procesu. Nie bez znaczenia było zapewne również odpowiednie rozdrobnienie liści, które dodatkowo zwiększyło powierzchnię kontaktu z rozpuszczalnikiem. Ponadto wysuszenie liści umożliwiło lepszą macerację, ich łatwą zwilżalność i podatność na wnikanie ekstrahentów.

W literaturze znaleziono wiele informacji dotyczących parametrów oraz krotności prowadzenia procesu ekstrakcji z liści miłorzębu. Większość autorów prowadziła ekstrakcje jednokrotne, ale np. Boonkaew i Camper (2005) ekstrahowali susz zielonych liści miłorzębu trzykrotnie metanolem. Proces prowadzili w temperaturze pokojowej, każdorazowo przez 24 h, i w efekcie uzyskali ekstrakt końcowy o dużej pojemności antyoksydacyjnej. Znacznie krócej, bo przez 2 h z użyciem metanolu prowadzili proces ekstrakcji jednokrotnej Skerget i in. (2005). Ekstrakty przez nich otrzymane również miały bardzo duży potencjał antyoksydacyjny. Stefanovits-Banyai i in. (2006) preparowali ekstrakty ze świeżych liści *Ginkgo biloba* z użyciem wody oraz mieszaniny etanolu i wody (80:20, v/v), jednokrotnie ekstrahując bardzo rozdrobniony materiał roślinny. Autorzy stwierdzili dużą aktywność przeciwutleniającą otrzymanych ekstraktów. Zahradnikowa i in. (2007) do ekstrakcji użyli 96-procentowego metanolu, a proces trwał 24 h. Wykazali, że aktywność przeciwutleniająca oraz profil zawartości składników biologicznie aktywnych w otrzymanym ekstrakcie były zbliżone do amerykańskiego preparatu z *Ginkgo Egb 761*. Podobnie trwającą 24 h ekstrakcję liści miłorzębu prowadzili Ellnain-Wojtaszek i in. (2003). Jako ekstrahentów użyli metanolu, etanolu oraz wody. Wykazali, że wydajność ekstrakcji, jak również skład są zależne od rozpuszczalników, a najkorzystniejszy efekt uzyskali w przypadku metanolu.

Badanie zawartości związków fenolowych w kolejnych ekstraktach wodnych, acetonowo-wodnych i etanolowych pozwoliło na stwierdzenie bardzo dużej wydajności procesu jednokrotnej ekstrakcji. W związku z tym zaniechano prowadzenia wielokrotnej ekstrakcji suszu liści zielonych i żółtych miłorzębu dwuklapowego zastosowanymi rozpuszczalnikami.

### Wydajność procesów ekstrakcyjnych

Ekstrakcję wykonuje się trzema podstawowymi metodami: ekstrakcja z rozpuszczalnikami (tradycyjna), ekstrakcja i mikroekstrakcja do fazy stałej oraz ekstrakcja nadkrytyczna (Janiszewska i Witrowa-Rajchert, 2005; Suhaj, 2006). Jako ekstrahenty są stosowane powszechnie różne rozpuszczalniki polarne i niepolarne, przede wszystkim: etanol, metanol, aceton, heksan, octan etylu, woda czy też chloroform, eter naftowy lub toluen. Często wykorzystuje się ich odpowiednią mieszaninę bądź ekstrahuje się kolejno różnymi ekstrahentami, uwzględniając ich polarność, aby uzyskać największą wydajność. Tak więc produktem ekstrakcji jest nielotny ekstrakt, na którego masę składa się suma składników, które w wyniku kompletnego procesu ekstrakcji przeszły do temperatury wrzenia rozpuszczalnika (Hromadkova i in., 1999).

W pracy porównano wydajności procesów ekstrakcji składników rozpuszczalnych z liści miłorzębu dwuklapowego z użyciem wody, mieszaniny acetonu i wody oraz etanolu. Aceton (propanon) wybrano, uwzględniając jego polarny aprotonowy charakter, natomiast wodę i alkohol etylowy – rozpuszczalniki polarne protonowe – zastosowano z uwagi na ich aktualnie szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym. Ponadto ekstrakty wodne nie wnoszą do produktu ewentualnych śladów rozpuszczalnika, co może mieć miejsce w przypadku zastosowania etanolu. Wyniki dotyczące wydajności poszczególnych procesów wyrażono w procentach i przedstawiono w tabeli 2. Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała istotne różnice w wydajności ekstrakcji prowadzonych z użyciem wody, etanolu oraz mieszaniny acetonu i wody (3:2, v/v) ( $p < 0,05$ ). Wydajność ekstrakcji z liści żółtych wymienionymi rozpuszczalnikami była większa aniżeli z liści zielonych. Wydajność ekstrakcji sporządzonej z użyciem mieszaniny

Tabela 2. Wydajność ekstrakcji z liści miłorzębu (%)

Table 2. Extraction yield of ginkgo leaves (%)

AW	AA	AE	BW	BA	BE
22,62 <sup>A</sup> ± 0,8	35,32 <sup>D</sup> ± 0,3	31,11 <sup>C</sup> ± 1,6	28,84 <sup>B</sup> ± 0,16	35,73 <sup>D</sup> ± 0,18	37,7 <sup>E</sup> ± 0,8

Dane przedstawiają wartości średnie z trzech powtórzeń oraz odchylenie standardowe. Wartości średnie oznaczone różnymi dużymi literami świadczą o istotności różnic ( $p \leq 0,05$ ).

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.

Data represent the mean values of three replicates and standard deviation. The mean values marked with different capital letters indicate the significance of differences ( $p \leq 0,05$ ).

AW – water extract of green leaves, AA – acetone-water extract of green leaves, AE – ethanol extract of green leaves, BW – water extract of yellow leaves, BA – acetone-water extract of yellow leaves, BE – ethanol extract of yellow leaves.

acetonu i wody liści zielonych i żółtych nie różniła się istotnie ( $p < 0,05$ ), w przeciwieństwie do pozostałych ekstrakcji, tzn. za pomocą wody oraz etanolu. Największą statystycznie istotną wydajność uzyskano, ekstrahując liście żółte etanolem (37,67%), następnie mieszaniną acetonu i wody (35,73%) oraz liście zielone mieszaniną acetonu i wody (35,32). Statystycznie mniejszą wydajnością, wynoszącą odpowiednio 22,62% i 31,11%, charakteryzowały się ekstrakty wodne z liści zielonych i żółtych. Z przeprowadzonych badań wynika, że wydajność ekstrakcji zależała od zawartości poszczególnych składników przechodzących do ekstraktu z surowca roślinnego. Wydajność ekstrakcji liści żółtych była zawsze większa niż zielonych, a najwięcej substancji przechodziło do roztworu acetonu i wody oraz etanolu. Można się spodziewać, że duże różnice w wydajności ekstrakcji z zastosowaniem wody (rozpuszczalnik polarny protonowy, nieorganiczny), mieszaniny acetonu i wody (rozpuszczalnik polarny aprotonowy, organiczny) oraz etanolu (rozpuszczalnik polarny protonowy, organiczny), wynikały z różnej rozpuszczalności składników w wymienionych mediach. Lin-Chun i in. (2006) porównywali wydajność ekstrakcji wodnej oraz etanolowej kwiatów liliowca i ocenili etanol jako rozpuszczalnik pozwalający na uzyskanie większej wydajności procesu. Podobnie Yu i in. (2005) wykazali większe wydajności ekstraktów etanolowych i metanolowych niż wodnych, a Ningappa i in. (2008) wykazali, że wydajność ekstrakcji wodnej była o 20% mniejsza niż etanolowej. Stwierdzili jednocześnie, że do ekstraktu wodnego przechodzi więcej węglowodanów, co powodowało, że ekstrakty te były stosunkowo ubogie w związki czynne. Skerget i in. (2005) ekstrahowali metanolem oregano, liście laurowe, liście z drzew oliwkowych, dziurawca zwyczajnego i głogu dwuszypkowego. W efekcie uzyskali różne wydajności procesów – od 24,6% w przypadku liści laurowych do 34,7% w przypadku liści z drzewa oliwkowego.

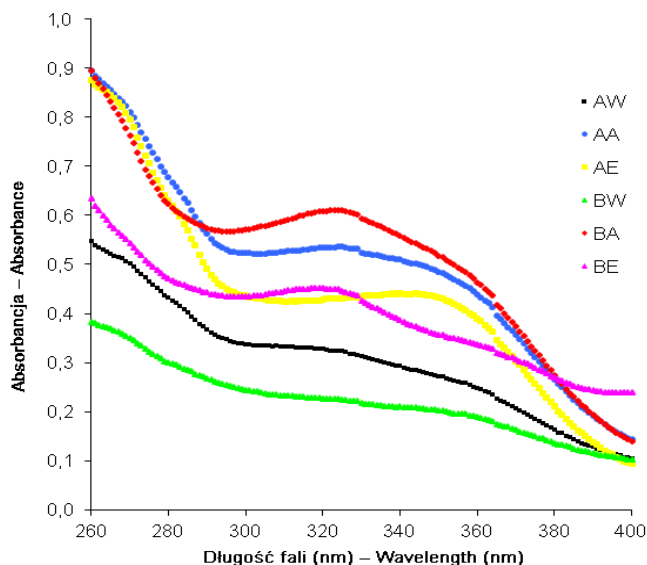
Wydajność procesów ekstrakcyjnych zależy od właściwości ekstrahowanych związków, a ściślej – od ich rozpuszczalności w zastosowanym rozpuszczalniku (Suhaj, 2006). Według ogólnie istniejącej zasady rozpuszczalności „podobne rozpuszcza się w podobnym”, co oznacza, że związki chemiczne posiadające kwaśny atom wodoru albo dużo grup hydroksylowych będą łatwiej się rozpuszczały w rozpuszczalnikach protonowych niż aprotonowych. Podobnie związek, który sam posiada duży moment dipolowy, będzie lepiej rozpuszczalny w rozpuszczalnikach polarnych niż apolarnych, posiadających zerowy albo bardzo mały moment dipolowy. Właściwość przechodzenia związku chemicznego do roztworu wynika z jego asymetrycznej budowy, z częściowo przemieszczonym ładunkiem elektrycznym. Warunkiem polarności cząsteczek jest więc występowanie w nich wiązań spolaryzowanych, czyli takich, w których chmury elektronowe są częściowo przemieszczone względem środka wiązania na skutek różnic w elektroujemności związanych atomów. W wyniku ekstrakcji za pomocą rozpuszczalników w ekstrakcie znajdują się zwykle takie surowce organiczne, jak: monosacharydy, oligosacharydy, kwasy organiczne, barwniki, garbniki, inne polifenole itp. Proporcje tych komponentów mogą być zróżnicowane, w zależności od użytego rozpuszczalnika (Yu i in., 2005). Ponadto można przypuszczać, że większa wydajność ekstrakcji z liści żółtych była związana z procesami wędnięcia i postępującą hydrolizą form związanych, takich jak estry czy glikozydy, co przełożyło się na ich większą rozpuszczalność i w efekcie większą wydajność ekstrakcji.



## Widma UV ekstraktów z liści miłorzębu

Widmo UV stanowi zapis pochłaniania energii promienistej przez badaną substancję, a dokładniej jej chromofor lub chromofory, czyli tę część cząsteczki, która jest bezpośrednio odpowiedzialna za jej barwę. Najczęściej są to pierścienie aromatyczne (aromatyczny sekstet elektronów), wiązania wielokrotne (np. wiązanie  $\pi$ , powstałe w wyniku nakładania bocznego orbitali atomowych), zarówno między atomami węgla, jak i innymi, np. grupy karbonylowej. Ponieważ pochłonięciu ulega kwant energii o określonej wartości, widmo UV powinno być zbiorem paru (jeśli występuje w cząsteczce parę chromoforów) ostrych linii, gdyż określonemu kwantowi energii odpowiada ściśle określona długość fali, i tylko taka zostanie pochłonięta. Jednak widma otrzymywane w praktyce bardzo się różnią od teorii. Jest to najczęściej zespół dwóch-trzech szerokich pasm nakładających się częściowo na siebie, dlatego stosowanie spektrofotometrii UV-VIS jako pojedynczej metody analizy ekstraktów i związków aktywnych w nich zawartych jest trudne. Trudność ta ma miejsce nawet wówczas, gdy warunki oznaczeń są modyfikowane, ekstrakty bowiem są mieszaniną wielu różnych związków i ich pochodnych, które mają maksima przy różnych długościach fali, dlatego badania spektrofotometryczne pozwalają jedynie na ogólne oszacowanie obecności bądź też braku poszczególnych grup związków.

W warunkach prowadzonego doświadczenia stężenia ekstraktów poddanych analizie były jednakowe. Pozwoliło to na wstępne szacunkowe zróżnicowanie badanych prób pod względem poziomu zawartości związków polifenolowych. Uzyskane wyniki pomiarów przedstawiono w formie widm zamieszczonych na rysunku 2. Spektrofotome-



Rys. 2. Widma UV ekstraktów z liści miłorzębu. Objasnienie symboli – jak w tabeli 2

Fig. 2. UV spectra of extracts from the ginkgo leaves. Explanation of symbols – like as Table 2

tryczny pomiar widm UV wykonano w zakresie długości fal 260-400 nm. Analiza krzywych pozwoliła wnioskować o obecności związków fenolowych we wszystkich ekstraktach. Odnotowano duże wartości absorbancji w maksimach absorpcji – przy długości fal 350 nm, natomiast przy 290 nm obserwowano przebiegię pasma absorpcji. Najwyższym poziomem absorbancji charakteryzowały się ekstrakty acetonowo-wodne z liści żółtych oraz zielonych, a najniższym – ekstrakty wodne. Ekstrakty sporządzone z użyciem etanolu charakteryzowały się mniejszą niż ekstrakty acetonowo-wodne wartością maksimum absorbancji, jednak maksimum to zaobserwowano przy różnych długościach fali. Ekstrakt BE maksimum miał przy 320 nm, natomiast AE – przy 345 nm. Maksima przy krótszych długościach fal świadczą o obecności izoflawonów, następnie fenolokwasów, a maksima przy 340-360 nm przemawiają za obecnością flawonoli lub flawonów. Na tym etapie badań stwierdzono, że ekstrakty acetonowo-wodne charakteryzowały się – w porównaniu z etanolowymi i wodnymi – większą zawartością polifenoli lub innym ich składem.

Również Amarowicz i in. (2008) charakteryzowali w ten sposób acetonowy (80-procentowy) i metanolowy (80-procentowy) ekstrakt z liści winogron. Wykonali oni m.in. pomiar UV widm absorpcyjnych i uzyskali wynik podobny do przedstawionego w naszej pracy, świadczący o obecności związków polifenolowych. Jednakże w badaniach Amarowicza i in. (2008) ekstrakt metanolowy charakteryzował się większą absorbancją w porównaniu z ekstraktem acetonowym w badanym zakresie długości fal. Rybarczyk i Amarowicz (2007) frakcjonowali na żelu krzemionkowym ekstrakt z nasion łubinu słodkiego i uzyskali cztery frakcje, dla których badali widma UV. W naszej pracy nie frakcjonowano ekstraktów, przez co poszczególne pasma nałożyły się, w wyniku czego powstał połączony obraz wielu pików.

### **Zawartość kwasów fenolowych w ekstraktach z miłorzębu**

W otrzymanych ekstraktach oznaczono zawartość wolnych kwasów fenolowych metodą HPLC (tab. 3). Spośród analizowanych kwasów dominujące były: kwas protokatechowy, *p*-hydroksybenzoesowy oraz *o*-kumarowy, które występowały na istotnie wyższych poziomach niż pozostałe ( $p < 0,001$ ). Zawartość kwasów fenolowych w ekstraktach zależała zarówno od użytego rozpuszczalnika, jak i od rodzaju liści. W ekstraktach z liści zielonych dominującym kwasem był kwas protokatechowy, którego zawartość w stosunku do kwasu *p*-hydroksybenzoesowego była 3,3 razy większa w AW (4572  $\mu\text{g/g}$  s.m.), 3,8 razy w AE (4692  $\mu\text{g/g}$  s.m.) oraz 5 razy w AA (9418  $\mu\text{g/g}$  s.m.). W ekstraktach z liści żółtych oznaczono największą ilość kwasu *p*-hydroksybenzoesowego, którego zawartość w stosunku do kwasu protokatechowego była 3,6 razy większa w BW (7379  $\mu\text{g/g}$  s.m.), 2,5 razy w BA (7080  $\mu\text{g/g}$  s.m.) i 1,2 razy w BE (4489  $\mu\text{g/g}$  s.m.).

Badane kwasy występowały w ekstraktach na różnym poziomie. W najmniejszym stopniu wykazano obecność kwasu chlorogenowego (od 21  $\mu\text{g/g}$  s.m. w AE do 86  $\mu\text{g/g}$  s.m. w AW). Większą zawartość kwasów: wanilinowego, chlorogenowego, kawowego, *p*-kumarowego, ferulowego i *o*-kumarowego stwierdzono w ekstraktach acetonowo-wodnych oraz etanolowych z liści żółtych, z kolei kwas sinapowy w większym stężeniu występował w ekstraktach z liści zielonych. Kwas kynureninowy, należący do związków azotowych i będący pochodną tryptofanu, znajdował się w ekstraktach w stosunkowo niewielkich ilościach (od 10  $\mu\text{g/g}$  s.m. w AE do 41  $\mu\text{g/g}$  s.m. w BW), jednak jego

Kobus-Cisowska, J., Flaczyk, E., Siger, A., Kmieciak, D. (2015). Wpływ warunków ekstrakcji na wydajność i skład wybranych ekstraktów z liści zielonych i żółtych miłorzębu dwuklapowego. Nauka Przyr. Technol., 9, 1, #9. DOI: 10.17306/J.NPT.2015.1.9

Tabela 3. Zawartość kwasów fenolowych oraz kwasu kynureninowego w ekstraktach z liści miłorzębu ( $\mu\text{g/g s.m.}$ )

Table 3. Content of phenolic acids and kynurenic acid in extracts of ginkgo leaves ( $\mu\text{g/g d.m.}$ )

Kwas – Acid	AW	AA	AE	BW	BA	BE
Protokatechowy Protocatechuic	4 572 <sup>D</sup> ±87	9 418 <sup>E</sup> ±190	4 692 <sup>D</sup> ±64	2 054 <sup>A</sup> ±3	2 797 <sup>B</sup> ±19	3 821 <sup>C</sup> ±3
<i>p</i> -Hydroksybenzo- esowy <i>p</i> -Hydroxybenzoic	1 395 <sup>B</sup> ±10	1 882 <sup>C</sup> ±36	1 249 <sup>A</sup> ±24	7 379 <sup>E</sup> ±98	7 080 <sup>E</sup> ±104	4 489 <sup>D</sup> ±54
Wanilinowy Vanillin	170 <sup>B</sup> ±12	195 <sup>B</sup> ±21	130 <sup>A</sup> ±12	276 <sup>C</sup> ±15	305 <sup>C</sup> ±16	528 <sup>D</sup> ±26
Kawowy Caffeic	63 <sup>E</sup> ±2	30 <sup>B</sup> ±1	26 <sup>A</sup> ±0	34 <sup>C</sup> ±0	51 <sup>D</sup> ±1	68 <sup>F</sup> ±1
<i>p</i> -Kumarowy <i>p</i> -Coumaric	143 <sup>A</sup> ±3	162 <sup>B</sup> ±12	147 <sup>A</sup> ±6	165 <sup>B</sup> ±9	175 <sup>C</sup> ±4	175 <sup>C</sup> ±4
Ferulowy Ferulic	100 <sup>D</sup> ±2	99 <sup>C</sup> ±0	76 <sup>A</sup> ±0	94 <sup>C</sup> ±1	116 <sup>E</sup> ±5	84 <sup>B</sup> ±2
Sinapowy Sinapic	458 <sup>D</sup> ±26	283 <sup>B</sup> ±20	478 <sup>D</sup> ±33	588 <sup>E</sup> ±21	229 <sup>A</sup> ±9	337 <sup>C</sup> ±1
<i>o</i> -Kumarowy <i>o</i> -Coumaric	1 764 <sup>D</sup> ±61	2 032 <sup>E</sup> ±15	1 340 <sup>B</sup> ±8	3 120 <sup>F</sup> ±65	597 <sup>A</sup> ±8	1 554 <sup>C</sup> ±13
Chlorogenowy Chlorogenic	86 <sup>F</sup> ±2	30 <sup>B</sup> ±1	21 <sup>A</sup> ±0	48 <sup>D</sup> ±1	66 <sup>E</sup> ±2	44 <sup>C</sup> ±1
Kynureninowy Kynurenic	17 <sup>B</sup> ±1	26 <sup>D</sup> ±0	10 <sup>A</sup> ±0	41 <sup>F</sup> ±0	34 <sup>E</sup> ±1	22 <sup>C</sup> ±0
Suma – Total	8 770 <sup>B</sup> ±122	14 157 <sup>E</sup> ±166	8 168 <sup>A</sup> ±83	13 799 <sup>D</sup> ±72	11 451 <sup>C</sup> ±129	11 121 <sup>C</sup> ±48

Dane przedstawiają wartości średnie z trzech powtórzeń oraz odchylenie standardowe. Wartości średnie oznaczone różnymi dużymi literami w tym samym wierszu świadczą o istotności różnic ( $p \leq 0,05$ ). Objaśnienie symboli – jak w tabeli 2.

Data represent the mean values of three replicates and standard deviation. Mean values marked with different capital letters in the same row indicate the significance of differences ( $p \leq 0.05$ ). Explanation of symbols – like as Table 2.

udokumentowane właściwości przeciwrodnikowe kształtują całkowitą pojemność antyoksydacyjną ekstraktów (Hyun i in., 2006).

Ekstrakty AA oraz BW charakteryzowały się największą zawartością sumy oznaczonych kwasów (odpowiednio 14 157  $\mu\text{g/g s.m.}$  oraz 13 799  $\mu\text{g/g s.m.}$ ). Nieco mniej tych związków stwierdzono w próbach BA oraz BE (11 451 oraz 11 121  $\mu\text{g/g s.m.}$ ), a najmniej – w ekstraktach AW oraz AE (odpowiednio 8770 i 8168  $\mu\text{g/g s.m.}$ ). Podobny do przedstawionego skład jakościowy uzyskali Satoh i Nishida (2004), którzy analizowali polifenolokwasy w ekstraktach z liści miłorzębu i stwierdzili dużą zawartość kwasów *p*-kumarowego, *p*-hydroksybenzoowego oraz protokatechowego. Duże zawartości kwasów protokatechowego i *p*-hydroksybenzoowego w badanych ekstraktach

można wytłumaczyć ich powszechnym występowaniem w stanie wolnym w roślinach nagonasiennych, do których zaliczany jest m.in. miłorząb. Pozostałe kwasy prawdopodobnie występowały w formie związanej, tworząc swoiste kompleksy przeważnie z estrami i glikozydami, stąd ich zawartość w formie wolnej w ekstraktach z miłorzębu była stosunkowo mała. Również Zheng i Wang (2001) w świeżych liściach miłorzębu oznaczyli znikome ilości kwasu wanilinowego (48  $\mu\text{g/g}$  s.m.), ale za to większą ilość kwasu kawowego (1340  $\mu\text{g/g}$  s.m.).

Badane ekstrakty charakteryzowały się dużą zawartością kwasów fenolowych. Największą ich sumę stwierdzono w ekstrakcie acetonowo-wodnym z liści zielonych oraz wodnym z liści żółtych. Wydaje się, że zawartość kwasów fenolowych oznaczona w ekstraktach może wpłynąć na ich właściwości przeciwutleniające, których mechanizm działania opiera się na hamowaniu generacji wolnych rodników, zdolności ich zmiatania oraz zwiększaniu aktywności katalitycznej endogennych enzymów uczestniczących w neutralizacji wolnych rodników. W szczególności dotyczy to kwasów protokatechowego, *p*-hydroksybenzoesowego oraz *o*-kumarowego, których w ekstraktach z miłorzębu stwierdzono najwięcej.

## Wnioski

1. Jednokrotna ekstrakcja wodą, mieszaniną acetonu i wody oraz etanolem pozwoliła na uzyskanie ekstraktów o dużej zawartości polifenoli, a jej wydajność zależała zarówno od rodzaju rozpuszczalnika, jak i od okresu wegetacji liści i była większa w przypadku liści żółtych.

2. Analiza widm absorpcji UV pozwoliła wnioskować o obecności związków fenolowych we wszystkich ekstraktach. Najwyższym poziomem absorbancji charakteryzowały się ekstrakty acetonowo-wodne z liści żółtych oraz zielonych.

3. Zawartość kwasów fenolowych zależała od rodzaju użytego rozpuszczalnika oraz okresu wegetacji liści. Ekstrakty z liści zielonych zawierały więcej kwasu protokatechowego. Ekstrakty z liści żółtych charakteryzowały się większą zawartością kwasów *p*-hydroksybenzoesowego i wanilinowego.

## Literatura

- Amarowicz, R., Narolewska, O., Karamać, M., Kosińska, A., Weidner, S. (2008). Grapevine leaves as a source of natural antioxidants. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 58, 73–78.
- 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.
- van Beek, T. A., Lelyveld, G. P. (1997). Preparative isolation and separation procedure for ginkgolides A, B, C and J and bilobalide. *J. Nat. Prod.*, 60, 7, 735–738.
- van Beek, T. A., Scheeren, H. A., Rantio, T., Melger, W. Ch., Lelyveld, G. P. (1991). Determination of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* leaves and phytopharmaceuticals. *J. Chromatogr. A*, 543, 375–387.

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 Przyr. Technol.*, 9, 1, #9. DOI: 10.17306/J.NPT.2015.1.9

---

- Boonkaew, T., Camper, N. D. (2005). Biological activities of *Ginkgo biloba* extracts. *Phytomedicine*, 12, 318–323.
- Chen, J., Zhang, T., Jiang, B., Mu, W., Miao, M. (2012). Characterization and antioxidant activity of *Ginkgo biloba* exocarp polysaccharides. *Carbohydr. Polym.*, 87, 1 (4), 40–45.
- Cheung, L. M., Cheung, P., Ooi, V. (2003). Antioxidant activity and total phenolic of edible mushrooms extracts. *Food Chem.*, 81, 249–255.
- Ding, S., Dudley, E., Plummer, S., Tang, J., Newton, R. P., Brenton, A. G. (2008). Fingerprint profile of *Ginkgo biloba* nutritional supplements by LC/ESI-MS/MS. *Phytochemistry (Oxf.)*, 69, 1555–1564.
- Ellnain-Wojtaszek, M., Kruczyński, Z., Kasprzak, J. (2003). Investigation of free radical scavenging activity of *Ginkgo biloba* L. leaves. *Fitoterapia*, 74, 1–6.
- Hromadkova, Z., Ebringerova, A., Valachovic, P. (1999). Comparison of classical and ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Salvia officinalis* L. *Ultrasonics Sonochem.*, 5, 163–168.
- Hyun, S. K., Jung, H. A., Chung, H. Y., Choi, J. S. (2006). *In vitro* peroxynitrite scavenging activity of 6-hydroxykynurenic acid and other flavonoids from *Ginkgo biloba* yellow leaves. *Arch. Pharm. Res.*, 29, 12, 1074–1079.
- Janiszewska, E., Witrowa-Rajchert, D. (2005). Ekstrakcja nadkrytyczna w przemyśle spożywczym. *Żywn. Nauka Technol. Jakość*, 45, 4, 5–16.
- Kobus, J., Flaczyk, E. (2007). Optymalizacja acetonowo-wodnej ekstrakcji naturalnych przeciwutleniaczy z liści *Ginkgo biloba*. *Żyw. Człow. Metab.*, 34, 1/2, 1430–1434.
- Kobus, J., Flaczyk, E., Siger, A., Nogala-Kalucka, M., Korczak, J., Pegg, R. B. (2009). Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts of *Ginkgo* leaves. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 111, 1150–1160.
- 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. DOI: 10.1016/j.meatsci.2014.01.011
- Lin-Chun, M., Xin, P., Fei, Q., Xue-Hua, F. (2006). Antioxidant properties of water and ethanol extracts from hot air-dried freeze-dried daylily flowers. *Eur. Food Res. Technol.*, 222, 236–241.
- Liu, C. S., Cheng, Y., Zhang, W., Chen, N. H., Zhang, J. T. (2006). Comparison of antioxidant activities between salvianolic acid B and *Ginkgo biloba* extract (EGb 761). *Acta Pharmacol. Sin.*, 27, 1137–1145.
- Ningappa, M. B., Dinesha, R., Srinivas, L. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of polyphenol-enriched curry leaf (*Murraya koenigii* L.) extracts. *Food Chem.*, 106, 720–728.
- Pereira, E., Barros, L., Ferreira, I. (2013). Chemical characterization of *Ginkgo biloba* L. and antioxidant properties of its extracts and dietary supplements. *Ind. Crops Prod.*, 51, 244–248.
- Pietta, P., Mauri, P., Bruno, A., Rava, A., Manera, E., Ceva, P. (1991). Identification of flavonoids from *Ginkgo biloba* L., *Anthemis nobilis* L. and *Equisetum arvense* L. by high-performance liquid chromatography with diode-array UV detection. *J. Chromatogr. A*, 553, 223–231.
- Rybarczyk, A., Amarowicz, R. (2007). Chromatografia kolumnowa związków fenolowych słodkiego lubinu na żelu krzemionkowym. *Bromatol. Chem. Toksykol.*, 40, 4, 375–379.
- Sati, P., Pandey, A., Rawat, S., Rani, A. (2013). Phytochemicals and antioxidants in leaf extracts of *Ginkgo biloba* with reference to location, seasonal variation and solvent system. *J. Pharm. Res.*, 7, 9, 804–809.
- Satoh, H., Nishida, S. (2004). Comparative vasodilating actions among terpenoids and flavonoids contained in *Ginkgo biloba* extract. *Clin. Chim. Acta*, 339, 129–133.

- Siger, A., Nogala-Kałucka, M., Lampart-Szczapa, E., Hoffmann, A. (2004). Zawartość związków fenolowych w nowych odmianach rzepaku. *Rośl. Oleiste*, 25, 263–274.
- Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Rizner-Hras, A., Simonic, M., Knez, Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant material and their antioxidant activities. *Food Chem.*, 89, 191–198.
- Stefanovits-Banyai, E., Szentmihályi, K., Hegedus, A., Koczka, N., Vali, L., Taba, G., Blazovics, A. (2006). Metal ion and antioxidant alterations in leaves between different seeds of *Ginkgo biloba* L. *Life Sci.*, 78, 1049.
- Suhaj, M. (2006). Spice antioxidants isolation and their antiradical activity, a review. *J. Food Compos. Anal.*, 19, 531–537.
- Yu, J., Ahmedna, M., Goktepe, I. (2005). Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. *Food Chem.*, 90, 199–206.
- Zahradnikowa, L., Schmidt, S., Sekretar, S., Janac, L. (2007). Determination of the antioxidant activity of *Ginkgo biloba* leaves extract. *J. Food Nutr. Res.*, 46, 15–19.
- Zheng, W., Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5165–5170.

## EFFECT OF THE EXTRACTION PROCESS ON YIELD AND COMPOSITION OF SELECTED EXTRACTS FROM MAIDENHAIR TREE GREEN AND YELLOW LEAVES

**Summary.** The aim of the study was to evaluate the effect of extraction process on the extraction efficiency and composition of selected extracts from the maidenhair tree (*Ginkgo biloba* L.) green and yellow leaves. Taken three-step extraction, where water, solution of acetone and water and ethyl alcohol were used, effectiveness by evaluating the content of total polyphenols was estimated. In the next step yield of selected extraction processes was estimated, then UV spectra of the obtained extracts and their content of phenolic acids. The content of phenolic compounds in the following extracts showed high efficiency of the first extraction process. Analysis of UV spectra allowed to deduce the presence of phenolic compounds in all tested extracts. The absorption maxima were recorded at wavelengths between 290 nm and 350 nm. Analysed extracts showed high content of phenolic acids. The largest of the sum of phenolic acids was estimated in the acetone-water extract from green leaves and in water extract from yellow leaves. In green leaves extracts the predominant acid was protocatechuic, while in yellow leaves extracts the greatest amount of *p*-hydroxybenzoic acid was shown.

**Key words:** antioxidants, maidenhair tree, phenolic acids, extracts spectra, polyphenols

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 Przyr. Technol.*, 9, 1, #9. DOI: 10.17306/J.NPT.2015.1.9

---

*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: joannak@up.poznan.pl*

*Zaakceptowano do opublikowania – Accepted for publication:*

*14.10.2014*

*Do cytowania – For citation:*

*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 Przyr. Technol.*, 9, 1, #9. DOI: 10.17306/J.NPT.2015.1.9*