

Utjecan načina sušenja na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidacijsku aktivnost listova ginka

Pavličević, Lana

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:122:804311>

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

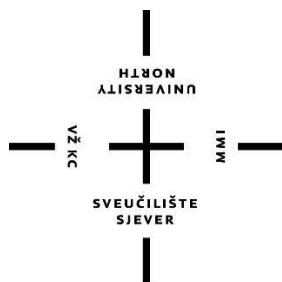
Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

[University North Digital Repository](#)





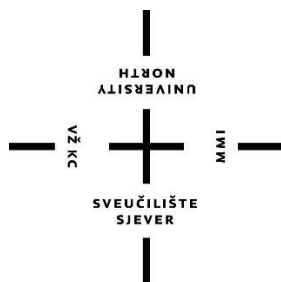
Sveučilište Sjever

Završni rad br: 53/PREH/2023

Utjecaj načina sušenja na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidacijsku aktivnost listova ginka

Lana Pavličević, 0336042293

Koprivnica, srpanj 2023. godine



Sveučilište Sjever

Prehrambena tehnologija

Završni rad br. 53/PREH/2023

Utjecaj načina sušenja na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidacijsku aktivnost listova ginka

Student

Lana Pavličević, 0336042293

Mentor

Doc.dr.sc. Dunja Šamec

Koprivnica, srpanj 2023. godine

Prijava završnog rada

Definiranje teme završnog rada i povjerenstva

ODJEL	Odjel za prehrambenu tehnologiju		
STUDIJ	preddiplomski stručni studij Prehrambena tehnologija		
PRISTUPNIK	Lana Pavličević	MATIČNI BROJ	0336042293
DATUM	28.06.2023	KOLEGIJ	Funkcionalna svojstva hrane
NASLOV RADA	Utjecaj načuna sušenja na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidacijsku aktivnost listova ginka		
NASLOV RADA NA ENGL. JEZIKU	Effect of drying method on total polyphenols, flavonoids, and antioxidant activity of ginkgo leaves		
MENTOR	Dunja Šamec	ZVANJE	doc.dr.sc.
ČLANOVI POVJERENSTVA	1. izv.prof.dr.sc.Bojan Šarkanj, predsjednik 2. Ivana Dodlek Šarkanj, predavaica, članica 3. doc.dr.sc.Dunja Šamec, mentorica 4. izv.prof.dr.sc. Natalija Uršulin Trstenjak, zamjenica 5.		

Zadatak završnog rada

BROJ	53/PREH/2023
OPIS	Zadatak predloženog završnog rada je ispitati kako na in sušenja listova ginka utječe na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida te antioksidacijsku aktivnost.

ZADATAK URUČEN

11.7.2023

POTPIS MENTORA

SVEUČILIŠTE
SJEVER



Predgovor

Zahvaljujem se mentorici doc.dr.sc. Dunji Šamec na strpljenju i pomoći pri izradi ovog završnog rada. Također se zahvaljujem i asistentici mag.biol. Ivi Jurčević Šangut na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela u laboratoriju.

Sažetak

Listovi ginka (*Ginko biloba* L.) upotrebljavaju se u tradicionalnoj medicini za poboljšanje kognitivnih sposobnosti te za tretiranje krvožilnih bolesti. Postoje različite aktivne komponente koje doprinose ljekovitim svojstvima ginka, a neke od njih se svrstavaju u skupinu polifenola, posebice flavonoida koji mogu imati antioksidacijsko djelovanje. Listovi ginka koji se koriste u tradicionalnoj medicini dobivaju se sušenjem svježih listova. U ovom radu smo ispitali učinak tri vrste različitog sušenja listova na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidacijsku aktivnost. Svježi listovi sušeni su na zraku, u sušioniku s cirkulacijom zraka te u liofilizatoru nakon čega su usitnjeni, pripremljeni su ekstrakti u 80% metanolu te izmjeren sadržaj ukupnih polifenola Folin-Ciocaltea metodom, flavonoida metodom s Al_2Cl_3 te antioksidacijska aktivnost DPPH metodom. Sadržaj ukupnih polifenola nije se značajno razlikovao u uzorcima sušenim u liofilizatoru ($44.47 \pm 1.45 \mu\text{g GAE/mg dw}$) te u sušioniku ($43.13 \pm 0.43 \mu\text{g GAE/mg dw}$) dok je kod listova sušenih na zraku bio nešto niži ($39.36 \pm 1.51 \mu\text{g GAE/mg dw}$). Sadržaj ukupnih flavonoida pokazao je drugačiji trend te je najviši sadržaj izmjeren kod listova sušenih u sušioniku ($4.15 \pm 0.31 \mu\text{g CE/mg dw}$), nešto niži u listovima sušenim na zraku ($4.07 \pm 0.34 \mu\text{g CE/mg dw}$) te najniži u listovima sušenim u liofilizatoru ($3.41 \pm 0.21 \mu\text{g CE/mg dw}$). Za antioksidacijsku aktivnost također nisu uočene značajne razlike. S obzirom na naše rezultate možemo zaključiti da način sušenja može utjecati na sadržaj polifenolnih komponenti u listovima ginka te time potencijalno i na ljekovitost samog pripravka te svakako treba prilikom pripreme listova za medicinsku upotrebu voditi računa o načinu sušenja.

Ključne riječi: ginko, *Ginkgo biloba* L., sušenje, ukupni polifenoli, ukupni flavonoidi

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.

Summary

Ginkgo leaves (*Ginkgo biloba* L.) are used in traditional medicine to improve cognitive abilities and treat vascular diseases. There are several active components that contribute to the healing properties of ginkgo, and some of them belong to the group of polyphenols, especially flavonoids, which may have antioxidant effects. Ginkgo leaves used in traditional medicine are obtained by drying the fresh leaves. In this work, we studied the effects of three different types of leaf drying on the content of total polyphenols, flavonoids and antioxidant activity. Fresh leaves were dried in air, in a dryer with air circulation, and in a freeze dryer. They were then crushed, extracts were prepared in 80% methanol, and the content of total polyphenols was measured by the Folin-Ciocalteu method, flavonoids by the Al_2Cl_3 method, and antioxidant activity by the DPPH method. The content of total polyphenols did not differ significantly between samples dried in a freeze dryer ($44.47 \pm 1.45 \mu\text{g GAE/mg dw}$) and in a dryer ($43.13 \pm 0.43 \mu\text{g GAE /mg dw}$), while it was slightly lower in air-dried leaves ($39.36 \pm 1.51 \mu\text{g GAE /mg}$). The content of total flavonoids showed a different trend, and the highest content was measured in dryer-dried leaves ($4.15 \pm 0.31 \mu\text{g CE /mg dw}$), slightly lower in air-dried leaves ($4.07 \pm 0.34 \mu\text{g CE /mg dw}$), and the lowest in leaves dried in a freeze dryer ($3.41 \pm 0.21 \mu\text{g CE /mg dw}$). No significant differences were also found in antioxidant activity. In view of our results, we can conclude that the drying method may influence the content of polyphenolic constituents in ginkgo leaves and thus possibly the medicinal properties of the preparation itself. Drying method should definitely be taken into account when preparing leaves for medicinal purposes.

Key words: ginkgo, *Ginkgo biloba* L., drying, total polyphenols, total flavonoids

Popis korištenih kratica

LDL- lipoproteini male gustoće

1. Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski dio.....	3
2.1. <i>Sušenje</i>	3
2.2. <i>Fitokemikalije</i>	4
2.3. <i>Ginko (Gingo biloba L.)</i>	7
2.3.1 <i>Botaničke karakteristike i rasprostranjenost</i>	7
2.3.2. <i>Upotreba u tradicionalnoj i suvremenoj medicini</i>	8
3. Praktični dio.....	10
3.2. Materijali i metode.....	10
3.2.1. <i>Uzorkovanje lišća ginka</i>	12
3.2.2. <i>Sušenje</i>	12
3.2.3. <i>Ekstrakcija</i>	12
3.2.4. <i>Određivanje ukupnih polifenola</i>	13
3.2.5. <i>Određivanje ukupnih flavonoida</i>	14
3.2.6. <i>Određivanje antioksidativne aktivnosti</i>	14
4. Analiza rezultata	16
4.1. <i>Ukupni polifenoli</i>	16
4.2. <i>Ukupni flavonoidi</i>	18
4.3. <i>Antioksidacijska aktivnost</i>	20
Zaključak	22
Literatura	23

1. Uvod

Ginko (*Ginkgo biloba* L.) listopadno je drvo iz porodice Ginkgoaceae. Najstariji pronađeni fosili stari su preko 200 milijuna godina te se još naziva i „živi fosil“. Nativan je za Aziju, no proširio se po ostalim dijelovima svijeta kao ornamentalno drvo te se danas nalazi u mnogim europskim i američkim parkovima te botaničkim vrtovima. Poznat je po svojim intenzivno žutim listovima u jesen (Slika 1.) [1].



Slika 1: Drvo ginka u jesen

Izvor: vlastita fotografija

U mnogim kulturama ginko se koristi u medicini i prehrani, ali kao i religijski znak. Listovi se koriste u tradicionalnoj medicini, sjemenke ginka koriste se kao poslastica, ujedno se od njih radi ulje te se koriste i u medicini. Drvo sa svojim prepoznatljivim lišćem dobilo je simbolično značenje u budizmu, daoizmu i konfucijanizmu. Iz Kine i Koreje proširio se i u Japan te postao dio religije šintoizma. Ginko je u Europi postao poznat zbog trgovačkih kolonija iz Azije. Sjeme je preneseno u Veliku Britaniju, od koje se rasprostranilo i Sjevernom Americom [2].

U suvremeno doba koristi se u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Najznačajniji dio je list koji, da bi se mogao koristiti, mora se prvo osušiti. Sušenje je jedan od najstarijih postupaka konzerviranja hrane koji je dostupan čovječanstvu još od prapovijesti. Prvi načini sušenja koje

je čovjek koristio bili su sunce, vjetar i dim s ciljem produljenja roka trajanja namirnica. Glavni cilj sušenja jest smanjenje udjela vode kako bi se usporilo ili izbjeglo kvarenje hrane od strane mikroorganizama. Kod sušenja vrlo je važno obratiti pozornost na izlaganje suncu, temperaturu i vremensko izlaganje. Pravilan način sušenja važan je kako bi se očuvale bitne bioaktivne komponente [3].

2. Teorijski dio

2.1. Sušenje

Cilj tehnološkog procesa sušenja jest eliminirati vlagu i spriječiti enzimske i kemijske reakcije koje mogu izazvati razgradnju tvari od interesa ili pak kvarenje. Biljni materijal koji se mora duže čuvati se suši do vlažnosti ispod 14%, a ako se radi o kraćem čuvanju sirovina se može sušiti do ispod 16%, no to naravno ovisi o vrsti biljnog materijala. Glavni cilj sušenja, osim eliminacije vlage, jest očuvanje organoleptičkih svojstava i aktivnih tvari u biljkama. Sušenje može biti u domaćinstvu i industrijsko. Sušenje na zraku u domaćinstvu ovisno je o vremenskim uvjetima. Sakupljene biljke se mogu poslagati na tekstilnu ili papirnu podlogu te sušiti u što kraćem vremenu u sjeni ili toplim i dobro prozračenim prostorijama. Važno je izbjeći bilo kakvu vlagu koja može utjecati na vrijeme i kvalitetu sušenja. Što se tiče industrijskog sušenja, ono može biti u diskontinuiranim, polukontinuiranim, kontinuiranim i šaržnim sušarama koje tehnički mogu biti izvedene kao konvekcijske, kontaktne, vakuumske, radijacijske, visokofrekventne te sušare u kojima se sušenje provodi smrzavanjem [4].

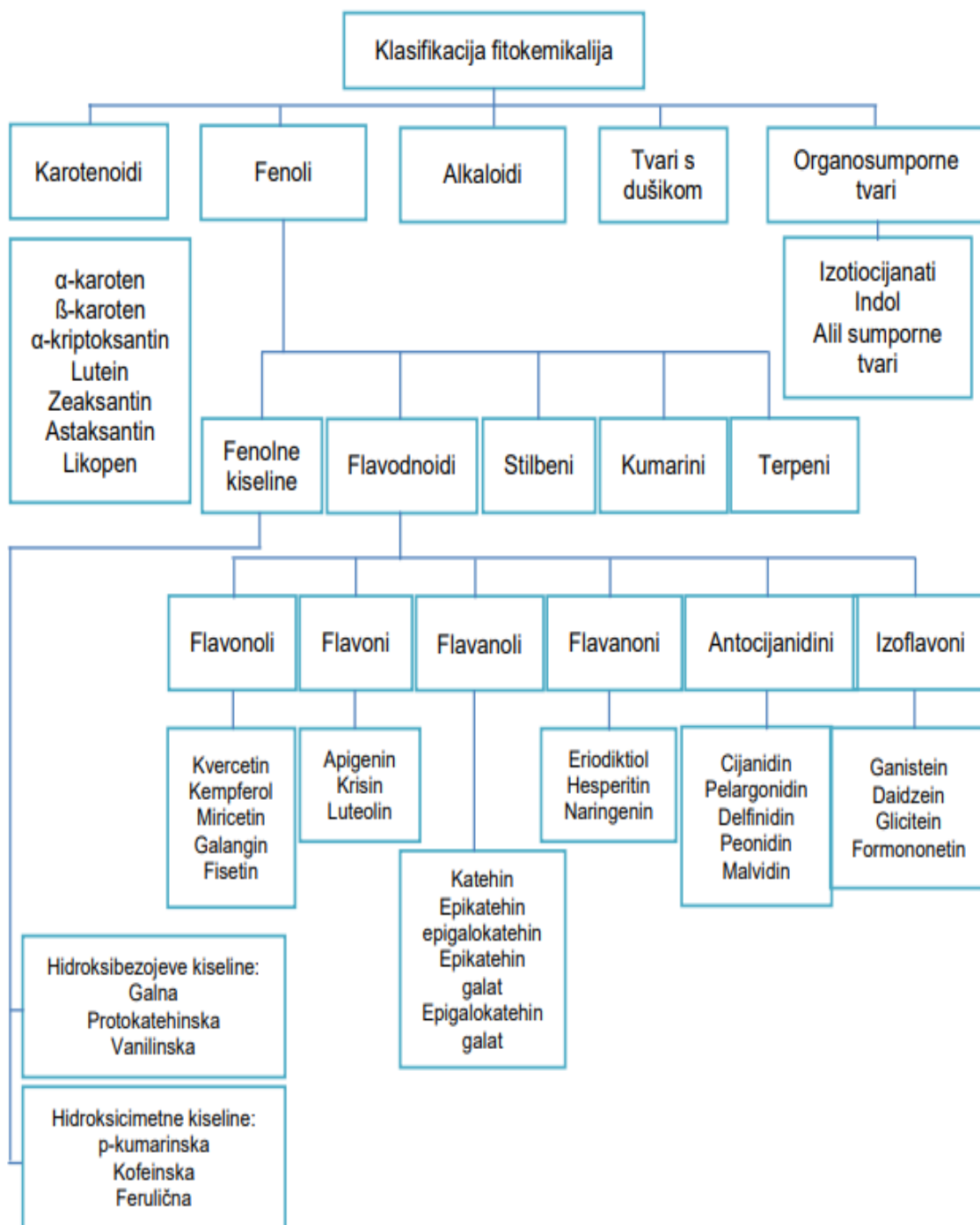
Sušenje prethodnim smrzavanjem provodi se u liofilizatoru. Koristi se za sušenje tvari koje su osjetljive na toplinu. Načinom sušenja u liofilizatoru očuvaju se strukture bjelančevina, biološki aktivni spojevi te žive mikrobnе stanice. Materijali se prvo ohlade na temperaturu do -10 i -40 °C. Zatim se iz njih uklanja voda sublimacijom u visokom vakuumu. Moguća su oštećenja biološki aktivnih sastojaka zbog smrzavanja (kristalići leda u stanicama) ili kod sušenja (denaturacija toplinom). To se sprječava primjenom zaštitnih sredstava kao što su glicerol, saharoza, laktoza. Osušeni su proizvodi vrlo trajni [4].

Laboratorijski sušionik je uređaj koji se obično koristi za uklanjanje vlage i otapala iz uzoraka u kontroliranom okruženju. Mogu funkcionirati pomoću metoda grijanja konvekcijom ili zračenjem, poput infracrvenog ili mikrovalnog zračenja. Svrha toplinskog sušionika je brzo i učinkovito sušenje uzoraka na konzistentnu težinu, uz smanjenje mogućnosti kontaminacije ili oštećenja uzorka. Za upotrebu su dostupni različiti tipovi toplinskih sušilica, od malih stolnih modela prikladnih za svakodnevnu upotrebu do većih industrijskih modela namijenjenih za ispitivanje visoke propusnosti. Korištenje toplinskih sušilica u laboratoriju učinilo je proces sušenja učinkovitijim, preciznijim i ponovljivim [4].

2.2. Fitokemikalije

Fitokemikalije su biološki aktivne komponente biljaka, a dolazi od grčke riječi *phytos* što znači biljka. Uključuju polifenole, flavonoide, izoflavonoide, fenole, antocijane, dušikove spojeve, derivate klorofila, beta karoten (i druge karotenoide), alkaloidne, kumarine, terpenoide i dr. Skupina nekih fitokemikalija prikazana je na Slici 2. Oni su često koncentrirani u vanjskim slojevima različitih biljaka, pa samim time daju različite boje biljkama. U biljkama imaju razne uloge, da štite biljku od mikroba, insekata, oksidativnih procesa. Neke sudjeluju u stvaranju energije, a neke su biljni hormoni. Osim uloge u biljkama, imaju i blagotvorne učinke i kod ljudi nakon konzumacije biljaka bogatih fitokemikalijama. Mogu usporiti starenje stanica, stimulirati rad enzima, spriječiti štetne reakcije itd. U ulozi hormona preveniraju nastanak karcinoma, sprečavaju oksidaciju LDL čestica, štite od srčanog i moždanog udara. Sprječavanjem nepoželjnih oksidacijskih procesa smanjuju rizik za nastanak tumora, imaju antibakterijski učinak, smanjuju rizik od ateroskleroze i smanjuju krvni tlak, štite od štetnih posljedica duhanskog dima i od kroničnih plućnih bolesti (astma, bronhitis, emfizem) i sl. [4].

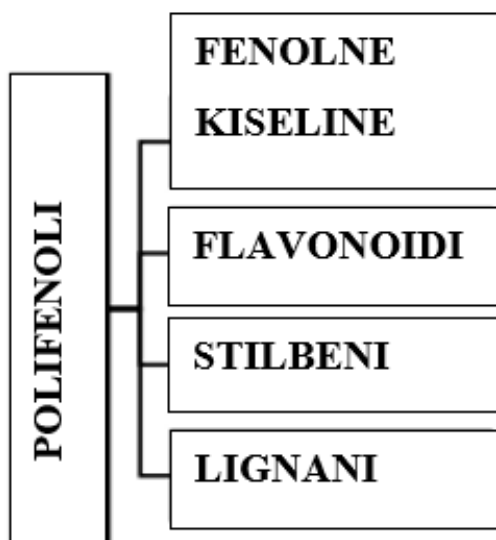
U prehrambenoj industriji koriste se kao dodaci prehrani i kao konzervansi. U novije doba ljudi vrlo često izbjegavaju sintetičke konzervanse zbog sigurnosnih i tehnoloških problema, podiže se svijest potrošača o korištenju biljnih supstituta te su stekli sve veću popularnost. Primjenjuju se u konzerviranju hrane zbog antimikrobnih i antioksidativnih svojstava te kao sredstva protiv posmeđivanja i mogu se koristiti i kao pojačivači okusa, boje i mirisa hrane [4].



Slika 2: Shema klasifikacije fitokemikalija

Izvor: Alibabić i Mujić [4]

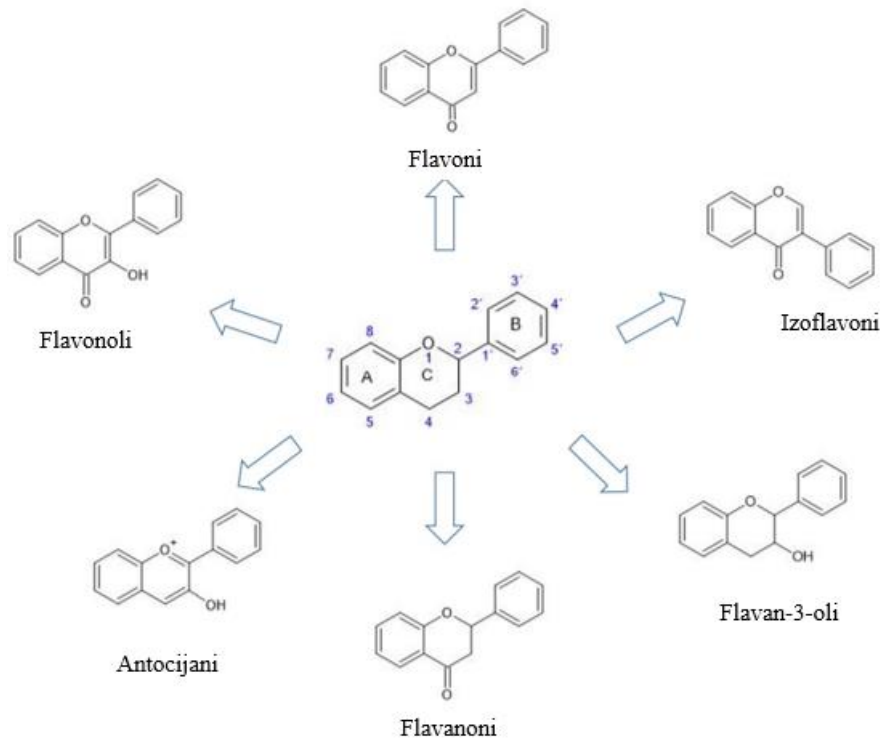
Polifenoli se nalaze u različitom voću i povrću posebice onom koje je obojeno. Biološki su aktivne komponente hrane koje nemaju nutritivni karakter, ali imaju vrlo pozitivan zdravstveni učinak, njihova antioksidativna, antibakterijska, antivirusna svojstva štite od nastanka karcinoma, krvožilnih oboljenja i slično. U polifenole se ubrajaju flavonoidi, fenolne kiseline, stilbeni te lignani (Slika 4). Jednu od najvećih skupina polifenola čine flavonoidi. Njihov je osnovni kostur građen od 15 C-atoma raspoređenih u dva aromatska prstena koji su međusobno povezani mostom od tri C- atoma. Most i aromatski prsten B sintetiziraju se iz fenilalanina u putu šikiminske kiseline. Šest C-atoma prstena A potječe od 3 acetatne jedinice iz puta jabučne kiseline [4].



Slika 3: Podjela polifenola

Izvor: Šamec i sur. [4]

Flavonoidi su najviše proučavana skupina polifenola te ih ima više od 6000. Prema strukturi oni se mogu podijeliti u šest skupina: flavoni, flavonoli, flavan-3-oli, flavanonoli, flavanoni, izoflavoni i antocijani (Slika 5). Razlikuju se po središnjem heterocikličkom piranskom prstenu. Atomi ugljika u molekulama flavonoida tvore dva prstena te su oni povezani s tri atoma ugljika i jednim atomom kisika tvoreći središnji piranski prsten. Najčešće je kod flavonoida istraživana njihova antioksidacijska aktivnost [5].



Slika 4: Podjela flavonoida

Izvor: Šamec i sur. [5]

2.3. Ginko (*Ginkgo biloba* L.)

2.3.1 Botaničke karakteristike i rasprostranjenost

Ginko (*Ginkgo biloba* L.) je listopadno drvo te vrsta u porodici Ginkgoaceae. Najveća visina koju stablo ginka može doseći je oko 35 metara, promjer debla može biti i preko dva metra. Kora je sive do tamnosmeđe boje, pupovi su široko piramidalni, zaobljenog vrha, listovi su lepezastog oblika podijeljeni na simetrične polovice. U proljeće i ljeto su zeleni a u jesen prije nego otpadnu poprime žutu boju. Dvodomna je biljka razlikuju se muške i ženske jedinke po obliku stabla, muška stabla su više vitka, dok ženska imaju širu krošnju. Razlika je i u cvjetovima, muški cvjetovi nalaze se u visećim cvatovima dužine 2-3 centimetra, dok su ženski cvjetovi na dršci te nastaju unutar ljuskastih zalistaka. Samo ženske jedinke imaju okrugle plodove veličine kao plod šljive, a unutar mesnatog ovoja nalazi se sjemenka. Ubraja se među

najstarije biljne vrste na svijetu te se često naziva i „živim fosilom“. Najstariji pronađeni fosili stariji su više od 200 milijuna godina [1].

Vrlo važno značenje ginka postalo je u 20. stoljeću kada se više počela promatrati evolucija biljaka. Ginko omogućuje znanstvenicima da prate njegovo podrijetlo unatrag milijunima godina. Smatra se da je on živa poveznica s dalekom prošlosti. Zanimljiva je činjenica da je nastanjivao Zemlju zajedno s mnogim vrstama biljaka i životinja koje su davno izumrle te je preživio različite epohe klimatskih promjena. Do danas je preživio zahvaljujući izrazitoj mogućnosti prilagodbe različitim klimatskim uvjetima a rasprostranjen je po različitim dijelovima svijeta.

2.3.2. Upotreba u tradicionalnoj i suvremenoj medicini

Kroz povijest ginko se često koristio kao lijek za različite bolesti. Najčešće se koristi list koji se već 4000 godina upotrebljava za liječenje zaboravljivosti kod starijih osoba. Kroz povijest rađena su istraživanja vezana uz blagotvorne učinke listova ginka. Ekstrakt lista ginka pokazao je dobre rezultate u liječenju bolesti kao što su Alzheimerova bolest, bolesti krvožilnog sustava, gubitak pamćenja, vrtoglavice i ostalih. Temeljni princip iza terapijskog djelovanja ekstrakta lista ginka na bolesti je njegov antioksidacijski učinak [6]. Također poboljšava cirkulaciju pa se koristi i za bolju prokrvljenost mozga, kod slabe cirkulacije u udovima. Poboljšava protok krvi na način da smanjuje tendenciju zgrušavanja trombocita.

U našoj kulturi konzumacija jezgre koštice nije uobičajena pojava, dok je u zemljama dalekog Istoka tradicionalni specijalitet. Plodovi se ubere i odmah se očiste od vanjske ovojnice koja ima neugodan miris. Mogu se kuhati ili pržiti, a na kraju se razbiju da se oslobodi jestiva koštica koja je orašastog okusa [7]. Sjemenke ginka te listovi prikazani su na Slici 5.

U našoj se kulturi ginko ne konzumira kao hrana već se osušeni listovi ginka, osušeni ekstrakt lišća ginka, prah ginka, zamućeni napici s ginkom i standardizirani osušeni ekstrakt lišća ginka upotrebljavaju kao biljni lijekovi i dodaci prehrani [8].



Slika 5: Sjemenke i listovi ginka

Izvor: vlastita fotografija

3. Praktični dio

U eksperimentalnom dijelu rada istraživano je kako način sušenja listova ginka utječe na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidacijsku aktivnost

3.2. Materijali i metode

Uređaji koji su korišteni u radu prikazani su na Slici 6. Korišteni uređaji su: analitička vaga (Adam Equipment), škrinja (POL-EKO), liofilizator LIO-5PLT (Kambič), vortex V1-plus (Biosan), sušionik VENTI-Line, kuglični mlin Bead Ruptor 12 (Omni International), spektrofotometar ONDA UV-21, UV vodena kupelj (Argolab), mini rotator Bio RS-24 (Biosan) i centrifuga LMC-4200R (Biosan)

Analitička vaga
Adam Equipment
Ujedinjeno Kraljevstvo



Škrinja
POL-EKO aparatura
Poljska



Liofilizator
LIO-5PLT, KAMBIČ,
Slovenija



Vortex
V1-plus, Biosan
Latvija



Sušionik
VENTI-Line 180 Prime
Poljska



Kuglični mlin
Bead Ruptor 12, Omni International
Sjedinjene Američke Države



Spektrofotometar
ONDA UV-21
Kina



UV vodena kupelj
Argo lab
Kina



Biosan mini rotator
Bio RS-24, Biosan
Latvija



Centrifuga
LMC-4200R, Biosan
Latvija



Slika 6: Korištena aparatura

Izvor: vlastita fotografija

Korištene kemikalije:

- metanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrij hidroksid (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- natrij karbonat (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens
- natrijev nitrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

- aluminij klorid (Sigma-Aldrich, St.Louis, Sjedinjene Američke Države)
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Sigma-Aldrich, St.Louis, Sjedinjene Američke Države)

3.2.1. Uzorkovanje lišća ginka

Lišće ginka uzrokovano je s drveća ginka u Koprivnici tijekom listopada u plastične vrećice te brzo transportirano u laboratorij. Nakon transporta lišće je izvagano te stavljeno na sušenje.

3.2.2. Sušenje

U svrhu ovog istraživanja lišće se sušilo na tri načina:

1. Liofilizator: u liofilizator je stavljeno lišće mase 10.00817 grama. Lišće se prvo stavilo na brzo zamrzavanje te je zatim uključeno sušenje.
2. Sušionik s cirkulacijom zraka: lišće koje je stavljeno u sušionik također se sušilo 48 sati. Sušilo se na 60 stupnjeva.
3. Sušenje na zraku: Najduže sušenje bilo je na zraku. Na zraku je lišću bilo potrebno tjedan dana da se osuši do kraja.

3.2.3. Ekstrakcija

Nakon sušenja preparati se usitnjavaju u kugličnom mlinu (odvagalo se 9 puta po 60 miligrama uzorka, sama ekstrakcija se provodila pomoću 80%-tnog metanola. U 60 miligrama uzorka dodalo se 2 mililitra 80%-tnog metanola te se vorteksiralo 5 minuta. Nakon vorteksiranja uzorci su stavljani u ultrazvučnu vodenu kupelj, dva ciklusa po 5 minuta. U ultrazvučnoj kupelji dolazi do razaranja biljnog materijala i oslobađanja spojeva. Nakon toga uzorci se stavljaju u rotator gdje se miješaju 45 min. Radi lakšeg uklanjanja taloga uzorci su stavljani u centrifugu 5 minuta na 4000g. Nakon centrifugiranja uzorci se dekantiraju, a zaostali talog odbaci, dok se supernatant koristi se za daljnje analize. Proces ekstrakcije prikazan je na Slici 7

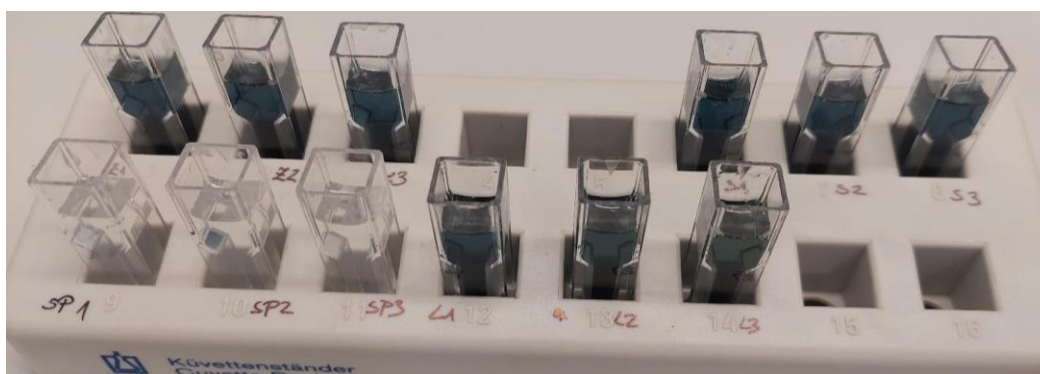


Slika 7: Ekstrakcija uzoraka

Izvor: vlastita fotografija

3.2.4. Određivanje ukupnih polifenola

Ukupni polifenoli određivani su Folin-Ciocalteu metodom [9]. U svaku se kivetu otpipetiralo po 20 μL uzorka, nakon uzorka dodano je 1.58 mL demineralizirane vode i 100 μL Folin-Ciocalteu reagensa. Sve zajedno dobro se promiješa na Vortexu. Nakon miješanja otpipetiralo se 300 μL zasićene otopine natrijeva karbonata i ponovo se dobro promiješalo. Nastala otopina je plave boje (Slika 8). Za slijepu probu korišten je 80%-tni metanol umjesto uzorka u istom volumenu. Svi uzorci priređivani su u triplikatu te je određena apsorbancija svake otopine na 765 nm u spektrofotometru [9].



Slika 8: Mjerenje ukupnih polifenola u ekstraktima lista ginka

Izvor: vlastita fotografija

3.2.5. Određivanje ukupnih flavonoida

Ukupni flavonoidi određeni su metodom s aluminijevim kloridom [10]. Otpipetralo se 200 μL uzorka u kivete u koje je prethodno dodano 800 μL destilirane vode. Reakcija započinje dodavanjem 60 μL natrijeva nitrata u omjeru (1:20), nakon 5 minuta otopini je dodano 60 μL aluminijeva klorida (1:10), a nakon 6 minuta dodano je 400 μL natrijeva hidroksida (1 M). Ukupni reakcijski volumen mora biti 2 mL, te se otopini doda još 480 μL destilirane vode nastala otopina je tamnocrvene boje (Slika 9). Svi su uzorci rađeni su u triplicatu, Slijepa proba radila se na isti način, samo je umjesto uzorka korišten isti volumen 80%-tnog metanola [10].



Slika 9: Prikaz mjerenja ukupnih flavonoida u ekstraktima lista ginka te u standardnoj otopini katehina

Izvor: vlastita fotografija

3.2.6. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Antioksidativna aktivnost određivana je metodom po Brand-Williamsu [11]. Metoda se zasniva na redukciji DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala. Smanjenje apsorbancije mjeri se spektrofotometrijski na 515 nm. U epruvete se pripremi 20 μL uzorka i 980 μL DPPH. Ostavlja se da reakcija odstoji 25-30 minuta uz lagano miješanje (Slika 12). Za slijepu probu

koristi se 20 μL čistog metanola umjesto uzorka. Uzorci se prebacuju u kivete i mjeri se apsorbanacija na navedenoj valnoj duljini [11].

Postotak inhibicije slobodnog radikala izračunava se prema formuli:

$$\% = \left(\frac{Asp - Au}{Asp} \right) * 100 \quad (1)$$

gdje je:

Asp- očitana vrijednost slijepe probe

Au- očitana vrijednost uzorka



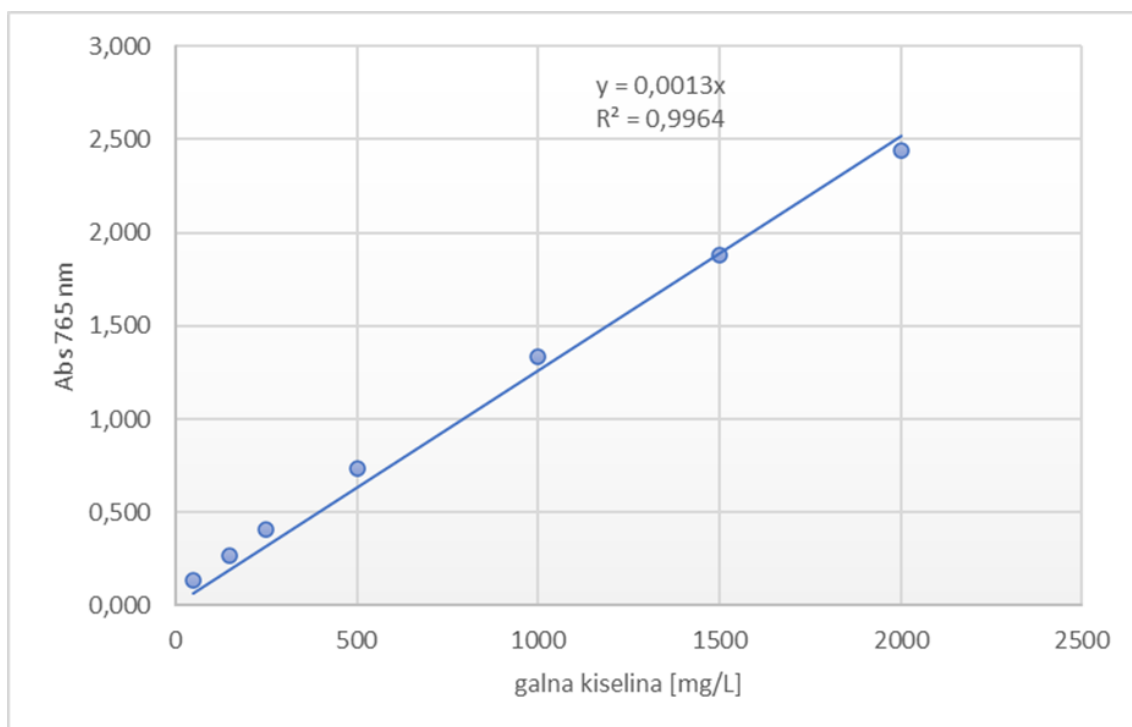
Slika 10: Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Izvor: vlastita fotografija

4. Analiza rezultata

4.1. Ukupni polifenoli

Na slici 11 nalazi se baždarni pravac za ukupne flavonoide.



Slika 11: Baždarni pravac za galnu kiselinu

Baždarni pravac izrađen je za koncentracije 0-2000 mg/L. Iz dobivenog pravca količina ukupnih flavonoida računa se prema sljedećoj formuli:

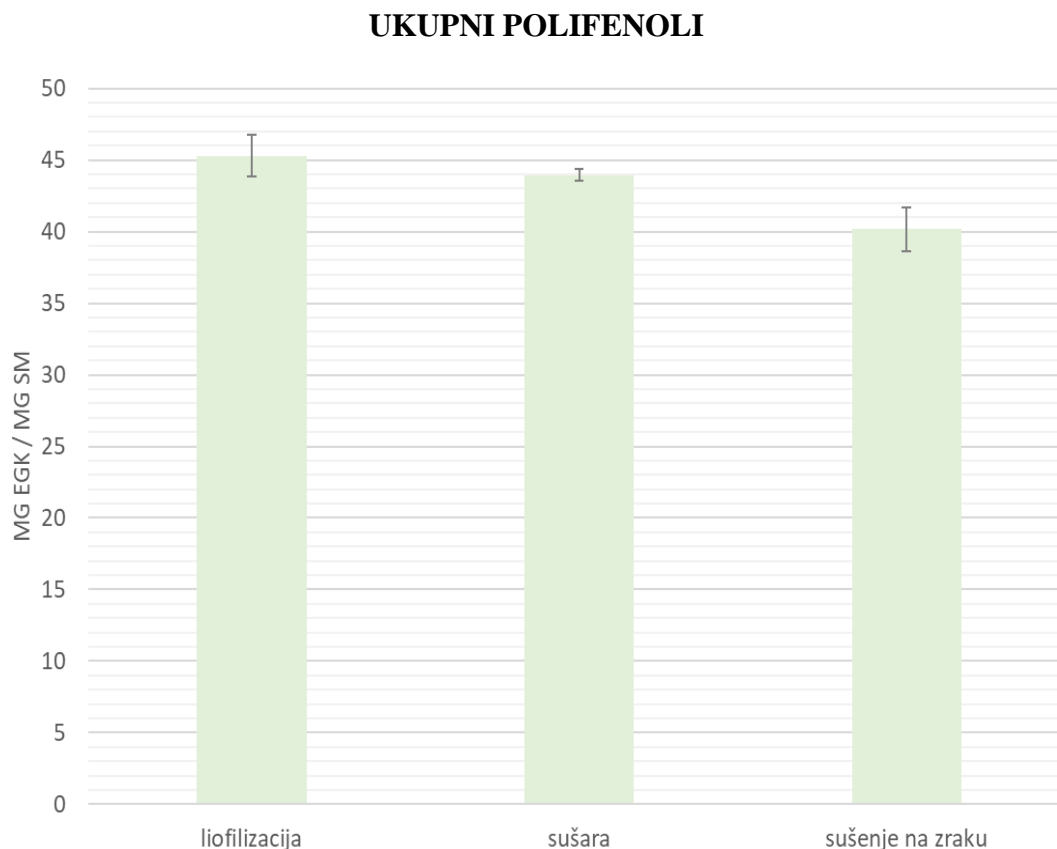
$$y = 0,0013x \quad (2)$$

Izmjerena vrijednost apsorbancija spektrofotometrijski na 765 nm prikazana je u Tablici 1. Slične vrijednosti triplikata upućuju na dobru reproducibilnost rezultata.

Tablica 1: Rezultati spektrofotometrijskog mjerenja ukupnih polifenola

	1	2	3	Prosjek	St.dev
Liofilizator	44,215	43,165	46,039	44,473	1,454
Sušionik	42,724	43,581	43,089	43,131	0,430
Zrak	38,542	41,103	39,355	39,355	1,515

Prema baždarnom pravcu izračunat je udio ukupnih polifenola te izražen u mikrogramima galne kiseline po miligramu suhe mase uzorka ($\mu\text{g GAE}/\text{mg dw}$), vrijednosti su prikazane na Slici 12.



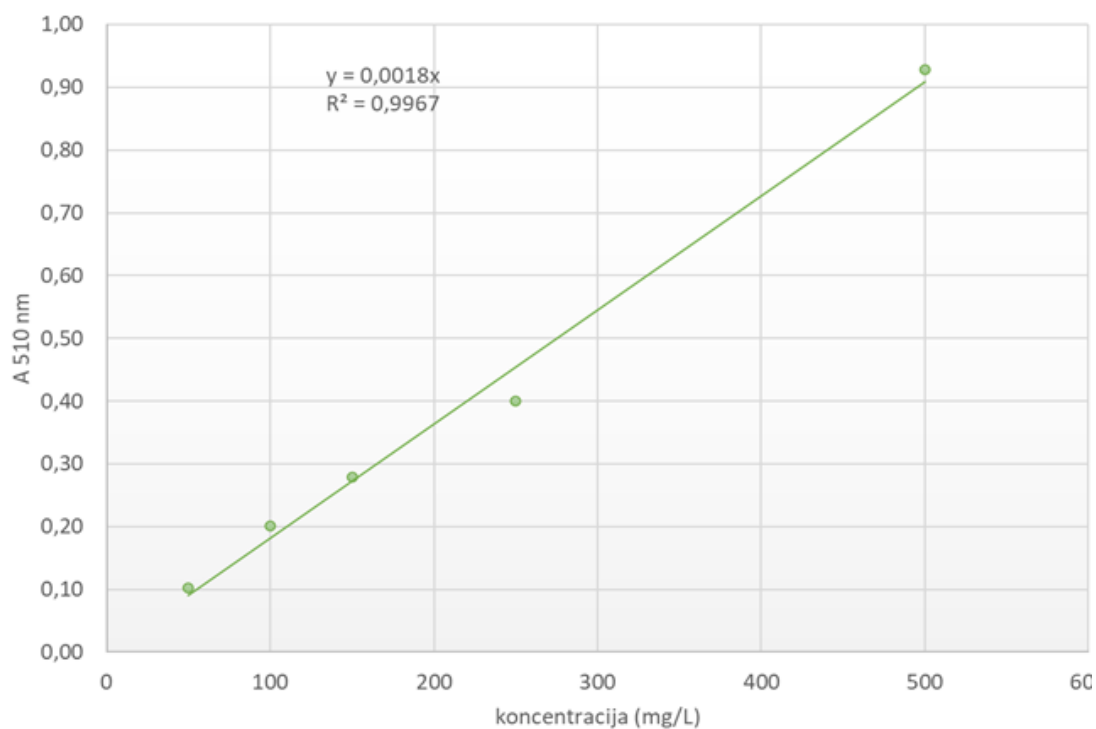
Slika 12: Utjecaj načina sušenja listova ginka na ukupne polifenole

Sadržaj ukupnih polifenola nije se značajno razlikovao u uzorcima sušenim u liofilizatoru ($44.47 \pm 1.45 \mu\text{g GAE}/\text{mg dw}$) te u sušioniku ($43.13 \pm 0.43 \mu\text{g GAE}/\text{mg dw}$) dok je kod listova sušenih na zraku bio nešto niži ($39.36 \pm 1.51 \mu\text{g GAE}/\text{mg dw}$). Naši rezultati ukazuju da sušenje na zraku i u sušioniku su dobra i jeftinija metoda za dobivanje listova ginka koje želimo koristiti kao izvor polifenola. Boateng i Yang [12] istraživali su kako utjecaj načina sušenja utječe na ukupne polifenole u sjemenkama ginka. U tom radu autori su koristili liofilizaciju, infracrveno sušenje, sušenje vrućim zrakom i sušenje pulsirajućim vakuumom. Prema njihovim rezultatima sušenje je imalo značajan utjecaj na sadržaj ukupnih polifenola koji je najviši bio kod sušenja infracrvenim zrakama.

Dobivene vrijednosti ukupnih polifenola mogu se usporediti s vrijednostima dobivenim u radu jordanskih znanstvenika [13] koji su u metanolnim ekstraktima listova ginka izmjerili količinu od $35.3 \pm 1.0 \mu\text{g GAE/mg}$.

4.2. Ukupni flavonoidi

Baždarni pravac za ukupne flavonoide prikazan je na slici 13



Slika 13: Baždarni pravac za ukupne flavonoide

Za izradu baždarnog pravca korištena je otopina katehina u koncentracijama 0-500 mg/L. Iz dobivenog pravca količina ukupnih flavonoida računa se prema sljedećoj formuli:

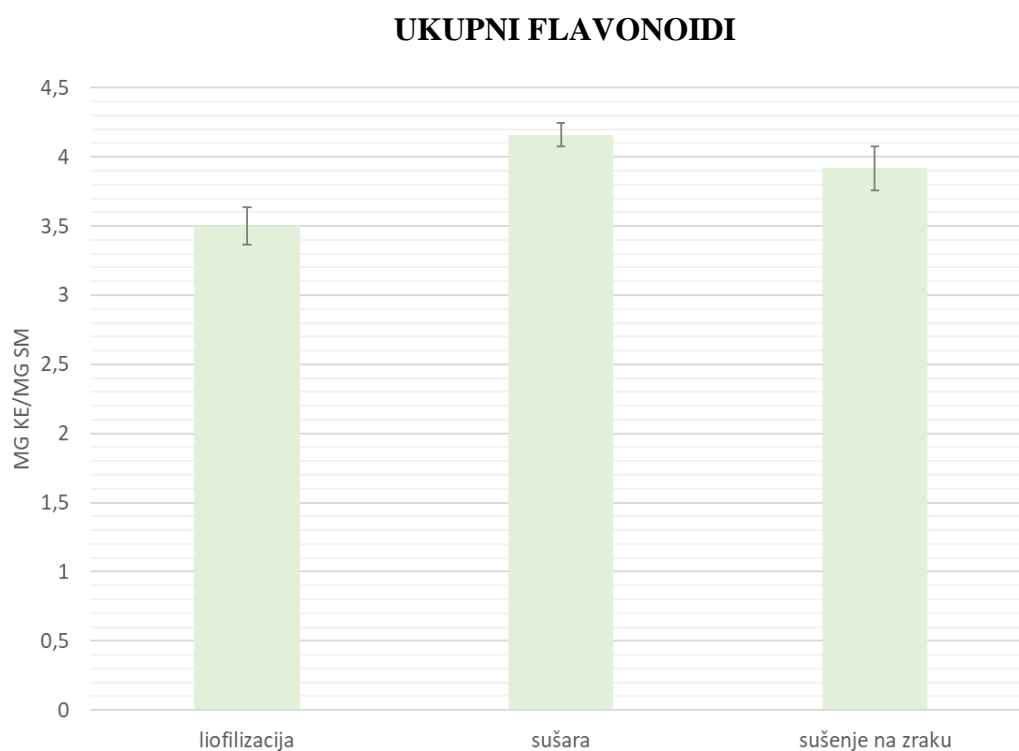
$$y = 0,0018x \quad (3)$$

Izmjerene apsorbancije na 510 nm za mjerenje ukupnih flavonoida prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2: Rezultati spektrofotometrijskog mjerenja ukupnih flavonoida

	1	2	3	Prosjek	st.dev.
Liofilizator	3,644	3,474	3,459	3,526	0,084
Sušionik	4,186	3,993	4,172	4,117	0,088
Zrak	3,842	3,998	3,835	3,892	0,075

Količina ukupnih flavonoida preračunata je preko dobivenog baždarnog pravca za katehin te izražena u mikrogramima katehin ekvivalenta kroz miligram suhe tvari ($\mu\text{g CE/mg dw}$), a rezultati su prikazani na Slici 14.



Slika 14: Utjecaj načina sušenja listova ginka na ukupne flavonoide

Sadržaj ukupnih flavonoida pokazao je drugačiji trend te je najviši sadržaj izmjeren kod listova sušenih u sušioniku ($4.15 \pm 0.31 \mu\text{g CE/mg dw}$), nešto niži u listovima sušenim na zraku ($4.07 \pm 0.34 \mu\text{g CE/mg dw}$) te najniži u listovima sušenim u liofilizatoru ($3.41 \pm 0.21 \text{ CE/mg dw}$). Li i sur. [14] u svom radu uspoređivali su ukupne flavonoide u listovima ginka sušenim u

liofilizatoru i na zraku te su dobili slične rezultate, $2083.58 \pm 41.34 \mu\text{g/g}$ u listovima sušenim na zraku odnosno $2133.93 \pm 1.77 \mu\text{g/g}$ u listovima sušenim u liofilizatoru.

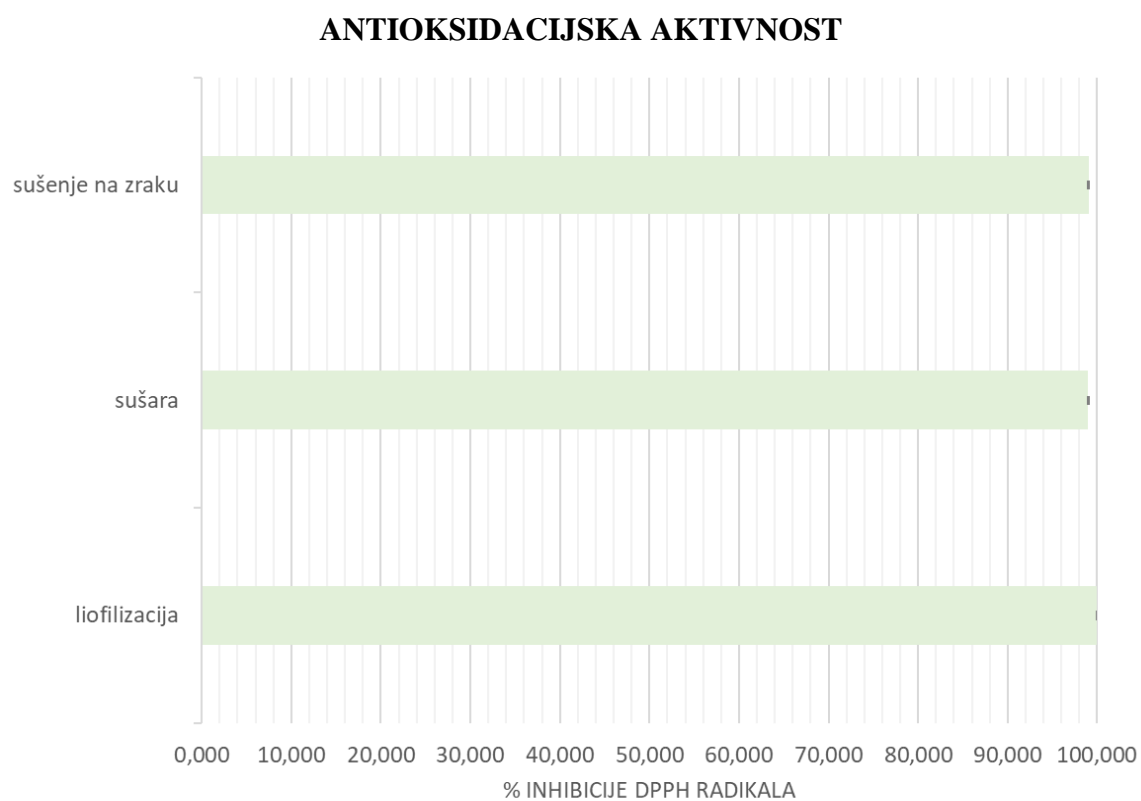
4.3. Antioksidacijska aktivnost

Mjerenja apsorbancije na 510 nm prikazane su u Tablici 4.

Tablica 3: Rezultati spektrofotometrijskog mjerenja i postotak inhibicije DPPH

	1	2	3
Sijepa proba	0,934	0,915	0,934
Liofilizator	0,040	0,039	0,038
Zrak	0,041	0,041	0,040
Sušionik	0,038	0,038	0,042

Antioksidacijska aktivnost izražena je u % inhibicije slobodnih radikala, a rezultati su prikazani na Slici 15.



Slika 15: Postotak inhibicije DPPH radikala

Kao što je vidljivo iz slike, kod svih je uzoraka došlo do gotovo 100% inhibicije slobodnog radikala upotrebom uobičajene metode koja se koristi u laboratoriju što upućuje na činjenicu da je listovi ginka imaju veću antioksidacijsku aktivnost od drugih biljaka koji su mjereni prethodno u laboratoriju. Za točnije rezultate vjerojatno trebalo bi ekstrakte razrijediti, no s obzirom na količinu ukupnih polifenola i flavonoida rezultati bi vjerojatno bili usporedivi. Slično je i u radu Li. i sur. [14] koji nisu dobili značajne razlike u antioksidacijskoj aktivnosti mjerenoj DPPH metodom između uzoraka sušenih na zraku i u liofilizatoru.

Zaključak

Sušenje je važan proces kod dobivanja biljnih materijala za upotrebu kao izvor fitokemikalija u tradicionalnoj medicini, prehrambenoj industriji i sl. Posebice kod pripreme biljnog materijala za upotrebu u medicini u obliku suhih listova biljaka, odabir odgovarajućeg načina sušenja je veoma važno zbog očuvanja biološki aktivnih spojeva, ali i da s etijekom prerade koristi što manje energije. Odabirom pravilnog načina sušenja može se uštediti značajna količina energije te pojeftiniti ukupan proces proizvodnje, a samim time i sniziti cijena konačnog proizvoda. Npr. liofilizacija koja uključuje zamrzavanje te sušenje u vakuumu koristi više energije nego sušenje za zraku ili u sušioniku.

Iako su naši rezultati pokazali razlike u sadržaju ukupnih polifenola i flavonoida u listovima sušenim na različite načine, te razlike nisu velike što je u skladu s literaturnim podacima [12, 14]. Stoga, na osnovi naših rezultata možemo zaključiti da se bilo koji od istraživanja tri načina sušenja može koristiti za dobivanje listova ginka za daljnju upotrebu u farmaceutskoj ili prehrambenoj industriji što se tiče sadržaja ukupnih polifenola, flavonoide i antioksidacijske aktivnosti.

Literatura

- [1] Begović B. (2014), Upoznajmo ginko, Opis biljke. Urednik: Begović B., *Eliksir života Ginko*, Pitomača, Nakladnik: vlastita naklada, 13-18.
- [2] Crane P., (2013), Podrijetlo i prapovijest, Urednik: Ovedovitz N, *Gingko: Drvo koje je vrijeme zaboravilo*, London, Nakladnik: Yale, 11-18
- [3] Ahmed Dr-Naseer, Jagmohan & Singh, Harmeet & Chauhan, Prerna & Gupta, Anisa & Anjum, Harleen & Kour., (2013). Different Drying Methods: Their Applications and Recent Advances. 4. 34-42.
- [4] Alibabić V., Mujić I, (2016), Fitokemikalije i zdravlje, Fenoli, Flavonoidi. Urednik: NDM Agency Bihać, *Pravilna prehrana i zdravlje*, Rijeka, Nakladnik: Veleučilište u Rijeci, 169-170
- [5] D.Šamec, E. Karalija E, I. Šola, V. Vujčić Bok, B. Salopek-Sondi: The Role of Polyphenols in Abiotic Stress Response: The Influence of Molecular Structure Plants 2021.
- [6] Ramassamy, C., Longpré, F., & Christen, Y. (2007). Ginkgo biloba extract (EGb 761) in Alzheimer's disease: is there any evidence?. *Current Alzheimer research*, 4(3), 253–262.
- [7] Ginko, *Gingko biloba* L. <https://www.plantea.com.hr/ginko/> ,pristupljeno 21.4.2023.
- [8] EP Brestel, K. Van Dyke (1991), Poglavlje 42, u: CR Craig, RE Stitzel (Ur.), Moderna farmakologija, 3. izdanje, Little, Brown & Co, Boston, 567–569
- [9] Singleton, V.L.; Rossi, J.A. (1965.), Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144–158
- [10] Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. (1999.), The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64, 555–559

[11] Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C., (1995.), Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci. Technol.*, 28, 25–30

[12] Boateng I. D., Yang X.M., (2020.), Effect of different drying methods on product quality, bioactive and toxic components of Ginkgo biloba L. seed, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 3079-3084

[13] Tawaha K., Alali, F., Gharaibeh M., Mohammad M., & Elelimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 104(4), 101,8, 1372–1378.

[14] Li F., Boateng I.D., Yang X.M., Li Y., Liu W., Li Y. (2023). Effects of processing methods on quality, antioxidant capacity, and cytotoxicity of Ginkgo biloba leaf tea product. *Journal of the science of food and agriculture*. 103. 10.1002

Popis slika

Slika 1: Drvo ginka u jesen	1
Slika 2: Shema klasifikacije fitokemikalija.....	5
Slika 3: Podjela polifenola	6
Slika 4: Podjela flavonoida	7
Slika 5: Sjemenke i listovi ginka.....	9
Slika 6: Korištena aparatura	11
Slika 7: Ekstrakcija uzoraka	13
Slika 8: Mjerenje ukupnih polifenola u ekstraktima lista ginka.....	13
Slika 9: Prikaz mjerenja ukupnih flavonoida u ekstraktima lista ginka te u standardnoj otopini katehina	14
Slika 10: Određivanje antioksidacijske aktivnosti	15
Slika 11: Baždarni pravac za galnu kiselinu	16
Slika 12: Utjecaj načina sušenja listova ginka na ukupne polifenole.....	17
Slika 13: Baždarni pravac za ukupne flavonoide	18
Slika 14: Utjecaj načina sušenja listova ginka na ukupne flavonoide.....	19
Slika 15: Postotak inhibicije DPPH radikala.....	20

Popis tablica

Tablica 2: Rezultati spektrofotometrijskog mjerenja ukupnih polifenola.....	16
Tablica 3: Rezultati spektrofotometrijskog mjerenja ukupnih flavonoida.....	19
Tablica 4: Rezultati spektrofotometrijskog mjerenja i postotak inhibicije DPPH.....	20



IZJAVA O AUTORSTVU

I

SUGLASNOST ZA JAVNU OBJAVU

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, Lana Pavličević, pod punom moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću, izjavljujem da sam isključivi autor/ica završnog rada pod naslovom Utjecaj načina sušenja na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidacijsku aktivnost listova ginka te da u navedenom radu nisu na nedozvoljeni način (bez pravilnog citiranja) korišteni dijelovi tuđih radova.

Student/ica:
Lana Pavličević

(vlastoručni potpis)

Sukladno 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.

Ja, Lana Pavličević neopozivo izjavljujem da sam suglasan/na s javnom objavom završnog rada pod naslovom Utjecaj načina sušenja na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidacijsku aktivnost listova ginka čiji sam autor/ica.

Student/ica:
Lana Pavličević

(vlastoručni potpis)

Završni rad konačno.docx

0.4% | Report 

1/36 Završni rad br: 53/PREH/2023 Utjecaj načina sušenja na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidacijsku aktivnost listova g
4396 words 07/19/2023, 02:23 PM [Content](#)