

**Verfahren zur Herstellung von Ginkgoextrakten mit hohem Gehalt an
Proanthocyanidinen und Nahrungsergänzungsmittel und Arzneimittel
enthaltend Ginkgoextrakte**

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein verbessertes vielstufiges Verfahren zur Herstellung eines Extrakts aus Blättern von Ginkgo biloba sowie dessen Verwendung als Arzneimittel oder Nahrungsergänzungsmittel.

Extrakte aus den Blättern von Ginkgo biloba werden seit Jahrzehnten als Arzneimittel verwendet. Die Arzneimittel werden derzeit zur Behandlung verschiedener Arten von Demenz und deren Symptome sowie von cerebralen und peripheren Durchblutungsstörungen verwendet. Inhaltsstoffe, mit denen die Wirksamkeit verknüpft ist, sind Terpenlaktone (Ginkgolide A, B, C und Bilobalid) sowie Glycoside von Flavonon (Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin).

Für Ginkgo biloba relevante Extraktionsverfahren sind in der EP 431536 B1 und in der EP 360556 B1 beschrieben.

Gemäß Anspruch 1 der EP 431536 B1 / DE 3940092 A1 ist das darin beanspruchte Verfahren zur Herstellung eines Extraktes aus Ginkgo biloba-Blättern dadurch gekennzeichnet, dass man

- (a) frische oder getrocknete grüne Blätter von Ginkgo biloba mit wasserhaltigem Aceton, einem wasserhaltigen Alkanol mit 1 bis 3 C-Atomen oder wasserfreiem Methanol bei einer Temperatur von etwa 40 bis 100°C extrahiert,
- (b) aus dem Extrakt die Hauptmenge des organischen Lösungsmittels auf einen Gehalt von höchstens 10 Gew.-% abtrennt, wobei bei den letzten Destillationsstufen gegebenenfalls Wasser zugesetzt wird,

- (c) die verbleibende konzentrierte wässrige Lösung mit Wasser auf einen Feststoffgehalt von 5 bis 25 Gew.-% verdünnt, unter Rühren auf eine Temperatur unter 25°C abkühlt, bis zur Bildung eines Niederschlages stehen lässt und den entstandenen Niederschlag, bestehend aus den in Wasser schwer löslichen lipophilen Bestandteilen, abtrennt,
- (d) die verbleibende wässrige Lösung mit Ammoniumsulfat versetzt und die entstandene Lösung mit Methylethylketon oder einem Gemisch aus Methylethylketon und Aceton extrahiert,
- (e) den erhaltenen Extrakt auf einen Feststoffgehalt von 50 bis 70 % konzentriert und das erhaltene Konzentrat mit Wasser auf einen Feststoffgehalt von 5 bis 20 % verdünnt,
- (f) die so erhaltene Lösung mehrstufig mit einem mit Wasser nicht mischbaren Butanol oder Pentanol extrahiert,
- (g) die Butanol- bzw. Pentanolphasen auf einen Feststoffgehalt von 50 bis 70 % konzentriert,
- (h) das Konzentrat durch Zugabe derartiger Mengen von Wasser und Ethanol verdünnt, dass eine Lösung von 5 bis 20 Gew.-% Trockenextrakt in 20 bis 60 Gew.-% wässrigem Ethanol erhalten wird,
- (i) die wässrig-alkoholische Lösung mit einem aliphatischen oder cycloaliphatischen Lösungsmittel mit einem Siedepunkt von 60 bis 100°C zur weiteren Abtrennung der Alkylphenol-Verbindungen extrahiert,
- (j) die Wasserphase unter vermindertem Druck konzentriert und bei einer Temperatur von höchstens 60 bis 80°C zu einem Trockenextrakt mit einem Wassergehalt von weniger als 5 % trocknet.

Blätter von *Ginkgo biloba* enthalten außer den erwähnten Verbindungen auch die sogenannten Ginkgolsäuren (Anacardsäuren). Bei diesen Verbindungen handelt es sich um 6-Alkylsalicylsäuren mit n-C13- bis n-C19-Alkylresten mit 0 bis 3 Doppelbindungen; vgl. J.L. Gellermann et al., *Phytochemistry*, Bd. 15 (1976), 1959-1961 und *Analytic. Chem.* Bd. 40 (1968), 739-743.

Durch Decarboxylierung der Ginkgolsäuren kann biogenetisch oder auch bei der technischen Bearbeitung der Ginkgo biloba-Blätter das "Ginkgol" entstehen, ein mit dem entsprechenden Alkylrest substituiertes Phenol; vgl. Kawamura, Japan. J. Chem. Bd. 3 (1928), 91-93.

Die Ginkgolsäuren und Ginkgole in Ginkgo biloba sind begleitet von entsprechenden Derivaten mit einer weiteren phenolischen Hydroxylgruppe in 4-Stellung, den 6-Alkylresorcinsäuren bzw. 5-Alkylresorcinen; vgl. J. Gellermann et al., Phytochemistry, Bd. 15 (1976), 1959-1961. Diese Resorcin-Derivate sind verantwortlich für die toxischen Effekte und besonders die starken Allergien und Kontaktdermatitiden, die von Pflanzen der Gattung Toxicodendron hervorgerufen werden; vgl. G. A. Hill et al., J. Am. Chem. Soc., Bd. 56 (1934), 2736-2738.

Die Bedeutung der durch Alkylphenol-Verbindungen aus Anacardiaceen und Ginkgoaceen hervorgerufenen Allergien wird erkennbar durch die in der Patentliteratur (vgl. US 44 28 965) beschriebene Entwicklung von Substanzen und Methoden zur Desensibilisierung gegen die durch Alkylphenol-Verbindungen hervorgerufenen Allergien.

Handelsübliche Extrakte aus Blättern von Ginkgo biloba enthalten auch zwischen 50 und 10 000 ppm Ginkgolsäuren.

Die nach den aus der DE 17 67 098 und DE 21 17 429 bekannten Verfahren hergestellten Extrakte aus Blättern von Ginkgo biloba sind praktisch frei von Alkylphenol-Verbindungen, weil die lipophilen Extraktbestandteile durch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion des wasserhaltigen Acetonextraktes mit einem lipophilen, mit Wasser praktisch nicht mischbaren Lösungsmittel, z. B. einem chlorierten niederen aliphatischen Kohlenwasserstoff wie Tetrachlorkohlenstoff entfernt werden. Allerdings werden bei der Verfahrensstufe auch die therapeutisch wertvollen Ginkgolide und das Bilobalid stark vermindert, so dass deren Gehalt im Endprodukt nach Beispiel 1 der DE 21 17 429 bei maximal 0,5% für die Summe der Ginkgolide, A, B, C und J und etwa 0,3% für das Bilobalid liegt. Die Summe der Flavonglykoside wurde nach diesem Verfahren dagegen stark angereichert, nämlich von 3 bis 4% im Rohextrakt auf etwa 24% im Endprodukt.

Der Einsatz von gesundheitsgefährdenden Stoffen ist naturgemäß unerwünscht, um Arzneimittel oder Nahrungsergänzungsmittel, basierend auf Extrakten, bereitzustellen.

Die DE 39 40 092 A1 beschreibt beispielsweise ein entsprechendes Verfahren, bei dem bei der Entfernung der unerwünschten Polyphenol-Verbindungen mit Gerbstoffcharakter (Proanthocyanidine) keine Bleiverbindungen verwendet werden. Verbindungen des Bleis sind wegen des Gesundheitsrisikos der damit arbeitenden Personen höchst unerwünscht und verursachen darüber hinaus erhebliche Kosten bei ihrer ordnungsgemäßen Beseitigung.

In den letzten Jahren sind vermehrt auch Lebensmittel mit Ginkgo-Extrakten auf dem Markt gekommen. Unter Lebensmitteln sind hierbei insbesondere diätetische Lebensmittel, Nahrungsergänzungsmittel sowie „medical food“ und „dietary supplements“ zu verstehen.

In den Industrieländern werden seit Jahrzehnten im großen Maßstab Nahrungsmittel industriell gefertigt, die von einem großen Teil der Bevölkerung tagtäglich konsumiert werden. Es ist seit langem bekannt, dass infolge der industriellen Fertigung und der damit einhergehenden technischen Verfahrensweisen wie z. B. Pasteurisieren, Homogenisieren, mechanischer Zerkleinerung, Separieren, Erhitzen oder Extraktion den Nahrungsmitteln ein erheblicher Teil ihrer Grundbestandteile entzogen wird. Dies betrifft vor allem Vitamine in den Grundnahrungsmitteln, die durch den technischen Prozess, z. B. infolge Erhitzens oder anderer Methoden, teilweise zerstört bzw. unwirksam werden. Dabei sind die diversen Vitamine (Vitamine B, C, D, A etc.) für einen störungsfreien Stoffwechsel essentiell wichtig.

Ein wesentliches Problem der heutigen Nahrungsmittel sind ferner die diversen Zusätze wie Konservierungsmittel z. B. in Form der Benzoesäure, Antioxidationsmittel, künstliche Aromastoffe, Zucker oder Enzyme. Viele dieser Zusatzstoffe in Verbindung mit der technischen Verarbeitung der Nahrungsmittel stehen im Verdacht, u. a. für den enormen Anstieg von Allergien in den letzten Jahrzehnten verantwortlich zu sein.

Aus den oben aufgeführten Gründen werden seit Jahren Nahrungsergänzungsmittel angeboten, die helfen sollen, die heutigen Ernährungsweisen, die zum größten Teil

auf industriell gefertigten Nahrungsmitteln basieren, zu ergänzen und deren Mängel in Bezug auf essentielle Nahrungsmittelbestandteile zu verbessern.

Viele der heute auf dem Markt angebotenen Nahrungsergänzungsmittel enthalten jedoch auch Additive bzw. Füllstoffe in Form von Milchpulver, Maltodextrin, Stärke, Gelatine, Weizengrieß, Molkepulver, Fruchtzucker, Glycerin oder Sorbit. Weitere Additive betreffen Antioxidationsmittel; des Weiteren werden Kalziumphosphat sowie Aromastoffe (meistenteils in Form von Fruchtaromen), künstliche Farbstoffe oder Zitrone beigemischt. Die Zusammensetzungen der verschiedenen Präparate schwanken, sofern es sich um Vitaminpräparate in Tabletten- oder Pulverform handelt, nur recht unwesentlich.

Bei diesen aus dem Stand der Technik bekannten Mitteln handelt es sich durchweg um Mischungen aus verschiedenen Vitaminen, Aminosäuren, Mineralien und/oder Proteinen. Den meisten dieser Präparationen ist gemeinsam, dass es sich um künstliche Zusammensetzungen handelt, die sich unspezifisch gegen mögliche Mangelzustände wie Vitamin- oder Mineralmangel richten oder eine unspezifische Verbesserung des Allgemeinbefindens hervorrufen.

Zudem sind Körperzellen tagtäglichen Angriffen von freien Radikalen – das sind aggressive bzw. hochreaktive Stoffe mit freien Elektronen, die im Zuge von Stoffwechselvorgängen oder infolge der natürlichen UV- oder radioaktiven Strahlung entstehen – ausgesetzt. Diese Radikale sind in der Lage, sofern die körperlichen Reparaturmechanismen nicht mehr voll funktionsfähig sind, ungewollte Reaktionen mit der Erbsubstanz oder essentiellen Proteinen auszulösen bzw. diese nachhaltig zu schädigen und dadurch zur Ausbildung von Tumoren beizutragen. Dieser Prozess lässt sich durch Gaben sogenannter Antioxidanzien verhindern oder minimieren. Zu den effektivsten Antioxidanzien für die Zellen zählen bestimmte Vitamine wie z. B. Vitamin C, Vitamin E, Vitamin A sowie verschiedene B-Vitamine, des Weiteren das Spurenelement Selen und einige Phytoflavone.

In der Literatur (Qu`dan et al. 2011, He et al. 2016, Cao et al. 2016, Xie et al., 2014, Yao et al. 2020) werden die antioxidativen und neuroprotektiven Eigenschaften von Proanthocyanidinen aus Ginkgoblättern und verschiedenen anderen Quellen beschrieben.

Referenzen:

- Fadi Qa'dan, Kenza Mansoor, Ibraheem AL-Adham, Mathias Schmidt & Adolf Nahrstedt (2011) Proanthocyanidins from Ginkgo biloba leaf extract and their radical scavenging activity, *Pharmaceutical Biology*, 49:5, 471-476, <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.523831>
- Q. He, S.-Y. Yang, W. Wang, Z.-J. Wu, H.-L. Ma, Y. Lu; Proanthocyanidins affects the neurotoxicity of A β 25-35 on C57/bl6 mice; *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci* 20 (2016): 679-684
- Wang-li Cao, Hai-bo Huang, Ling Fang, Jiang-ning Hu, Zhu-ming Jin, Ru-wei Wang; Protective effect of ginkgo proanthocyanidins against cerebral ischemia/reperfusion injury associated with its antioxidant effects; *Neural Regeneration Research*. 2016;11(11):1779-1783, <https://doi.org/10.4103/1673-5374.194722>
- Xie, H.; Wang, J.-R.; Yau, L.-F.; Liu, Y.; Liu, L.; Han, Q.-B.; Zhao, Z.; Jiang, Z.-H. Catechins and Procyanidins of Ginkgo biloba Show Potent Activities towards the Inhibition of β -Amyloid Peptide Aggregation and Destabilization of Preformed Fibrils. *Molecules* 2014, 19, 5119-5134. <https://doi.org/10.3390/molecules19045119>
- Jianbiao Yao, Hongxiang Qiao, Zhuming Jin, RuweiWang, Haibo Huang, Ling Fang, Yan Chen, Khalid Tai, Yan Chen, Thorsten Roland Doeppner, Zhong Chen, Kenny Kuchta; Ginkgo biloba and Its Constituent 6-hydroxykynurenic-acid as well as Its Proanthocyanidins Exert Neurorestorative Effects against Cerebral Ischemia; *Planta Med* 2020; 86(10): 696-707; <https://doi.org/10.1055/a-1146-2861>

Ein kombiniertes Wirkspektrum, das sowohl Mangelzustände, das Allgemeinbefinden, die Gesundheit sowie auch Krankheiten positiv beeinflussen kann, ist daher wünschenswert.

Daher ist ein erhöhter Gehalt an Proanthocyanidinen in Extrakten aus Blättern von Ginkgo biloba wünschenswert, um die tagtäglichen Angriffe von freien Radikalen zu mindern.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren zu entwickeln, bei dem ein Ginkgo biloba-Extrakt erhalten wird, der einen erhöhten Gehalt an

Proanthocyanidinen enthält und zur Verwendung als Arzneimittel, Nahrungsergänzungsmittel oder als Lebensmittel geeignet ist. Vorzugsweise entspricht der Extrakt allen Anforderungen des Pharm. Eur. und weist vorzugsweise einen hohen Gehalt an Proanthocyanidinen auf.

Die Aufgabe wird daher gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung eines Extraktes, vorzugsweise eines Trockenextraktes, aus Ginkgo biloba-Blättern umfassend die folgenden Schritte:

- (a) Extraktion frischer oder getrockneter Blätter von Ginkgo biloba mit wasserhaltigem Aceton, einem wasserhaltigen Alkanol mit 1 bis 3 C-Atomen oder wasserfreiem Methanol bei einer Temperatur von 40 bis 100°C, um eine Rohextraktlösung zu erhalten,
- (b) Abtrennen durch Destillation des Acetons, Alkanols mit 1 bis 3 C-Atomen oder wasserfreien Methanols aus der Rohextraktlösung aus Schritt (a) auf einen Gehalt von höchstens 10 Gew.-% von diesem, bezogen auf das Gesamtgewicht der Rohextraktlösung, um eine konzentrierte wässrige Lösung zu erhalten, wobei im Fall der Verwendung von wasserfreiem Methanol in Schritt (a) am Ende der Destillation ein- oder mehrfach Wasser zugesetzt wird,
- (c) Verdünnen der konzentrierten wässrigen Lösung aus Schritt (b) mit Wasser auf einen Feststoffgehalt von 10 bis 30 Gew.-%, vorzugsweise 15 bis 25 Gew.-%, Abkühlen auf eine Temperatur unter 25°C, Kühlhalten bis zur Bildung eines Niederschlags und Abtrennen des entstandenen Niederschlags, um wiederum eine wässrige Lösung zu erhalten,
- (d) Versetzen der erhaltenen wässrigen Lösung aus Schritt (c) mit Ammoniumsulfat und Extraktion der entstandenen Ammoniumsulfat-enthaltenden Lösung mit Methylethylketon / Aceton im Verhältnis von 3/2 bis 1/1 (m/m) und Trennung der wässrigen Phase von der Methylethylketon-Aceton-Phase, um eine Methylethylketon-Aceton-Phase zu erhalten,

wobei der Extrakt nach Schritt (d) nach Trocknen zum Trockenextrakt einen Gehalt an 2,0 Gew.-% bis 5,0 Gew.-% Bilobalid, 1,5 Gew.-% bis 5,0 Gew.-% Ginkgolide A, B und C sowie 25 – 40 Gew.-%, vorzugsweise 30 – 40 Gew.-%, Proanthocyanidine aufweist.

Die Abkürzung (m/m) steht vorteilhafterweise für die jeweiligen Massen, d.h. beispielsweise 3g Methylethylketon zu 2g Aceton.

Vorzugsweise wird die Extraktion in Schritt (a) mit wasserhaltigem Aceton, einem wasserhaltigen Alkanol mit 1 bis 3 C-Atomen oder wasserfreiem Methanol in einem Verhältnis von 5 – 12 (Volumen Extraktionsmittel in Liter) zu 1 (Masse Blätter von Ginkgo biloba in kg) durchgeführt. Das Verhältnis von Extraktionsmittel/Droge (Volumen in Liter/Masse in kg) ergibt sich dadurch, dass im Allgemeinen die Droge (Blätter von Ginkgo biloba) gewogen und das Lösungsmittel für die Extraktion in L (über einen Volumenmesser) zugesetzt wird. Bevorzugt kann die Extraktion mehrmals hintereinander wiederholt werden.

Vorzugsweise umfasst das erfindungsgemäße Verfahren die weiteren Schritte

- (e) Einengen der Methylethylketon-Aceton-Phase aus Schritt (d) bis zu einem Trockenextraktanteil von 40 bis 80 Gew.-%, um ein Konzentrat zu erhalten,
- (f) gegebenenfalls Verdünnen des erhaltenen Konzentrats aus Schritt (e) mit Wasser auf einen Feststoffgehalt von 25 – 50 Gew.-%, um eine Lösung zu erhalten, (falls das Konzentrat aus Schritt (e) einen Trockenextraktanteil von 40 – 50 Gew.-% aufweist, d.h. einen Feststoffgehalt im Bereich von 25 – 50 Gew.-%, kann das Konzentrat aus Schritt (e) direkt in Schritt (g) eingesetzt werden).
- (g) mindestens einstufige Extraktion der in Schritt (f) erhaltenen Lösung mit einem mit Wasser nicht mischbaren Butanol oder Pentanol, um eine Butanol- oder Pentanolphase zu erhalten,
- (h) Konzentration der Butanol- oder Pentanolphase aus Schritt (g) auf einen Feststoffgehalt von mindestens 50 Gew.-%, um ein Konzentrat zu erhalten,

- (i) Verdünnen des in Schritt (h) erhaltenen Konzentrats durch Zugabe derartiger Mengen von Wasser und gegebenenfalls Ethanol, dass eine Lösung von 5 bis 20 Gew.-% Trockenextrakt in Wasser oder höchstens 60 Gew.-% wässrigem Ethanol (gleichbedeutend mit „wasserhaltigem Ethanol mit einem Ethanolgehalt von 60 Gew.-%“) erhalten wird,
- (j) Extraktion der wässrigen oder wässrig-ethanolischen Lösung aus Schritt (i) mit einem aliphatischen Lösungsmittel mit einem Siedepunkt von 60 bis 100°C, und Trennung der wässrigen Phase von der aliphatischen Lösungsmittel-Phase, um eine wässrige Phase zu erhalten,
- (k) Konzentration der in Schritt (j) erhaltenen wässrigen Phase unter vermindertem Druck und bei einer Temperatur von höchstens 60 bis 80°C, um einen Trockenextrakt mit einem Wassergehalt von weniger als 5 Gew.-% zu erhalten.

Vorzugsweise liegt im Schritt (d) im Verfahren das Volumen des eingesetzten Methylethylketon/Aceton im Bereich von dem 0,3- bis zu dem 1,8-fachen Volumen der wässrigen Lösung. Bevorzugter liegt im Schritt (d) im Verfahren das Volumen des eingesetzten Methylethylketon/Aceton im Bereich von dem 0,6- bis zu dem 1,8-fachen Volumen der wässrigen Lösung, noch bevorzugter im Bereich von dem 0,8- bis zu dem 1,5-fachen Volumen der wässrigen Lösung.

Besonders bevorzugt liegt im Schritt (d) im Verfahren das Volumen des eingesetzten Methylethylketon/Aceton im Bereich des 0,3- bis 0,4-; 0,4- bis 0,5-; 0,5- bis 0,6-; 0,6- bis 0,7-; 0,7- bis 0,8-; 0,8- bis 0,9-; 0,9- bis 1,0-; 1,0- bis 1,1-; 1,1- bis 1,2-; 1,2- bis 1,3-; 1,3- bis 1,4-; 1,4- bis 1,5-; 1,5- bis 1,6- bzw. 1,6- bis 1,7-fachen Volumens der Wasserphase (wässrigen Lösung).

Vorzugsweise weist der Extrakt nach Schritt (d) einen Gehalt an 10,0 Gew.-% bis 27,0 Gew.-% Flavonoiden, berechnet als Flavonglycoside, 2,0 Gew.-% bis 5,0 Gew.-% Bilobalid, 1,5 Gew.-% bis 5,0 Gew.-% Ginkgolide A, B und C und 30 – 40 Gew.-% Proanthocyanidine auf. Hierbei beziehen sich die Prozentangaben auf den Trockenextrakt.

Vorzugsweise weist der Extrakt nach Schritt (d) einen Gehalt an 10,0 Gew.-% bis 27,0 Gew.-% Flavonoiden, berechnet als Flavonglycoside, 2,1 Gew.-% bis 5,0 Gew.-% Bilobalid, 2,1 Gew.-% bis 5,0 Gew.-% Ginkgolide A, B und C und 30 – 40 Gew.-% Proanthocyanidine auf. Hierbei beziehen sich die Prozentangaben auf den Trockenextrakt.

Vorzugsweise weist der Extrakt nach Schritt (d) einen Gehalt an 10,0 Gew.-% bis 27,0 Gew.-% Flavonoiden, berechnet als Flavonglycoside, 2,1 Gew.-% bis 3,6 Gew.-% Bilobalid, 2,1 Gew.-% bis 3,8 Gew.-% Ginkgolide A, B und C und 30 – 40 Gew.-% Proanthocyanidine auf. Hierbei beziehen sich die Prozentangaben auf den Trockenextrakt.

Vorzugsweise weist der Extrakt nach Schritt (d) einen Gehalt an 10,0 Gew.-% bis 27,0 Gew.-% Flavonoiden, berechnet als Flavonglycoside, 2,1 Gew.-% bis 3,2 Gew.-% Bilobalid (besonders bevorzugt 2,6 Gew.-% bis 3,2 Gew.-% Bilobalid), 2,1 Gew.-% bis 3,4 Gew.-% Ginkgolide A, B und C (besonders bevorzugt 2,8 Gew.-% bis 3,4 Gew.-% Ginkgolide A, B und C) und 30 – 40 Gew.-% Proanthocyanidine auf. Hierbei beziehen sich die Prozentangaben auf den Trockenextrakt.

Vorzugsweise weist der Extrakt nach Schritt (g) einen Gehalt an 20,0 Gew.-% bis 27,0 Gew.-% Flavonoiden, berechnet als Flavonglycoside, 2,6 Gew.-% bis 5,0 Gew.-% Bilobalid (vorzugsweise 2,6 Gew.-% bis 3,6 Gew.-% Bilobalid), 3,0 Gew.-% bis 5,0 Gew.-% Ginkgolide A, B und C (vorzugsweise 3,0 Gew.-% bis 3,8 Gew.-% Ginkgolide A, B und C) und 5,5 – 25 Gew.-%, bevorzugt 5,5 – 20 Gew.-%, bevorzugter 5,5 – 18 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt 7 – 14 Gew.-%, Proanthocyanidine, auf. Hierbei beziehen sich die Prozentangaben auf den Trockenextrakt.

Vorzugsweise weist der Extrakt nach Schritt (g) einen Gehalt an 20,0 Gew.-% bis 27,0 Gew.-% Flavonoiden, berechnet als Flavonglycoside, 2,6 Gew.-% bis 3,2 Gew.-% Bilobalid, 2,8 Gew.-% bis 3,4 Gew.-% Ginkgolide A, B und C und 5,5 – 18 Gew.-%, bevorzugt 7 – 14 Gew.-%, Proanthocyanidine, auf. Hierbei beziehen sich die Prozentangaben auf den Trockenextrakt.

Vorzugsweise weist der Extrakt nach Schritt (k) oder (j) einen Gehalt an 21,0 Gew.-% bis 27,0 Gew.-% Flavonoiden, berechnet als Flavonglycoside, 2,6 Gew.-% bis 5,0

Gew.-% Bilobalid, 2,8 Gew.-% bis 5,0 Gew.-% Ginkgolide A, B und C sowie höchstens 5 ppm Ginkgolsäuren und 5,5 – 25 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt 6,5 – 20 Gew.-%, Proanthocyanidine auf. Hierbei beziehen sich die Prozentangaben auf den Trockenextrakt.

Vorzugsweise weist der Extrakt nach Schritt (k) oder (j) einen Gehalt an 21,0 Gew.-% bis 27,0 Gew.-% Flavonoiden, berechnet als Flavonglycoside, 2,6 Gew.-% bis 3,6 Gew.-% Bilobalid (vorzugsweise 2,6 Gew.-% bis 3,2 Gew.-% Bilobalid), 2,8 Gew.-% bis 3,6 Gew.-% Ginkgolide A, B und C (vorzugsweise 2,8 Gew.-% bis 3,4 Gew.-% Ginkgolide A, B und C) sowie höchstens 5 ppm Ginkgolsäuren und 6,5 – 20 Gew.-%, Proanthocyanidine auf. Hierbei beziehen sich die Prozentangaben auf den Trockenextrakt.

Bevorzugt weist der Extrakt nach Schritt (k) oder (j) einen Gehalt von Proanthocyanidinen von 7,0 bis 8,0; 8,0 bis 9,0; 9,0 bis 10,0; 10,0 bis 11,0; 11,0 bis 12,0; 12,0 bis 13,0; 13,0 bis 14,0; 14,0 bis 15,0; 15,0 bis 16,0; 16,0 bis 17,0; 17,0 bis 18,0 oder 18,0 bis 19,0 Gew.-% auf. Besonders bevorzugt weist der Extrakt nach Schritt (k) oder (j) einen Gehalt von Proanthocyanidinen von 7,0 bis 10 Gew.-% auf. Hierbei beziehen sich die Prozentangaben auf den Trockenextrakt.

Vorzugsweise umfasst das erfindungsgemäße Verfahren die weiteren Schritte

- (e1) Konzentration der Methylethylketon-Aceton-Phase aus Schritt (d) auf einen Feststoffgehalt von mindestens 40 Gew.-%, vorzugsweise 45 bis 95 Gew.-%, um ein Konzentrat zu erhalten,
- (f1) Verdünnen des in Schritt (e1) erhaltenen Konzentrats durch Zugabe derartiger Mengen von Wasser und gegebenenfalls Ethanol, dass eine Lösung von 5 bis 20 Gew.-% Trockenextrakt in Wasser oder höchstens 60 Gew.-% wässrigem Ethanol erhalten wird,
- (g1) Extraktion der wässrigen oder wässrig-ethanolischen Lösung aus Schritt (f1) mit einem aliphatischen Lösungsmittel mit einem Siedepunkt von 60 bis 100°C und Trennung der wässrigen Phase von der aliphatischen Lösungsmittel-Phase, um eine wässrige Phase zu erhalten,

- (h1) Konzentration der in Schritt (g1) erhaltenen wässrigen Phase unter vermindertem Druck und bei einer Temperatur von höchstens 60 bis 80°C, um einen Trockenextrakt mit einem Wassergehalt von weniger als 5 Gew.-% zu erhalten,

wobei der Trockenextrakt nach Schritt (h1) einen Gehalt an 2,0 Gew.-% bis 5,0 Gew.-% Bilobalid (vorzugsweise 2,0 Gew.-% bis 3,6 Gew.-%, bevorzugter 2,6 Gew.-% bis 3,6 Gew.-%, besonders bevorzugt 2,6 Gew.-% bis 3,2 Gew.-% Bilobalid), 2,0 Gew.-% bis 5,0 Gew.-% Ginkgolide A, B und C (vorzugsweise 2,0 Gew.-% bis 3,6 Gew.-%, bevorzugter 2,8 Gew.-% bis 3,6 Gew.-%, besonders bevorzugt 2,8 Gew.-% bis 3,4 Gew.-% Ginkgolide A, B und C) sowie höchstens 5 ppm Ginkgolsäuren und 25 – 40 Gew.-%, vorzugsweise 30 – 40 Gew.-%, Proanthocyanidine aufweist. Der Gehalt an Flavonoiden, berechnet als Flavonglycoside, beträgt vorzugsweise 21,0 Gew.-% bis 27,0 Gew.-%, besonders bevorzugt 22,0 Gew.-% bis 27,0 Gew.-%.

Die Schritte (e1) bis (h1) sind als alternative Verfahrensschritte zu den Schritten (e) bis (k) zu verstehen.

Ganz besonders bevorzugt ist ein Verfahren zur Herstellung eines Extraktes, vorzugsweise eines Trockenextraktes, aus Ginkgo biloba-Blättern umfassend die folgenden Schritte:

- (a) Extraktion frischer oder getrockneter Blätter von Ginkgo biloba mit wasserhaltigem Aceton, einem wasserhaltigen Alkanol mit 1 bis 3 C-Atomen oder wasserfreiem Methanol bei einer Temperatur von 40 bis 100°C, um eine Rohextraktlösung zu erhalten,
- (b) Abtrennen durch Destillation des Acetons, Alkanols mit 1 bis 3 C-Atomen oder wasserfreien Methanols aus der Rohextraktlösung aus Schritt (a) auf einen Gehalt von höchstens 10 Gew.-% von diesem, bezogen auf das Gesamtgewicht der Rohextraktlösung, um eine konzentrierte wässrige Lösung zu erhalten, wobei im Fall der Verwendung von wasserfreiem Methanol in Schritt (a) am Ende der Destillation ein- oder mehrfach Wasser zugesetzt wird,
- (c) Verdünnen der konzentrierten wässrigen Lösung aus Schritt (b) mit Wasser auf einen Feststoffgehalt von 10 bis 30 Gew.-%, vorzugsweise 15 bis 25

Gew.-%, Abkühlen auf eine Temperatur unter 25°C, Kühlhalten bis zur Bildung eines Niederschlags und Abtrennen des entstandenen Niederschlags, um wiederum eine wässrige Lösung zu erhalten,

- (d) Versetzen der erhaltenen wässrigen Lösung aus Schritt (c) mit Ammoniumsulfat und Extraktion der entstandenen Ammoniumsulfat-enthaltenden Lösung mit Methylethylketon / Aceton im Verhältnis von 3/2 bis 1/1 (m/m) und Trennung der wässrigen Phase von der Methylethylketon-Aceton-Phase, um eine Methylethylketon-Aceton-Phase zu erhalten,

wobei der Extrakt vorzugsweise nach Schritt (d) einen Gehalt an 10,0 Gew.-% bis 27,0 Gew.-% Flavonoiden, berechnet als Flavonglycoside, 2,0 Gew.-% bis 5,0 Gew.-% Bilobalid, 1,5 Gew.-% bis 5,0 Gew.-% Ginkgolide A, B und C, 30 – 40 Gew.-% Proanthocyanidine aufweist und sich die Prozentangaben auf den Trockenextrakt beziehen,

- e) Einengen der Methylethylketon-Aceton-Phase aus Schritt (d) bis zu einem Trockenextraktanteil von 40 bis 80 Gew.-%, um ein Konzentrat zu erhalten,
- (f) gegebenenfalls Verdünnen des erhaltenen Konzentrats aus Schritt (e) mit Wasser auf einen Feststoffgehalt von 25 – 50 Gew.-%, um eine Lösung zu erhalten,
- (g) mindestens einstufige Extraktion der in Schritt (f) erhaltenen Lösung mit einem mit Wasser nicht mischbaren Butanol oder Pentanol, um eine Butanol- oder Pentanolphase zu erhalten, wobei vorzugsweise in Schritt (g) die wässrige Lösung 1-stufig extrahiert wird.
- (h) Konzentration der Butanol- oder Pentanolphase aus Schritt (g) auf einen Feststoffgehalt von mindestens 50 Gew.-%, um ein Konzentrat zu erhalten,
- (i) Verdünnen des in Schritt (h) erhaltenen Konzentrats durch Zugabe derartiger Mengen von Wasser und gegebenenfalls Ethanol, dass eine Lösung von 5 bis 20 Gew.-% Trockenextrakt in Wasser oder höchstens 60 Gew.-% wässrigem Ethanol (gleichbedeutend mit „wasserhaltigem Ethanol mit einem Ethanolgehalt von 60 Gew.-%“) erhalten wird,

- (j) Extraktion der wässrigen oder wässrig-ethanolischen Lösung aus Schritt (i) mit einem aliphatischen Lösungsmittel mit einem Siedepunkt von 60 bis 100°C, und Trennung der wässrigen Phase von der aliphatischen Lösungsmittel-Phase, um eine wässrige Phase zu erhalten,
- (k) Konzentration der in Schritt (j) erhaltenen wässrigen Phase unter vermindertem Druck und bei einer Temperatur von höchstens 60 bis 80°C, um einen Trockenextrakt mit einem Wassergehalt von weniger als 5 Gew.-% zu erhalten,

wobei der Extrakt nach Schritt (k) oder (j) einen Gehalt an 21,0 Gew.-% bis 27,0 Gew.-% Flavonoiden, berechnet als Flavonglycoside, 2,6 Gew.-% bis 5,0 Gew.-% Bilobalid, 2,8 Gew.-% bis 5,0 Gew.-% Ginkgolide A, B und C sowie höchstens 5 ppm Ginkgolsäuren und 5,5 – 25 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt 6,5 – 20 Gew.-%, Proanthocyanidine aufweist und wobei sich hierbei die Prozentangaben auf den Trockenextrakt beziehen.

Vorzugsweise weist der Extrakt nach Schritt (d) einen Gehalt an 10,0 Gew.-% bis 27,0 Gew.-% Flavonoiden, berechnet als Flavonglycoside, 2,1 Gew.-% bis 3,6 Gew.-% Bilobalid (besonders bevorzugt 2,1 Gew.-% bis 3,2 Gew.-% Bilobalid), 2,1 Gew.-% bis 3,8 Gew.-% Ginkgolide A, B und C (besonders bevorzugt 2,1 Gew.-% bis 3,4 Gew.-% Ginkgolide A, B und C), 30 – 40 Gew.-% Proanthocyanidine auf, wobei sich die Prozentangaben auf den Trockenextrakt beziehen.

Vorzugsweise weist der Extrakt nach Schritt (k) oder (j) einen Gehalt an 21,0 Gew.-% bis 27,0 Gew.-% Flavonoiden, berechnet als Flavonglycoside, 2,6 Gew.-% bis 3,6 Gew.-% Bilobalid, 2,8 Gew.-% bis 3,6 Gew.-% Ginkgolide A, B und C sowie höchstens 5 ppm Ginkgolsäuren und 5,5 – 25 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt 6,5 – 20 Gew.-%, Proanthocyanidine auf, wobei sich die Prozentangaben auf den Trockenextrakt beziehen.

Vorzugsweise wird als Extraktionslösungsmittel in Schritt (a) wasserhaltiges Aceton mit einem Acetongehalt von etwa 50 bis 70 Gew.-%, besonders bevorzugt mit einem Acetongehalt von etwa 60 Gew.-% eingesetzt.

Vorzugsweise wird als Extraktionslösungsmittel in Schritt (a) ein wasserhaltiges Alkanol ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Methanol, Ethanol, 1-Propanol,

2-Propanol oder Mischungen daraus, mit einem Alkanolgehalt von 50 Gew.-% bis 70 Gew.-%, besonders bevorzugt wasserhaltiges Ethanol mit einem Ethanolgehalt von 60 Gew.-% eingesetzt.

Vorzugsweise wird die in Schritt (c) verdünnte wässrige Lösung auf eine Temperatur unter 12°C, insbesondere auf 0°C bis 11°C (physikalische Normalbedingungen), abgekühlt.

Vorzugsweise wird in Schritt (d) mindestens 30 Gew.-% Ammoniumsulfat, besonders bevorzugt 30 bis 50 Gew.-% Ammoniumsulfat bezogen auf die wässrige Lösung aus Schritt (c) zugesetzt.

Vorzugsweise erfolgt in Schritt (e) ein Einengen der Methylethylketon-Aceton-Phase aus Schritt (d) bis zu einem Trockenextraktanteil von 45 bis 75 Gew.-%, um ein Konzentrat zu erhalten.

Vorzugsweise erfolgt in Schritt (f) gegebenenfalls ein Verdünnen des erhaltenen Konzentrats aus Schritt (e) mit Wasser auf einen Feststoffgehalt von 30 – 45 Gew.-%, um eine Lösung zu erhalten,

Vorzugsweise wird in Schritt (g) mit 1-Butanol extrahiert, wobei vorzugsweise einmal oder einmal bis dreimal extrahiert wird.

Vorzugsweise wird in Schritt (g) die wässrige Lösung 1-stufig extrahiert und in einem weiteren Schritt (j) mit Heptan, besonders bevorzugt mit n-Heptan oder einem Heptanisomerengemisch mit einem Anteil von mehr als 25 Gew.-% n-Heptan extrahiert.

Nach dem Schritt (c) beträgt der Gehalt an PACs vorzugsweise 8,5 bis 12 Gew.-%, bezogen auf den Trockenextrakt.

Nach dem Schritt (g) beträgt der Gehalt an PACs vorzugsweise 5,5 bis 20 Gew.-%, besonders bevorzugt 5,5 bis 18 Gew.-%, bezogen auf den Trockenextrakt.

Zudem wird in einer weiteren Ausführungsform ein Extrakt aus Ginkgo biloba bereitgestellt, welcher nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlich ist.

Zur Herstellung von Arzneimitteln kann der erfindungsgemäße Ginkgo biloba-Extrakt in üblicher Weise verarbeitet werden, z. B. zu Lösungen, Dragees, Tabletten oder

Injektionspräparaten. Die Arzneimittel der Erfindung werden vorzugsweise zur Behandlung von peripheren und cerebralen arteriellen Durchblutungsstörungen verwendet.

Daher wird in einer weiteren Ausführungsform ein Arzneimittel oder Nahrungsergänzungsmittel bereitgestellt, enthaltend den erfindungsgemäßen Extrakt.

Vorzugsweise umfasst das Nahrungsergänzungsmittel Vitalstoffe ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Vitaminen, Mineralien, Spurenelementen, Pflanzenfarbstoffe, Coenzymen, Aminosäuren, Peptiden oder Pflanzenextrakten.

Vorzugsweise umfasst das Nahrungsergänzungsmittel:

- (i) mindestens ein Vitamin ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Vitamin A (Retinol), Vitamin B1 (Thiamin), Vitamin B2 (Riboflavin), Vitamin B3 (Niacin), Vitamin B4 (Adenin, Cholin), Vitamin B5 (Pantothensäure), Vitamin B6 (Pyridoxin), Vitamin B7 (Biotin), Vitamin B8 (Adenosinphosphat), Vitamin B9 (Folsäure), Vitamin B10 (para-Aminobenzoessäure, Mischung von B-Vitaminen), Vitamin B11 (Folsäure), Vitamin B12 (Cobalamin), Vitamin B13 (Orotsäure), Vitamin B14 (Mischung von Vitaminen B10 und B11), Vitamin B15 (Pangamsäure), Vitamin B16 (Pyridoxin), Vitamin B17 (Amygdalin), Vitamin B22 , Vitamin BT (Carnithin), Vitamin BX (para-Aminobenzoessäure), Vitamin C (Ascorbinsäure), Vitamin D (Cholecalciferol), Vitamin E (Tocopherol), Vitamin H (Biotin), Vitamin K (Phyllochinin, Menachinon) Vitamin Q (Ubichinon, Coenzym Q10) und deren Derivaten; und
- (ii) optional eine Mineralstoffkomponente-umfassend mindestens eine Komponente ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Calcium, Eisen, Kalium, Kupfer, Magnesium, Molybdän, Selen, Silicium, Zink und deren Salze,
- (iii) optional einen zugesetzten Naturstoff bzw. Naturstoffgemisch umfassend mindestens einen Naturstoff bzw. Naturstoffgemisch ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Carotinoiden, insbesondere

Lutein, Lykopen, Lipiden, insbesondere mittelkettige Triglyceride, Phospholipiden und Omega-3-Fettsäuren und Omega-6-Fettsäuren, Resveratrol und Curcumin,

- (iv) eine Pflanzenextrakt-Komponente umfassend mindestens zwei unterschiedliche Pflanzenextrakte, welche jeweils ein Extrakt aus einer Pflanze oder Pflanzenteilen sind, unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus dem erfindungsgemäßen Ginkgoextrakt und zusätzlich Ginseng, Grüner Tee, Rhodiola rosea, Lavendelöl (ätherisches Öl), Safran, Melisse, Baldrian, Withania oder Kombinationen davon,
- (v) optional mindestens ein Probiotika ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Streptococcus thermophilus, Lactobacillus-Stämme (z.B. Lactobacillus plantarum und Lactobacillus helveticus), Bifidobacterium-Stämme (z.B. Bifidobacterium breve Stamm A1), Bacillus subtilis, Anaerostipes-Stämme, Oscillibacter-Stämme, Lachnospiraceae-Stämme, Akkermansia-Stämme, Christensenellaceae-Stämme, Firmicutes-Stämme, Ruminococcus-Stämme, Clostridium-Stämme (z.B. Clostridium butyricum), Eubacterium-Stämme (z.B. Eubacterium Hallii, Eubacterium Rectale and Eubacterium plexicaudatum), Coprococcus-Stämme, Faecalibacterium-Stämme, Butyrivibrio-Stämme, Actinomycetes-Stämme, Bacteroidetes-Stämme, Proteobacteria-Stämme, Spirochetes-Stämme, Blautia-Stämme (z.B. Blautia hansenii) und Muribaculum-Stämme (z.B. Muribaculum intestinale).

Unter „Extraktion“ im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein Trennverfahren zu verstehen, bei dem mit Hilfe eines Extraktionsmittels oder Mischungen davon eine oder mehrere Komponenten aus einem Stoffgemisch, das aus festen, flüssigen oder gasförmigen Einzelstoffen besteht, herausgelöst wird/werden. Als Extraktionsmittel wird im erfindungsgemäßen Verfahren ein Extraktionslösungsmittel verwendet, beispielsweise wasserhaltiges Aceton, ein wasserhaltiges Alkanol mit 1 bis 3 C-Atomen (vorzugsweise Methanol, Ethanol, 1-Propanol, 2-Propanol oder Mischungen daraus), wasserfreies Methanol, ein Methylethylketon-Aceton-Gemisch (im Schritt (d) im Verhältnis 3/2 bis 1/1 (m/m)), mit Wasser nicht mischbares Butanol oder Pentanol

oder aliphatische Lösungsmittel (vorzugsweise mit einem Siedepunkt von 60 bis 100°C).

Mit Wasser nicht mischbares Butanol umfasst *n*-Butanol, *iso*-Butanol und *sec*-Butanol. Mit Wasser nicht mischbares Pentanol umfasst Pentan-1-ol, Pentan-2-ol, Pentan-3-ol, 2-Methylbutan-1-ol, 2-Methylbutan-2-ol, 3-Methylbutan-1-ol, 3-Methylbutan-2-ol und 2,2-Dimethylpropan-1-ol.

Ein bevorzugtes aliphatisches Lösungsmittel ist Heptan, besonders bevorzugt *n*-Heptan oder ein Heptanisomerengemisch mit einem Anteil von mehr als 25 Gew.-% *n*-Heptan.

Unter „Extrakt“ im Sinne der vorliegenden Erfindung sind die eine Komponente oder die mehreren Komponenten zu verstehen, die bei der Extraktion aus einem Stoffgemisch extrahiert wird/werden. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Extrakt um einen Trockenextrakt.

„Getrocknete Blätter von *Ginkgo Biloba*“ werden mittels einem dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten. Vorzugsweise werden sie durch Trocknung im Trommelofen bei bis zu mehreren hundert °C, vorzugsweise bei Temperaturen größer 60°C, und Trocknungszeiten von 10 min bis zu mehreren Stunden erhalten. Weiterhin ist eine „Lufttrocknung“ (ohne technische Hilfsmittel) möglich bzw. der Einsatz anderer technischer Trocknungsverfahren bzw. Kombinationen aus Lufttrocknung und technischer Trocknung.

Gemäß dem aktuellen Europäischen Arzneibuch (Version 11.0; Monographie 04/2008: 1827 „*Ginkgo dry extract, refined and quantified*“), welches verbindlich ist für alle Ginkgoextrakte, die im Geltungsbereich des Arzneibuchs als Arzneimittel zugelassen werden können, enthält Ginkgoextrakt 22,0 % bis 27,0 % Flavonoide, berechnet als Flavonglycoside, 2,6 % bis 3,2 % Bilobalid, 2,8 % bis 3,4 % Ginkgolide A, B und C sowie höchstens 5 ppm Ginkgolsäuren. Die Herstellung wird in der „Bekanntmachung über die Zulassung und Registrierung von Arzneimitteln (Aufbereitungsmonographien für den humanmedizinischen Bereich) – *Ginkgo folium (Ginkgo-biloba-Blätter)*“ (Bundesanzeiger 46, (133), 7360-7361 (1994)) folgendermaßen beschrieben: „Ein aus den getrockneten Blättern von *Ginkgo biloba*

LINNE mit Aceton-Wasser und nachfolgenden Reinigungsschritten ohne Zumischung von Konzentraten oder isolierten Inhaltsstoffen hergestellter Trockenextrakt“.

Bei den Ginkgoliden A, B, C und bei Bilobalid handelt es sich um bekannte Verbindungen aus der Gruppe der Terpenlaktone. Die Ginkgolide A, B, C sind hexacyclische Diterpene und Bilobalid ist ein tetracyclisches Sesquiterpen.

Der Gehalt an Flavonoiden wird als Gehalt an Flavonglycosiden berechnet. Die Flavonglycoside umfassen vorzugsweise die Glycoside der Flavone (auch Flavonoide genannt) Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin, bei denen es sich um bekannte Verbindungen handelt.

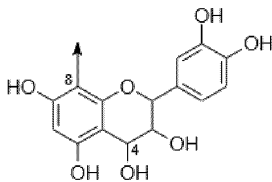
Unter „*Pflanzenextrakt*“ im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein Extrakt zu verstehen, der aus einer Pflanze oder aus Pflanzenteilen als Ausgangsmaterial gewonnen wurde. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Pflanzenextrakt um einen Trockenextrakt.

Unter „*Trockenextrakt*“ im Sinne der vorliegenden Erfindung ist der Rückstand zu verstehen, der erhalten wird, wenn nach einer Extraktion das Extraktionsmittel entfernt wurde. Vorzugsweise wird der so erhaltene feste Rückstand zusätzlich einem Trocknungsschritt unterzogen. Trockenextrakte werden typischerweise durch das Verhältnis von Droge zu Extrakt (DEV) charakterisiert. Trockenextrakte haben vorzugsweise einen Wassergehalt von höchstens 5 Gew.-%, bevorzugt höchstens 4 Gew.-%, höchstens 3 Gew.-%, höchstens 2 Gew.-% oder höchstens 1 Gew.-%.

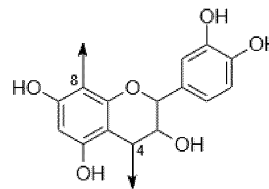
Unter „*Rohextraktlösung*“ im Sinne der vorliegenden Erfindung ist die bei einer Extraktion erhaltene Mischung aus Extrakt und Extraktionslösungsmittel zu verstehen.

Im Schritt (b) versteht man vorzugsweise unter „*am Ende der Destillation ein- oder mehrfach Wasser zugesetzt wird*“ das Zusetzen von Wasser, sobald der Trockenextraktanteil der konzentrierten Extraktlösung mindestens 20 Gew.-% erreicht hat, was durch ein- bzw. mehrfache Zugabe von 25 – 150 Gew.-% Wasser, bezogen auf die Masse der konzentrierten Extraktlösung, erfolgen kann, und weitere Destillation, wodurch der Methanol-Gehalt in der konzentrierten Extraktlösung reduziert werden kann.

Unter „*Proanthocyanidinen*“ (PAC) im Sinne der vorliegenden Erfindung sind sekundäre Pflanzenstoffe aus der Gruppe der Tannine zu verstehen, die beim Erhitzen mit verdünnten Mineralsäuren eine Farbreaktion, die sogenannte Proanthocyanidinreaktion ergeben. Proanthocyanidine stellen vorzugsweise Polymerisationsprodukte aus Flavan-3-olen und Flavan-3,4-diolen dar. Häufige Proanthocyanidine umfassen die Kondensationsprodukte von Flavan-3,4-diolen, die über 4→8- oder 4→6-Bindungen zu Di-, Tri- und Oligomeren kondensieren, und die Kondensationsprodukte von Flavan-3-ol-Einheiten, die über die Positionen 4 und 8 miteinander verbunden sind. Proanthocyanidine umfassen vorzugsweise dimere Proanthocyanidine, oligomere Proanthocyanidine (OPC) und polymere Proanthocyanidine (PPC).



Flavan-3,4-diol-Einheit



Flavan-3-ol-Einheit

Unter „*Pflanze oder Pflanzenteile*“ im Sinne der vorliegenden Erfindung ist eine gesamte Pflanze (beispielsweise Ginkgo, Ginseng, Grüner Tee) oder ein Teil dieser Pflanze zu verstehen, beispielsweise eines oder mehrere aus der Gruppe, ausgewählt aus Wurzel, Stamm, Blatt, Blume, Frucht, Knospe, Trieb oder Samen.

Unter „*frische oder getrocknete Blätter von Ginkgo biloba*“ im Sinne der vorliegenden Erfindung sind vorzugsweise die grünen Blätter als frische Blätter des Baums gemeint und wenn diese schonend getrocknet werden, entstehen daraus die getrockneten Blätter.

Unter „*Ginkgo*“ im Sinne der vorliegenden Erfindung ist die Pflanze *Ginkgo biloba*, eine Baumart aus der Ordnung der *Ginkgoales*, zu verstehen.

Unter „*Ginkgoliden*“ im Sinne der vorliegenden Erfindung werden vorzugsweise die Ginkgolide A, B und C verstanden.

Unter dem Begriff „*wasserhaltig*“ (z.B. wasserhaltiges Aceton, wasserhaltiges Alkanol) im Sinne der vorliegenden Erfindung ist zu verstehen, dass eine chemische Verbindung, vorzugsweise ein Lösungsmittel, eine Mindestmenge an Wasser enthält, typischerweise mindestens 1 Gew.-%, vorzugsweise 10-90 Gew.-%, bevorzugter 20-80 Gew.-%, bevorzugter 30-80 Gew.-%, bevorzugter 40-80 Gew.-%, bevorzugter 50-70 Gew.-%. Beispielsweise hat wasserhaltiges Aceton vorzugsweise einen Acetongehalt von etwa 50 bis 70 Gew.-%, besonders bevorzugt etwa 60 Gew.-%. Beispielsweise hat wasserhaltiges Alkanol vorzugsweise einen Alkanolgehalt von etwa 50 bis 70 Gew.-%, besonders bevorzugt etwa 60 Gew.-%.

Unter dem Begriff „*wasserfrei*“ im Sinne der vorliegenden Erfindung ist zu verstehen, dass eine chemische Verbindung, vorzugsweise ein Lösungsmittel, praktisch kein Wasser enthält. Kommerziell erhältliches wasserfreies Methanol, das in der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, enthält beispielsweise maximal 0,8 Gew.-%, 0,2 Gew.-%, 0,1 Gew.-%, 0,02 Gew.-%, 0,01 Gew.-% oder 0,002 Gew.-% Wasser.

Unter „*Einengen*“ im Sinne der vorliegenden Erfindung wird das teilweise oder vollständige Entfernen eines Lösungsmittels (Extraktionsmittels) oder eines Lösungsmittelgemischs aus einem Stoffgemisch mittels Destillation verstanden.

Unter „*Trockenextraktanteil*“ im Sinne der vorliegenden Erfindung wird der nicht flüchtige Anteil einer Extraktlösung verstanden. In der Regel wird dieser in Gew.-% angegeben. Der Begriff „*Feststoffgehalt*“ wird synonym verwendet.

Unter „*Extraktlösung*“ im Sinne der vorliegenden Erfindung wird eine Lösung aus den in einem Lösungsmittel löslichen Bestandteilen der frischen oder getrockneten Blätter von Ginkgo biloba verstanden. Dieser Begriff wird auch für die weiterverarbeiteten Lösungen der Zwischenstufen verwendet.

Unter „*Mineralstoffkomponente*“ sind im Sinne der vorliegenden Erfindung sowohl Makroelemente als auch Spurenelemente zu verstehen. Diese sind für den menschlichen Organismus essenziell. Makroelemente sind mit einer Konzentration von mindestens 50 mg / kg Körpergewicht enthalten. Spurenelemente sind mit einer Konzentration von weniger als 50 mg / kg Körpergewicht enthalten.

Beispiele:**Übersicht der Analysemethoden**Photometrische Bestimmung von Proanthocyanidinen

Der Gehalt an Proanthocyanidinen wird photometrisch gegen eine aus dem Ginkgo biloba Extrakt gewonnene Proanthocyanidin-Fraktion als Kalibriersubstanz mittels 1-Punkt-Kalibrierung bestimmt.

50 mg Extrakt, genau gewogen, werden mit einer Mischung aus Isopropanol / 3 M HCl [5 : 1 (V/V)] auf 25 mL aufgefüllt und gelöst. 5,0 mL dieser Lösung werden in ein verschließbares Gefäß überführt und 45 min im Wasserbad bei 100°C hydrolysiert.

Die abgekühlte Probe wird mit dem Isopropanol / HCl- Gemisch auf 10 mL aufgefüllt und am Photometer vermessen (Wellenlänge: 556 nm; Schichtdicke: 1 cm).

Eine geeignete Menge Proanthocyanidin- Fraktion wird analog vermessen.

Die Probeneinwaagen werden so angepasst, dass die Extinktion zwischen 0,2 und 1 liegt.

HPLC-Bestimmung von Terpenlactonen (Ginkgolide A, B, C und Bilobalid)

Die Bestimmung von Terpenlactonen erfolgt in Anlehnung an die im Pharm. Eur. 11 beschriebene Methode zur Bestimmung von Terpenlactonen in Ginkgo-Trockenextrakt.

HPLC-Bestimmung von Flavonoiden

Die Bestimmung von Flavonoiden erfolgt in Anlehnung an die im Pharm. Eur. 11 beschriebene Methode zur Bestimmung von Flavonoiden in Ginkgo-Trockenextrakt.

HPLC- Bestimmung von Ginkgolsäuren

Die Bestimmung von Ginkgolsäuren erfolgt in Anlehnung an die im Pharm. Eur. 11 beschriebene Methode zur Bestimmung von Ginkgolsäuren in Ginkgo-Trockenextrakt.

Entsprechende Bestimmungsmethoden sind in „European Pharmacopoeia 11.0“ unter dem Punkt „Ginkgo dry extract, refined and quantified“ zu finden.

Optimierung der Parameter des Verfahrensschritts (c)

Herstellung der Ausgangslösung für Optimierung der Parameter des Verfahrensschritts (c)

(entsprechend dem Verfahrensschritt (a); siehe auch „Unter Herstellung der Ausgangslösung“)

600 g getrocknete und zerkleinerte Blätter von Ginkgo biloba wurden mit 4,5 kg 60 Gew.-% Aceton 30 min bei 60 °C extrahiert. Das Pflanzenmaterial wurde abfiltriert, erneut mit 4,5 kg 60 Gew.-% Aceton 30 min bei 60 °C extrahiert und wiederum abfiltriert. Die beiden so erhaltenen Extraktlösungen wurden vereinigt, homogenisiert und anschließend Aliquote für die einzelnen Versuche verwendet.

Referenzbeispiel 1: Kältefällung bei TE (Trockenextraktanteil) = 5 %

(entsprechend den Verfahrensschritten (b) und (c))

0,68 kg der obigen Ausgangslösung wurden auf 41,7 g konzentriert und mit Wasser auf 291 g (Trockenextraktanteil: 5 %) eingestellt. Die Mischung wurde 1 h auf 12°C gekühlt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und die Rohextraktlösung eingedampft und getrocknet (Analysenprobe KF-05%).

Beispiel 2: Kältefällung bei TE = 15 %

(entsprechend den Verfahrensschritten (b) und (c))

6,78 kg der obigen Ausgangslösung wurden auf 412,5 g konzentriert und mit Wasser auf 962 g (Trockenextraktanteil: 15 %) eingestellt. Die Mischung wurde 1 h auf 12°C gekühlt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und 10 g der Rohextraktlösung eingedampft und getrocknet (Analysenprobe KF-15%).

Beispiel 3: Kältefällung bei TE = 25 %

(entsprechend den Verfahrensschritten (b) und (c))

0,68 kg der obigen Ausgangslösung wurden auf 37,4 g konzentriert und mit Wasser auf 58 g (Trockenextraktanteil: 25 %) eingestellt. Die Mischung wurde 1 h auf 12°C gekühlt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und die Rohextraktlösung eingedampft und getrocknet (Analysenprobe KF-25%).

Analysenergebnisse: Prozessschritt (c) „Kältefällung“

Analysenprobe	in %	PAC [in %]	Flavone [in %]	Bilobalid [in %]	Ginkgolide [in %]
KF-05%	Kältefällung bei einem TE = 5 %	8	3,37	0,552	0,61
KF-15%	Kältefällung bei einem TE = 15 %	9,1	3,39	0,492	0,529
KF-25%	Kältefällung bei einem TE = 25 %	9,8	3,49	0,487	0,534

*alle Prozentangaben in Gewichtsprozent

Optimierung der Parameter des Prozessschritts (d)**Optimierung des Methylethylketon – Aceton – Verhältnisses****Herstellung der Ausgangslösung**

(entsprechend den Verfahrensschritten (a) bis (c))

600 g getrocknete und zerkleinerte Blätter von Ginkgo biloba wurden mit 4,5 kg 60 Gew.-% Aceton 30 min bei 60 °C extrahiert. Das Pflanzenmaterial wurde abfiltriert, erneut mit 4,5 kg 60 Gew.-% Aceton 30 min bei 60 °C extrahiert und wiederum abfiltriert. Die beiden so erhaltenen Extraktlösungen wurden vereinigt und homogenisiert.

6,78 kg der obigen Extraktlösung wurden auf 412,5 g konzentriert und mit Wasser auf 962 g (Trockenextraktanteil: 15 %) eingestellt. Die Mischung wurde 1 h auf 12°C gekühlt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und die Rohextraktlösung für die weiteren Versuche aliquotiert.

Referenzbeispiel 4: MEK : Aceton–Verteilung 0,75 / 1 (m / m)

(entsprechend des Verfahrensschritts (d))

100 g Filtrat (Rohextraktlösung aus „Herstellung der Ausgangslösung“) wurden mit 30 g Ammoniumsulfat versetzt und dieses gelöst. Diese Lösung wurde zweimal mit je 50 mL Methylethylketon / Aceton 0,75 / 1 (m / m) extrahiert. Die Methylethylketon / Aceton–Phasen wurden vereinigt, homogenisiert, eingedampft und getrocknet (Analysenprobe: MEK : Aceton 0,75 / 1).

Beispiel 5: MEK : Aceton–Verteilung 6 / 5 (m / m)

(entsprechend des Verfahrensschritts (d))

656 g Filtrat wurden mit 197 g Ammoniumsulfat versetzt und dieses gelöst. Diese Lösung wurde zweimal mit je 330 mL Methylethylketon / Aceton 6 / 5 (m / m) extrahiert. 100 g der vereinigten und homogenisierten Methylethylketon / Aceton–Phasen wurde eingedampft und getrocknet (Analysenprobe: MEK : Aceton 6 / 5).

Referenzbeispiel 6: MEK : Aceton–Verteilung 2,25 / 1 (m / m)

(entsprechend des Verfahrensschritts (d))

52 g Filtrat wurden mit 16 g Ammoniumsulfat versetzt und dieses gelöst. Diese Lösung wurde zweimal mit je 25 mL Methylethylketon / Aceton 2,25 / 1 (m / m) extrahiert. Die Methylethylketon / Aceton–Phasen wurden vereinigt, homogenisiert, eingedampft und getrocknet (Analysenprobe: MEK : Aceton 2,25 / 1).

Analysenergebnisse:

Prozessschritt (d) " Optimierung des Methylethylketon – Aceton – Verhältnisses"

Analysenprobe		PAC [in %]	Flavone [in %]	Bilobalid [in %]	Ginkgolide [in %]
MEK : Aceton 0,75 / 1 (Referenzbsp. 4)	Verhältnis MEK : Aceton (0,75 : 1 [m/m]) Ausschüttlung mit dem 1- fachen Volumen der Wasserphase	30,6	11,93	1,956	2,132
MEK : Aceton 6 / 5 (Beispiel 5)	Verhältnis MEK : Aceton (6 : 5 [m/m]); Ausschüttlung mit dem 1- fachen Volumen der Wasserphase	32,3	14,55	2,265	2,247
MEK : Aceton 2,25 / 1 (Referenzbsp. 6)	Verhältnis MEK : Aceton (2,25 : 1 [m/m]) Ausschüttlung mit dem 1- fachen Volumen der Wasserphase	29,6	18,86	2,988	3,142

Optimierung des Volumenverhältnisses der Oberphase zur Unterphase

Hierbei ist die Oberphase, die sich im Scheidetrichter gebildete obere Phase (Methylethylketon – Aceton – Phase). Die Unterphase, die sich im Scheidetrichter gebildete untere Phase (wässrige Phase).

Herstellung der Ausgangslösung

(entsprechend den Verfahrensschritten (a) bis (c))

Analog der allgemeinen Versuchsvorschrift zu Herstellung der Ausgangslösung, jedoch wurde die Kältefällung bei einem TE = 25 % durchgeführt. Dieser Wert entspricht dem bevorzugten Verfahren.

Referenzbeispiel 7 MEK: Aceton–Verteilung 0,25 faches Volumen Oberphase zu Unterphase

(entsprechend des Verfahrensschritts (d))

92 g Filtrat wurden mit 28 g Ammoniumsulfat versetzt und dieses gelöst. Diese Lösung wurde zweimal mit je 11,5 mL Methylethylketon / Aceton 6 / 5 (*m / m*) versetzt. Nach dem Schütteln bildet sich ein 3-Phasengemisch aus (Analysenprobe: MEK : Aceton 0,25).

Beispiel 8 MEK: Aceton–Verteilung 0,5 faches Volumen Oberphase zu Unterphase

(entsprechend des Verfahrensschritts (d))

52 g Filtrat wurden mit 16 g Ammoniumsulfat versetzt und dieses gelöst. Diese Lösung wurde zweimal mit je 12,5 mL Methylethylketon / Aceton 6 / 5 (*m / m*) extrahiert. Die vereinigten und homogenisierten Methylethylketon / Aceton–Phasen wurden eingedampft und getrocknet (Analysenprobe: MEK : Aceton 0,5).

Referenzbeispiel 9 MEK: Aceton–Verteilung 2 faches Volumen Oberphase zu Unterphase

(entsprechend des Verfahrensschritts (d))

52 g Filtrat wurden mit 16 g Ammoniumsulfat versetzt und dieses gelöst. Diese Lösung wurde zweimal mit je 50 mL Methylethylketon / Aceton 6 / 5 (*m / m*) extrahiert. Die vereinigten und homogenisierten Methylethylketon / Aceton–Phasen wurden eingedampft und getrocknet (Analysenprobe: MEK : Aceton 2).

Analysenergebnisse:

Prozessschritt (d) "Optimierung des Volumenverhältnisses der Oberphase zur Unterphase"

Analysenprobe		PAC [in %]	Flavone [in %]	Bilobalid [in %]	Ginkgolide [in %]
MEK : Aceton 0,25 (Referenzbsp. 7)	Verhältnis MEK : Aceton (6 : 5 [m/m]) Ausschüttlung mit dem 0,25-fachen Volumen der Wasserphase	Bildung einer 3. Phase (größentechnisch nicht mehr durchführbar)			
MEK : Aceton 0,5 (Beispiel 8)	Verhältnis MEK : Aceton (6 : 5 [m/m]) Ausschüttlung mit dem 0,5-fachen Volumen der Wasserphase	37	18,37	2,984	1,589
MEK : Aceton 6 / 5 (Beispiel 5)	Verhältnis MEK : Aceton (6 : 5 [m/m]); Ausschüttlung mit dem 1- fachen Volumen der Wasserphase	32,3	14,55	2,265	2,247
MEK : Aceton 2 (Referenzbsp. 9)	Verhältnis MEK : Aceton (6 : 5 [m/m]) Ausschüttlung mit dem 2- fachen Volumen der Wasserphase	26,7	12,04	1,655	1,784

*alle Prozentangaben in Gewichtsprozent

Optimierung der Parameter des Prozessschritts (g)

Herstellung der Ausgangstrockenextrakts

(entsprechend den Verfahrensschritten (a) bis (e))

1500 g getrocknete und zerkleinerte Blätter von Ginkgo biloba wurden mit 11,25 kg 60 Gew.-% Aceton 1 h bei 60°C extrahiert. Das Pflanzenmaterial wurde abfiltriert, erneut mit 11,25 kg 60 Gew.-% Aceton 1 h bei 60°C extrahiert und wiederum abfiltriert. Die beiden so erhaltenen Extraktlösungen wurden vereinigt und homogenisiert.

Die Ausgangslösung (21,85 kg) wurde auf 1,2 kg (Trockenextraktanteil 35 %) konzentriert und mit Wasser auf 2545 g (Trockenextraktanteil 15 %) eingestellt. Die Mischung wurde 16 h auf $<12^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Der Niederschlag wurde abfiltriert.

2402 g Filtrat wurden mit 721 g Ammoniumsulfat versetzt und dieses gelöst. Diese Lösung wurde zweimal mit je 2066 g Methylethylketon / Aceton 5,4 / 6 (m / m) extrahiert. Die Methylethylketon / Aceton-Phasen wurden vereinigt, homogenisiert und getrocknet.

Beispiel 10: 1-Butanol-Verteilung 3-fache Verteilung

(entsprechend den Verfahrensschritten (f) und (g))

15 g Trockenextrakt wurden mit Wasser auf einen Trockenextraktanteil von 40 % eingestellt. Diese Phase wurde 3 x mit 42 mL 1-Butanol ausgeschüttelt. Die 1-Butanol-Phasen wurden vereinigt und getrocknet (Analysenprobe: Butanol 3x)

Beispiel 11: 1-Butanol Verteilung 1-fache Verteilung

(entsprechend den Verfahrensschritten (f) und (g))

5 g Trockenextrakt wurden mit Wasser auf einen Trockenextraktanteil von 40 % eingestellt. Diese Phase wurde 1 x mit 70 mL 1-Butanol ausgeschüttelt. Die 1-Butanol-Phase getrocknet (Analysenprobe: Butanol 1x)

Analysenergebnisse: Prozessschritt (g) "1-Butanol-Verteilung"

Analysenprobe		PAC [in Gew. %]	Flavone [in Gew. %]	Bilobalid [in Gew. %]	Ginkgolide [in Gew. %]
Butanol 3x	wässrige Phase auf TE= 40 % eingestellt; 3 x mit 1-Butanol ausgeschüttelt	4,04	17,29	2,05	2,51
Butanol 1x	wässrige Phase auf TE= 40 % eingestellt; 1 x mit 1-Butanol ausgeschüttelt	5,48	16,72	2,11	2,64

*alle Prozentangaben in Gewichtsprozent

Das erfindungsgemäße Verfahren wird anhand des Vergleichsbeispiels 1 gemäß EP 431 536 B1 und des erfindungsgemäßen Beispiels 1 näher erläutert und beschrieben.

In den nachfolgenden Beispielen ist unter der Bezeichnung „Heptan“ ein gesättigtes aliphatisches Kohlenwasserstoffgemisch zu verstehen mit einem Siedebereich von 94 – 100 °C und einem n-Heptan-Anteil von mehr als 25 Gew.-%.

Ausgangslösung für Beispiel 1 und Vergleichsbeispiel 1

(entsprechend dem Verfahrensschritt (a) der EP 431 536 B1 und des erfindungsgemäßen Verfahrens)

750 g getrocknete und zerkleinerte Blätter von Ginkgo biloba wurden mit 5,63 kg 60 Gew.-% Aceton 1 h bei 60 °C extrahiert. Das Pflanzenmaterial wurde abfiltriert, erneut mit 5,63 kg 60 Gew.-% Aceton 1 h bei 60 °C extrahiert und wiederum abfiltriert. Die beiden so erhaltenen Extraktlösungen wurden vereinigt, homogenisiert und anschließend geteilt.

Vergleichsbeispiel 1 gemäß EP 431536 B1

(entsprechend den Verfahrensschritten (b) bis (k))

Die Hälfte der obigen Ausgangslösung (5162 g) wurde auf 300 g (Trockenextraktanteil 35 %) konzentriert und mit Wasser auf 716 g (Trockenextraktanteil 15 %) eingestellt. Die Mischung wurde 1 h auf 12 °C gekühlt. Der Niederschlag wurde abfiltriert.

Von der Lösung wurde eine Analysenprobe entnommen, konzentriert und getrocknet. (Analysenprobe V 1, Probe nach dem Schritt (c)).

680 g Filtrat wurden mit 204 g Ammoniumsulfat versetzt und dieses gelöst. Diese Lösung wurde zweimal mit je 340 mL Methylethylketon / Aceton 0,75 / 1 (*m / m*) extrahiert. Die Methylethylketon / Aceton–Phasen wurden vereinigt und homogenisiert.

Von der Lösung wurde eine Analysenprobe entnommen, konzentriert und getrocknet. (Analysenprobe V 2, Probe nach dem Schritt (d)).

584 g der vereinigten Methylethylketon / Aceton–Phase wurden aufkonzentriert und mit Wasser auf einen Trockenextraktanteil von 10 % eingestellt. Diese Phase wurde dreimal mit 55 mL 1-Butanol ausgeschüttelt. Die 1-Butanol–Phasen wurden vereinigt und homogenisiert.

Von der Lösung wurde eine Analysenprobe entnommen, konzentriert und getrocknet. (Analysenprobe V 3, Probe nach dem Schritt (g)).

96 g 1-Butanol–Phase wurde vom 1-Butanol befreit und mit Wasser und Ethanol auf einen Trockenextraktanteil von 10 % und einen Ethanol -Anteil von 30 % eingestellt. Diese Lösung wurde dreimal mit 25 mL Heptan extrahiert, aufkonzentriert und getrocknet: 5,1 g (Analysenprobe V 4, Probe nach dem Schritt (j), vergleichbar mit Schritt (k) im erfindungsgemäßen Verfahren).

	PAC	Flavone	Bilobalid	Ginkgolide
Analysenprobe V 1	7,78 %	3,32 %	0,455 %	0,504 %
Analysenprobe V 2	33,5 %	12,84 %	1,834 %	1,990 %
Analysenprobe V 3	5,34 %	26,11 %	4,191 %	4,295 %
Analysenprobe V 4	5,50 %	26,39 %	4,386 %	4,573 %

*alle Prozentangaben in Gewichtsprozent

Der Gehalt an Ginkgolsäuren in der Analysenprobe V 4 wurde mit kleiner 5 ppm bestimmt.

Erfindungsgemäßes Beispiel 1

(entsprechend den erfindungsgemäßen Verfahrensschritten (b) bis (k))

Die zweite Hälfte der obigen Ausgangslösung (5161 g) wurde auf 300 g (Trockenextraktanteil 35 %) konzentriert und mit Wasser auf 430 g (Trockenextraktanteil 25 %) eingestellt. Die Mischung wurde 1 h auf 12 °C gekühlt. Der Niederschlag wurde abfiltriert.

Von der Lösung wurde eine Analysenprobe entnommen, konzentriert und getrocknet. (Analysenprobe E 1, Probe nach dem Schritt (c)).

393 g Filtrat wurden mit Wasser auf 665 g verdünnt, 200 g Ammoniumsulfat zugesetzt und dieses gelöst. Diese Lösung wurde zweimal mit je 330 mL Methylethylketon / Aceton 6 / 5 (m / m) extrahiert. Die Methylethylketon / Aceton-Phasen wurden vereinigt und homogenisiert.

Von der Lösung wurde eine Analysenprobe entnommen, konzentriert und getrocknet. (Analysenprobe E 2, Probe nach dem Schritt (d)).

495 g der vereinigten Methylethylketon / Aceton-Phase wurden aufkonzentriert und mit Wasser auf einen Trockenextraktanteil von 30 % eingestellt. Diese Phase wurde

einmal mit 130 mL 1-Butanol ausgeschüttelt. Die 1-Butanol-Phase wurde homogenisiert.

Von der Lösung wurde eine Analysenprobe entnommen, konzentriert und getrocknet. (Analysenprobe E 3, Probe nach dem Schritt (g)).

89 g 1-Butanol-Phase wurde vom 1-Butanol befreit und mit Wasser und Ethanol auf einen Trockenextraktanteil von 10 % und einen Ethanol-Anteil von 30 % eingestellt. Diese Lösung wurde dreimal mit 27 mL Heptan extrahiert, aufkonzentriert und getrocknet: 5,8 g (Analysenprobe E 4, Probe nach dem Schritt (j)).

	PAC	Flavone	Bilobalid	Ginkgolide
Analysenprobe E 1	9,54 %	3,33 %	0,447 %	0,492 %
Analysenprobe E 2	31,0 %	15,30 %	2,201 %	2,366 %
Analysenprobe E 3	11,1 %	21,47 %	3,339 %	3,533 %
Analysenprobe E 4	8,43 %	22,17 %	3,332 %	3,540 %

*alle Prozentangaben in Gewichtsprozent

Der Gehalt an Ginkgolsäuren in der Analysenprobe E 4 wurde mit kleiner 5 ppm bestimmt.

Im Extrakt gemäß dem erfindungsgemäßen Beispiel 1 (Analysenprobe E 4) wurde ein Proanthocyanidin (PAC)-Gehalt von 8,43 Gew.-% ermittelt, während im Extrakt gemäß Vergleichsbeispiel 1 lediglich 5,50 Gew.-% PAC gefunden wurden, was einer Anreicherung um den Faktor 1,53 entspricht.

Figur 1: Hemmung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch verschiedene Inhaltsstoffgruppen isoliert aus EGb 761

Die pharmakologischen Untersuchungen zeigen ein erhöhtes antioxidatives Potential von Extrakten mit einem Proanthocyanidin-Gehalt von 6,5 – 9,5 Gew.-% gegenüber proanthocyanidinfreien Extrakten.

In der Figur 1 sieht man die antioxidativen Eigenschaften der PACs (Proanthocyanidinen). Diese wurden im Vergleich zu anderen bekannten Inhaltsstoffen von Ginkgo biloba-Extrakt (Flavone und Terpenlaktone) in einem zellulären System untersucht. Dazu wurde die spontane Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in der Ratten-Neuroblastom-Zelllinie RN46A mittels Dihydrofluoreszein-Umsatz bestimmt. Die Zugabe von ansteigenden Konzentrationen von Ginkgo biloba-Inhaltsstoffen führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion des Fluoreszenzsignals, was auf Hemmung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies hinweist. Die PAC-Fraktion stellte hierbei die aktivste Inhaltsstoffgruppe dar.

Figur 2: Hemmung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch EGb 761 im Vergleich zu einem PAC-abgereicherten Ginkgo biloba Extrakt

Figur 2 beschreibt die Ergebnisse einer Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften von EGb 761 mit einem PAC-Gehalt von 8 Gew.-% im Vergleich zu einem Ginkgo biloba-Extrakt (mit vergleichbarer Herstellung und Spezifikation), jedoch mit einem zusätzlichen Prozessschritt zur präparativen Abreicherung der PACs (PAC-Gehalt < 1 Gew.-%). Die antioxidative Wirkung des PAC-abgereicherten Extraktes war um einen Faktor 2,6 vermindert im Vergleich zum PAC-reichen EGb 761.

ANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung eines Extraktes aus Ginkgo biloba-Blättern umfassend die folgenden Schritte:
 - (a) Extraktion frischer oder getrockneter Blätter von Ginkgo biloba mit wasserhaltigem Aceton, einem wasserhaltigen Alkanol mit 1 bis 3 C-Atomen oder wasserfreiem Methanol bei einer Temperatur von 40 bis 100°C, um eine Rohextraktlösung zu erhalten,
 - (b) Abtrennen durch Destillation des Acetons, Alkanols mit 1 bis 3 C-Atomen oder wasserfreien Methanols aus der Rohextraktlösung aus Schritt (a) auf einen Gehalt von höchstens 10 Gew.-% von diesem, bezogen auf das Gesamtgewicht der Rohextraktlösung, um eine konzentrierte wässrige Lösung zu erhalten, wobei im Fall der Verwendung von wasserfreiem Methanol in Schritt (a) am Ende der Destillation ein- oder mehrfach Wasser zugesetzt wird,
 - (c) Verdünnen der konzentrierten wässrigen Lösung aus Schritt (b) mit Wasser auf einen Feststoffgehalt von 10 bis 30 Gew.-%, vorzugsweise 15 bis 25 Gew.-%, Abkühlen auf eine Temperatur unter 25°C, Kühlhalten bis zur Bildung eines Niederschlags und Abtrennen des entstandenen Niederschlags, um wiederum eine wässrige Lösung zu erhalten,
 - (d) Versetzen der erhaltenen wässrigen Lösung aus Schritt (c) mit Ammoniumsulfat und Extraktion der entstandenen Ammoniumsulfat-enthaltenden Lösung mit Methylethylketon / Aceton im Verhältnis von 3/2 bis 1/1 (m/m) und Trennung der wässrigen Phase von der Methylethylketon-Aceton-Phase, um eine Methylethylketon-Aceton-Phase zu erhalten,

wobei der Extrakt nach Schritt (d) nach Trocknen zum Trockenextrakt einen Gehalt an 2,0 Gew.-% bis 5,0 Gew.-% Bilobalid, 1,5 Gew.-% bis 5,0 Gew.-% Ginkgolide A, B und C sowie 25 – 40 Gew.-% Proanthocyanidinen, aufweist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, umfassend die weiteren Schritte
- (e) Einengen der Methylethylketon-Aceton-Phase aus Schritt (d) bis zu einem Trockenextraktanteil von 40 bis 80 Gew.-%, um ein Konzentrat zu erhalten,
 - (f) gegebenenfalls Verdünnen des erhaltenen Konzentrats aus Schritt (e) mit Wasser auf einen Feststoffgehalt von 25 – 50 Gew.-%, um eine Lösung zu erhalten,
 - (g) mindestens einstufige Extraktion der in Schritt (f) erhaltenen Lösung mit einem mit Wasser nicht mischbaren Butanol oder Pentanol, um eine Butanol- oder Pentanolphase zu erhalten,
 - (h) Konzentration der Butanol- oder Pentanolphase aus Schritt (g) auf einen Feststoffgehalt von mindestens 50 Gew.-%, um ein Konzentrat zu erhalten,
 - (i) Verdünnen des in Schritt (h) erhaltenen Konzentrats durch Zugabe derartiger Mengen von Wasser und gegebenenfalls Ethanol, dass eine Lösung von 5 bis 20 Gew.-% Trockenextrakt in Wasser oder höchstens 60 Gew.-% wässrigem Ethanol erhalten wird,
 - (j) Extraktion der wässrigen oder wässrig-ethanolischen Lösung aus Schritt (i) mit einem aliphatischen Lösungsmittel mit einem Siedepunkt von 60 bis 100°C, und Trennung der wässrigen Phase von der aliphatischen Lösungsmittel-Phase, um eine wässrige Phase zu erhalten,
 - (k) Konzentration der in Schritt (j) erhaltenen wässrigen Phase unter vermindertem Druck und bei einer Temperatur von höchstens 60 bis 80°C, um einen Trockenextrakt mit einem Wassergehalt von weniger als 5 Gew.-% zu erhalten.

3. Verfahren nach Anspruch 1, umfassend die weiteren Schritte
- (e1) Konzentration der Methylethylketon-Aceton-Phase aus Schritt (d) auf einen Feststoffgehalt von mindestens 40 Gew.-%, um ein Konzentrat zu erhalten,
 - (f1) Verdünnen des in Schritt (e1) erhaltenen Konzentrats durch Zugabe derartiger Mengen von Wasser und gegebenenfalls Ethanol, dass eine Lösung von 5 bis 20 Gew.-% Trockenextrakt in Wasser oder höchstens 60 Gew.-% wässrigem Ethanol erhalten wird,
 - (g1) Extraktion der wässrigen oder wässrig-ethanolischen Lösung aus Schritt (f1) mit einem aliphatischen Lösungsmittel mit einem Siedepunkt von 60 bis 100°C und Trennung der wässrigen Phase von der aliphatischen Lösungsmittel-Phase, um eine wässrige Phase zu erhalten,
 - (h1) Konzentration der in Schritt (g1) erhaltenen wässrigen Phase unter vermindertem Druck und bei einer Temperatur von höchstens 60 bis 80°C, um einen Trockenextrakt mit einem Wassergehalt von weniger als 5 Gew.-% zu erhalten,
- wobei der Trockenextrakt nach Schritt (h1) einen Gehalt an 2,0 Gew.-% bis 5,0 Gew.-% Bilobalid, vorzugsweise 2,0 Gew.-% bis 3,6 Gew.-% Bilobalid, 2,0 Gew.-% bis 5,0 Gew.-% Ginkgolide A, B und C, vorzugsweise 2,0 Gew.-% bis 3,6 Gew.-% Ginkgolide A, B und C, sowie höchstens 5 ppm Ginkgolsäuren und 25 – 40 Gew.-% Proanthocyanidinen, aufweist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei im Schritt (d) das Volumen des eingesetzten Methylethylketon/Aceton im Bereich von dem 0,3- bis zu dem 1,8-fachen Volumen der wässrigen Lösung liegt.
5. Verfahren nach Anspruch 2, wobei der Extrakt nach Schritt (j) oder (k) einen Gehalt an 21,0 Gew.-% bis 27,0 Gew.-% Flavonoiden, berechnet als Flavonglycoside, 2,6 Gew.-% bis 5,0 Gew.-% Bilobalid, 2,8 Gew.-% bis 5,0

- Gew.-% Ginkgolide A, B und C sowie höchstens 5 ppm Ginkgolsäuren und 6,5 – 20 Gew.-% Proanthocyanidinen, aufweist.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Extrakt nach Schritt (j) oder (k) einen Gehalt an 22,0 Gew.-% bis 27,0 Gew.-% Flavonoiden, berechnet als Flavonglycoside, 2,6 Gew.-% bis 3,2 Gew.-% Bilobalid, 2,8 Gew.-% bis 3,4 Gew.-% Ginkgolide A, B und C, sowie höchstens 5 ppm Ginkgolsäuren und 6,5 – 20 Gew.-% Proanthocyanidinen, aufweist.
 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei als Extraktionslösungsmittel in Schritt (a) wasserhaltiges Aceton mit einem Acetongehalt von etwa 50 bis 70 Gew.-%, besonders bevorzugt mit einem Acetongehalt von etwa 60 Gew.-% eingesetzt wird.
 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei als Extraktionslösungsmittel in Schritt (a) ein wasserhaltiges Alkanol ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Methanol, Ethanol, 1-Propanol, 2-Propanol oder Mischungen daraus, mit einem Alkanolgehalt von 50 Gew.-% bis 70 Gew.-%, besonders bevorzugt wasserhaltiges Ethanol mit einem Ethanolgehalt von 60 Gew.-% eingesetzt wird.
 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die in Schritt (c) verdünnte wässrige Lösung auf eine Temperatur unter 12 °C abgekühlt wird.
 10. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, wobei in Schritt (d) mindestens 30 Gew.-% Ammoniumsulfat, besonders bevorzugt 30 bis 50 Gew.-% Ammoniumsulfat bezogen auf die wässrige Lösung aus Schritt (c) zugesetzt wird.
 11. Verfahren nach Anspruch 1 bis 10, wobei in Schritt (g) mit 1-Butanol extrahiert wird.
 12. Verfahren nach Anspruch 1 bis 11, wobei in Schritt (g) die wässrige Lösung 1-stufig extrahiert und/oder in Schritt (j) mit Heptan, besonders bevorzugt mit n-Heptan oder einem Heptanisomerengemisch mit einem Anteil von mehr als 25 Gew.-% n-Heptan extrahiert wird.
 13. Extrakt aus Ginkgo biloba, erhältlich mit dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12.

14. Arzneimittel oder Nahrungsergänzungsmittel, enthaltend einen Extrakt nach Anspruch 13.
15. Nahrungsergänzungsmittel gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Nahrungsergänzungsmittel Vitalstoffe umfasst, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Vitaminen, Mineralien, Spurenelementen, Pflanzenfarbstoffe, Coenzyme, Aminosäuren, Peptiden oder Pflanzenextrakten.
16. Nahrungsergänzungsmittel nach Anspruch 15 umfassend:
 - (i) mindestens ein Vitamin ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Vitamin A (Retinol), Vitamin B1 (Thiamin), Vitamin B2 (Riboflavin), Vitamin B3 (Niacin), Vitamin B4 (Adenin, Cholin), Vitamin B5 (Pantothersäure), Vitamin B6 (Pyridoxin), Vitamin B7 (Biotin), Vitamin B8 (Adenosinphosphat), Vitamin B9 (Folsäure), Vitamin B10 (para-Aminobenzoessäure, Mischung von B-Vitaminen), Vitamin B11 (Folsäure), Vitamin B12 (Cobalamin), Vitamin B13 (Orotsäure), Vitamin B14 (Mischung von Vitaminen B10 und B11), Vitamin B15 (Pangamsäure), Vitamin B16 (Pyridoxin), Vitamin B17 (Amygdalin), Vitamin B22, Vitamin BT (Carnithin), Vitamin BX (para-Aminobenzoessäure), Vitamin C (Ascorbinsäure), Vitamin D (Cholecalciferol), Vitamin E (Tocopherol), Vitamin H (Biotin), Vitamin K (Phyllochinin, Menachinon) Vitamin Q (Ubichinon, Coenzym Q10) und deren Derivaten; und
 - (ii) optional eine Mineralstoffkomponente umfassend mindestens eine Komponente ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Calcium, Eisen, Kalium, Kupfer, Magnesium, Molybdän, Selen, Silicium, Zink und deren Salze,
 - (iii) optional einen zugesetzten Naturstoff bzw. Naturstoffgemisch umfassend mindestens einen Naturstoff bzw. Naturstoffgemisch ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Carotinoiden, insbesondere Lutein, Lycopin, Lipide, insbesondere mittelkettige Triglyceride,

Phospholipiden und Omega-3-Fettsäuren und Omega-6-Fettsäuren, Resveratrol und Curcumin,

- (iv) eine Pflanzenextrakt-Komponente umfassend mindestens zwei unterschiedliche Pflanzenextrakte, welche jeweils ein Extrakt aus einer Pflanze oder Pflanzenteilen sind unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus dem Ginkgoextrakt gemäß Anspruch 13 und zusätzlich Ginseng, Grüner Tee, Rhodiola rosea, Lavendelöl (ätherisches Öl), Safran, Melisse, Baldrian, Withania oder Kombinationen davon,
- (v) optional mindestens ein Probiotika ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Streptococcus thermophilus, Lactobacillus-Stämme (z.B. Lactobacillus plantarum und Lactobacillus helveticus), Bifidobacterium-Stämme (z.B. Bifidobacterium breve strain A1), Bacillus subtilis, Anaerostipes-Stämme, Oscillibacter-Stämme, Lachnospiraceae-Stämme, Akkermansia-Stämme, Christensenellaceae-Stämme, Firmicutes-Stämme, Ruminococcus-Stämme, Clostridium-Stämme (z.B. Clostridium butyricum), Eubacterium-Stämme (z.B. Eubacterium Hallii, Eubacterium Rectale und Eubacterium plexicaudatum), Coprococcus-Stämme, Faecalibacterium-Stämme, Butyrivibrio-Stämme, Actinomycetes-Stämme, Bacteroidetes-Stämme, Proteobacteria-Stämme, Spirochetes-Stämme, Blautia-Stämme (z.B. Blautia hansenii) und Muribaculum-Stämme (z.B. Muribaculum intestinale).