Farmakobotaničko istraživanje Ginkgo folium

Kuštrak, Danica; Maleš, Željan; Sever, Anita

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 1995, 51, 291 - 302**

Journal article, Published version
Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:332355

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

FARMACEUTSKI GLASNIK
GLASILO HRVATSKOG FARMACEUTSKOG DRUŠTVA

GOD. 51 STUDENI 1995. BROJ 11

FAGLAI Farm.Glas. ISSN 014–8202

ZNANSTVENI RADOVI

Danica Kuštrak, Željan Maleš (Zagreb) i Anita Sever (Varaždin)

Farmakobotaničko istraživanje *Ginkgo folium*

Pharmacbotanical Investigation of the Ginkgo Biloba Leaves

S u m m a r y – In recent years phytopharmaceutical preparations of the maidenhair tree – Ginkgo biloba L. have a high popularity. This preparations are manufactured from leaves. These are usually bilobate, although they can also be almost entire or very divided. For the manufacturers it is of interesting to know when the leaves contain the highest yield of the active compounds.

The concentration of flavonoids were determined in the leaves of 4 different maidenhair trees (male and female) from summer until autumn 1992. The difference in flavonoids content between the 4 trees was 0.45%–1.00%. Concentration was lowest in October (0.45%–0.81%) in comparison with the same in September (0.63%–1.00%).

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

UVOD

I u našim ljekarnama nalaze se u prometu lijekovi izrađeni iz ekstrakata listova *Ginkgo biloba* L.. Pojava ovih preparata posljednjih godina na međunarodnom farmaceutskom tržištu pobudila je mnoge nove poticaje, kako u znanstvenim, tako i u nastavnim krugovima. Počinje intenzivno izučavanje ove biljne vrste s botaničkog, kemijskog, analitičkog i farmakološkog stajališta.

Ginkgo biloba L. (*Ginkgoaceae*) udomaćena je u Kini i Japanu, a kultivira se za ukras u parkovima, drvoredima i vrtovima u Europi i Americi. U svojoj domovini stablo *Ginkga* može doseći i do 40 m visine i više od 2 m debljine. U Europi naraste do 30 m. Na granama stabla postoje dugi i kratki izbojci na kojima zavojito izrastaju listovi. Listovi su najizrazitije obilježje *Ginkga*; oblikovani su kao orijentalna otvorena ili naborana lepeza.

Kemijski sastav vrste *Ginkgo biloba* dosta je istraživan i još se istražuje. Listovi *Ginkga* sadrže dvije skupine sastavnica s vrlo važnim farmakološkim svojstvima. Dosad su iz listova izolirane ove glavne sastavnice: lipofilni diterpenski laktoni ginkgolidi A, B, C, J i M (ca. 0,06%), seskviterpenski lakton bilobalid (ca. 0.02%), od kvercetina, kemferola i izoramnetina izvedeni o-acil-

glikozidi (ca. 10%), biflavonoidi (amentoflavon, bilobetol, 5-metoksibilobetol, ginkgetin, izoginkgetin, sciadopitizin), katehini, procijanidini, šikimi kiselina i 6-hidroksikinurenska kiselina (1).

Ginkgo-preparati izrađuju se iz ekstrakata listova. To su specijalno pripremljeni ekstrakti, za koje svaki proizvođač ima određenu oznaku. Preparati su najčešće standardizirani na sadržaj od 24% (specijalni ekstrakt GK 501) ili 25% (specijalni ekstrakt LI 1370) ukupnih flavonolskih glikozida i 4% (ekstrakt G 115) ginsenozida (Gincosan Pharmaton) ili 6% terpenskih laktona (ginkgolidi i bilobalid) (Tanakan, Ginkgo cerebral-Kaveri). Ovi preparati nisu klasični gerijatrici, iako se primjenjuju kod smetnji prokrvljenosti mozga, uzrokovanih degenerativnim promjenama i smetnji cerebralne cirkulacije u starijoj dobi (2).

Farmakološka istraživanja djelovanja specifičnih *Ginkgo*-flavonoida ukazuju na njihovo antiedematozno i antihemoragično djelovanje (2). *Ginkgo* ekstrakt pokazao se u pokusima na životinjama kao arterijski vazodilatator, a venozni vazokonstriktor (3).

Istraživanje i analitika flavonoida u listovima i ekstraktima *Ginkga* detaljno su obrađeni u našem prethodnom radu (4).

U farmakognoškim udžbenicima, odnosno udžbenicima fitoterapije (2), nalaze se monografije **Ginkgo folium**, odnosno **Ginkgo extractum**. Ove će monografijie ući u farmakopeje i postati oficinalne droge, jer su to ishodne sirovine za brojne fitopreparate s farmaceutskog tržišta.

Budući da se radi o novoj, vrlo popularnoj biljnoj drogi, i mi smo prišli farmakobotaničkom istraživanju uzoraka lista *Ginkga* sa stabala na našim lokacijama.

EKSPERIMENTALNI DIO

Biljni materijal

Materijal za istraživanje bili su listovi biljke *Ginkgo biloba* L. skupljani na tri lokacije od 30. travnja do 31. listopada 1992. godine. Mjesto i vrijeme skupljanja uzoraka vidljivi su u tablici 1.

Metode istraživanja listova Ginkgo biloba

1. Makroskopsko istraživanje

Iz svakog uzorka izdvojeno je po 20 listova. Listovima je izmjerena dužina od vrha plojke do peteljke i širina na mjestu gdje je najveća (tablice 2, 3, 4 i 5).

2. Mikroskopsko istraživanje

Uzorci listova su obrađeni kao:
a) poprečni presjek plojke lista,
b) površinski mikroskopski preparat (slika 1.)

c) poprečni presjek peteljke lista (slika 2.)
d) mikroskopski pregled praška listova

3. Dokazivanje flavonoida u ekstraktima listova kromatografijom na tankom sloju.

a) Priprema ekstrakata
1 g pulveriziranog lista ekstrahirano je sa 10 ml metanola zagrijavanjem 5 min. na vodenoj kupelji. Ohlađen i filtriran ekstrakt nanošen je na tanki sloj ploče.
Pod istim uvjetima izvršena je i ekstrakcija acetonom.

b) Uvjeti kromatografiranja
Stacionarna faza: silikagel G prema Stahlu

Tablica 1.
Vremenski interval sabiranja listova Ginkga

Lokacija	Broj uzorka	Datum sabiranja (1992.)	Rod stabla
I. Botanički vrt ljekovitg i otrovnog bilja »Fran Kušan« FBF-a Zagreb	1.	3. 7.	muško
	2.	18. 7.	
	3.	11. 8.	
	4.	25. 8.	
	5.	7. 9.	
	6.	26.10.*	
	7.	29.10.*	
II. Dvorište Studentskog doma »Stjepan Radić« Zagreb	1.	22. 9.	muško
	2.	30. 9.	
	3.	14.10.	
	4.	23.10.*	
	5.	29.10.*	
III-a. Park »Vatroslava Jagića« Lončarićeva ulica Varaždin	1.	30. 4.	muško
	2.	3. 8.	
	3.	25. 9.	
	4.	2.10.	
	5.	15.10.	
	6.	24.10.*	
	7.	31.10.*	
III-b.	1.	30. 4.	žensko
	2.	3. 8.	
	3.	25. 9.	
	4.	2.10.	
	5.	15.10.	
	6.	24.10.*	
	7.	31.10.*	

* = žuti listovi

Tablica 2.
Listovi iz Farmaceutskog botaničkog vrta »Fran Kušan«, FBF-a u Zagrebu

Broj uzorka (muško stablo)	Datum sabiranja uzoraka					
	3.7.		25.8		26.10.	
	a	b	a	b	a	b
1.	59	46	56	37	66	53
2.	57	35	45	25	74	55
3.	55	40	64	49	54	35
4.	50	45	55	35	68	39
5.	65	44	58	35	47	33
6.	70	54	38	21	44	40
7.	65	42	42	25	40	23
8.	55	41	57	40	54	33
9.	48	25	38	25	60	35
10.	64	44	59	40	32	30
11.	62	43	40	22	41	25
12.	50	32	34	17	83	55
13.	62	38	60	35	40	24
14.	49	36	42	25	42	24
15.	63	43	39	24	45	42
16.	60	34	31	20	40	38
17.	45	39	41	22	61	43
18.	65	53	55	35	35	20
19.	45	39	39	22	39	20
20.	60	35	32	19	50	32

a = širina plojke lista u mm;
b = dužina plojke lista u mm,

Jednaka mjerenja provedena su i na uzorcima od 18.7., 11.8., 7.9. i 29.10 (Tablica 1.)

Tablica 3.
Listovi iz dvorišta Studentskog doma »Stjepan Radić« u Zagrebu

Broj uzorka (muško stablo)	Datum sabiranja uzoraka					
	22.9.			14.10.		
	a	b	c	a	b	c
1.	84	67	–	108	55	–
2.	90	49	–	105	56	48
3.	105	64	57	95	69	47
4.	100	51	47	92	50	44
5.	83	53	48	85	48	–
6.	95	64	42	86	50	–
7.	105	52	49	79	45	35
8.	75	58	33	87	51	45
9.	77	42	37	80	42	33
10.	98	50	–	71	39	32
11.	85	60	53	76	44	36
12.	95	53	43	68	36	–
13.	90	59	–	69	40	–
14.	82	45	–	66	37	28
15.	92	50	45	67	35	–
16.	72	40	–	49	39	22
17.	85	56	–	48	27	–
18.	89	46	38	65	38	31
19.	76	41	35	57	32	25
20.	80	62	–	63	30	–

a = širina plojke lista u mm;
b = dužina plojke;
c = dužina plojke lista od proreza do peteljke
Jednaka mjerenja provedena su i na uzorcima od 30.9., 23.10. i 29.10. (Tablica 1.)

Tablica 4.
Listovi iz parka »Vatroslava Jagića« u Varaždinu

Broj uzoraka (muško stablo)	Datum sabiranja uzoraka							
	25.9.		15.10.			31.10.		
	a	b	a	b	c	a	b	
1.	89	55	89	51	–	78	72	
2.	84	64	95	62	–	77	50	
3.	68	67	75	42	–	79	55	
4.	71	53	88	60	–	73	63	
5.	70	65	75	63	47	86	55	
6.	75	42	76	42	–	71	53	
7.	69	48	65	40	35	70	57	
8.	71	36	65	50	–	77	39	
9.	65	49	57	55	–	52	35	
10.	71	48	67	35	–	65	37	
11.	67	32	60	40	35	53	52	
12.	58	35	72	45	–	50	47	
13.	48	49	50	35	–	48	31	
14.	60	42	46	50	–	53	29	
15.	53	34	48	50	–	54	41	
16.	54	47	43	41	24	55	29	
17.	60	33	40	47	34	57	32	
18.	50	34	45	25	20	58	42	
19.	58	52	28	27	23	47	31	
20.	45	30	34	42	–	53	33	

a = širina plojke lista u mm;
b = dužina plojke;
c = dužina plojke lista od proreza do peteljke
Jednaka mjerenja provedena su i na uzorcima od 2.10. i 24.10. (Tablica 1.)

Mobilna faza:
1. Etilacetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1)
2. Etilacetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27)

Zasićivanje kade: 2 h, dužina puta mobilne faze: oko 10 cm. Na ploču je nanošeno po 10 μl acetonskog, odnosno metanolnog ekstrakta.

c) Detekcija odijeljenih flavonoida

Otkrivanje mrlja provedeno je pomoću modificiranog Naturstoff-reagensa (NST/PEG). Ploče su prskane 1%-tnom metanolnom otopinom β-etilaminoestera difenilboratne kiseline, a zatim 5%-tnom etanolnom otopinom polietilenglikola 4000. Vidljive su odmah, odnosno nakon 15 min. intenzivne fluorescencije u UV_{365} nm, koje su uvjetovane strukturom spoja. Derivati kvercetina fluoresciraju narančasto, a kemferola žuto-zeleno. Dodatkom PEG-a povisuje se granica detekcije (5).

4. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

0,5 g listova Ginkga, smljevenih u prah, ekstrahira se kuhanjem 30 min. sa 25 ml metanola na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Iscrpina se procijedi kroz vatu u odmjernu tikvicu od 50 ml. Vata s ostatkom listova kuha se još jednom 30 min. sa 20 ml metanola i filtrira. Sjedinjeni filtrati razrijede se metanolom do 50 ml. 5 ml metanolnog ekstrakta pomiješa se u kiveti za centrifugiranje sa 2 ml tetrakloruglјika i 3 ml vode i centrifugira. Vodeno-metanolni sloj se odijeli i dopuni metanolom do 10 ml. Količina ove otopine, koja odgovara količini rutina od 0,15 mg do 0,70 mg razrije-

Tablica 5.
Listovi iz parka »Vatroslava Jagića« u Varaždinu

Broj uzorka (žensko stablo)	Datum sabiranja uzoraka								
	25.9.			15.10.			31.10.		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
1.	68	45	–	89	46	32	84	46	37
2.	65	45	33	49	32	28	95	47	40
3.	78	40	34	40	35	30	80	40	34
4.	82	42	33	77	38	35	81	46	–
5.	83	43	25	90	45	36	71	33	25
6.	71	35	25	95	46	–	65	32	26
7.	71	38	–	79	43	–	67	37	31
8.	82	49	30	67	34	24	60	29	23
9.	69	36	25	73	38	35	71	37	35
10.	78	36	33	60	30	24	62	37	21
11.	51	27	23	62	35	23	65	42	26
12.	46	28	22	69	40	21	60	37	16
13.	50	27	23	52	43	20	54	35	25
14.	46	29	18	60	36	26	52	29	–
15.	53	36	–	49	31	–	50	30	–
16.	51	30	–	57	35	32	44	37	22
17.	62	31	–	43	25	15	43	25	18
18.	53	28	–	56	34	24	39	24	17
19.	51	27	–	46	28	20	37	20	–
20.	45	24	21	38	28	17	45	36	10

a = širina plojke lista u mm;
b = dužina plojke;
c = dužina plojke lista od proreza do peteljke lista
Jednaka mjerenja provedena su i na uzorcima od 2.10. i 24.10. (Tablica 1.)

Tablica 6.
Sadržaj flavonoida u uzorcima listova *Ginkga*

Broj	Mjesto sabiranja	Rod stabla	Datum sabiranja jesen 1992.	Apsorbancija	Koncentracija očitana iz baždarnog dijagrama (mg)	Sadržaj ukupnih flavonoida (%)
I	Farmaceutski botanički vrt »Fran Kušan« Zagreb	muško	7.9 26.10.	0.150 0,125	0,180 0,150	0,90 0,75
II	Dvorište Studentskog doma »Stjepan Radić« Zagreb	muško	22.9. 23.10.	0,100 0,070	0,125 0,090	0,63 0,45
III-a	Park »Vartroslava Jagića« Lončarićeva ulica Varaždin	muško	25.9. 24.10.	0,125 0.090	0,150 0,110	0,75 0,55
III-b		žensko	25.9. 24.10.	0,165 0,135	0,200 0,162	1,00 0,81

Svaki je uzorak skupljenih listova ispitivan dvaput stoga su rezultati u tablici srednja vrijednost dva određivanja.

di se s metanolom do 2 ml, doda se 0,60 ml konc. octene kiseline i 10 ml reagensa dobivenog miješanjem 20 ml piridina i 80 ml vode, te 2,5 ml otopine aluminij-klorida (12%-tna otopina u metanolu). Dobivena smjesa dopuni se vodom do 25 ml. Ako je potrebno, otopina se filtrira, pri čemu se baca prvih 5 ml filtrata. Apsorbancija se mjeri u sloju debljine 1 cm na valnoj dužini od 420 nm. Količina flavonoida očita se na baždarnoj krivulji. Baždarna krivulja: 0,05 g rutina otopi se u 100 ml metanola. Od toga se 0,25 ml, 0,50 ml, 1,00 ml i 1,50 ml (što odgovara količini od 0,125 mg, 0,250 mg, 0,500 mg, 0,750 mg rutina) razrijedi metanolom do 2 ml i obradi kako je navedeno (6).

REZULTATI ISTRAŽIVANJA

1. Dužina, širina i veličina ureza listova navedene su u tablicama 2, 3, 4, i 5. Rezultati mjerenja pokazuju da su dužina i širina plojke lista različite za listove istog uzorka, što znači da listovi imaju različite oblike. Omjeri širine i dužine plojke listova (a/b), nalaze se u granicama od 1 do 2, tj. širina je približno jednaka dužini, odnosno širina je dvostruko veća od dužine. Kod listova ženskog stabla omjer je širine i dužine približno 2. No to se ne može uzeti kao pravilo, jer su mjereni listovi samo jednog ženskog stabla. Urez je prisutan više u listovima ženskog, nego u muških stabala. Urez je veličine od nekoliko milimetara, pa sve do polovice plojke lista.

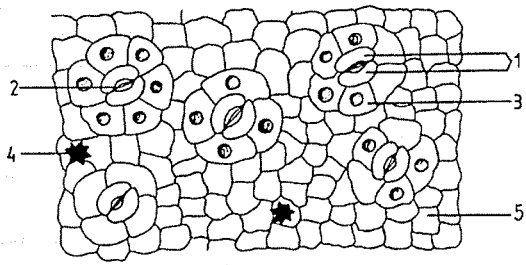
2. Mikroskopskim pregledom poprečnih presjeka plojki listova utvrđeno je da postoje dva tipa listova. Prvi ima ispod epiderme 1 do 2 sloja kratkih, zbijenih palisadnih stanica, pa ga možemo nazvati dorziventralnim tipom lista. Drugi nema palisada. Rastresit spužvasti parenhim nalazi se između gornje i donje epiderme, a stanice su zbijenije uz sloj epiderme. Na poprečnom presjeku plojke dorziventralnog lista zapažena je deblja gornja kutikula, veliki ekskretorni kanal, a u rastresitom spužvastom parenhimu ružice kalcij-oksalata. Ksilem i floem obavijeni su žilnim ovojem. Donja kutikula je tanja. Poprečni presjek plojke lista bez palisada pokazuje vrlo sličnu građu. Gornja kutikula je deblja, a donja tanja. Ružice kalcij-oksalata relativno su velike i smještene u blizini žile. I ovdje se zapaža žilni ovoj.

Promatranjem površinskih preparata s lica i naličja plojke lista nisu uočene anatomske razlike. Slika 1.

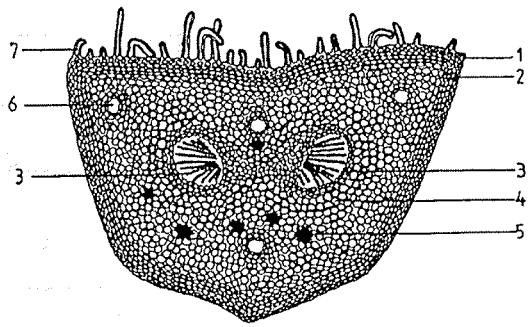
Slika 2. prikazuje anatomsku strukturu peteljke lista. Zamijećeno je da se najveći broj dlaka nalazi na bazi peteljke; prema sredini peteljke ima ih sve manje, dok ih pri vrhu uopće nema.

Nekoliko listova iz svakog uzorka smljevena su u sitan prašak, koji je zatim promatran pod mikroskopom. U prašku su zapaženi fragmenti mezofila lista s jažičastim traheidama i ružicama kalcij-oksalata. Na fragmentima epidermalnih stanica zapažene su puči sa stanicama susjedicama i velikim jezgrama.

3. Na tankom sloju silikagela G prema Stahlu kromatografirani su acetonski i metanolni ekstrakti listova. Poredbene supstancije bile su rutin i izokvercitrin otopljeni u metanolu.



Slika 1. Površinski mikroskopski preparat plojke lista
1–stanice zapornice puči, 2–uski otvor puči, 3–stanice susjedice s velikim jezgrama, 4–ružica kalcij-oksalata, 5–epidermalne stanice
Anatomsko ispitivanje provedeno je na proljetnim (30.4.), rano i kasno ljetnim (3.7. i 25.8.), te jesenjim listovima (7.9. i 31.10.).



Slika 2. Poprečni presjek baze peteljke lista
1–epiderma, 2–periderma, 3–dvostruka kolateralna žila, 4–prsten sklerenhimskih stanica. 5–ružica kalcij-oksalata, 6–ekskretorni kanal, 7–jednostanične dlake različitih veličina
Anatomsko ispitivanje provedeno je na proljetnim (30.4.), rano i kasno ljetnim (3.7. i 25.8.), te jesenjim listovima (7.9. i 31.10.)

4. Za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida izabrana je kao najpogodnija spektrofotometrijska metoda prema Römischu (6), a kao standardna supstancija rutin. Za analizu izabrani su samo uzorci listova skupljenih u rujnu i listopadu sa sve tri lokacije. Vrijednosti dobivene prilikom određivanja prikazane su u tablici 6.

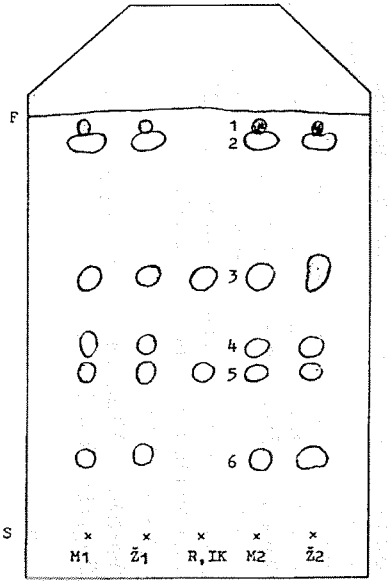
RASPRAVA REZULTATA

Makroskopskim istraživanjem listova *Ginkga* zapazili smo neke morfološke razlike u obliku listova s muškog i ženskog stabla. Listovi ženskog stabla uglavnom su pokazivali oblik otvorene lepeze, tj. širina plojke lista bila je 1,7–2 puta veća od dužine plojke, dok su listovi s muških stabala najčešće pokazivali oblik nabrane lepeze. Urez u listu bio je prisutan češće u listovima ženskog stabla (Tablice 3, 4. i 5.). Između listova s različitih muških stabala utvrđene su razlike s obzirom na učestalost i veličinu ureza na plojci lista. Urez je najčešće bio prisutan na listovima muškog stabla u dvorištu Studentskog doma »Stjepan Radić«, a zauzimao je 1/4 dužine plojke lista (Tablica 3.). Vrlo mali broj ureza, a manji od 1/2 dužine plojke, imali su listovi muškog stabla iz Varaždina (Tablica 4.) i iz Farmaceutskog botaničkog vrta »Fran Kušan« u Zagrebu (Tablica 2.).

Skice kromatograma metanolnih i acetonskih ekstrakata listova *Ginkga* dobivene kromatografijom na tankom sloju prikazane su na slijedećim stranicama: Opis skica: M1 = listovi muškog stabla sabrani 25. 9. 1992. u Varaždinu: $Ž_1$ = listovi ženskog stabla sabrani 25. 9. 1992. u Varaždinu; R = poredbena supstancija rutin; IK = poredbena supstancija izokvercitrin; M2 = listovi muškog stabla sabrani 31. 10. 1992. u Varaždinu; $Ž_2$ = listovi ženskog stabla sabrani 31. 10. 1992. u Varaždinu; S = start; F = fronta;

Skica 1.

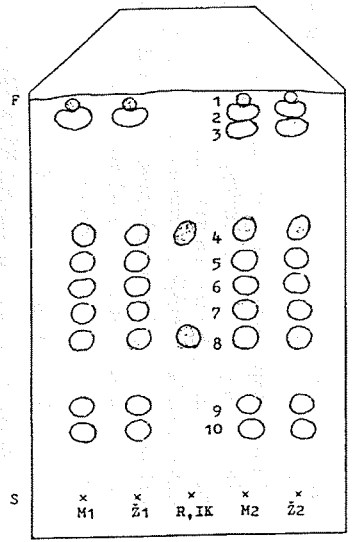
Ispitivani uzorak: acetonski ekstrakt listova Ginka
Stacionarna faza: silikagel G prema Stahlu
Mobilna faza: etilacetat–mravlja kiselina–voda (8:1:1)
Detekcija: NST/PEG; UV_{365} nm



RAZDVOJENE KOMPONENTE		
OZNAKA	VRSTA	R_f
1		0,96
2		0,93
3	izokvercitrin	0,60
4		0,43
5	rutin	0,37
6		0,18

Skica 2.

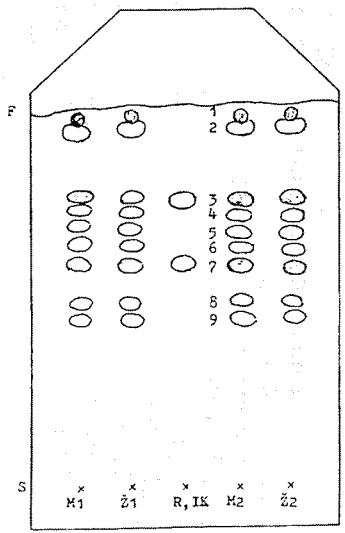
Ispitivani uzorak: metanolni ekstrakt listova Ginka
Stacionarna faza: silikagel G prema Stahlu
Mobilna faza: etilacetat–mravlja kiselina–voda (8:1:1)
Detekcija: NST/PEG; UV_{365} nm



RAZDVOJENE KOMPONENTE		
OZNAKA	VRSTA	R_f
1		0,97
2		0,94
3		0,91
4	izokvercitrin	0,63
5		0,57
6		0,51
7		0,44
8	rutin	0,38
9		0,21
10		0,16

Skica 3.

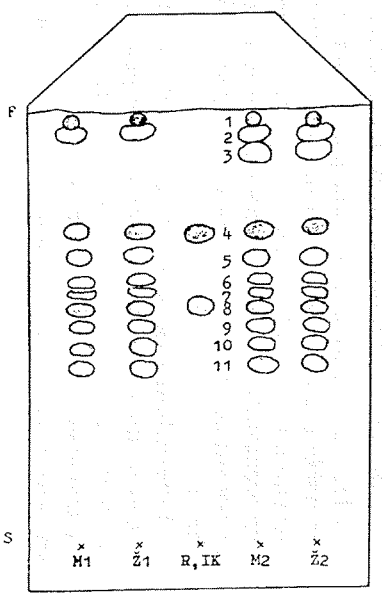
Ispitivani uzorak: acetonski ekstrakt listova Ginka
Stacionarna faza: silikagel G prema Stahlu
Mobilna faza: etilacetat–mravlja kiselina–ledena octena kiselina–voda (100:11:11:27)
Detekcija: NST/PEG; UV_{365} nm



RAZDVOJENE KOMPONENTE		
OZNAKA	VRSTA	R_f
1		0,98
2		0,96
3	izokvercitrin	0,74
4		0,71
5		0,67
6		0,62
7	rutin	0,57
8		0,48
9		0,45

Skica 4.

Ispitivani uzorak: metanolni ekstrakt listova Ginka
Stacionarna faza: silikagel G prema Stahlu
Mobilna faza: etilacetat–mravlja kiselina–ledena octena kiselina–voda (100:11:11:27)
Detekcija: NST/PEG; UV_{365} nm



RAZDVOJENE KOMPONENTE		
OZNAKA	VRSTA	R_f
1		0,98
2		0,96
3		0,91
4	izokvercitrin	0,71
5		0,66
6		0,60
7		0,57
8	rutin	0,54
9		0,49
10		0,44
11		0,39

Mikroskopsko istraživanje pokazalo je da su u listovima kao i u peteljci uočene velike ružice kalcij-oksalata (Slika 1. i Slika 2.). U literaturi se spominje prisutnost ružica kalcij-oksalata samo u ksilemskom parenhimu drva (7).

Za odjeljivanje flavonoida metodom kromatografije na tankom sloju, primijenili smo dvije mobilne faze koje literatura (8, 5) citira kao najpovoljnije za flavonoide. Kromatografska analiza priređenih ekstrakata pokazala je da je u acetonskom ekstraktu detektiran manji broj mrlja (svega 6 i 9 mrlja) od broja mrlja u metanolnom ekstraktu (10 i 11 mrlja), što je vidljivo na skicama 1. i 3., odnosno 2. i 4.. Prvi broj u zagradi označuje broj mrlja nastao uz mobilnu fazu: etilacetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1), a drugi broj u zagradi uz mobilnu fazu: etilacetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27). Nakon prskanja ploča reagensom NST/PEG moglo se uočiti flavonoide prema boji i prema R_f vrijednostima. Na skici 3. uočene su 2 narančaste mrlje, broj 3 i 7, koje su identificirane uz poredbene supstancije kao izokvercitrin **3** i rutin **7**. Žutozelenom fluorescencijom u UV zračenju kod 365 nm uočeni su flavonoidi označeni brojevima 6 i 8, a koji su derivati kemferola.

Uspoređujući skice 2. i 4. (metanolni ekstrakt) zapaža se na prvoj skici 10 dobro odjeljenih mrlja (preko čitave ploče) sa 4 narančaste mrlje, od kojih su identificirane 4 i 8 kao izokvercitrin i rutin, a čine vodeće flavonoide. Zapažene su i 3 žutozelene mrlje **5**, **7**, **9**, koje potječu od derivata kemferola. Na skici 4. vidimo čak 11 odijeljenih mrlja, ali su one zbijenije i viših R_f vrijednosti (0,98–0,39).

Spektrofotometrijsko određivanje ukupnog sadržaja flavonoida proveli smo s uzorcima iz rujna i listopada zato što je u tim mjesecima sadržaj ginkgolida i bilobalida relativno visok (9), a sve su ove tri skupine sastavnica odgovorne za terapijski učinak preparata *Ginkga*.

Naše određivanje pokazuje da je sadržaj ukupnih flavonoida veći u listovima ženskog stabla, nego u listovima muškog stabla. Ali s obzirom da je određivanje provedeno na uzorcima samo s jednog ženskog stabla, ova se činjenica ne može uzeti kao pravilo.

ZAKLJUČAK

Nakon provedenog makroskopskog istraživanja (Tablica 2., 3., 4. i 5.) zaključili smo da su individualne razlike u morfologiji listova pojedinih *Ginkgo* stabala vrlo istaknute.

Promatranjem anatomske građe listova i peteljki nisu utvrđene nikakove razlike s obzirom na njihovo različito porijeklo. Isto tako nisu utvrđene ni značajnije razlike u usporedbi s morfološkim i anatomskim obilježjem koje citira literatura (7).

Kromatografsko ispitivanje pokazalo je da je veličina mrlja pojedinih sastavnica, odnosno intenzitet fluorescencije, bio veći u uzorcima iz rujna.

Kvantitativna analiza ukupnih flavonoida (Tablica 6.) provedena metodom prema Römischu, potvrđuje rezultate tankoslojne kromatografije. Listovi skupljeni u rujnu (jesenski zeleni listovi) sadrže više flavonoida, nego li-

stovi skupjeni u listopadu (žuti listovi). Sadržaj ukupnih flavonoida iznosio je 0,63%–1% u uzorcima listova iz rujna, odnosno 0.45%–0,81% u uzorcima iz listopada. Ovi se podaci slažu s podacima koje navode Lobstein i suradnici (9), kao i Hasler i Sticher (10) i Meier i suradnici (11).

Lobstein i suradnici (9) pratili su sezonske promjene sadržaja flavonoida u listovima *Ginkgo biloba* skupljenim u Strasbourgu (Francuska) sa stabla starog 100 godina. Uzorci skupljeni u ožujku predstavljali su pupoljke listova, u travnju proljetne listove, a u kolovozu ljetne. Početkom listopada skupljeni su jesenski zeleni listovi, a koncem mjeseca jesenski žuti, U mjesecu studenom skupili su autori i otpale listove. Jesenski zeleni listovi sadržavali su 0,60%, a jesenski žuti 0,42% ukupnih flavonolskih glikozida, što je vrlo slično našim uzorcima sa stabla iz dvorišta Studentskog doma »Stjepan Radić« u Zagrebu (Tablica 6). Treba spomenuti da su autori za kvantitativnu analizu primjenili HPLC metodu.

Hasler i Sticher (10) su također za identifikaciju i determinaciju flavonoida iz *Ginkgo biloba* primjenili tekućinsku kromatografiju visoke moći razlučivanja. Uzorci listova *Ginkga* bili su iz prometa (švicarski dobavljači), ali su i skupljeni s jednog ženskog stabla u Zürichu (Švicarska) od sredine svibnja do sredine studenog. I njihovi rezultati pokazuju pad sadržaja ukupnih flavonoida od rujna prema listopadu.

Meier i suradnici (11) izolirali su 21 flavonolski glikozid. Uzorke su skupljali u listopadu i studenom s 4-godišnjeg stabla u Romanshornu (Švicarska). I ovdje se radilo o jesenskim zelenim a zatim i starijim listovima, kojima je određivan sadržaj ukupnih flavonoida.

Naše određivanje pokazuje da je sadržaj ukupnih flavonoida veći u listovima ženskog stabla (1%–0,81%), nego u listovima muškog stabla (0,75%–0,55%) s iste lokacije. Van Beek i Lelyveld (12) istraživali su sadržaj ginkgolida i bilobalida u listu *Ginkgo biloba* tijekom vegetacije. Istraživanje su provodili na 3 različita stabla, od kojih su jedno muško i jedno žensko stablo starosti oko 60 godina rasla u Botaničkom vrtu u Wageningenu (Nizozemska). I ovi su autori zapazili viši sadržaj određivanih tvari u listovima ženskog stabla, nego muškog.

Uspoređujući rezultate naših istraživanja s rezultatima istraživanja navedenih autora, možemo zaključiti da su i uzorci listova sa stabala na našim lokacijama sličnog sadržaja za terapiju važnih sastavnica. Nadalje se može zaključiti da je sredina jeseni pogodno vrijeme za skupljanje listova *Ginkga*. Koncentracije flavonoida, ginkgolida i bilobalida su u to vrijeme još uvijek visoke, a u ovom razdoblju listovi se mogu skupljati bez posljedica kao što je oštećivanje stabla.

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

Literatura – References

(1) E. *Steinegger*, R. *Hänsel*, Lehrbuch der Pharmakognosie und Phytopharmacie, 4. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, 1988.
(2) H. *Wagner*, M. *Wiesenauer*, Phytotherapie, Phytopharmaka und pflanzliche Homöopathika, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1995.
(3) J. *Bruneton*, Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants, Lavoisier publishing, Paris, 1995.
(4) D. *Kuštrak* i A. *Sever*, Farm. Glas. **51** (1995) 49–64.
(5) H. *Wagner*, S. *Bladt*, und E. M. *Zgainski*, Drogenanalyse, Springer-Verlag, Berlin, 1983, 163.
(6) H. *Römisch*, Pharmazie, **15** (1960) 33.
(7) R. C. *McLean* and W. R. *Ivimey-Cook*, Textbook of Theoretical Botany, Vol. I, Longmans, Green and Co., London, 1951.
(8) M. *Luckner*, O. *Bessler*, und R. *Luckner*, Pharmazie, **20** (1965) 681.
(9) A. *Lobstein*, L. *Rietsch-Jako*, M. *Haag-Berrurier*, and R. *Anton*, Planta Med. **57** (1991) 430–433.
(10) A. *Hasler* and O. *Sticher*, J. Chromatogr. **605** (1992) 41–48.
(11) B. *Meier*, A. *Hasler*, and O. *Sticher*, 40th Annual Congress on Medicinal Plant Research, Trieste, September 1–5, 1992, 114.
(12) T. A. *van Beek* and G. P. *Lelyveld*, Planta Med. **58** (1992) 413–416.