

# Utjecaj ekstrakcijskog otapala na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidacijsku aktivnost ginka

---

Oreški, Rebeka

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:122:428067>

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

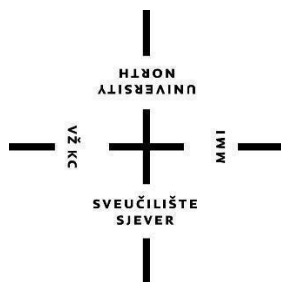
Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-24**



Repository / Repozitorij:

[University North Digital Repository](#)



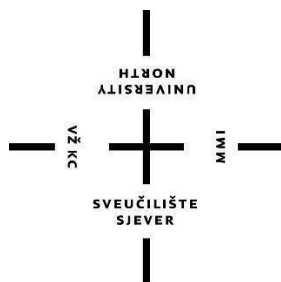


**Sveučilište  
Sjever**

*Završni rad br. 52/PREH/2023*

**Utjecaj ekstrakcijskog otapala na sadržaj ukupnih  
polifenola, flavonoida i antioksidacijsku aktivnost listova  
ginka**

**Rebeka Oreški, 0336047765**



# Sveučilište Sjever

Prehrambena tehnologija

Završni rad br. 52/PREH/2023

## Utjecaj ekstrakcijskog otapala na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidacijsku aktivnost listova ginka

**Student**

Rebeka Oreški, 0336047765

**Mentor**

Doc.dr.sc. Dunja Šamec

# Prijava završnog rada

## Definiranje teme završnog rada i povjerenstva

ODJEL Odjel za prehrambenu tehnologiju

STUDIJ preddiplomski stručni studij Prehrambena tehnologija

PRISTUPNIK Rebeka Oreški

MATIČNI BROJ 0336047765

DATUM 28.06.2023

KOLEGIJ Funkcionalna svojstva hrane

NASLOV RADA Utjecaj ekstrakcijskog otapala na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidacijsku a

NASLOV RADA NA ENGL. JEZIKU Effect of extraction solvents on total polyphenols, flavonoids, and antioxidant activity of gink

MENTOR Dunja Šamec

ZVANJE doc.dr.sc.

### ČLANOVI POVJERENSTVA

- izv.prof.dr.sc.Bojan Šarkanj, predsjednik
- Ivana Dodlek Šarkanj, predavačica, članica
- doc.dr.sc.Dunja Šamec, mentorica
- izv.prof.dr.sc. Natalija Uršulin Trstenjak, zamjena člana
- 

## Zadatak završnog rada

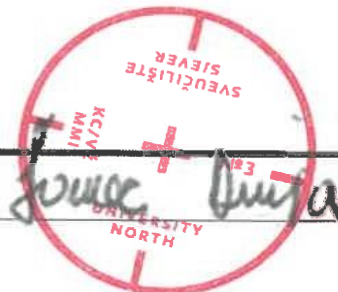
BROJ 52/PREH/2023

### OPIS

Zadatak predloženog završnog rada je provesti ekstrakciju listova ginka s različitim otapalima te odrediti kako način otapala utječe na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida te antioksidacijsku aktivnost ekstrakta.

ZADATAK URUČEN 28.06.2023.

POTPIS MENTORA



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, Rebeka Oreški (*ime i prezime*) pod punom moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću, izjavljujem da sam isključivi autor/ica završnog/diplomskog (*obrisati nepotrebno*) rada pod naslovom Utjecaj ekstrakcijskog otapala na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidacijsku aktivnost listova ginka (*upisati naslov*) te da u navedenom radu nisu na nedozvoljeni način (bez pravilnog citiranja) korišteni dijelovi tuđih radova.

Student/ica:  
(*upisati ime i prezime*)

Oreški

(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, Rebeka Oreški (*ime i prezime*) neopozivo izjavljujem da sam suglasan/na s javnom objavom završnog/diplomskog (*obrisati nepotrebno*) rada pod naslovom Utjecaj ekstrakcijskog otapala na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidacijsku aktivnost listova ginka (*upisati naslov*) čiji sam autor/ica.

Student/ica:  
(*upisati ime i prezime*)

Oreški

(vlastoručni potpis)

## **Predgovor**

Htjela bih se zahvaliti mentorici doc.dr.sc. Dunji Šamec na ukazanom povjerenju i danoj prilici za izradu ovog završnog rada. Njezina pomoć bila je od presudne važnosti u postizanju uspješnih rezultata i završetka ovog završnog rada. Veliko joj hvala za njen neizmjeran trud, podršku i dostupnost tijekom pisanja rada.

Zahvaljujem se i asistentici Ivi Jurčević Šangut na sugestijama i pomoći kojom je pridonijela kvaliteti ovoga rada kao i na njezinoj podršci tijekom izrade istog.

Obitelji i prijateljima također veliko hvala na bodrenju i podršci tijekom cijelog studija.

## Sažetak

Ekstrakti listova ginka (*Ginkgo biloba* L.) koriste se u tradicionalnoj i suvremenoj medicini za tegobe kognitivnog sustava te poboljšavanje cirkulacije. Između ostalog, bioaktivne komponente prisutne u tim ekstraktima pripadaju skupini polifenola, posebice flavonoida. Prije svake upotrebe valja ekstrahirati bioaktivne komponente iz listova. U ovom radu smo ispitali utjecaj četiri različite vrste ekstrakcijskih otapala na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidacijsku aktivnost. Svježi listovi sušeni su u liofilizatoru, zatim su usitnjeni te su pripremljeni ekstrakti u 70%-tnom etanolu, 80%-tnom metanolu, 96%-tnom etanolu i 100%-tnom metanolu te je izmjeren sadržaj ukupnih polifenola Folin-Ciocaltea-u metodom, flavonoida metodom s aluminijevim kloridom te antioksidacijska aktivnost DPPH metodom. Sadržaj ukupnih polifenola pokazao se najvišim kod ekstrakcije u 70%-tnom etanolu ( $38 \pm 0.46 \mu\text{g GAE/mg sm}$ ) te 80%-tnom metanolu ( $34.77 \pm 1.39 \mu\text{g GAE/mg sm}$ ) te su isti ekstrakti pokazali i najvišu antioksidacijsku aktivnost, dok je najviši sadržaj ukupnih flavonoida izmjeren kod ekstrakcije u 96%-tnom etanolu ( $9.85 \pm 0.85 \mu\text{g GAE/mg sm}$ ). Naši rezultati upućuju na potrebu odabira najpogodnijeg otapala u ovisnosti o komponentama koje želimo ekstrahirati. No također, za točnije rezultate valjalo bi napraviti kvantifikaciju pojedinih flavonoida nekom od metoda tekućinske kromatografije s odgovarajućim detektorima.

Ključne riječi: *Ginkgo biloba* L., ekstrakcija, ukupni polifenoli, ukupni flavonoidi, antioksidacijska aktivnost

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

Extracts of ginkgo leaves (*Ginkgo biloba* L.) are used in traditional and modern medicine for problems with the cognitive system and they are also improving circulation. Among other things, the bioactive components present in these extracts belong to the group of polyphenols, especially flavonoids. Bioactive components should be extracted from the leaves before each use. In this paper, we examined the influence of four different types of extraction solvents on the content of total polyphenols, flavonoids and antioxidant activity. Fresh leaves were dried in a lyophilizer, then they were crushed and extracts were prepared in 70% ethanol, 80% methanol, 96% ethanol and 100% methanol, and the content of total polyphenols was measured using the Folin-Ciocaltea method, flavonoids using the aluminum chloride method and antioxidant activity using DPPH method. The content of total polyphenols was the highest when extracted in 70% ethanol ( $38 \pm 0.46$   $\mu\text{g GAE/mg sm}$ ) and 80% methanol ( $34.77 \pm 1.39$   $\mu\text{g GAE/mg sm}$ ), and the same extracts showed the highest antioxidant activity, while the highest content of total flavonoids was measured during extraction in 96% ethanol ( $9.85 \pm 0.85$   $\mu\text{g GAE/mg sm}$ ). Our results point to the need to choose the most suitable solvent depending on the components we want to extract. But also, for more accurate results, the quantification of individual flavonoids should be done using one of the liquid chromatography methods with appropriate detectors.

Key words: *Ginkgo biloba* L., extraction, total polyphenols, total flavonoids, antioxidant activity

Acknowledgment: This paper was prepared as part of the Croatian Science Foundation project: "Role of biflavonoids in plants: *Ginkgo biloba* L. as a model system" UIP-2019-04-1018.

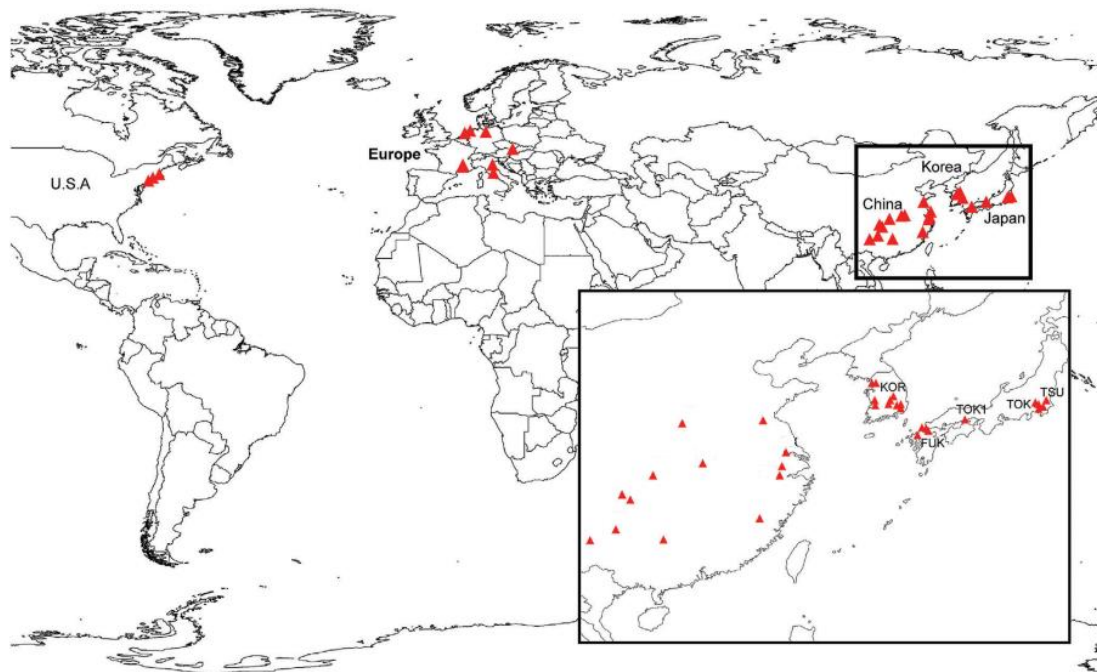


## Sadržaj

<b>1.</b>	<b><i>Uvod</i></b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b><i>Teorijski dio</i></b> .....	<b>4</b>
2.1.	Upotreba ljekovitog bilja u farmaceutici i prehrambenoj industriji.....	4
2.2.	Biljni ekstrakti.....	6
2.3.	Optimizacija procesa ekstrakcije .....	8
2.4.	Ginkgo ( <i>Ginkgo biloba L.</i> ) .....	10
<b>3.</b>	<b><i>Praktični dio</i></b> .....	<b>11</b>
3.1.	Aparatura i pribor .....	11
3.2.	Kemikalije.....	12
3.3.	Metode rada.....	13
3.3.1.	Uzorkovanje i homogenizacija .....	13
3.3.2.	Ekstrakcija.....	13
3.3.3.	Određivanje ukupnih polifenola .....	14
3.3.4.	Određivanje ukupnih flavonoida .....	15
3.3.5.	Određivanje antioksidativne aktivnosti .....	17
<b>4.</b>	<b><i>Analiza rezultata</i></b> .....	<b>18</b>
4.1.	Ukupni polifenoli .....	18
4.2.	Ukupni flavonoidi .....	20
4.3.	Antioksidacijska aktivnost.....	22
<b>5.</b>	<b><i>Zaključak</i></b> .....	<b>24</b>
<b>6.</b>	<b><i>Literatura</i></b> .....	<b>25</b>

# 1. Uvod

Ginko (*Ginkgo biloba L.*) je ljekovita, prehrambena i ornamentalna biljka prvi puta unesena u Europu iz Japana početkom 18. stoljeća od strane njemačkog liječnika i botaničara Engelberta Kaempfera. Rasprostranjenost je prikazana na Slici 1. Prvo europsko kultivirano stablo ginka posađeno je 1730. u Nizozemskoj. Ginko je listopadno dugovječno dvodomno drvo, a procjenjuje se da su najstarije poznate jedinke stare otprilike 1000 do 3000 godina. Od 1730. godine, stabla ginka sve su se više sadila diljem Europe na mjesta kao što su Geetbets (Belgija) 1730., Anduze (Francuska) 1750., Padova (Italija) 1750., Slavkov (Češka) 1758., Kew (Ujedinjeno Kraljevstvo) 1762., Beč (Austrija) 1770., Daruvar (Hrvatska) 1777., HARBKE (Njemačka) 1781., Montpellier (Francuska) 1788. i tako dalje. Godine 1784. prvo stablo ginka posađeno je u Sjevernoj Americi, u Philadelphiji. Sva stabla koja su sadili bile su muške jedinke. Prvo zabilježeno žensko stablo dolazilo je iz okolice Ženeve u Švicarskoj, 1814. Njegovi izdanci su cijepljeni na muško stablo u botaničkom vrtu Montpellierera, gdje je izraslo prvo sjeme. Tijekom sljedeća dva stoljeća, ginko se kontinuirano uvozio iz Japana, a možda i Kine, u Europu i Sjevernu Ameriku. Dugo se među zapadnim botaničarima smatralo da je drvo ginka vjerojatno izumrlo u divljini i da se rod ginka očuvao samo ljudskim uzgojem [1].



Slika 1: Rasprostranjenost ginka u svijetu

Izvor: Zhao Y. i sur. [1]

Ginko (Slika 2) se smatra živim fosilom jer je jedini preostali predstavnik izolirane porodice golosjemenjača Ginkgoaceae. Ovo drvo ima izuzetno dug životni vijek, koji se procjenjuje na 2000 do 4000 godina. Dugovječnost stabla ginka može se pripisati njegovoj izvanrednoj sposobnosti prilagodbe različitim okolišnim uvjetima. Jedan od zapanjujućih aspekata ginka je njegova iznimna otpornost na insekte i gljivične bolesti. Ovo drvo je razvilo prirodne mehanizme obrane koji ga štite od štetnika. Ta svojstva su vjerojatno doprinijela dugovječnosti ginka. Još jedna impresivna činjenica o ginku je da je preživio nuklearnu eksploziju u Hirošimi 1945. godine. Iako je većina okolnih struktura bila uništena, nekoliko stabala ginka ostalo je živo u blizini epicentra eksplozije. Ovaj događaj dodatno naglašava izuzetnu izdržljivost i otpornost ovog drva. Ginko je stoga jedno od najzanimljivijih i najizdržljivijih drvenastih vrsta na planeti, s poviješću koja seže duboko u prošlost i sposobnošću da preživi u ekstremnim uvjetima. U Kini se njegov jestivi plod smatra vrijednim orašastim plodom. Kinezi su primijetili raznolikost njegovih plodova te su opisali i imenovali niz kultivara na temelju oblika, veličine i različitih značajki plodova. Kada je u 18. stoljeću donesen u Europu, a potom i u Sjevernu Ameriku nije se koristio zbog plodova već kao ukrasno drvo. Posljedično tome, hortikulturisti i šumari izdali su brojne selekcije i zabilježen je veliki broj kultivara razvijenih u ukrasne svrhe [2].



*Slika 2: Drvo ginka*

Izvor: vlastita fotografija

Drevni kineski liječnici koristili su lišće (Slika 3) i sjemenke ginka radi njihovog blagotvornog djelovanja. Osušeni listovi ginka u Kini se stoljećima koriste kao biljni lijekovi, a danas su ekstrakti iz lišća ginka, zbog mješavine biološki aktivnih tvari koje omogućavaju kompleksni farmakološki učinak, jedni od najčešće korištenih biljnih proizvoda i dodataka prehrani u svijetu [3,4]. Kako bi izdvojili ekstrakte ginka i iskoristili ih maksimalno, vrlo je bitno optimizirati proces ekstrakcije. Drugim riječima, parametri procesa kao što su omjer otapala i krutine, temperatura same ekstrakcije, trajanje ekstrakcije, veličina čestica sirovina i brzina miješanja, od iznimne su važnosti za uspješnost ekstrakcije. Karakteristike korištenih otapala također su ključne za uspješnost ekstrakcije. Kako lišće ginka sadrži hidrofilne komponente, u prvom redu fenole i flavonoide, za njihovu se ekstrakciju koriste polarna otapala kao što su metanol, etanol ili etil-acetat [5].



*Slika 3: Lišće ginka*

Izvor: vlastita fotografija

## 2. Teorijski dio

### 2.1. Upotreba ljekovitog bilja u farmaceutici i prehrambenoj industriji

Ljekovita biljka je biljka koja sadrži bioaktivne tvari u svojim organima i može se koristiti u terapijske svrhe ili kao sirovina za sintezu lijekova. Razlikujemo ljekovite biljke čija su ljekovitost i sastav znanstveno dokazani od onih koje su prepoznate kao ljekovite, ali još nisu podvrgnute temeljitim znanstvenim studijama. U tradicionalnoj se medicini dugi niz godina koriste brojne biljke [6]. Na našoj planeti postoji oko 350 tisuća biljnih vrsta, od kojih se otprilike 12 tisuća može koristiti za pripremu lijekova [7]. Iako se neke od njih široko upotrebljavaju, nema dovoljno znanstvenih podataka za potvrdu njihove učinkovitosti. Farmaceuti i farmakolozi koriste izraz "sirovi lijekovi prirodnog ili biološkog podrijetla" kako bi opisali cjelovite biljke ili njihove dijelove koji posjeduju ljekovita svojstva. Naglasak na korištenju ljekovitog bilja do sada je bio stavljen na liječenje, a ne na prevenciju bolesti. Međutim, u novije vrijeme u literaturi postoji značajan broj radova vezanih uz upotrebu ljekovitog bilja i njegovih sastojaka u prevenciji razvoja bolesti [6]. Na području Hrvatske dostupan je širok izbor vrsta čajeva, od čak preko 65 vrsta, te više od 80 farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda koji koriste ekstrakte ljekovitog bilja. U Kini, i dalje više od 50% stanovništva koristi lijekove biljnog podrijetla, a ovaj oblik liječenja postaje sve popularniji i u razvijenim državama poput SAD-a, Europe, Kanade i drugih. To rezultira rastućim globalnim interesom za ljekovito bilje zbog upotrebe eteričnih ulja, ekstrakata, tinktura, droga i drugih oblika [7].

U prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji postoje brojni proizvodi koji sadrže biološki aktivne tvari iz ljekovitog bilja [7]. Tako se u prehrambenoj industriji traže nove sigurne alternative za konzerviranje hrane prirodnog podrijetla jer je povećan pritisak javnosti protiv sintetskih aditiva u hrani. Kao rezultat toga, proizvođači hrane razmatraju prirodne alternative kako bi održali ili produžili rok trajanja proizvoda. Mnogi bioaktivni spojevi biljnog porijekla mogu se smatrati dobrim zamjenama za sintetske dodatke hrani s antimikrobnim i antioksidativnim svojstvima. Ovi spojevi potječu iz biljaka i pokazuju obećavajuće rezultate u laboratorijskim ispitivanjima. Odabir sigurnih biljnih izvora za ekstrakciju ovih spojeva ključan je za njihovu primjenu u prehrambenim aditivima. Ljekovite biljke, koje su se koristile tisućama godina u tradicionalnoj medicini, mogu predstavljati potencijalne alternative za konzerviranje hrane [8]. Primjer lovora i origana kao ljekovitog bilja koje se koristi u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1: Primjeri ljekovitog bilja korištenog u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji

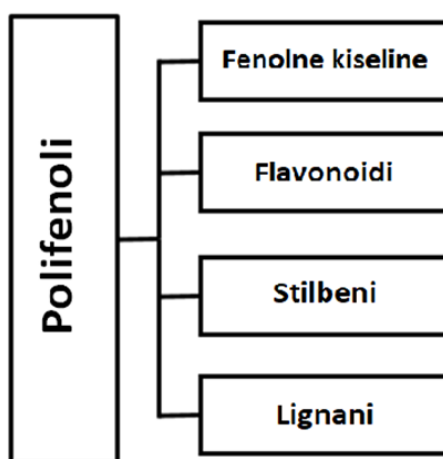
Izvor: Mihovilović I. [9]

	<b>Farmaceutska industrija</b>	<b>Prehrambena industrija</b>
<p>LOVOR (<i>Laurus nobilis</i>, porodica Lauraceae, lovori)</p>  <p>Slika 4: Listovi lovora Izvor: Mihovilović I. [9]</p>	<p>Eterično ulje dobiveno destilacijom listova koristi se za izradu mirisnih kompozicija u parfemima, sapunima, deterdžentima i sličnim proizvodima. Djelovanje eteričnog ulja obuhvaća različite koristi, uključujući antireumatsko, antiseptično, baktericidno, dijaforetično, digestivno, diuretično, i fungicidno djelovanje, te snižava krvni tlak i ima sedativno djelovanje. Ovo ulje se primjenjuje kod probavnih tegoba, olakšavanja respiratornih problema, posebno kod kroničnog bronhitisa. Potiče imunološki sustav te se koristi za prehlade, gripu i virusne infekcije. Također, koristi se u preparatima za ublažavanje mišićnih bolova te u njezi masne kože i kod gljivičnih kožnih infekcija.</p>	<p>U prehrambenoj industriji, eterično ulje dobiveno destilacijom listova koristi se za aromatiziranje različitih proizvoda. To uključuje alkoholna pića, smrznute deserte, pekarske proizvode i mesne proizvode. Dodavanjem ovog ulja, proizvodi dobivaju karakterističan i privlačan okus i miris koji poboljšava njihovu kvalitetu i ukupno iskustvo konzumacije.</p>
<p>ORIGANO, MRAVINAC (<i>Origanum vulgare</i>, porodica Lamiaceae, usnače)</p>  <p>Slika 5: Cvijet i listovi origana Izvor: Mihovilović I. [9]</p>	<p>Eterično ulje dobiveno destilacijom listova pokazuje mnoga ljekovita svojstva, uključujući analgetično (protiv bolova), antireumatično (protiv reumatskih tegoba), antivirusno, baktericidno, fungicidno, karminativno (za olakšavanje probave), ekspektorirajuće (za poticanje iskašljavanja) i rubefacijentno (za poticanje protoka krvi). Primjenjuje se kod raznih tegoba probavnog i dišnog sustava, kao i za liječenje reumatskih tegoba. Također, koristi se za jačanje imunostava i borbu protiv virusnih infekcija.</p>	<p>U prehrambenoj industriji koristi se kao sastojak prehrambenih aroma, a posebno mesnih proizvoda.</p>

## 2.2. Biljni ekstrakti

Biljni ekstrakti su proizvodi koji se dobivaju kroz različite ekstrakcijske postupke iz svježeg ili sušenog bilja, uključujući dijelove biljaka kao što su lišće, cvjetovi, sjemenke, korijen i kora. Ti ekstrakti sadrže aktivne sastojke koji se izdvajaju zajedno s drugim materijalom prisutnim u biljnoj masi [10]. Ekstrakcija u farmaciji podrazumijeva proces odvajanja medicinski aktivnih dijelova biljnih ili životinjskih tkiva od neaktivnih ili inertnih komponenti korištenjem selektivnih otapala u standardnim postupcima ekstrakcije. Dobiveni proizvodi iz biljaka su obično relativno nečiste tekućine, polukrutine ili praškasti oblici namijenjeni za oralnu ili vanjsku primjenu. Ovo uključuje različite klase pripravaka kao što su dekokcije, infuzije, tekući ekstrakti, tinkture, polukruti ekstrakti i ekstrakti u prahu. Ovi pripravci su popularno poznati kao galenski pripravci, a nazvani su po Galenu, grčkom liječniku iz drugog stoljeća [11].

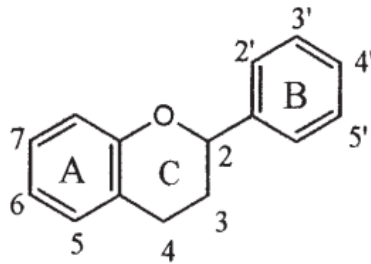
Biljni ekstrakti mogu sadržavati različite prirodne spojeve koji pozitivno utječu na ljudski organizam, a jedna od najčešće ekstrahiranih grupa biljnih aktivnih tvari jesu polifenoli koji su često aktivne komponente raznih pripravaka na biljnoj bazi [12]. Polifenoli su najveća i najistraživanija skupina biljnih metabolita, koja broji više od 8000 različitih molekula [13]. Oni su produkti sekundarnog metabolizma biljaka i obavljaju važne funkcije u reprodukciji i rastu biljaka. Također, služe kao obrambeni mehanizmi protiv patogena, parazita i grabežljivaca te pridonose boji biljaka. Osim što su važni za biljke, polifenolni spojevi prisutni u našoj prehrani mogu pružiti zdravstvene prednosti povezane s smanjenim rizikom od kroničnih bolesti. Podjela polifenola prikazana je na Slici 6 [12].



Slika 6: Podjela polifenola

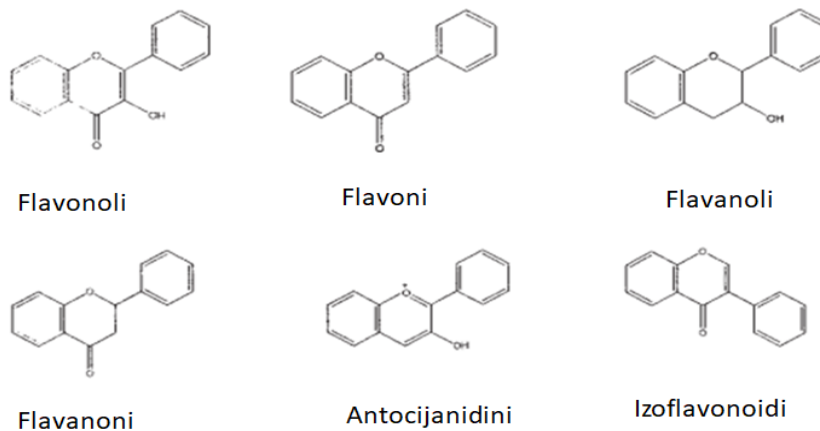
Izvor: Šamec i sur. [14]

Flavonoidi su najviše istraživana skupina polifenolnih spojeva s izraženim antioksidativnim svojstvima. Oni se nalaze u voću, povrću i drugim biljnim namirnicama, a povezuju se sa smanjenjem rizika od ozbiljnih kroničnih bolesti. Struktura im se sastoji od dva aromatska prstena (A i B prsten) povezana s tri ugljika koji su često dio oksigeniranog heterocikličkog prstena ili C prstena (Slika 7). Razlike u generičkoj strukturi heterocikličkog prstena C omogućuju klasifikaciju flavonoida u flavonole, flavone, flavanole, flavanone, antocijanidine i izoflavonoide (Slika 8) [12].



Slika 7: Struktura flavonoida

Izvor: Liu R.H. [12]



Slika 8: Podjela i struktura flavonoida

Izvor: Liu R.H. [12]



### 2.3.Optimizacija procesa ekstrakcije

Metode ekstrakcije uključuju korištenje otapala, destilaciju, prešanje i sublimaciju, no najčešće se koristi ekstrakcija otapalom. Svojstva otapala za ekstrakciju, veličina čestica sirovina, omjer otapala i čvrstoće, mogu imati utjecaj na učinkovitost postupka kao i sama temperatura ekstrakcije i vrijeme odnosno trajanje ekstrakcije [15].

Prinos ekstrakcije i antioksidativna aktivnost ne ovise samo o metodi ekstrakcije, već i o otapalu koje se koristi za ekstrakciju. Dobro otapalo za pripremu ekstrakta za kasniju primjenu u farmaceutskoj ili prehrambenoj industriji mora imati nisku toksičnost i konzervansno djelovanje na ekstrakt. Osim toga, otapalo bi trebalo ispariti na niskoj temperaturi, imati sposobnost brze apsorpcije u ekstrakt i ne smije uzrokovati razdvajanje smjese. Specifična priroda ciljanog bioaktivnog spoja utječe na odabir otapala. Bioaktivni spoj može se ekstrahirati iz prirodnih proizvoda različitim sustavima otapala. Pri odabiru otapala valja uzeti u obzir topljivost ciljanih bioaktivnih spojeva, difuznost spojeva u otapalu i karakteristike uzorka. Kako bi se dobila visoka čistoća i selektivnost ekstrakta, odabrani spoj treba imati veću topljivost u otapalu u usporedbi s ostalim spojevima. Osim toga, pri izboru otapala treba uzeti u obzir i druge aspekte, kao što su sigurnost, ekonomičnost i održivost. Treba dati prednost neškodljivim i manje otrovnim otapalima. Voda, acetati, alkoholi i glikol uobičajena su otapala koja se koriste za ekstrakciju biljaka. Ekstrakcija hidrofilnih spojeva koristi polarna otapala, kao što su metanol, etanol ili etil-acetat. Za ekstrakciju lipofilnijih spojeva koristi se diklormetan ili smjesa diklormetan/metanol u omjeru 1:1. U nekim se slučajevima za uklanjanje klorofila koristi ekstrakcija heksanom [5].

Omjer otapalo-krutina je omjer otapala po sirovini koja se koristi u procesu ekstrakcije. Za otapanje otopljene tvari i njezin prijenos na vanjski dio čvrste matrice važna je odgovarajuća količina otapala. Viši omjeri dovode do poboljšanja kinetike ekstrakcije zbog veće koncentracije između otopljenih tvari zarobljenih unutar sirovine i onih koje se nalaze na površini. Međutim, ne preporučuje se korištenje prekomjerne količine otapala jer će zahtijevati veći energetska i toplinski kapacitet [5].

Na učinkovitost i selektivnost procesa ekstrakcije također utječe temperatura tijekom ekstrakcije. Visoke temperature koje se koriste povećavaju učinkovitost ekstrakcije zbog prekida interakcije analita i matrice uzorka uzrokovane vodikovim vezama, van der Waalsovima silama i privlačenjem dipola. Štoviše, korištenje povišene temperature u procesu ekstrakcije moglo bi smanjiti površinske napetosti otapala, otopljenih tvari i matrice, i tako pomoći vlaženje uzorka otapalom. Visoke temperature ekstrakcije također smanjuju viskoznost otapala i poboljšavaju brzinu difuzije. Međutim, previsoke temperature mogu uzrokovati gubitak otapala zbog

isparavanja, oštetiti osjetljivu opremu, mogu izlučiti nepoželjne sastojke ili pak izazvati degradaciju aktivnih komponenata [5].

Trajanje ekstrakcije ključno je za smanjenje energije i troškova procesa ekstrakcije. Štoviše, trajanje obrade utječe na razgradnju ciljanih spojeva. Smanjenje trajanja ekstrakcije što je više moguće moglo bi smanjiti učinak razgradnje. Štoviše, produljeno trajanje ekstrakcije povećat će gubitak otapala isparavanjem i može uzrokovati raspad osjetljivih bioaktivnih komponenata. Ne preporučuje se trajanje ekstrakcije dulje od 3 sata [5].

Veličina čestica sirovina utječe na brzinu ekstrakcije i njenu učinkovitost. Manje veličine čestica sirovina povećavaju učinkovitost ekstrakcije zbog kraće duljine puta unutarne difuzije preko ekstrahiranih otopljenih tvari i moraju putovati do tekuće faze. Štoviše, veće površine dostupne u manjim česticama mogle bi povećati brzinu prijenosa mase, posljedično smanjujući vrijeme potrebno za početno namakanje matrice biljke. Veća stopa ekstrakcije također se može postići u većim kontaktnim područjima tekućine i krutine s manjom veličinom čestica. Međutim, premala veličina čestica smanjila bi učinkovitost dostupne površine zbog aglomeracije finih čestica, što otežava prodiranje otapala [5].

## **2.4. Ginko (*Ginkgo biloba* L.)**

Ginko je listopadno drvo, visoko do 30 i više metara, spada u porodicu Ginkgoaceae i danas je jedini živi predstavnik razreda Ginkgoopsida. Kora debela je sive boje, dok smolnih kanala nema. Listovi imaju do 10 cm dugu peteljku te plojku lepezasta oblika, podijeljenu na dvije simetrične polovice s paralelnom nervaturom. Na odvojenim jedinkama nalaze se jednospolni cvjetovi. Muški cvjetovi sadrže 2-7 peludnica te su smješteni pojedinačno na vrhu produljene osi, dok se ženski cvjetovi nalaze pojedinačno na stapci i imaju 1-2 sjemena zametka obavijena kupulom. Sjemenka ginka sadrži dvije supke, velika je i okrugla te obavijena mesnatim, srebrno-narančasto obojenim ovojem, neugodna mirisa [16].

Dijelovi ginka koji su ljekoviti jesu svježi ili osušeni listovi i odvojene sjemenke odnosno njihov mesnati, vanjski sloj [17]. Ginko je biljka koja se koristi u tradicionalnoj medicini već tisućama godina. Koristi se za pomoć u liječenju problema koji su tipično povezani sa starenjem, kao što su loša cirkulacija, mentalna zbunjenost i gubitak pamćenja. Najvažniji sastojci standardiziranih ekstrakata suhog lišća ginka su flavonoidi (kvercetin, kampferol, izorhamnetin) i terpenški trilaktani (ginkgolidi i bilobalid). Ti spojevi imaju različite farmakološke učinke i smatra se da doprinose ljekovitim svojstvima ginka. Brojna istraživanja su pokazala da standardizirani ekstrakt ginka ima značajan utjecaj na neurotransmitterske receptore središnjeg živčanog sustava i može spriječiti oštećenje pamćenja povezano sa starenjem. Također, pokazano je da može poboljšati budnost i pomoći u rješavanju problema s pamćenjem i kognitivnim funkcijama povezanim sa starenjem i senilnošću. Važno je napomenuti da se rezultati istraživanja mogu razlikovati i da se neki stručnjaci i dalje raspravljaju o učinkovitosti ginka u liječenju određenih stanja [18].

### 3. Praktični dio

#### 3.1. Aparatura i pribor

Lišće ginka vagano je na analitičkoj vagi (Adam Equipment, Ujedinjeno Kraljevstvo). Za hlađenje lišća korišten je laboratorijski hladnjak (POL-EKO aparatura, Poljska), dok je za sušenje lišća korišten liofilizator proizvođača „Kambić“ (LIO-5PLT, Kambić, Slovenija). Kako bi usitnili i homogenizirali uzorke lišća korišten je Bead Ruptor 12, homogenizator mlina s kuglicama (Bead Ruptor 12, Omni International, Sjedinjene Američke Države). Uzorci su vorteksirani na vorteksu tvrtke „Biosan“ (V1-plus, Latvija). Za razaranje biljnog materijala uzorka korištena je ultrazvučna laboratorijska kupelj DU-100 proizvođača „Argo lab“ (Kina). Mini-rotator Bio RS-24 proizvođača „Biosan“ (Latvija), omogućio je vertikalnu rotaciju platforme kako bi ekstrahirali biološke komponente u samome uzorku. LMC-4200R „Biosan“ (Latvija), laboratorijska je rashlađena centrifuga korištena u svrhu centrifugiranja, odnosno odvajanja čestica na temelju njihove gustoće i veličine, u ovom slučaju uz kontrolu temperature tijekom samog centrifugiranja. Kako bi očitali apsorbanciju uzoraka korišten je Spektrofotometar ONDA UV-21 (Kina). Korišteni uređaji prikazani su na Slici 9.

Analitička vaga  
Adam Equipment  
Ujedinjeno Kraljevstvo



Škrinja  
POL-EKO aparatura  
Poljska



Liofilizator  
LIO-5PLT, Kambić  
Slovenija



Kuglični mlin  
Bead Ruptor 12, Omni  
International  
Sjedinjene Američke Države



Vortex  
V1-plus, Biosan  
Latvija



UV vodena kupelj  
Argo lab  
Kina



Biosan mini rotator  
Bio RS-24, Biosan  
Latvija



Centrifuga  
LMC-4200R, Biosan  
Latvija



Spektrofotometar  
ONDA UV-21  
Kina



*Slika 9: Korištena aparatura*

Izvor: vlastita fotografija

### 3.2. Kemikalije

Korištene kemikalije:

- metanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- etanol (GRAM-MOL, Zagreb, Hrvatska)
- natrij karbonat (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- natrijev hidroksid (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Sigma-Aldrich, Švicarska)
- natrijev nitrit (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- aluminij klorid (Sigma-Aldrich, St.Louis, Sjedinjene Američke Države)
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil) (Sigma-Aldrich, St.Louis, Sjedinjene Američke Države)

### 3.3. Metode rada

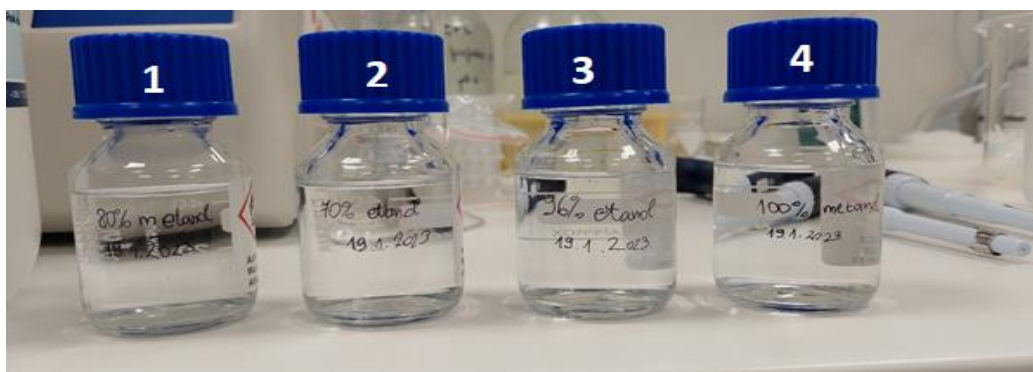
#### 3.3.1. Uzorkovanje i homogenizacija

Lišće ginka skupljeno je sa stabala ginka u Koprivnici (ulica Ivana Mažuranića), tijekom listopada 2022. godine. Odmah nakon branja lišće je prebačeno u laboratorij, izvagano, smrznuto na  $-80^{\circ}\text{C}$  i stavljeno u liofilizator na sušenje na temperaturu od  $-101,5^{\circ}\text{C}$  i tlak od cca. 600 Pa. Nakon 48 sati i 30 minuta lišće je izvađeno iz liofilizatora te čuvano u zatvorenim posudicama do analize.

Prije ekstrakcije lišće je samljeveno u sitni prah upotrebom kugličnog homogenizatora (Bead Ruptor 12, Omni International, Sjedinjene Američke Države).

#### 3.3.2. Ekstrakcija

Za pripremu ekstrakta biljnog uzorka, u plastične epice od 2 mL odvažano je 60 mg usitnjenog i osušenog lišća ginka. Kako bismo pratili utjecaj različitih otapala na ekstrakciju, ekstrakti su pripremljeni s četiri različite vrste otapala (Slika 10) kako bi se ispitaio utjecaj različitih otapala na sadržaj aktivnih komponenata.



*Slika 10: Četiri korištene različite vrste otapala*

Izvor: vlastita fotografija

Sve ekstrakcije su rađene u triplicatima. U svaku epicu u kojoj je bilo po 60 mg usitnjenog uzorka ginka dodano je posebno po 2 mL 80%-tnog metanola (1), 70%-tnog etanola (2), 96%-tnog etanola (3) ili 100%-tnog metanola (4) (Slika 10). Uzorci su zatim promiješani na vorteksu. Nakon toga uzorci su stavljeni u ultrazvučnu kupelj na 10 min te na mini rotator 45 minuta. Završno, uzorci su centrifugirani 5 minuta na 4000 g. Supernatant je pažljivo odvojen od taloga u nove epice i pohranjen u hladnjak do daljnje uporabe.

### 3.3.3. Određivanje ukupnih polifenola

Za određivanje ukupnih polifenola korištena je Folin-Ciocalteuova metoda [19] koja se koristi za mjerenje ukupnog sadržaja fenola u uzorku. Polifenoli u biljnim ekstraktima reagiraju sa specifičnim redoks reagensima (Folin-Ciocalteu reagens) [20]. Nakon što Folin-Ciocalteuov reagens reagira s fenolnim spojem, dolazi do plavog obojenja te je potrebno spektrofotometrijski odrediti apsorbancu na 765 nm [19].

U svaku kivetu dodan je uzorak u količini od 20  $\mu$ L, a svaki uzorak je pripremljen u triplicatu. Nakon dodavanja uzorka, u svaku kivetu otpipetirano je 1.58 mL demineralizirane vode i 100  $\mu$ L Folin-Ciocalteu reagensa. Sve je temeljito promiješano. Nakon miješanja, u svaku kivetu dodano je 300  $\mu$ L zasićene otopine natrijeva karbonata prethodno dobivene otapanjem 20 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u 80 ml destilirane vode, zagrijavane do vrenja te je nakon njezina hlađenja dodano par sitnih kristalića natrijevog karbonata. Otopina je nakon 24 sata filtrirana kroz filter papir te je preostali volumen do 100 ml dopunjen destiliranom vodom. Nakon dodane otopine natrijeva karbonata potrebno je ponovno dobro promiješati. Otopine su ostavljene na sobnoj temperaturi dva sata. Dolazi do plavog obojenja nakon čega je spektrofotometrijski određena apsorbancija svake otopine na 765 nm. Slijepa proba pripremljena je na isti način, no mjesto uzorka dodan je 80% metanol [19].



*Slika 11: Mjerenje ukupnih polifenola u uzorku lišća*

Izvor: vlastita fotografija

Kako bi se odredila baždarna krivulja, prvo je pripremljena stock otopina galne kiseline koncentracije 5 mg/ml. (Za njenu pripremu korišteno je 50 grama galne kiseline otopljene u 1 ml 96%-tnog etanola u odmjerne tikvici od 10 ml te je ostatak nadopunjen destiliranom vodom. Od stock otopine galne kiseline pripremljena su razrjeđenja potrebna za izradu baždarnog pravca prikazana u Tablici 2. Sadržaj ukupnih polifenola izračunat je prema dobivenoj jednadžbi pravca:  $y=0,0013x$ .

Tablica 2: Razrjeđenja potrebna za izradu baždarnog pravca i izračun sadržaja ukupnih polifenola

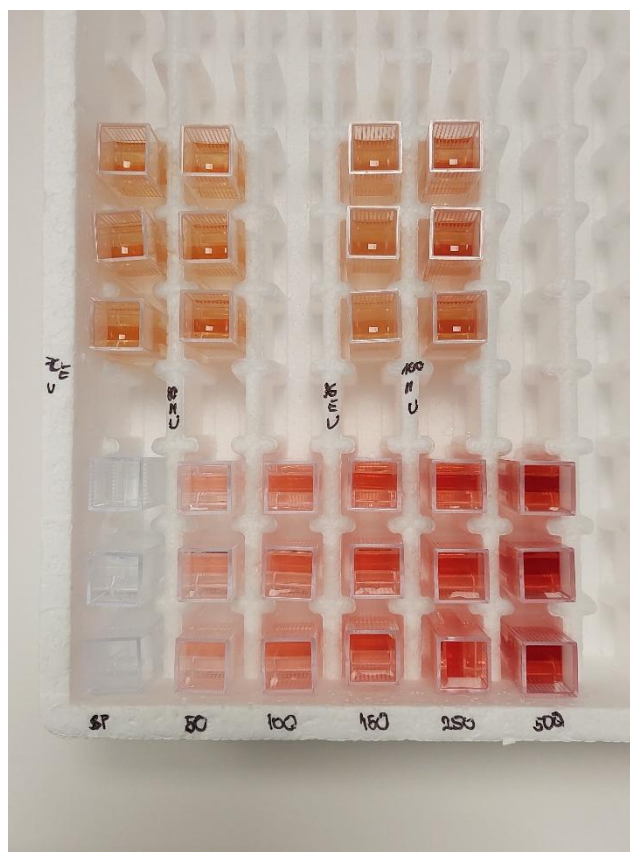
c [mg/l]	Stock otopina	Demineralizirana H <sub>2</sub> O
0	0 µl	2000 µl
50	10 µl	1990 µl
150	30 µl	1970 µl
250	50 µl	1950 µl
500	100 µl	1900 µl
1000	200 µl	1800 µl
1500	300 µl	1700 µl
2000	400 µl	1600 µl

### 3.3.4. Određivanje ukupnih flavonoida

Metoda s aluminijevim kloridom, poznata i kao metoda po Zhishen i sur. (1999) [21], koristi se za određivanje ukupnih flavonoida u uzorcima. Temelji se na sposobnosti flavonoida da tvore komplekse s aluminijevim kloridom (AlCl<sub>3</sub>), pri čemu je intenzitet obojenja proporcionalan količini prisutnih flavonoida.

Za provedbu metode potrebno je pripremiti 5%-tnu otopinu natrijeva nitrita, 10%-tnu otopinu aluminijeva klorida i 1 M otopinu natrijevog hidroksida. Otopina natrijevog nitrita dobivena je otapanjem 1.25 g natrijevog nitrita u 25 ml destilirane vode. Otapanjem 2.5 g aluminijeva klorida u 25 ml destilirane vode, dobivena je otopina aluminijeva klorida. Pri otapanju aluminijeva klorida u vodi potrebno je biti oprezan jer dolazi do egzotermne reakcije odnosno oslobađanja topline što rezultira porastom temperature okoline, te ovaj proces obično prati oslobađanje plamenova, iskre, svjetlosti ili dima. Otopina natrijevog hidroksida pripremljena je otapanjem 4 g NaOH u 100 ml destilirane vode. Korištene su plastične kivete od 2 ml te su uzorci rađeni u triplicatu. U kivete je otpipetirano 800 µl destilirane vode i 200 µl uzorka (70E, 80M, 96E, 100M). Reakcija je započeta dodavanjem 60 µl natrijeva nitrita, a 5 minuta kasnije smjesi je dodano 60 µl aluminijeva klorida. Nakon 6 minuta dodano je 400 µl prethodno pripremljene otopine 1M natrijevog hidroksida. Na kraju je otopini dodano još 480 µl destilirane vode kako bi sveukupan volumen iznosio 2 ml. Dobivene su otopine crvenog obojenja, dobro promiješane stavljene u spektrofotometar kako bi se odredila apsorbancija na 510 nm. Slijepa proba pripremljena je na isti način, no mjesto uzoraka dodan je 80% metanol [21].





Slika 12: Ukupni flavonoidi u ekstraktima lišća ginka i u standardnoj otopini katehina

Izvor: vlastita fotografija

Pripremljena je otopina katehina koncentracije 1 mg/mL otapanjem 10 mg katehina u metanolu unutar tikvice od 10 mL. Tikvica je stavljena na miješalicu na pola sata kako bi se katehin brže otopio. Ta otopina je korištena za dobivanje razrjeđenja od 50 - 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Razrjeđenja potrebna za izradu baždarnog pravca prikazana su u Tablici 3. Na temelju vrijednosti apsorbancije razrjeđenja izvedena je jednadžba baždarnog pravca  $y = 0,0027x$ . Dobivenom jednadžbom pravca izračunat je sadržaj ukupnih flavonoida.

Tablica 3: Razrjeđenja potrebna za izradu baždarnog pravca i izračun sadržaja ukupnih flavonoida

c [mg/l]	Stock otopina	80% metanol
0	0 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$
50	50 $\mu\text{l}$	950 $\mu\text{l}$
100	100 $\mu\text{l}$	900 $\mu\text{l}$
150	150 $\mu\text{l}$	850 $\mu\text{l}$
250	250 $\mu\text{l}$	750 $\mu\text{l}$
500	500 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$

### 3.3.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Metoda prema Brand-Williamsu [22] koristi se za procjenu antioksidacijske vrijednosti putem smanjenja radikala DPPH° (2,2.difenil-1-pikrihidrazil). Koristi se spektrofotometrija za praćenje smanjenja apsorpcije pri valnoj duljini od 515 nm, jer DPPH radikal apsorbira pri toj valnoj duljini. U epice je pripremljeno 20 µl uzorka i 980 µl DPPH, dok je za slijepu probu pripremljeno 20 µl čistog metanola i 980 µl DPPH. Reakcija je ostavljena da odstoji 25-30 minuta uz lagano miješanje. Uzorci su zatim prebačeni u kivete te se mjeri apsorbanca na 515 nm na spektrofotometru [22].

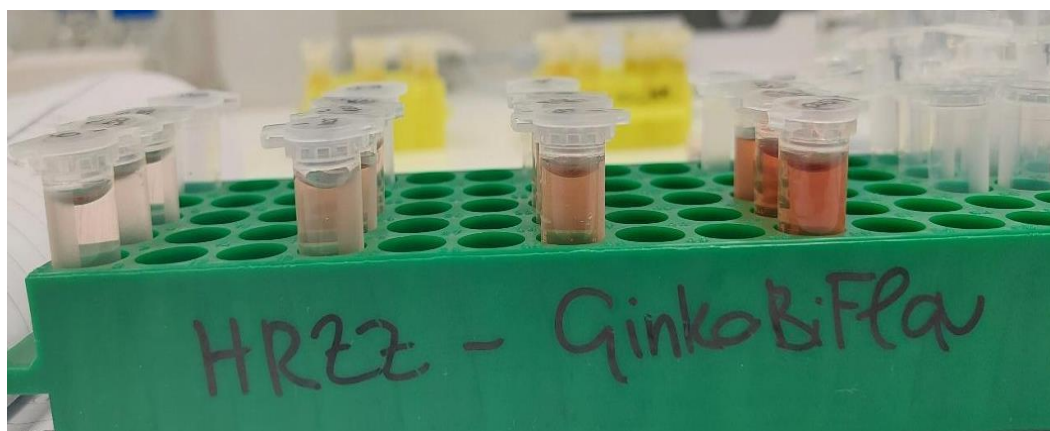
Postotak inhibicije slobodnog radikala izračunava se prema formuli:

$$\% = \left( \frac{Asp - Au}{Asp} \right) \times 100$$

pri čemu je:

*Asp* – očitana vrijednost slijepa probe

*Au* – očitana vrijednost uzorka



Slika 13: Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Izvor: vlastita fotografija

## 4. Analiza rezultata

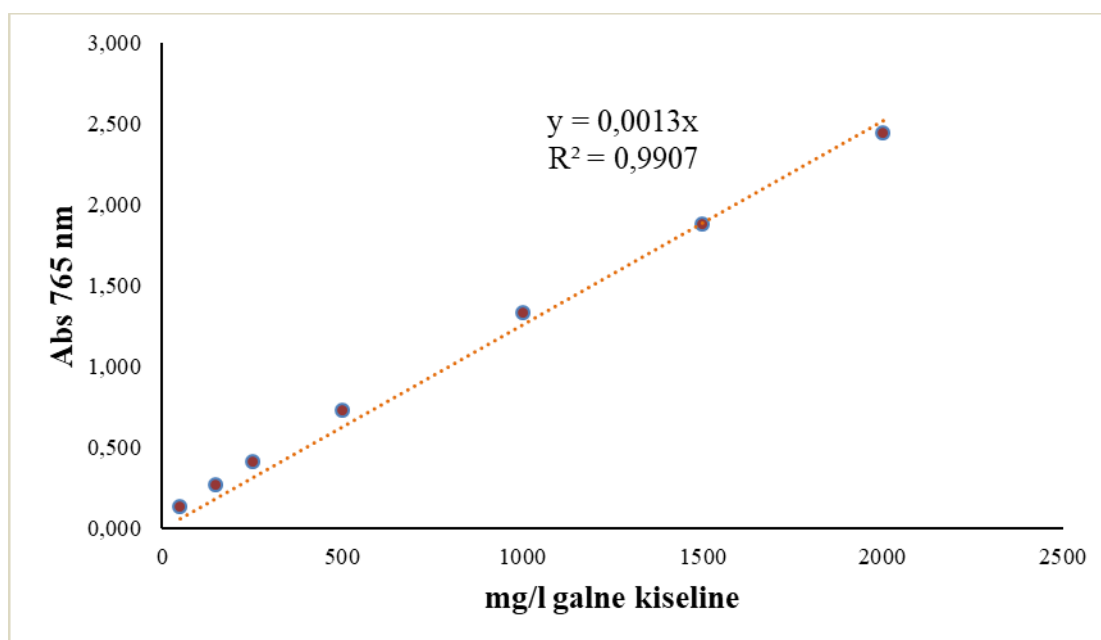
### 4.1. Ukupni polifenoli

Tablica 4 prikazuje izmjerene vrijednosti apsorbancije spektrofotometrijski pri 765 nm. Slične vrijednosti u triplikatu ukazuju na dobru reproducibilnost rezultata.

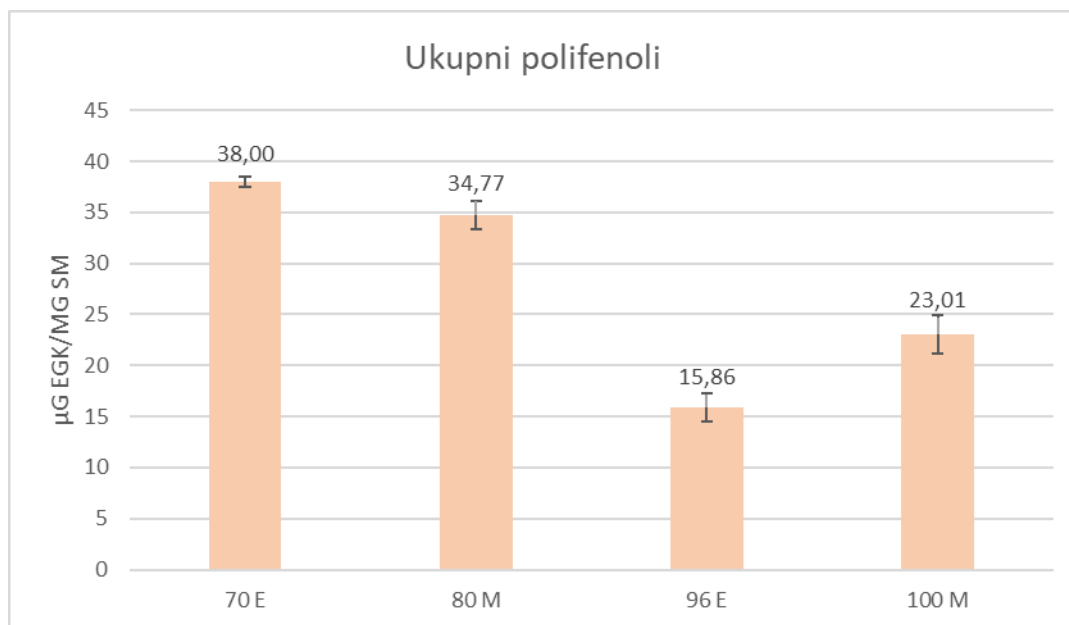
Tablica 4: Rezultati spektrofotometrijskog mjerenja ukupnih polifenola

UZORAK	OČITANA APSORBANCIJA PRI 765 nm		
	1	2	3
70% etanol	1,498	1,483	1,477
80% metanol	1,313	1,393	1,405
96% etanol	0,562	0,632	0,670
100% metanol	0,840	0,995	0,877

Na Slici 15 prikazane su vrijednosti udjela ukupnih polifenola izračunate prema jednadžbi baždarnog pravca galne kiseline (Slika 14). Udio je izražen u mikrogramima galne kiseline po miligramu suhe mase uzorka ( $\mu\text{g GAE}/\text{mg dw}$ ).



Slika 14: Baždarni pravac za galnu kiselinu



Slika 15: Utjecaj ekstrakcijskog otapala na sadržaj ukupnih polifenola listova ginka

Sadržaj ukupnih polifenola pokazivao je malo više vrijednosti kod ekstrakcije u 70%-tnom etanolu ( $38 \pm 0.46 \mu\text{g GAE/mg dw}$ ) od onog u 80%-tnom metanolu ( $34.77 \pm 1.39 \mu\text{g GAE/mg dw}$ ). Kod 100%-tnog metanola vidljiv je smanjen sadržaj ukupnih polifenola ( $23.01 \pm 1,87 \mu\text{g GAE/mg dw}$ ) u usporedbi sa 70%-tnim etanolom i 80%-tnim metanolom, dok je kod listova otopljenih u 96%-tnom etanolu najniži sadržaj ukupnih polifenola ( $15.86 \pm 1.36 \mu\text{g GAE/mg dw}$ ) u usporedbi sa svim ostalim korištenim otapalima. Rezultati upućuju na to da je korištenje 70%-tnog etanola i 80%-tnog metanola najbolji izbor otapala za ekstrakciju ukupnih polifenola kod lišća ginka ukoliko iste želimo koristiti kao izvor polifenola.

Dobivene vrijednosti ukupnih polifenola mogu se usporediti s rezultatima dobivenima u radu koji se temeljio na utjecaju različitih ekstrakcijskih otapala na ukupni sadržaj fenola, flavonoida i biološke aktivnosti ekstrakata iz sudanskih ljekovitih biljaka gdje je utvrđeno kako je 70%-tni etanol najbolje otapalo izbora za pripremu ekstrakata bogatih fenolnim spojevima [23].

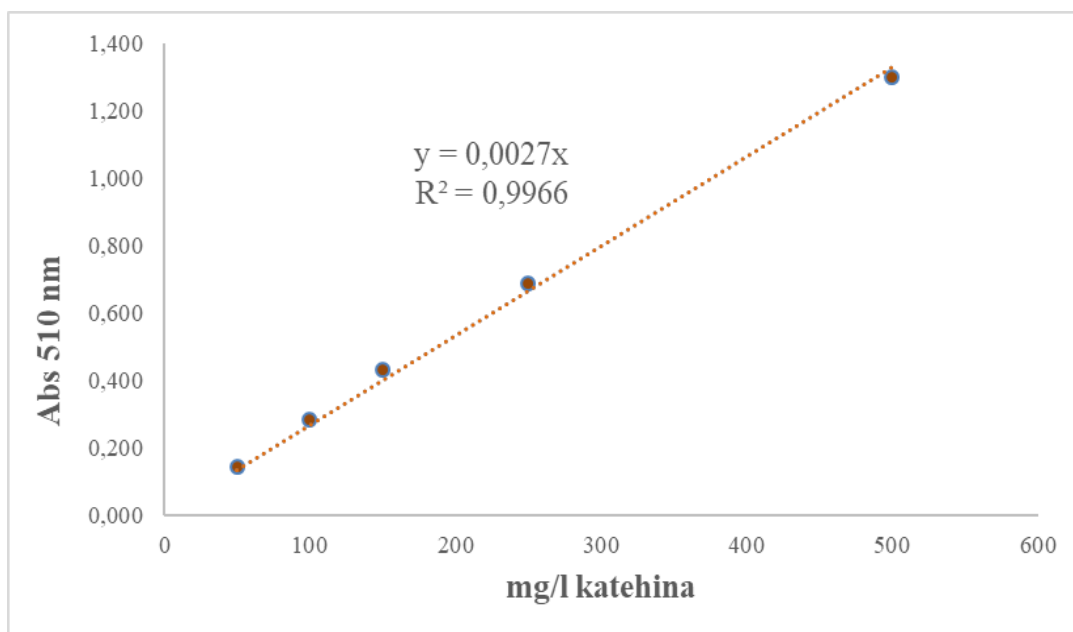
## 4.2. Ukupni flavonoidi

Tablica 5 prikazuje izmjerene apsorbancije pri 510 nm za mjerenje ukupnih flavonoida. Jednako kao i za ukupne polifenole slične vrijednosti izmjerene u triplicatima upućuju na dobru reproducibilnost.

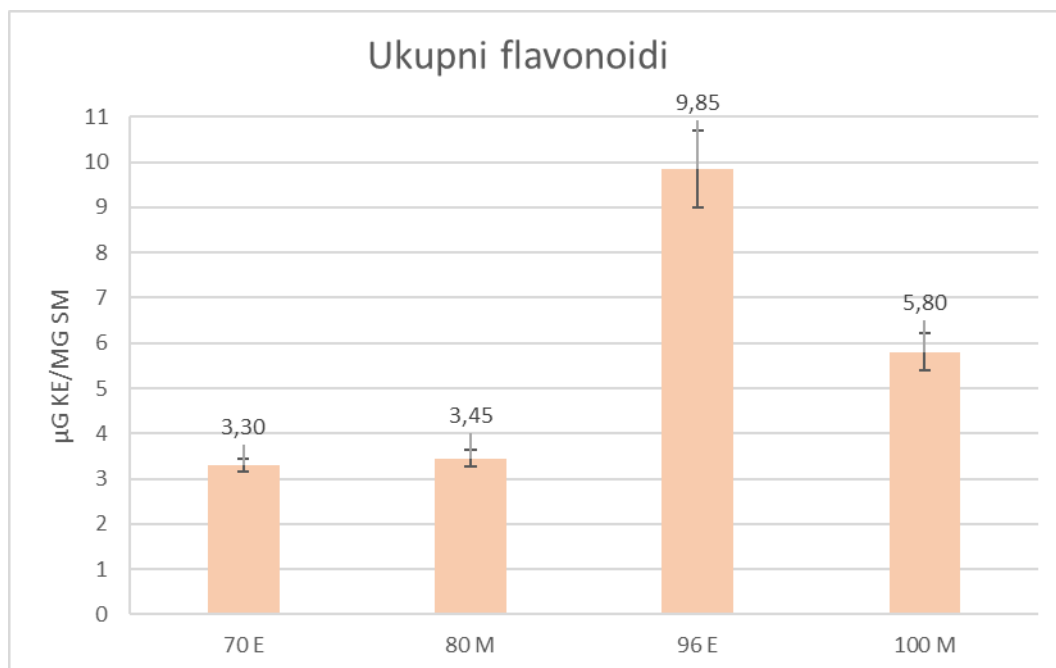
Tablica 5: Rezultati spektrofotometrijskog mjerenja ukupnih flavonoida

UZORAK	OČITANA APSORBANCIJA PRI 510 nm		
	1	2	3
70% etanol	0,256	0,279	0,270
80% metanol	0,301	0,270	0,276
96% etanol	0,721	0,831	0,852
100% metanol	0,484	0,498	0,437

Na Slici 17 prikazane su vrijednosti količine ukupnih flavonoida, preračunate prema dobivenoj jednadžbi baždarnog pravca za katehin (Slika 16). Količina je izražena u suhoj tvari kao ekvivalent katehina ( $\mu\text{g CE/mg dw}$ ).



Slika 16: Baždarni pravac za katehin



Slika 17: Utjecaj ekstrakcijskog otapala na sadržaj ukupnih flavonoida listova ginka

Usporedno sa rezultatima sadržaja ukupnih polifenola, sadržaj ukupnih flavonoida pokazao je različite vrijednosti s obzirom na različita otapala. Najviši sadržaj ukupnih flavonoida izmjeren je kod ekstrakcije u 96%-tnom etanolu ( $9.85 \pm 0.85$  µg GAE/mg dw), slijedi ekstrakt pripremljen u 100% metanolu 100%-tnom metanolu ( $5.80 \pm 0.41$  µg GAE/mg dw) te oni u 80% metanolu ( $3.45 \pm 0.19$  µg GAE/mg dw) te 70% etanolu ( $3.30 \pm 0.15$  µg GAE/mg dw). Ovi rezultati slijede malo drugačiji trend od ukupnih polifenola.

Rezultati dobiveni u istraživanju temeljenom na učinku ekstrakcijskog otapala na ukupni sadržaj fenola, ukupni sadržaj flavonoida i antioksidativno djelovanje *Limnophila aromatica* [24], ukazuju na slične rezultate, točnije utvrđeno je kako 100%-tni etanol daje najveći prinos ukupnih flavonoida u usporedbi s drugim korištenim ekstrakcijskim otapalima. Odabir otapala ovisi o biljnoj matrici, ali i o bioaktivnim spojevima koje želimo ekstrahirati te je uvijek potrebno napraviti optimizaciju ekstrakcije i odabrati najbolje otapalo [5].

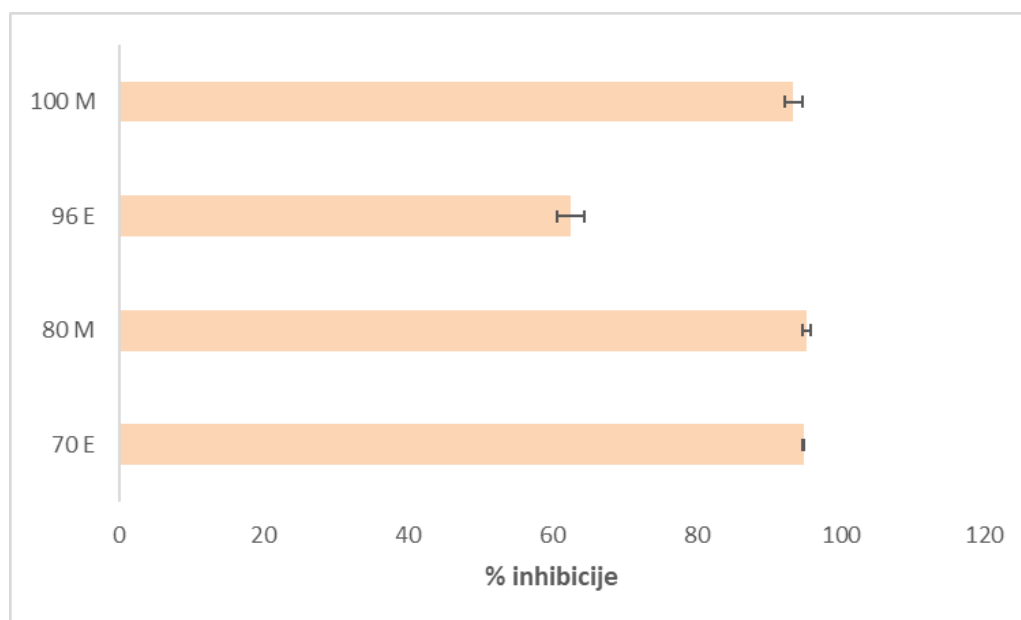
### 4.3. Antioksidacijska aktivnost

Mjerenja apsorbancije na 515 nm su prikazane su u Tablici 6.

Tablica 6: Rezultati spektrofotometrijskog mjerenja i postotak inhibicije DPPH

	SP	1	2	3
70 E	0,928	0,047	0,049	0,047
80 M	0,930	0,051	0,04	0,042
96 E	0,931	0,366	0,352	0,327
100 M	0,929	0,072	0,047	0,063

Na Slici 18 prikazana je antioksidacijska aktivnost izražena u postotku inhibicije slobodnih radikala.



Slika 18: Postotak inhibicije DPPH radikala

Kao što je vidljivo iz grafičkog prikaza rezultata, kod gotovo svih uzoraka je došlo do približno istog postotka inhibicije slobodnih radikala osim u slučaju korištenja 96%-tnog etanola. Kod korištenja 96%-tnog etanola dobiveni postotak inhibicije slobodnih radikala iznosi približno 63% dok kod korištenja ostalih ekstrakcijskih otapala vidljivih na grafu, postotak inhibicije se kreće od 93 do 95 %. Ti rezultati upućuju na činjenicu da je kod 96% etanola došlo do ekstrakcije manje količine bioaktivnih komponenata koje imaju antioksidacijsku aktivnost. Takvi rezultati nisu očekivani jer je upravo ekstrakt u 96% etanolu pokazao najviši udio ukupnih flavonoida koji su poznati antioksidansi. No za točno objašnjenje rezultata valja napraviti analizu i kvantifikaciju pojedinih flavonoida.

Slični rezultati dobiveni su u radu u kojem je istraživana utjecaj različitih ekstrakcijskih otapala na antioksidativni potencijal ekstrakta kore japanskog crvenog bora [25]. Utvrđeno je kako 100%-tni etanol daje najmanju antioksidacijsku aktivnost, kao što i u ovom slučaju 96%-tni etanol daje najslabije rezultate. No svakako za svaki biljni materijal valja ispitati različita otapala te prema eksperimentalnim rezultatima odabrati najpogodnije.



## 5. Zaključak

Biljni ekstrakti dobiveni iz različitih biljnih organa našli su široku primjenu u različitim industrijama, posebice farmaceutskoj i prehrambenoj. Kod pripreme ekstrakta za daljnju upotrebu valja voditi računa o tome da se koristi ekstrakcijsko sredstvo koje je što manje toksično, te se mora voditi računa o isplativosti ekstrakcije. Jedan od važnih faktora je odabir najpovoljnijeg otapala [5]. U ovom radu ispitan je utjecaj otapala na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidacijsku aktivnost listova ginka. Listovi ginka upotrebljavaju se u farmaceutskoj industriji za tretiranje različitih stanja povezanih sa starenjem kao što su neurodegenerativne bolesti i usporena cirkulacija.

U ovom radu ispitana su četiri različita otapala: 100% metanol, 80% metanol, 96% etanol te 70% etanol. Proces ekstrakcije za sva otapala bio je identičan kako bi se pratio samo utjecaj različitog otapala. Sadržaj ukupnih polifenola bio je najviši kod primjene 70% etanola te 80% metanola dok je sadržaj ukupnih flavonoida bio najviši kod upotrebe 96% etanola. Antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom pokazala je gotovo 100% inhibiciju u svim otapalima osim kod 96% etanola.

Naši rezultati ukazuju na činjenicu da je kod pripreme ekstrakta važno odabrati najbolje otapalo koje će dati najviši prinos. Spektrofotometrijski podaci daju orijentacijske rezultate, no mane ovakvih metoda su niska specifičnost te može doći do oprečnih rezultata kod različitih metoda kao što je slučaj u ovom radu. Za najbolje rezultate potrebno bi bilo napraviti i kvantifikaciju pojedinačnih aktivnih komponenata upotrebom neke od metoda tekućinske kromatografije sa odgovarajućim detektorima.

## 6. Literatura

[1] Zhao Y., Fu C., Paule J., Koch M., (2010), Out of China: Distribution history of Ginkgo biloba L., 495-496

[2] Pang Z., Pan F., He S., (1996), Ginkgo biloba L.: History, Current Status, and Future Prospects. The journal of alternative and complementary medicine, Volume 2, Number 3, pp. 359-361

[3] Ramassamy C., Longpré F., Christen Y., (2007), Ginkgo Biloba Extract (EGb 761) in Alzheimer's Disease: Is there Any Evidence?. Current Alzheimer Research, 4, 253-262

[4] Lin L., Chen P., Ozcan M., Harnly J.M., (2008), Chromatographic Profiles and Identification of New Phenolic Components of Ginkgo biloba Leaves and Selected Products. J. Agric. Food Chem. 56, 6671–6679

[5] Muhamad I.I., Hasan N.D., Mamat S.N.H., Nawi N.M., Rashid W.A., Azlan Hadi Tan N., (2017), Extraction Technologies and Solvents of Phytochemicals From Plant Materials: Physicochemical Characterization and Identification of Ingredients and Bioactive Compounds From Plant Extract Using Various Instrumentations. University of Technology Malaysia, Johor Bahru, Johor, Malaysia, 15-32

[6] Sofowora A., Ogunbodede E., Onayaade A., (2013), The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. 210-211

[7] Kolak I., Šatović Z., Rukavina H., Rozić I., (1997), Ljekovito bilje na Hrvatskim prostorima. Znanstveni rad. Zagreb: Agronomski fakultet. 343-343

[8] Ortega-Ramirez L.A., Rodriguez-Garcia I., Leyva J.M., Cruz-Valenzuela M.R., Silva-Espinoza B.A., Gonzalez-Aguilar G., Siddiqui W., Ayala-Zavala J.F., (2014.), Potential of Medicinal Plants as Antimicrobial and Antioxidant Agents in Food Industry: A Hypothesis. Journal of Food Science, Vol. 79, Nr. 2, 129-130

[9] Mihovilović I., Proizvodnja i prerada ljekovitog i aromatičnog bilja. 1.izd. Senj: Grad Senj, Razvojna agencija Senj d.o.o., 17-19, 23

- [10] Vinatoru M., (2001), An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonic Sonochemistry* 8. 303-304
- [11] Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo, G., Rakesh, D.D. (2008), Extraction technologies for Medicinal and Aromatic Plants, International centre for science and high technology, Trieste, 21-22
- [12] Liu R.H., (2018), Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. Department of Food Science, Cornell University, Ithaca. 3479-3481
- [13] González-Sarrías A.; Tomás-Barberán, F.; García-Villalba, R., (2020) Structural diversity of polyphenols and distribution in foods. 2
- [14] Šamec D., Karalija E., Šola I, Vujčić Bok V., Salopek-Sondi B., (2021), Uvod, Flavonoidi, The Role of Polyphenols in Abiotic Stress Response: The Influence of Molecular Structure, 3-6
- [15] Zhang Q.W., Lin L.G., Ye W.C., (2018), Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review, 1-3
- [16] Hulina N., (2011), Više biljke – stablašice: Sistematika i gospodarsko značenje. Urednik: Rak O., Nakladnik: Rešetar A., 43-45
- [17] Singh B., Kaur P., Gopichand, R.D. Singh, P.S. Ahuja, (2008), Biology and chemistry of Ginkgo biloba. Institute of Himalayan Bioresource Technology, Palampur, HP — 176 061, India, 401-418
- [18] Blecharz-Klin K., Widy-Tyszkiewicz E., Piechal A., Joniec I., Pyrzanowska J., (2009), Pharmacological and biochemical effects of Ginkgo biloba extract on learning, memory consolidation and motor activity in old rats. *Acta Neurobiol Exp*, 69: 217–231
- [19] Singleton, V.L.; Rossi, J.A. (1965), Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144–158

- [20] Palazzo de Mello C., Lopes G. C., Blainski A., (2013), Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*,18, 6853-6854
- [21] 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
- [22] 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
- [23] Dirar A.I., Alsaadi D.H.M., Wada M., Mohamed M.A., Watanabe T., Devkota H.P., (2018), Effects of extraction solvents on total phenolic and flavonoid contents and biological activities of extracts from Sudanese medicinal plants. *South African Journal of Botany*, Volume 120, 261-267
- [24] Do Q.D., Angkawijaya A.E., Tran-Nguyen P.L., Huynh L.H., Soetaredjo F.E., Ismadji S., Ju Y.H., (2013), Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoids content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis*, 1-7
- [25] Venkatesan T., Choi Y.W., Kim Y.K., (2019), Impact of Different Extraction Solvents on Phenolic Content and Antioxidant Potential of *Pinus densiflora* Bark Extract. *Hindawi, BioMed Research International*, 1-15

## Popis slika

Slika 1: Rasprostranjenost ginka u svijetu .....	1
Slika 2: Drvo ginka .....	2
Slika 3: Lišće ginka .....	3
Slika 4: Listovi lovora.....	5
Slika 5: Cvijet i listovi origana.....	5
Slika 6: Podjela polifenola .....	6
Slika 7: Struktura flavonoida.....	7
Slika 8: Podjela i struktura flavonoida.....	7
Slika 9: Korištena aparatura .....	12
Slika 10: Četiri korištene različite vrste otapala.....	13
Slika 11: Mjerenje ukupnih polifenola u uzorku lišća .....	14
Slika 12: Ukupni flavonoidi u ekstraktima lišća ginka i u standardnoj otopini katehina .....	16
Slika 13: Određivanje antioksidacijske aktivnosti .....	17
Slika 14: Baždarni pravac za galnu kiselinu .....	18
Slika 15: Utjecaj ekstrakcijskog otapala na sadržaj ukupnih polifenola listova ginka.....	19
Slika 16: Baždarni pravac za katehin.....	20
Slika 17: Utjecaj ekstrakcijskog otapala na sadržaj ukupnih flavonoida listova ginka .....	21
Slika 18: Postotak inhibicije DPPH radikala .....	22

## **Popis tablica**

Tablica 1: Primjeri ljekovitog bilja korištenog u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji .....	5
Tablica 2: Razrjeđenja potrebna za izradu baždarnog pravca i izračun sadržaja ukupnih polifenola .....	15
Tablica 3: Razrjeđenja potrebna za izradu baždarnog pravca i izračun sadržaja ukupnih flavonoida .....	16
Tablica 4: Rezultati spektrofotometrijskog mjerenja ukupnih polifenola .....	18
Tablica 5: Rezultati spektrofotometrijskog mjerenja ukupnih flavonoida .....	20
Tablica 6: Rezultati spektrofotometrijskog mjerenja i postotak inhibicije DPPH .....	22

**4.3%**PlagScan by Turnitin Results of plagiarism analysis from 08/25/2023, 02:34 PM  
Rebeka Oreški.docx

Date: 08/25/2023, 02:30 PM

\* All sources 22 | Internet sources 15 | Own documents 1 | Organization archive 1 | Plagiarism Prevention Pool 5

- [0] [repozitorij.unin.hr/en/islandora/object/unin:5941](#)  
1.1% 6 matches

---

- [1] [www.bib.irb.hr/1262905](#)  
1.1% 7 matches

---

- [2] [zir.nsk.hr/islandora/object/pmf:5881/datastream/PDF/view](#)  
0.8% 7 matches

---

- [3] [www.semanticscholar.org/paper/Extraction-Technologies-and-Solvents-of-From-Plant-Muhamad-Hassan/892d0a5ea7f6b07fd08685f0396d322637ceb16e](#)  
0.9% 4 matches

---

- [4] [repozitorij.unizg.hr/islandora/object/pbf:3069/datastream/PDF](#)  
0.4% 3 matches

---

- [5] [zir.nsk.hr/islandora/object/pbf:3241/datastream/PDF/download](#)  
0.2% 2 matches

---

- [6] from a PlagScan document dated 2017-10-23 21:13  
0.3% 3 matches

---

- [7] "Završni rad Lucija Pintarić.docx" dated 2022-07-15  
0.3% 3 matches

---

- [8] "Ms. No. MLJE-21-66\_BJEKIC.docx" dated 2021-07-16  
0.2% 2 matches

---

- [9] [www.researchgate.net/publication/320005620\\_Extraction\\_Technologies\\_and\\_Solvents\\_of\\_Phytocompounds\\_From\\_Plant\\_Materials\\_Physicochemical\\_Characteriz](#)  
0.3% 2 matches

---

- [10] [www.ars.usda.gov/people-locations/person?person-id=2331](#)  
0.2% 2 matches

---

- [11] [vdocuments.mx/utjeaj-iljnih-regulatora-rasta-na-sadraj-utjeaj-iljnih-regulatora-rasta-na-sadraj.html](#)  
0.2% 1 matches

---

- [12] [www.bib.irb.hr/598311](#)  
0.2% 2 matches

---

- [13] from a PlagScan document dated 2019-07-10 17:13  
0.2% 1 matches  
2 documents with identical matches

---

- [16] [repozitorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf:3448/datastream/PDF/download](#)  
0.2% 1 matches

---

- [17] from a PlagScan document dated 2022-02-09 02:13  
0.1% 1 matches  
2 documents with identical matches

---

- [20] [repozitorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf:3071/datastream/PDF/view](#)  
0.1% 1 matches  
3 documents with identical matches

---

- [24] from a PlagScan document dated 2021-06-24 16:59  
0.1% 1 matches  
2 documents with identical matches

---

- [27] from a PlagScan document dated 2018-11-09 02:42  
0.1% 1 matches

---

- [28] [core.ac.uk/download/pdf/197876062.pdf](#)  
0.1% 1 matches  
1 documents with identical matches

---

- [30] [repozitorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf:2964/datastream/PDF/view](#)  
0.1% 1 matches

---

- [31] [repozitorij.unizg.hr/islandora/object/pbf:2529/preview](#)  
0.1% 1 matches  
2 documents with identical matches