

Mjerenje inhibicije enzima acetilkolinesteraze i antioksidacijske aktivnosti biljnih infuzija listova ginka

Gospočić, Sara

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University North / Sveučilište Sjever**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:122:341432>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-07**



Repository / Repozitorij:

[University North Digital Repository](#)





**Sveučilište
Sjever**

Završni rad br. 51/PREH/2023

**Mjerenje inhibicije enzima acetilkolinesteraze i
antioksidacijske aktivnosti biljnih infuzija listova ginka**

Sara Gospočić, 0336031240

Koprivnica, rujan 2023. godine



Sveučilište Sjever

Odjel za prehrambenu tehnologiju

Završni rad br. 51/PREH/2023

Mjerenje inhibicije enzima acetilkolinesteraze i antioksidacijske aktivnosti biljnih infuzija listova ginka

Student

Sara Gospočić, 0336031240

Mentor

doc. dr. sc. Dunja Šamec

Koprivnica, lipanj 2023. godine

Prijava završnog rada

Definiranje teme završnog rada i povjerenstva

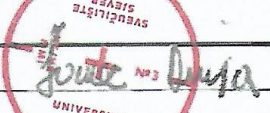
ODJEL	Odjel za prehrambenu tehnologiju		
STUDIJ	preddiplomski stručni studij Prehrambena tehnologija <input type="checkbox"/>		
PRISTUPNIK	Sara Gospočić	MATIČNI BROJ	
DATUM	28.06.2023	KOLEGIJ	Funkcionalna svojstva hrane
NASLOV RADA	Mjerenje inhibicije enzima acetilkolinesteraze i antioksidacijske aktivnosti biljnih infuzija lista		

NASLOV RADA NA ENGL. JEZIKU Measurement of acetylcholinesterase enzyme inhibition and antioxidant activity of herbal tea

MENTOR	Dunja Šamec	ZVANJE	doc.dr.sc.
ČLANOVI POVJERENSTVA	1. izv.prof.dr.sc.Bojan Šarkanj, predsjednik		
	2. Ivana Dodlek Šarkanj, predavačica, članica		
	3. doc.dr.sc.Dunja Šamec, mentorica		
	4. izv.prof.dr.sc. Natalija Uršulin Trstenjak, zamjena člana		
	5. _____		

Zadatak završnog rada

BROJ	51/PREH/2023
OPIS	Zadatak predloženog završnog rada je izmjeriti inhibiciju enzima acetilkolinesteraze te antioksidacijsku aktivnost u biljnim infuzijama listova ginka različite starosti.

ZADATAK URUČEN	28.06.2023	POTPIS MENTORA	
----------------	------------	----------------	--



Predgovor

Željela bih se zahvaliti mentorici doc.dr.sc. Dunji Šamec za vodstvo i strpljenje pri izradi ovog završnog rada, za uloženi trud i strpljenje. Veliko hvala i asistentici mag.biol. Ivi Jurčević Šangut na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela u laboratoriju te pristupačnost i uloženi trud.

Hvala svim dragim osobama koji su bili uz mene prije studiranja, tokom, ali i nakon završenog studiranja.

Zahvala: Ovaj rad izrađen je u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost: „Uloga biflavonoida u biljkama: Ginkgo biloba L. kao modelni sustav“ UIP-2019-04-1018

Sažetak

Upotreba ljekovitog bilja za liječenje i ublažavanje tegoba i stara je koliko i čovječanstvo. Jedan od čestih načina upotrebe je u obliku biljnih infuzija koje se mogu pripremati od različitih dijelova biljaka upotrebom vode različite temperature. Ginko (*Ginkgo biloba* L.) upotrebljava se u modernoj i tradicionalnoj medicini kao ekstrakt ili infuzija za poboljšavanje cirkulacije, kognitivnih performansi i sl. Cilj ovog rada bio je ispitati sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze te antioksidacijsku aktivnost infuzija listova ginka pripremljenih od zelenih i žutih listova. Sposobnost inhibicije acetilkolinesteraze povezuje se s blagotvornim učinkom na različite neurološke bolesti i stanja dok se antioksidacijska aktivnost povezuje s sposobnošću inhibicije slobodnih radikala te sprečavanja mnogih degenerativnih bolesti. Višu sposobnost inhibicije acetilkolinesteraze pokazali su žuti listovi ($27,67 \pm 1,10\%$) u usporedbi s zelenim ($10,31 \pm 3,99\%$). Jednako tako žuti ($7,36 \pm 0,29\%$) listovi pokazali su višu sposobnost inhibicije slobodnih DPPH radikala u usporedbi sa zelenim ($1,80 \pm 0,32\%$). S obzirom na rezultate u ovom radu možemo zaključiti da žuti listovi sadrže više bioaktivnih spojeva, no za točne rezultate valjalo bi napraviti metabolomičke analize.

Ključne riječi: biljne infuzije, ginkgo, inhibicija acetilkolinesteraze, antioksidacijska aktivnost

Summary

The use of medicinal herbs for alleviating symptoms and treating ailments is as old as humanity itself. One of the common methods of usage is in the form of herbal infusions, which can be prepared from various parts of plants using water of different temperatures. Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) is utilized in both modern and traditional medicine as an extract or infusion to improve circulation, cognitive performance, and more. The aim of this study was to investigate the ability to inhibit the enzyme acetylcholinesterase and the antioxidant activity of ginkgo leaf infusions prepared from green and yellow leaves. The ability to inhibit acetylcholinesterase is linked to beneficial effects on various neurological diseases and conditions, while antioxidant activity is associated with the ability to inhibit free radicals and prevent many degenerative diseases. Yellow leaves demonstrated a higher inhibition ability of acetylcholinesterase ($27,67 \pm 1,10\%$) compared to green leaves ($10,31 \pm 3,99\%$). Similarly, yellow leaves ($7,36 \pm 0,29\%$) exhibited a greater ability to inhibit free DPPH radicals compared to green leaves ($1,80 \pm 0,32\%$).

Keywords: herbal infusions, ginkgo, acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity

Popis korištenih kratica

AChE (engl. acetylcholinesterase) – acetilkolinesteraza

ACh (engl. acetylcholine) – acetilkolin

AD (engl. Alzheimer's disease) – Alzheimerova bolest

BChE (engl. butyrylcholinesterase) - butirilkolinesteraze

DPPH - 2,2 – difenil – 1- pikrilhidrazil radikal

Sadržaj

1.	Uvod.....	1
2.	Teorijski dio	2
2.1.	Biljne infuzije	2
2.2.	Biljna infuzija listova ginka	4
2.3.	Acetilkolinesteraza	5
2.4.	Antioksidacijska aktivnost	6
3.	Praktični dio	7
3.1.	Materijali	7
3.1.1.	<i>Kemikalije</i>	8
3.1.2.	<i>Aparatura</i>	8
3.2.	Metode.....	10
3.2.1.	<i>Priprema biljnih infuzija</i>	10
3.2.2.	<i>Određivanje inhibicije acetilkolinesteraze</i>	10
3.2.3.	<i>Određivanje antioksidacijske aktivnosti</i>	12
4.	Analiza rezultata	14
4.1.	Inhibicija aktivnosti acetilkolinesteraze	14
4.2.	Antioksidacijska aktivnost	16
5.	Zaključak.....	18
6.	Literatura.....	19
	Popis slika	21
	Popis tablica.....	22

1. Uvod

Već dugi niz godina, biljne infuzije koriste se u svrhu poboljšanja zdravlja i su kulturnih običaja u zemljama koje se oslanjaju na tradicionalnu medicinu. Ginko (*Ginkgo biloba* L.) je jedna od najstarijih biljnih vrsta čiji se listovi i sjemenke koriste za ublažavanje raznih tegoba, jedina je preživjela dvodomna vrsta iz porodice Ginkgoaceae. Pradomovina ginka je područje Kine i Japana, a danas se uzgaja diljem svijeta. Iako se dugo koristi u kineskoj medicini, prava vrijednost ove 200 milijuna godina stare biljne vrste prepoznata je tek prije 40 godina kada se njegov standardizirani ekstrakt počinje koristiti za poboljšanje kognitivnih performansi. Ginko pokazuje izvanrednu genetičku stabilnost. Vrstu ginka karakterizira veliki genom, dvodomno razmnožavanje i visoka otpornost na čimbenike stresa, uključujući abiotički i biotički stres. Visoku otpornost na stres svjedoči njegovo preživljavanje nakon atomske bombe u Hirošimi. Već 5000 godina poznato je da sjemenke ginka pomažu u liječenju plućnih bolesti, upali mjehura, a listovi ginka pomažu kod srčanih oboljenja i kožnih infekcija. Najpoznatija svojstva ginka su njegovi blagotvorni učinci na kognitivne probleme, ali osim ljekovitih svojstava, plodovi ginka koriste se i za pripremu džemova, posebno za svadbe i druga slavlja [1].



Slika 1: Stablo ginka

Izvor: vlastita fotografija

2. Teorijski dio

2.1. Biljne infuzije

Biljni pripravci dolaze u različitim oblicima što uključuje cijelu biljku ili njezine dijelove, sirup, esencijalna ulja, masti, kapsule, meleme i tablete koje sadrže mljeveni ili praškasti oblik izvorne biljke ili njen osušeni ekstrakt. Jedan od oblika biljnih pripravaka su i biljne infuzije. Biljne infuzije su vodene infuzije morfološki različitih biljnih dijelova (svježih ili suhih) - listova, cvjetova, korijenja, sjemenki ili plodova. Sadrže jednu ili više biljaka koji su nositelji njihova okusa i okrepljujućih svojstava, a pojedine biljne vrste povezuju se i s ljekovitim učincima. Zbog mnogobrojnih ljekovitih učinaka biljne se infuzije koriste za očuvanje te poboljšanja zdravstvenih tegoba već tisućama godina širom svijeta te su dio kulturnih običaja u zemljama koje se oslanjaju na tradicionalnu medicinu. U Kini se još od davnina tradicionalna medicina povezuje sa biljnim infuzijama [2]. Primjeri biljaka koje se pripremaju kao infuzije te način pripreme prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Primjeri biljaka koje se koriste za pripremu infuzija

Biljna vrsta	Dio koji se koristi	Način pripreme	Referenca
Paprena metvica (<i>Mentha piperita</i> L.)	Listovi	Dvije žlice svježih ili jedna žlica suhih listova metvice prelije se čašom vruće vode, zamota te i ostavi da se ohladi	[3]
Kamilica (<i>Matricaria chamomilla</i> L.)	Cvjetovi	Cvjetovi kamilice preliju se vrućom vodom na temperaturi od 90°C, 5 minuta	[3]
Matičnjak (<i>Melissa officinalis</i> L.)	Listovi	Suho lišće matičnjaka prelije se kipućom vodom na temperaturi od 85°C, 5 minuta	[3]
Limunska verbena (<i>Aloysia citrodora</i> Paláu)	Listovi	Sušena verbena prelije se kipućom vodom na temperaturi od 96°C, 6 minuta	[3]
Limunski timijan (<i>Thymus citriodorus</i> (Pers.) Schreb.)	Listovi	Listovi se preliju kipućom vodom na temperaturi od 92°C, 7 minuta	[3]
Limunska trava (<i>Cymbopogon citratus</i> L.)	Stabljika	Nasjeckane stabljike limunske trave preliju se kipućom vodom na temperaturi od 99°C, 8.5 minuta	[3]
Imela (<i>Viscum album</i> L.)	Listovi	Vrećice imele preliju se sa kipućom vodom na temperaturi od 96°C, 5 minuta	[4]

Biljne su infuzije dostupne u raznim oblicima kao što je prah, osušeni dijelovi biljke u/bez čajnih vrećica, cijele osušene biljke, granule, a također se često pripremaju neposredno prije same konzumacije u vrućoj do kipućoj vodi no neke se pripremaju i u hladnoj vodi. Valja razlikovati biljne infuzije i čaj. Čaj je napitak koji je pripremljen od lisnih pupoljaka i mladih izdanaka varijeteta biljne vrste *Camellia sinensis* L. (sinonim *Thea sinensis* L), porodice Theaceae. Dok su biljne infuzije pripremljene od svih ostalih biljnih vrsta. Još jedna razlika jest da biljne infuzije, za razliku od čajeva, ne sadrže kofein [5].

2.2. Biljna infuzija listova ginka

G. biloba L. je vrsta iz porodice Ginkgoaceae. Raste u malim prirodnim populacijama u jugoistočnoj Kini, ali se uzgaja diljem Kine i svijeta. Ova biljna vrsta stara je preko 200 milijuna godina, a razlog tome je izuzetna otpornost na različite klimatske i druge promjene te na štetna djelovanja iz okoliša. Stabla ginka obično dosežu visinu od 20-40 metara i promjer debla od jednog do četiri metra. Formiraju dvije vrste izbojaka: duge izbojke sa široko razmaknutim listovima i pazušnim pupoljcima i kratke izbojke s grozdastim listovima bez internodija i pazušnih pupova. Listovi imaju duge peteljke i karakterističan lepezasti oblik. Svijetlozelene su boje, a u jesen postaju zlatnožute. Kora drveta je sive boje. Cvjetovi su dvodomni i rastu samo na kratkim izbojcima. Oprašivanje se odvija vjetrom od početka travnja do kraja svibnja. Neugodan miris sjemenki ginka razvija se tek kada su potpuno zrele i rezultat su dva hlapljiva spoja, maslačne i heksanske kiseline. Struktura ovojnice sjemena je složena i sastoji se od nekoliko slojeva: mekog, mesnatog vanjskog sloja, tvrdi, kameni srednji sloj, i tanki, membranski unutarnji sloj. Spolna zrelost kod ginka postiže se tek nakon 20 godina [1].

Upravo zbog dugotrajne uporabe u tradicionalnoj medicini, ginko se smatra prirodnim rezervoarom molekula s potencijalom za promicanje zdravlja. Zdravstvena svojstva ginka povezana su s prisutnošću specijaliziranih metabolita poput flavonoida, terpenoida i trilaktona. Prema nedavnim podacima, otkriveno je više od stotinu različitih flavonoidnih struktura u ginku. Javljuju se kao aglikoni, glikozidi, ili dimerni oblici nazvani biflavonoidi. Biflavonoidi su postali središte znanstvene pozornosti posljednjih godina zbog svojih farmakoloških aktivnosti, uključujući protuupalna, antioksidativna, antibakterijska, antivirusna, antidijabetička, antitumorska i citotoksična svojstva, te se mogu koristiti za liječenje Alzheimerove bolesti i Parkinsonove bolesti [1].

Za pripremu biljnih infuzija ginka koriste se mladi zeleni listovi koji se beru u proljeće. Nakon sušenja listovi se pakiraju u vrećice te se tako nalaze na tržišti (primjer Slika 2).



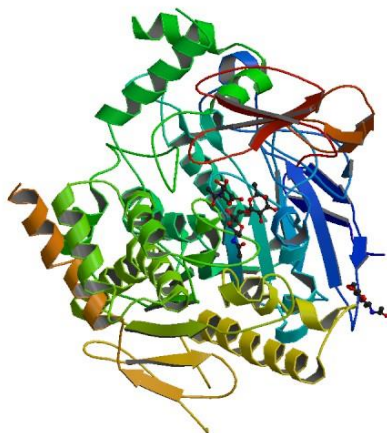
Slika 2. Biljna infuzija ginka

Izvor: <https://www.futunatura.hr/caj-ginko-biloba>

Prema naputku na ambalaži, biljna infuzija ginka priprema se u vreloj ili kipućoj vodi. Doda se 0,25 L vrele ili kipuće vode te odstoji 8-10 minuta. Boja je blijedo žućkasta-zelenkasta ili gotovo prozirna. Ovakav biljni pripravak konzumira se sa medom ili bez [6].

2.3. Acetilkinesteraza

Acetilkinesteraza (engl. acetylcholinesterase, AChE) (Slika 3) je enzim koji katalizira razgradnju acetilkolina na acetatni ion i kolin, koji se vraća u presinapsni živčani završetak za ponovnu proizvodnju acetilkolina [7]. AChE pripada sljedećim skupinama: skupini hidrolaza, podskupini esteraza i potpodskupini hidrolaza estera karboksilnih kiselina. Sintetizira se u mišićima, mozgu i koštanog srži. Od izrazite je važnosti za održavanje homeostaze organizma budući je njezin fiziološki supstrat, acetilkolin (ACh), jedan od prijenosnika živčanih signala [8].



Slika 3. Acetilkinesteraza

Izvor:

https://bs.wikipedia.org/wiki/Acetilholinesteraza#/media/Datoteka:PBB_Protein_ACHE_image.jpg

Kod nekih bolesti kao što je Alzheimerova bolest primijećena je niska razina acetilkolina u mozgu. Stoga prema kolinergičkoj hipotezi inhibicija enzima AchE, čija je uloga hidroliza ACh, može povećati razinu ACh te time pozitivno utjecati na Alzheimerovu i druge neurološke bolesti kao što su senilna demencije, ataksije, miastenije gravis i Parkinsonova bolest [9].

2.4. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidansi spadaju u tvari čija je uloga štititi stanice od oksidacijskog djelovanja izazvanih slobodnim radikalima, a ključan princip po pitanju kako djeluju antioksidansi su reakcije sa slobodnim radikalima. Antioksidansi doniraju svoje elektrone slobodnim radikalima čime ih stabiliziraju, ali sami ne postaju slobodni radikali. Slobodni radikali su izrazito reaktivni spojevi. Oni sadrže u vanjskoj elektronskoj ljusci nesparene elektrone, jedan ili više njih. Njihovo nastajanje temelji se na homolitičkom cijepanju kovalentne veze i svoju reaktivnost duguju prvenstveno nesparenim elektronima. Slobodni radikali upravo zbog svog djelovanja mogu imati štetan utjecaj na stanice u organizmu čovjeka zbog oksidacije čiji rezultat može se odraziti na razgradnju stanične membrane, oštećenje membranskih proteina i raznim mutacijama u DNK. Zbog neravnoteže prisutne u oksido-redukcijskim reakcijama što ide u korist oksidacijskih reakcija dolazi do oslobađanja povećane količine slobodnih radikala [10].

Biljke i hrana biljnog podrijetla može sadržavati različite bioaktivne spojeve koji mogu djelovati kao antioksidansi. Kod određivanja antioksidacijske aktivnosti spojeva, provode se kemijske metode i *in vitro* metode sa stanicama. Kemijske metode koje se koriste kod ispitivanja antioksidacijskog kapaciteta su: ABTS, ORAC, DPPH, FRAP, DMDP, TRAP, PSC, PFRAP, CUPRAC, HORAC, CERACHORAC, testovi za izbjeljivanje te test inhibicije lipidne peroksidacije [11].

Jedna od najčešće upotrebljivanih je metoda po Brand-Williamsu [12]. Metoda po Brand-Williamsu bazira se na redukciji DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala. Smanjenje apsorbancije na određenoj valnoj duljini u toku reakcije prati se spektrofotometrijski. U obliku radikala, DPPH apsorbira pri 515 nm, ali poslije redukcije s antioksidansom ili drugim radikalom apsorpcija izostaje tj. otopina s vremenom polako gubi boju [12].

3. Praktični dio

3.1. Materijali

Za ovaj eksperiment koristili su se liofilizirani listovi ginka uzorkovani 20.5.2022. godine (Slika 4) i 18.10.2022. godine (Slika 5) koji su se usitnili i izvagali po 20 mg u triplikatu na analitičkoj vagi (Adam Equipment, Ujedinjeno Kraljevstvo).



Slika 4. Zelene listovi ginka

Izvor: vlastita fotografija



Slika 5. Žuti listovi ginka

Izvor: vlastita fotografija

3.1.1. Kemikalije

U provedbi praktičnog dijela rada korištene su sljedeće kemikalije:

- Trizma base (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)
- acetilkolinesteraza (acetilkolinesteraza iz *Electrophorus electricus*, Type VI-S, 200-1, 000 units/mg protein)
- klorovodična kiselina (VWR Chemicals, Radnor, Pennsylvania, Sjedinjene Američke Države)
- DTNB 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)
- S-acetiltiokolin jodid (BIOSYNTH, Bratislava, Slovačka)
- 2,2-difenil-1-pikrihidrazil-1-picrylhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- metanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

3.1.2. Aparatura

U provedbi praktičnog dijela rada korištena je sljedeća aparatura (Slika 6):

- analitička vaga,
- centrifuga,
- čitač pločica,
- spektrofotometar.



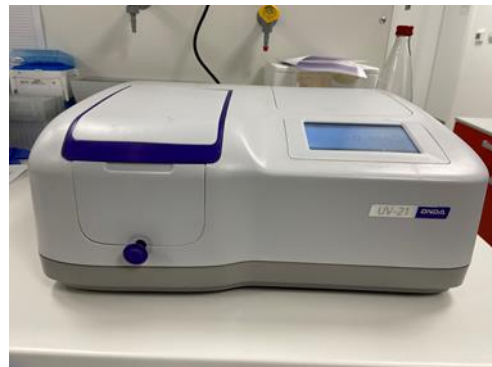
Analitička vaga (Adam Equipment, Ujedinjeno kraljevstvo)



. Centrifuga (LCM-4200R, Biosan, Latvija)



Čitač pločica (Azure biosystems, Dublin, Kalifornija)



Spektrofotometar (ONDA UV-21, Kina)

Slika 6. Korištena aparatura

Izvor: vlastita fotografija

3.2. Metode

3.2.1. Priprema biljnih infuzija

Uzorci listova ginka (proljetni i jesenski) odvagani su u triplikatu po 20 mg (Tablica 2). Destilirana voda zagrijavana je do vrenja te je u svaku epicu s uzorcima otpipetirano 2 ml vode i ostavljeno da sve odstoji 10 minuta. Nakon toga uzorci su centrifugirani 5 minuta na 4000x g te je poslije centrifugiranja odvojen supernatant i stavljen na hlađenje do testiranja inhibicije enzima.

Tablica 2. Mase izvaganih uzoraka ginka

20.5.2022. Izvagana masa (mg)		18.10.2022. Izvagana masa (mg)	
1.tehnička replika	20,05	1.tehnička replika	20,05
2.tehnička replika	20,04	2.tehnička replika	20,05
3.tehnička replika	20,07	3.tehnička replika	20,07

3.2.2. Određivanje inhibicije acetilkolinesteraze

Kemikalije su pripremljene kako slijedi:

Priprema Tris-HCl pufera

Za pripremu 50 mM Tris-pufera odvagano je 6,057 grama Trizma base praha i otopljeno u tikvici od 1 L u ultračistoj vodi na sobnoj temperaturi. Korekcija pH vrijednosti do pH 8 napravljena je 1 M otopinom HCl.

Priprema otopine acetilkolinesteraze koncentracije 0,25 U/mL

Početna koncentracija stock-otopine acetilkolinesteraze bila je 100 U/mL. Za pripremu 1 mL enzima koncentracije 0,25 U/mL iz stock otopine otpipetirano je 2,5 μ L, dok je ostatak volumena nadopunjen puferom.

Priprema Elmanovog reagensa (DTNB):

Za pripremu 50 mL 3 mM otopine Elmanovog reagensa, odvagano je 0,0554 g DTNB i otopljeno u volumetrijskoj tikvici u puferu.

Priprema S-acetiltiokolin jodida

Za pripremu 50 mL 15 mM otopine S-acetiltiokolin jodida, odvagano je 0,2168 g i otopljeno u volumetrijskoj tikvici u puferu.

Inhibicija acetilkolinesteraze testirana je biljnom infuzijom listova ginka različite starosti: 5. (proljetni) i 10. (jesenski) mjesec rasta. Protokol za provođenje inhibicije prilagođen je prema radu Jakimiuk i sur. (2022). Test inhibicije enzima proveden je na mikrotitarskoj pločici s 96 jažica (Slika 7). U prvom stupcu u triplikatu pripremljena je slijepa proba sastavljena od sljedećih komponenti: 50 μ L TRIS-HCl pufera (50 mM, pH 8), 25 μ L acetilkolinesteraze (0,25 U/mL), 125 μ L Elmanovog reagensa – DTNB (3mM). U susjednom stupcima testirane su biljne infuzije, dodajući uzorak biljnih infuzija umjesto volumena pufera kao kod slijepe probe. Nakon predinkubacije svih komponenti 15 minuta na sobnoj temperaturi, dodano je 25 μ L S-acetiltiokolin jodida. Uslijedila je inkubacija 15 minuta na sobnoj temperaturi, a nakon toga i mjerenje apsorbancije na čitaču pločica na 405 nm.

Kada je izmjerena apsorbanciju, izračunat je postotak inhibicije slobodnog radikala po formuli:

$$\% = (Asp - Au / Asp) \times 100$$

(1)

gdje je

Asp = srednja vrijednost slijepe probe

Au = uzorak čaja po 3 tehničke replike za svaki mjesec starosti ginka



Slika 7. Mikrotitarska pločica za provođenje testa inhibicije acetilkolinesteraze

Izvor: vlastita fotografija

3.2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Metoda po Brand-Williamsu, jedna od najzastupljenijih za procjenu antioksidacijske aktivnosti, zasniva se na redukciji DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala. Smanjenje apsorbancije na određenoj valnoj duljini u toku reakcije prati se spektrofotometrijski. U obliku radikala, DPPH apsorbira pri 515 nm, ali nakon redukcije s antioksidansom ili drugim radikalom apsorpcija izostaje tj. otopina s vremenom polako gubi boju [10].

Za pripremu 0,094 mM otopine DPPH na analitičkoj vagi izvagano je 1,85 mg DPPH koji je zatim otopljen u volumetrijskoj tikvici u 50 mL metanola. Tikvica je zatamnjena i ostavljena uz lagano miješanje da odstoje 15 do 20 minuta kako bi se DPPH dobro otopio. Slijepa proba i uzorci infuzije ginka (proljetni i jesenski) pripremljeni su u triplicatu. Slijepa proba pripremljena je tako da je pomiješano 5 μ L destilirane vode i 995 μ L otopine DPPH. Uzorci su pripremljeni na jednak način, ali su umjesto destilirane vode pomiješani uzorci biljnih infuzija ginka. Uzorci su ostavljeni da odstoje 25 do 30 minuta uz povremeno lagano miješanje. Nakon toga uzorci su prebačeni u kivete (Slika 8) te je izmjerena apsorbancija na 515 nm u spektrofotometru.

Postotak inhibicije slobodnog radikala izračunava se prema formuli:

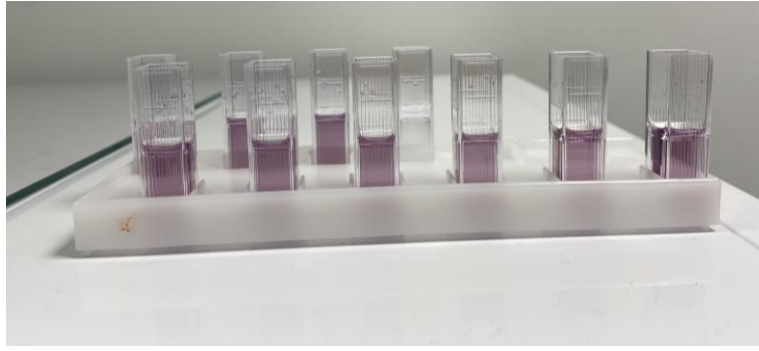
$$\% = (A_{sp-Au}/A_{sp}) \times 100$$

(2)

gdje je

A_{sp} = srednja vrijednost slijepe probe

A_u = uzorak čaja po 3 tehničke replike za svaki mjesec starosti ginka



Slika 8. Kivete s uzorcima za mjerenje antioksidacijske aktivnosti

Izvor: vlastita fotografija

4. Analiza rezultata

4.1. Inhibicija aktivnosti acetilkolinesteraze

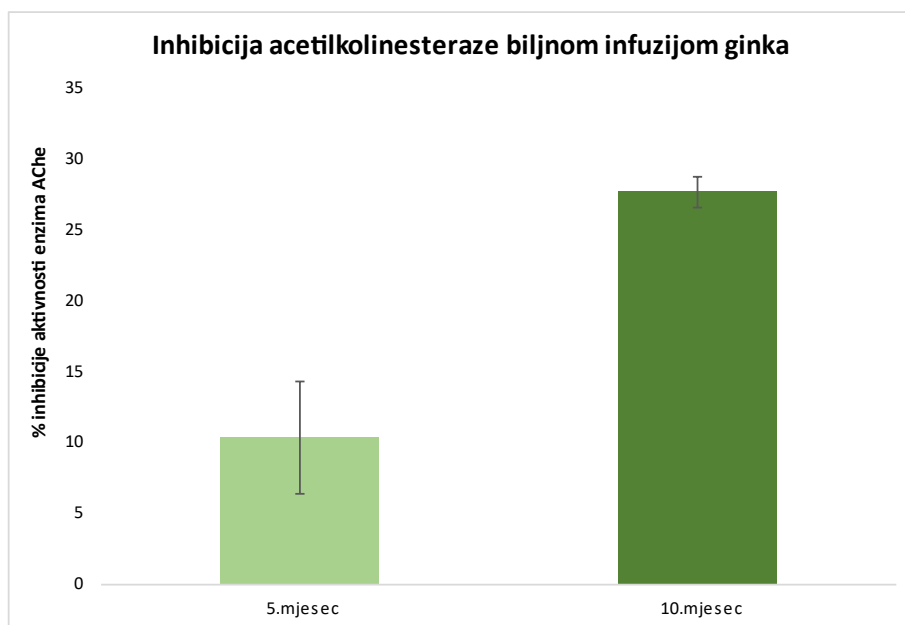
Nakon što je bila izmjerena apsorbancija uzoraka na 405 nm i nakon izračuna prema dobivenim vrijednostima apsorbancije (Tablica 3), rezultati su pokazali kako dolazi do inhibicije aktivnosti enzima acetilkolinesteraze uslijed dodatka biljne infuzije ginka (Tablica 4, Slika 9).

Tablica 3. Podaci izmjerene apsorbancije na 405 nm s čitača pločica

Uzorak	Slijepa proba	5. mjesec	10. mjesec
A	1,549	1,471	1,149
B	1,575	1,377	1,117
C	1,560	1,353	1,122
Srednja vrijednost	1,561		

Tablica 4. Vrijednosti inhibicije [%] acetilkolinesteraze infuzijom ginka

Uzorak	Mjerenje inhibicije po formuli $\% = (\text{Asp} - \text{Au}/\text{Asp}) \times 100$	
	5. mjesec	10. mjesec
A	5,786	26,409
B	11,806	28,459
C	13,343	28,138
Srednja vrijednost	10,312	27,669



Slika 9. Inhibicija acetilkolinesteraze [%] biljnim infuzijama ginka

Iz rezultata se iščitava kako biljna infuzija listova ginka iz 10. mjeseca ima veću inhibitornu aktivnost u odnosu na infuziju listova iz 5. mjeseca. Ginko iz 10. mjeseca ima 27,67% inhibitornog djelovanja na enzim acetilkolinesterazu, dok ginko iz 5. mjeseca ima 10,31% (Slika 9). Ti rezultati ukazuju na činjenicu da žuti listovi sadrže više spojeva koji djeluju na inhibiciju acetilkolinesteraze. Kobus-Cisowska i sur. [13] također su ispitali inhibiciju acetilkolinesteraze kod zelenih i žutih listova ekstrakta ginka ekstrahiranih puferom i etil acetatom. U njihovom radu također su žuti listovi pokazivali veću inhibiciju enzima acetilkolinesteraze. Prema dostupnoj literaturi jesenski, žuti listovi, sadrže više dimernih spojeva flavonoida, biflavonoida, koji im i daju karakterističnu žutu boju, no u medicinske svrhe se najčešće koriste zeleni mladi listovi [1, 13].

4.2. Antioksidacijska aktivnost

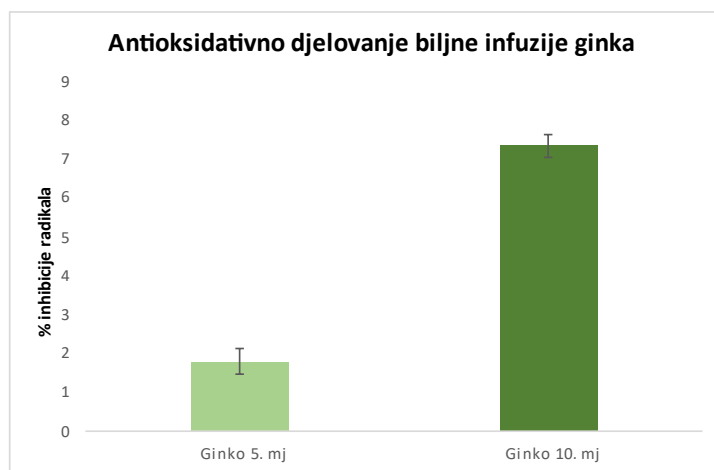
Nakon izvođenja eksperimenta uzorci su bili prebačeni u kivete i izmjerena je apsorbancija na spektrofotometru na 515 nm. Dobivena mjerenja apsorbancije prikazana su u Tablici 5. Dobiveni postoci inhibicije slobodnih radikala biljnom infuzijom ginka prikazani su u Tablici 6. i na Slici 10.

Tablica 5. Podaci dobiveni mjerenjem apsorbancije na 515 nm na spektrofotometru

Uzorak	Slijepa proba	5. mjesec	10. mjesec
A	1,105	1,092	1,029
B	1,110	1,085	1,023
C	1,110	1,088	1,028
Srednja vrijednost	1,108		

Tablica 6. Postotci inhibicije slobodnih radikala s biljnom infuzijom ginka

Mjerenje inhibicije po formuli $\% = (Asp - Au/Asp) \times 100$		
Uzorak	5. mjesec	10. mjesec
A	1,474	7,158
B	2,105	7,699
C	1,835	7,248
Srednja vrijednost	1,805	7,368



Slika 10. Postotak inhibicije DPPH radikala

Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da infuzija listova ginka iz 10. mjeseca pokazuje veću antioksidativnu aktivnost. Infuzija listova ginka iz 10. mjeseca ima 7,36% antioksidativnog djelovanja, dok ginko iz 5. mjeseca ima svega 1,80% (Tablica 5, Slika 13) na inhibiciju slobodnih DPPH radikala. Naši rezultati slični su kao i u radu Kobus-Cisowska i sur. [13] gdje su također ekstrakti žutih listova pokazali višu antioksidacijsku aktivnost te je prema autorima to uzrok višeg sadržaja flavonoidnih spojeva.

5. Zaključak

Biljne su infuzije pripremaju se u vodi različite temperature od različitih dijelova osušenih ili svježih biljaka a dostupne su u raznim oblicima kao što je prah, osušeni dijelovi biljke u/bez čajnih vrećica, cijele osušene biljke, granule. Valja razlikovati biljne infuzije i čaj. Čaj je napitak koji je pripremljen od lisnih pupoljaka i mladih izdanaka varijeteta biljne vrste *Camellia sinensis* L. Dok su biljne infuzije pripremljene od svih ostalih biljnih vrsta. Jedna od biljaka od koje se pripremaju infuzije i koriste za tretiranje različitih stanja jest ginko. Za pripremu infuzija najčešće se koriste mladi zeleni listovi. U ovom radu ispitali smo sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze te antioksidacijsku aktivnost infuzija listova ginka pripremljenih od zelenih i žutih listova. Sposobnost inhibicije acetilkolinesteraze povezuje se s blagotvornim učinkom na različite neurološke bolesti i stanja dok se antioksidacijska aktivnost povezuje s sposobnošću inhibicije slobodnih radikala te sprečavanja mnogih degenerativnih bolesti.

Višu sposobnost inhibicije acetilkolinesteraze pokazali su žuti listovi ($27,67 \pm 1,10$ %) u usporedbi s zelenim ($10,31 \pm 3,99\%$). Jednako tako žuti ($7,36 \pm 0,29\%$) listovi pokazali su višu sposobnost inhibicije slobodnih DPPH radikala u usporedbi sa zelenim ($1,80 \pm 0,32\%$). Takvi rezultati u skladu su s literaturnim podacima [13] te su vjerojatno posljedica veće količine fenolnih spojeva u žutim listovima koji im i daju karakteristično žuto obojenje. Prema našim rezultatima i žuti listovi mogli bi se koristiti za pripremu infuzija, međutim za točnu provjeru količine fitokemikalija i moguće prisutnih toksičnih spojeva u njima potrebno bi bilo napraviti identifikaciju i kvantifikaciju pojedinačnih bioaktivnih komponenata.

6. Literatura

- [1] D. Šamec, E. Karalija, E. Dahija, S.T.S. Hassan (2022): Biflavonoids: Important Contributions to the Health Benefits of Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.), *Plants*, 11, 1381.
- [2] C. Ravikumar (2014) Review on herbal teas. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, Vol. 6(5), 2014, 236-238
- [3] C. Rocha, A. Pinto Moura, D. Pereira, R. Costa Lima, L.M. Cunha (2021): Costa Lima R.,Cunha L.M. (2021): Consumer-Led Adaption of the Essense Profile For Herbal Infusions. *Foods* 10(3), 684
- [4] S. Jager, M. Beffert, K. Hoppe, D. Nadbrezeny, B. Frank, A.Scheffler (2011): Preparation of Herbal Tea as Infusion or by Maceration at Room Temperature Using Mistletoe Tea as an Example. *Sci Pharm*; 79.No 1., str. 145–155
- [5] A. Chandrasekara , F. Shahidi (2018); Herbal beverages: Bioactive compounds and their role in disease risk reduction – A review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* Vol. 8, No.4, str. 451-458
- [6] <https://gospodarski.hr/rubrike/ljekovito-bilje-rubrike/za-bolje-raspolozenje-i-pamcenje-ginko/>, dostupno: 26.7.2023.
- [7] <http://struna.ihjj.hr/naziv/acetilkinesteraza/26416/>, dostupno: 27.7.2023.
- [8] A. Bosak, M. Kalinić, Z. Kovarik: *Archives of the Industrial Hygiene and Toxicology*, Vol. 62, str. 175-190
- [9] A.P. Murray, M. Belen Faraoni, M.J. Castro, N.P. Alza, V. Cavallaro V. (2013): Natural AChE Inhibitors from Plants and their Contribution to Alzheimer’s Disease Therapy. *Current Neuropharmacology*, Vol. 11, No. 4, str. 388-413
- [10] D. Gupta (2015): Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, Vol 6., No 2., str. 546-566
- [11]] C. Bender, S. Graziano (2015): Evaluation of the antioxidant activity of foods in human cells. *Nutrafoods* 79–85.
- [12] W. Brand Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset (1995); Use Of A Free Radical Method To

Evaluate Antioxidant Activity, Vol.28, No.1

[13] J. Kobus-Cisowska, M. Dziedziński, O. Szczepaniak, W. Kusek, D: Kmiecik , M. Ligaj, A. Telichowska, S: Byczkiewicz, P. Szulc, D. Szwajgier. (2020): Phytocomponents and evaluation of acetylcholinesterase inhibition by Ginkgo biloba L. leaves extract depending on vegetation period, CyTA - Journal of Food, 18:1, 606-615.

Popis slika

Slika 1: Stablo ginka

Slika 2: Biljna infuzija ginka

Slika 3: Acetilkolinesteraza

Slika 4: Zeleni listovi ginka

Slika 5: Žuti listovi ginka

Slika 6: Korištena aparatura

Slika 7: Mikrotitarska pločica za provođenje testa inhibicije acetilkolinesteraze

Slika 8: Kivete s uzorcima za mjerenje antioksidacijske aktivnosti

Slika 9: Inhibicija acetilkolinesteraze [%] biljnim infuzijama ginka

Slika 10: Postotak inhibicije DPPH radikala

Popis tablica

Tablica 1: Primjeri biljaka koje se koriste za pripremu infuzije

Tablica 2: Mase izvaganih uzoraka ginka

Tablica 3: Podaci izmjerene apsorbancije na 405 nm s čitača pločica

Tablica 4: Vrijednosti inhibicije [%] acetilkolinesteraze infuzijim ginka

Tablica 5: Podaci dobiveni mjerenjem apsorbancije na 515 nm na spektrofotometru

Tablica 6: Postotci inhibicije slobodnih radikala s biljnom infuzijom ginka

Sveučilište Sjever

IZJAVA
AUTORSTVA



SVEUČILIŠTE
SJEVER

IZJAVA O AUTORSTVU

Završni/diplomski rad isključivo je autorsko djelo studenta koji je isti izradio te student odgovara za istinitost, izvornost i ispravnost teksta rada. U radu se ne smiju koristiti dijelovi tuđih radova (knjiga, članaka, doktorskih disertacija, magistarskih radova, izvora s interneta, i drugih izvora) bez navođenja izvora i autora navedenih radova. Svi dijelovi tuđih radova moraju biti pravilno navedeni i citirani. Dijelovi tuđih radova koji nisu pravilno citirani, smatraju se plagijatom, odnosno nezakonitim prisvajanjem tuđeg znanstvenog ili stručnoga rada. Sukladno navedenom studenti su dužni potpisati izjavu o autorstvu rada.

Ja, SARA GOSPOČIĆ (ime i prezime) pod punom moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću, izjavljujem da sam isključivi autor/ica ~~završnog/diplomskog~~ (obrisati nepotrebno) rada pod naslovom NEREDNE INHIBICIJNE ENZIMA ACETILKOLINESTERAZE! (upisati naslov) te da u navedenom radu nisu na nedozvoljeni način (bez pravilnog citiranja) korišteni dijelovi tuđih radova.

Student/ica:
(upisati ime i prezime)

Sara Gospočić
(vlastoručni potpis)

Sukladno čl. 83. Zakonu o znanstvenoj djelatnosti i visokom obrazovanju završne/diplomske radove sveučilišta su dužna trajno objaviti na javnoj internetskoj bazi sveučilišne knjižnice u sastavu sveučilišta te kopirati u javnu internetsku bazu završnih/diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice. Završni radovi istovrsnih umjetničkih studija koji se realiziraju kroz umjetnička ostvarenja objavljuju se na odgovarajući način.

Sukladno čl. 111. Zakona o autorskom pravu i srodnim pravima student se ne može protiviti da se njegov završni rad stvoren na bilo kojem studiju na visokom učilištu učini dostupnim javnosti na odgovarajućoj javnoj mrežnoj bazi sveučilišne knjižnice, knjižnice sastavnice sveučilišta, knjižnice veleučilišta ili visoke škole i/ili na javnoj mrežnoj bazi završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice, sukladno zakonu kojim se uređuje znanstvena i umjetnička djelatnost i visoko obrazovanje.

5.8%

PlagScan by Turnitin Results of plagiarism analysis from 09/06/2023, 01:21 PM


Sara Gospočić.docx





Date: 09/06/2023, 01:18 PM


* All sources 44 | Internet sources 19 | Own documents 2 | Plagiarism Prevention Pool 23


<input checked="" type="checkbox"/>	[2]	zir.nsk.hr/islandora/object/pbf:3689/datastream/PDF/view	1.5%	6 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[3]	zir.nsk.hr/islandora/object/ktfst:95/datastream/PDF/view	0.7%	3 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[4]	core.ac.uk/download/pdf/197794356.pdf	0.8%	4 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[5]	www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3097500/	0.5%	2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[6]	repositorij.pmf.unizg.hr/islandora/object/pmf:5881/datastream/PDF/download	0.6%	3 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[7]	from a PlagScan document dated 2022-06-21 06:20	0.6%	3 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[8]	zir.nsk.hr/islandora/object/ktfst:562/datastream/PDF/view	0.6%	2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[9]	from a PlagScan document dated 2019-05-15 00:39	0.5%	3 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[10]	from a PlagScan document dated 2020-05-01 07:47	0.4%	3 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[11]	zir.nsk.hr/islandora/object/pbf:4193/datastream/PDF/download	0.4%	3 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[12]	from a PlagScan document dated 2022-05-17 08:53	0.4%	3 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[13]	www.researchgate.net/publication/292980647_Croatian-English_Dictionary_of_Physiology	0.4%	1 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[14]	www.thespruceeats.com/how-to-make-an-herbal-infusion-1762142	0.4%	3 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[15]	apps.unizg.hr/rektorova-nagrada/javno/radovi/1635/preuzmi	0.4%	2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[16]	core.ac.uk/download/pdf/162649993.pdf	0.4%	3 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[17]	www.researchgate.net/publication/51170137_Preparation_of_Herbal_Tea_as_Infusion_or_by_Maceration_at_Room_Temperature_Using_Mistletoe_Tea_as_an_E	0.3%	1 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[18]	from a PlagScan document dated 2021-07-17 14:09	0.4%	2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[19]	from a PlagScan document dated 2023-04-17 12:20	0.4%	2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[20]	from a PlagScan document dated 2022-05-27 09:12	0.4%	2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[21]	from a PlagScan document dated 2022-05-17 08:35	0.4%	2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[22]	from a PlagScan document dated 2022-01-26 03:00	0.4%	2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[23]	from a PlagScan document dated 2021-07-26 12:01	0.4%	2 matches 1 documents with identical matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[25]	from a PlagScan document dated 2020-11-18 10:26	0.4%	2 matches
<input checked="" type="checkbox"/>	[26]	from a PlagScan document dated 2020-11-18 10:15	0.4%	2 matches


- [27]  from a PlagScan document dated 2019-03-14 02:09
0.4% 2 matches


- [28]  from a PlagScan document dated 2019-02-27 05:33
0.4% 2 matches


- [29]  from a PlagScan document dated 2018-05-14 03:43
0.4% 2 matches


- [30]  from a PlagScan document dated 2017-07-11 13:41
0.4% 2 matches


- [31]  from a PlagScan document dated 2022-05-17 08:47
0.3% 2 matches


- [32]  from a PlagScan document dated 2020-08-08 07:05
0.3% 2 matches


- [33]  from a PlagScan document dated 2019-03-29 07:45
0.3% 2 matches


- [34]  core.ac.uk/download/pdf/149965183.pdf
0.2% 2 matches


- [35]  from a PlagScan document dated 2020-07-22 09:50
0.2% 1 matches


- [36]  www.unin.hr/2023/08/objavljuje-se-399/
0.3% 1 matches


- [37]  core.ac.uk/download/pdf/197898017.pdf
0.2% 1 matches


- [38]  zir.nsk.hr/islandora/object/kfst:96/datastream/PDF/download
0.2% 1 matches


- [39]  zir.nsk.hr/islandora/object/pmf:3813/preview
0.1% 1 matches

- [40]  from a PlagScan document dated 2019-03-27 08:21
0.1% 1 matches

- [41]  hr.healthy-food-near-me.com/leocarpus-fragile-description-and-photo/
0.2% 1 matches

- [42]  core.ac.uk/download/pdf/270119276.pdf
0.1% 1 matches

- [43]  from a PlagScan document dated 2019-03-11 14:53
0.2% 1 matches

- [44]  from a PlagScan document dated 2019-03-10 12:10
0.2% 1 matches

34 pages, 4275 words

PlagLevel: 5.8% selected / 7.9% overall

39 matches from 45 sources, of which 19 are online sources.

Settings

Data policy: *Compare with web sources, Check against my documents, Check against my documents in the organization repository, Check against organization repository, Check against the Plagiarism Prevention Pool*

Sensitivity: *Medium*

Bibliography: *Consider text*

Citation detection: *Reduce PlagLevel*

Whitelist: *--*