

Ginkgo biloba i fitopreparati Ginkga

Kuštrak, Danica; Sever, Anita

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 1995, 51, 49 - 64**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:014598>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



FARMACEUTSKI GLASNIK

GLASILO HRVATSKOG FARMACEUTSKOG DRUŠTVA

GOD. 51

OŽUJAK 1995.

BROJ 3

FAGLAI

Farm.Glas.

ISSN 014-8202

STRUČNI RADOVI

Danica Kuštrak (Zagreb) i Anita Sever (Varaždin)

Ginkgo biloba i fitopreparati *Ginkga**

UVOD

Suvremena medicina posljednjih je godina otkrila važno djelovanje sastavnica listova biljne vrste *Ginkgo biloba* L. Ove komponente u sastavu brojnih preparata djeluju u terapiji kod smetnji cerebralne i periferne arterijske cirkulacije.

U Japanu i Kini, domovini ove biljke, poznaju ljekovitost *Ginkga* već oko 5000 godina. Na farmaceutskom tržištu postoji veliki broj preparata izrađenih s ekstraktom listova *Ginkga* namijenjenih za liječenje insuficijencije cirkulacije i nervnih oboljenja. Smetnje se očituju glavoboljama, šumom u ušima, vrtoglavicama, a u kasnijem stadiju i slabljenjem intelektualnih sposobnosti, te gubitkom memorije. Smetnje arterijske cirkulacije učestala su bolest našeg vremena. S rastućim brojem starijih osoba sve je više pacijenata s ovakvim tegobama.

Klinička su ispitivanja međutim pokazala da se preparati *Ginkga* mogu s uspjehom primijeniti i u terapiji oboljenja uha. Ispitivanje je provedeno na 112 pacijenata na klinici za uho, grlo, nos, medicinskog sveučilišta u Lübecku od 1988. do 1991. godine.

Najnovija istraživanja pokazuju da bi se komponenta ginkgolid B mogao primijeniti i pri sepsi.

BOTANIČKI PODACI

Ginkgo, *Ginkgo biloba* L. pripada porodici ginkovke, *Ginkgoaceae* iz razreda golosjemenjača, *Gymnospermae*. Hegnauer (1) spominje postojanje 17 rodova iz porodice *Ginkgoaceae* s mnogobrojnim vrstama, što je utvrđeno na

*Rad je nagrađen Nagradom rektora za 1993. godinu.

osnovi fosilnih ostataka. Izumrli su svi osim roda *Ginkgo*. Stoga je *Ginkgo biloba* L. reliktna vrsta.

1. Etimologija naziva i strana imena

Uz naziv *Ginkgo biloba* L. susrećemo u literaturi sinonime: *Salisburia adiantifolia* Smith i *Pterophyllus alosburiensis* Nelson. Hegi (2) tvrdi da ime *Ginkgo biloba* L. potječe od kineskih narodnih imena: Gin-ko, što znači »srebrni plod«, Gin-kyo ili Hin-ko što znači »bademasti plod«.

Ime »biloba« dobila je biljka zbog karakterističnog dvokrpastog izgleda listova.

U Engleskoj *Ginkgo* nazivaju Maidenhair Tree (2). Ovaj se naziv temelji na sličnosti izgleda listova *Ginkga* i Maidenhair Fern koji ima latinsko ime *Adiantum capillis – veneris*. Od ovog latinskog naziva potječe i sinonim Ginkgova imena *Salisburia adiantifolia* Smith (4).

Japanaska imena su Ichonoki ili Ginnan-noki, a francuska za *Ginkgo* su: Noyer du Japon, l'arbre aux quarante écus (2).

2. Povijesni podaci

Okamenjeni ostaci *Ginkga* pronađeni su u Kini. Potječu iz mezozoika, dakle, biljka je postojala prije 150 milijuna godina. U razdobljima jure i krede *Ginkgo* doživljava svoj najveći razvoj i široku rasprostranjenost zahvaljujući vjerojatno otpornosti sjemenki na močenje morskom vodom (3,4). Od tada progresivno propada i nestaje. Vrsta je preživjela zahvaljujući dugotrajnom uzgoju i brizi redovnika budističkih hramova. U Kini i Japanu *Ginkgo* smatraju svetim drvetom, stoga se uvijek sadi uz budističke hramove.

Ginkgo biloba L. zauzima jedinstveno, gotovo izolirano mjesto u sistematici i vrlo je teško sa sigurnošću utvrditi njegovo porijeklo. Blizak srodnik mu je fosilni rod *Baiera* (postojao je od razdoblja permiana do razdoblja jure). Sve ono što se smatra abnormalnim karakteristikama *Ginkga*, normalne su osobine roda *Baiera*: višerežnjevitost lišća, brojni viseći sjemeni zamci na ženskim cvjetovima i brojni mikrosporangiji na svakom sporofilu.

Rod *Trichopitys* iz razdoblja permiana također je u srodstvu s *Ginkgom*.

Anatomske i morfološke osobine *Ginkga* pokazuju da se *Ginkgo* odvojio od razreda papratnjača prije *Cycada*, a svoje jedinstvene osobine zadržao je još od vremena paleozoika do danas (3).

3. Morfološka obilježja porodice Ginkgoaceae

Ginkgo biloba L. jedina je preživjela vrsta iz porodice *Ginkgoaceae*. Zato pod morfološkim obilježjima porodice podrazumijevamo morfološko obilježje same reliktna vrste.

4. Morfološka i anatomska obilježja vrste *Ginkgo biloba* L.

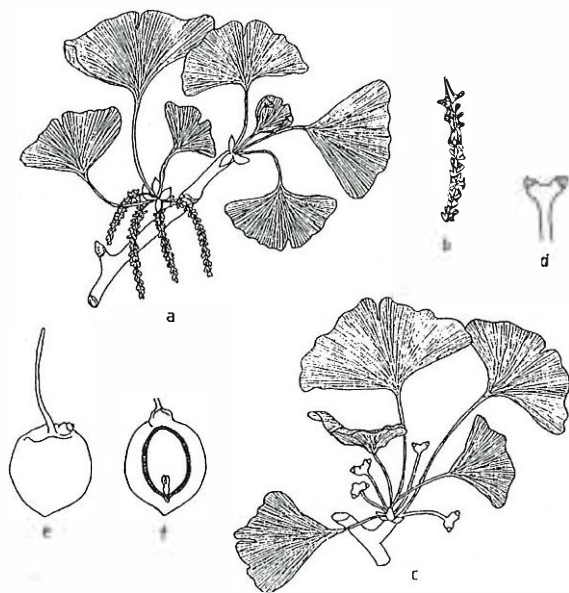
4.1. Morfološka obilježja

U svojoj domovini stablo *Ginkgo* može doseći i do 40 metara visine, i više od dva metra debljine. U našim prilikama i općenito umjerenog pojasa Europe, naraste 25–30 metara. U mladosti ima piramidalan rast. Starija stabla razvijaju široku krošnju porastom grana (3). Stablu je potrebno oko 30 godina da naraste 10 metara (6). Slično kao i kod četinjača, postoje dugi i kratki izbojci na kojima zavojito izrastaju listovi. Velike grane rastu ravno, ponekad strmo, a duž osi imaju kratke postrane izbojke, dužine 2–3 cm i 5–7 mm promjera. Na kratkim izbojcima listovi se razvijaju najčešće u skupini tzv. gronji. Svaka gronja ima 3–5 listova na vrlo savitljivoj peteljci (3).

Listovi su najizrazitije obilježje *Ginkga*. Listovi istog nodija često su anizofilni i heterofilni. Promjera su 4–7 cm, imaju valoviti rub i na vrhu urez koji ponekad gotovo potpuno podijeli list (dvokrpasti list). Iznimno može biti nekoliko ureza na listu pa list ima tzv. dlanastokrpasti oblik. Takav podsjeća na strukturu lista srodnog fosila roda *Baiera*. Takav se dlanastokrpasti list može smatrati reliktom, posljednjim ostatkom sastavljenog lista. Plojka lista sužava se prema dolje u savitljivu peteljku, koja je često duža od same plojke. Listovi rastu izmjenično u zavojitom poretku. Na kratkim izbojcima internodiji su zbijeni pa izgleda kao da svi listovi izrastaju iz istog nodija. Ovi su listovi obično nepodijeljeni. Donji je rub lista zadebljan. Zadebljanje se povećava prema peteljci, tako da je list oblikovan kao orijentalna otvorena ili pak kao naborana lepeza. Listovi imaju paralelno razgranate žile (3). U proljeće su listovi svijetlozeleni, ljeti tamnozeleni, a u jesen su prekrasne žute boje (6).

Ginkgo je dvodoman. Muški cvjetovi razvijaju se na kratkim izbojcima u pazušcu listova. Obično ih je šest u skupini i resasta su oblika; dugi približno 2,5 cm. Ženski cvjetovi, koje McLean i Ivmeý-Cook (3) nazivaju ovularnim izdancima (engleski ovuliferous axis), Alehin i surad. (5) makrosporofilima, a Kušan (7) i Domac (8) plodnim listovima, razvijaju se na kratkim izbojcima, u pazušcima listova ženskog stabla. Jednostavna drška plodnog lista, oko 2,5 cm dugačka, na vrhu se grana u dva dijela od kojih svaki na kraju nosi sjemeni zametak. Baza sjemenih zametaka okružena je mesnatim ovojem, kojeg McLean i Ivmeý-Cook (3) nazivaju ring ili collar. Od dva sjemena zametka u plodnom listu jedan se obično razvija u plod.

Plod ima debeli žuti mesnati ovoj, neugodnog mirisa, a obavija sjemenku. Sjemenka ima oblik male ovalne koštunice, duge do 3 cm. Duži promjer označen je s dva hrpta na tvrdoj stijenci. Ponekad se razvijaju sjemenke sa 3 hrpta, vrlo slične fosilnim sjemenkama *Trigonocarpus* vrsta. Jezgra sjemenke je jestiva (3). Slika 1.



Slika 1. Morfološka obilježja vrste *Ginkgo biloba* L.

- a – izbojak s muškim cvjetovima;
- b – muški cvijet
- c – izbojak sa ženskim cvjetovima
- d – ženski cvijet
- e – zrelo sjeme;
- f – presjek sjemena

4.2. Anatomska obilježja

A) Anatomija debla

Anatomski debl je slično deblima *Pinus* vrsta. Kora je svijetlosiva, a u starosti ispucala. Vanjsku koru tvori debeli sloj periderme izgrađen od plutenog kambija ili felogena koji prema unutrašnjosti razvija debeli sloj feloderme. Floem je izgrađen od sitastih cijevi bez stanica pratilica. U floemu postoje diskontinuirana područja s vlaknastim stanicama i mala količina parenhima. Floem je od ksilema odvojen fascikularnim kambijem, dakle središnji cilindar čini otvorena kolateralna žila. Ksilem je izgrađen od uskih i širokih traheida poredanih u nepravilne, radijalne nizove. Traheide koje nastaju u proljeće imaju širi lumen, nešto tanje stijenke i brojnije jažice, nego traheide kasnog drveta koje nastaje ljeti; prve služe prije svega za provođenje vode, druge u prvom redu za učvršćenje (3,6). Ima malo ksilemskog parenhima s kristalima kalcij-oksalata.

B) Anatomija listova

Iako su listovi bjelogoričnog tipa i otpadaju u jesen, imaju prilično čvrstu tkivnu strukturu te debelu kutikulu i uleknut stomatalni aparat na donjoj strani lista. Zbog ovih su osobina listovi kseromorfni kao oni u *Pinusa*. Oko udubljenih puči na vrlo karakterističan način od površine lista prema unutrašnjosti, smještene su stanice susjednice.

Peteljke listova sadrže dvostruki krug koji potječe od dviju kolateralnih žila. Na ulazu u list te se dvije žile razgranjuju u lijevu i desnu pa ponovo granaju. Na taj način svaka polovica lista ima neovisnu nervaturu. Budući da su žile prema van zavinuti nastavci žila stabljike, njihov je ksilemski dio okrenut prema gornjoj strani lista, a floemski prema donjoj.

Listovi smješteni na dužim izbojcima imaju mezofil građen od palisada i spužvastog parenhima. Na kratkim su izbojcima listovi čiji je mezofil jednoličan. Nezbijene, slobodne stanice središnjeg parenhima lista razvučene su i smještene paralelno s površinom lista.

Iako su odrasli dijelovi *Ginkga* gotovo potpuno lišeni dlaka, peteljke mladih listova i ovojnice pupoljaka gusto su dlakave, a neke dlačice ostaju na bazi peteljke čak i u odraslih listova.

5. Geografska rasprostranjenost vrste *Ginkgo biloba* L.

Samonikla stabla *Ginkga* nalaze se u zapadnim dijelovima Kine i u pojedinim dijelovima Japana (3). U nekim krajevima Kine *Ginkgo* je nađen do 3000 m nad morem. Inače se ondje uzgaja na područjima s umjerenom klimom, obično do 1800 m nadmorske visine (6).

Ginkgo je vrlo dekorativna vrsta pa se u posljednjih 300 godina kultivira u cijelom svijetu. Nalazimo ga u parkovima, drvodredima i posebno u botaničkim vrtovima. Uglavnom se uzgajaju muški primjerci. Ženska stabla razvijaju plodove vrlo neugodnog mirisa pa se izbjegava njihova sadnja.

Može se razmnožavati i reznicama, no stabla koja porastu iz sjemena pravilnijeg su i ljepšeg habitusa.

Stablu *Ginkga* najbolje odgovaraju sunčani položaji i svježja, dublja, ali ne i prevlažna tla. Dosta je otporan na visoke i niske temperature te na uvjete gradske sredine (6).

U šumarskoj enciklopediji, spominju se varijeteti *Ginkga*, koji se međusobno morfološki razlikuju (6).

Ginkgo biloba var. *pendula* Carr. – ima više grane

Ginkgo biloba var. *fastigiata* Henry – ima usko čunjastu krošnju

Ginkgo biloba var. *lanciniata* Carr. – ima krupnije, dublje dijeljeno lišće

Ginkgo biloba var. *variegata* Carr. – ima lišće sa žutim prugama

6. Farmakognoški podaci

Ginkgo biloba nije još oficinalna droga u europskim farmakopejama. Tek je u prijedlogu ESCOP-a (European Scientific Cooperative on Phytotherapy). 18 lipnja 1992. godine predložena je izrada monografije *Ginkgo biloba*, odnosno *Ginkgo folium*.

Budući da je domovina biljne vrste *Ginkgo biloba* L. Kina i Japan, službena kineska farmakopeja objavljuje monografiju »*Ginkgo semen*«. McLean i Ivimey-Cook (3) otkrivaju da je jezgra sjemenke jestiva.

Wagner (9) u skupini »Droge s flavonoidima« donosi monografiju *Ginkgo folium*, koja obuhvaća, uz botaničke podatke i geografsku rasprostranjenost, kemizam listova *Ginkga* i terapijsku primjenu ove biljne droge.

7. Kemijski podaci

7.1. Kemijska obilježja porodice *Ginkgoaceae*

Budući da je danas porodica *Ginkgoaceae* svedena samo na vrstu *Ginkgo biloba* L., pod kemijskim obilježjem porodice podrazumijevamo kemijsko obilježje ove vrste.

7.2. Kemizam vrste *Ginkgo biloba*

Kemizam vrste *Ginkgo biloba* dosta je istražen, ali se istraživanja još nastavljaju.

Dosad su izolirani i identificirani ovi spojevi:

1. Manan i pentozan

U drvnom dijelu vrste *Ginkgo biloba* nađeno je 3,4 % manana i 5,5 % pentozana

2. Rafinoza

Muški cvjetovi *Ginkga* sadrže do 4 % rafinoze.

3. Škrob, bjelančevine, lipoidi

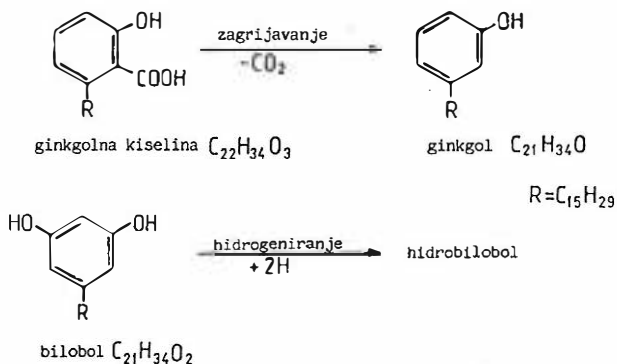
Suhe sjemenke sadrže 13,1 % bjelančevina, 67,9 % škroba, 2,9 % lipoida, 3,4 % pepela, 1 % sirovih vlakana, 1,6 % pentozana.

4. Kiseline

Svježi mesnati ovoj oko sjemenke (sarkotesta) sadrži mravlju, octenu, propionsku, puno maslačne, valerijansku, te puno kaprnske kiseline.

5. Ginkgolna kiselina i bilobol

Iz osušenih sarkotesta izolirani su ginkgolna kiselina i bilobol. Oba spoja jako iritiraju kožu. Grijanjem ginkgolna kiselina prelazi uz gubitak CO_2 , u ginkgol. Alkalne soli ginkgolne kiseline djeluju jako hemolizirajuće., Slika 2.



Slika 2.

6. Ginol

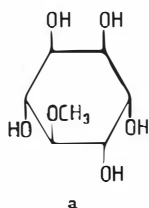
Iz osušenih sarkotesta izoliran je još jedan sekundarno-parafinski alkohol nazvan ginol.

Ginol je sinonim za nanozan - 10-ol

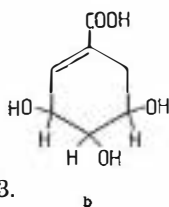
7. Pinit (5-metil eter α -inozit)

Pinit je nađen u količini od 0,05 % u listovima. Slika 3a.

8. Šikimi kiselina je također prisutna u listovima. Njezin sadržaj je promjenljiv i ovisi o razvojnem stadiju listova: listovi u lipnju sadrže 0,2 %, u rujnu 0,6 %, a u studenom 0,4 % šikimi kiseline. Slika 3b.



Slika 3.



9. Neestolidni vosak

Iz suhih listova dobiveno je 0,7–1 % neestolidnog voska čiji je esterski broj 58,2. Vosak sadrži 10 % slobodnih kiselina, 15 % estera, 75 % parafina i voskastih alkohola. Glavni sastavni dio voska je ginol (nonakozan -10-ol), nonakozan, nonakozan -10-on i oktakozanol.

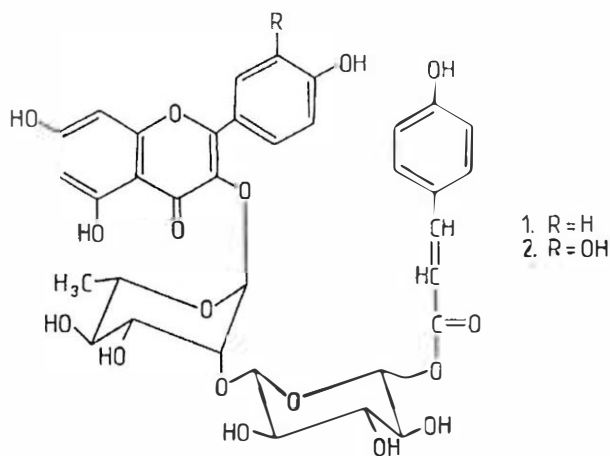
10. Najvažnija skupina tvari u kemizmu *Ginkga* su flavonoidi.

Izolirani su iz listova.

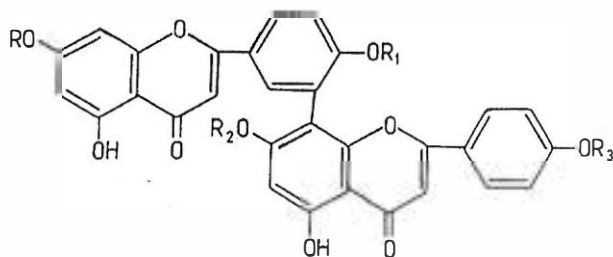
Prema kemijskoj su strukturi ovi spojevi podijeljeni u 3 skupine (tablica 1.) (12).

Tablica 1.

Komponenta	Skupina
Šikimi kiselina 6-hidroksikinurenska kiselina	kiseline
1. flavonolski glikozidi 2. flavonolski glikozid 3. kvercetin-3-O-rutinozid 4. kvercetin-3-O-glukozid 5. kemferol-3-O-glukozid 6. flavonolski glikozid	flavonolski glikozidi
1. kemferol-3-O-kumaroil glukoramnozid 2. kvercetin-3-kumaroil glukoramnozid	aciflavonol glikozidi
1. ginkgetin / izoginkgetin 2. bilobetin 3. amentoflavon 4. sciadopitizin 5. 5' - metoksibilobetin	biflavoni



Slika 4. Struktura aciflavanolskih glikozida izoliranih iz listova *Ginkgo biloba*



biflavon	R	R ₁	R ₂	R ₃
ginkgetin	CH ₃	CH ₃	H	H
isoginkgetin	H	CH ₃	H	CH ₃
sciadopitizin	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃

Slika 5. Struktura biflavona: ginkgetina, isoginkgetina i sciadopitizina

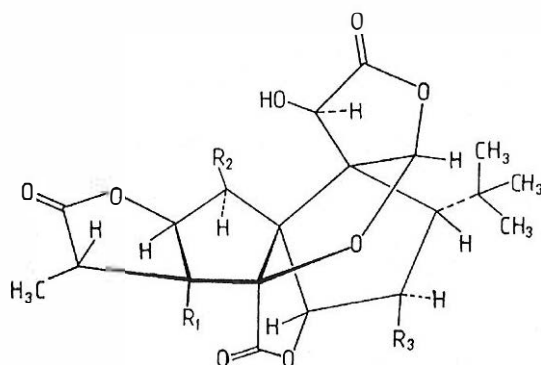
11. Kemijski zanimljivu skupinu tvari čine i terpenke strukture. Slika 6. i 7..

Samo iz *Ginkgo biloba* izolirani su diterpentrilaktoni: ginkgolid A, B, C i J. Farmakološki je upravo ginkgolid B najznačajniji (11).

12. Bilobalid je strukturno seskviterpen (11).

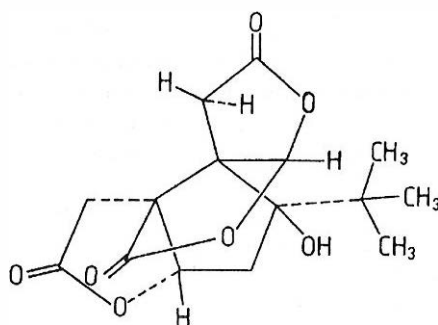
13. Iz listova su izolirani i leukoantocijani koji nakon hidrolize tvore aglikon cijanidin.

14. Novija istraživanja potvrdila su i prisutnost steroida, karotinoida kao i β -lecitina.



Slika 6. Struktura ginkgolida A, B, C i J izoliranih iz listova *Ginkgo biloba*

ginkgolid	R ₁	R ₂	R ₃
A	OH	H	H
B	OH	OH	H
C	OH	OH	●H
J	OH	H	OH



Slika 7. Struktura bilobalida

8. Analitika ekstrakata listova *Ginkga*

Budući da još ne postoji monografija *Ginkgo folium* ni u jednoj farmakopeji, nema ni pravih analitičkih zahtjeva, odnosno podataka. U terapijskoj uporabi su ekstrakti listova *Ginkga*, a tu kromatografija na tankom sloju uz velik broj sastavnica, nije dovoljno pouzdana metoda. Najboljom analitičkom metodom pokazala se HPLC (tekućinska kromatografija visoke moći razlučivanja) kombinirana s mjerenjem UV- spektra flavonoidnih aglikona, odnosno s mjerenjem indeksa loma kada se određuju ginkgolidi i bilobalid.

Wagner i suradnici (10) razradili su kromatografiju na tankom sloju, kao i HPLC analize ekstrakata *Ginkga* i preparata koji sadrže ove ekstrakte. Dobiveni karakteristični HPLC-kromatogram ekstrakta *Ginkga* tzv. »otisk

prsta« sadržavao je 20 pikova, ali su dokazana samo 2 flavonoida (rutin i astragalin) i 4 biflavonoida (bilobetin, ginkgetin, isoginkgetin i sciadopitizin), ginkgol, šikimi kiselina i 6-hidroksikinurenska kiselina.

Nedostatak poredbenih supstancija sprečava potpunu identifikaciju pikova na kromatogramu pa se flavonoidi dokazuju pomoću svojih UV- spektara.

Obrnuto – faznu HPLC metodu upotrijebili su Lobstein i suradnici (12) radi određivanja sezonske promjene sadržaja flavonolskih glikozida, aciflavonolskih glikozida i biflavona u listovima *Ginkga*. Listovi *Ginkga* sabirani su tokom jednog vegetacijskog razdoblja svakih mjesec dana od ožujka do studenoga.

Ekstrakti listova *Ginkga* pripremljeni su pomoću etanola u Soxhlet aparaturi. Sirovi etanolni ekstrakti ispareni su do suha pod sniženim tlakom, a alikvot ostatka otopljen je u metanolu. Stacionarna faza u koloni bila je sastavljena od ovih supstancija:

LichnoCART 125-4, Superspher 100 RP-18, Lichroprep RP-18.

Kao mobilna faza upotrijebljena su otapala acetonitril i 10 %-tna fosfatna kiselina u različitim koncentracijama. Detekcija odijeljenih sastavnica eluiranih s kolone provedena je pomoću UV-spektrofotometra na valnoj dužini od 330 nm. Identitet glavnih pikova provjeren je usporednim ubrizgavanjem poredbenih supstancija: rutin, kemferol-p-kumaroil-glukoramnozid i bilobetin. Prema tim poredbenim supstancijama određen je sadržaj pojedinih skupina flavonoida. Rezultati ispitivanja pokazuju da pupoljci sadrže najveću količinu aciflavonolskih glikozida. Proljetni listovi najbogatiji su flavonolskim glikozidima, a jesenski sadrže više biflavonoida u odnosu na proljetne listove.

Hasler i Sticher (13) razvili su dvije vrlo pouzdane obrnuto – fazne HPLC metode kojima se identificiraju i određuju flavonoidi u listovima *Ginkga*. Metoda A uključuje hidrolizu flavonoida, a zatim kvantitativno kromatografsko ispitivanje dobivenih aglikona i kvalitativnu analizu istovremeno odijeljenih biflavonoida. Metodom B dobiva se karakteristični kromatogram »otisak prsta«. Autori su materijal za ispitivanje skupili sa ženskog stabla u Zürichu (Mythenquai) od sredine svibnja do sredine studenoga 1988. Listovi su odmah osušeni na 35 °C, 72 h u sušioniku uz pojačanu ventilaciju. Za metodu A ekstrakt listova pripremljen je metanolom i 25 %-tnom kloridnom kiselinom u Soxhlet aparaturi. Otopina je uparena na manji volumen i očišćena propuštanjem kroz kolonu s modificiranim silikagelom C₁₈ kao stacionarnom fazom (eng. Bond Elut C₁₈). Za metodu B listovi su dva put ekstrahirani 80 %-tnim etanolom uz upotrebu mješalice na 20.000 okretaja u minuti.

Otopina je uparena na manji volumen i očišćena na koloni sa C₁₈- stacionarnom fazom (eng. Bond Elut C₁₈). Prilikom analize *Ginkgo*- preparata, alikvot otopine uparen je do suha, a zatim obrađen metodom A, odnosno metodom B. Stacionarna faza u HPLC-koloni bila je: Nucleosil 100-C₁₈ (čestice veličine 3 µm). Mobilna faza u metodi A je sustav otapala: metanol, tetrahi-

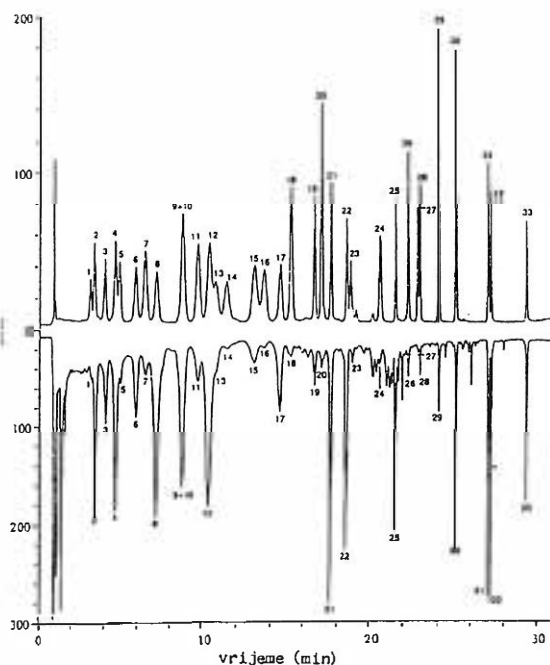
drofuran (THF) i 0,5 %-tna ortofosforna kiselina, a udio svakog otapala se mijenjao u određenim vremenskim razmacima.

U metodi B upotrijebljen je sljedeći sustav otapala: isopropanol – THF (25:65), acetonitril i 0,5 %-tna ortofosforna kiselina. U određenim vremenskim razmacima mijenjao se udio pojedinih otapala u sustavu, tj. u mobilnoj fazi. Detekcija odijeljenih komponenata eluiranih s kolone provedena je pomoću UV spektrofotometra na valnoj dužini od 370 nm (metoda A) i na 350 nm (metoda B). Sadržaj flavonolnih i aciflavonolnih glikozida određen je prema količini aglikona izoramnetina, kemferola i kvercetina.

Metoda A pokazuje da se određivanje flavonoida može kontrolirati određivanjem aglikona. Rezultati određivanja sadržaja *Ginkgo*- flavonoida u skladu su s rezultatima ranijih istraživanja.

Metodom B dobiven kromatogram »otisak prsta« sadrži 33 jasno izražena pika. Na osnovi redoslijeda eluiranja i prema UV spektru identificirana su 22 flavonoidna glikozida, 6 flavonoidnih aglikona i 5 biflavonoida.

Na slici 8. prikazani su profil eluiranja i kromatogrami flavonoida iz listova *Ginkga* i iz suhog ekstrakta koji je sastavni dio u terapiji upotrijebljenog preparata proizvedenog u tvrtki Zeller.



Slika 8. Hasler i Sticher – metoda B (13)

a – kromatogram flavonoida iz listova *Ginkga*; b – kromatogram suhog ekstrakta listova *Ginkga* iz preparata tvrtke Zeller (Zeller. Lot-No 32/89).

Rezultati pokazuju da je ova metoda naročito korisna u analizi stabilnosti flavonoidnih glikozida i biflavonoida.

Sadržaj bilobalida i ginkgolida A, B, C i J nizak je, stoga ih je teško analitički dokazati. Uz njih dolaze i druge supstancije (flavonoidi, tanini, klorofil, lipidi) koje smetaju pri njihovom odjeljivanju metodom tankoslojne kromatografije i HPLC metodom. Zbog toga se ekstrakti listova prije kromatografiranja pročišćuju.

Steinenger i Hänsel (14) navode da je etanolne ekstrakte koji se primjenjuju u tankoslojnoj kromatografiji potrebno očistiti na ovaj način: Etanolni se ekstrakti suspendiraju u vodi. Lipofilne komponente, koje su se izdvojile, uklone se pomoću cikloheksana. Ph-vrijednost podesi se na 2, a zatim se upari na manji volumen i služi za kromatografiranje. Za stacionarnu fazu upotrijebljen je Kieselgel, a za mobilnu smjesa otapala cikloheksana i etilacetata (40 + 50). Detekcija je izvršena prskanjem s acetanhidridom. Dobivene su narančasto – crvene mrlje.

Van Beck i Lelyveld (15) primijenili su obrnuto – faznu HPLC metodu za određivanje sadržaja bilobalida i ginkgolida A, B, C i J u ekstraktima listova *Ginkga* i u fitofarmaceutskim preparatima koji sadrže ekstrakte *Ginkga*.

Osušeni listovi (400-800 mg), smljeveni u prašak, selektivno su ekstrahirani dvaput 10 %-tnom otopinom metanola uz uporabu povratnog hladila. Ekstrakt je očišćen puštanjem kroz kolone s poliamidom i C₁₈-čvrstom stacionarnom fazom. Kao eluens upotrijebljena je 2 %-tna i 5 %-tna vodena otopina metanola. Ginkgolidi i bilobalid zadržani na C₁₈-stacionarnoj fazi (eng. Bond – Elut C₁₈) eluirani su upotrebom otapala heksan-metilacetat (60:40).

Otapalo se ispari, a ostatak se otopi u maloj količini metanola i injicira u HPLC sustav. Kada se obavlja analiza fitofarmaceutskih *Ginkgo*-preparata, prvo se iz gotovog ekstrakta ukloni alkohol zagrijavanjem 5 minuta na uljnoj kupelji na 150 °C bez povratnog hladila. Nadalje se ekstrakt pročišćuje i obrađuje isto kao ekstrakt listova.

Stacionarna faza u kromatografskoj koloni je Spherisorb C₁₈ veličine čestica 5 µm. Kao mobilna faza upotrijebljeni su metanol i voda (67:33). Ginkgolidi A, B, C i J i bilobalid su detektirani mjerenjem indeksa loma.

Prije HPLC analize injiciran je benzil-alkohol kao unutarnji standard. Sadržaj pojedinog ginkgolida i bilobalida izračunat je na temelju poznavanja površine »pika« i količine unutarnjeg standarda (benzil-alkohol) i poznavanja površine pika pojedinog *Ginkgo*-spoja.

Uporabom unutarnjeg standarda izbjegnuta je potreba za točnim volumenom injicirane otopine. Osim toga, metoda postaje upotrebljiva u laboratorijima koji ne posjeduju čiste ginkgolide.

Na slici 9. prikazan je tipični kromatogram ginkgolida i bilobalida iz ekstrakta listova *Ginkga*.

Van Beck i Lelyveld (11) također su istraživali sezonsku promjenu sadržaja ginkgolida i bilobalida. Listovi *Ginkga* sabrani su u Wageningenu (Nizozemska), od sredine svibnja do sredine studenoga 1990. s mladog sta-

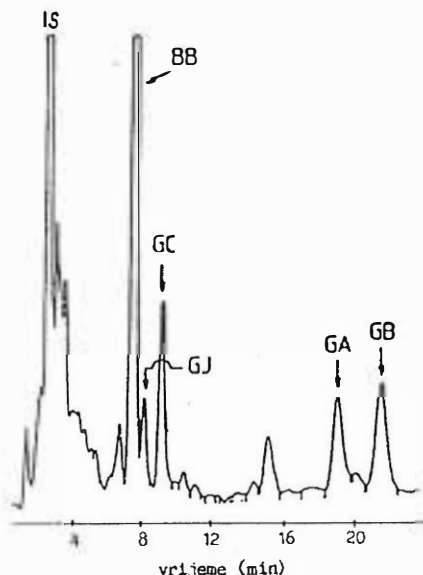
Slika 9. HPLC kromatogram of 1,000 g listova *Ginkga* sabranih u Nizozemskoj (rujan 1989.) i obrađenih prema propisanom postupku ekstrakcije i čišćenja

Otapalo: metanol – voda (67:33)

Protok: 1,0 ml/min

Detekcija mjerenjem indeksa loma

Kratice: BB = bilobalid; IS = unutarnji standard (benzil alkohol), GJ, GC, GA, GB = ginkgolidi J, C, A i B



bla, 60-godišnjeg ženskog i 60-godišnjeg muškog stabla. Svi detalji postupka ekstrakcije i čišćenja kao i HPLC analiza sadržaja ginkgolida i bilobalida u listovima *Ginkga* detaljno su opisani u literaturi. Rezultati njihovih istraživanja pokazuju da listovi sadrže najviše ginkgolida i bilobalida krajem ljeta i početkom jeseni. Listovi mladog stabla znatno su bogatiji ovim komponentama nego 60-godišnjeg ženskog i muškog stabla. Osim toga listovi ženskog stabla u svim ispitivanjima pokazuju veći sadržaj ginkgolida i bilobalida od listova muškog stabla.

Istraživači su zaključili da su individualne razlike između pojedinih stabala *Ginkga* mnogo značajnije za sadržaj ginkgolida i bilobalida nego vrijeme sabiranja. Mogući drugi činioci promjene sadržaja ginkgolida i bilobalida su: spol stabla, starost stabla, sastav tla, klima i postojanje kemijskih rasa (11).

Dosadašnji rezultati analiza ekstrakata listova *Ginkga* pokazuju da je sredina jeseni najpovoljnija za berbu listova *Ginkga*. Sadržaj ginkgolida i bilobalida i flavonolskih glikozida još uvijek je visok, a listovi se mogu ubrati bez oštećivanja stabla.

Od najnovijih istraživanja ginkgolida i bilobalida treba spomenuti rezultate Kreutera i suradnika (16) iz 1993. godine. Oni su razvili metodu koja je prikladnija za rutinske laboratorijske analize. Ginkgolide A, B, C i bilobalid odredili su kombiniranom metodom plinske kromatografije i masene spektroskopije.

Uzorak su pripremili na sljedeći način: dodatkom fosfatnog pufera uzorku je podešen pH na 7,5. Suspenzija je filtrirana i ekstrahirana izopropilacetatom. Skupljeni ekstrakti su osušeni dodatkom natrij sulfata. Otopina se filtrira i ispari. Ostatak je otopljen u etanolu.

Uvjeti plinskog kromatografiranja: kolona sa silikagelom OV-1; plin nosilac: He; injekcijski volumen: 1 µl; temperatura injiciranja: 230 °C; temperaturni program: 2 min 80 °C – 16 min 10 °C/min – 30 min 240 °C.

Na temelju spektra masa i vremena zadržavanja određeni su pikovi na kromatogramu dobivenom plinskom kromatografijom. Kvantitativna analiza provedena je upotrebom vanjskog standarda.

9. Djelovanje i uporaba *Ginkga*

Najveći broj publikacija koje se bave izučavanjem ove prastare biljne vrste, donose farmakološka istraživanja. Rezultati ovih istraživanja pokazuju djelovanje ekstrakata *Ginkga* na patogenezu smetnja periferne i cerebralne cirkulacije krvi.

Sastavnice koje su odgovorne za terapijsko djelovanje *Ginkga* su različiti flavonolski glikozidi, ginkolidi i seskviterpenski bilobalid.

Flavonolski glikozidi djeluju na permeabilnost staničnih membrana i utječu na očvršćenje kapilara, tj. spriječavaju njihovu lomljivost. Ovo se djelovanje temelji na inhibiciji hijaluronidaze, a osobito se pripisuje rutinu. Kvercetin ima blago antiinflamatorno djelovanje, jer inhibira sintezu prostaglandina i lipooksigenaze (18, 19). Kvercetinu se pripisuje i svojstvo da inhibira agregaciju eritrocita. Biflavonoidi: amentoflavon, bilobetin, ginkgetin, izoginkgetin i sciadopitizin imaju protuupalno djelovanje (20).

Antikoagurirajuće djelovanje pripisuje se diterpen-trilaktonima: ginkgolidima A, B, C i J. Ove komponente djeluju kao antagonisti faktora za aktiviranje trombocita. Farmakološki je najznačajniji ginkgolid B (11).

Ginkgolidi i bilobalid povećavaju metaboličku izmjenu tvari u mozgu, iako je zbog oslabiljene cirkulacije prisutna hipoksija. Aktivnost bilobalida se u posljednje vrijeme intenzivno istražuje.

Ekstrakti listova *Ginkga* koji sadrže spomenute terapijski aktivne sastavnice, djeluju jednako dobro na cerebralnu kao i na perifernu cirkulaciju (17).

Na farmaceutskom tržištu postoji veći broj preparata, koje je moguće svrstati u dvije glavne skupine:

- a) preparati izrađeni na bazi kompletnih ekstrakata;
- b) preparati izradjeni na bazi specijalnih ekstrakata (21).

Prva skupina preparata obuhvaća često i homeopatika. Druga skupina preparata izrađena je s posebno priređenim ekstraktima listova LI 1370 (22,23).

Preparati su najčešće standardizirani na sadržaj od 9,6 mg flavonoida *Ginkga*, a neki su preparati standardizirani na viši sadržaj, na 24 % ili čak

25 % flavonoida i 6 % ginkgolida i bilobalida. Namijenjeni su najčešće pacijentima sa smetnjama cirkulacije mozga, popraćenim otežanom koncentracijom, šumom u ušima, vrtoglavicama, zbunjenošću i zaboravljivošću.

Uz monopreparate *Ginkga*, postoje na farmaceutskom tržištu i kombinirani preparati. Najčešće se uz ekstrakt listova *Ginkga* kombinira ekstrakt korijena ginsenga. U posljednje vrijeme javljaju se i preparati, koji su kombinacija ekstrakata *Ginkga*, imele i gloga, ili kombinacija ekstrakata *Ginkga*, ginsenga, gloga i češnjaka. Proizvođači žele obuhvatiti pozitivna svojstva svih kombiniranih ekstrakata.

Popularnost ekstrakata *Ginkga* postala je tako velika da osobinu poboljšane cirkulacije primjenjuje i kozmetička industrija u balzovima za njegu kose ili u *Ginkgo biloba*-kremama.

(Zavod za farmakognozu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb i Ljekarna dr. Gaj, Varaždin).

***Ginkgo biloba* and phytopharmaceutical preparations of this plant**

by **Danica Kuštrak and Anita Sever**

Summary

The *Ginkgo* tree, *Ginkgo biloba* L., is the sole surviving species of the family *Ginkgoaceae*. This tree has been subjected to numerous chemical investigations. These investigations have led to the isolation and characterization of unique compounds: lactonic terpenes (ginkgolides and bilobalide) proper to *Ginkgo*, and flavonol glycosides, acylated flavonol glycosides and biflavonoids (amentoflavone, ginkgetin, isoginkgetin, bilobetin, sciadopitysin and 5'-methoxybilobetin).

More than a hundred papers have appeared on the pharmacology of these compounds. Extracts from the leaves of *Ginkgo biloba* are known to exhibit positive effects on the cerebral and peripheral blood circulation. *Ginkgo* preparations are sold against various symptoms related with old age.

(Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, and Pharmacy Dr. Gaj, Varaždin, Republic of Croatia)

Literatura – References

- (1) R. Hegnauer, Chemotaxonomie der Pflanzen, Band I, Birkhäuser Verlag, Basel, 1962.
- (2) G. Hegi, Illustrierte Flora von Mittel-Europa, Band I, Carl Hanser Verlag, München, 1935.
- (3) R. C. McLean and W. R. Ivimey-Cook, Textbook of Theoretical Botany, Volume I, Longmans, Green and Co., London, 1951.
- (4) E. Strasburger, K. Magdefrau, F. Ehrendorfer, Sistematika evolucije i geobotanika, Školska knjiga, Zagreb, 1984.
- (5) V. V. Alehin, M. I. Golenkin, L. I. Kursanov, K. I. Mejer, Botanika, II dio, Naučna knjiga, Beograd, 1959.
- (6) Šumarska enciklopedija, I dio, Jugoslavenski leksikografski zavod, Zagreb, 1980.
- (7) F. Kušan, Ljekovito i drugo korisno bilje, Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb, 1956.
- (8) R. Domac, Botanika, Školska knjiga, Zagreb, 1992.
- (9) H. Wagner, Pharmazeutische Biologie, 2. Drogen und ihre Inhaltsstoffe, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1988.
- (10) H. Wagner, S. Bladt, U. Hartmann, A. Daily, W. Berkuleie, Dtsch. Apoth. Ztg. **129** (1989) 2421.
- (11) T. A. van Beek, G. P. Lelyveld, Planta Med. **58** (1992) 413.
- (12) A. Lobstein, L. Rietsch-Jako, M. HaagBerruier, R. Auton, Planta Med. **57** (1991) 430.
- (13) A. Hasler, O. Sticher, J. Chromatogr. **605** (1992) 41-48.
- (14) E. Steinegger, R. Hänsel, Lehrbuch der Pharmakognosie und Phytopharmazie, 4. Aufl. Springer Verlag, Berlin, 1988.
- (15) T. A. van Beek, G. P. Lelyveld, T. Rantio, W. Ch. Melger, H. A. Scheeren, J. Chrom., **543** (1991) 375-387.
- (16) M. H. Kreuter, E. Giger, T. Ramp, C. Zanier, H. Honerlagen, Abstracts of Short Lectures and Poster Presentations 71, 41st Annual Congress on Medicinal Plant Research, Düsseldorf, 31. 8. – 4. 9. 1993.
- (17) E. Steinegger, R. Hänsel, Lehrbuch der Pharmakognosie, 3. Aufl., Springer-Verlag, Berlin 1972, 137.
- (18) O. Schimmer, Dtsch. Apoth. Ztg., **126** (1986) 1811.
- (19) M. Luckner, O. Bessler, R. Luckner, Pharmazie, **20** (1965) 681.
- (20) R. Della Loggia, S. Sosa, A. Tubaro, E. Bombardelli, Abstracts of Short Lectures and Poster Presentations 11, 41st Annual Congress on Medicinal Plant Research, Düsseldorf, 31. 8. – 4. 9. 1993.
- (21) O. Sticher, A. Hasler, B. Meier, Dtsch. Apoth. Ztg., **131** (1991) 1827.
- (22) E. Brüchert, S. E. Heinrich, P. Ruf-Kohler, Münchner Medizinische Wochenschrift, **133** (1991) 9.
- (23) H. Schulz, M. Jobert, H.-P. Breuel, **34**, (ibid) **133** (1991) 26.