

Razvoj i optimizacija ekstrakcije biflavonoida iz lišća Ginkgo biloba L. eutekničnim otapalima

Bajo, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:201480>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-08**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Matea Bajo

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidatkinja Matea Bajo

Predala je izrađen diplomski rad dana: 19. rujna 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

Doc. dr. sc. Anita Šalić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije
Izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Doc. dr. sc. Martina Sudar, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije
Prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 22. rujna 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Matea Bajo

RAZVOJ I OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE BIFLAVONOIDA IZ LIŠĆA *Ginkgo biloba*
L. EUTEKTIČNIM OTAPALIMA

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: doc. dr. sc. Anita Šalić

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. doc. dr. sc. Anita Šalić
2. izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić
3. doc. dr. sc. Martina Sudar

Zagreb, rujan 2023.

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Aniti Šalić na vodstvu, izdvojenom vremenu i strpljenju pri izradi i pisanju ovog eksperimentalnog rada. Hvala Vam na svakom komentaru i savjetu jer sam na taj način jako puno naučila. Bilo mi je veliko zadovoljstvo raditi s Vama jer, osim što sam od Vas puno naučila, pokazali ste mi što znači voljeti svoj posao stvarajući ugodnu radnu atmosferu.

Također se želim zahvaliti Miji Radović, mag. ing., doc. dr. sc. Dunji Šamec, izv. prof. dr. sc. Ani Jurinjak Tušek, izv. prof. dr. sc. Marini Cvjetko Bubalo i prof. dr. sc. Bruni Zeliću koji su svojim znanjem i utrošenim vremenom doprinijeli izradi ovog rada.

Velika hvala mojim roditeljima i bratu koji su moj najveći oslonac u životu i koji su uvijek tu za mene!

I za kraj, želim se zahvaliti svim svojim prijateljicama i prijateljima, a posebno osobama koje su najviše obilježile pet godina mog studentskog života. Valentine, Antonia i Marko, hvala vam na svakom trenutku provedenom skupa u domu na Savi, svakoj kavi, ručku i druženju koji su uvelike uljepšali ovaj period života!

SAŽETAK

Biljni svijet je prirodno skladište bioaktivnih tvari. Jedna od najviše istraženih skupina svakako su flavonoidi koji imaju višestruku funkciju u biljkama, ali i pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje. Flavonoidi u biljkama mogu postojati u slobodnom obliku, ali najčešće su glikolizirani, metilirani, acetilirani, prenilirani ili polimerizirani, što utječe i na njihovu bioaktivnost. Flavonoidni dimeri, poznatiji pod nazivom biflavonoidi, se sastoje od dva identična ili različita flavonoidna monomera. U odnosu na monomere značajno su manje istraženi iako pokazuju bolju biološku aktivnost od njih i nedavno je prepoznat njihov farmakološki potencijal, ponajviše zbog antivirusne, antikancerogene i antifungalne aktivnosti. Biflavonoidi su prisutni u biljkama koje se koriste u tradicionalnoj medicini poput ginka (*Ginkgo biloba* L.). Kako bi se biflavonoidi mogli koristiti, potrebno ih je izolirati iz prirodnih izvora. Ovaj proces obično uključuje korištenje raznih organskih otapala, koja mogu biti opasna za okoliš i ljude stoga se u zadnje vrijeme sve više koriste eutektična otapala (engl. *Deep Eutectic Solvent*, DES) koja su prepoznata kao zelena i jeftina ekstrakcijska sredstva, a dodatna prednost im je izražena fleksibilnost. Osim toga, zbog svoje netoksičnosti i biorazgradivosti odgovaraju svim zahtjevima i principima zelene kemije. Zbog svega navedenog, DES se smatraju vrlo pogodnima za izolaciju biomolekula kao što su biflavonoidi.

U sklopu ovog rada, prirodna eutektička otapala (engl. *Natural Deep Eutectic Solvent*, NADES) korištena su za ekstrakciju biološki aktivnih molekula iz listova ginka. Pomoću računalnog modela COSMO-RS ispitana je topljivost ginkgetina, najčešćeg predstavnika biflavonoida u listovima ginka, i amentoflavona, najpolarnijeg biflavonoida u ginku. Na temelju topljivosti procijenjeno je kako bi 15 od 250 ispitanih NADES moglo biti dobro ekstrakcijsko sredstvo. Odabrani NADES su u sljedećem koraku sintetizirani i karakterizirani (gustoća, viskoznosti, pH-vrijednost). U slijedu šaržnih ekstrakcija pomoću odabranih 15 otapala pri istim procesnim uvjetima (temperatura, vrijeme ekstrakcije i omjer početne mase usitnjenog lišća ginka i volumena otapala) ispitana je učinkovitost ekstrakcije biflavonoida, ukupnih flavonoida, polifenola i fenolnih kiselina. Najveća učinkovitost ekstrakcije ukupnih flavonoida postignuta je pomoću NADES betain:etilen glikol (B:EG) 1:2 s 30 % H₂O (w/w). Dobiveni rezultati uspoređeni su s ekstrakcijom provedenom pod istim uvjetima korištenjem 80 % metanola kao otapala, pri čemu je korištenjem odabranog NADES postignuta veća učinkovitost ekstrakcije za 24 %. U sljedećem koraku, ekstrakcija s odabranim NADES je dodatno optimirana korištenjem eksperimentalnog Box-Behnken dizajna na tri razine s tri faktora: vrijeme ekstrakcije, omjer početne mase usitnjenog lišća i volumena NADES-a i

temperatura. Dobiveni rezultati pokazali su da su optimalni uvjeti ekstrakcije korištenjem odabranog NADES: vrijeme ekstrakcije 45 min, omjer početne mase usitnjenog lišća i volumena NADES 20 mg/mL, te temperatura 20 °C. Naposljetku, korištenjem HPLC-DAD metode u ekstraktima su određene koncentracije 5 najzastupljenijih biflavonoida u lišću ginku (amentoflavon, ginkgetin, izoginkgetin, bilobetin i sciadopitisin).

Ključne riječi: flavonoidi, biflavonoidi, *Ginkgo biloba* L., ekstrakcija, NADES

SUMMARY

The plant kingdom is a known reservoir of bioactive natural products. The best-studied group to date is flavonoids, which perform multiple functions in plants and have positive impact on human health. Flavonoids can occur in free form in plants, but are more commonly glycosylated, methylated, acetylated, prenylated, or polymerized, which affects their bioactivity. Flavonoid dimers, known as biflavonoids, are consist of two identical or different flavonoid units. They are a less-studied subgroup of flavonoids, although they have bigger bioactivity, and they have recently been recognized as potential pharmaceutical agents, particularly because of their antiviral, anticancer, antifungal, and other bioactivities. They are commonly found in plants used in traditional medicine, such as ginkgo (*Ginkgo biloba* L.). The crucial step for the pharmaceutical use of any natural product is its isolation from the natural matrix. This process usually involves the use of various organic solvents, which can be hazardous to the environment and humans. Therefore, deep eutectic solvents (DES) have recently been recognized as environmentally friendly and cheap extraction agents, whose additional advantage is their pronounced flexibility. Besides that, there are non-toxic and biodegradable, so they satisfy all the requirements and principles of green chemistry. Due to all of the above, DES are considered very suitable for the isolation of biomolecules such as biflavonoids.

As part of this work, natural deep eutectic solvents (NADES) were used to extract biologically active molecules from ginkgo leaves. To select the best NADES for efficient extraction of biflavonoids from ginkgo, COSMOtherm software was used, and solubility of ginkgetin, as the most common biflavonoid in ginkgo leaves, and amentoflavone, as the most polar, was calculated. Based on the obtained solubility predictions, 15 of 250 tested NADES could be effective in extraction of biflavonoids. In the next step, those 15 NADES were synthesized, and characterized (density, viscosity, and pH). After synthesis, the extraction of biflavonoids, total phenols, flavonoids and phenolic acids was performed in a series of batch experiments with the same process conditions (temperature, extraction time and ratio of initial mass of shredded leaves and mass of NADES) where the extraction efficiency of total flavonoids was defined as a criterion for the selection of the best NADES. The highest extraction efficiency was obtained with Betaine:Ethylene Glycol (B:EG) 1:2 NADES with 30 % H₂O (w/w). Compared to extraction with 80 % methanol, 24 % higher extraction efficiency was obtained using B:EG 1:2 with 30 % H₂O (w/w) NADES under the same process conditions. In addition, extraction with that solvent was optimized using the experimental Box-

Behnken design at three levels with three factors: extraction time, ratio of initial mass of shredded leaves and mass of NADES, and temperature. It was concluded that the optimal extraction conditions are: extraction time of 45 min, the ratio of the initial mass of shredded leaves and mass of NADES 20 mg/mL, and temperature 20 °C. Finally, the concentrations of the 5 most abundant biflavonoids in ginkgo (amentoflavone, ginkgetin, isoginkgetin, bilobetin and sciadopitisin) were determined using HPLC-DAD method.

Key words: flavonoids, biflavonoids, *Ginkgo biloba* L., extraction, NADES

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1 Zelena kemija	3
2.2 Eutektična otapala	4
2.3 Ginko.....	8
2.4 Flavonoidi.....	8
2.4.1 Biflavonoidi	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1 Materijali	16
3.1.1 Kemikalije.....	16
3.1.2 Aparatura.....	17
3.2 Metode.....	18
3.2.1 Odabir NADES	18
3.2.2 Priprema i karakterizacija NADES	20
3.2.3 Mehanička obrada lišća ginka.....	22
3.2.4 Ekstrakcija kruto-kapljevito.....	22
3.2.5 Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije polifenola	23
3.2.6 Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije flavonoida	23
3.2.7 Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije fenolnih kiselina	24
3.2.8 HPLC-DAD analiza za određivanje koncentracije biflavonoida.....	25
3.2.9 Optimizacija ekstrakcije flavonoida	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1 Procjena topljivosti biflavonoida amentoflavona i ginkgetina u NADES primjenom programa COSMOtherm.....	29
4.2 Karakterizacija odabranih NADES	32

4.3	Ekstrakcija specijaliziranih metabolita pomoću NADES	33
4.3.1	Ekstrakcija polifenola	33
4.3.3	Ekstrakcija flavonoida	35
4.3.4	Ekstrakcija fenolnih kiselina.....	40
4.4	Optimizacija procesnih uvjeta ekstrakcije flavonoida pomoću NADES betain:etilen glikol (B:EG) 1:2 s 30 % H ₂ O.....	41
4.5	Određivanje koncentracije specijaliziranih metabolita u lišću ginka s različitim lokacija.....	48
5.	ZAKLJUČAK.....	51
6.	LITERATURA	52
7.	PRILOZI.....	56
	ŽIVOTOPIS.....	61

1. UVOD

Separacijske metode, među kojima je i ekstrakcija, poznate su od davnina. Faraonska civilizacija, čija povijest seže više od 4000 godina u prošlost, prva je počela prakticirati ekstrakciju kruto-tekuće te je tako iskoristila prednosti biljnog svijeta za dobivanje boja, aroma i materijala. Danas je važnost ekstrakcije još izraženija pa je gotovo nemoguće pronaći proizvodni proces u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji, ali i industriji finih kemikalija, biogoriva, materijala itd. u kojemu se ne koristi ekstrakcija. Procesi ekstrakcije su energetski zahtjevni, skupi, dugotrajni i štetni za okoliš zbog uporabe različitih organskih otapala. Stoga se danas radi na poboljšanju ovih procesa korištenjem različitih tehnika poput mikrovalova i ultrazvuka ili zamjenom organskih otapala zelenim alternativama [1].

Otapala s najvećom potencijalom da zamijene pojedina organska otapala u procesima ekstrakcije i sinteze, pogotovo u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, su prirodna eutektična otapala (engl. *Natural Deep Eutectic Solvent*, NADES). NADES su smjesa dviju ili više komponenti, krutih ili kapljevitih, koje imaju niže talište od svake pojedinačne komponente zbog formiranja međumolekulskih vodikovih veza [2]. Uz NADES se često veže i pojam niskotemperaturna eutektična otapala koji se odnosi za spomenuto značajno sniženje tališta pa su ova otapala većinom u kapljevitom stanju pri sobnoj temperaturi. Ono što ih čini boljim izborom od organskih otapala su niska hlapljivost, nezapaljivost, biorazgradivost te niska toksičnost. Osim navedenih prednosti, jedna od najvažnijih karakteristika NADES je njihova fleksibilnost dizajniranja (širok raspon početnih komponenti, različiti omjeri komponenti, udio vode itd.) što omogućuje njihovu ciljanu sintezu za specifične svrhe. Malim promjenama koncentracije ili omjera komponenti tijekom postupka sinteze mogu se sintetizirati otapala različitih fizikalno-kemijske karakteristike koja se potom mogu koristiti u različite svrhe. Osim u spomenutoj farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, NADES su svoju ulogu pronašla i u elektrokemiji, biomedicini, (bio)katalizi itd. [3].

Flavonoidi su organski spojevi koji se široko rasprostranjeni u jestivim i nejestivim biljkama u različitim koncentracijama. Pripadaju grupi sekundarnih metabolita u biljkama, a dokazan je njihov pozitivan utjecaj i na ljudsko zdravlje. Neki od važnih izvora flavonoida su voće i povrće poput kaka, čaja, soje, vina, kupine, borovnice, ginka, luka, mrkve [4]. Zbog svoje antioksidacijske, antikancerogene, antialergijske i protuupalne aktivnosti već su dugi niz godina predmet velikih znanstvenih istraživanja. Osim flavonoida, pažnju znanstvenika privukli su biflavonoidi, flavonoidni dimeri koji također pokazuju značajnu farmakološku

aktivnosti s posebnim naglaskom na antikancerogena svojstva. U ginku je do sada identificirano 13 različitih biflavonoida, a najzastupljeniji su: amentoflavon, ginkgetin, izoginkgetin, bilobetin i sciadopitisin [5]. Spomenuti biflavonoidi imaju vrlo sličnu strukturu pa je njihova identifikacija i izolacija iz prirodnih izvora vrlo zahtjevna. Stoga je, zbog velike biološke aktivnosti biflavonoida, potrebno pronaći učinkovitu, ali i ekološki održivu metodu za njihovu izolaciju iz prirodnih izvora kao što je *Ginkgo biloba* L.

U ovom radu provedena je ekstrakcija specijaliziranih metabolita (biflavonoida, ukupnih flavonoida, polifenola i fenolnih kiselina) iz usitnjenog lišća ginka pomoću 15 različitih NADES koji su odabrani pomoću računalnog softvera COSMOtherm na temelju topljivosti ginkgetina i amentoflavona. U slijedu šaržnih ekstrakcija, eksperimentalno je određena učinkovitost ekstrakcije ukupnih flavonoida pomoću odabranih NADES. Ekstrakcija s odabranim NADES je dodatno optimirana korištenjem eksperimentalnog Box-Behnken dizajna na tri razine s tri faktora: vrijeme ekstrakcije, omjer početne mase usitnjenog lišća i volumena NADES-a i temperatura. Naposljetku, HPLC-DAD metodom u ekstraktima su određene koncentracije 5 najzastupljenijih biflavonoida (amentoflavon, ginkgetin, izoginkgetin, bilobetin i sciadopitisin) u lišću ginka.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Zelena kemija

Tijekom prošlog stoljeća došlo je do ubrzanog razvoja industrije, znanosti i tehnologije koji ljudima omogućava kvalitetniji i dulji život. Iako je od početka bilo jasno da taj razvoj sa sobom nosi brojne negativne učinke, ponajviše na zdravlje ljudi i okoliš, tome se nije pridavala velika pažnja sve do kraja prošlog stoljeća. Tada je na inicijativu američke Agencije za zaštitu okoliša (engl. *Environmental Protection Agency*, EPA) razvijen koncept „zelene kemije“ koja se definira kao dizajn kemijskih proizvoda i procesa za smanjenje ili uklanjanje upotrebe i stvaranja opasnih tvari. Zelena kemija se temelji na 12 načela koja se odnose na sve dijelove procesa [6]:

- Sprječavanje nastanka otpada
- Maksimiziranje iskoristivosti atoma
- Manje opasne kemijske sinteze
- Korištenje sigurnijih kemikalija
- Korištenje sigurnijih otapala i pomoćnih sredstava
- Povećanje energetske učinkovitosti
- Upotreba obnovljivih sirovina
- Smanjenje proizvodnje derivata
- Korištenje katalizatora
- Razvoj postupaka razgradnje
- Pravovremena analiza za prevenciju onečišćenja
- Sigurnija kemija za prevenciju nesreća

Navedena načela predstavljaju upute, odnosno pravila prema kojima bi znanstvenici i inženjeri trebali razvijati nove materijale, proizvode, procese itd.

Organska otapala su nužna u različitim dijelovima kemijskih procesa, počevši od sinteze, analitičkih metoda za detekciju i kvantifikaciju spojeva, pročišćavanja te naposljetku čišćenje proizvodnih strojeva. Zbog svoje sposobnosti otapanja različitih spojeva, lipofilnosti, niske molarne entalpije isparavanja, niskih energetske zahtjeva i drugih prednosti i danas su to najčešće korištena otapala u industriji. Međutim, ta otapala ne zadovoljavaju načela zelene kemije jer su većinom toksična, lako zapaljiva i hlapljiva. Stoga je danas fokus mnogih znanstvenika usmjeren na razvoj novih otapala kojima bi se zamijenila dosad korištena

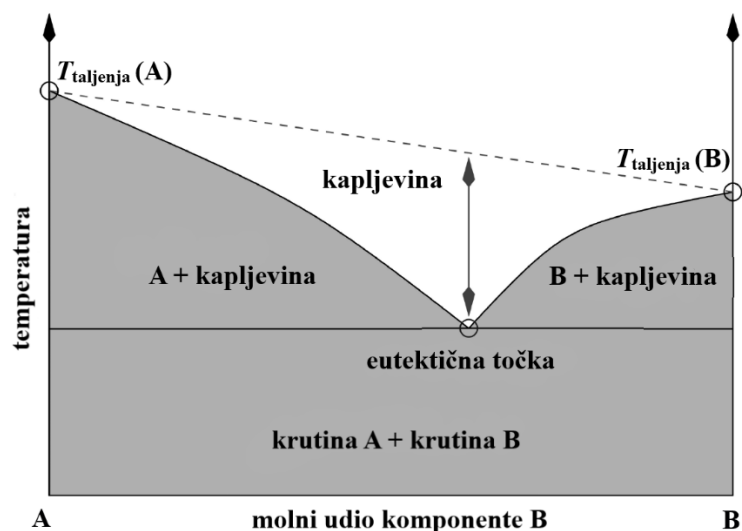
organska otapala. Neka od otapala koja se nastoje razviti i implementirati u razne industrijske procese su superkritični fluidi, voda, fluorirana otapala, polietilen glikol (PEG), glicerol, tekući polimeri, ionska otapala, euteklična otapala itd. Otapala s najvećim potencijalom, pogotovo u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, su DES. Brojni znanstvenici su prepoznali njihov potencijal te je u razdoblju između 2005. do 2020. godine objavljeno preko 4500 znanstvenih radova u kojima se ističu prednosti primjene DES u različitim područjima [3].

2.2 Euteklična otapala

Jedan od ključnih predmeta proučavanja zelene kemije je razvoj novih zelenih otapala koja će zamijeniti štetna organska otapala u mnogim kemijskim procesima poput ekstrakcija, sinteza i ostalih. Posebnu pažnju u tom pogledu privukla su ionska otapala (engl. *ionic liquids*, IL) i DES.

IL su spojevi potpuno sastavljeni od iona s talištem ispod 100 °C. Sastoje se od organskog kationa i koordinirajućeg aniona. Posjeduju vrlo nizak tlak pare, nisu zapaljivi i stabilni su na visokim temperaturama (oko 200 °C). Njihovi nedostaci su visoka cijena, visoka toksičnost, vrlo niska atomska ekonomija zbog njihove sinteze, teškoće u pročišćavanju i slaba biorazgradivost [7]. Novija vrsta otapala, DES se u posljednje vrijeme razvijaju kao analogna otapala ionskim. Prema nekim autorima DES su podvrsta IL, odnosno svrstavaju se u četvrtu generaciju IL. Iako te dvije vrste otapala imaju mnogo toga zajedničkog poput fizikalnih svojstava i primjene, s kemijske točke gledišta, ove dvije vrste otapala su zasebne grupe. DES se mogu pripremiti i iz ionskih, ali i iz neionskih spojeva pa se ne mogu u potpunosti smatrati IL [8].

DES su smjese dviju ili više komponenti, krutih ili kapljevutih, koje imaju niže talište od svake pojedinačne komponente zbog formiranja međumolekulskih vodikovih veza [2]. Na Slici 1. je prikazan općeniti fazni dijagram kruto-kapljevito jedne binarne euteklične smjese u kojem se može vidjeti ovisnost temperature taljenja o sastavu smjese. Najniža temperatura pri kojoj euteklična smjesa može postojati u kapljevitoj fazi naziva se euteklična točka i u njoj je sastav kapljevite i krute faze jednak. Razlika između temperature euteklične točke i teoretske temperature taljenja smjese ovisi o jačini interakcija između komponenti. Što su one jače, veća je i njihova razlika [9].



Slika 1. Fazni dijagram binarne eutektične smjese [10]

Zbog značajnog sniženja tališta DES su često kapljevine pri sobnoj temperaturi, a zbog svojih svojstava poput niske hlapljivosti, nezapaljivosti, biorazgradivosti i niske toksičnosti, ali i mogućnosti dizajniranja za specifične svrhe, DES su pronašla širok spektar primjena u različitim područjima [3].

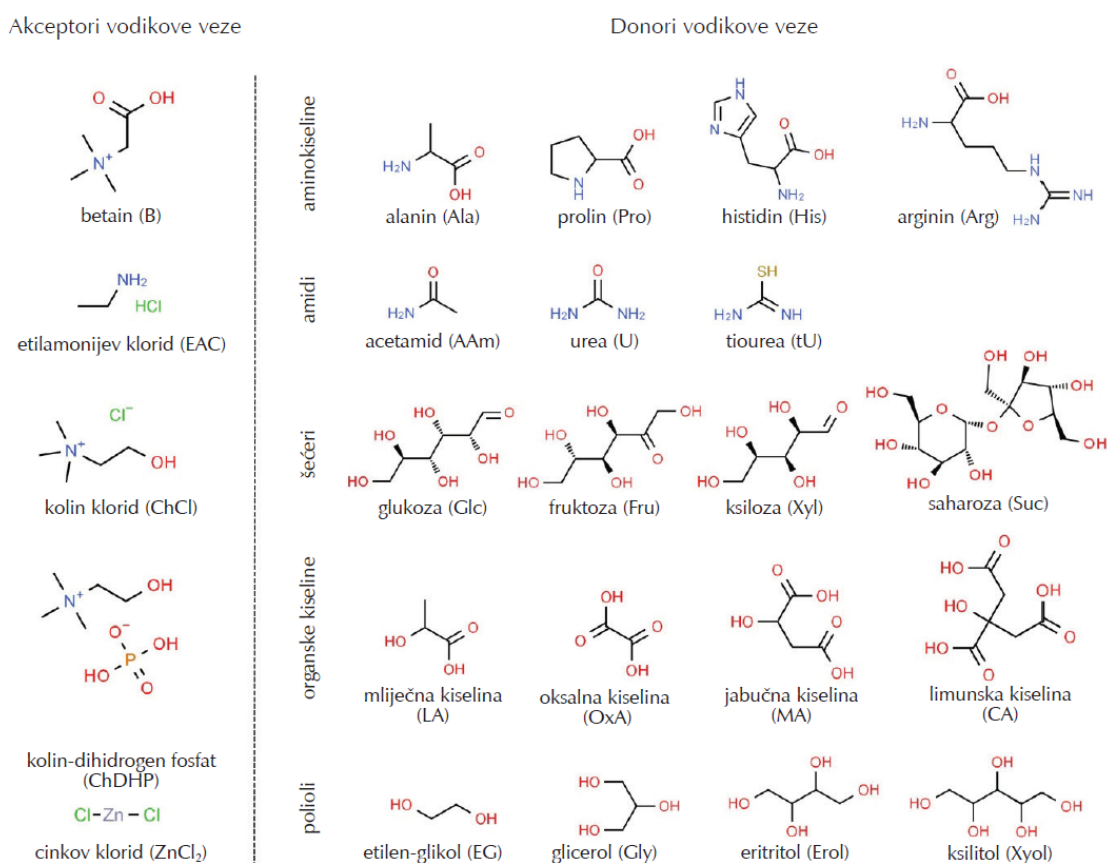
Priprava eutektičnih otapala je ekonomična i jednostavna, a smatra se održivim procesom koji se ostvaruje sa 100 %-tnom atomskom ekonomijom pri čemu se ne stvara otpad. U tom procesu ne dolazi do kemijske reakcije, nego se stvaraju vodikove veze. Postoji više različitih načina za pripravu DES, a najčešći je postupak u kojem se točno određena masa komponenti pomiješa uz ili bez dodatka vode te se smjesa zagrijava do 60 °C uz konstantno miješanje, tj. dok se ne dobije bistra kapljevina. Molarni omjer komponenti, temperatura i vrijeme priprave najviše ovise o kemijskoj prirodi početnih komponenti. Osim ovog načina, DES se još mogu pripremiti iz koncentrirane vodene otopine koja sadrži sve komponente ili iz otopine jedne komponente u kojoj je druga disocirana [8].

Kemijska struktura DES može se prikazati općom formulom Cat^+X^-zY pri čemu je Cat^+ predstavlja amonijev, sulfonijev ili fosfonijev kation, X^- Lewisovu bazu, najčešće halogenidni anion, Y Lewisovu ili Brønstedovu kiselinu, a z broj molekula Y. Cat^+X^- zajedno predstavljaju akceptor vodikove veze (engl. *hydrogen bond acceptor*, HBA), dok je Y donor vodikove veze (engl. *hydrogen bond donor*, HBD). Složene anionske vrste nastaju između Lewisove baze i Lewisove ili Brønstedove kiseline [3, 10]. DES se uglavnom klasificiraju prema prirodni upotrijebljenog sredstva za stvaranje kompleksa, a ta podjela je prikazana u Tablici 1.

Tablica 1. Podjela DES prema prirodni upotrijebljenog sredstva za stvaranje kompleksa [3, 10, 11]

Tip 1	Kvaterni sol i halogenid metala poput Zn, Sn, Fe, Al
Tip 2	Kvaterni sol i hidratiziran halogenid metala poput Cr, Co, Cu
Tip 3	Kvaterni sol i donor vodikove veze poput amida, karboksilnih kiselina, alkohola
Tip 4	Halogenid metala i donor vodikove veze poput amida i alkohola
Tip 5	Donori i akceptori vodikove veze su neionske molekule (engl. <i>non-ionic</i> DESs)

Najviše DES su tipa 3 jer su komponente za njihovu sintezu jeftine i lako dostupne. HBA su netoksični kvaterni amonijevi spojevi poput etilamonijevog klorida, kolin klorida i betaina, dok su HBD šećeri, polioli, amidi i organske kiseline. Kemijske strukture najčešće korištenih spojeva za sintezu niskotemperaturnih eutektičnih otapala su prikazane na Slici 2.



Slika 2. Primjeri spojeva pogodnih za pripremu niskotemperaturnih eutektičnih spojeva [3]

Osim navedene podjele postoje i razne podskupine DES poput prirodnih eutektičnih otapala (engl. *natural deep eutectic solvent*, NADES). NADES su otapala kod kojih su sve

sastavne komponente iz prirodnih izvora, najčešće primarni metaboliti. Ova vrsta otapala je, zbog svog sastava, niske toksičnosti [3], a igraju i ključnu ulogu u staničnom metabolizmu jer imaju utjecaj na mnoge biološke procese (klijavost, otpornost na sušu, dehidracija itd.) [11]. Osim NADES, postoje još i terapijska eutektička otapala (engl. *Therapeutic Deep Eutectic Solvents*, THEDES) koja imaju potencijalnu primjenu u farmaceutskoj industriji, kvazipolimerna eutektična otapala (engl. *Poly-Quasi Eutectic Solvents*, PQES) i polimerna eutektična otapala (engl. *Polymeric Deep Eutectic Solvents*, PODES) [11].

Najvažnije fizikalno-kemijske karakteristike DES su svakako nisko talište, viskoznost, gustoća, polarnost, pH-vrijednost, površinska napetost, toplinska stabilnost [11]. Talište DES je niže od 150 °C, dok je za najčešće korištena DES ispod 50 °C. Karakteristično za ova otapala je da su im viskoznost i gustoća veći od onih za vodu. Ove karakteristike najviše ovise o strukturi ishodnih komponenti pa su tako otapala na bazi šećera najgušća i najviskozija, dok su ona na bazi alkohola značajno manje viskozna i gusta. Valja napomenuti da se ove dvije karakteristike mogu modificirati dodatkom vode, međutim maseni udio vode mora biti manji od 40-50 % jer će previsok udio vode razbiti supramolekularni kompleks donor-akceptor vodikove veze te bi to na posljetku bila vodena otopina ishodnih komponenti, a ne DES [3]. Prema polarnosti ova otapala mogu se podijeliti u dvije skupine; hidrofilni i hidrofobni, s tim da je većina ovih otapala hidrofilna. Tek su u posljednje vrijeme počela istraživati eutektična otapala hidrofobnog karaktera zbog ograničenja u primjeni hidrofilnih otapala samo na polarne spojeve [11].

Zbog širokog raspona svih navedenih fizikalno-kemijskih karakteristika ova otapala se smatraju dizajniranim otapalima (engl. *designer solvents*) jer se odabirom početnih komponenti, njihovim omjerom i dodatkom vode mogu dobiti specifična svojstva za određene primjene. Neke od najvažnijih područja primjene su elektrokemija, sintetska kemija i (bio)kataliza, biotehnologija i prehrambena tehnologija, separacijski procesi, farmaceutsko inženjerstvo, biomedicina itd. [3]. U elektrokemiji su zbog svoje električne provodljivosti i sposobnosti otapanja različitih metalnih soli i oksida pronašli svoju primjenu u elektropoliranju nehrđajućih čelika, sintezi metalnih nanočestica te u elektrodepoziciji različitih metala (Cr, Al, Cu, Ni) [10]. DES su, zbog sposobnosti otapanja različitih spojeva, počevši od malih molekula poput CO₂ pa sve do makromolekula poput enzima, vrlo pogodni mediji za razne sinteze, ali i njihovi katalizatori. Također su zbog sposobnosti otapanja i stabilizacije različitih prirodnih spojeva vrlo važni u biotehnologiji i prehrambenoj tehnologiji. Danas se koriste za ekstrakciju različitih spojeva iz prirode, među kojima su najzastupljeniji polifenoli.

2.3 Ginko

Ginkgo biloba L. je jedini rod i vrsta ginka koja postoji. Naziva se živim fosilom jer je najstarija biljka golosjemenjača koja je preživjela kvartarnu glacijaciju što govori o njenoj iznimnoj otpornosti na biotičke i abiotičke stresove [12, 13]. Potječe iz Kine i od davnina se sadi u vrtovima kineskih i japanskih hramova jer se smatrao svetim zbog svojih terapijskih učinaka. Pripravci od ginka, najčešće lišća, su se koristili za liječenje kašlja, bronhijalne astme, iritabilnog mjehura, pa čak i zlouporabe alkohola. Danas se njegovi ekstrakti uvelike koriste za liječenje kognitivnih tegoba poput poremećaja pamćenja, Alzheimerove bolesti, poremećaja u koncentraciji, depresije, vrtoglavice, tinitusa itd. [12].

Zbog ljekovitih svojstava, koje ginko posjeduje, detaljno su istražene njegove sastavne komponente. To su ginkolidi, bilobalid, ginkolna kiselina, flavonoidi, triterpeni, karotenoidi, poliprenoli, eterična ulja, aromatske kiseline, askorbinska kiselina, D-glutarinska kiselina, kininska kiselina, šikiminska kiselina, alkil-kumarini, lipidi, dugolančani ugljikovodici, ugljikohidrati, derivati glicerola, 1-hidroksipireni, zeatin, 6-hidroksikinurna kiselina, pentadien-1,5-difenol, tanini i vrlo otrovni spoj ginkotoksin. Od navedenih sastavnica svojstva ljekovitosti ginko daju terpeni laktoni (ginkolidi i bilobalid) i flavonoidi [12].

Neiskorišteni industrijski otpad ginka predstavlja rasipanje vrijednih resursa, ali i ozbiljno onečišćenje okoliša zbog toksičnih komponenti, ginkotoksina i ginkolne kiseline, koje sadrži te jer na toj vrsti otpada mogu rasti štetni mikroorganizmi [14]. Budući da su neke od sastavnica tog otpada spojevi širokog spektra bioloških aktivnosti, poput biflavonoida, poželjno je pronaći način izolacije tih tvari iz otpada i posljedično smanjiti njegovu količinu u okolišu.

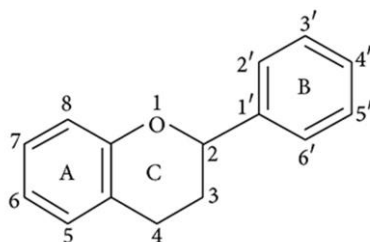
2.4 Flavonoidi

Flavonoidi su organski spojevi koji se široko rasprostranjeni u jestivim i nejestivim biljkama u različitim koncentracijama. Do danas je dokumentirano preko 8000 različitih flavonoida [15]. Flavonoidi spadaju u skupinu polifenola koji su općenito poznati kao spojevi s biološki aktivnim djelovanjem pa, samim tim, imaju određene pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. Pozitivan učinak polifenola osobito je prepoznat kod kardiovaskularnih, neurodegenerativnih i metaboličkih bolesti [16].

Flavonoidi pripadaju grupi sekundarnih metabolita u biljkama što znači da nisu direktno uključeni u normalan rast, razvoj, ili razmnožavanje organizma, te da njihovo odsustvo ne rezultira trenutnom smrću biljke, ali njihov nedostatak može uzrokovati dugoročna oštećenja te

negativno utjecati na plodnost i izgled biljke. Različiti napitci, voće i povrće poput kakaa, čaja, soje, vina, kupine, borovnice, luka, mrkve su samo neki od važnih izvora flavonoida [4]. Vrsta i količina flavonoidnih komponenti u biljkama ovisi o vrsti biljke, stupnju njezinog rasta i razvoja, sezoni, ali i dijelu biljke u kojem se nalazi; list, stabljika, cvijet, sjemenka [16]. Tako se, na primjer, u luku i čaju nalazi najviše flavona i flavonola, dviju podvrsta flavonoida. Flavonoidi imaju višestruku ulogu u biljkama. Prije svega, dugo je već poznato da biljkama daju boju i miris. Nakupljanje flavonoida u cvjetovima biljke od posebne je važnosti zbog privlačenja kukaca oprašivača [17]. Iz toga posljedično proizlazi njihova uloga u reprodukciji biljaka. Osim toga, štite biljke od različitih biotičkih i abiotičkih stresova; djeluju kao UV filtri te štite biljke od različitih mikroba i biljojeda. Imaju ulogu i kod otpornosti na mraz, otpornosti na sušu i mogu imati funkcionalnu ulogu u toplinskoj aklimatizaciji biljaka i otpornost na smrzavanje [4].

Osnovna kemijska struktura flavonoida sastoji se od 15 C-atoma raspoređenih u dva fenilna prstena A i B i jedan heterociklički piranski prsten C koji ih spaja, kao što je prikazano na Slici 3. Jedna ili više hidroksilnih skupina povezane su s aromatskim prstenovima u slobodnom obliku, esterificirane i/ili povezane sa šećerima [4]. Dakle, flavonoidi se u prirodi mogu javiti kao aglikoni, ali najčešće su u prirodi prisutni kao glikozidi koji su povezani sa šećerom u konjugiranom obliku kao monoglikozidni, diglikozidni i drugi derivati [17]. Njihova biološke karakteristike i uloga u biljkama uvelike ovise o tome u kojem se obliku nalaze.



Slika 3. Osnovna kemijska struktura flavonoida

Flavonoidi se dijele u različite podgrupe ovisno o tome s kojim je C-atomom prstena C povezan prsten B te o stupnju nezasićenosti i oksidacije prstena C. Flavonoidi u kojima je prsten B vezan na C-atom označen brojem 3 nazivaju se izoflavoni. Oni u kojima je prsten B vezan na C-atom označen brojem 4 nazivaju se neoflavonoidi, dok se oni u kojima je prsten B vezan na C-atom označen brojem 2 dalje dijele u nekoliko podskupina na temelju strukturnih značajki prstena C. Ove podskupine su: flavoni, flavonoli, flavanoni, katehini (flavanoli ili flavanonoli), antocijanini i kalkoni [4]. Navedena podjela flavonoida, najpoznatiji predstavnici i njihovi prirodni izvori prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Podjela flavonoida, najpoznatiji predstavnici i njihovi prirodni izvori [4]

Flavonoidi	Najpoznatiji predstavnici	Prirodni izvor
antocijanini	- cijanidin - delfinidin - malvidin - pelargonidin - peonidin	bobičasto voće, bazga...
flavanoni	- hesperitin - naringenin - eriodiktiol	citrusno voće i medicinske biljke
flavoni	- luteolin - apigenin - tangeritin	celer, peršin, ginko...
flavonoli	- kempferol - kvercetin - miricetin - fisetin	luk, bobičasto voće, medicinske biljke...
izoflavoni	- genistin - genistein - daidzein - glicitein	mahunarke, soja
kalkoni	- florizin - arbutin - floretin - kalkonaringenin	rajčica, kruška, pšenica...
katehini	- katehin - epikatehin - epikatehin galat - epigalokatehin	čaj, kakao, banana...
neoflavonoidi	- kalofilolid - dalbergin	tajlandsko ružino drvo, uljani orah...

Flavoni su, iako ne tako učestala podgrupa flavonoida, vrlo značajni. Najviše su prisutni u lišću, cvjetovima i plodovima kao glukozidi [4]. Prisutni su u nekim biljkama intenzivnog okusa i u bilju poput celera i peršina [16], ali se mogu u većim količinama pronaći i u ginku i u menti [4].

Flavonoli su flavonoidi s ketonskom skupinom te su vrlo rasprostranjena i velika podgrupa. Nalaze se u raznim vrstama voća i povrća poput luka, kelja, kupusa, rajčice, grejpa i bobičastog voća, a čaj i crno vino su također važni izvori flavonola. Već su odavno prepoznati njihovi pozitivni učinci na ljudsko zdravlje poput antioksidativnog djelovanja i smanjenja rizika od vaskularnih bolesti [4].

Flavanoni su većinom zastupljeni u citrusnom voću (limun, grejp i naranča), pri čemu različiti spojevi daju različiti karakteristični okus. Na primjer, naringin se nalazi u grejpfrotu,

dok je hesperetin prisutan u narančama [16], s tim da je za sve flavanone u citrusima karakterističan gorak okus. Povezuje ih se s brojnim pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje zbog njihove sposobnosti hvatanja slobodnih radikala [4].

Katehini su 3-hidroksi derivati flavanona, a radi se o visoko kompleksnim spojevima u rasponu od monomera, modificiranih monomera, dimera do polimera. Velike količine flavanola nalaze se u crnom i zelenom čaju, čokoladi, kakau, brusnicama, banani, acai bobicama, grašku, grahu i vinu [16, 18].

Antocijanini su najčešće prisutni kao pigmenti u biljkama, cvjetovima i plodovima, a voće i povrće bogato antocijaninima lako se prepoznaje zbog karakteristične boje od tamnoplave do tamnocrvene [16]. Boja antocijanina ovisi o pH-vrijednosti te metilaciji ili acilaciji na hidroksilnim skupinama A i B prstena. Antocijanini se uglavnom nalaze u vanjskim slojevima različitog voća kao što su brusnice, crni ribiz, crno grožđe, maline, jagode, borovnice, borovnice i kupine [4].

Kalkone karakterizira odsustvo prstena C, odnosno prsteni A i B su povezani nekom acikličkom strukturom. U značajnim se količinama nalaze u rajčicama, kruškama, jagodama i određenim proizvodima od pšenice. Veliku pozornost su privukli zbog svojih brojnih nutritivnih i bioloških dobrobiti [4].

Izoflavoni nisu rasprostranjeni u biljnom svijetu kao ostali flavonoidi te se pretežno mogu pronaći u mahunarkama i soji. Zbog sličnosti u građi s estrogenom, u tijelu se pretvaraju u biljne estrogene pri čemu imaju metaboličke učinke te zbog toga pokazuju ogroman potencijal u borbi protiv niza bolesti [4, 16].

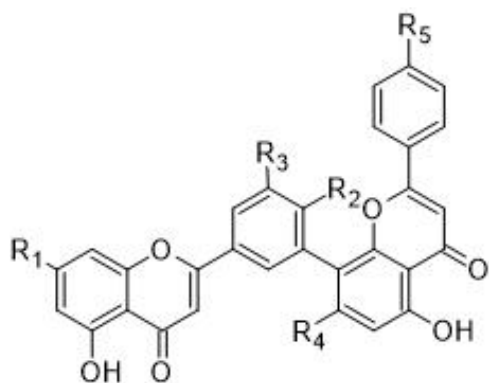
Neoflavonoidi su fenolni spojevi kojima je prsten B vezan na C-atom prstena C na poziciji 4. Vrlo su rijetki i neistraženi te se mogu pronaći u nekim posebnim biljnim vrstama poput šrilankanske endemske vrste *Mesua thwaitesii* ili drvetu naziva tamanu (lat. *Calophyllum inophyllum*) [4].

Opisivanjem različitih podgrupa flavonoida, već je nekoliko puta spomenuta njihov pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Upravo su iz tog razloga oni već dugi niz godina predmet velikih znanstvenih istraživanja. Njihova antioksidacijska, antikancerogena, antialergijska i protuupalna aktivnost potaknula je niz kliničkih, prekliničkih i epidemioloških istraživanja koja pretpostavljaju njihov veliki doprinos u prevenciji kroničnih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, dijabetes, karcinom, neurodegenerativne bolesti itd. [16].

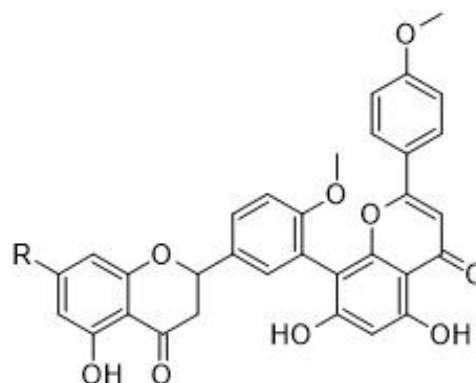
2.4.1 Biflavonoidi

Flavonoidni dimeri, poznatiji pod nazivom biflavonoidi, sačinjeni su od dva monomerna flavonoida koji su povezani direktno ili linearnom vezom. Linearna veza podrazumijeva alkilnu C-C vezu ili alkoksidnu C-O-C vezu koje mogu biti različitih duljina. Do danas je poznato oko 600 različitih biflavonoida, a većina njih je pronađena u medicinskim biljkama [19]. Dimerizacija flavonoida u prirodi se javlja samo u nekim biljkama, a njihova uloga još nije dovoljno istražena. Na osnovu njihove biološke aktivnosti i položaja u lišću biljke, pretpostavlja se da imaju ulogu u zaštiti biljke od štetnika i predatora, regulaciji rasta biljke i zaštiti od UV zračenja [5]. Ovi spojevi imaju veliki potencijal za biomedicinsku primjenu te je njihovo daljnje istraživanje od velike važnosti.

Strukturu biflavonoida čine dva ista ili različita flavonoida, a moguće su različite kombinacije; flavon-flavon, flavon-flavanon, flavon-flavonol itd. Osim različitih kombinacija, raznovrsnosti biflavonoida doprinose i vrsta i pozicija veze između dva monomera. Dakle, u teoriji je moguće da postoji iznimno velik broj flavonoidnih dimera što sugerira da opseg bioloških aktivnosti također može biti ogroman [20]. Unatoč tome, najčešće ih se može pronaći u nekoliko biljnih obitelji poput *Ginkgo biloba* L., *Selaginella* sp., *Garcinia* sp. iz kojih se danas najčešće ekstrahiraju [14]. Biflavonoidi su prisutni i u drugim biljnim vrstama ali u njima nisu dominantne komponente te se one ne koriste kao njihov izvor u procesima ekstrakcije. Kemijska struktura flavon-flavon biflavonoida iz ginka prikazana je na Slici 4., a flavon-flavanon na Slici 5.



Slika 4. Flavon-flavon [5]



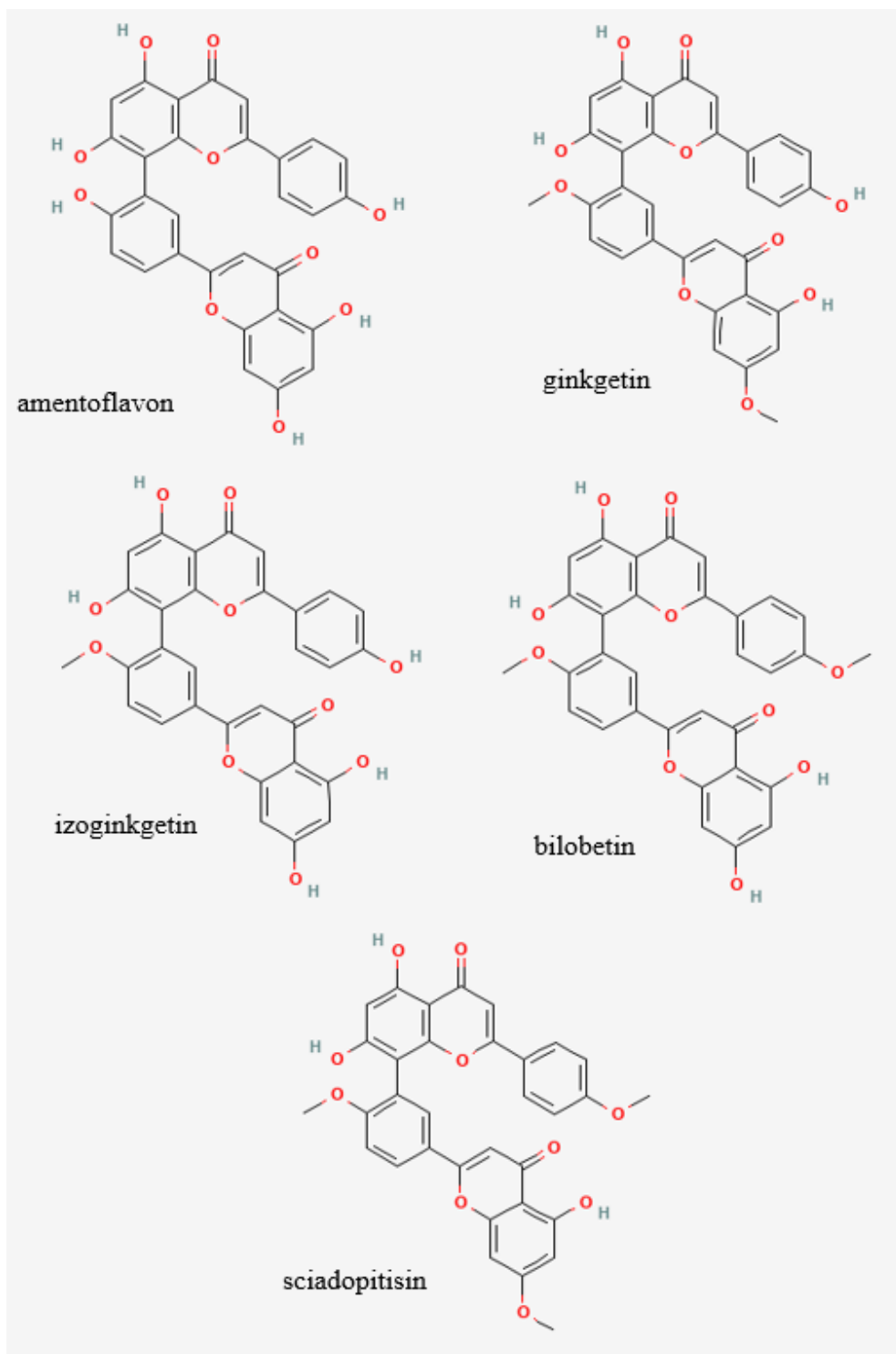
Slika 5. Flavon-flavanon [5]

U ginku (*Ginkgo biloba* L.) je dosad identificirano 110 različitih flavonoida, a od toga je 13 biflavonoida koji su prikazani u Tablici 3. Ukupno je 11 biflavonoida flavon-flavon i 2 flavon-flavanon [5].

Tablica 3. Biflavonoidi iz ginka, njihove kemijske formule i molarne mase [21]

Biflavonoidi iz <i>Ginkgo biloba</i> L.		Kemijska formula	Molarna masa, g/mol
flavon-flavon	amentoflavon	$C_{30}H_{18}O_{11}$	554,46
	seskvojaflavon	$C_{31}H_{20}O_{10}$	552,48
	bilobetin	$C_{31}H_{20}O_{10}$	552,48
	podokarpusflavon A	$C_{31}H_{20}O_{10}$	552,48
	ginkgetin	$C_{32}H_{22}O_{10}$	566,51
	izoginkgetin	$C_{32}H_{22}O_{10}$	566,51
	5'-metoksibilobetin	$C_{32}H_{22}O_{11}$	582,51
	sciadopitisin	$C_{33}H_{24}O_{10}$	580,54
	7''-O- β -D-glukozil-ginkgetin	$C_{38}H_{32}O_{15}$	728,65
	7''-O- β -D- glukozil-izoginkgetin	$C_{38}H_{32}O_{15}$	728,65
	7-metoksiamentoflavone	$C_{31}H_{20}O_{11}$	568,48
flavon-flavanon	2,3-dihidroizoginkgetin	$C_{32}H_{24}O_{10}$	568,53
	2,3-dihidrosciadopitisin	$C_{33}H_{26}O_{10}$	582,55

Najzastupljenijih pet biflavonoida u ginku su amentoflavon, ginkgetin, izoginkgetin, bilobetin i sciadopitisin [5]. Svi oni ulaze u flavon-flavon tip biflavonoida, a njihove strukturne formule prikazane su na Slici 6. Amentoflavon je dimer dvaju apigenina sa šest hidroksilnih skupina koje se lako mogu zamijeniti metoksilnom skupinom. Ostali biflavonoidi se mogu smatrati derivatima amentoflavona. Tako je bilobetin derivat amentoflavona s jednom metoksilnom skupinom, ginkgetin i izoginkgetin s dvije, a sciadopitisin s tri metoksilne skupine [5].



Slika 6. Strukturne formule najzastupljenijih biflavonoida u ginku [22]

Dosadašnja istraživanja pokazala su da biflavonoidi posjeduju značajne farmakološke aktivnosti - antibakterijsku, antioksidativnu, protuupalnu, antikancerogenu te sposobnosti zaustavljanja oslobađanja histamina (antialergijsku) [14]. Njihova biološka aktivnost te potencijalna farmakološka primjena ovise o samoj kemijskoj strukturi spojeva. Zbog svega

navedenog imaju potencijal u liječenju neurodegenerativnih, kardiovaskularnih i metaboličkih bolesti [5]. Najviše pažnje se danas pridaje njihovoj antikancerogenoj aktivnosti. Tako je na primjer dokazano da je ginkgetin citotoksičan za ljudski adenokarcinom jajnika. Također, ginkgetin, izoginkgetin i I-4'-ometilrobustaflavone, izolirani iz biljke *Selaginella*, su pokazali selektivnu citotoksičnost protiv tri testirane stanične linije ljudskog raka [17].

Zbog njihove slične kemijske strukture njihova izolacija iz prirodnih izvora, ali i identifikacija je vrlo zahtjevna. Međutim, zbog širokog spektra biomedicinske aktivnosti potrebno pronaći učinkovitu metodu za njihovu izolaciju iz prirodnih izvora kao što je *Ginkgo biloba* L. Njihov biomedicinski potencijal je vrijedan uloženi novaca, vremena i znanja koje je potrebno uložiti u daljnja istraživanja.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Materijali

Za razvoj i optimizaciju ekstrakcije specijaliziranih metabolita iz lišća *Ginkgo biloba* L. proveden je niz šaržnih ekstrakcija pomoću različitih NADES i 80 % metanola. Nakon odabira najboljeg otapala prema kriteriju najveće učinkovitosti ekstrakcije flavonoida provedena je optimizacija ekstrakcije pomoću eksperimentalnog Box-Behnken modela na tri razine i s tri faktora: vrijeme ekstrakcije, omjer mase usitnjenog lišća ginka i volumena otapala te temperatura. Korištenjem HPLC-DAD metode, u ekstraktima su određene i koncentracije 5 najzastupljenijih biflavonoida u lišću ginku (amentoflavon, ginkgetin, izoginkgetin, bilobetin i sciadopitisin). Naposljetku, razvijena metoda ispitana je na uzorcima lišća ginka koji su prikupljeni ručno na dvije lokacije u Zagrebu, u Dugom Selu te u Padovi.

3.1.1 Kemikalije

Za provedbu eksperimenata korištene su sljedeće kemikalije:

- Aluminijev klorid, Kemika, Hrvatska
- Acetonitril, VWR Chemicals BDH, Francuska
- Amentoflavon, Phytolab, Njemačka
- Betain, Alfa Aesar, SAD
- Bilobetin, Phytolab, Njemačka
- Dimetilsulfoksid (DMSO), Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
- Etilen-glikol, Kemika, Hrvatska
- Folin-Ciocalteuov reagens, Fluka, SAD
- Galna kiselina, Acros Organics, SAD
- Ginkgetin, Phytolab, Njemačka
- Glicerol, Lachner, Češka
- Glukoza, Sigma-Aldrich, SAD
- Izoginkgetin, Phytolab, Njemačka
- Jabučna kiselina, Acros Organics, SAD
- Katehin, Fluka, SAD
- Kava kiselina, Fluka, SAD
- Klorovodična kiselina, VWR-Chemicals, Njemačka
- Kolin klorid, Thermo Fisher Scientific, SAD

- Maltoza, Sigma-Aldrich, SAD
- Metanol, VWR-Chemicals, Njemačka
- Mravlja kiselina, Kemika, Hrvatska
- Natrijev hidroksid, Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
- Natrijev karbonat, Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
- Natrijev molibdat, CARLO ERBA Reagents, Njemačka
- Natrijev nitrit, Laphoma, Jugoslavija
- Prolin, Sigma-Aldrich, SAD
- Saharoza, Sigma-Aldrich, SAD
- Sciadopitisin, Phytolab, Njemačka
- Urea, Sigma-Aldrich, SAD

Uzorci ginka:

- Uzorak ginka iz ljekarne (NB Natural, Bjelovar)
- Uzorak Zagreb – Botanički vrt (Trg Marka Marulića 9A, Zagreb, Hrvatska)
- Uzorak Zagreb – Dom zdravlja (Runjaninova ulica 4, Zagreb, Hrvatska)
- Uzorak Dugo selo (Josipa Zorića 86, Dugo Selo, Hrvatska)
- Uzorak Padova – Botanički vrt (Via Orto Botanico 15, Padova, Italija)

Uzorci ginka su prikupljeni u studenom 2022. godine, sušeni 10 dana na sobnoj temperaturi (prosjeak 23°C) te usitnjeni prije daljnje upotrebe. Kemikalije korištene u ovom radu su analitičke čistoće te su primjerene za provođenje HPLC analiza. Voda korištena za pripremu DES i svih potrebnih otopina bila je ultračista.

3.1.2 Aparatura

U eksperimentima je korištena sljedeća oprema:

- Centrifuga, Universal 320 R, Hettich, SAD
- Digestor, Flores Valles 1200, Flores Valles, Španjolska
- Homogenizator, RS-VA10, Phoenix Instrument, SAD
- HPLC 1260 Infinity II, Agilent, SAD
- Inkubacijska tresilica, Innova 4330 Refrigerated Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, SAD
- Magnetska miješalica Rotamix S-10, Tehnica, Slovenija
- Mlinac za usitnjavanje, IKA-Werke M20, Njemačka

- pH-metar Lab 860, Schott Instruments, Njemačka
- Rotacijski viskozimetar, Anton Paar ViscoQC 300, SAD
- Spektrofotometar, Shimadzu, UV-1800, Japan
- UZV kupelj, Bandelin DT 103 H, Njemačka

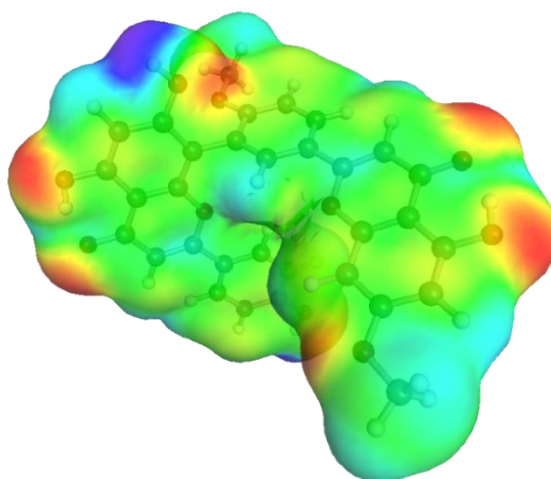
3.2 Metode

3.2.1 Odabir NADES

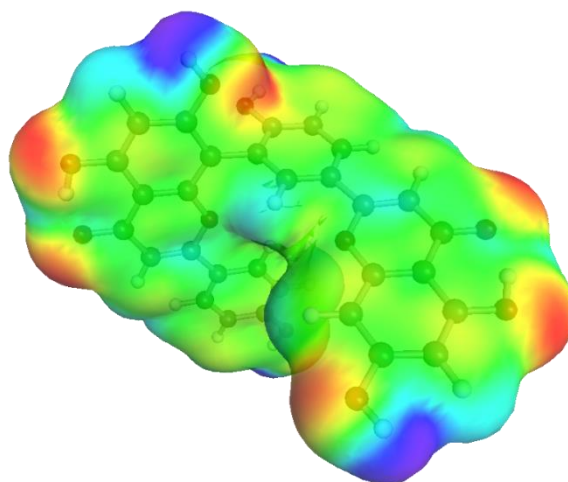
Odabir pogodnog NADES koje bi bilo dobra zamjena za organsko otapalo (80 % metanol) pri ekstrakciji specijaliziranih metabolita iz ginka bio je prvi korak u ovom istraživanju. Odabir pogodnog zamjenskog otapala najčešće se temelji na empirijskoj metodi pokušaja i pogreške, međutim takav pristup nije dobar jer zahtjeva vrijeme, novac te velike količine kemikalija, a takvim pristupom nastaju i veće količine otpada. Zbog toga je, ako je moguće, bolje koristiti matematičke modele koji skraćuju vrijeme analize, ne troše kemikalije te smanjuju ukupne troškove. Jedan od takvih modela je kontinuirani model solvatacije (engl. *Continuous solvation models*, CSMs) u koji pripadaju i model polarizirajućeg kontinuuma i COSMO-RS (engl. *Conductor-like Screening Model for Real Solvents*) model, a koji se mogu upotrebljavati za predviđanje kemijske ravnoteže. Pomoću spomenutih modela računaju se parametri poput energije otapanja na osnovu kojih se onda predviđa topljivost komponenti u NADES. Na taj način moguće je vrlo brzo pretražiti veliki broj otapala, a eksperimentalno ispitati samo nekoliko. U svrhu pronalaska pogodnog NADES za ekstrakciju aktivnih komponenti iz lišća *Ginkgo biloba* L. korišten je računalni softver COSMOtherm koji se temelji na COSMO-RS teoriji međudjelovanja površinskih naboja [23]. Model COSMO-RS razvio je 1995. godine njemački znanstvenik Andreas Klamt, a s vremenom se sve više razvijao te se danas smatra najboljom poveznicom između kemijske kvantne mehanike i inženjerske termodinamike [24].

Kako bi se pronašlo pogodno NADES za ekstrakciju aktivnih komponenti iz ginka, potrebno je poznavati kemijske strukture željenih spojeva. Kao što je ranije spomenuto cilj ovog istraživanja bio je izolirati biflavonoide iz ginka. U ginku je do sada identificirano 13 biflavonoida, a najzastupljeniji su: amentoflavon, ginkgetin, izoginkgetin, bilobetin i sciadopitisin. Prvi korak u primjeni modela je konstruiranje molekule za koju se provodi proračun na način da molekula bude optimalne geometrije, odnosno minimalne energije. Kako je navedeno, biflavonoidi iz ginka imaju sličnu strukturu, te se smatra da te male razlike u strukturi neće značajno utjecati na proračune. Stoga proračun nije proveden za svih pet biflavonoida nego samo za dva i to: ginkgetin kao najzastupljeniji i amentoflavon kao najpolarniji biflavonoid u ginku. Konstrukcija odabranih molekula u stanju minimalne energije

omogućena je korištenjem programskog softvera TMoleX. Konstruirane molekule učitane su u program COSMOtherm te su dobiveni σ -profili molekula. σ profil pokazuje vjerojatnost pronalaska površinskih segmenata sa σ polaritetom na površini molekule i sadrži najrelevantnije informacije potrebne za predviđanje elektrostatičkih, vodikovih veza i disperzijskih interakcija spoja [25]. Energetski i geometrijski optimirana molekule ginkgetina i amentoflavona prikazana je na Slici 7., odnosno na Slici 8. Krajnji rezultat ovih proračuna je prirodni logaritam koeficijenta aktivnosti, $\ln \gamma$, koji ukazuje na topljivosti ispitanih spojeva u pojedinom otapalu. Što je $\ln \gamma$ negativniji i veći za pojedini spoj, bolja je njegova topljivost u ispitanoj otapali. Za potrebe ovog istraživanja, ispitana je topljivost odabranih biflavonoida u ukupno 250 NADES.



Slika 7. Energetski i geometrijski optimirana molekula ginkgetina



Slika 8. Energetski i geometrijski optimirana molekula amentoflavona

3.2.2 Priprema i karakterizacija NADES

Pomoću programskog softvera COSMOtherm, tj. na temelju dobivenih vrijednosti koeficijenta aktivnosti, $\ln \gamma$, od 250 potencijalnih NADES (60 hidrofilnih NADES s 4 različita udjela vode (10, 20, 30 i 50 % w/w) i 10 hidrofobnih NADES) odabrano je 15 hidrofilnih NADES za nastavak istraživanja koji su prikazani u Tablici 4.

Tablica 4. Odabrana NADES

NADES	Kratica	Molarni omjer	Udio vode (w/w)
Betain:etilen-glikol	B:EG	1:2	10 %
Betain:etilen-glikol	B:EG	1:2	20 %
Betain:etilen-glikol	B:EG	1:2	30 %
Betain:saharoza	B:Suc	4:1	20 %
Betain:saharoza	B:Suc	4:1	30 %
Betain:jabučna kiselina	B:MA	1:1	10 %
Betain:jabučna kiselina	B:MA	1:1	20 %
Betain:jabučna kiselina:prolin	B:MA:Pro	1:1:1	10 %
Betain:glicerol	B:Gly	1:2	10 %
Kolin klorid:etilen-glikol	ChCl:EG	1:2	10 %
Kolin klorid:etilen-glikol	ChCl:EG	1:2	20 %
Kolin klorid:urea	ChCl:U	1:2	10 %
Kolin klorid:urea:etilen-glikol	ChCl:U:EG	1:2:2	10 %
Kolin klorid:maltoza	ChCl:Mal	4:1	10 %
Kolin klorid:glukoza	ChCl:Glc	2:1	10 %

Sinteza odabranih NADES provedena je na način da su u staklene bočice odvagane izračunate mase komponenti koje su prikazane u Tablici 5. s određenim udjelom vode. Staklene bočice su potom stavljene na magnetsku miješalicu uz zagrijavanje na temperaturi 55 °C tijekom 2 h, tj. dok nisu nastala bezbojna, homogena i prozirna otapala spremna za daljnju uporabu.

Tablica 5. Sastavne komponente odabranih NADES

NADES	Komponenta 1,	Komponenta 2,	Komponenta 3,	Voda,
	g	g	g	g
B:EG 1:2 s 10 % H ₂ O (w/w)	9,26	8,74	/	2,00
B:EG 1:2 s 20 % H ₂ O (w/w)	8,23	7,77	/	4,00
B:EG 1:2 s 30 % H ₂ O (w/w)	6,80	7,20	/	6,00
B:Suc 4:1 s 20 % H ₂ O (w/w)	9,25	6,75	/	4,00
B:Suc 4:1 s 30 % H ₂ O (w/w)	8,09	5,91	/	6,00
B:MA 1:1 s 10 % H ₂ O (w/w)	8,39	9,61	/	2,00
B:MA 1:1 s 20 % H ₂ O (w/w)	7,46	8,54	/	4,00
B:MA:Pro 1:1:1 s 10 % H ₂ O (w/w)	5,76	6,58	5,66	2,00
B:Gly 1:2 s 10 % H ₂ O (w/w)	7,00	11,00	/	2,00
ChCl:EG 1:2 s 10 % H ₂ O (w/w)	9,53	8,47	/	2,00
ChCl:EG 1:2 s 20 % H ₂ O (w/w)	8,47	7,53	/	4,00
ChCl:U 1:2 s 10 % H ₂ O (w/w)	9,68	8,32	/	2,00
ChCl:U:EG 1:2:2 s 10 % H ₂ O (w/w)	6,55	5,63	5,82	2,00
ChCl:Mal 4:1 s 10 % H ₂ O (w/w)	11,16	6,84	/	2,00
ChCl:Glc 2:1 s 10 % H ₂ O (w/w)	10,94	7,06	/	2,00

Tako pripravljenim eutekničnim otapalima određena je pH-vrijednost, gustoća i viskoznost. Gustoća je određena piknometrijskom metodom, a viskoznost pomoću rotacijskog viskozimetra.

3.2.3 Mehanička obrada lišća ginka

Prije provedbe ekstrakcije specijaliziranih metabolita, uzorke ginka bilo je potrebno osušiti te usitniti kako bi se dobila što veća specifična površina uzorka te posljedično povećala i učinkovitost ekstrakcije. Listovi ginka prikupljeni ručno s različitih lokacija, sušeni su na zraku 10 dana. Uzorak ginka iz ljekarne nije bilo potrebno sušiti. Nakon sušenja uslijedilo je mljevenje suhog lišća u mlincu za usitnjavanje nakon čega je dobiven usitnjen uzorak kao što je prikazano na Slici 9.



Slika 9. Usitnjen uzorak ginka

3.2.4 Ekstrakcija kruto-kapljevito

Ekstrakcija specijaliziranih metabolita iz lišća ginka provedena je tako da se u *Eppendorf* tubice odvaže 30 mg uzorka (usitnjeno lišće *Ginkgo biloba* L.) i otpipetira 1 mL određenog otapala, NADES ili 80 % metanola. Kako bi se smanjio utjecaj heterogenosti uzorka, ekstrakcija sa svakim pojedinim otapalom provedena je 3 puta. Nakon toga se sadržaj u tubici kratko homogenizira pomoću homogenizatora nakon čega se provodi ekstrakcija 8 min u ultrazvučnoj kupelji na 20 °C pri frekvenciji 35 kHz te 45 min na inkubacijskoj tresilici pri 450 rpm i 20 °C. Nakon provedene ekstrakcije, sadržaj se centrifugira 5 min na 13000 rpm/min. Dobiveni talog se baca, a ekstrakt se odvađa, filtrira (nesterilni hidrofobni PTFE filter za šprice, Chromafil Xtra RC-20/25 0,45 µm, Macherey-Nagel, Njemačka) i čuva u hladnjaku na 4 °C do daljnje analize. Ovako pripremljeni ekstrakti koriste se za određivanje koncentracije specijaliziranih metabolita: ukupnih polifenola, flavonoida, fenolnih kiselina i pojedinačnih biflavonoida.

3.2.5 Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije polifenola

Za određivanje koncentracije ukupnih polifenola korišten je protokol prema Slinkardu i Singletonu iz 1977. godine za koji je potreban Folin- Ciocalteuov reagens. On je većinski smjesa heteropolifosfovolframovih molibdata i drugih reagensa, a sama metoda se temelji na redukciji fosfomolibdatnog-fosfovolframatnog kompleksa pomoću fenola u plave reakcijske produkte koji imaju maksimum apsorbancije pri $\lambda = 765$ nm [26].

Za provedbu eksperimenta, osim Folin- Ciocalteuov reagensa potrebna je i zasićena otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3) koja je pripravljena otapanjem 50 g Na_2CO_3 u 200 mL ultračiste vode. Otopina je potom zagrijana do vrenja ($T = 100$ °C) nakon čega je u nju dodano nekoliko kristalića Na_2CO_3 te je ohlađena tijekom sljedeća 24 h, profiltrirana i nadopunjena ultračistom vodom do 250 mL.

Spektrofotometrijska metoda provedena je u plastičnim kivetama od 2 mL. U kivetu je potrebno dodati 790 μL ultračiste vode, 10 μL ekstrakta ili standarda (razrjeđenje temeljne otopine galne kiseline za baždarni pravac) ili otapala (NADES ili 80 % metanol za slijepu probu) i 50 μL Folin-Ciocalteuov reagensa. Kivete je potrebno dobro promiješati pomoću homogenizatora te nakon 8 min dodati 150 μL zasićene otopine Na_2CO_3 koja povisuje pH-vrijednost medija što ubrzava razvoj boje. Kivete je potrebno ponovno dobro promiješati te ostaviti na 20 °C tijekom 2 h. Tijekom provedbe ovog eksperimenta poželjno je održavati izotermne uvjete jer temperatura ima utjecaj na razvoj boje, odnosno više temperature ubrzavaju razvoj boje [26]. Nakon 2 h određena je apsorbancija uzoraka pri $\lambda = 765$ nm. Za izradu baždarnog pravca, pripravljena je otopina galne kiseline koncentracije 2 mg/mL u 80 % metanolu. Tako dobivena otopina razrjeđivana je na potrebne koncentracije u rasponu koncentracija 100 – 1500 $\mu\text{g/mL}$. Nakon mjerenja apsorbancije pripremljenih razrjeđenja, izrađen je baždarni dijagram (Prilog 1) za linearno područje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline. Sadržaj ukupnih polifenola izračunat na temelju baždarnog pravca izražen je kao mikrogram ekvivalenta galne kiseline (engl. *gallic acid equivalent*, GAE) po miligramu suhe tvari ($\mu\text{g GAE/mg ST}$).

3.2.6 Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije flavonoida

Za određivanje koncentracije ukupnih flavonoida korišten je protokol po Zhishenu i suradnicima iz 1999. godine. Metoda se temelji na stvaranju flavonoid-aluminij kompleksa koji su crvene boje i imaju maksimum apsorbancije pri $\lambda = 510$ nm [27].

Za provedbu eksperimenta potrebna je otopina natrijevog nitrita (NaNO_2) masene koncentracije 0,05 g/mL, otopina aluminijevog klorida (AlCl_3) masene koncentracije 0,18 g/mL te otopina natrijeve lužine (NaOH) koncentracije 1 mol/L. Otopina NaNO_2 dobivena je otapanjem 1,25 g NaNO_2 u 25 mL ultračiste vode. Otopina AlCl_3 dobivena je otapanjem 4,48 g NaNO_2 polaganim dodavanjem 25 mL ultračiste vode. Otopinu je potrebno pripremati u digestoru jer je otapanje AlCl_3 vrlo egzotermna reakcija. Otopina NaOH pripremljena je otapanjem 2 g granula NaOH u 50 mL ultračiste vode.

U plastične kivete od 2 mL otpipetirano je 800 μL ultračiste vode, 200 μL ekstrakta ili standarda (razrjeđenje temeljne otopine katehina za baždarni pravac) ili otapala (NADES ili 80 % metanol za slijepu probu) te 60 μL otopine NaNO_2 . Sadržaj u kivetama se homogenizira pomoću homogenizira te se 5 min nakon toga u smjesu doda 60 μL otopine AlCl_3 . Nakon 6 min u smjesu se doda 400 μL otopine NaOH za zaustavljanje reakcije i 480 μL ultračiste vode. Kivete se dobro promiješaju te se mjeri apsorbanacija uzoraka na $\lambda = 510 \text{ nm}$. Za izradu baždarnog pravca, pripremljena je otopina katehina koncentracije 1 mg/mL u 80 % metanolu. Budući da se katehin sporo otapa, odmijerna tikvica je stavljena na magnetnu miješalicu 30 min. Tako dobivena temeljna otopina razrjeđivana je na potrebne koncentracije u rasponu koncentracija 50-250 $\mu\text{g/mL}$. Nakon mjerenja apsorbanacije pripremljenih razrjeđenja, izrađen je baždarni dijagram (Prilog 2) za linearno područje ovisnosti apsorbanacije o koncentraciji katehina. Sadržaj ukupnih flavonoida izračunat je na temelju baždarnog pravca te izražen u mikrogramima katehin ekvivalenta (engl. *catechin equivalents*, CE) po miligramu suhe tvari uzorka ($\mu\text{g CE/mg ST}$).

3.2.7 Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije fenolnih kiselina

Koncentracija ukupnih fenolnih kiselina određena je spektrofotometrijskom metodom razvijenom i opisanom u European Pharmacopoeia iz 2004. godine [28].

Za provedbu eksperimenta potrebno je pripremiti Arnowljev reagens otapanjem 1 g natrijeva nitrita (NaNO_2) i 1,17 g natrijeva molibdata dihidrata ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) u 10 mL ultračiste vode. Osim Arnowljevog reagensa, potrebno je pripremiti otopinu klorovodične kiseline (HCl) koncentracije 0,5 mol/L i otopinu natrijeve lužine (NaOH) koncentracije 1 mol/L. Otopina HCl pripremljena je razrjeđenjem 37 %-tne HCl , a otopina NaOH pripremljena je otapanjem 2 g granula NaOH u 50 mL ultračiste vode.

U plastičnu kivetu od 2 mL otpipetirano je 300 μL ultračiste vode, 300 μL ekstrakta ili standarda (razrjeđenje temeljne otopine kava kiseline za baždarni pravac) ili otapala (NADES

ili 80 % metanola za slijepu probu), 100 μ L otopine HCl i 100 μ L Arnowljevog reagensa. Kivete je potrebno dobro promiješati pomoću vorteksa te dodati 100 μ L otopine NaOH i 100 μ L ultračiste vode. Apsorbancija uzoraka mjerena je na $\lambda = 490$ nm. Za određivanje baždarnog pravca, pripremljena je otopina kava kiseline koncentracije 0,5 mg/mL u 80 % metanolu. Tako dobivena temeljna otopina razrjeđivana je na potrebne koncentracije u rasponu koncentracija 510-250 μ g/mL. Nakon mjerenja apsorbancije pripremljenih razrjeđenja, izrađen je baždarni dijagram (Prilog 3) za linearno područje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji katehina. Sadržaj fenolnih kiselina izračunat je na temelju jednadžbe baždarnog pravca te izražen kao mikrogram ekvivalenta kava kiseline (engl. *caffeic acid equivalent*, CAE) po miligramu suhe tvari uzorka (μ g CAE/mg ST).

3.2.8 HPLC-DAD analiza za određivanje koncentracije biflavonoida

Kako bi se odredile koncentracije pet najzastupljenijih biflavonoida (amentoflavon, ginkgetin, izoginkgetin, bilobetin i sciadopitisin) korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) s DAD detektorom (engl. *diode array detector*). Korišteni uređaj je Agilent 1260 Infinity II HPLC koji je opremljen sa sustavom kvaterne pumpe, automatskim uzorkovanjem, dijelom za kolonu i navedenim DAD detektorom. Prikupljanje i obrada podataka provedena je korištenjem softvera Agilent OpenLAB CDS. Kromatografsko odvajanje provedeno je pomoću Zorbax 300Extend-C18 kolone, dimenzija 150 \times 4,6, 3,5 μ m na 30 °C. Mobilna faza A je 0,1 % mravlja kiselina, a mobilna faza B je acetonitril. Tijekom 42 min trajanja analize njihov protok je konstantan i iznosi 1,0 mL/min. Višestupanjski linearni gradijent otapala je bio: 0 min 98 % A, 5 min 90 % A, 15 min 70 % A, 20 min 50 % A, 25 min 50 % A, 30 min 20 % A, 32 min 2 % A, 40 min 98 % A. Za analizu je uzorkovano 10 μ L svakog standarda i uzorka. UV/Vis spektri su snimljeni u rasponu od 190 - 400 nm, a kromatogrami su snimljeni na 330 nm [19].

Prije analiza bilo je potrebno izraditi standardne otopine biflavonoida čije je koncentracije potrebno odrediti. Standardne otopine pet biflavonoida koncentracije 1000 μ g/mL pripremljene su pojedinačno u DMSO. Odgovarajuća količina svake standardne osnovne otopine razrijeđena je s 80 % metanola da se dobije sedam radnih standardnih otopina (koncentracije 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20, 50 i 100 g/mL) za izradu relevantnih kalibracijskih krivulja. Standardne otopine, zajedno s radnim otopinama, skladištene su u mraku na -20 °C do upotrebe. Kromatogram dobiven pomoću standardnih otopina nalazi se u Prilogu 4.

3.2.9 Optimizacija ekstrakcije flavonoida

Parametri koji značajno utječu na učinkovitost ekstrakcije flavonoida su temperatura, omjer mase usitnjenog lišća ginka i volumena otapala te vrijeme ekstrakcije. Kako bi se odredili optimalni uvjeti, odnosno uvjeti pri kojima će učinkovitost ekstrakcije biti najveća, korišten je Box-Behnken eksperimentalni dizajn na tri razine s tri faktora korištenjem programskog paketa Design-Expert (Stat-Ease Inc., Minneapolis, SAD). Box i Behnken su predložili kako odabrati točke za eksperiment na tri razine koji omogućuju učinkovitu procjenu koeficijenata prvog i drugog reda matematičkih modela [28]. Glavne karakteristike ovog dizajna su:

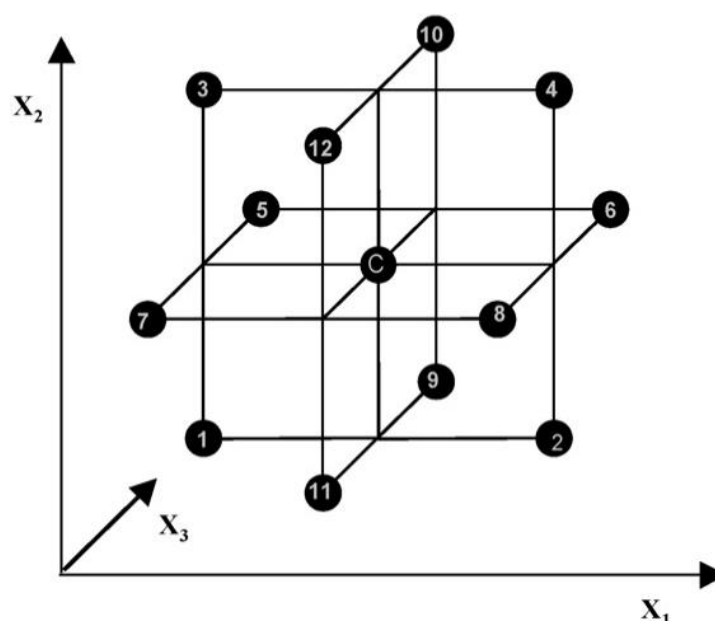
1. Jednadžba za određivanje broja eksperimenta koja je prikazana Jednadžbom 1:

$$N = 2k(k-1) + C_p \quad (1)$$

gdje su k broj nezavisnih varijabli, a C_p broj centralnih točaka

2. Svi faktori moraju biti na tri ekvidistantne razine (-1, 0, +1)

Na Slici 10. prikazan je grafički prikaz Box-Behnken dizajna za tri parametra kojeg čine tri međusobno povezane 2^2 varijable i centralna točka.



Slika 10. Box-Behnken dizajn za optimizaciju tri varijable [28]

U Tablici 6. prikazane su unesene razine uvjeta ekstrakcije koje moraju biti ekvidistantne.

Tablica 6. Prikaz razina na kojima se provodi ekstrakcija

Procesna veličina	-1	0	1
Temperatura, T , °C	20	30	40
Omjer mase suhe tvari i volumena otapala, $m_{\text{suhe tvari}}/V_{\text{otapala}}$, mg/mL	10	20	30
Vrijeme ekstrakcije, t , min	15	30	45

Na ovaj način dobiven je eksperimentalni plan s ukupno 17 eksperimenata koji su prikazani u Tablici 7.

Tablica 7. Plan eksperimenta prema Box-Behnken dizajnu

Broj eksperimenta	T , °C	$m_{\text{suhe tvari}}/V_{\text{otapala}}$, mg/mL	t , min
1	20,0	20,0	15,0
2	40,0	20,0	15,0
3	20,0	20,0	45,0
4	40,0	20,0	45,0
5	20,0	10,0	30,0
6	40,0	10,0	30,0
7	20,0	30,0	30,0
8	40,0	30,0	30,0
9	30,0	10,0	15,0
10	30,0	10,0	45,0
11	30,0	30,0	15,0
12	30,0	30,0	45,0
13	30,0	20,0	30,0
14	30,0	20,0	30,0
15	30,0	20,0	30,0
16	30,0	20,0	30,0
17	30,0	20,0	30,0

Nakon provedenih svih 17 eksperimenata analiziran je utjecaj odabranih veličina na učinkovitost ekstrakcije. Kako bi se izračunale vrijednosti koeficijenata polinoma drugog reda koji je korišten u modelu, sustav dobivenih jednadžbi rješava se višestrukom regresijskom tehnikom, odnosno metodom najmanjih kvadrata (engl. *Method of Least Squares*, MLS).

Osnovna statistička analiza dobivenih rezultata provedena je LevenbergMarquardtovim algoritmom implementiranom u programskom paketu Statistica 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, SAD). Promatrani su parametri modela višestruke linearne regresije, djelomične linearne regresije i nelinearne regresije kako bi se odredili njihovi međusobni odnosi i povezanost.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je ekstrahirati specijalizirane metabolite iz lišća *Ginkgo biloba* L. s posebnim naglaskom na biflavonoide koristeći NADES. Kako bi se proces odabira najboljeg otapala ubrzao, a sam proces minimizirao troškove istraživanja i uštedio vrijeme, korišten je računalni program COSMOtherm na temelju kojeg je od ukupno 250 ispitanih NADES odabrano njih 15 koja su u daljnjem koraku ispitana kao nova zelena otapala za učinkovitu ekstrakciju specijaliziranih metabolita kao što su polifenoli, flavonoidi, biflavonoidi itd. U seriji šaržnih ekstrakcija spektrofotometrijskim metodama određena je koncentracija ekstrahiranih polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina, a kao kriterij za odabir najboljeg NADES odabrana je učinkovitost ekstrakcije ukupnih flavonoida. Nakon odabranog najboljeg NADES, provedena je optimizacija procesnih uvjeta ekstrakcije flavonoida; temperatura i vrijeme ekstrakcije te omjer početne mase usitnjenog lišća i volumena NADES. Pri dobivenim optimalnim procesnim uvjetima provedena je ekstrakcija flavonoida, polifenola i fenolnih kiselina pomoću odabranog NADES iz lišća ginka s 4 različite lokacije; Botanički vrt u Zagrebu, Doma zdravlja u Zagrebu, Dugo Selo te Botanički vrt u Padovi. Naposljetku, pomoću HPLC-DAD metode određena je koncentracija najzastupljenijih biflavonoida (amentoflavon, ginkgetin, izoginkgetin, bilobetin i sciadopitisin) u lišću ginka..

4.1 Procjena topljivosti biflavonoida amentoflavona i ginkgetina u NADES primjenom programa COSMOtherm

Kako bi se smanjila potreba za eksperimentalnim radom, odnosno ispitivanjem topljivosti biflavonoida u svakom pojedinačnom NADES, korišten je računalni program COSMOtherm. COSMOtherm uzima u obzir interakcije vodikovih veza između molekula otopljene tvari (amentoflavona i ginkgetina) i otapala (NADES) na temelju kojih može izračunati kemijski potencijal, ali i procijeniti topljivosti otopljene tvari u otapalu. Pomoću njega je ispitano ukupno 250 NADES, a kao krajnji rezultat za svaki od njih dobiven je prirodni logaritam koeficijenta aktivnosti, $\ln \gamma$, koji je indikator topljivosti ginkgetina i amentoflavona u pojedinom ispitanom NADES. Što je vrijednost $\ln \gamma$ negativnija i veća, očekivana je bolja topljivost. U Tablici 8. prikazana je predviđena topljivost amentoflavona i ginkgetina u ispitanim NADES, a oznakom x označeni su NADES odabrani za daljnje istraživanje jer su u njima topljiva oba biflavonoida. Dobivene vrijednosti $\ln \gamma$ za sve ispitane NADES prikazane su u Prilogu 5. $\ln \gamma$ vrijednosti također su predviđene i za najčešća otapala koja se koriste za ekstrakciju te je tako predviđeno da su amentoflavon i ginkgetin vrlo slabo topljivi u vodi

($\ln\gamma_{\text{amentoflavon}} = 5,889$ i $\ln\gamma_{\text{ginkgetin}} = 13,631$). Od organskih otapala najbolja topljivost je predviđena za dimetil sulfoksid (DMSO) ($\ln\gamma_{\text{amentoflavon}} = -29,915$ i $\ln\gamma_{\text{ginkgetin}} = -16,024$) nakon čega slijede metanol ($\ln\gamma_{\text{amentoflavon}} = -11,286$ i $\ln\gamma_{\text{ginkgetin}} = -1,169$), etanol ($\ln\gamma_{\text{amentoflavon}} = -10,149$ i $\ln\gamma_{\text{ginkgetin}} = -3,133$) i acetonitril ($\ln\gamma_{\text{amentoflavon}} = -8,444$ i $\ln\gamma_{\text{ginkgetin}} = -3,929$). Topljivost biflavonoida ovisi o njegovoj strukturi, ponajviše stupnju metilacije s čijim se povećavanjem poveća i hidrofobnost spoja, te o prirodi biljnog materijala iz kojeg se ekstrahira. Općenito su biflavonoidi topljivi u svim otapalima izuzev manje polarnih alifatskih ugljikovodika poput heksana. Biflavonoide na koje je vezano više hidroksilnih skupina, kao što su amentoflavon i ginkgetin, najbolje je ekstrahirati pomoću polarnih otapala poput metanola i etanola [30]. Budući da su kod ginkgetina dvije hidroksilne skupine zamijenjene metilnim skupinama, on je manje polaran pa su navedena otapala pokazala manje negativnu vrijednost $\ln\gamma$ u odnosu na onu za amentoflavon. Polarno aprotično otapalo DMSO prema proračunima je najbolje otapalo za amentoflavon i ginkgetin zbog svoje visoke polarosti. Međutim, iako bi sva navedena organska otapala bila učinkovita za ekstrakciju biflavonoida, zbog njihove toksičnosti, zapaljivosti, hlapivosti i štetnog utjecaja na okoliš u ovom radu su istražene zelene alternative [31].

Tablica 8. Topljivost amentoflavona i ginkgetina u NADES

Popis NADES sustava		Kratice	% H ₂ O (w/w)	10	20	30	50	10	20	30	50	Popis DES sustava		Kratice	% H ₂ O (w/w)	10	20	30	50	10	20	30	50
HIDROFILNI DES												HIDROFILNI DES											
				amentoflavon				ginkgetin								amentoflavon				ginkgetin			
				A				B								A				B			
1	Betain:limunska kiselina	B:CA	1:1									31	Kolin-klorid:urea:glicerol	ChCl:U:Gly	1:2:2								
2	Betain:glukoza	B:Glc	1:1									32	Kolin-klorid:ksilozna	ChCl:Xyl	2:1								
3	Betain:glicerol	B:Gly	1:2					x				33	Kolin-klorid:ksilitol	ChCl:Xylol	5:2								
4	Betain:oksalna kiselina:glicerol	B:Ox:A:Gly	1:2:1									34	Limunska kiselina:fruktoza	CA:Fru	1:1								
5	Betain:jabučna kiselina	B:MA	1:1							x		35	Limunska kiselina:fruktoza:glicerol	CA:Fru:Gly	1:1:1								
6	Betain:jabučna kiselina:glukoza	B:MA:Glc	1:1:1									36	Limunska kiselina:glukoza	CA:Glc	1:1								
7	Betain:jabučna kiselina:prolin	B:MA:Pro	1:1:1							x		37	Limunska kiselina:glukoza:glicerol	CA:Glc:Gly	1:1:1								
8	Betain:etilen-glycol	B:EG	1:2					x	x	x		38	Limunska kiselina:sorboza	CA:Sor	2:3								
9	Betain:arginine	B:Arg	1:1									39	Limunska kiselina:saharozna	CA:Suc	1:1								
10	Betain:histidine	B:His	1:1									40	Fruktoza:etilen-glikol	Fru:EG	1:2								
11	Betain:Lysine	B:Lys	1:1								x	41	Glukoza:etilen-glikol	Glc:EG	1:2								
12	Betain:Dksilozna	B:Xyl	1:1									42	Glukoza:fruktoza	Glc:Fru	1:1								
13	Betain:saharozna	B:Suc	4:1							x	x	43	Glukoza:fruktoza:etilen-glikol	Glc:Fru:EG	1:1:2								
14	Kolin-klorid:limunska kiselina	ChCl:CA	2:1									44	Fruktoza:glukoza:urea	Glc:Fru:U	1:1:2								
15	Kolin-klorid:limunska kiselina	ChCl:CA	1:1									45	Glicerol:glukoza	Glc:Gly	1:2								
16	Kolin-klorid:etilen-glikol	ChCl:EG	1:2					x	x			46	Glicerol:sorbitol	Gly:Sol	2:1								
17	Kolin-klorid:fruktoza	ChCl:Fru	1:1									47	Jabučna kiselina:fruktoza	MA:Fru	1:1								
18	Kolin-klorid:glukoza	ChCl:Glc	2:1							x		48	Jabučna kiselina:fruktoza:glicerol	MA:Fru:Gly	1:1:1								
19	Kolin-klorid:glukoza	ChCl:Glc	1:1									49	Jabučna kiselina:glukoza	MA:Glc	1:1								
20	Kolin-klorid:glicerol	ChCl:Gly	1:2									50	Jabučna kiselina:glukoza:glicerol	MA:Glc:Gly	1:1:1								
21	Kolin-klorid:jabučna kiselina	ChCl:MA	1:1									51	Jabučna kiselina:sorboza:glicerol	MA:Sor:Gly	1:1:2								
22	Kolin-klorid:maltoza	ChCl:Mal	4:1							x		52	Jabučna kiselina:saharozna	MA:Suc	2:1								
23	Kolin-klorid:oksalna kiselina	ChCl:Ox	1:1									53	Prolin:glukoza:glicerol	Pro:Glc:Gly	1:1:1								
24	Kolin-klorid:prolin:jabučna kiselina	ChCl:Pro:MA	1:1:1									54	Prolin:jabučna kiselina	Pro:MA	1:1								
25	Kolin-klorid:sorbitol	ChCl:Sol	1:1									55	Saharozna:etilen-glikol	Suc:EG	1:2								
26	Kolin-klorid:sorbitol	ChCl:Sol	2:3									56	Saharozna:glukoza:fruktoza	Suc:Glc:Fru	1:1:1								
27	Kolin-klorid:sorboza	ChCl:Sor	1:1									57	Saharozna:glukoza:urea	Suc:Glc:U	1:1:2								
28	Kolin-klorid:saharozna	ChCl:Suc	2:1									58	Sorboza:etilen-glikol	Sor:EG	1:2								
29	Kolin-klorid:urea	ChCl:U	1:2							x		59	Sorbitol:etilen-glikol	Sol:EG	1:2								
30	Kolin-klorid:urea:etilen-glikol	ChCl:U:EG	1:2:2							x		60	Ksilozna:etilen-glikol	Xyl:EG	1:2								

HIDROFOBNI NADES							
61	L menthol:D,L camphor	Me:Cam	1:1				
62	L menthol:D,L camphor	Me:Cam	4:01				
63	L menthol:eucalyptol	Me:EU	1:01				
64	L menthol:salicilic acid	Me:SA	4:01				
65	L menthol:octanoic acid	Me:C8	1:1				
66	L menthol:decanoic acid	Me:C10	1:1				
67	L menthol:linoleic acid	Me:C18:2	1:1				
68	L menthol:thymol	Me:Ty	3:2 (3C)				
69	Thymol:octanoic acid	Ty:C8	1:03				
70	Thymol:decanoic acid	Ty:C10	1:01				
71	Thymol:Coumarin	Ty:Cou	3:2 (23.6C)				

LEGENDA	
	ln γ
	> 3
	2
	1
	0
	-1
	-2
	< -3

Rezultati analize topljivosti amentoflavona i ginkgetina predviđjeli su da je amentoflavon topljiviji od ginkgetina te da je topljiv u većini ispitanih hidrofilnih NADES. Za razliku od njega, ginkgetin je topljiv u manjem broju hidrofilnih NADES i to većinom u onima na bazi betaina i kolin-klorida.

U usporedbi s organskim otapalima, odnosno metanolom koji se najčešće koristi u ekstrakciji specijaliziranih metabolita, pojedini NADES imaju značajno negativniji $\ln \gamma$ (Prilog 5). Na primjer, COSMOterm je izračunao da je $\ln \gamma$ za NADES B:EG 1:2 s 10 % vode (w/w) za ginkgetin negativan i 381,0 % niži u odnosu na metanol, a za amentoflavon 60,7 % . Navedeni rezultati ukazuju da bi topljivost biflavonoida trebala biti najbolja baš u NADES tog sastava.

Većina dosadašnjih istraživanja povezanih s ekstrakcijama su se temeljila na hidrofilnim NADES, dok je prvi hidrofobni DES otkriven i istražen 2015. godine. Zbog nedostatka jeftinih i lako dostupnih hidrofobnih spojeva koji tvore eutektično otapalo, do danas je zabilježen relativno mali broj hidrofobnih NADES u odnosu na hidrofilne [11]. U programu

COSMOtherm je ispitana i topljivost ginkgetina i amentoflavona u 10 hidrofobnih NADES od kojih se istaknuo L-mentol:eukaliptol 1:1 čije su vrijednosti $\ln\gamma_{\text{amentoflavon}} = -7,932$ i $\ln\gamma_{\text{ginkgetin}} = -1,679$. Unatoč činjenici da je model predvidio dobru topljivost oba spoja u hidrofobnim NADES, oni nisu istraženi u daljnjem radu zbog analitičkih metoda koje za određivanje polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina zahtijevaju prisutnost vode.

4.2 Karakterizacija odabranih NADES

Nakon odabira 15 NADES na temelju predviđene topljivosti, NADES su sintetizirana i karakterizirana, tj. određena im je gustoća, pH-vrijednosti i viskoznosti. Dobivene eksperimentalne vrijednosti navedenih veličina prikazane su u Tablici 9. Svojstva otapala koja su poželjna za ekstrakciju su manja gustoća i viskoznost zbog prijenosa tvari i lakšeg rukovanja te, u slučaju flavonoida, poželjna je niža pH-vrijednost kako bi se osjetljivi flavonoidi zaštitili od oksidativne razgradnje.

Tablica 9. Gustoća, pH-vrijednost i viskoznost pripremljenih NADES

NADES	ρ (25 °C), g/mL	pH, -	η (25 °C), mPas
B:EG 1:2 s 10 % H ₂ O (w/w)	1,149	8,168 ± 0,007	47,357 ± 4,288
B:EG 1:2 s 20 % H ₂ O (w/w)	1,123	7,467 ± 0,344	11,480 ± 0,156
B:EG 1:2 s 30 % H ₂ O (w/w)	1,009	6,478 ± 0,003	10,037 ± 0,162
B:Suc 4:1 s 20 % H ₂ O (w/w)	1,210	/	1680,333 ± 126,450
B:Suc 4:1 s 30 % H ₂ O (w/w)	1,229	7,386 ± 0,002	83,580 ± 5,778
B:MA 1:1 s 10 % H ₂ O (w/w)	1,333	3,088 ± 0,001	7118,88 ± 76,25
B:MA 1:1 s 20 % H ₂ O (w/w)	1,288	3,080 ± 0,003	520,200 ± 27,577
B:MA:Pro 1:1:1 s 10 % H ₂ O (w/w)	1,234	3,264 ± 0,004	1747,000 ± 22,716
B:Gly 1:2 s 10 % H ₂ O (w/w)	1,153	8,120 ± 0,001	311,800 ± 4,243
ChCl:EG 1:2 s 10 % H ₂ O (w/w)	1,130	6,625 ± 0,002	27,730 ± 0,481
ChCl:EG 1:2 s 20 % H ₂ O (w/w)	1,060	5,101 ± 0,002	12,105 ± 0,559
ChCl:U 1:2 s 10 % H ₂ O (w/w)	1,091	9,154 ± 0,003	27,923 ± 0,064
ChCl:U:EG 1:2:2 s 10 % H ₂ O (w/w)	1,173	9,175 ± 0,002	25,130 ± 0,481
ChCl:Mal 4:1 s 10 % H ₂ O (w/w)	1,239	4,405 ± 0,003	1091,000 ± 44,800
ChCl:Glc 2:1 s 10 % H ₂ O (w/w)	1,265	5,324 ± 0,003	>3000

Iz prikazanih vrijednosti vidljivo je da sva eutektična otapala imaju veću gustoću i viskoznost od vode pri 25 °C. Najmanju gustoću i viskoznost ima NADES betain:etilen glikol (B:EG) 1:2 s 30 % H₂O (w/w). Uspoređujući te vrijednosti s vrijednostima gustoće i viskoznosti za isto otapalo s manjim udjelima vode, može se jasno uočiti kako se s povećanjem udjela vode viskoznost i gustoća smanjuju što je vrlo poželjno zbog olakšavanja prijenosa tvari. Međutim, udio vode u NADES ne smije biti veći od procijenjenih 50 % jer je tada narušena struktura otapala te prevladavaju interakcije voda-voda i otapalo-voda [3]. Osim dodatka vode, na ove veličine znatno utječu i sirovine iz kojih se NADES pripremaju, pa su tako otapala s najvećom gustoćom i viskoznosti ona koja sadrže šećere, poput kolin klorid:glukoze (ChCl:Glc) 2:1 s 10 % H₂O (w/w) i kolin klorid:maltoze (ChCl:Mal) 4:1 s 10 % H₂O (w/w).

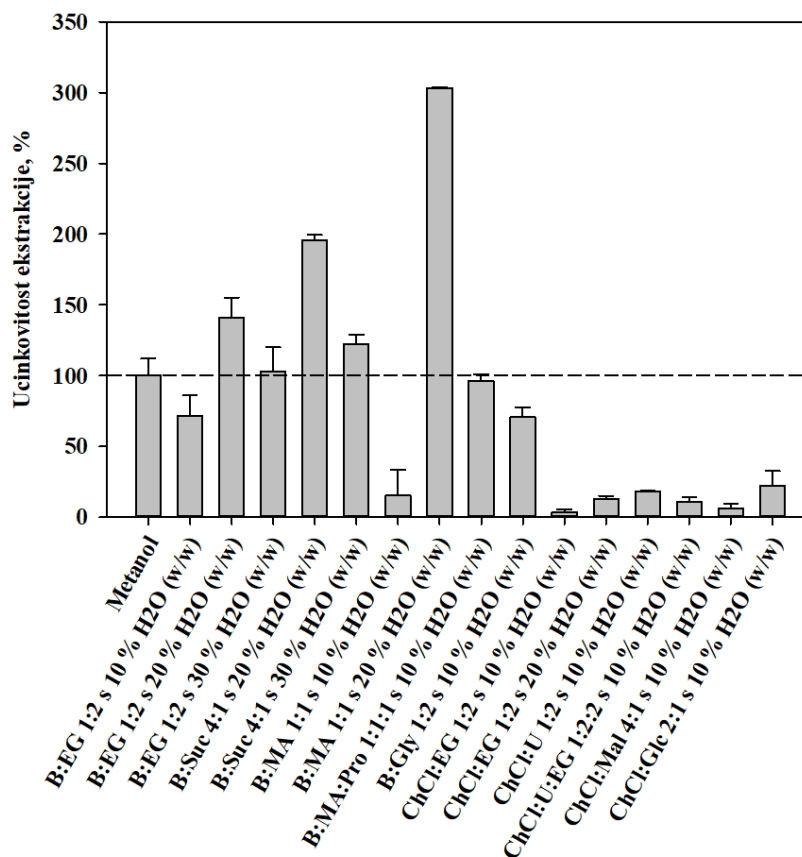
Kiselost NADES također ovisi o prirodi komponenti koje ga sačinjavaju pa, od ispitanih otapala, najmanju pH-vrijednost imaju otapala koja sadrže kiselinu, poput betain:jabučna kiselina (B:MA) 1:1 s 20 % H₂O (w/w) i betain:jabučna kiselina:prolin (B:MA:Pro) 1:1:1 s 10 % H₂O (w/w). S druge strane, najveću pH-vrijednost imaju ona otapala koja sadrže amid, poput kolin klorid:urea (ChCl:U 1:2) s 10 % H₂O (w/w) i kolin klorid: urea: etilen glikol (ChCl:U:EG) 1:2:2 s 10 % H₂O (w/w).

Valjda također napomenuti da je NADES betain:saharoza (B:Suc) 4:1 s 20 % H₂O (w/w) nakon nekoliko sati, kada se u potpunosti ohladio na 25 °C, kristalizirao te mu nije određena pH-vrijednost, a NADES kolin klorid:glukoza (ChCl:Glc) 2:1 s 10 % H₂O (w/w) je bio toliko viskozno da mu je bilo nemoguće izmjeriti viskoznost dostupnom aparaturom.

4.3 Ekstrakcija specijaliziranih metabolita pomoću NADES

4.3.1 Ekstrakcija polifenola

Za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz prirodnih izvora najčešće se koriste organska otapala kao što su aceton i etil-acetat te alkilni alkoholi metanol, etanol i propanol ili njihove smjese [31]. Iako navedena otapala vrlo učinkovito ekstrahiraju polifenole, ona ne zadovoljavaju principe zelene kemije te ih je poželjno zamijeniti ekološki prihvatljivijim alternativama. Nakon provedbe ekstrakcije polifenola odabranim NADES, dobivene učinkovitosti ekstrakcije uspoređene su s učinkovitosti ekstrakcije koja se postiže korištenjem 80 % metanola, jednim od najčešće korištenih otapala za ekstrakciju polifenola. Na Slici 11. prikazane su učinkovitosti ekstrakcije ukupnih polifenola pomoću odabranih NADES u odnosu na 80 % metanol čija učinkovitost predstavlja 100 %.



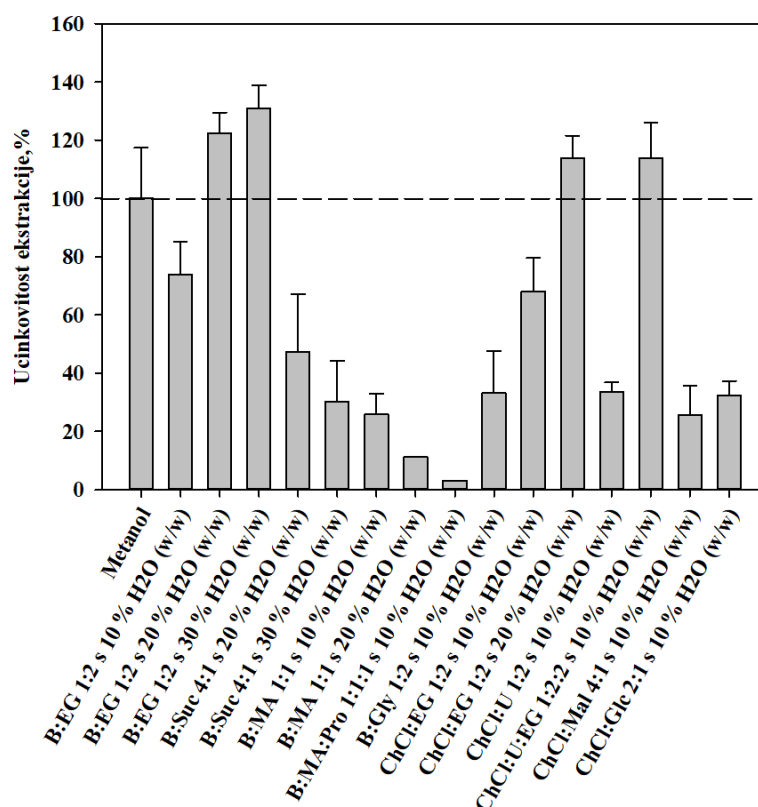
Slika 11. Učinkovitost ekstrakcije polifenola u odnosu na 80 % metanol

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da čak pet odabranih NADES pokazuje veću učinkovitost ekstrakcije polifenola od 80 % metanola i to betain:saharoza (B:SUC) 4:1 s 20 i 30 % H₂O (w/w), betain:etilen glikol (B:EG) 1:2 s 20 % i 30 % H₂O (w/w) te betain:jabučna kiselina (B:MA) 1:1 s 20 % H₂O (w/w). Koncentracija polifenola ekstrahiranih iz lišća *Ginkgo biloba* L. pomoću metanola izražena je u ekvivalentima galne kiseline po miligramu suhe tvari i iznosi $15,399 \pm 1,633 \mu\text{g GAE/mg ST}$. Za razliku od toga, pomoću otapala B:MA 1:1 s 20 % vode ekstrahirano je $38,189 \pm 1,714 \mu\text{g GAE/mg ST}$. Svojstva koja otapalo pogodno za ekstrakciju mora zadovoljiti su svakako niska gustoća i viskoznost zbog lakšeg prijenosa tvari između biljnog ekstrakta i samog otapala. Iz tog razloga su se od ispitanih 15 NADES, istaknula otapala betain:etilen glikol (B:EG) 1:2 s 20 % i 30 % H₂O (w/w) čije su vrijednost viskoznosti i gustoće nešto veće od onih za vodu. Međutim, osim viskoznosti i gustoće, kad je riječ o ekstrakciji polifenolnih spojeva, vrlo važnu ulogu ima i pH vrijednost. Prema dosadašnjim istraživanjima [32, 33], za ekstrakciju polifenola pogoduju niže pH vrijednosti jer se pri višim pH vrijednostima pojedini polifenolni spojevi razgrađuju. Obzirom na to, betain:jabučna

kiselina (B:MA) 1:1 s 20 % H₂O (w/w) koje ima najnižu pH vrijednost od svih 15 ispitanih NADES, se pokazalo najboljim za ekstrakciju polifenola.

4.3.3 Ekstrakcija flavonoida

Jedan od glavnih ciljeva ovog istraživanja bila je ekstrakcija biflavonoida iz lišća *Ginkgo biloba* L. Kako je rečeno na početku, biflavonoidi ulaze u skupinu flavonoida, pa je u ovom dijelu istraživanja, brzim spektrofotometrijskim testom ispitano 15 odabranih NADES s ciljem pronalaska onog s kojim će se postići najveća učinkovitost ekstrakcije. Na Slici 12. prikazani su dobiveni rezultati te se može uočiti da čak četiri NADES pokazuju veću učinkovitost ekstrakcije u odnosu na 80 % metanol, od kojih se posebno ističe NADES betain:etilen glikol (B:EG) 1:2 s 30 % H₂O (w/w). Dobiveni rezultati su u skladu s predviđanjima COSMOtherm koji je na temelju topljivosti pretpostavio da je najpogodniji NADES za ekstrakciju flavonoida onaj na bazi betaina i etilen glikola molarnog omjere 1:2. Uspoređujući NADES betain:etilen glikol (B:EG) 1:2 s različitim udjelima vode, COSMOtherm je predvidio da će najbolja učinkovitost ekstrakcije biti postignuta korištenjem NADES betain:etilen glikol (B:EG) 1:2 s 10 % H₂O (w/w) što nažalost eksperimentalno nije potvrđeno. Razlog tome je vjerojatno viskoznost i gustoća ovog NADES (Tablica 9.) koji su visoki što otežava prijenos tvari. Povećanjem udjela vode u spomenutom NADES, eksperimentalno je rezultiralo povećanjem učinkovitost ekstrakcije.



Slika 12. Učinkovitost ekstrakcije flavonoida u odnosu na 80 % metanol

Osim otapala na bazi betaina i etilen glikola (1:2), veća učinkovitost ekstrakcije od one za 80 % metanol postignuta je još korištenjem NADES kolin klorid:etilen glikol (ChCl:EG) 1:2 s 20 % H₂O (w/w) te kolin klorid:urea:etilen glikol (ChCl:U:EG) 1:2:2 s 10 % H₂O (w/w). Prema literaturi [34] Qi i sur. su proveli ekstrakciju flavonoida iz *Equisetum palustre* L. pomoću devet različitih NADES na bazi betaina i kolin klorida. Uočeno je da je najveća učinkovitost ekstrakcije postignuta kada je kao donor vodikove veze korišten etilen glikol, što je slučaj i u ovom istraživanju. Prema navedenom istraživanju, NADES na bazi etilen glikola i kolin klorida su učinkovitiji su za ekstrakciju polarnijih flavona, dok NADES na bazi etilen glikola i betaina pokazuju veću učinkovitost ekstrakcije na relativno slabo polarne spojeve. Dobiveni rezultati ukazuju koliko je zapravo važno ispravno izabrati/dizajnirati NADES za specifičnu primjenu.

Koncentracija flavonoida ekstrahiranih iz lišća *Ginkgo biloba* L. pomoću 80 % metanola izražena je u mikrogramima ekvivalenta katehina (*catechin equivalents*) po miligramu suhe tvari uzorka ($\mu\text{g CE/mg ST}$) i iznosi $3,714 \pm 0,571 \mu\text{g CE/mg ST}$. Za razliku od toga, korištenjem NADES betain:etilen glikol (B:EG) 1:2 s 10 % H₂O (w/w) ekstrahirano je $4,866 \pm 0,261 \mu\text{g CE/mg ST}$.

U sljedećem koraku, korištenjem HPLC-DAD metode u ekstraktima su određene koncentracije pet najzastupljenijih biflavonoida u lišću ginka (amentoflavon, ginkgetin, izoginkgetin, bilobetin i sciadopitisin). Svih pet ispitanih biflavonoida smatraju se derivatima amentoflavona, s tim da bilobetin ima jednu metoksilnu skupinu, ginkgetin i izoginkgetin imaju po dvije, ali na različitim mjestima te sciadopitisin tri. Prisutnost metoksilnih skupina utječe na kemijska svojstva analiziranih spojeva i njihovu polarnost što omogućava razdvajanje spojeva pomoću silika reverzno-faznih C18 kolona [19]. Izmjereni udjeli pet najzastupljenijih biflavonoida u odabranim uzorcima prikazane su u Tablici 10.

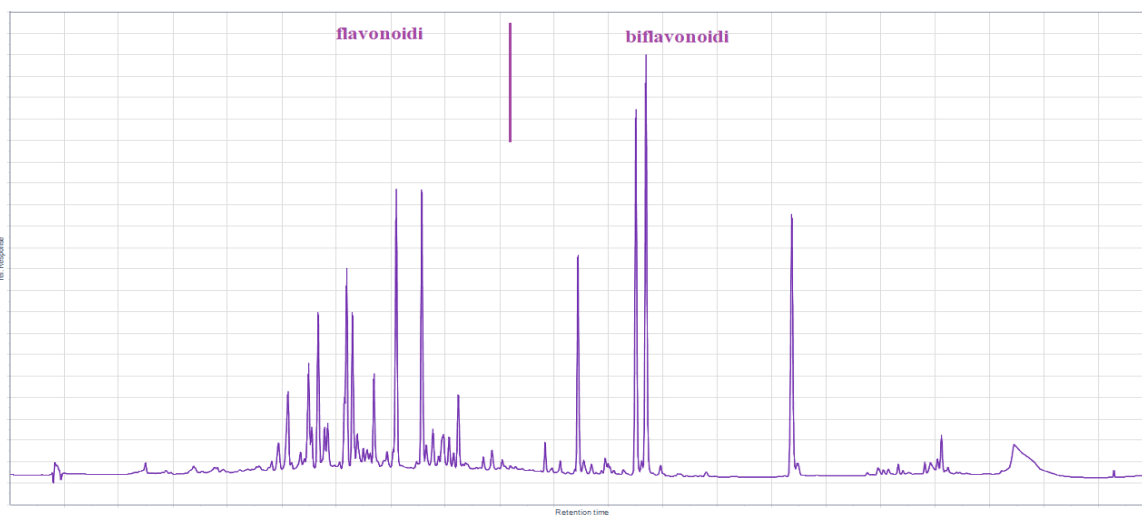
Tablica 10. Udjeli biflavonoida dobivenih nakon ekstrakcije u NADES i 80 % metanolu

Otapalo	w(amentoflavon), µg/g ST	w(bilobetin), µg/g ST	w(ginkgetin), µg/g ST	w(izoginkgetin), µg/g ST	w (sciadopitisin), µg/g ST
80 %-tni metanol	81,03 ± 2,41	470,71 ± 13,39	367,64 ± 4,12	543,44 ± 5,03	344,18 ± 26,14
B:EG (1:2) s 10 % H₂O (w/w)	/	107,35 ± 8,86	110,30 ± 10,39	146,01 ± 16,58	154,60 ± 19,20
B:EG (1:2) s 20 % H ₂ O (w/w)	60,93 ± 8,53	171,07 ± 29,58	105,78 ± 16,32	124,54 ± 6,67	77,94 ± 1,31
B:EG (1:2) s 30 % H₂O (w/w)	53,06 ± 0,72	118,96 ± 13,47	74,32 ± 3,90	94,97 ± 5,99	71,05 ± 5,46
B:SUC (4:1) s 30 % H ₂ O (w/w)	/	63,33 ± 0,00	/	63,13 ± 1,08	54,10 ± 2,05
B:GLY (1:2) s 10 % H ₂ O (w/w)	/	91,66 ± 13,85	73,55 ± 4,83	82,98 ± 8,70	59,21 ± 1,37
ChCl:EG (1:2) s 10 % H ₂ O (w/w)	/	64,50 ± 1,55	/	62,29 ± 1,43	51,48 ± 1,83
ChCl:EG (1:2) s 20 % H ₂ O (w/w)	/	72,33 ± 0,00	/	61,46 ± 0,50	50,27 ± 0,40
ChCl:U (1:2) s 10 % H ₂ O (w/w)	/	66,98 ± 2,87	/	61,45 ± 0,10	50,09 ± 0,34
ChCl:U:EG (1:2:2) s 10 % H ₂ O (w/w)	/	77,25 ± 3,14	/	62,60 ± 1,47	50,44 ± 0,69

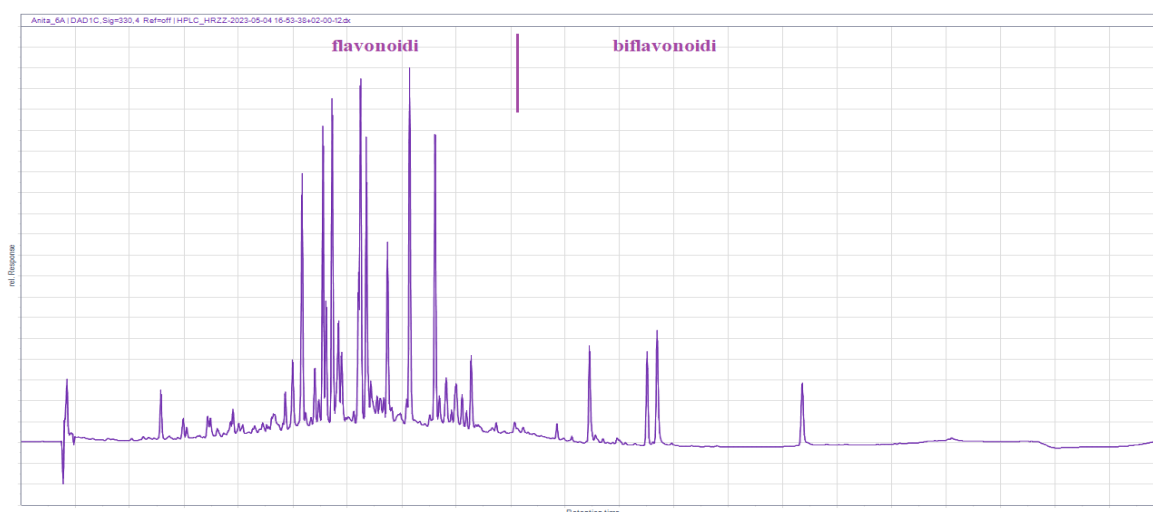
Kovač Tomas i sur. [19] proveli su ekstrakciju biflavonoida pomoću 80 % metanola iz različitih dijelova ginka te je opaženo da je najviše biflavonoida prisutno u lišću i peteljka listova. Autori su također zabilježili da je u lišću biflavonoid amentoflavon prisutan u najmanjoj koncentraciji i to $86,00 \pm 0,74 \mu\text{g/g ST}$. Slični rezultati dobiveni su i u ovom istraživanju, tj. dobivena je koncentracija amentoflavona od $81,03 \pm 2,41 \mu\text{g/g ST}$. S druge strane, spomenuti autori su zabilježili najveće koncentracije sciadopitisa i to $2398,59 \pm 6,11 \mu\text{g/g ST}$, dok je u ovom istraživanju 80 % metanolom ekstrahirano najviše izoginkgetina ($543,44 \pm 5,03 \mu\text{g/g ST}$). Razlog ovih neslaganja je heterogenost realnih/bioloških uzoraka te razlika u sastavu biljnog materijala koja proizlazi iz vanjskih čimbenika koji utječu na pojedino stablo i njegove dijelove. U radu Wang i sur. [35], prikazana je ekstrakcija biflavonoida iz lišća *Ginkgo biloba* L. pomoću 50 % vodene otopine etanola. Autori su u uzorcima detektirali četiri biflavonoida (ginkgetin, izoginkgetin, bilobetin i sciadopitisin), od kojih je najviše bilo prisutno izoginkgetin i sciadopitisin, a njihov sastav i količina su ovisili o datumu žetve. U radu Pandey i sur. [36] također je provedena ekstrakcija biflavonoida iz lišća ginka pomoću etanola, ali analizirali su samo amentoflavon i sciadopitisin. Prema tim rezultatima, ovisno o uzorku, koncentracija amentoflavona je od 250 – 465 $\mu\text{g/g ST}$, dok je koncentracija sciadopitisa od 13200 – 71200 $\mu\text{g/g ST}$ što je značajno više u odnosu na amentoflavon kao što je to slučaj i u ovom radu. Niske koncentracije amentoflavona su razlog zašto u nekim drugim studijama amentoflavon nije detektiran.

Analizom dobivenih rezultata može se uočiti da niti jedan NADES nije učinkovit kao 80 % metanol, tj. u svim uzorcima nakon ekstrakcije s NADES zabilježene su niže koncentracije biflavonoida u odnosu na ekstrakciju provedenu s 80 % metanolom. Od ispitanih NADES, najviše biflavonoida ekstrahirano je pomoću otapala betain:etilen glikol (B:EG) 1:2 s 10 % H_2O (w/w) kako je predvidio i COSMOtherm softver.

Na Slici 13. prikazan je kromatogram uzoraka nakon ekstrakcije pomoću 80 % metanola, a na Slici 14. nakon ekstrakcije pomoću otapala betain:etilen glikol (B:EG) 1:2 s 30 % H_2O (w/w). Usporedbom kromatograma, tj. veličine pikova vidi se da je 80 % metanol učinkovitiji za ekstrakciju biflavonoida, dok je NADES učinkovitiji za ekstrakciju monomernih flavonoida.



Slika 13. Dobiveni kromatogram nakon ekstrakcije pomoću metanola

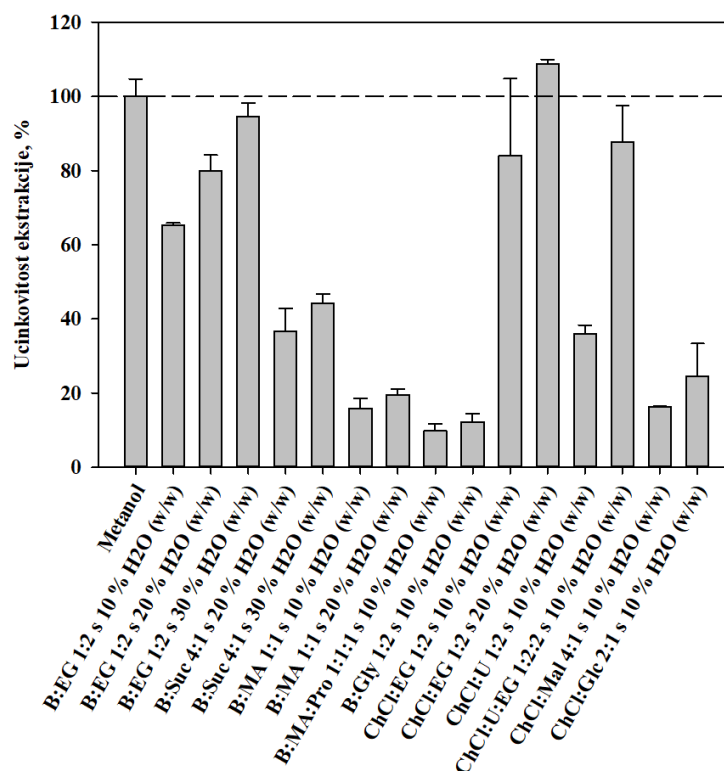


Slika 14. Dobiveni kromatogram nakon ekstrakcije pomoću otapala betain:etilen glikol (1:2) s 30 % vode (w/w)

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da su NADES učinkoviti za ekstrakciju flavonoida međutim, proces je potrebno dodatno optimirati kako bi se postigla ekstrakcija biflavonoida.

4.3.4 Ekstrakcija fenolnih kiselina

Osim učinkovitosti ekstrakcije ukupnih polifenola i flavonoida, ispitana je učinkovitost ekstrakcije fenolnih kiselina pomoću odabranih NADES. Na Slici 15. prikazana je učinkovitost ekstrakcije fenolnih kiselina pomoću NADES s obzirom na 80 % metanol. Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako samo otapalo kolin klorid:etilen glikol (ChCl:EG) 1:2 s 20 % H₂O (w/w) pokazuje veću učinkovitost ekstrakcije u odnosu na ekstrakciju provedenu s 80 % metanolom.

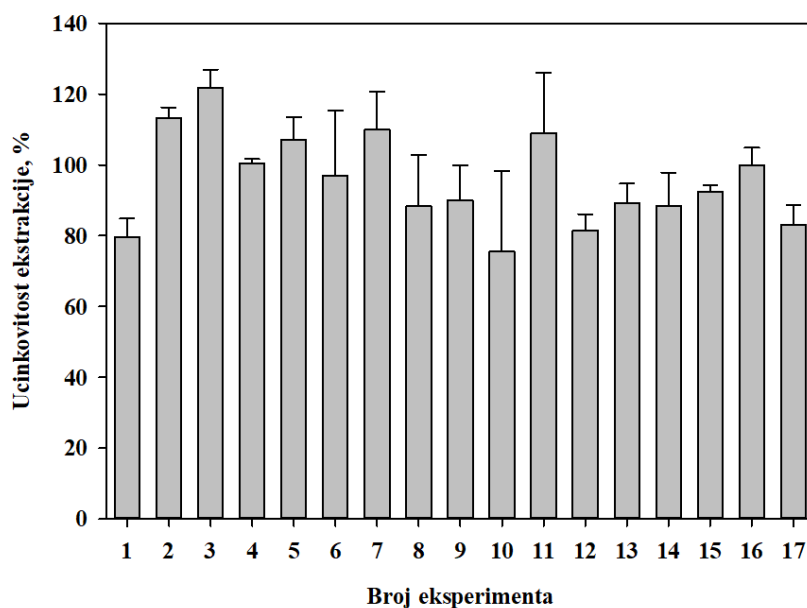


Slika 15. Učinkovitost ekstrakcije fenolnih kiselina s obzirom na metanol

Koncentracija fenolnih kiselina ekstrahiranih iz lišća *Ginkgo biloba* L. pomoću 80 % metanola izražena je u mikrogram ekvivalenta kava kiseline po miligramu suhe tvari uzorka ($\mu\text{g CAE}/\text{mg ST}$) i iznosi $9,676 \pm 0,403 \mu\text{g CAE}/\text{mg ST}$. Za razliku od toga, korištenjem NADES kolin klorid:etilen glikol (ChCl:EG) 1:2 s 20 % H₂O (w/w) ekstrahirano je $10,524 \pm 0,102 \mu\text{g CAE}/\text{mg ST}$.

4.4 Optimizacija procesnih uvjeta ekstrakcije flavonoida pomoću NADES betain:etilen glikol (B:EG) 1:2 s 30 % H₂O

Na temelju dobivenih rezultata učinkovitosti ekstrakcije flavonoida iz lišća *Ginkgo biloba* L., kao najučinkovitije NADES odabrano je otapalo betain:etilen glikol (B:EG) 1:2 s 30 % H₂O (w/w). Kako bi se postigla što veća učinkovitost ekstrakcije, provedena je optimizacija procesa pomoću eksperimentalnog Box-Behnken dizajna na tri razine s tri faktora. Korištenjem programskog paketa Design-Expert, izrađen je eksperimentalni plan s ukupno 17 eksperimenata (Tablica 7.), kako bi se ispitao utjecaj temperature, omjera mase usitnjenog lišća ginka i volumena otapala te vremena na učinkovitost ekstrakcije flavonoida. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 16.



Slika 16. Učinkovitosti ekstrakcije flavonoida u točkama eksperimentalnoga plana prema Box-Behnken dizajnu

Za analizu rezultata pokusa dobivenih prema Box-Behnken dizajnu na tri razine s tri faktora korišten je programski paket Design-Expert. Analizom su određeni koeficijenti modela koji ovise o odabranim procesnim veličinama (X_1 - temperatura, X_2 -vrijeme trajanja ekstrakcije i X_3 -omjer mase usitnjenog lišća ginka i volumena otapala) i odzivu procesa (učinkovitost ekstrakcije flavonoida). Za opisivanje utjecaja odabranih procesnih veličina na učinkovitost ekstrakcije flavonoida pomoću otapala betain:etilen glikol (B:EG) 1:2 s 30 % H_2O (w/w), odabran je polinom drugog stupnja kojim su opisani linearni i kvadratni utjecaj pojedinog procesnog uvjeta te njihova međusobna ovisnost na učinkovitost ekstrakcije. Osim određivanja vrijednosti koeficijenta utjecaja, provedena je i statistička analiza vrijednosti dobivenih eksperimentom i vrijednosti dobivenih simulacijom modela kako bi se mogla ispitati valjanost dobivenog modela te može li se upotrijebiti za određivanje optimalnih uvjeta provedbe procesa.

Kao mjerilo za određivanje utjecaja određenih procesnih veličina i njihovog međusobnog utjecaja na učinkovitost ekstrakcije flavonoida korištene su P -vrijednosti. Prema literaturi [37] P -vrijednost manje od 0,05 ukazuju na značajan utjecaj analiziranih procesnih veličina ili interakcija. Nasuprot tome, ukoliko je P -vrijednost veća od 0,05 vrijednosti analiziranih veličina ili interakcija nisu značajne te se mogu zanemariti u daljnjem istraživanju. U Tablici 11. prikazana je analiza utjecaja ispitivanih procesnih veličina na učinkovitost ekstrakcije flavonoida gdje se vrijednost X_n odnosi na linearni član, a X_n^2 na kvadratni član.

Tablica 11. Rezultati analize utjecaja pojedinih procesnih veličina i *P*-vrijednosti

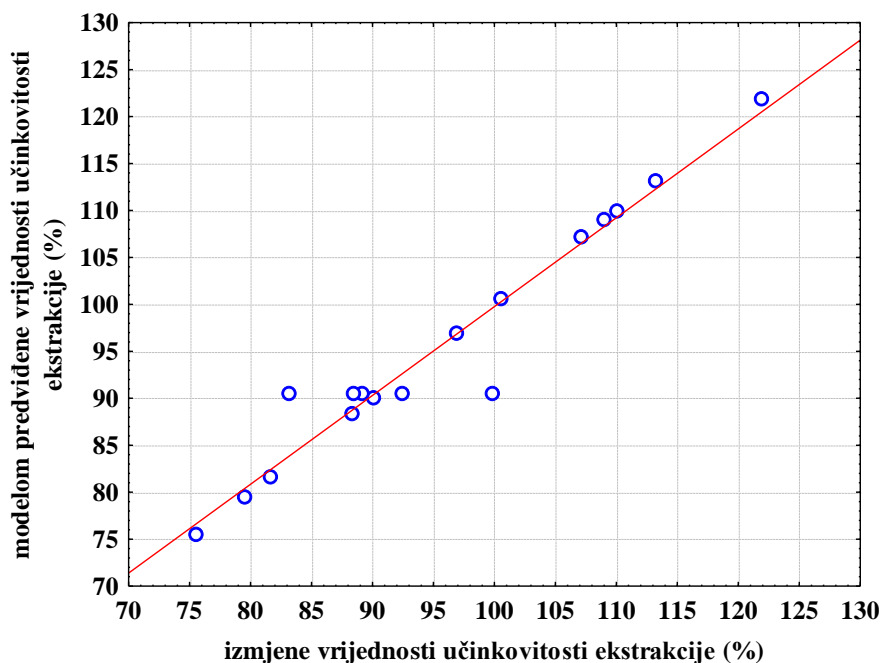
Parametri	Utjecaj	<i>P</i> -vrijednost
Odsječak	97,8155	0,000001
X_1	-1,1841	0,807812
X_1^2	-12,3698	0,014241
X_2	2,9259	0,555775
X_2^2	-0,8275	0,794987
X_3	2,2374	0,649155
X_3^2	2,3465	0,475004
međudjelovanje X_1-X_2	-27,5203	0,010811
međudjelovanje X_1-X_3	-5,7277	0,401873
međudjelovanje X_2-X_3	-6,4688	0,349690

Značajan utjecaj na učinkovitost ekstrakcije flavonoida ima temperatura (X_1^2) te međudjelovanje temperature i omjera mase usitnjenog lišća ginka i volumena otapala (X_1 - X_2). Oba navedena parametra imaju negativan utjecaj na učinkovitost ekstrakcije flavonoida, odnosno njihovim daljnjim povećanjem učinkovitost ekstrakcije će se smanjivati. Naime, porastom temperature opada viskoznost i gustoća otapala, ali raste tlak pare koji smanjuje učinkovitost procesa kavitacije i dovodi do niže učinkovitosti ekstrakcije [31]. Iz Tablice 10. vidljivo je da najznačajniji utjecaj, i to negativan, ima međudjelovanje temperature i omjera mase usitnjenog lišća ginka i volumena otapala. Iz rezultata je vidljivo kako sve analizirane veličine imaju utjecaj na učinkovitost ekstrakcije te je one s mjerodavnom *P*-vrijednosti potrebno uzeti u obzir pri definiranju matematičkog modela procesa koji je prikazan Jednadžbom 2.

$$\%E = 97,8155 - 1,1841 \cdot X_1 - 12,3698 \cdot X_1^2 + 2,9259 \cdot X_2 - 0,8275 \cdot X_2^2 + 2,2374 \cdot X_3 - 2,3465 \cdot X_3^2 - 27,5203 \cdot X_1 \cdot X_2 - 5,7277 \cdot X_1 \cdot X_3 - 6,4688 \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (2)$$

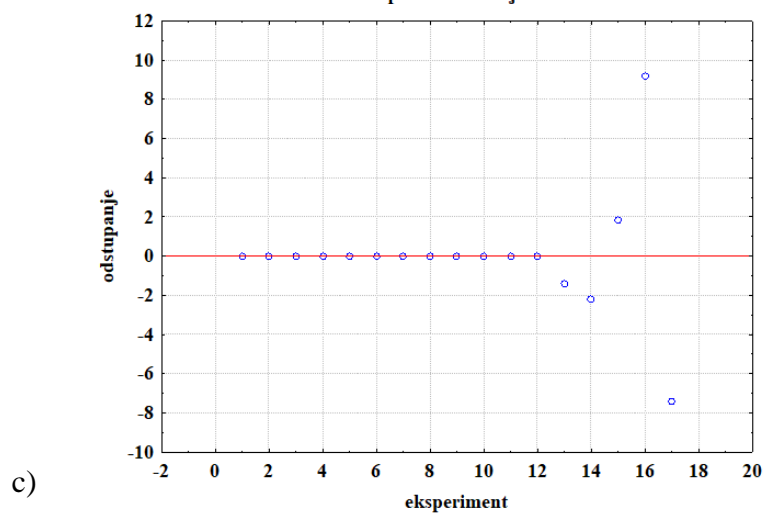
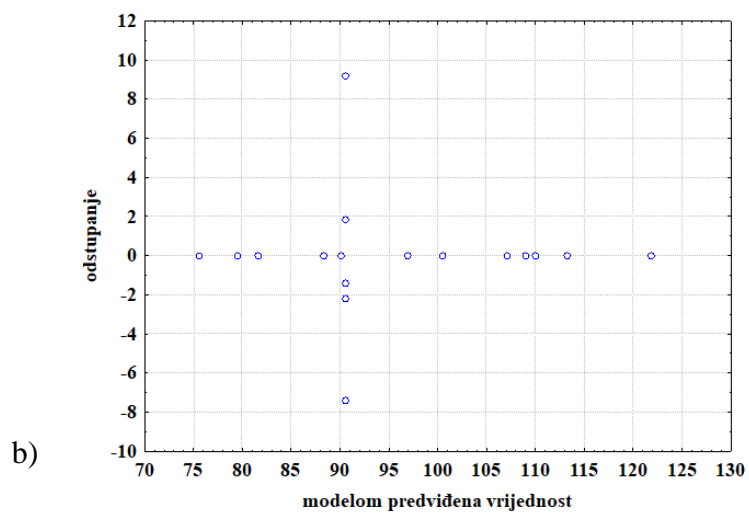
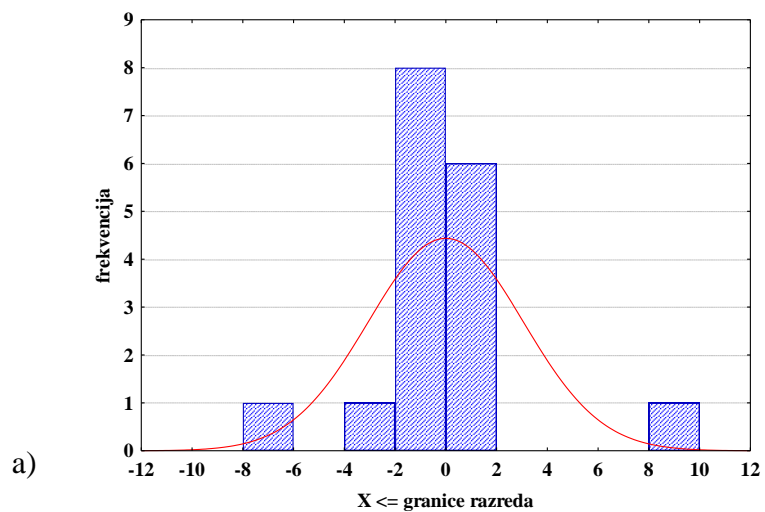
Na Slici 17. prikazana je usporedba vrijednosti učinkovitosti ekstrakcije flavonoida dobivenih matematičkim modelom i eksperimentalnih vrijednosti. Odstupanje (R^2) između vrijednosti iznosi 0,94588 što znači da matematički model dobro opisuje zadovoljavajuće eksperimentalne rezultate, s obzirom na to da vrijednost R^2 veća od 0,70 ukazuje na to da je model pouzdan te ga se može koristiti s dostatnom pouzdanošću za simulaciju procesa

ekstrakcije flavonoida iz lišća ginka pomoću prirodnog niskotemperaturnog otapala betain:etilen glikol (B:EG) 1:2 s 30 % H₂O (w/w).



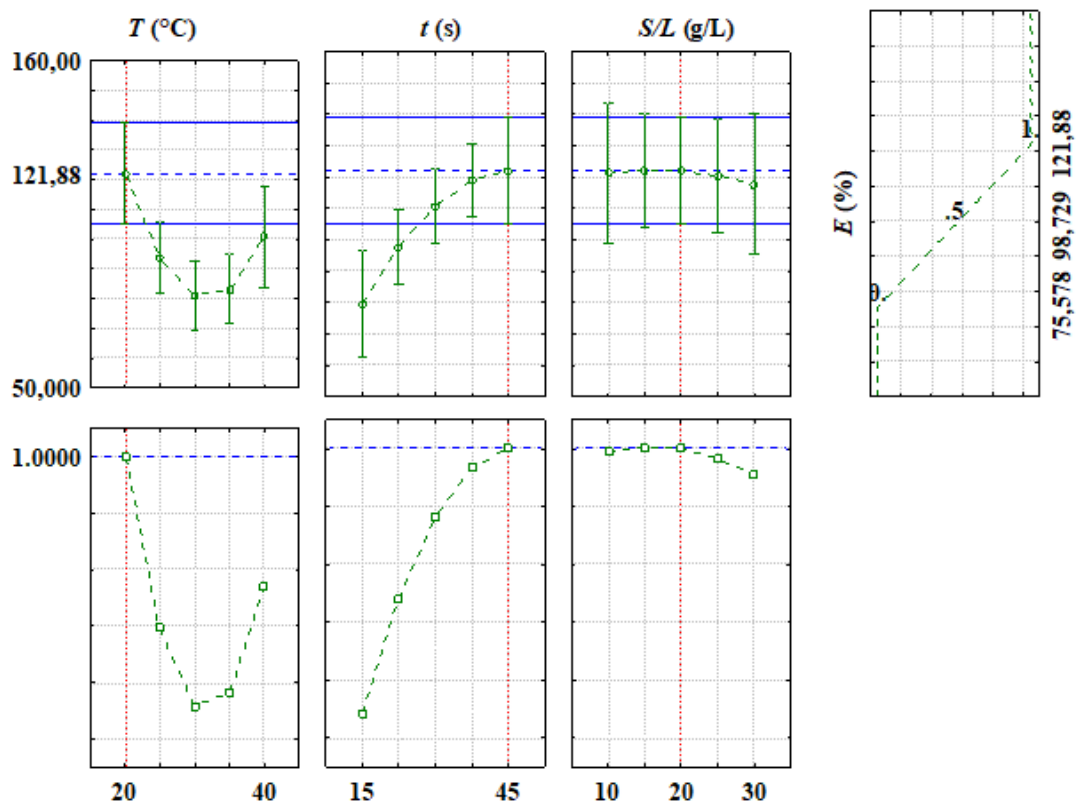
Slika 17. Usporedba vrijednosti učinkovitosti ekstrakcije flavonoida dobivenih matematičkim modelom i eksperimentalnih vrijednosti

Vrijednost R^2 nije dovoljno dobar pokazatelj pouzdanosti modela te je napravljena i rezidualna analiza koja daje bolji uvid u vrijednosti predloženog matematičkog modela za ispitivani sustav. Ona se temelji na usporedbi eksperimentalno dobivenih vrijednosti procesnih veličina i vrijednosti dobivenih veličina simulacijom matematičkog modela procesa. Na Slici 18. prikazana je provedena rezidualna analiza za ekstrakciju flavonoida iz lišća ginka pomoću NADES betain:etilen glikol (B:EG) 1:2 s 30 % H₂O (w/w) u cilju dobivanja što veće vrijednosti učinkovitosti ekstrakcije. Na Slici 18a nalazi se histogram oblika zvona što je potvrda dobre raspodjele, unatoč određenim nesimetrijama. Usporedbom rezidualnih i predviđenih vrijednosti na Slici 18b uočeno je da se podatci ponašaju nasumično, odnosno nije primijećen uzorak, što je pokazatelj da model dobro odgovara podatcima. Kako bi se provjerilo može li redoslijed eksperimentalnih izvođenja utjecati na podatke, uspoređeni su rezidualni i eksperimentalni podaci što je prikazano na Slici 18c. Dobiveni rezultati ukazuju na to da je razina randomizacije bila primjerena, da redoslijed testiranja nije utjecao na podatke i da je postavljeni model procesa ipak prihvatljiv te da se može koristiti za daljnju optimizaciju procesa.

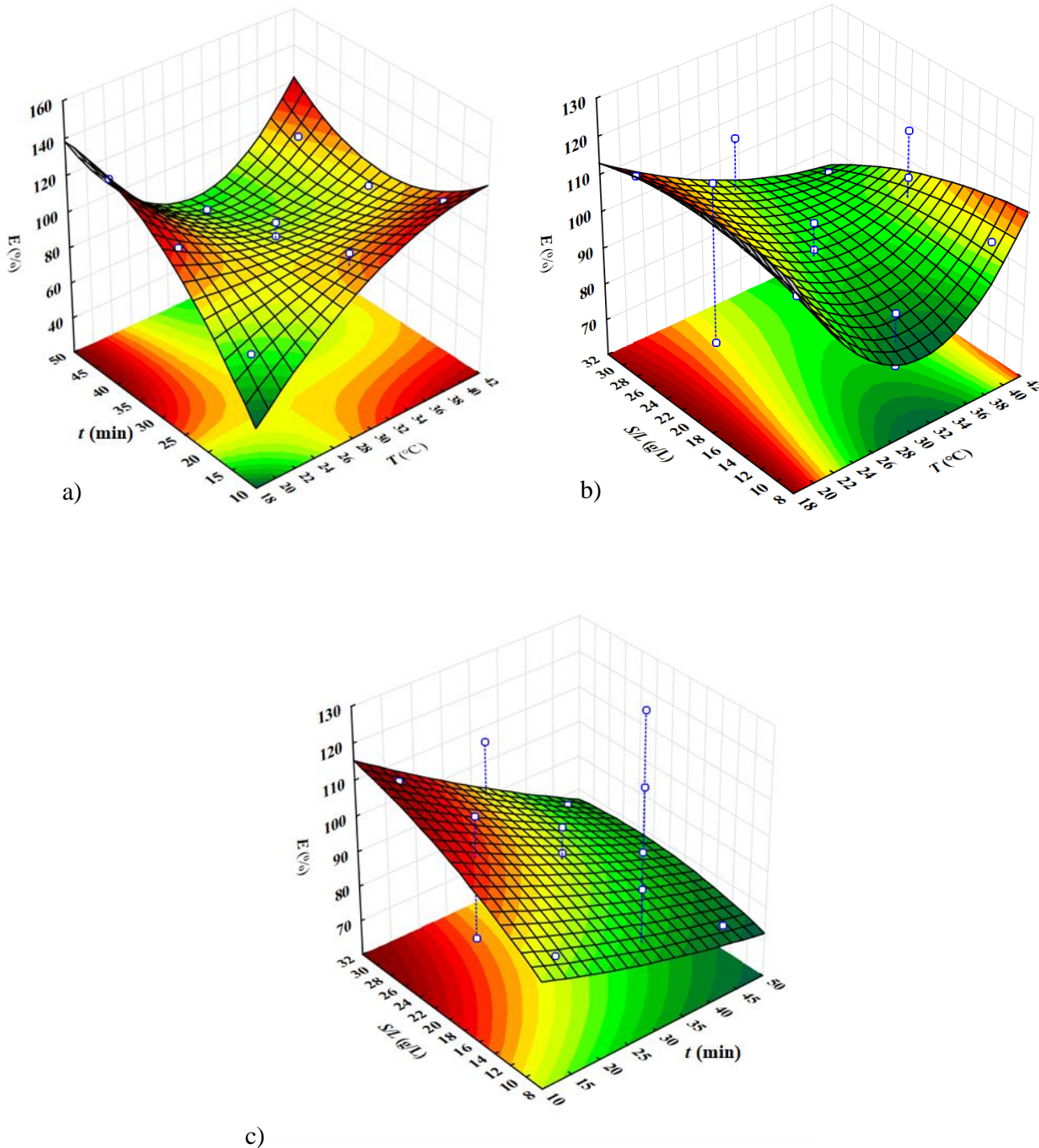


Slika 18. Rezidualna analiza za ekstrakciju flavonoida iz lišća *Ginkgo biloba* L. provedenu pomoću prirodnog niskotemperaturnog otapala betain:etilen glikol (1:2) s 30 % H₂O, a) histogram, b) odnos predviđene vrijednosti u odnosu na rezidualne vrijednosti, i c) usporedba eksperimentalnih i rezidualnih podataka.

Optimalni uvjeti procesa ekstrakcije flavonoida iz lišća ginka provedene pomoću NADES betain:etilen glikol (B:EG) 1:2 s 30 % H₂O (w/w), određeni su temeljem simulacija razvijenog matematičkog modela procesa u programskom paketu Design-Expert. Rezultati optimizacije prikazani su na Slici 19. i Slici 20. Kao optimalni procesni uvjeti određeni su: temperatura 20 °C, vrijeme ekstrakcije 45 min te omjer mase usitnjenog lišća ginka i volumena otapala od 20 mg/mL.



Slika 19. Optimalni uvjeti procesa ekstrakcije flavonoida iz lišća ginka provedene pomoću NADES betain:etilen glikol (B:EG) 1:2 s 30 % H₂O (w/w)



Slika 20. 3D prikaz optimalnih uvjeta procesa ekstrakcije flavonoida iz lišća ginka provedene pomoću NADES betain:etilen glikol (B:EG) 1:2 s 30 % H₂O (w/w): a) temperatura i vrijeme ekstrakcije, b) temperatura i omjer mase uzorka ginka i volumena otapala i c) vrijeme ekstrakcije i omjer mase uzorka ginka i volumena otapala

Kako bi se ocijenila valjanost matematičkog modela i provjerili dobiveni optimalni procesni uvjeti, provedena je ekstrakcija specifičnih metabolita pri optimalnim uvjetima. Usporedba koncentracija ukupnih flavonoida, polifenola i fenolnih kiselina ekstrahiranih pri optimalnim uvjetima u odnosu na početne uvjete prikazana je u Tablici 12.

Tablica 12. Koncentracije ekstrahiranih flavonoida, polifenola i fenolnih kiselina pri početnim i optimalnim procesnim uvjetima

Otapalo	Početni uvjeti	Optimalni uvjeti
	Sadržaj ukupnih flavonoida ($\mu\text{g GAE/mg ST}$)	
80 % metanol	$3,714 \pm 0,791$	$5,634 \pm 0,076$
B:EG 1:2 s 30 % H₂O (w/w)	$4,865 \pm 0,361$	$6,473 \pm 0,036$
	Sadržaj ukupnih polifenola ($\mu\text{g CE/mg ST}$)	
80 % metanol	$14,629 \pm 1,452$	$14,629 \pm 0,855$
B:EG 1:2 s 30 % H₂O (w/w)	$23,702 \pm 2,615$	$27,159 \pm 2,275$
	Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina ($\mu\text{g CAE/mg ST}$)	
80 % metanol	$9,913 \pm 0,196$	$11,719 \pm 0,497$
B:EG 1:2 s 30 % H₂O (w/w)	$6,908 \pm 0,368$	$7,655 \pm 0,090$

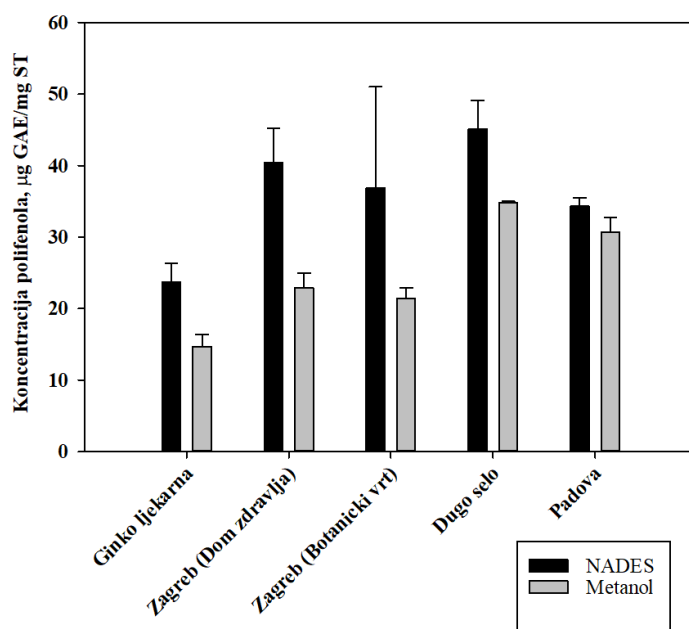
Iz dobivenih rezultata se može uočiti da su prilikom provedbe ekstrakcije pri optimalnim uvjetima, ekstrahirane veće koncentracije svih ispitanih specifičnih metabolita.

4.5 Određivanje koncentracije specijaliziranih metabolita u lišću ginka s različitim lokacija

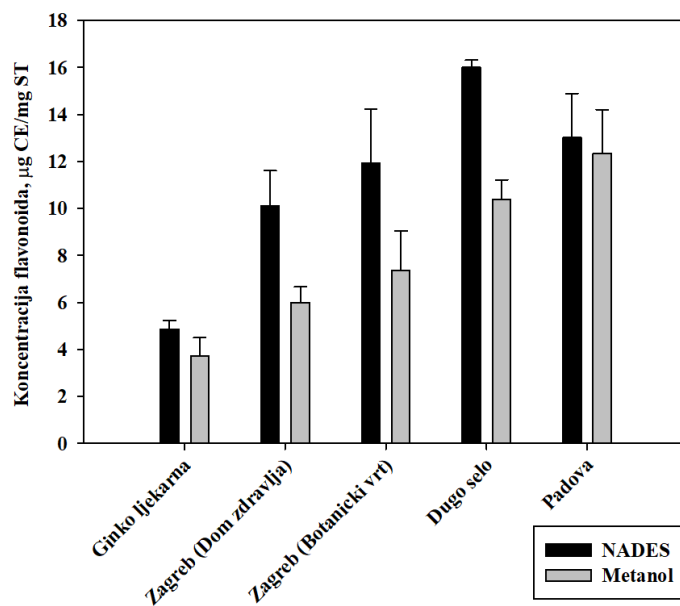
Mnoge biljke predstavljaju bogat izvor polifenolnih spojeva, ali sadržaj polifenola, flavonoida, fenolnih kiselina i ostalih važnih metabolita varira od biljke do biljke, ali i između istih biljaka. Postoji mnogo čimbenika koji utječu sadržaj i koncentraciju navedenih skupina spojeva u biljkama, a neke od njih su klimatski uvjeti u kojima biljka raste, različiti stresovi, starost biljke, godišnje doba prikupljanja uzoraka, uvjeti sušenja uzorka, uvjeti i vremenski period skladištenja prikupljenih uzoraka itd. Sva istraživanja u ovom radu provedena su na lišću ginka kupljenog u ljekarni, pa je u sljedećem koraku razvijena metoda testirana na ručno prikupljenim

listovima ginka s još četiri različite lokacije: dvije u gradu Zagrebu, Dugo Selo te ginko iz najstarijeg botaničkog vrta na svijetu u Padovi.

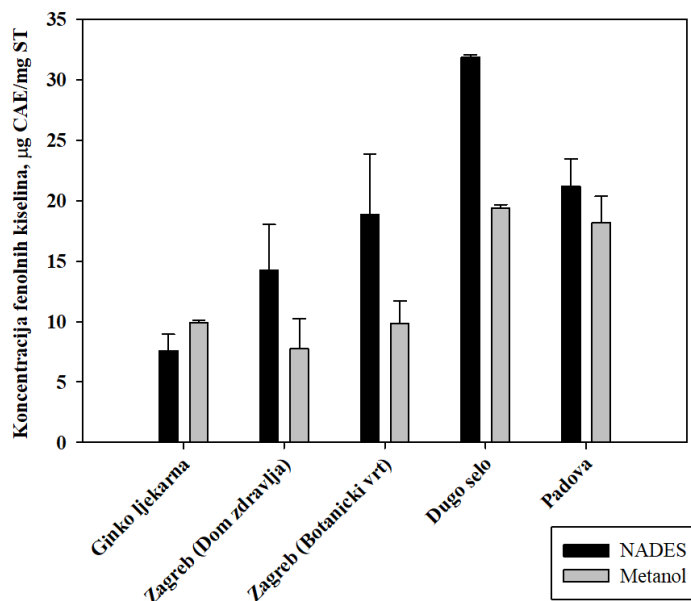
Na Slici 21. prikazana je usporedba koncentracije ekstrahiranih polifenola (Slika 21a), flavonoida (Slika 21b) i fenolnih kiselina (Slika 21c) pomoću NADES betain:etilen glikol (B:EG) 1:2 s 30 % H₂O (w/w) i 80 % metanola. Može se uočiti da je i na ovim uzorcima odabrani NADES učinkovitiji u ekstrakciji od 80 % metanola, te da je najveći udio polifenola ($45,101 \pm 5,538 \mu\text{g GAE/mg ST}$), flavonoida ($16,000 \pm 0,276 \mu\text{g CE/mg ST}$) i fenolnih kiselina ($31,897 \pm 0,152 \mu\text{g CAE/mg ST}$) zabilježen u lišću koje je sakupljeno sa stabla u Dugom Selu koje je između ostalog bilo i najmlađe drvo od svih.



a)



b)



c)

Slika 21. Usporedba ekstrakcije: a) polifenola, b) flavonoida i c) fenolnih kiselina pomoću 80 % metanola i NADES iz lišća *Ginkgo biloba* L. sakupljenih s različitih lokacija

5. ZAKLJUČAK

- Topljivost biflavonoida amentoflavona i ginkgetina procijenjena je uz pomoć programskog softvera COSMOtherm te je na osnovu dobivenih prirodnih logaritama koeficijenata aktivnosti ($\ln\gamma$) odabrano ukupno 15 hidrofilnih NADES za provedbu ekstrakcije specijaliziranih metabolita iz lišća ginka
- Odabrana NADES su sintetizirana te karakterizirana (pH-vrijednost, gustoća i viskoznost) pri čemu je zaključeno da sastav NADES utječe na fizikalno-kemijska svojstva NADES
- Odabir NADES za ekstrakciju specijaliziranih metabolita iz lišća ginka proveden je pokusima u šaržnom sustavu. Na temelju postignute učinkovitosti ekstrakcije flavonoida i rezultata karakterizacije NADES, kao najbolji NADES izabran je betain:etilen glikol (B:EG) s 30 % H₂O (w/w)
- U cilju postizanja što veće učinkovitosti ekstrakcije, provedena je optimizacija procesa pomoću eksperimentalnog Box-Behnken dizajna na tri razine s tri faktora pri čemu su određeni sljedeći optimalni procesni uvjeti: temperatura 20 °C, vrijeme ekstrakcije 45 min te omjer mase usitnjenog lišća ginka i volumena otapala od 20 mg/mL.
- Određivanjem koncentracije ekstrahiranih biflavonoida pomoću HPLC-DAD metode pokazalo se da su NADES učinkoviti za ekstrakciju flavonoida međutim, proces je potrebno dodatno optimirati kako bi se pospješila ekstrakcija biflavonoida.

6. LITERATURA

1. Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.S., Nutrizio, M., Režek Jambrak, A., Munekata, P.E.S., Lorenzo, J.M., Barba, F.J., Binello, A., Cravotto, G. A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products, *Green Chem.*, 22 (2020) 2325-2353
2. Daia, Y., van Spronsenb, J., Witkampb, G., Verpoortea, R., Choia, Y. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology, *Anal. Chim. Acta*, 766 (2013) 61– 68
3. Radović, M., Panić, M., Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Radojčić Redovniković, I. Niskotemperaturna eutektička otapala – racionalnim dizajnom do zelenog otapala budućnosti, *Kem. Ind.*, 70 (2021) 551–562
4. Panchel, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R. Flavonoids: an overview, *J. Nutr. Sci.*, 5 (2016) 1-15
5. Šamec, D., Karalija, E., Dahija, S., Hassan, S.T.S. Biflavonoids: Important Contributions to the Health Benefits of Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.), *Plants*, 11 (2022) 1-20
6. Anastas, P., Eghbali, N. Green chemistry: principles and practice, *Chem. Soc. Rev.*, 39 (2010) 301-312
7. Płotka-Wasyłka, J., Guardia, M., Andruch, V., Vilkova, M. Deep eutectic solvents vs ionic liquids: Similarities and differences, *Microchem. J.* 159 (2020) 1-7
8. Cvjetko Bubalo, M., Panić, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I. Metode pripreve eutektičkih otapala, *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 11 (2016) 164-168
9. Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R.L., Duarte, A.R.C. Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2 (2014) 1063–1071
10. Smith, E.L., Abbott, A.P., Ryder, K.S. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications, *Chem. Rev.*, 114 (2014) 11060–11082
11. Shaibuna, M., Theresa, L.V., Sreekumar, K. Neoteric deep eutectic solvents: history, recent developments, and catalytic applications, *Soft Matter*, 18 (2022)2695–2721
12. Leistner, E., Drewke, C. *Ginkgo biloba* and Ginkgotoxin, *J. Nat. Prod.*, 73 (2010) 86–92

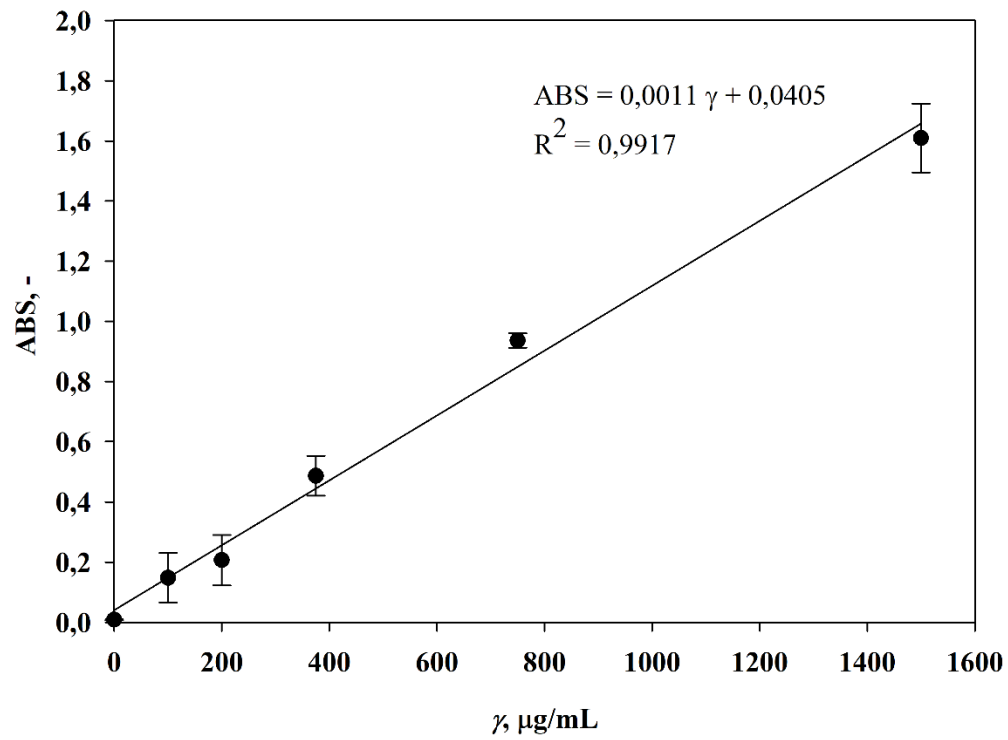
13. Çankaya, I.I.T., Devkota, H.P., Zengin, G., Šamec, D. Neuroprotective Potential of Biflavone Ginkgetin: A Review, *Life*, 13 (2023) 1-17
14. Shen, N., Liu, Y., Cui, Y., Xin, H. Large-scale targetedly isolation of biflavonoids with high purity from industrial waste *Ginkgo biloba* exocarp using two-dimensional chromatography coupled with macroporous adsorption resin enrichment, *Ind. Crops Prod.*, 175 (2022) 1-9
15. Jan, S., Abbas, N. *Chemistry of Himalayan Phytochemicals*, Elsevier, 2018, str. 125-126
16. Kamenjašević, M., Oršolić, N., Matković, A., Matković, B.R. Učinkovitost polifenolne prehrane na zdravlje i funkcionalnu sposobnost sportaša i rekreativaca, *Hrvat. Športskomed. Vjesn.*, 32 (2017) 5-21
17. Rasouli, H., Hosseini-Ghazvini, S., Khodarahmi, R. *Therapeutic Potentials of the Most Studied Flavonoids: Highlighting Antibacterial and Antidiabetic Functionalities*, Elsevier, 2019, str. 86-95
18. Fan, F., Sang, L., Jiang, M. Catechins and Their Therapeutic Benefits to Inflammatory Bowel Disease, *Molecules*, 22 (2017) 1-29
19. Kovač Tomas, M., Jurčević, I., Šamec, D. Tissue-Specific Profiling of Biflavonoids in *Ginkgo* (*Ginkgo biloba* L.), *Plants*, 12 (2023) 1-11
20. Mercader, A.G., Pomilio, A.B. *Biflavonoids: occurrence, structural features and bioactivity*, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2012, str. 1-2, 173-188
21. Liu, L., Wang, Y., Zhang, J., Wang, S. Advances in the chemical constituents and chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaf, extract, and phytopharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 193 (2021) 1-48
22. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (pristupljeno 18.6.2023.)
23. Klamt, A.J. Conductor-like Screening Model for Real Solvents: A New Approach to the Quantitative Calculation of Solvation Phenomena, *Phys. Chem.* 99 (1995) 2224–2235
24. URL: https://www.scm.com/doc/COSMO-RS/COSMO-RS_theory.html#cosmo-rs-combinatorial-term (pristupljeno: 19.6.2023.)
25. Panić, M., Radović, M., Cvjetko Bubalo, M., Radošević, K., Rogošić, M., Coutinho, J.A.P., Radojčić Redovniković, I., Jurinjak Tušek, A. Prediction of pH Value of Aqueous Acidic and Basic Deep Eutectic Solvent Using COSMO-RS σ Profiles' Molecular Descriptors, *Molecules* 27 (2022) 1-14

26. Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Ravent, R.M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent, *Meth. Enzymol.* 299 (1999) 152-178
27. Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, *Food Chem.*, 64 (1999) 555-559
28. European Pharmacopoeia (2004) 4th ed. Council of Europe, Strasbourg, 2377–2378
29. Ferreira, S.L.C, Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J.M., Brandão, G.C., da Silva, E.G.P., Portugal, L.A., dos Reis, P.S., Souza, A.S., dos Santos, W.N.L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods, *Anal. Chim. Acta*, 597 (2007) 179-186
30. Lone, S.H., Khuroo, M.A., Biflavanoids Chemical and Pharmacological Aspects, Elsevier, 2016, str. 10-21
31. Chaves, J.O., de Souza, M.C., da Silva, L.C., Lachos-Perez, D., Torres-Mayanga, P.C., Machado, A.P.D.F., Forster-Carneiro, T., Vázquez-Espinosa, M., González-de-Peredo, A.V., Barbero, G.F., Rostagno, M.A. Extraction of Flavonoids From Natural Sources Using Modern Techniques. *Front Chem.*, 8 (2020) 1-25
32. Friedman, M., Jurgens, H.S., Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds, *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 2101-2110
33. Librán, C.M., Mayor, L., Garcia-Castello, E.M., Vidal-Brotons, D., Polyphenol extraction from grape wastes: Solvent and pH effect, *Agric. Sci.*, 4 (2013) 56-62
34. Qi, X.L., Peng, X., Huang, Y.Y., Li, L., Wei, Z.F., Zu, Y.G., Fu, Y.J. Green and efficient extraction of bioactive flavonoids from *Equisetum palustre* L. by deep eutectic solvents-based negative pressure cavitation method combined with macroporous resin enrichment, *Ind. Crops Prod.*, 70 (2015) 142-148
35. Wang, L.T., Fan, X.H., Jian, Y., Dong, M.Z., Yang, Q., Meng, D., Fu, Y.J. A Sensitive and Selective Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry Method for Simultaneous Quantification of Flavonol Glycoside, Terpene Lactones, and Biflavonoids in *Ginkgo Biloba* Leaves, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 170 (2019) 335–340
36. Pandey, R., Chandra, P., Arya, K.R., Kumar, B., Development and Validation of an Ultra High Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Determination of Selected Flavonoids in *Ginkgo Biloba*, *J. Sep. Sci.*, 37 (2014), 3610–3618

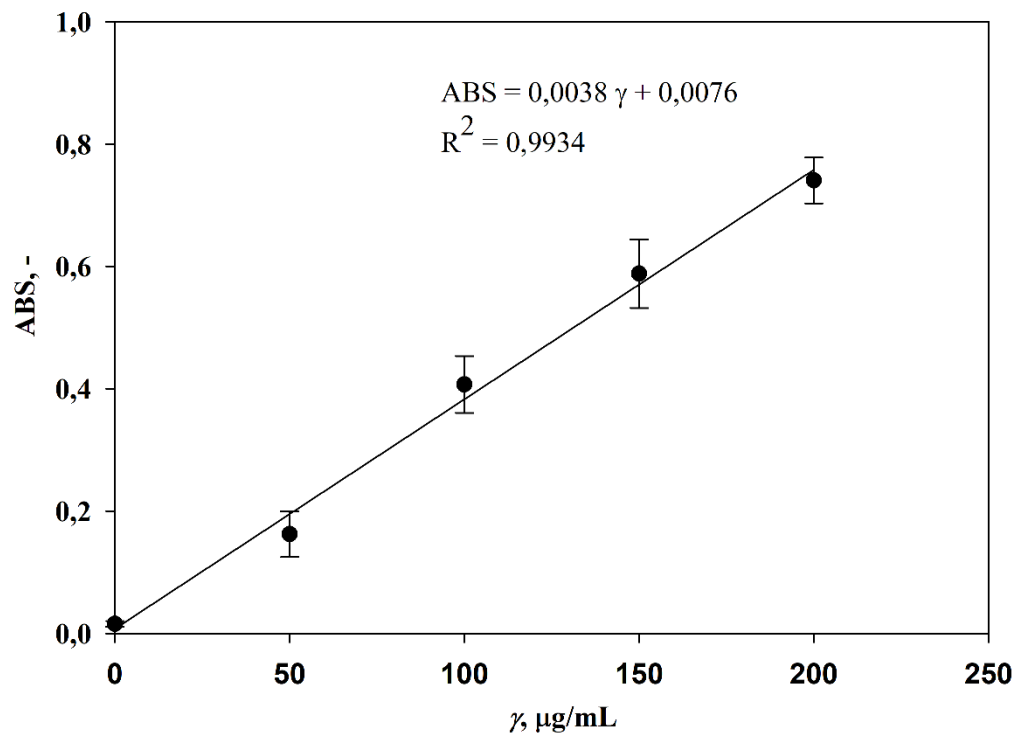
37. Concato, J., Hartigan, J.A. P values: from suggestion to superstition, *J. Invest. Med.*, 64 (2016) 1166-1171

7. PRILOZI

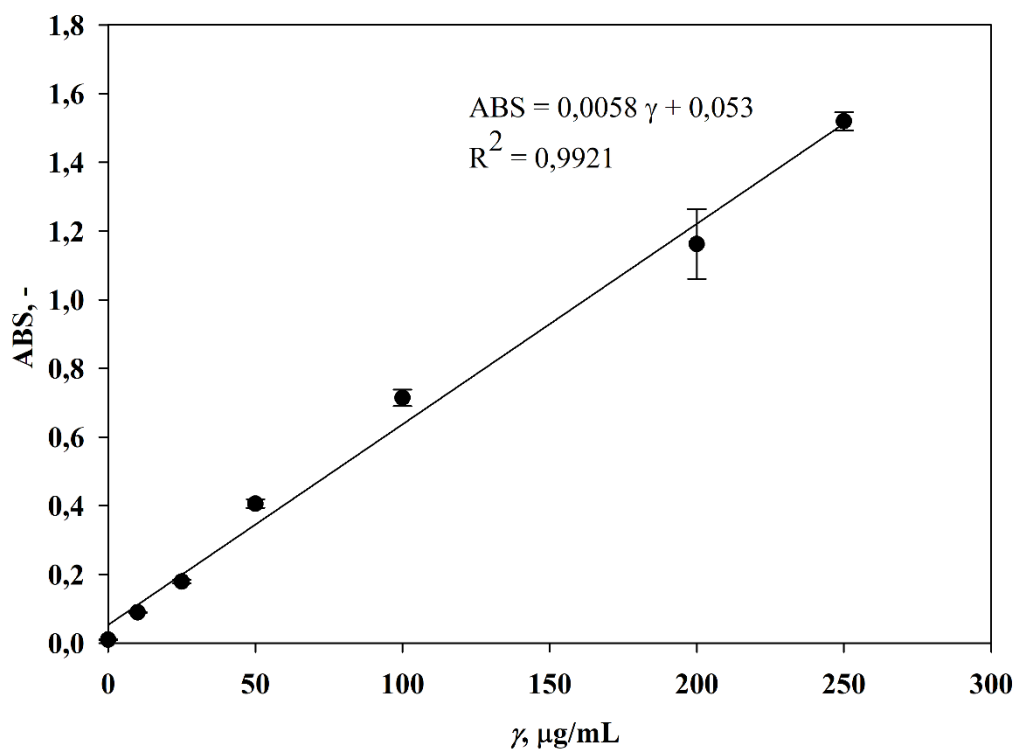
Prilog 1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije polifenola



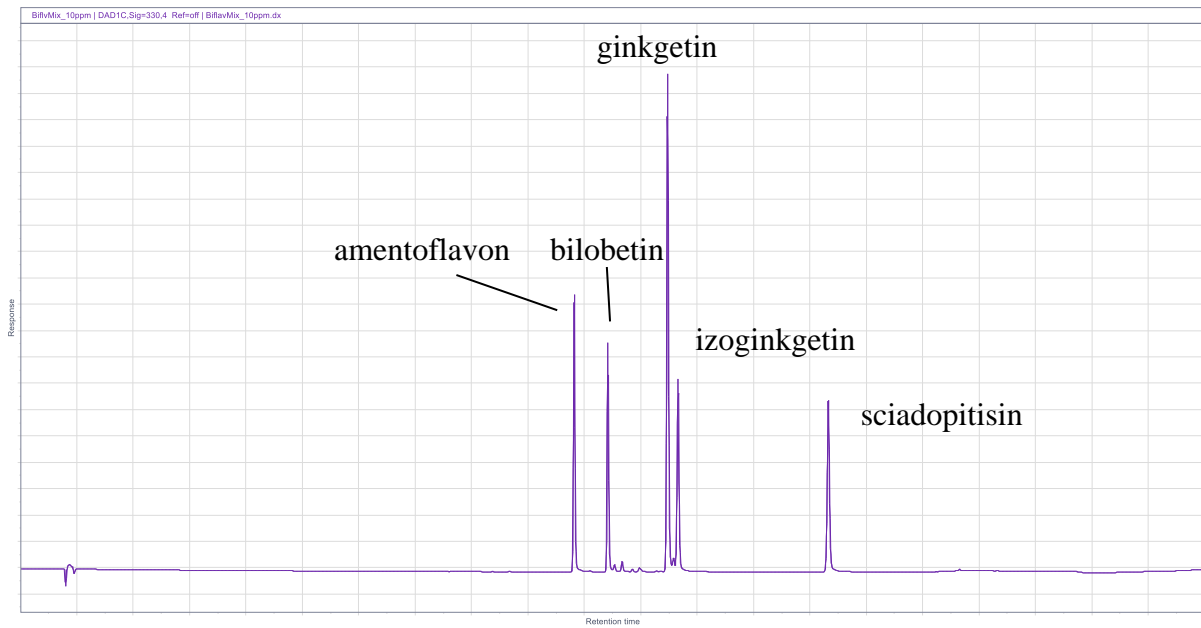
Prilog 2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije flavonoida



Prilog 3. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije fenolnih kiselina



Prilog 4. Kromatogram najzastupljenijih biflavonoida u lišću ginka



ŽIVOTOPIS

Matea Bajo [REDACTED] Osnovnoškolsko obrazovanje je stekla u Osnovnoj školi „Nova Bila“ nakon kojeg upisuje opću gimnaziju Katolički školski centar „Petar Barbarić“ u Travniku. Tijekom pohađanja osnovne i srednje škole sudjeluje na natjecanjima iz područja matematike, biologije i kemije te joj je po završetku i osnovne i srednje škole dodijeljena Posebna diploma o postignutim rezultatima za odličan uspjeh iz svih nastavnih predmeta i uzorno vladanje. Preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo na Sveučilištu u Zagrebu, Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije upisuje 2018. godine, a završava ga 2021. godine obranom završnog rada na temu Karakterizacija sirovog ekstrakta enzima *endo*-1,4-ksilanaza proizvedenog fermentacijom *Trametes versicolor* na čvrstim nosačima te je stekla titulu prvostupnice kemijskog inženjerstva uz pohvalu (*Cum Laude*). Iste godine upisuje diplomski studij Kemijsko inženjerstvo, modul Kemijske tehnologije i proizvodi te joj je dodijeljena Nagrada za najbolju studenticu prve godine diplomskog studija. Sudjelovala je na *XIV. susretu mladih kemijskih inženjera* i *28. hrvatskom susretu kemičara i kemijskih inženjera* s posterskim priopćenjem. Na drugoj godini preddiplomskog studija učlanjuje se u Studentsku sekciju Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa te četiri godine aktivno sudjeluje u organizaciji mnogih projekata koji promiču znanost od kojih valja istaknuti dugogodišnji projekt Boje inženjerstva koji je i vodila.