

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2025

Lucie Vojtěchová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Jinan Dvoulaločný – charakterizace a možnosti stanovení významných látek  
Bakalářská práce

2025

Lucie Vojtěchová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Lucie Vojtěchová**  
Osobní číslo: **C21052**  
Studijní program: **B0531A130012 Farmakochemie a medicínální materiály**  
Téma práce: **Jinan dloulaločný – charakterizace a možnosti stanovení významných látek**  
Téma práce anglicky: **Ginkgo biloba – characterization and possibilities of determination of important substances**  
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

## Zásady pro vypracování

1. Proveďte literární rešerši zabývající se jinanem dvoulaločným.
2. Zaměřte se na charakterizaci rostliny a její význam, včetně farmakologického využití.
3. Věnujte se metodám stanovení významných látek včetně přípravy vzorku k analýze.
4. V samostatné kapitole přehledně zpracujte informace získané z odborných publikací věnovaných analýze sloučenin v jinanu, kromě textové formy použijte také formu tabelární.
5. Výsledky zpracujte formou závěrečné práce v souladu se Směrnicí UPCE č. 7/2019 "Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací" v platném znění.

Rozsah pracovní zprávy: **dle potřeby**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:  
podle pokynů vedoucího bakalářské práce

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Tomáš Bajer, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **29. února 2024**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.** v.r.  
děkan

L.S.

**prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Jinan Dvoulaločný – charakterizace a možnosti stanovení významných látek jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 23. 6. 2025

Lucie Vojtěchová v.r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce, doc. Ing. Tomáši Bajerovi Ph.D., za jeho ochotu, cenné rady a trpělivost během celého procesu zpracování této práce.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se zabývá charakterizací a stanovením významných bioaktivních látek obsažených v jinanu dvoulaločném s důrazem na jejich analýzu pomocí moderních analytických technik. Práce se dále věnuje farmakologickým účinkům extraktu z jinanu, jejich aplikaci ve zdravotnictví a nežádoucím účinkům spojených s jejich užíváním.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

jinan dvoulaločný, terpenoidy, flavonoidy, ginkgolidy, chromatografie

## **TITLE**

Ginkgo biloba – characterization and possibilities of determination of important substances

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis deals with the characterization and determination of important bioactive compounds contained in *Ginkgo biloba* with emphasis on their analysis using modern analytical techniques. The thesis also discusses the pharmacological effects of the extract of *Ginkgo biloba*, their application in the health care and adverse effects associated with their use.

## **KEYWORDS**

ginkgo biloba, terpenoids, flavonoids, ginkgolides, chromatography

# OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	11
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....	12
ÚVOD.....	13
1 JINAN DVOULALOČNÝ .....	14
1.1 Historie.....	14
1.2 Popis.....	15
1.3 Přírodní podmínky a výskyt.....	15
1.4 Reprodukce jinanu dvoulaločného.....	16
1.4.1 Pohlavní rozmnožování .....	16
1.4.2 Semena.....	16
2 BIOAKTIVNÍ LÁTKY OBSAŽENÉ V JINANU DVOULALOČNÉM .....	18
2.1 Bioaktivní látky.....	18
2.1.1 Flavonoidy .....	18
2.1.2 Biflavonoidy .....	19
2.1.3 Terpenoidy .....	20
2.1.4 Ginkgolové kyseliny .....	21
2.1.5 Ostatní bioaktivní látky.....	22
3 ROSTLINNÉ PŘÍPRAVKY Z JINANU DVOULALOČNÉHO.....	24
3.1 Léčivé přípravky z <i>ginkgo biloba</i> .....	24
3.2 Extrakty z <i>ginkgo biloba</i> .....	24
3.3 Situace na trhu s produkty z <i>ginkgo biloba</i> .....	25
4 METODY ANALÝZY JINANU DVOULALOČNÉHO.....	26
4.1 Extrakce .....	26
4.1.1 Extrakce pevná látka–kapalina .....	26
4.1.2 Soxhletova extrakce .....	26

4.1.3	Extrakce nadkritickou tekutinou (SFE) .....	27
4.1.4	Extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku (PLE) .....	28
4.1.5	Mikrovlnná extrakce (MAE) .....	28
4.1.6	Ultrazvuková extrakce (UAE) .....	29
4.1.7	Extrakce tuhou fází (SPE).....	29
4.1.8	Mikroextrakce tuhou fází (SPME).....	30
4.2	Chromatografické metody .....	30
4.2.1	Princip chromatografie .....	30
4.2.2	Rozdělení chromatografických metod .....	30
4.2.3	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	31
4.2.4	Plynová chromatografie (GC).....	32
4.2.5	Chromatogram a jeho vyhodnocení .....	34
4.3	Hmotnostní spektrometrie (MS) .....	36
4.3.1	Ionizace elektrosprejem (ESI) .....	37
4.3.2	Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI).....	37
4.3.3	Elektronová ionizace (EI) .....	37
5	STUDIE ZABÝVAJÍCÍ SE JINANEM DVOULALOČNÝM .....	38
6	VYUŽITÍ JINANU DVOULALOČNÉHO VE ZDRAVOTNICTVÍ.....	41
6.1	Antioxidační účinek .....	41
6.2	Protizánětlivý účinek .....	42
6.3	Anti-PAF účinek .....	42
6.4	Kardioprotektivní účinek .....	42
6.5	Prevence neurodegenerativních poruch .....	42
6.6	Vliv na tinnitus.....	43
6.7	Vliv na změny nálad, paměť a působení stresu .....	44
6.8	Nežádoucí účinky .....	44
6.8.1	Ginkgo ořechy.....	44

6.8.2	Ginkgo přípravky .....	44
ZÁVĚR .....		46
POUŽITÁ LITERATURA .....		47

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Jinan dvoulaločný strom [3] .....	14
Obrázek 2: Jinan dvoulaločný list [6] .....	15
Obrázek 3: Jinan dvoulaločný plod [7] .....	17
Obrázek 4: Strukturní vzorce vybraných flavonoidů .....	19
Obrázek 5: Strukturní vzorce vybraných biflavonoidů .....	19
Obrázek 6: Strukturní vzorce vybraných biflavonoidů .....	20
Obrázek 7: Strukturní vzorec ginkgolidů .....	21
Obrázek 8: Strukturní vzorec bilobalidu .....	21
Obrázek 9: Strukturní vzorce vybraných ginkgolových kyselin .....	22
Obrázek 10: Strukturní vzorce vybraných karboxylových kyselin .....	23
Obrázek 11: Strukturní vzorce vybraných protokyanidinů .....	23
Obrázek 12: Soxhletův extraktor [22] .....	27
Obrázek 13: Extrakce tuhou fází [29] .....	29
Obrázek 14: Instrumentace v HPLC [32] .....	31
Obrázek 15: Instrumentace v GC [34] .....	33
Obrázek 16: Chromatogram [32] .....	35
Obrázek 17: Hmotnostní spektrometrie [37] .....	36
Obrázek 18: Jinan dvoulaločný ořech [74]      Obrázek 19: Strukturní vzorec ginkgotoxinu .	44
Tabulka 1: Ginkgolidy .....	20
Tabulka 2: Složení standardizovaného EGb-761 [17] .....	25
Tabulka 3: Studie zabývající se stanovením bioaktivních látek jinanu dvoulaločného .....	38

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
ECD	detektor elektronového záchytu
EI	elektronová ionizace
EGb	extrakt z <i>ginkgo biloba</i>
ESI	ionizace elektrosprejem
FID	plamenový ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
MAE	mikrovlňná extrakce
MS	hmotnostní spektrometrie
PAF	faktor aktivující krevní destičky
PLE	extrakce tlakovou kapalinou
SFE	extrakce nadkritickou kapalinou
SPE	extrakce na pevné fázi
SPME	mikroextrakce na pevné fázi
TCD	tepelně-vodivostní detektor
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UAE	ultrazvuková extrakce

## ÚVOD

Jinan dvoulaločný neboli *ginkgo biloba* je jedním z nejstarších stromů na Zemi, jehož historie sahá více než 200 milionů let do minulosti. Tato fascinující rostlina pocházející z Číny má výjimečné vlastnosti, které přitahují pozornost nejen botaniků, ale také farmaceutů a výzkumníků v oblasti přírodní medicíny.

Bioaktivní látky obsažené v listech jinanu dvoulaločného, především flavonoidy a terpenoidy, mají široké spektrum účinků na lidské zdraví. Flavonoidy jsou známé svými antioxidačními vlastnostmi, zatímco terpenoidy jsou zkoumány pro své neuroprotektivní a protizánětlivé účinky. Stanovení bioaktivních látek v *ginkgo biloba* hraje klíčovou roli při zjišťování kvality a účinnosti produktů obsahujících extrakty z této rostliny. Používá se řada analytických metod jako je kapalinová chromatografie, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie a další.

Cílem této bakalářské práce je poskytnout komplexní přehled o jinanu dvoulaločném, jeho charakteristice, využití a metodách stanovení jeho bioaktivních látek.

# 1 JINAN DVOULALOČNÝ

## 1.1 Historie

Jinan dvoulaločný je součástí čeledi jinanovitých (*Ginkgoaceae*), kdysi pestré skupiny rostlinných druhů. Čeleď existující již od prvohor, dosáhla nejvyššího vrcholu v druhohorách, kdy se její zástupci rozšířili po celé severní polokouli. S postupem geologického vývoje však začalo docházet k ústupu této skupiny, do dnešní doby se dochoval jen jediný druh *Ginkgo biloba* [1].

Časem začal i tento druh pozvolna mizet z volné přírody. Zachoval se pouze v zahradách na Dálném východě, zejména v dnešní Číně. Právě v této zemi si jinan získal výjimečné postavení. Po staletí byl pěstován v klášterních zahradách a chrámech, kde byl vnímán jako posvátný strom symbolizující dlouhověkost, odolnost a duchovní sílu. Dodnes se v Číně nachází stromy *ginkga* staré více než 1000 let [2].

V novověku se jinany dostali i do Evropy a Severní Ameriky. V současnosti je jinan dvoulaločný vnímán jako okrasný strom (obrázek 1), který nalezneme v botanických zahradách a parcích po celém světě. Ve volné přírodě jinany bohužel nerostou ve velkém počtu jedinců [1].



Obrázek 1: Jinan dvoulaločný strom [3]

## 1.2 Popis

Stromy jinanu dorůstají do výšky okolo 20 až 40 metrů a mohou mít průměr kmene 1 až 4 metry [4]. Upoutají pozornost nejen svým vznešeným vzhledem, ale i typickým vějířovitým tvarem listů (obrázek 2). Listy jsou zpravidla rozděleny výrazným zářezem na dva laloky, což dalo stromu jeho druhové jméno. Mohou mít různé odstíny zelené až hnědé, na podzim se zbarvují do žluta a opadávají [5].

Jinan dvoulaločný patří mezi nahosemenné dvoudomé rostliny. Po opylení se na samičích stromech vytvářejí semena v dužnatém obalu, svou velikostí připomínající třešně. Vzhledem k tomu, že plody samičích stromů na podzim opadávají a silně zapáchají, bývají pro výsadbu v městských parcích a ulicích častěji vybírány samčí stromy [1].



Obrázek 2: Jinan dvoulaločný list [6]

## 1.3 Přírodní podmínky a výskyt

*Ginkgo biloba* je rostlina s velkou tolerancí k různým klimatickým podmínkám. Preferuje teplé a vlhké prostředí, ale je odolný vůči suchu, mrazu, požáru a znečištění ovzduší těžkými kovy. Během 2. světové války odolalo 6 stromů jinanu dvoulaločného extrémním podmínkám po svržení atomové bomby v Hirošimě v Japonsku. Nejčastěji se vyskytuje podél povodněmi narušených břehů vodních toků v listnatých nebo smíšených lesích [2].

## 1.4 Reprodukce jinanu dvoulaločného

### 1.4.1 Pohlavní rozmnožování

Jinan dvoulaločný je fascinující rostlina s unikátním reprodukčním cyklem a vývojem semen. Juvenilní období *ginkgo biloba* je poměrně dlouhé, k pohlavnímu rozmnožování dochází obvykle až okolo 20.-30. roku života rostliny. Samčí a samičí pohlavní orgány se tvoří na krátkých výhoncích, v paždí pupenových šupin. Samčí jehnědy se objevují před listy a opadávají ihned po vysypání pylu. Opylování větrem obvykle probíhá na jaře, buď začátkem dubna v mírných oblastech, nebo koncem května v oblastech s tuhými zimami [4].

Vajíčka velikosti 2 až 3 mm se vyskytují po dvou na konci stopek dlouhých 1,5 až 2 cm. V receptivní fázi rozmnožování vylučuje mikropyl slizovou tekutinu, která usnadňuje zachycení pylových zrn. Jakmile se samčí gametofyt dostane do vnitřní části vajíčka, začíná 4 měsíce dlouhé vývojové období. Proces vyvrcholí produkcí páru multiflagelovaných spermatozoidů, jeden z nich oplodní čekající vajíčko, což může nastat kdykoli od konce srpna do konce září, záleží na datu opylení [4].

### 1.4.2 Semena

V procesu zrání semena je embryo obklopeno samičím gametofytem a silnou vrstvou semenného obalu. Na povrchu semen se nachází dužnatá vrstva tzv. sarkotesta, která mimo jiné obsahuje dvě těkavé sloučeniny, kyselinu butanovou a hexanovou. Vnitřní struktura semene se skládá z tvrdé střední vrstvy a tenké membránózní vnitřní vrstvy. Semena jinanu dvoulaločného (obrázek 3) padají ze stromu asi měsíc po oplodnění a tento moment výrazně zapáchají kvůli obsahu těkavých látek. Mimo jiné obsahují semena i fenolické sloučeniny, které mohou u člověka způsobit kontaktní dermatitidu [4].

Semeno *ginkgo biloba* obsahuje ořech, který se konzumuje jako potrava i jako lék po celém světě. Čerstvé ořechy obsahují cca 41 % vlákniny. Suché ořechy obsahují 6 % sacharózy, 68 % škrobu, 13 % bílkovin a 3 % tuku. V Číně probíhá více než 600 let komerční produkce ořechů *ginkgo* [4].



*Obrázek 3: Jinan dvouletý plod [7]*

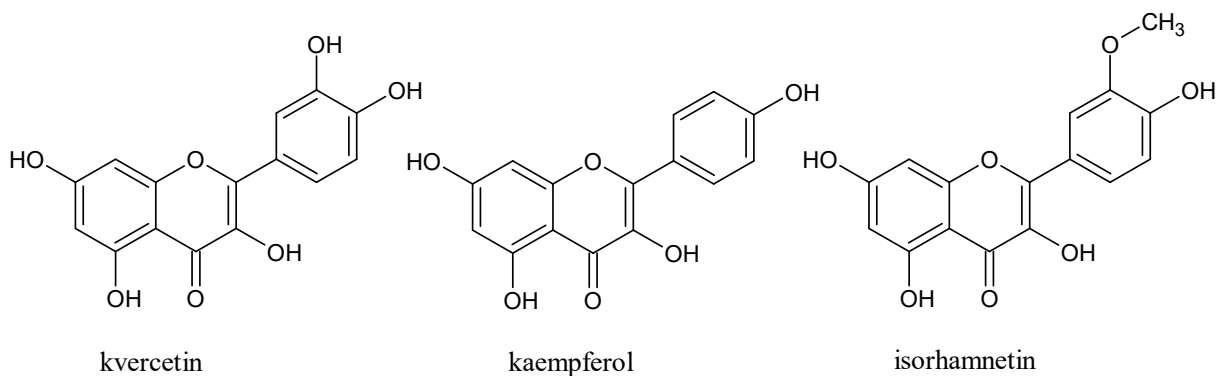
## **2 BIOAKTIVNÍ LÁTKY OBSAŽENÉ V JINANU DVOULALOČNÉM**

### **2.1 Bioaktivní látky**

Jinan dvoulaločný obsahuje širokou škálu bioaktivních látek s různými biologickými účinky. Tyto látky jsou důležité jak pro samotnou rostlinu, tak i pro léčebné účely člověka. Listy ginkga obsahují terpenoidy, polyfenoly, alkylfenoly, organické kyseliny, sacharidy, mastné kyseliny, lipidy, aminokyseliny a další látky. Hlavními bioaktivními látkami jsou flavonoidy a terpenoidy [4].

#### **2.1.1 Flavonoidy**

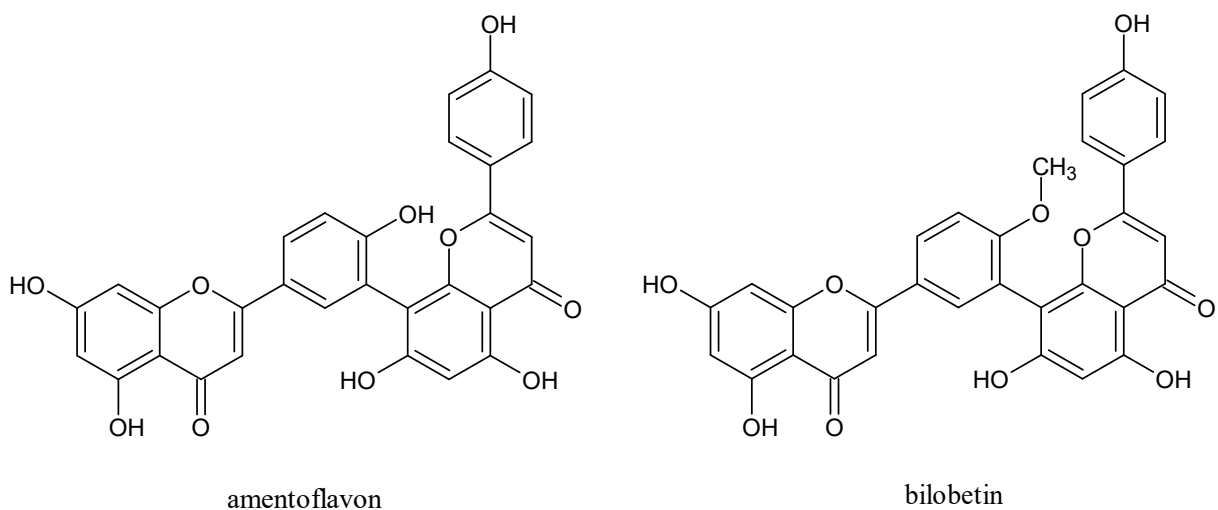
Flavonoidy se vyskytují ve většině zelených rostlin [4]. Základní strukturní skelet má 15 uhlíků, je tvořen dvěma benzenovými kruhy spojenými přes heterocyklický tří uhlíkatý pyranový kruh [8]. Mnoho flavonoidů bylo izolováno a identifikováno pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Z listů jinanu dvoulaločného bylo identifikováno celkem 110 flavonoidů [9]. Nejvíce byly zastoupeny deriváty kvercetinu, kaempferolu a isorhamnetinu (obrázek 4) [4]. Flavonoidy ginkgo biloba se dělí do 7 hlavních tříd jako jsou flavonové glykosidy, flavonolové glykosidy, flavanony, isoflavony, flavan-3-oly, biflavonoidy a biginkgosidy [9]. Teplota, množství srážek a vlhkost půdy mají významný vliv na biosyntézu a akumulaci flavonoidů v listech jinanu. Vyšší nadmořské výšky, nižší teplota a větší množství slunečního záření usnadňují syntézu těchto látek [2]. Flavonoidy mají celou řadu účinků na lidské tělo, mezi ty nejdůležitější patří antioxidační, antibakteriální, protizánětlivé a antivirové účinky. Byly prokázány také slibné výsledky flavonoidů při léčbě kardiovaskulárních, metabolických a neurodegenerativních onemocněních [10].



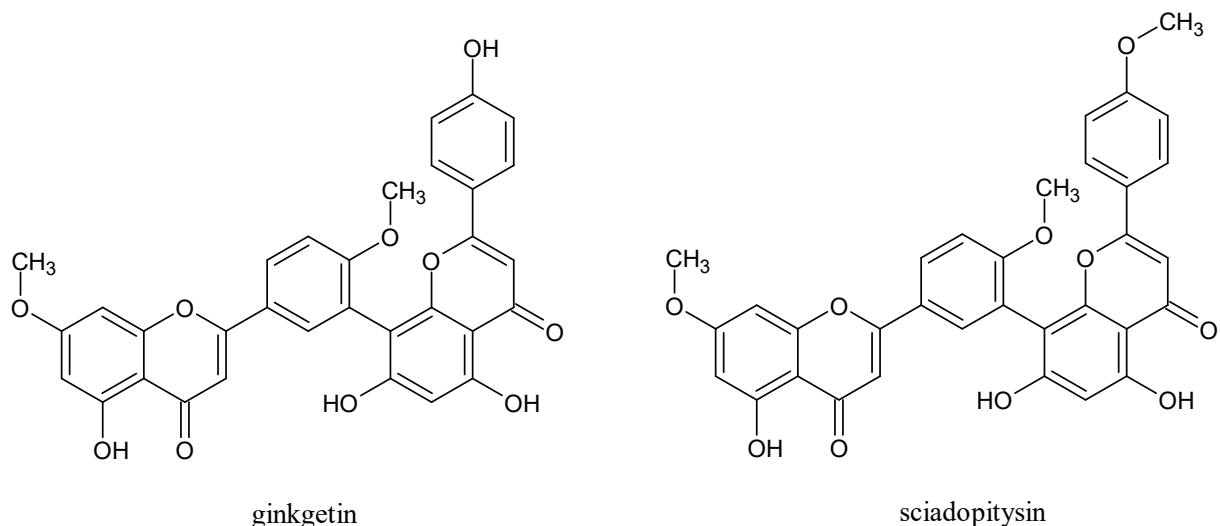
Obrázek 4: Strukturní vzorce vybraných flavonoidů

### 2.1.2 Biflavonoidy

Látky tvořené dvěma flavonoidními strukturami se označují jako biflavonoidy [11]. Prvním biflavonoidem izolovaným z jinanu dvoulaločného byl ginkgetin. Dalšími zástupci této skupiny jsou isigenkgetin, amentoflavon, bilobetin, sciadopitysin, ginkgolin a jiné (obrázek 5 a 6) [9]. Biflavonoidy jsou přírodními inhibitory lidského trombinu. Silné inhibiční účinky na aktivitu trombinu vykazuje ginkgolin, isoginkgolin, bilobetin a amentoflavon. Některé biflavonoidy, konkrétně amentoflavon, sciadopitysin, ginkgetin, isoginkgetin a bilobetin, mohou působit hepatotoxicky nebo nefrotoxicky [11].



Obrázek 5: Strukturní vzorce vybraných biflavonoidů



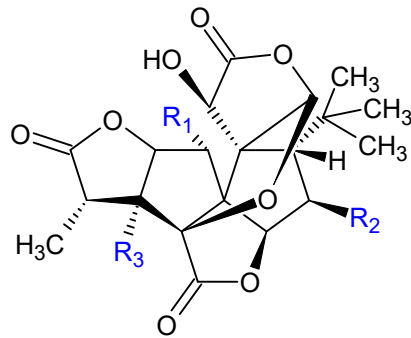
Obrázek 6: Strukturní vzorce vybraných biflavonoidů

### 2.1.3 Terpenoidy

Terpenoidy představují další důležitou skupinu sekundárních metabolitů nalezených v listech jinanu dvoulaločného. Do této skupiny látek patří ginkgolidy a bilobalid. Ginkgolidy (tabulka 1, obrázek 7) jsou specifické terpenoidní sloučeniny, které lze rozdělit podle polohy hydroxylových skupin (ginkgolid A, B, C, J, K, L, M, N, P, Q). Nejvyšší biologickou aktivitu vykazuje ginkgolid B [11]. Tyto látky jsou syntetizovány jak v kořenech jinanu, tak i v listech. Zatímco ginkgolidy A, B, C a J jsou přítomny v listech jinanu, ginkgolid M se nachází pouze v kořenové kůře rostliny [4].

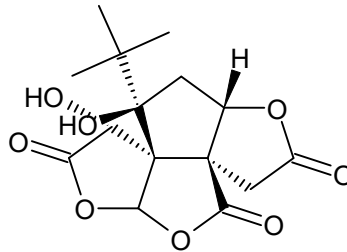
Tabulka 1: Ginkgolidy

<b>Ginkgolidy</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
ginkgolid A	-H	-H	-OH
ginkgolid B	-OH	-H	-OH
ginkgolid C	-OH	-OH	-OH
ginkgolid J	-H	-OH	-OH
ginkgolid M	-OH	-OH	-H



Obrázek 7: Strukturální vzorec ginkgolidů

Další významnou látkou mezi terpenoidy je seskviterpen bilobalid (obrázek 8), který má též důležitou roli v biologických procesech jinanu dvoulaločného [4].



bilobalid

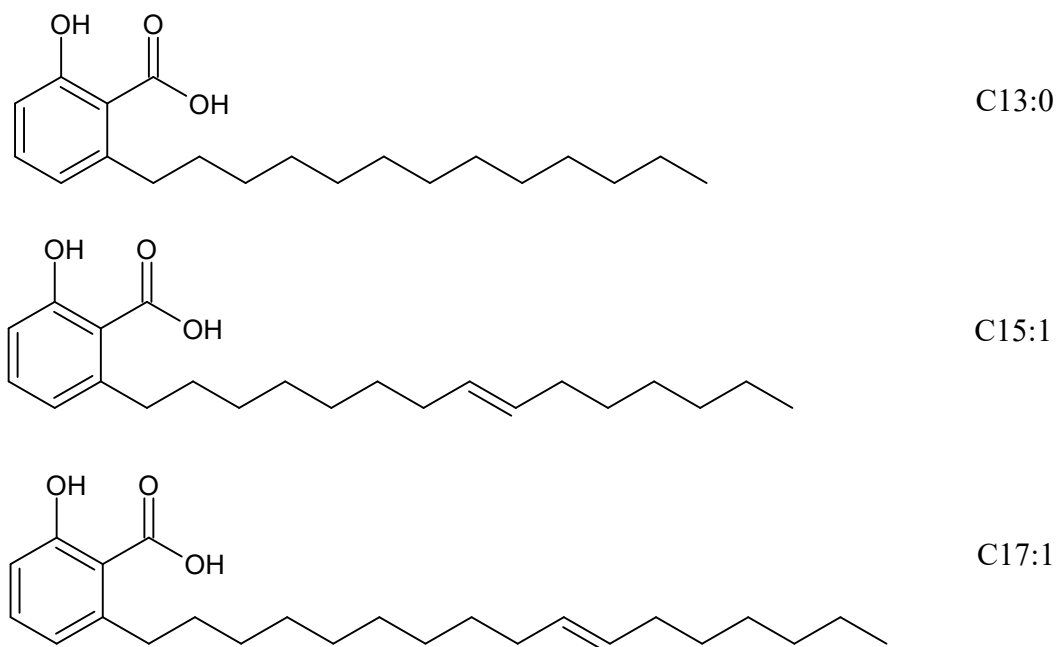
Obrázek 8: Strukturální vzorec bilobalidu

Bylo zjištěno, že terpenové trilaktony izolované z jinanu dvoulaločného mají pozitivní vliv na neurony hipokampu v mozku. Zlepšují paměť a schopnost učení, předchází vzniku epileptického záchvatu a zmírňují poškození neuronů. Terpenoidy představují klíčovou skupinu bioaktivních látek v jinanu dvoulaločném, přičemž jejich výzkum má potenciál otevřít nové perspektivy v lékařském a farmaceutickém výzkumu této rostliny. Jejich stabilní a různorodá povaha poskytuje zajímavé možnosti pro další studium a využití v léčebné praxi [11].

#### 2.1.4 Ginkgolové kyseliny

Ginkgolové kyseliny jsou systematicky 2-hydroxy-6-alkylsalicylové kyseliny s alkylovými řetězci obsahujícími 13, 15 nebo 17 uhlíků. Nejčastěji se vyskytující ve třech formách, C13:0, C15:1 a C17:1 (obrázek 9). Ginkgolové kyseliny v kombinaci s chemoterapií synergicky

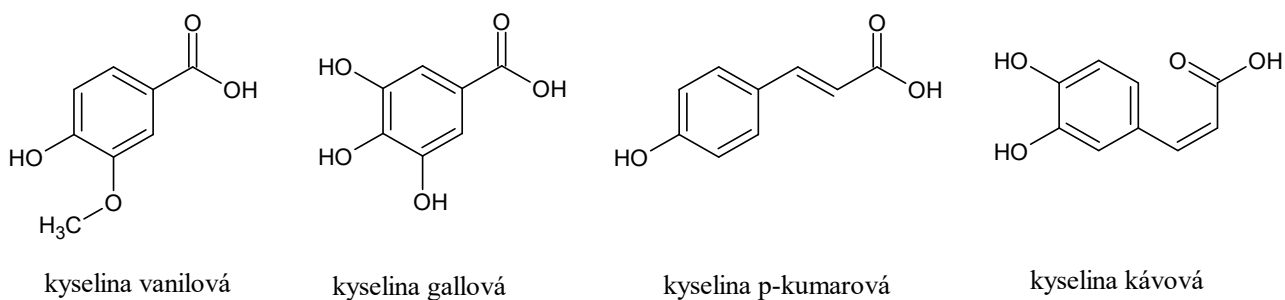
potlačují rakovinu a snižují vedlejší účinky spojené s léčbou. Základní mechanismy fungování těchto látek v lidském těle nejsou stále objasněny. Tyto látky by mohly v budoucnu posloužit k vývoji nových léčiv nebo kombinované chemoterapii [12].



Obrázek 9: Strukturální vzorce vybraných ginkgolových kyselin

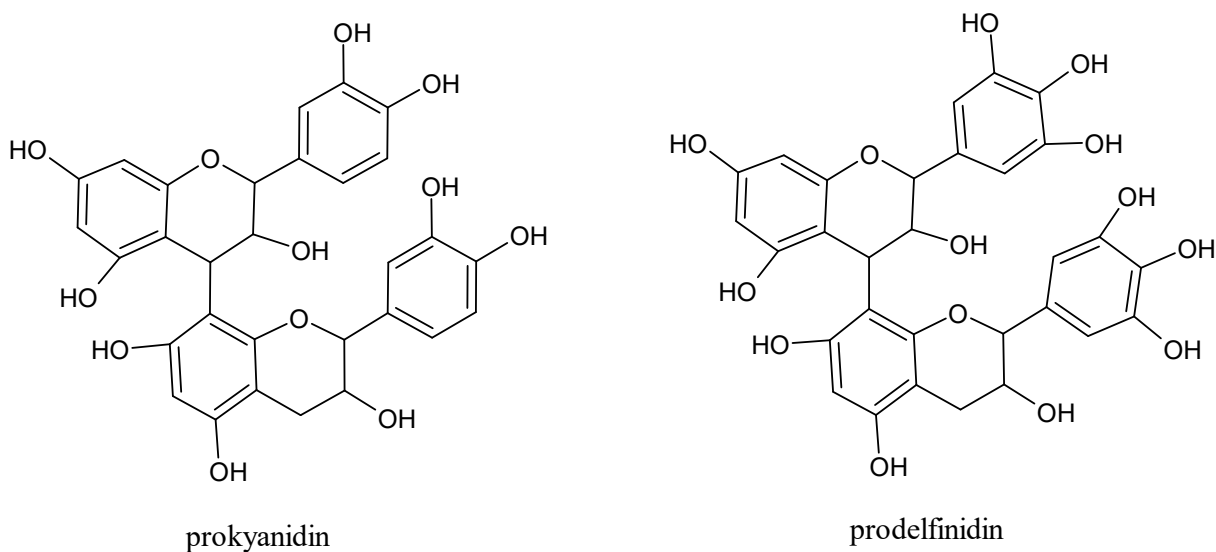
### 2.1.5 Ostatní bioaktivní látky

Kromě flavonoidů, biflavonoidů a terpenoidů obsahuje jinan dvoulaločný i další bioaktivní látky, které mají významné biologické účinky, např. alkylfenoly, hydroxykyseliny, lignany, protokyanidiny, či polyprenoly. Alkylfenoly se dělí do pěti hlavních skupin na kardanoly,  $\alpha$ -hydroxykardanoly, kardoly, urushioly a isourushioly. Nejčastěji popisovanými hydroxykyselinami obsaženými v jinanu dvoulaločném jsou kyselina vanilová, isovanilová, protokatechová, p-hydroxybenzoová, kávová, ferulová, p-kumarová, gallová, sinapová a kyselina m-hydroxybenzoová (obrázek 10) [11].



Obrázek 10: Strukturální vzorce vybraných karboxylových kyselin

Mezi protokyanidiny *ginkgo biloba* se řadí prodelfinidin a prokyanidin (obrázek 11) [11]. Protokyanidiny se vážou na bílkoviny a aktivují antioxidační enzymy, jako jsou kataláza, glutathionperoxidáza a laktátdehydrogenáza. Tyto látky mají antioxidační, protizánětlivé a antivirové účinky [13].



Obrázek 11: Strukturální vzorce vybraných protokyanidinů

Polyprenoly jsou dlouhé lipidové homology složené ze 14 až 24 isopentenylových jednotek. Strukturou se podobají S-polyterpenovým alkoholům, které se vyskytují v těle savců. Polyprenoly vykazují antibakteriální účinek [11].

## 3 ROSTLINNÉ PŘÍPRAVKY Z JINANU DVOULALOČNÉHO

### 3.1 Léčivé přípravky z *ginkgo biloba*

Léčivé přípravky s obsahem jinanového listu lze získat dvěma způsoby. Variantami je buď rozemletí suchých listů na prášek nebo výroba suchého výtažku. Suchý výtažek se připravuje extrakcí, při níž se účinné látky z rostlinného materiálu rozpustí v acetonu, který se následně odpaří. Produkty obsahující *ginkgo* jsou obvykle dostupné v tekuté i pevné formě určené k perorálnímu užívání. Často bývají kombinovány s dalšími rostlinnými látkami.

Přípravky ve formě suchého výtažku je možno používat ke zmírnění poklesu kognitivních funkcí souvisejících s pokročilým věkem a ke zlepšení života osob s mírnou demencí. Léčivé přípravky ve formě prášku z listů jinanu se používají ke zmírnění pocitu těžkých nohou, pocitu chladu na koncových částech těla, které se vyskytují u osob s mírnými poruchami oběhového systému [14].

### 3.2 Extrakty z *ginkgo biloba*

Rostlinný materiál obsahuje široké spektrum bioaktivních sloučenin, jejichž složení se může lišit v závislosti na době a místě sklizně listů jinanu dvoulaločného. Farmaceutické společnosti vyrábí tzv. standardizované extrakty za účelem zajistit stálé složení a odpovídající farmakologický účinek [1].

Standardizovaný extrakt z listů *ginkgo biloba* je purifikovaný výtažek, ze kterého byly odstraněny nežádoucí látky, jako jsou např. toxické fenoly nebo potenciální alergeny [1]. Složení standardizovaných extraktů vypadá následovně. Obsahují 22-27 % flavonoidních glykosidů a 5-7 % terpenových laktonů, z nichž přibližně 2,8-3,4 % tvoří ginkgolidy a 2,6-3,2 % bilobalid [2].

V současné době je jediným dobře prostudovaným extraktem z *ginkgo biloba* EGb-761. Složení tohoto konkrétního přípravku je uvedeno níže (tabulka 2). Proces výroby EGb-761 začíná extrakcí sušených listů jinanu dvoulaločného směsí acetonu a vody za částečného vakua, následuje odstranění rozpouštědla, vícestupňové čištění a zakoncentrování účinných látek. Finální odpaření extraktu probíhá v mikrovlnné tunelové troubě. Výsledný extrakt je standardizován na přesný obsah flavonoidů a terpenoidů a prochází důkladnou analytickou kontrolou, která zajišťuje odpovídající čistotu, koncentraci bioaktivních látek a zejména bezpečnost produktu [15].

Tabulka 2: Složení standardizovaného EGb-761 [17]

skupina látek	obsah (%)
flavonové glykosidy	24
neflavonové glykosidy	20
terpenové laktony	6
karboxylové kyseliny	13
proantokyanidiny	7
katechiny	2
vysokomolekulární látky	4
anorganické látky	5
voda	3
další látky	16
kyselina ginkgolová	0,0005

Klinická studie ukázala, že užívání bylinného extraktu EGb-761 má příznivý vliv na lidský organismus, včetně účinků na mozkovou insuficienci, ischemii myokardu, mozkovou mrtvici, hypertenzi, kognitivní poruchy a jiné [16].

### 3.3 Situace na trhu s produkty z *ginkgo biloba*

Od 80. let minulého století dramaticky vzrostl zájem západních lékařů o *ginkgo biloba* díky jeho pozitivnímu vlivu na kardiovaskulární systém, zejména na činnost mozkových cév. Látky izolované z této rostliny se staly důležitou součástí mnoha léčivých přípravků.

Padesát milionů stromů se pěstuje zejména v Číně, Francii a v Jižní Karolíně v USA. Plantáže každoročně vyprodukují 8000 tun sušených listů, aby uspokojily komerční poptávku po produktech z *ginkgo biloba*. Jinan dvoulaločný patří mezi nejprodávanější léčivé rostliny na světě. Prodává se ve formě listů, práškového extraktu nebo ve formě tinktury farmaceutickým společnostem, které provádí další zpracování [4].

Předními společnostmi působícími na trhu s *ginkgo bilobou* jsou Wagott, Green-Health Pharmaceutical, Schwabe, Blackmores a Solgar. Trh v tomto případě tvoří kosmetické, potravinářské a farmaceutické společnosti. Současné tržní trendy předpokládají, že trh s extraktem z jinanu dvoulaločného dosáhne do roku 2030 hodnoty 2379,2 milionu USD, oproti 1710,5 milionu USD v roce 2020, s roční mírou růstu 4,11 % [18].

## **4 METODY ANALÝZY JINANU DVOULALOČNÉHO**

Před začátkem analýzy je nutné vzorky náležitě upravit. Nejčastěji se používají extrakční metody, jako např. SFE, PLE, UAE. Následně se provádí chromatografická analýza, většinou kapalinová či plynová chromatografie podle povahy analyzovaných látek [19].

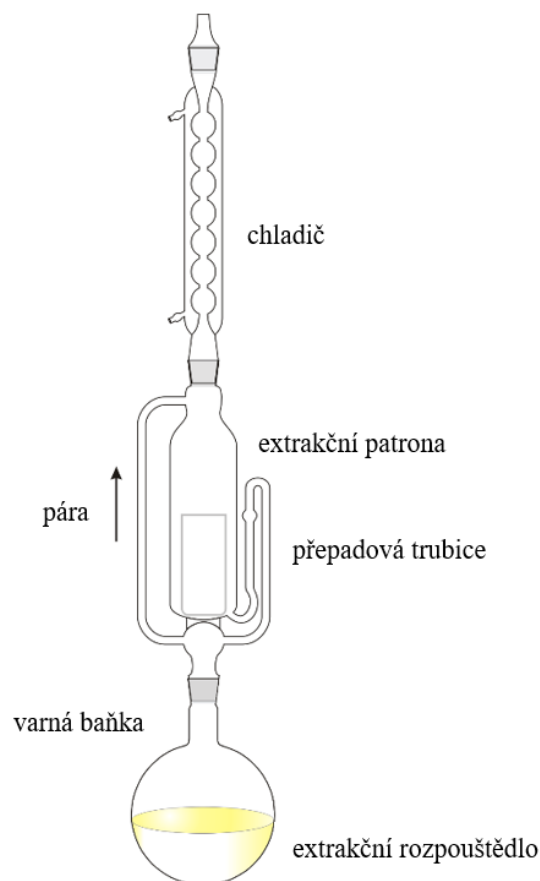
### **4.1 Extrakce**

#### **4.1.1 Extrakce pevná látka–kapalina**

Jedná se o metodu hojně využívanou ve farmaceutickém a v potravinářském průmyslu a v analýze životního prostředí. Tento proces převádí cílové sloučeniny z pevných materiálů do kapalného rozpouštědla na základě rozdílů v rozpustnosti a afinitě. Účinnost extrakce je ovlivněna několika faktory, konkrétně dobou extrakčního procesu, teplotou, tlakem a velikostí částic. Existuje několik metod extrakce požadovaných sloučenin z pevných materiálů, přičemž každá metoda má své jedinečné vlastnosti a je vhodná pro různé aplikace. Do skupiny extrakce pevná látka–kapalina se řadí Soxhletova extrakce, PLE, SFE, MAE, UAE a jiné. K přečištění či k zakoncentrování látek v kapalných extraktech se používá SPE. Tyto metody jsou blíže specifikovány níže [20].

#### **4.1.2 Soxhletova extrakce**

Kontinuální extrakce je časově náročnější, ale účinnější než klasické vytřepávání. V tomto případě se nejčastěji používá Soxhletův extraktor (obrázek 12). Funguje tak, že se vzorek umístí do extrakční patrony, která se vloží do střední části přístroje naplněného vhodným rozpouštědlem. Destilační baňka se zahřeje na teplotu varu rozpouštědla, páry rozpouštědla postupují do chladiče, kde kondenzují a skapávají na vzorek. Po naplnění extrakční patrony roztok přetéká zpět do destilační baňky, kde se rozpouštědlo znovu destiluje. Po ukončení extrakce se rozpouštědlo vydestiluje a izolovaná složka zůstane v baňce [21].



Obrázek 12: Soxhletův extraktor [22]

#### 4.1.3 Extrakce nadkritickou tekutinou (SFE)

Tato technika využívá nadkritické tekutiny, která kombinuje vlastnosti kapaliny a plynu. Když se kapalina dostane do nadkritického stavu (nad kritický tlak a teplotu), získává unikátní vlastnosti, které jsou výhodné pro extrakci. Nadkritické tekutiny mají vysokou hustotu a nejsou stlačitelné, což umožňuje řídit jejich vlastnosti změnami teploty a tlaku. Typickým příkladem je oxid uhličitý ( $\text{CO}_2$ ), který se stává nadkritickým při teplotě  $31\text{ °C}$  a tlaku  $7380\text{ kPa}$  [23].

Nadkritický oxid uhličitý prochází během extrakce patronou se vzorkem a rozpouští látky obsažené v něm. Při vypouštění extraktu dochází ke snížení tlaku na atmosférický, extrahované látky se oddělí od  $\text{CO}_2$  a oxid se opět vrací do plynného stavu. Jedná se o nejčastěji používané rozpouštědlo při SFE, díky své nízké kritické teplotě, nízké toxicitě a nízkým nákladům. Přidáním modifikátorů, jako je ethanol nebo methanol, lze zvýšit rozpustnost polárních látek v nadkritickém  $\text{CO}_2$  [23].

SFE poskytuje vysoké výtěžky a vysokou kvalitu extraktů. Tato metoda nevyžaduje použití organických rozpouštědel. Proces SFE je rychlý a jednoduchý. Extrakce nadkritickou tekutinou je moderní a účinná metoda, která nabízí řadu výhod. Jedinou nevýhodou jsou vysoké pořizovací náklady na zařízení pro SFE [24].

#### **4.1.4 Extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku (PLE)**

Extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku je také známá jako zrychlená extrakce rozpouštědlem nebo extrakce horkým rozpouštědlem pod tlakem. Zvýšená teplota rozpouštědla vede k lepším solvatačním vlastnostem. Na rozdíl od SFE u PLE se teplota pohybuje nad teplotou varu rozpouštědla, ale pod kritickým bodem [25]. Hodnota tlaku je volena tak, aby se rozpouštědlo udrželo v kapalném stavu. V průběhu PLE se z důvodu vyšších teplot mění vlastnosti rozpouštědel, dochází ke zvýšení rychlosti přenosu hmoty a rozpustnosti analyzovaných látek, snižuje se povrchové napětí a viskozita [24].

Doba extrakce se obvykle pohybuje v rozmezí 5 až 20 minut. Důležitými faktory PLE jsou velikost částic vzorku, rychlost přenosu hmoty a použití dispergátorů, které zajišťují rovnoměrné rozložení rozpouštědla a zvyšují výtěžnost extrakce. Zařízení pro PLE zahrnuje čerpadlo, extrakční baňku, troubu a sběrnou nádobku. Extrakce tlakovou kapalinou je rychlá a efektivní metoda, která poskytuje vysokou výtěžnost. Nevýhodou může být přítomnost organických rozpouštědel ve výsledném extraktu [24].

#### **4.1.5 Mikrovlnná extrakce (MAE)**

Mikrovlnná extrakce se používá k extrakci bioaktivních látek z přírodních materiálů. Při tomto procesu jsou rostlinné vzorky společně s rozpouštědlem vystaveny mikrovlnnému záření, které zahřívá polární molekuly v materiálu a zvyšuje kinetiku extrakce. Mikrovlny generují teplo skrze dipólovou rotaci, což vede k narušení buněčných stěn rostlinného materiálu a uvolnění bioaktivních složek [23].

Výhodou MAE je rychlost, ekonomičnost, nižší spotřeba rozpouštědla a vysoká účinnost extrakce. K dispozici jsou různé přístroje, jako např. fokusované mikrovlnné trouby a uzavřené extrakční nádoby. Hlavními parametry ovlivňujícími účinnost MAE jsou mikrovlnný výkon, doba extrakce, druh rozpouštědla a jeho viskozita. V případě mikrovlnné extrakce nelze použít nepolární nebo těkavá rozpouštědla [26].

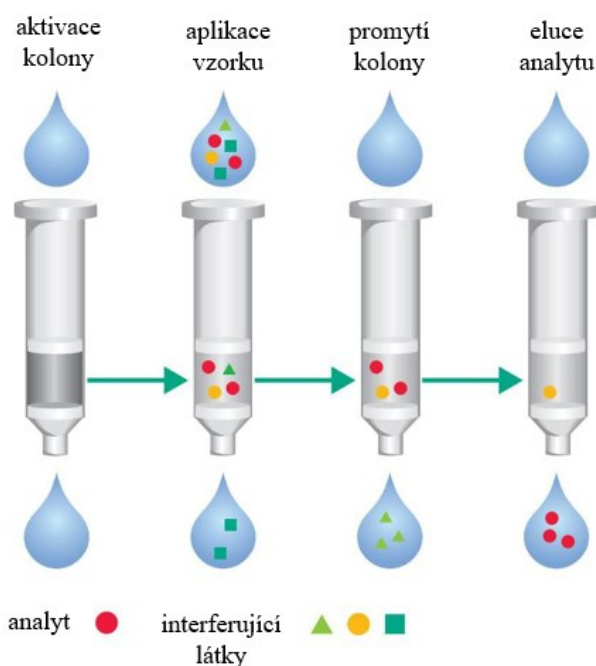
#### 4.1.6 Ultrazvuková extrakce (UAE)

Ultrazvuková extrakce, známá také pod pojmem sonifikace, je extrakční metoda používaná k získávání cenných sloučenin z různých materiálů. Tento proces využívá ultrazvukové vlny o frekvencích v rozmezí od 20 do 40 kHz [19]. Ultrazvukové vlny způsobují kavitaci, která mechanicky narušuje buněčné stěny rostlinného materiálu a zvyšuje účinnost extrakce [23].

Kinetika extrakce je rychlejší, díky tomu se zkracuje doba potřebná pro extrakci. Nižší teploty během extrakce umožňují zpracování termolabilních sloučenin bez jejich degradace. Při nižších frekvencích ultrazvuku je kavitace intenzivnější než při vysokých frekvencích. To vede k vyšším teplotám a tlakům při implozi bublin, a tím i k větší tvorbě volných radikálů, které mohou degradovat účinné složky extraktu [27].

#### 4.1.7 Extrakce tuhou fází (SPE)

SPE (obrázek 13) je moderní metoda, která se používá k přečištění analytů a zakoncentrování již připravených vzorků před chromatografickou analýzou. V prvním kroku se připraví kolona se sorbentem, je nutné ji aktivovat. Poté dochází k aplikaci vzorku. Následuje promytí kolony, kdy jsou vyplaveny pryč interferující látky. Na závěr je přidáno eluční rozpouštědlo a dochází k uvolnění analytu. SPE je oblíbená pro svou schopnost zlepšit selektivitu a citlivost analytických metod. Proces je rychlý a efektivní [28].



Obrázek 13: Extrakce tuhou fází [29]

#### **4.1.8 Mikroextrakce tuhou fází (SPME)**

Pro tuto extrakční metodu je typické, že zachytí těkavé i netěkavé analyty z plyných, kapalných i pevných vzorků. Princip spočívá v adsorbci analytů na speciálně upravené vlákno, nejčastěji potažené polymerním materiálem. SPME je vhodná pouze pro jednorázovou analýzu, extrakt je při ní kompletně spotřebován.

Při mikroextrakci se spotřebuje minimální množství rozpouštědla a speciální vlákno je možno použít opakovaně. Jedná se tedy o moderní metodu přípravy vzorků, která je rychlá, ekonomická a univerzální pro mnoho aplikací [30].

### **4.2 Chromatografické metody**

#### **4.2.1 Princip chromatografie**

Chromatografie představuje skupinu analytických metod, jejichž cílem je oddělit jednotlivé složky směsi na základě jejich rozdílné afinity ke stacionární a mobilní fázi. Mobilní (pohyblivá) fáze prochází systémem, který obsahuje stacionární (nepohyblivou) fázi. Látky, které se silněji vážou ke stacionární fázi, se pohybují pomaleji. Naopak látky, které mají vyšší afinitu k mobilní fázi, se pohybují rychleji. Tímto způsobem dochází k separaci látek [30, 31].

#### **4.2.2 Rozdělení chromatografických metod**

Základní typy chromatografických metod lze rozdělit podle různých kritérií:

1) Podle fyzikálně-chemického principu dělení:

Adsorpční chromatografie: Separace na základě adsorpce složek směsi na povrch stacionární fáze.

Rozdělovací chromatografie: Separace na základě rozdílné rozpustnosti složek směsi v mobilní a stacionární fázi.

Iontově výměnná chromatografie: Separace na základě iontových interakcí mezi složkami směsi a stacionární fází.

Gelová chromatografie: Separace na základě velikosti molekul.

Afinitní chromatografie: Separace na základě specifických interakcí mezi složkami směsi a ligandem navázaným na stacionární fázi.

2) Podle skupenství mobilní fáze:

Kapalinová chromatografie (LC): Mobilní fází je kapalina.

Plynová chromatografie (GC): Mobilní fází je plyn.

3) Podle uspořádání stacionární fáze:

Kolonová chromatografie: Stacionární fáze je umístěna v koloně.

Kapilární chromatografie: Stacionární fáze je umístěna v kapiláře.

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC): Stacionární fáze je tenká vrstva adsorbentu na nosiči.

Papírová chromatografie: Stacionární fáze je papír/voda adsorbovaná na papíře.

4) Podle účelu použití:

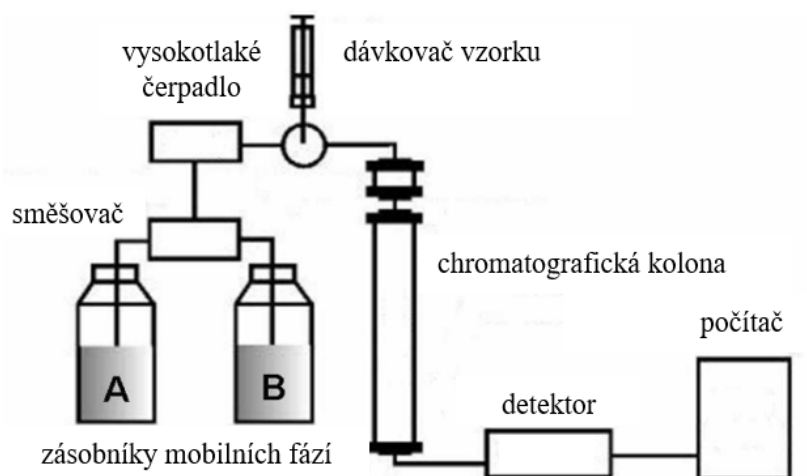
Analytická chromatografie: Používá se pro analýzu složení směsí.

Preparativní chromatografie: Používá se pro izolaci a čištění větších množství látek [30, 31].

### 4.2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie představuje jednu z nejpoužívanějších separačních technik v analytické chemii. Je založena na separaci analytů na základě jejich rozdílné afinity ke kapalně stacionární fázi a zpravidla tuhé mobilní fázi. HPLC vyžaduje relativně vysoké tlaky v systému kvůli zajištění dostatečného průtoku mobilní fáze chromatografickou kolonou. Mezi hlavní výhody patří vysoká citlivost, přesnost a možnost analýzy složitých látek přírodního původu. Tato metoda je široce využívána v oblasti farmacie, potravinářství, klinické diagnostiky a ekologie [30].

#### 4.2.3.1 Instrumentace v HPLC



Obrázek 14: Instrumentace v HPLC [32]

Základem HPLC (obrázek 14) je chromatografická kolona, obvykle vyrobená z nerezové oceli a naplněná vhodnou stacionární fází. V současnosti jsou nejpoužívanější kolony s vnitřním průměrem 2–5 mm a délkou 50–250 mm [30].

Vzhledem k malému průměru částic stacionární fáze (3–10  $\mu\text{m}$ ) je třeba mobilní fázi čerpat kolonou pomocí vhodných vysokotlakých čerpadel, umožňujících dosažení tlaků 30–60 MPa, v některých případech i více [33].

Vzorek je do systému zaváděn pomocí dávkovače. V laboratorní praxi se používá buď manuální injekční systém nebo automatizovaný dávkovač, tzv. autosampler, který zajišťuje přesné a reprodukovatelné vstřikování vzorků i při vysokém tlaku [33].

Mobilní fáze obsahující rozseparované látky vytéká z kolony a je dále zaváděna do detektoru. Separované analyty jsou zde detegovány a generovaný elektronický signál je zaznamenán ve formě chromatogramu. Nejčastěji se u HPLC setkáváme se spektrofotometrickými UV-Vis, hmotnostními, fluorimetrickými a elektrochemickými detektory [30, 33].

Celý chromatografický proces je řízen počítačem, který zároveň monitoruje signál generovaný detektorem, ukládá data a vyhodnocuje koncentrace analytů na základě výšky odpovídající píku na chromatogramu [30].

#### **4.2.3.2 Příprava vzorku pro HPLC analýzu**

Před samotnou analýzou je nezbytné vzorek náležitě upravit. Mezi běžné postupy patří extrakce analytu, zakoncentrování vzorku nebo derivatizace. Důvodem derivatizace je usnadnění detekce analytů [30].

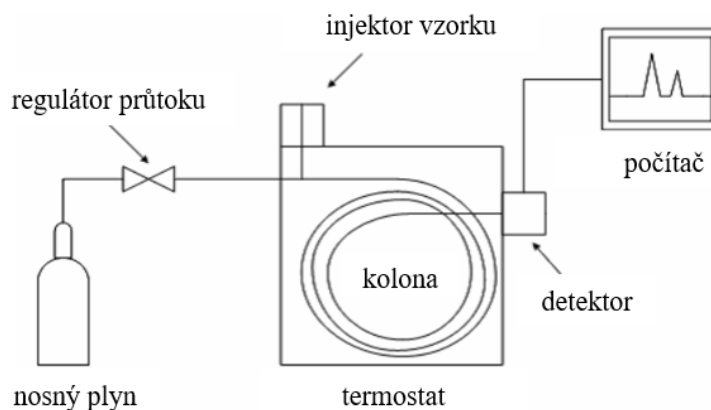
#### **4.2.4 Plynová chromatografie (GC)**

V plynové chromatografii je mobilní fází nosný plyn a látky se dělí v plynném stavu. Při rozdělovací chromatografii v systému plyn-kapalina se látky dělí mezi nosný plyn a stacionární kapalnou fází, zakotvenou na tuhém nosiči. Při adsorbční chromatografii v systému plyn-tuhá látka se látky dělí mezi nosný plyn a tuhý sorbent [34].

Vzorek se dávkuje do vyhřívaného prostoru, kde se zplyní a je unášen proudem nosného plynu do chromatografické kolony umístěné v termostatu. V koloně se složky separují na základě různé afinity ke stacionární fázi. Látky, které se zadržují málo, vystupují z kolony nejdříve, mají nejkratší eluční časy. Složky opouštějící kolonu indikuje detektor. Signál

z detektoru je vyhodnocen, z časového průběhu intenzity signálu je určen druh a kvantitativní zastoupení složek [35].

#### 4.2.4.1 Instrumentace v GC



Obrázek 15: Instrumentace v GC [34]

Hlavní částí GC (obrázek 15) je chromatografická kolona obsahující vhodnou stacionární fázi. Kolona se nachází v termostatu, na vstupu je napojena na dávkovací zařízení a na výstupu je napojena na příslušný detektor.

Zdrojem nosného plynu je tlaková láhev s dusíkem nebo heliem. V případě použití detekce ionizací plamenem je nutný přívod vodíku a kyslíku do oblasti detektoru, až za chromatografickou kolonu. Nosný plyn musí být čistý, i malá koncentrace nečistot může negativně ovlivnit analýzu. Po průchodu elektronicky nastavenými regulátory tlaku prochází nosný plyn do injektoru.

V injektoru se do proudu nosného plynu dávkuje speciální mikrostříkačkou vzorek. Dávkovač je zahříván na takovou teplotu, aby v něm došlo k okamžitému zplynění vzorku. Teplota nesmí být příliš vysoká, aby nezpůsobila rozklad analyzovaných látek. Součástí chromatografu bývá často autosampler, který je přesnější. Z injektoru jsou páry vzorku unášeny na kolonu umístěnou v termostatu.

Na chromatografické koloně dochází k separaci jednotlivých složek vzorku na základě dříve popsaného principu. Lze využít různé druhy chromatografických kolon pro různé typy analýz.

Proud nosného plynu, který obsahuje oddělené složky, je veden z kolony na detektor. V GC převažuje užití hmotnostní detekce. Dále se v GC uplatňuje plamenový ionizační detektor (FID), tepelně-vodivostní detektor (TCD) nebo detektor elektronového záchytu (ECD).

U plamenově-ionizačního detektoru je směs plynu z kolony zaváděna do plamene, kde dochází k ionizaci a vzniku nabitých částic. FID je citlivý na většinu organických látek, ale naopak nereaguje na většinu anorganických plynů a par. TCD obsahuje zahřívané odporové vlákno, jehož elektrický odpor se mění s průchodem látky. Tento detektor je velmi univerzální. ECD je pro změnu selektivní, citlivý na elektronegativní atomy.

Podobně jako u HPLC jsou celá analýza, sběr a zpracování dat řízeny počítačem [30, 34, 35].

#### 4.2.4.2 Příprava vzorku pro GC analýzu

Před GC analýzou je často nutné sledované analyty ze vzorku biologického materiálu vyextrahovat do organického rozpouštědla a poté chemicky derivatizovat. Řada významných látek je netěkavých a chemická modifikace nebo derivatizace zvýší těkavost pro GC analýzu [31, 36].

#### 4.2.5 Chromatogram a jeho vyhodnocení

V GC a LC mobilní fáze s eluovanými látkami opouští kolonu a prochází přes vhodný detektor, kde se produkuje elektronický signál. Dochází k grafickému zaznamenání signálu jako funkce času nebo objemu. Eluované analyty jsou graficky znázorněny jako série vrcholů tzv. píků. Výsledkem je chromatogram, takto graficky zaznamenaná data slouží k identifikaci a kvantifikaci analytů [30, 31].

K identifikaci látek slouží retenční čas, který lze získat z chromatografického záznamu. Další možností je použití specifických detektorů jako např. NMR nebo MS detektor. Kvantifikace analytu probíhá na základě plochy případně výšky píku [30].

##### 4.2.5.1 Retenční faktor

K charakterizaci chromatografického chování látek v konkrétním analyzovaném systému se v chromatografii nejčastěji používá veličina tzv. retenční faktor  $k$ . Charakterizuje selektivitu a slouží k porovnání separace a retence analytu v různých systémech. Retenční faktor lze vyjádřit rovnicí:

$$k = \frac{V_r - V_m}{V_m} = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

Retenční (eluční) objem  $V_r$  je celkový objem mobilní fáze proteklý od nástřiku vzorku až na konec kolony. Mrtvý objem  $V_m$  je objem kolony, který není vyplněn vlastní stacionární fází. Zjišťuje se analýzou látky, která se v daném chromatografickém systému nezadržuje, má nulovou retenci. Celkový čas, který příslušný analyt stráví v separační koloně se označuje jako tzv. retenční (eluční) čas  $t_r$ . Mrtvý čas kolony  $t_m$  je retenční čas analytu, který není v koloně zadržován, pohybuje se kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze. Retenční čas, který analyt stráví ve fázi stacionární se nazývá redukovaný retenční čas  $t_r'$ , lze ho určit následujícím vztahem [30].

$$t_r' = t_r - t_m$$

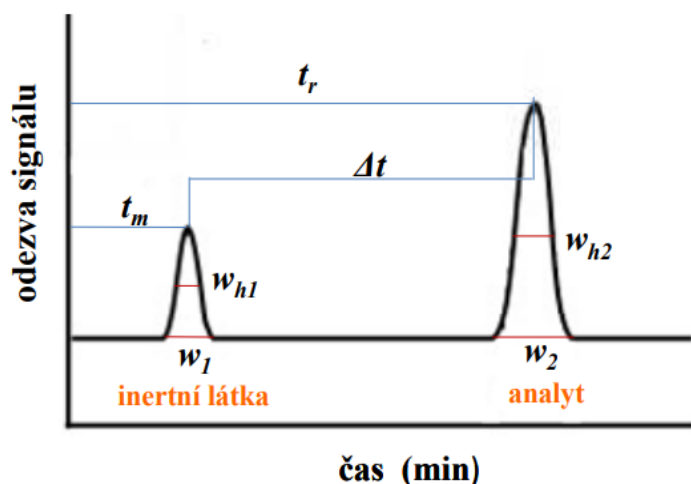
#### 4.2.5.2 Účinnost chromatografické kolony

Hlavním cílem chromatografických metod je dosažení co nejlepšího rozdělení analyzovaných látek v co nejkratším časovém úseku, tzn. s co nejvyšší účinností.

Účinnost kolony charakterizuje její schopnost separace jednotlivých složek směsi. Tento parametr je vyjádřen počtem teoretických pater kolony  $N$ . Můžeme ho experimentálně zjistit z naměřených parametrů dosažením do vzorce,

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{w}\right)^2 = 5,545 \cdot \left(\frac{t_r}{w_h}\right)^2$$

kde  $t_r$  je retenční čas analytu,  $w$  je šířka píku při základně a  $w_h$  šířka píku v polovině výšky. V chromatogramu jsou znázorněny jednotlivé parametry (obrázek 16).

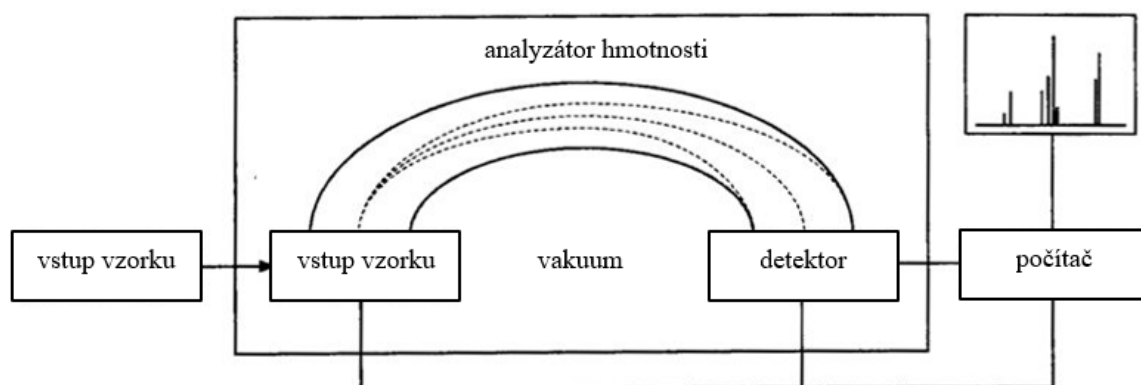


Obrázek 16: Chromatogram [32]

Pokud známe počet teoretických pater  $N$  a celkovou délku kolony  $L$ , můžeme určit výškový ekvivalent teoretického patra  $H$  [30].

$$H = \frac{L}{N}$$

### 4.3 Hmotnostní spektrometrie (MS)



Obrázek 17: Hmotnostní spektrometrie [37]

Hmotnostní spektrometrie (obrázek 17) nachází uplatnění v analytické chemii při identifikaci molekul. Principem této metody je separace iontů a fragmentů analyzované látky v magnetickém poli a jejich následné dělení na základě poměru jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Výsledkem MS je hmotnostní spektrum, které ukazuje relativní množství iontů na ose y a jejich poměry  $m/z$  na ose x. Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru [36].

Vzorky mohou být ionizovány za atmosférického nebo sníženého tlaku. Existují tvrdé techniky ionizace (např. elektronová ionizace) a měkké techniky ionizace (např. elektrosprej, chemická ionizace za atmosférického tlaku).

Běžnými analyzátoři jsou kvadrupóly, průletové analyzátoři a iontové pasti. Pro zvýšení citlivosti a selektivity se mohou některé analyzátoři také kombinovat. Nakonec ionty dopadají na detektor, kde je zaznamenán signál ve formě elektrického proudu.

Spojení hmotnostní spektrometrie se separačními technikami jako GC a LC umožňuje oddělit a identifikovat analyty v průběhu jedné analýzy. Nejčastější kombinací je LC/MS s ionizací za atmosférického tlaku a GC/MS s elektronovou ionizací [38].

#### **4.3.1 Ionizace elektrosprejem (ESI)**

Při ionizaci elektrosprejem je vzorek, rozpuštěný ve vhodném rozpouštědle, veden do kovové kapiláry s vysokým napětím, kde se vytváří aerosol. Rozpouštědlo se odpařuje, kapky se zmenšují, dochází ke coulombickým explozím a uvolnění iontů. Tato technika je vhodná pro analýzu biomakromolekul a často se používá ve spojení s HPLC [38].

#### **4.3.2 Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)**

APCI je ionizační technika s vyšší energií než ESI, což vede k větší fragmentaci iontů. Vzorek se sprejuje do vyhřívané části iontového zdroje, kde se odpařuje. Ionizace probíhá díky koronovému výboji. Ionty jsou dále pomocí elektrického pole usměrňovány do vstupu analyzátoru. APCI se používá pro ionizaci nepolárních až středně polárních látek a je vhodná pro molekuly do hmotnosti 2000 Da [38].

#### **4.3.3 Elektronová ionizace (EI)**

K ionizace molekul analytu dochází v plynném stavu pomocí proudu elektronů. Z molekuly je při srážce s paprskem elektronů odtržen valenční elektron, molekula získává kladný náboj. Následně dochází k fragmentaci molekuly v důsledku přebytku energie. Postup elektronové ionizace je dobře prozkoumán, jsou podrobně popsány fragmentační mechanismy jednotlivých tříd látek. Rozsáhlé knihovny hmotnostních spekter umožňují počítačové porovnání změřeného spektra s databází a rychlou identifikaci neznámé látky. EI nelze použít pro netěkavé látky a pro látky teplotně nestálé [39].

## 5 STUDIE ZABÝVAJÍCÍ SE JINANEM DVOULALOČNÝM

Analýza flavonoidů, flavonoidních glykosidů, ginkgolidů a bilobalidu se provádí pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie [5]. Analýza terpenových trilaktonů, bilobalidu a ginkgolidů, byla dlouho obtížně proveditelná kvůli špatné absorpci UV záření, nedostatku dobrého chromoforu a relativně nízké koncentraci látek v listech. Dnes se pro analýzu těchto sloučenin používají různé kvantitativní metody založené na HPLC, GC, LC-MS, kapilární elektroforéze a TLC [4]. Příklady studií, ve kterých byly použity některé výše zmíněné techniky, jsou shrnuty níže (tabulka 3), dále v textu jsou pak uvedeny některé zajímavé detaily.

Tabulka 3: Studie zabývající se stanovením bioaktivních látek jinanu dvoulaločného

typ vzorku	původ vzorku	úprava vzorku	metoda stanovení	stanovené látky	zdroj
list	neuveдено	SPE	HPLC-DAD-UV HPLC-APCI-MS	6 ginkgolových kyselin 2 kardanoly	[40]
5x EGb 761	Čína	extrakce kapalinou	UPLC-MS-MS	kvercetin kaempferol apigenin luteolin isorhamnetin bilobalid ginkgolidy (A, B, C, J)	[41]
6x list 3x prášek	USA Kolumbie Čína	UAE	LC-DAD-ESI/MS	kvercetin kaempferol myricetin apigenin luteolin isorhamnetin amentoflavon bilobetin ginkgetin bilobalid ginkgolidy (A, B, C, J)	[42]
20x EGb 761	Čína	extrakce kapalinou	HPLC-UV/DAD/MS LC-MS	kvercetin kaempferol apigenin isorhamnetin genistin rutin	[43]
list	Rumunsko	extrakce kapalinou	TLC HPLC	kvercetin rutin	[44]

**N. Fuzzati a kolektiv** [40] přišli s jednoduchou a rychlou HPLC-UV metodu pro kvantifikaci ginkgolových kyselin v extraktech *ginkgo biloba*. Byly použity vzorky sušených mletých listů jinanu dvoulaločného, extrahované různými rozpouštědly za účelem izolace alkylfenolů a ginkgolových kyselin. Podmínky zahrnovaly mobilní fázi s kyselinou mravenčí nebo kyselinou trifluoroctovou a vlnovou délkou 210 nm. Metoda používá externí standard ginkgolových kyselin C13:0, C15:1 a C17:1. Vzorky byly čištěny pomocí SPE, eluovány methanolem a analyzovány pomocí HPLC. Metoda byla validována zkoumáním její specifity, linearity, přesnosti a opakovatelnosti. Specifičnost byla potvrzena analýzou HPLC-DAD-UV a HPLC-APCI-MS. Tuto metodu lze použít pro kontrolu kvality EGb, aby se zajistilo, zda splňují požadovanou kvalitu.

**Wang a kolektiv** [41] v rámci studie vyvinuli a validovali metodu UPLC-MS-MS pro stanovení hlavních účinných látek a toxických složek v EGb-761. K ověření účinnosti této metody byly analyzovány vzorky EGb-761 od různých výrobců v Číně. Výsledky ukázaly, že celkový obsah terpenových trilaktonů ve všech vzorcích překročil požadavky čínského lékopisu.

Při analýze byly připraveny vzorky, provedena chromatografická separace a detekce pomocí hmotnostní spektrometrie. Studie byla zaměřena na separaci 16 cílových sloučenin jako např. kvercetin, kaempferolu, isorhamnetin, bilobalid a další. Obsah bioaktivních látek v extraktech se mezi výrobci lišil.

Vyvinutou metodu lze použít nejen pro kontrolu kvality EGb-761, ale i příbuzných tradičních čínských léčivých přípravků. Poskytuje spolehlivý způsob kvantifikace bioaktivních látek v extraktech z listů jinanu dvoulaločného, což je přínosem pro farmaceutický průmysl a spotřebitele.

**Lin a kolektiv** [42] identifikovali v listech jinanu dvoulaločného 45 glykosylovaných flavonolů a flavonů, 3 flavonolové aglykony, katechin, 10 biflavonů, dihydroxybenzoovou kyselinu a 4 terpenové laktony. Ve studii bylo analyzováno šest vzorků listů *ginkgo biloba* a tři zpracované produkty, konkrétně prášek z listů jinanu.

Pro získání chromatografických profilů flavonoidů a terpenových laktonů byla použita metoda LC-DAD-ESI/MS. Flavonoidy v produktech z listů *ginkgo biloba* byly podobné jako

v surových listech, s výjimkou absence biflavonů. Všech šest vzorků listů mělo obdobné chromatografické profily.

Metoda LC-MS se ukázala jako účinná pro identifikaci sloučenin. Studie naznačuje, že chromatografické profily *ginkgo biloba* mohou být celosvětově podobné, přičemž zpracované produkty si zachovávají většinu glykosylovaných flavonoidů. Výsledky této studie mohou být využity k určení kvalitativních parametrů výrobků a doplňků stravy z jinanu dvoulaločného, čímž se zajistí jejich účinnost a bezpečnost pro spotřebitele.

**Yang a kolektiv** [43] vyvinuli metodu pro komplexní hodnocení kvality extraktů *ginkgo biloba* pomocí chromatografických a spektrometrických technik. Dvacet šarží EGb bylo analyzováno pomocí HPLC-UV/DAD/MS fingerprintingu. Flavonoidy byly semikvantitativně stanoveny pomocí kalibračních křivek a molekulových hmotností zjištěných LC-MS. V některých šaržích EGb byly přítomny falšující látky, jako jsou genistein a isorhamnetin 3-O-glukosid. Ukázalo se, že šarže číslo 11 obsahovala falšované složky.

Vyvinutá metoda je vhodná pro analýzu extraktů s vysokým obsahem flavonoidů. Může být využita pro kontrolu kvality EGb a dalších rostlinných extraktů, včetně detekce falšovaných produktů.

**Dumitru a kolektiv** [44] analyzovali etanolové extrakty z listů jinanu dvoulaločného a testovali jejich fytochemické a antibakteriální vlastnosti. Etanolový extrakt z listů jinanu byl připraven ze 70% alkoholu. Pomocí TLC byly kvalitativně stanoveny flavonoidy, konkrétně kvercetin a rutin. HPLC bylo zjištěno množství kvercetinu v extraktu, které činilo 1,34 mg/ml.

Pro testování citlivosti *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* byla použita disková metoda. Po inkubaci bakterií bylo zjištěno, že EGb vykazuje vysokou antimikrobiální aktivitu, která je přisuzována nejen kvercetinu, ale i dalším sekundárním metabolitům přítomným v extraktu.

## 6 VYUŽITÍ JINANU DVOULALOČNÉHO VE ZDRAVOTNICTVÍ

*Ginkgo biloba* je rostlina se širokým spektrem využití, nalézá uplatnění nejen ve zdravotnictví, ale také v potravinářství, zahradnictví, umění a náboženství. Největší roli hraje v oblasti lékařství, kde má již dlouholetou historii v tradičních léčebných postupech. Po dobu více než 700 let byla semena jinanu dvoulaločnatého používána v tradiční čínské a japonské medicíně k léčbě kašle a bronchiálního astmatu [2]. V záznamech lidového léčitelství se uvádí, že přípravky z *ginkgo biloba* sloužily také k vyvolání porodu, k léčbě omrzelin, artritidy a edému [5].

Stále větší část populace se při léčbě svých zdravotních potíží přiklání k rostlinným lékům a produktům pro jejich léčebné a výživové účinky. Přesto, že doposud není znám přesný mechanismus účinku jinanu dvoulaločného, klinické studie naznačují, že *ginkgo* vykazuje pozitivní vliv na osoby trpící chronickým onemocněním, jako jsou neurodegenerativní a kardiovaskulární nemoci, rakovina, zdravotní komplikace spojené s přibývajícím věkem, psychické problémy a jiné [5].

Extrakty z jinanu dvoulaločného jsou známé pro své pozoruhodné ochranné účinky proti různým toxinům a záření. Tyto již zmiňované extrakty obsahují bioaktivní látky, které zlepšují krevní oběh, zabráňují tvorbě sraženin, posilují stěny kapilár a chrání nervové buňky před poškozením nedostatkem kyslíku [4]. Jsou účinně využívány k léčbě demence, poruch paměti a koncentrace. Produkty z *ginkga* se jsou dále podávány pacientům při depresích, závratích, přetrvávajících bolestech hlavy a při poruše učení [2].

### 6.1 Antioxidační účinek

Extrakty z jinanu dvoulaločného jsou známé svou antioxidační aktivitou [45–47] a přínosem v prevenci onemocnění spojených s oxidačním stresem. Oxidační stres je vyvolán nerovnováhou v tvorbě a hromadění volných radikálů v různých buňkách a tkáních. Neschopnost lidského těla účinně reagovat na reaktivní sloučeniny a eliminovat je, může vést ke vzniku nejrůznějších zdravotních potíží. Tento stav je spojen s rozvojem problémů souvisejících s vyšším věkem, jako jsou diabetes 2. typu, kardiovaskulární nebo neurodegenerativní onemocnění [48]. Antioxidační účinek jinanu dvoulaločného spočívá v okamžitém vychytávání volných radikálů a v blokaci jejich tvorby [13].

*Ginkgo biloba* je bohatým zdrojem flavonoidů [49–51] a terpenoidů [52–54], které patří mezi silné antioxidanty.

## **6.2 Protizánětlivý účinek**

Zánět je přirozenou reakcí těla na zranění nebo invazi cizích látek v organismu. Při zánětlivé reakci dochází k aktivaci nejrůznějších složek imunitního systému. Preklinické studie [55, 56] ukazují, že extrakt z jinanu dvoulaločného může snížit markery zánětu u různých chorobných stavů [57].

## **6.3 Anti-PAF účinek**

Faktor aktivující krevní destičky (PAF, platelet-activating factor) je fosfolipidová sloučenina, která se uvolňuje z buněčných membrán působením fosfolipázy v reakci na různé podněty, jako např. vazba antigen-protilátka [58]. Je to silný zánětlivý mediátor, i velmi malé množství PAF může ovlivnit řadu fyziologických a patologických dějů v organismu. Nadbytek PAF může vést k vážným zdravotním stavům. Lidské tělo si ho tvoří spontánně i bez podnětu a jeho účinky jsou regulovány enzymy. K prevenci jeho škodlivých účinků se používají zejména přírodní inhibitory PAF, jedním z nich je i extrakt z jinanu dvoulaločného. Ginkgolidy v něm obsažené mají výrazný anti-PAF účinek [59].

## **6.4 Kardioprotektivní účinek**

Bylo zjištěno, že prostřednictvím produkce prostaglandinů a oxidu dusného zvyšují extrakty z *ginkgo biloba* průtok krve, inhibují agregaci krevních destiček a snižují kapilární permeabilitu. Kardioprotektivního efektu je dosaženo především díky ginkgolidu B, který brzdí faktor aktivující krevní destičky [60].

## **6.5 Prevence neurodegenerativních poruch**

Jednou z nejzávažnějších forem neurodegenerativních poruch je Alzheimerova choroba, která postihuje zejména starší populaci a vede ke ztrátě kognitivních schopností člověka. Podle odhadů zasahuje přibližně 4 % osob starších 65 let a až pětinu lidí nad 80 let [61]. Onemocnění je charakterizováno vznikem amyloidových plaků na mozkové tkáni. Tyto usazeniny vedou k poškození a odumírání nervových spojení a buněk. Mimo jiné dochází

k poklesu hladiny neurotransmiteru acetylcholinu v mozku, což negativně ovlivňuje přenos signálu mezi neurony [62].

Extrakt z listů jinanu dvoulaločného byl předmětem výzkumu kvůli svému potenciálu zpomalit nebo zmírnit příznaky Alzheimerovy choroby. Bylo zjištěno, že EGb může bránit vzniku amyloidních proteinů vznikajících z  $\beta$ -amyloidového proteinu. Tvorba tohoto proteinu může souviset s vyšší hladinou cholesterolu. Bioaktivní látky obsažené v jinanu pravděpodobně soutěží s volným cholesterolem o vazbu na amyloidní proteiny, čímž napomáhají snižovat jejich ukládání v lidském mozku [63].

Pro zhodnocení vlivu standardizovaného EGb-761 na Alzheimerovu chorobu byly provedeny různé klinické studie. Roční studie, které se zúčastnilo 309 náhodně vybraných pacientů trpících Alzheimerovou nebo multiinfarktovou demencí, zkoumala účinnost a bezpečnost přípravku. Výsledky ukázaly, že léčba byla dobře snášena, vedla ke stabilizaci zdravotního stavu a v některých případech i k mírnému zlepšení kognitivních funkcí pacientů [64].

Jiná studie [65] porovnávala účinek EGb s běžně používanými inhibitory acetylcholinesterázy (takrin, donepezil, rivastigmin, metrifonát) u pacientů s Alzheimerovou demencí. Tato studie trvala 24 až 30 týdnů. Skupina užívající inhibitory cholinesterázy zahrnovala pouze pacienty trpící Alzheimerovou demencí, zatímco skupina užívající extrakt zahrnovala i pacienty s multiinfarktovou demencí. Výsledky neprokázaly zásadní rozdíly v účinnosti mezi oběma typy léčby. Na základě těchto zjištění lze produkty z jinanu považovat za vhodné doplňky klasické farmakoterapie neurodegenerativních poruch.

## **6.6 Vliv na tinnitus**

Tinnitus, známý jako „zvonění v uších“ postihuje přibližně 10 % populace, hlavně tedy starší jedince. Jednou z hlavních příčin je nedostatečné prokrvení vnitřního ucha. Předpokládalo se, že z toho důvodu by mohl mít extrakt z jinanu dvoulaločného pozitivní vliv na léčbu tinnitu. Několik klinických studií [66–69] se zabývalo tímto tématem. Výsledky však nejsou jednoznačné kvůli rozdílným komerčním vzorkům extraktu, variabilním metodám léčby, dávkování extraktu a různým kritériím pro vyhodnocení studií [70].

## 6.7 Vliv na změny nálad, paměť a působení stresu

Stres, změny nálad a deprese jsou v dnešní době hojně se vyskytující jevy. Doplnková a alternativní léčba mohou být účinnou prevencí těchto symptomů. Stres zvyšuje hladinu glukokortikoidů, což může vést k problémům s pamětí, zvýšené úzkosti, oslabené imunitě, zažívacím potížím, infarktu myokardu a nespavosti. Stresové stavy bývají spojovány s výkyvy nálad a emocí [71]. Snížením vazebné kapacity periferních benzodiazepinových receptorů dochází k potlačení syntézy kortikosteroidů a následně také glukokortikoidů. To vše se děje díky působení ginkgolidů A a B. Mimo jiné je prokázáno, že *ginkgo biloba* zlepšuje paměť a působí preventivně proti neurodegenerativním poruchám [72].

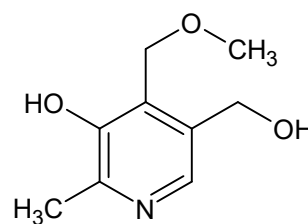
## 6.8 Nežádoucí účinky

### 6.8.1 Ginkgo ořechy

Od pradávna byly plody jinanu (obrázek 18) považovány za jedlé, v Číně a Japonsku věřili, že jsou zdraví prospěšné. V dnešní době je však známo, že nadměrná konzumace těchto plodů může způsobit intoxikaci, projevující se klonickými křečemi a zvracením [2]. Za toxicitou *ginkgo* ořechů stojí neurotoxické látky, 4'-O-methylpyridoxin (obrázek 19) a jeho glykosidy. Tyto látky tzv. *ginkgotoxiny* narušují tvorbu vitamin B6 u savců. Dochází k nerovnováze mezi neurotransmitery, což vede k abnormální dráždivosti neuronů v centrálním nervovém systému, to může vyvolat až epileptický záchvat [73].



Obrázek 18: Jinan dvouločný ořech [74]



4'-O-methylpyridoxin

Obrázek 19: Strukturní vzorec ginkgotoxinu

### 6.8.2 Ginkgo přípravky

V souvislosti s užíváním léčivých přípravků s obsahem jinanového listu, byly u jinak zdravých jedinců popsány nežádoucí účinky jako např. bolest hlavy, závratě, nadměrný tlukot

srdce, nevolnost nebo kožní reakce [75]. Opatrní by měli být zejména lidé, kteří již užívají léky na některé ze svých onemocnění. Výtažky z *ginkgo biloba* totiž interagují s více než 290 léky [64].

Při užívání přípravků z jinanu dvoulaločného zároveň s léky na ředění krve, může dojít k vnitřnímu krvácení a k dalším nežádoucím účinkům, jako je krvácení dásní, změna barvy moči a stolice. Stejně tak v případě užívání EGb a několika dalších rostlinných doplňků, které také ovlivňují srážlivost krve, se zvyšuje pravděpodobnost vnitřního krvácení. Jinan dvoulaločný není vhodné kombinovat s hřebíčkem, ženšenem, kurkumou, paprikou, česnekem a kaštanem koňským [65]. Mimo jiné *ginkgo biloba* může snižovat účinnost některých léků proti úzkosti a proti depresím, a rovněž narušovat účinek přípravků používaných při léčbě cukrovky nebo ke snížení hladiny cholesterolu [75].

## ZÁVĚR

Tato bakalářská práce poskytuje komplexní přehled o jinanu dvoulaločném, od základní charakteristiky rostliny, přes obsažené bioaktivní látky a možnosti jejich stanovení až po účinky na lidský organismus. Jinan obsahuje velké množství sekundárních metabolitů, z nichž jsou nejvíce zastoupeny flavonoidy a terpenoidy.

Moderní analytické metody, jako je vysokotlaká kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie se ukázaly jako zásadní pro přesné stanovení a kontrolu bioaktivních látek v extraktech z *ginkgo biloba*. Kombinace chromatografických a spektrometrických metod poskytuje spolehlivé a přesné výsledky, což je klíčové pro farmaceutický průmysl a další odvětví zabývající se výrobou přírodních doplňků stravy s obsahem bioaktivních látek z jinanu dvoulaločného. Tyto metody umožňují nejen kvantitativní a kvalitativní analýzu, ale také identifikaci případných falzifikátů. Je nezbytná důkladná kontrola kvality a standardizace produktů obsahujících extrakty z jinanu dvoulaločného, aby byla zajištěna jejich účinnost a především bezpečnost.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] PATOČKA, Jiří; STRUNECKÁ, Anna. Ginkgo Biloba L. - Symbol životní síly. In: *Psychiatrie*. 4. vyd. 2001, s. 261–264.
- [2] LIN, Han-Yang; LI, Wen-Hao; LIN, Chen-Feng; WU, Hao-Ran; ZHAO, Yun-Peng. International Biological Flora: Ginkgo biloba. *Journal of Ecology*. 2022, **110**(4), 951-982. ISSN 1365-2745.
- [3] *Jinan dvoulaločný na Plajchu* [online]. 2020.  
Dostupné z: [https://pamatky.benatky.cz/imgcache/571/571x750\\_157299\\_399.jpg](https://pamatky.benatky.cz/imgcache/571/571x750_157299_399.jpg)
- [4] SINGH, Bikram; KAUR, Pushpinder; GOPICHAND, R. D. SINGH; AHUJA, P. S. Biology and chemistry of *Ginkgo biloba*. *Fitoterapia* [online]. 2008, **79**(6), 401–418. ISSN 0367-326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.fitote.2008.05.007
- [5] WELTGESUNDHEITSORGANISATION. WHO monographs on selected medicinal plants. Volume 1. In: . Geneva: World Health Organization, 1999. ISBN 978-92-4-154517-4.
- [6] *Ginkgo biloba* [online]. [vid. 2025-05-10].  
Dostupné z: [https://www.vdberk.cz/media/cache/tree\\_slider/media/Bomen/GIBILOBA/Ginkgo%20biloba-leafs.jpg](https://www.vdberk.cz/media/cache/tree_slider/media/Bomen/GIBILOBA/Ginkgo%20biloba-leafs.jpg)
- [7] *Fruit-of-the-Ginkgo-Biloba-Tree* [online]. [vid. 2025-05-10].  
Dostupné z: <https://gardenerspath.com/wp-content/uploads/2023/05/Fruit-of-the-Ginkgo-Biloba-Tree.jpg>
- [8] WIGHTMAN, Emma L. Potential benefits of phytochemicals against Alzheimer's disease. *Proceedings of the Nutrition Society* [online]. 2017, **76**(2), 106–112. ISSN 0029-6651, 1475-2719. Dostupné z: doi:10.1017/S0029665116002962
- [9] LIU, Lingmei; WANG, Yating; ZHANG, Jucong; WANG, Shufang. Advances in the chemical constituents and chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaf, extract, and phytopharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021, **193**, 113704. ISSN 0731-7085.
- [10] AKABERI, Maryam; BAHARARA, Hamed; AMIRI, Mohammad Sadegh; MOGHADAM, Ali Tafazoli; SAHEBKAR, Amirhossein; EMAMI, Seyed Ahmad. Ginkgo biloba: An updated review on pharmacological, ethnobotanical, and phytochemical studies. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine* [online]. 2023, **9**, 100331. ISSN 26671425. Dostupné z: doi:10.1016/j.prmcm.2023.100331
- [11] DEFOREST, Jacob C.; DU, Lin; JOYNER, P. Matthew. 4',4'',7,7''-Tetra-O-methylcupressuflavone Inhibits Seed Germination of *Lactuca sativa*. *Journal of Natural Products*. 2014, **77**(4), 1093–1096. ISSN 0163-3864.
- [12] DING, Yuan; DING, Zheheng; XU, Jin; LI, Yueying; CHEN, Min. Pharmacological Activities of Ginkgolic Acids in Relation to Autophagy. *Pharmaceuticals* [online]. 2022, **15**(12), 1469. ISSN 1424-8247. Dostupné z: doi:10.3390/ph15121469

- [13] MAHADEVAN, S.; PARK Y. Multifaceted Therapeutic Benefits of Ginkgo biloba L.: Chemistry, Efficacy, Safety, and Uses. *Journal of Food Science*. 2008, **73**(1), R14–R19. ISSN 1750-3841.
- [14] *ginkgo-leaf-summary-public\_cs.pdf* [online]. [vid. 2025-05-11].  
Dostupné z: [https://www.ema.europa.eu/cs/documents/herbal-summary/ginkgo-leaf-summary-public\\_cs.pdf](https://www.ema.europa.eu/cs/documents/herbal-summary/ginkgo-leaf-summary-public_cs.pdf)
- [15] DRIEU, K. Preparation and Definition of Ginkgo Biloba Extract.  
In: E. W. FÜNFGELD, ed. *Rökan* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer, 1988, s. 32–36. ISBN 978-3-642-73686-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-73686-5\_3
- [16] LI, Shanshan; ZHANG, Xinjiang; FANG, Qi; ZHOU, Junshan; ZHANG, Meijuan; WANG, Hui; CHEN, Yan; XU, Biyun; WU, Yanfeng; QIAN, Lai; XU, Yun. Ginkgo biloba extract improved cognitive and neurological functions of acute ischaemic stroke: a randomised controlled trial. *Stroke and Vascular Neurology* [online]. 2017, **2**(4), 189-197. ISSN 2059-8696. Dostupné z: doi:10.1136/svn-2017-000104
- [17] JIRÁK, Roman. *Extrakt z Ginkgo biloba EGb 761 v léčbě organických psychických poruch | Remedia* [online]. [vid. 2025-05-11].  
Dostupné z: <https://www.remédia.cz/rubriky/prehledy-komentare-nazory-diskuse/extrakt-z-ginkgo-biloba-egb-761-v-lecbe-organickyh-psychickyh-poruch-6887/>
- [18] Ginkgo Biloba Extract Market. *MarketResearch.biz* [online]. [vid. 2025-05-11].  
Dostupné z: <https://marketresearch.biz/report/ginkgo-biloba-extract-market/>
- [19] STEVENS, G. W.; LO, Teh C.; BAIRD Malcolm H. I. Extraction, Liquid-Liquid.  
In: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, 2007 [vid. 2025-05-11]. ISBN 978-0-471-23896-6.  
Dostupné z: doi:10.1002/0471238961.120917211215.a01.pub2
- [20] *Exploring Solid-Liquid Extraction Methods* [online]. 2023.  
Dostupné z: <https://nuovaestrazione.com/solid-liquid-extraction/exploring-solid-liquid-extraction-methods/>
- [21] *05\_cviceni\_18.pdf* [online]. [vid. 2025-05-11].  
Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/med/podzim2018/BLLC0111c/um/05\\_cviceni\\_18.pdf?kod=C6120;predmet=669690](https://is.muni.cz/el/med/podzim2018/BLLC0111c/um/05_cviceni_18.pdf?kod=C6120;predmet=669690)
- [22] *Soxhlet extractor* [online]. 2022.  
Dostupné z: [https://www.periodni.com/gallery/soxhlet\\_extractor.png](https://www.periodni.com/gallery/soxhlet_extractor.png)
- [23] AZWANIDA, N. N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants* [online]. 2015, **04**(03) [vid. 2025-05-11]. ISSN 21670412. Dostupné z: doi:10.4172/2167-0412.1000196
- [24] PATEL, Komal; PANCHAL, Namrata; INGLE, Pradnya. Review of Extraction Techniques Extraction Methods: Microwave, Ultrasonic, Pressurized Fluid, Soxhlet Extraction, Etc. *International Journal of Advanced Research in Chemical Science*. 2019, **6**(3) [vid. 2025-05-11]. ISSN 23490403.

- [25] ZHANG, Qing-Wen; LIN, Li-Gen; YE, Wen-Cai. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine* [online]. 2018, **13**(1), 20. ISSN 1749-8546. Dostupné z: doi:10.1186/s13020-018-0177-x
- [26] KAUFMANN, Béatrice; CHRISTEN, Philippe. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis* [online]. 2002, **13**(2), 105–113. ISSN 1099-1565. Dostupné z: doi:10.1002/pca.631
- [27] *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants\_0.pdf* [online]. [vid. 2025-05-11]. Dostupné z: [https://www.unido.org/sites/default/files/2009-10/Extraction\\_technologies\\_for\\_medicinal\\_and\\_aromatic\\_plants\\_0.pdf](https://www.unido.org/sites/default/files/2009-10/Extraction_technologies_for_medicinal_and_aromatic_plants_0.pdf)
- [28] HENNION, Marie-Claire. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1999, **856**(1), 3–54. ISSN 0021-9673.
- [29] *Food Safety and Solid Phase Extraction – An Essential Guide for Switching from a Manual to an Automated Protocol* [online]. [vid. 2025-05-28]. Dostupné z: <https://www.gilson.com/default/learninghub/post/food-safety-and-solid-phase-extraction-an-essential-guide-for-switching-from-a-manual-to-an-automated-protocol.html>
- [30] *Chromatografie\_ucebni\_text.pdf* [online]. [vid. 2025-05-11]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/med/jaro2018/BLIT0222p/um/Chromatografie\\_ucebni\\_text.pdf](https://is.muni.cz/el/med/jaro2018/BLIT0222p/um/Chromatografie_ucebni_text.pdf)
- [31] BEŇOVSKÁ, Miroslava; BREINEK, Petr; BUČKOVÁ, Dana; DASTYCH, Milan; GOTTWALDOVÁ, Jana; MIKUŠKOVÁ, Alena. *Aplikované analytické a instrumentální techniky v laboratorní medicíně* [online]. 2017. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/med/podzim2018/MBKB071p/Aplikovane\\_analyticke\\_a\\_instrumentalni\\_techniky\\_v\\_laboratorni\\_medicine.txt](https://is.muni.cz/el/med/podzim2018/MBKB071p/Aplikovane_analyticke_a_instrumentalni_techniky_v_laboratorni_medicine.txt)
- [32] *HPLC\_spec\_metody.pdf* [online]. [vid. 2025-05-11]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/1431/podzim2013/C8102/um/HPLC\\_spec\\_metody.pdf](https://is.muni.cz/el/1431/podzim2013/C8102/um/HPLC_spec_metody.pdf)
- [33] *chromatografie(4f9a8942587af).pdf* [online]. [vid. 2025-05-11]. Dostupné z: [https://vyuka-data.lf3.cuni.cz/CVSE1M0001/chromatografie\(4f9a8942587af\).pdf](https://vyuka-data.lf3.cuni.cz/CVSE1M0001/chromatografie(4f9a8942587af).pdf)
- [34] *Plynová chromatografie.pdf* [online]. [vid. 2025-05-11]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/1431/jaro2009/C6390/7480488/uvod.pdf>
- [35] ZACHAŘ, P.; SÝKORA, D. PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE [online]. 2019 [vid. 2025-05-11]. Dostupné z: <https://old.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf>
- [36] MCMURRY, John. Určování struktury: hmotnostní spektrometrie a infračervená spektroskopie. In: Jiří SVOBODA, ed. *Organická chemie*. VUT v Brně: Nakladatelství VUTIUM, 2015, Překlady vysokoškolských učebnic, svazek 5, s. 361–386. ISBN 978-80-214-4769-1.
- [37] *Hmotnostní spektrometrie* [online]. Dostupné z: <https://player.slideplayer.cz/13/4188584/data/images/img6.jpg>

- [38] *LCMS\_spec\_metody.pdf* [online]. [vid. 2025-05-11].  
Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/1431/podzim2013/C8102/um/LCMS\\_spec\\_metody.pdf](https://is.muni.cz/el/1431/podzim2013/C8102/um/LCMS_spec_metody.pdf)
- [39] VÁVROVÁ, Jaroslava. *Ionizace nárazem elektronů (elektronová ionizace, EI)* [online].  
Dostupné z: <https://www.nextlab.cz/biolabkt-laboratorni-prirucka/JVATR.htm>
- [40] FUZZATI, N.; PACE R.; VILLA, F. A simple HPLC-UV method for the assay of ginkgolic acids in *Ginkgo biloba* extracts. *Fitoterapia* [online]. 2003, **74**(3), 247–256. ISSN 0367-326X. Dostupné z: doi:10.1016/S0367-326X(03)00040-6
- [41] WANG, Yao; LIU, Yuan; WU, Qi; YAO, Xin; CHENG, Zongqi. Rapid and Sensitive Determination of Major Active Ingredients and Toxic Components in Ginkgo Biloba Leaves Extract (EGb 761) by a Validated UPLC–MS-MS Method. *Journal of Chromatographic Science*. 2017, **55**(4), 459–464. ISSN 0021-9665.
- [42] LIN, Long-Ze; CHEN, Pei; OZCAN, Mustafa; HARNLY, James M. Chromatographic Profiles and Identification of New Phenolic Components of Ginkgo biloba Leaves and Selected Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, **56**(15), 6671–6679. ISSN 0021-8561.
- [43] YANG, Jing; WANG, An-Qi; LI, Xue-jing; FAN, Xue; YIN, Shan-Shan; LAN, Ke. A chemical profiling strategy for semi-quantitative analysis of flavonoids in Ginkgo extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016, **123**, 147-154. ISSN 0731-7085.
- [44] DUMITRU, Dana-Victoria; CÂMPEAN, Ramona; OLAH, Neli-Kinga; CARPA, Rahela. Biological analysis of Ginkgo biloba extract. *ResearchGate* [online]. [vid. 2025-05-11].  
Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/311953507\\_Biological\\_analysis\\_of\\_Ginkgo\\_biloba\\_extract](https://www.researchgate.net/publication/311953507_Biological_analysis_of_Ginkgo_biloba_extract)
- [45] SONG, Wei; GUAN, Han-Jun; ZHU, Xing-Zu; CHEN, Zhong-Liang; YIN, Meng-Long; CHENG, Xiao-Fang. Protective effect of bilobalide against nitric oxide-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2016, **21**(5), 41520–41420. ISSN 1745-7254, 1671-4083.
- [46] DEFEUDIS, Francis V.; PAPADOPOULOS, Vassilios, DRIEU, Katy. Ginkgo biloba extracts and cancer: a research area in its infancy. *Fundamental & Clinical Pharmacology* [online]. 2003, **17**(4), 405–417. ISSN 1472-8206.  
Dostupné z: doi:10.1046/j.1472-8206.2003.00156.x
- [47] SMITH, J. V.; LUO, Y. Studies on molecular mechanisms of Ginkgo biloba extract. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2004, **64**(4), 465–472. ISSN 1432-0614. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-003-1527-9
- [48] ALI, Syed Saqib; AHSAN, Haseeb; ZIA, Mohammad Khalid; SIDDIQUI Tooba; KHAN, Fahim Halim. Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *Journal of Food Biochemistry*. 2020, **44**(3), e13145. ISSN 1745-4514.
- [49] LIU, Xin-Guang; WU, Si-Qi; LI, Ping; YANG, Hua. Advancement in the chemical analysis and quality control of flavonoid in Ginkgo biloba. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015, **113**, 212–225. ISSN 07317085.

- [50] HASLER, Andreas; GROSS, Gian-Andrea; MEIER, Beat; STICHER Otto. Complex flavonol glycosides from the leaves of Ginkgo biloba. *Phytochemistry* [online]. 1992, **31**(4), 1391–1394. ISSN 00319422. Dostupné z: doi:10.1016/0031-9422(92)80298-S
- [51] HASLER, A.; STICHER, O.; MEIER, B. Identification and determination of the flavonoids from Ginkgo biloba by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1992, **605**(1), 41–48. ISSN 00219673.
- [52] JI, Shuai; HE, Dan-dan; WANG, Tian-yun; HAN, Jie; LI, Zheng; DU, Yan; ZOU, Jia-hui; GUO, Meng-zhe; TANG, Dao-quan. Separation and characterization of chemical constituents in Ginkgo biloba extract by off-line hydrophilic interaction × reversed-phase two-dimensional liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017, **146**, 68–78. ISSN 07317085.
- [53] MA, Guang-Lei; WAN, Jiang; Xiong, Juan; Yang, Guo-Xun; HU, Jin-Feng. *Simultaneous Identification of Characteristic Components in HPLC-PDA-ELSD Fingerprint Profile of Ginkgo biloba Leaves Extract* [online]. [vid. 2025-05-29]. Dostupné z: doi:10.1177/1934578X19857902
- [54] LIANG, Tingfu; MIYAKAWA, Takuya; YANG, Jinwei; ISHIKAWA, Tsutomu; TANOKURA, Masaru. Quantification of terpene trilactones in Ginkgo biloba with a 1H NMR method. *Journal of Natural Medicines*. 2018, **72**(3), 793–797. ISSN 1861-0293.
- [55] TAO, Zhu; JIN, Wenwen; AO, Mingzhang; ZHAI, Shengbing; XU, Hang; YU, Longjiang. Evaluation of the anti-inflammatory properties of the active constituents in Ginkgo biloba for the treatment of pulmonary diseases. *Food & Function* [online]. 2019, **10**(4), 2209–2220. Dostupné z: doi:10.1039/C8FO02506A
- [56] YE, Jing; YE, Changqing; HUANG, Yayan; ZHANG, Na; ZHANG, Xueqin; XIAO, Meitian. Ginkgo biloba sarcotesta polysaccharide inhibits inflammatory responses through suppressing both NF-κB and MAPK signaling pathway. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2019, **99**(5), 2329–2339. ISSN 1097-0010.
- [57] ZUO, Wei; YAN, Feng; ZHANG, Bo; LI, Jiantao; MEI, Dan. Advances in the Studies of Ginkgo Biloba Leaves Extract on Aging-Related Diseases. *Aging and Disease* [online]. 2017, **8**(6), 812–826. ISSN 2152-5250. Dostupné z: doi:10.14336/AD.2017.0615
- [58] KORNECKI, Elizabeth; EHRLICH, Yigal H. Calcium ion mobilization in neuronal cells induced by PAF. *Lipids* [online]. 1991, **26**(12), 1243–1246. ISSN 1558-9307. Dostupné z: doi:10.1007/BF02536540
- [59] SINGH, Preeti; SINGH, Ishwari Narayan; MONDAL, Sambhu Charan; SINGH, Lubhan; GARG, Vipin Kumar. Platelet-activating factor (PAF)-antagonists of natural origin. *Fitoterapia* [online]. 2013, **84**, 180–201. ISSN 0367-326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.fitote.2012.11.002
- [60] PIETRI, Sylvia; MAURELLI, Eziana; DRIEU, Katy; CULCASI, Marcel. Cardioprotective and Anti-oxidant Effects of the Terpenoid Constituents

- of Ginkgo biloba Extract (EGb 761). *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1997, **29**(2), 733–742. ISSN 0022-2828, 1095-8584.
- [61] ZIMMERMANN, Martina; COLCIAGHI, Francesca; CATTABENI, Flaminio; DI LUCA, Monica. Ginkgo biloba extract: from molecular mechanisms to the treatment of Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*. 2002, **48**(6), 613–623. ISSN 0145-5680.
- [62] Alzheimerova choroba. *Neuraxpharm CZ* [online]. [vid. 2025-05-11]. Dostupné z: <https://www.neuraxpharm.com/cz/poruchy/alzheimerova-choroba>
- [63] YAO, Zhi-Xing; HAN, Zeqiu; DRIEU, Katy; PAPADOPOULOS, Vassilios. Ginkgo biloba extract (Egb 761) inhibits beta-amyloid production by lowering free cholesterol levels. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2004, **15**(12), 749–756. ISSN 0955-2863.
- [64] LI, Yanping; ZHANG, Ya; WEN, Min; ZHANG, Ju; ZHAO, Xia; ZHAO, Yuan; DENG, Jiagang. Ginkgo biloba extract prevents acute myocardial infarction and suppresses the inflammation- and apoptosis-regulating p38 mitogen-activated protein kinases, nuclear factor- $\kappa$ B and B-cell lymphoma 2 signaling pathways. *Molecular Medicine Reports* [online]. 2017, **16**(3), 3657–3663. ISSN 1791-2997. Dostupné z: doi:10.3892/mmr.2017.6999
- [65] Everything You Need to Know About Ginkgo Biloba. *EverydayHealth.com* [online]. 25. duben 2025 [vid. 2025-05-11]. Dostupné z: <https://www.everydayhealth.com/diet-nutrition/everything-you-need-to-know-about-ginkgo-biloba/>
- [66] RADUNZ, Camila L.; OKUYAMA, Cristina E.; BRANCO-BARREIRO, Fátima C. A.; PEREIRA, Regina M. S.; DINIZ, Susana N. Clinical randomized trial study of hearing aids effectiveness in association with *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) on tinnitus improvement. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. 2020, **86**(6), 734–742. ISSN 1808-8694.
- [67] MEYER, B. [Multicenter randomized double-blind drug vs. placebo study of the treatment of tinnitus with Ginkgo biloba extract]. *Presse Medicale (Paris, France:1983)*. 1986, **15**(31), 1562–1564. ISSN 0755-4982.
- [68] ERNST, E.; STEVINSON, C. Ginkgo biloba for tinnitus: a review. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences* [online]. 1999, **24**(3), 164–167. ISSN 1365-2273. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2273.1999.00243.x
- [69] KRAMER, Felipe; ORTIGOZA, Ángela. Ginkgo biloba for the treatment of tinnitus. *Medwave* [online]. 2018, **18**(06) [vid. 2025-05-29]. ISSN 0717-6384. Dostupné z: doi:10.5867/medwave.2018.06.7294
- [70] BARTH, Stephan W.; LEHNER, Martin D.; DIETZ, Gunnar P. H.; SCHULZE, Holger. Pharmacologic treatments in preclinical tinnitus models with special focus on *Ginkgo biloba* leaf extract EGb 761®. *Molecular and Cellular Neuroscience* [online]. 2021, **116**, 103669. ISSN 1044-7431. Dostupné z: doi:10.1016/j.mcn.2021.103669

- [71] WALESIUŁ, Anna; TROFIMIUK, Emil; BRASZKO, Jan J. Ginkgo biloba extract diminishes stress-induced memory deficits in rats. *Pharmacological reports: PR.* 2005, **57**(2), 176–187. ISSN 1734-1140.
- [72] AMRI, H.; OGWUEGBU, S. O.; BOUJRAD, N.; DRIEU, K.; PAPADOPOULOS, V. In vivo regulation of peripheral-type benzodiazepine receptor and glucocorticoid synthesis by Ginkgo biloba extract EGb 761 and isolated ginkgolides. *Endocrinology* [online]. 1996, **137**(12), 5707–5718. ISSN 0013-7227.  
Dostupné z: doi:10.1210/endo.137.12.8940403
- [73] KÄSTNER, Uta; HALLMEN, Christian; WIESE, Michael; LEISTNER, Eckhard; DREWKE, Christel. The human pyridoxal kinase, a plausible target for ginkgotoxin from Ginkgo biloba. *The FEBS Journal* [online]. 2007, **274**(4), 1036–1045. ISSN 1742-4658.
- [74] *Ginkgo, Ginkgo Seeds (Ginkgo biloba)* [online]. Dostupné z: <https://www.seeds-gallery.eu/cs/home/maidenhair-tree-seeds-ginkgo-biloba.html>
- [75] Ginkgo. *Mayo Clinic* [online]. [vid. 2025-05-11].  
Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/drugs-supplements-ginkgo/art-20362032>