

Potpomognuta ekstrakcija biflavonoida iz listova Ginkgo biloba L.

Šepić, Lina

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:149:948912>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-11**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Lina Šepić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, 2024.

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

Kandidatkinja Lina Šepić

Predala je izrađen završni rad dana: 10. rujna 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

doc. dr. sc. Anita Šalić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Bruno Zelić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije

doc. dr. sc. Dunja Šamec, Sveučilište Sjever

prof. dr. sc. Domagoj Vrsaljko, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred
povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 13. rujna 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Lina Šepić

POTPOMOGNUTA EKSTRAKCIJA BIFLAVONOIDA IZ LISTOVA GINKA
(*Ginko biloba* L.)

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: doc. dr. sc. Anita Šalić

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. doc. dr. sc. Anita Šalić
2. prof. dr. sc. Bruno Zelić
3. doc. dr. sc. Dunja Šamec

Zagreb, rujan 2024.

SAŽETAK

Biljke proizvode strukturno raznovrsne specijalizirane metabolite, koji su se razvili u različitim biljnim vrstama i predstavljaju prilagodbu specifičnim ekološkim situacijama. Flavonoidni dimeri, poznatiji pod nazivom biflavonoidi, sastoje se od dva identična ili različita flavonoidna monomera. U odnosu na monomere, manje su istraženi i pokazuju različitu biološku aktivnost, a u zadnje vrijeme je prepoznat njihov farmakološki potencijal. Kako bi se biflavonoidi mogli koristiti kao antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno, ili antikarcinogeno sredstvo, potrebno ih je izolirati iz prirodnih izvora.

U ovom radu istražene su različite metode ekstrakcije biflavonoida iz listova ginka, uključujući konvencionalnu ekstrakciju sa 70% etanolom, te ekstrakciju sa 70% etanolom potpomognutu ultrazvukom, mehanički, enzimski (smjesa lignocelulitičkih enzima: celulaza, lakaza, ksilanaza) i kemijski. Morfološka analiza praha prije i nakon ekstrakcije provedena je pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM). Ukupan sadržaj polifenola, fenolnih kiselina i flavonoida određen je spektrofotometrijski u ekstraktima, a biflavonoidi su identificirani i kvantificirani HPLC-DAD analizom. Rezultati istraživanja biflavonoida ukazali su kako se unutar prvih 5 minuta ekstrakcija vidi značajna razlika između različitih metoda ekstrakcije. Svaka potpomognuta ekstrakcija rezultirala je povećanjem učinkovitosti ekstrakcije biflavonoida, pri čemu je korištenjem enzimске potpomognute ekstrakcije zabilježeno i 50% povećanje koncentracije biflavonoida u ekstraktima u odnosu na ekstrakciju provedenu samo sa 70% etanolom. Kada je ekstrakcija provedena u vremenu od 45 min, najbolji rezultati ekstrakcije biflavonoida dobiveni su korištenjem 70% etanola potpomognutog ultrazvukom i enzimom.

Ključne riječi: potpomognuta ekstrakcija, biflavonoidi, ginko

SUMMARY

Plants produce various specialized metabolites that have evolved in different species due to adaptation to specific ecological conditions. Flavonoid dimers or biflavonoids consist of two identical or different flavonoid monomers. These compounds are less researched than the monomers and have different biological activities, although their pharmacological potential has recently been increasingly recognized. In order for biflavonoids to be used as antibacterial, anti-inflammatory, antiallergic, antimutagenic, antiviral or anticarcinogenic agents, it is necessary to isolate them from natural sources.

In this study, different methods for the extraction of biflavonoids from ginkgo leaves were investigated, including conventional extraction in 70% ethanol, ultrasound-assisted (UAE + 70% ethanol), mechanically assisted (MAE + 70% ethanol), chemically assisted (CAE + 70% ethanol) and enzyme-assisted extraction (EAE + 70% ethanol) using a mixture of lignocellulolytic enzymes (cellulase, laccase, xylanase). Morphological analysis of the powder before and after extraction was performed using a scanning electron microscope (SEM). The total content of polyphenols, phenolic acids and flavonoids in the extracts was determined spectrophotometrically, while the biflavonoids were identified and quantified by HPLC-DAD analysis. The study showed significant differences in extraction efficiency within the first 5 minutes between the different methods. Assisted extraction techniques significantly increased the efficiency of biflavonoid extraction, with enzyme-assisted extraction yielding a 50% increase in biflavonoid concentration compared to extraction with 70% ethanol alone. The most effective results were obtained with the UAE + 70% ethanol and EAE + 70% ethanol methods when the extraction was performed for 45 minutes.

Key words: assisted extraction, biflavonoids, ginkgo

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1 Ginko.....	3
2.2 Flavonoidi	4
2.2.1 Biflavonoidi.....	6
2.3 Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz biljaka.....	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1 Materijali.....	11
3.1.1 Kemikalije	11
3.1.2 Aparatura.....	12
3.2 Metode	13
3.2.1 Mehanička obrada lišća.....	13
3.2.2 Priprema otopina	13
3.2.3 Ekstrakcija kruto-kapljevito	14
3.2.4 Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija.....	14
3.2.5 Mehanički potpomognuta ekstrakcija	15
3.2.6 Enzimski potpomognuta ekstrakcija	15
3.2.7 Kemijski potpomognuta ekstrakcija.....	16
3.2.8 Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije polifenola	16
3.2.9 Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije flavonoida.....	17
3.2.10 Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije fenolnih kiselina	17
3.2.11 HPLC-DAD analiza za određivanje koncentracije biflavonoida	18
3.2.12 Morfološka analiza uzoraka	19
3.2.13 Statistička obrada podataka.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1 Utjecaj različitih metoda ekstrakcija na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida, fenolnih kiselina i biflavonoida.....	20
4.2 Utjecaj trajanja procesa ekstrakcije sa 70% etanolom na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida, fenolnih kiselina i biflavonoida.....	23
4.3 Morfološka analiza uzoraka lišća ginka.....	30
5. ZAKLJUČAK	32
6. LITERATURA	33
7. PRILOZI	37

1. UVOD

Biljke su bogate različitim metabolitima koji sudjeluju u interakciji biljaka s okolinom, zaštititi biljke te ostalim fiziološkim procesima. Metabolite dijelimo na primarne te specijalizirane (često nazivani i sekundarni). Sekundarni metaboliti uključeni su u odgovor biljaka na stres te sudjeluju u prilagodbi na različite okolišne čimbenike. Zbog svoje specifične kemijske strukture pokazuju biološku aktivnost u samoj biljci, no mogu biti i korisni za ljudski organizam pa ih se zbog toga može pronaći u različitim pripravcima kozmetičke, prehrambene i medicinske industrije [1]. Kako bi takvi spojevi zadržali svoja korisna svojstva potrebno ih je što učinkovitije izolirati iz biljaka. U tu svrhu koriste se različite ekstrakcijske metode. Klasične metode ekstrakcije podrazumijevaju otapanje čvrste tvari u specifično prilagođenim organskim otapalima. Međutim, nedostaci takvog pristupa su dugotrajnost procesa, potreba za velikim količinama otapala visoke čistoće i niska selektivnost ekstrakcije [2]. Zbog ovih ograničenja, razvijaju se alternativne metode ekstrakcije [3]. Jedan od načina povećanja učinkovitosti ekstrakcije je i optimizacija provedbe procesa (temperatura, pH vrijednost i trajanje ekstrakcije) ali i dodavanje komponenti poput deterdženta, organskih otapala, različitih reagensa itd. Osim toga, učinkovitost ekstrakcije se može pospješiti i korištenjem ultrazvuka, mikrovalnog zračenja ili dodatnim mehaničkim usitnjavanjem uzoraka ali i upotrebom enzima ili kemijskih reagensa kao što su deterdženti [2, 3]. Često se navedene metode mogu i kombinirati kako bi se u što većoj mjeri izolirala ciljane bioaktivne tvari ili tvari. Pored same optimizacije procesa, sve veća pažnja se posvećuje ekološkoj prihvatljivosti ekstrakcijskih metoda pa je tako dodatni cilj razviti učinkovite ali zelene metode [3].

Jedna od biljaka najpoznatijih ljekovitih biljaka koja već desetljećima privlači pažnju znanstvenika je ginko (*Ginkgo biloba* L.). Iako se preparati na bazi ginka već stoljećima koriste u medicini azijskih kultura, a dostupni su i standardizirani ekstrakti koji se koriste u suvremenoj medicini [4], još uvijek se istražuju svi metaboliti u toj biljci. Jedna od brojnijih skupina specijaliziranih metabolita u ginku su flavonoidi. Flavonoidi, kao sekundarni metaboliti prisutni u ginku, povezani su s ljekovitim svojstvima ginka, te ih to čini predmetom brojnih istraživanja i primjena u različitim industrijama [5]. Smatra se da flavonoidi posjeduju antioksidativna, protuupalna i antikancerogena svojstva te mogućnost inhibicije pojedinih enzima povezanih s kognitivnim bolestima [2]. Jedna od podskupina flavonoida u ginku su biflavonoidi koji se sastoje od dvije monomerne jedinice flavonoida te posjeduju biološka svojstva koja ih čine korisnim molekulama za tretiranje neurodegenerativnih, metaboličkih bolesti te nekih vrsta karcinoma.

Uzevši u obzir važnost ovih spojeva, u ovom radu provedene su različite metode ekstrakcije biflavonida iz lišća ginka s ciljem povećanja učinkovitosti njihove ekstrakcije. Ispitana je klasična ekstrakcija sa 70% etanolom ali i ekstrakcija potpomognuta mehanički, ultrazvučno, kemijski i enzimski. Cilj korištenja svih dodatnih metoda je narušiti strukturu stanične stijenke biljaka te tako omogućiti učinkovitiju ekstrakciju biflavonoida organskim otapalima tj. etanolu u ovom istraživanju. Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcije temelji se na korištenju visokofrekventnih zvučnih valova za stvaranje mikromjehurića unutar otopine, što dovodi do kavitacije i narušavanja strukture stanične stijenke [6, 7]. Enzimski potpomognuta ekstrakcija uključuje upotrebu specifičnih enzima koji razgrađuju staničnu stijenku, omogućujući lakši pristup bioaktivnim spojevima [7, 8]. Mehanički potpomognuta ekstrakcija dodatno povećava površinu izloženosti, što poboljšava učinkovitost ekstrakcije [7, 9]. Kombinacija s kemijskim reagensima može dodatno poboljšati razgradnju staničnih struktura i olakšati izolaciju željenih komponenti [9]. Ukupan sadržaj polifenola, fenolnih kiselina i flavonoida određen je spektrofotometrijski u ekstraktima nakon ekstrakcije navedenim metodama, a biflavonoidi su identificirani i kvantificirani HPLC-DAD analizom. Dodatna analiza površine usitnjenog lišća ginka, prije i nakon ekstrakcije, učinjena je korištenjem skenirajućeg elektronskog mikroskopa pomoću kojeg je uočeno kako je svaka od korištenih metoda drugačije djelovala na površinu usitnjenog lišća ginka.

Rezultati ovog istraživanja doprinose razumijevanju kako kombinacija različitih metoda doprinosi procesu ekstrakcije, te kako pospješiti učinkovitost ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz ginka.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Ginko

Ginko (*Ginkgo biloba* L.) jedinstvena je vrsta drveta iz porodice Ginkgoaceae [10]. Poznata je i pod nadimkom „živi fosil“, a nadimak je zaslužio zbog svoje iznimne dugovječnosti i statusa kao najstarije poznate vrste golosjemenjača. Ovo drvo izvorno potječe iz Kine gdje se smatralo svetim te se mogao naći u vrtovima budističkih hramova, a kasnije je preneseno diljem svijeta [10, 11]. U Europu je prvi put stigao 1730. godine, kada je njemački botaničar Kaempfer donio sjeme iz Japana i posadio ga u Utrechtu, Nizozemska. Taj čin bio je početak širenja ginka po zapadnim zemljama. Oko pedeset godina kasnije, ginko je stigao i na područje Sjeverne Amerike, gdje je dodatno osigurao svoju prisutnost u globalnoj botanici [11]. Danas se stabla ginka mogu naći u parkovima širom svijeta.

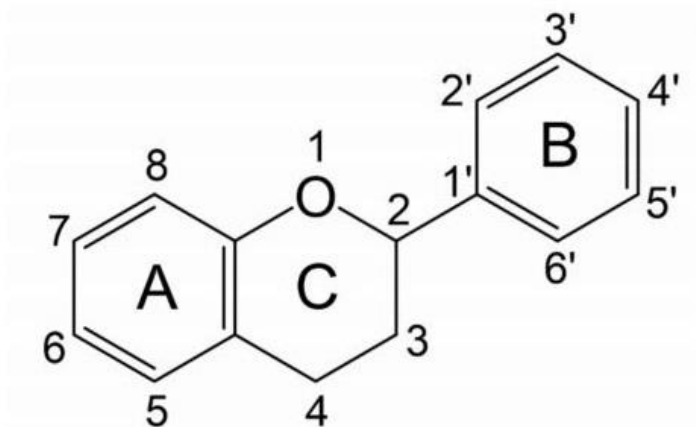
Ginko je poznat po svojoj otpornosti na ekstremne uvjete. Stablo ima visok prag tolerancije na različite stresove, uključujući onečišćenje i okolišne promjene, izrazito je prilagodljiv na urbane uvjete i čak opstaje pod utjecajima radioaktivnih zračenjima. Jedan od najznačajnijih dokaza njegove izdržljivosti je preživljavanje nekoliko stabala ginka u Hiroshimi nakon pada atomske bombe 1945. godine. Ta stabla, udaljena 1 do 2 kilometra od epicentra eksplozije, nastavila su rasti i danas su simbol nade i opstanka [5]. Za njegov opstanak donekle su zaslužni i ljudi koji su prepoznali njegove ljekovite sposobnosti te ga nastavili saditi i širiti.

Razni preparati na bazi ginka od davnina se koriste u kineskoj medicini i kulturi. Zapisi o njegovom korištenju sežu sve do 11. i 12. stoljeća gdje su se preparati pripremljeni od lišća i sjemenke koristili za tretiranje raznoraznih kožnih infekcija te ozbiljnijih zdravstvenih problema poput tegoba respiratornog sustava. U suvremenoj medicini poznat je ginko ekstrakt Egb761 koji se koristi za poboljšanje kognitivnih performansi od sredine sedamdesetih godina 20-og stoljeća, a priprema se od zelenih listova ginka [5]. Ginko je postao predmet interesa zbog antioksidativnih, protuupalnih i antikancerogenih svojstva. Sredinom prošlog stoljeća intenzivno je počelo istraživanje aktivnih tvari u ginku te načina na koje one djeluju, pa su tako otkrivene dvije najvažnije grupe spojeva tj. terpeniski laktoni, točnije ginkolidi i bilobalidi, te flavonoidni spojevi [12].

2.2 Flavonoidi

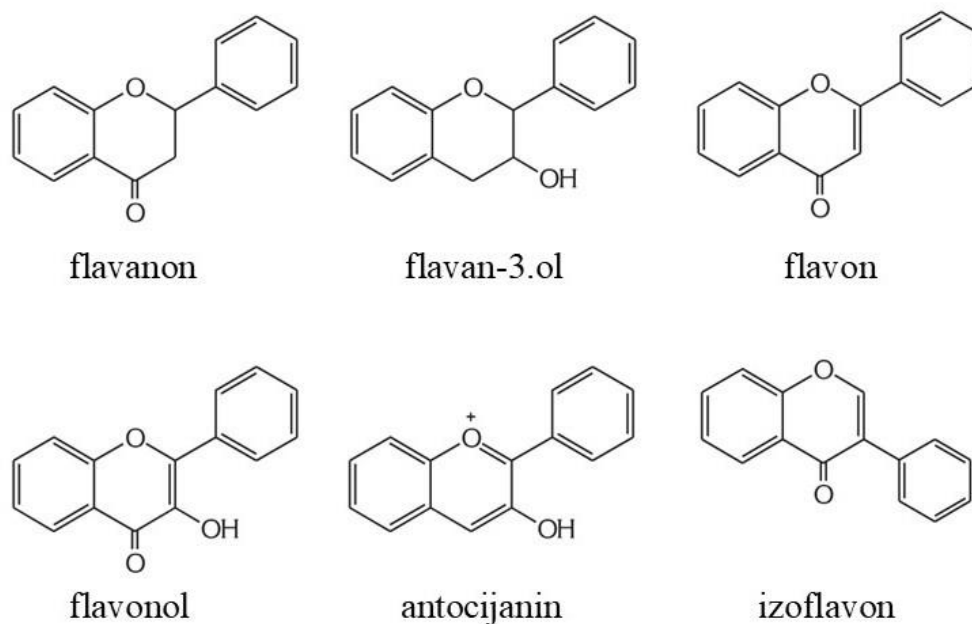
Flavonoidi su polifenolni spojevi koji se nalaze u svim biljkama, iako njihova količina i zastupljenost ovisi o biljnoj vrsti. Najbolje su istraživana skupina polifenola, a zabilježeno je čak 6000 različitih vrsta. Biljke bogate raznovrsnim flavonoidima poput kamilice, mente, maslina, kadulje, celera, peršina, ginka, crvene paprike itd. se široko primjenjuju u medicinskoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj, prehrambenoj industriji te u agrikulturne svrhe [13]. Flavonoidi pridonose okusu biljaka i posljedično hrane biljnog podrijetla, a i daju specifičnu boju pa su prepoznati i kao biljni pigmenti koji imaju i tehnološki potencijal [14]. U biljci, njihova uloga je zaštita biljaka od stresa, UV zračenja, bolesti, pružaju otpornost na isušivanje te na zamrzavanje tijekom hladnih perioda, djeluju kao stimulans prilikom prisustva mikroorganizama u biljkama te omogućavaju interakciju s okolišem funkcionirajući kao signalne molekule [5, 14, 15, 16].

Flavonoidi se sastoje od dva aromatska benzenska prstena kao i jednog heterocikličkog piranskog prstena koji sadrži jedan atom kisika. Kemijsku strukturu čine 15 ugljikovih atoma raspoređenih u prijašnje opisane formacije (Slika 1.) [13, 14].



Slika 1. Osnovna struktura flavonoida

Ovisno o strukturi, flavonoidi mogu biti podijeljeni u 6 podgrupa: flavone, flavonole, flavan-3-ole, flavanone, izoslavone i antocijanine. Grupe se razlikuju po rasporedu centralnog heterocikličkog piranskog prstena u samoj strukturi [17].



Slika 2. Kemijske strukture podgrupa flavonoida

Snažna antioksidativna svojstva navedenih spojeva prepisuju im se zbog njihovih sposobnosti da oslobode svoj vodikov atom te „uhvate“ slobodne radikale i na taj način prekidaju njihovu lančanu reakciju [18]. Zaustavljanjem slobodnih radikala štite stanične ćelije od oštećenja koja bi nastala ukoliko bi došlo do neravnoteže u biljkama. Uzimajući u obzir kako se većina antioksidansa danas dobiva sintetičkim putevima, biljke koje su bogate njima predstavljaju iznimno zanimljive izvore. Jedna od ključnih značajki je da spomenutim antioksidativnim djelovanjem pozitivno djeluju i kao preliminarni korak za suzbijanje karcinoma. Karcinom je bolest koja je određena mnogim značajkama, no poznato je kako prehrana bogata antioksidansima poboljšava suzbijanje njegovog pojavljivanja [14].

Inhibicija enzima je još jedno svojstvo koje flavonoidi posjeduju. Istraživanja su pokazala [16] da flavonoidi imaju ključnu ulogu prilikom interakcije enzima i receptora u mozgu. Time se i povlači poveznica između flavonoida i bolesti živčanog sustava poput Parkinsonove kao i bolesti koje utječu na kognitivne sposobnosti kao Alzheimerova bolest. Osim kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti, flavonoidi mogu imati značajne uloge u sprečavanju nastajanja karcinoma, dijabetesa te različitih upalnih procesa, no njihovi mehanizmi djelovanja još se uvijek istražuju.

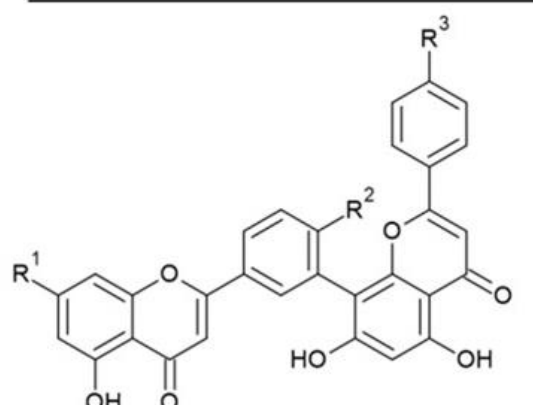
2.2.1 Biflavonoidi

Biflavonoidi su kompleksne organske molekule, dimeri sastavljeni od dva flavonoidna monomera povezani linearnom ili direktnom vezom [19, 20]. Identificirano je gotovo 600 različitih vrsta, a mogu se naći u različitom biljnom svijetu, uključujući paprat, golosjemenjače i kritosjemenjače [21]. Uloga ovih molekula još uvijek nije u potpunosti poznata, no s obzirom da pripadaju flavonoidima pretpostavlja se kako imaju zaštitnu ulogu u biljkama [19]. Visoke koncentracije biflavonoida često se nalaze u listovima, što dodatno sugerira na ulogu u obrani od okolišnih uvjeta i potencijalnih predatora [19, 21].

Istraživanja su pokazala da ukupna količina biflavonoida u lišću može varirati ovisno o dobu godine i stupnju razvoja biljke [22]. U radu Wang i sur. [22] ispitane su koncentracije biflavonoida u listovima ginka kroz seriju od šest uzoraka prikupljenih kroz period od dva mjeseca. Rezultati su pokazali kako je najveća koncentracija ukupnih biflavonoida pronađeno u listovima kasnijeg stupnja razvoja.

Kao što je već navedeno, flavonoidi su poznati po mnogim ljekovitim svojstvima. Kako su biflavonoidi u strukturi flavonoidni dimeri, ta svojstva se pripisuju i njima, odnosno i biflavonoidima je dokazana antioksidativna, antivirusna, antikancerogena, protuupalna svojstva, te mogućnost utjecaja na kognitivne bolesti te mnoge druge [5]. Zanimljivo je i spomenuti da biflavonoidi posjeduju i antivirusne sposobnosti odnosno prirodni biflavonoidi imaju mogućnost interakcije s DNA i RNA virusima na način da ih blokiraju pri ulasku u stanice. Time sprječavaju umnažanje i translaciju virusa što u konačnici štiti zdrave stanice od kontaminacije s potencijalnim virusnim česticama. Ovi rezultati sugeriraju da biflavonoidi mogu imati potencijalnu primjenu u razvoju novih terapija za virusne bolesti kao što su respiratorne virusne bolesti, virusne humane imunodeficijencije (engl. *Human immunodeficiency virus*, HIV), hepatitis B i C itd. [23]

Ginko je biljka koja je poznata po svojem bogatstvu raznovrsnim biflavonoidima, a istraživanja su otkrila čak 110 različitih vrsta flavonoida u njegovoj strukturi, od kojih je 13 biflavonoida. Među najčešćim biflavonoidima ističu se amentoflavon, bilobetin, ginkgetin, izoginkgetin i sciadopitisin [19]. Strukture najčešćih biflavonoida u ginku prikazane na Slici 3.

	R ¹	R ²	R ³
amentoflavon	OH	OH	OH
bilobetin	OH	OMe	OH
izoginkgetin	OH	OMe	OMe
ginkgetin	OMe	OMe	OH
sciadopitisin	OMe	OMe	OMe

Slika 3. Kemijska struktura pojedinih vrsta biflavonoida [21]

Amentoflavon je biflavonoid sastavljen od dva apigenina te šest hidroksilnih skupina koje se vrlo lako mogu zamijeniti s metoksil skupinom. Zbog toga se svi biflavonoidi mogu smatrati njegovim derivatima [5]. Nalazi se u raznim biljkama kao što su ginko i *Selaginella* sp.. Amentoflavon je poznat po svojoj antioksidativnoj i protuupalnoj aktivnosti. Također pokazuje potencijalne antivirusne, antikancerogene i neuroprotektivne učinke [24].

Bilobetin je još jedan značajan biflavonoid koji se nalazi prvenstveno u listovima ginka [5]. Ovaj spoj ima snažna antioksidativna svojstva čime pomaže u zaštiti stanica od oksidativnog stresa. Također ima protuupalne i neurozaštitne učinke, što ga čini vrijednim za sprječavanje neurodegenerativnih bolesti. Bilobetin ima veliki potencijala za korištenje u kozmetičkoj industriji, zato što inhibira lučenja žlijezda lojnica što je značajno kod tretmana protiv akni [25].

Ginkgetin se nalazi u raznim biljkama no prvenstveno je izoliran i identificiran iz listova ginka. Poznat je po svojim antioksidativnim, protuupalnim i antikancerogenim svojstvima. Uz to, pokazuje neurozaštitne učinke čineći ga korisnim u zaštiti mozga od oštećenja uzrokovanih oksidativnim stresom i upalama. Njegova sposobnost inhibicije enzima povezanih s upalom dodatno doprinosi njegovom terapijskoj vrijednosti [26].

Izoginkgetin ima slična svojstva kao i drugi biflavonoidi, uključujući antioksidativnu i protuupalnu aktivnost. Izoginkgetin je također predmet istraživanja zbog svojih potencijalnih neurozaštitnih učinaka [5]. Ovaj spoj može pomoći u zaštiti mozga od oksidativnog stresa i upala, što je ključno za očuvanje kognitivnih funkcija.

Sciadopitisin je biflavonoid koji se nalazi u ginku i nekim drugim biljkama. Posjeduje

antioksidativna svojstva, pomažući u neutralizaciji slobodnih radikala. U istraživanju gdje je promatrano kako biflavonoidi utječu na širenje COVID virusa, pokazalo se kako je sciadopitisin najbolji inhibitor ispitanog virusa [5].

Iako se preporuča unos prirodnih biflavonoida kroz prehranu, prekomjerna konzumacija potencijalno može imati toksičan utjecaj na organizam posebice na jetru i bubrege [11]. Bilobetin je jedan od spojeva koji može biti štetan za jetru ukoliko se u organizmu nađe u velikim koncentracijama [25]. Detaljna toksičnost spojeva nije istražena u potpunosti. Razlog tome leži u činjenici da su navedeni spojevi trenutno istraživani s fokusom na njihove pozitivne učinke. U budućnosti, kada se znanje o biflavonoidima proširi moguće je da će se više obraćati pozornost i na negativne utjecaje koje ove komponente mogu nanijeti na ljudski organizam.

2.3 Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz biljaka

Najvažniji korak u procesu izolacije bioaktivnih komponenti iz biljaka je ekstrakcija. Poboljšavanje samih postupaka i rezultata ekstrakcijskih metoda u interesu je mnogih industrija, jer može značajno utjecati na učinkovitost i ekonomičnost proizvodnje. Optimizacija ekstrakcije omogućava smanjenje vremena i korištenih sirovina, što direktno smanjuje troškove proizvodnje i povećava profitabilnost.

Uz ekonomske aspekte, sve veći fokus stavlja se na održivost i ekološku prihvatljivost ekstrakcijskih metoda. Kako raste globalna svijest o klimatskim promjenama, industrije su pod pritiskom da razvijaju procese koji su ne samo djelotvorni, već i ekološki održivi. To uključuje korištenje zelenih tehnologija, smanjenje upotrebe štetnih kemikalija i minimiziranje otpada. Cilj je postići balans između isplative i učinkovite proizvodnje uz obraćanje pažnje na očuvanje okoliša.

Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija (engl. *Ultrasound-assisted extraction*, UAE) glasi kao zelena alternativa konvencionalnim ekstrakcijama. Kako bi utjecaj ultrazvuka bio što učinkovitiji, uzorak se prvo suspendira u otapalu. Prolaskom ultrazvuka kroz medij dolazi do pojave ciklusa ekspanzije i kompresije odnosno stvaraju se kavitacijski mjehurići koji svojom implozijom mogu uzrokovati značajni mehanički utjecaj na površinu stanice [6]. Odnosno, djelovanjem mjehurića dolazi do pucanja stanične stijenke i oslobađanja ključnih komponenti koje se žele ekstrahirati iz uzorka. Za provedbu UAE koriste se ultrazvučne kupelji ili ultrazvučne sonde. Ultrazvučna kupelj omogućava ravnomjerno raspršivanje energije valova po cijeloj površini medija s obzirom na to da se valovi šire sa svih strana kupelji. S druge strane, sonda mora biti uronjena u uzorak kako bi se ultrazvučni val unio direktno u medij. Ovakav

pristup omogućava precizniju distribuciju ultrazvučne energije i smanjuje njene gubitke [24]. Primjenom UAE štedi se na vremenu, postupak se provodi pri manjim temperaturama čime se štedi energija, ekološki je prihvatljiva metoda jer se koriste manje količine otapala, a velika prednost je i jednostavnost izvedbe [28].

Enzimski potpomognuta ekstrakcija (engl. *Enzyme assisted extraction*, EAE) predstavlja naprednu i održivu tehnologiju koja omogućava učinkovito izdvajanje bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala [4]. Njena sposobnost da se provodi u blagim ekstrakcijskim uvjetima i s visokom specifičnošću, čini je idealnim izborom za industrije koje traže ekološki prihvatljive i ekonomski isplative metode ekstrakcije. Enzimi se navode kao idealni katalizatori ekstrakcijskih procesa zbog svojih sposobnosti da s velikom preciznošću ubrzavaju reakcije u blagim radnim uvjetima [8] tj. da specifičnim mehanizmima razgrađuju različite komponente staničnih stijenki. Najčešće korišteni enzimi uključuju celulaze, hemicelulaze i pektinaze, koje razgrađuju celulozu, hemicelulozu i pektine - glavne sastojke biljne stanične stijenke [29]. Ovakav pristup ekstrakcijama široko se primjenjuje kada je potrebno izdvojiti sekundarne biljne metabolite, pogotovo one s antioksidativnim svojstvima poput flavonoida [4]. Također se smatra ekološki prihvatljivom alternativom jer smanjuje potrebu za upotrebom agresivnih kemikalija i organskih otapala.

Mehanički potpomognuta ekstrakcija (engl. *Mechanical assisted extraction*, MAE) je jedna od inovativnih metoda koja se primjenjuje prilikom izoliranja bioaktivnih komponenti. Ova metoda se temelji na primjeni mehaničke energije na uzorak, što rezultira dodatnim usitnjavanjem, razbijanjem staničnih stijenki i potencijalnom promjenom kemijske strukture uzorka [9]. Tijekom MAE, mehanička energija se prenosi na uzorak putem raznih uređaja, kao što su homogenizatori i kuglični mlinovi. Ova energija stvara intenzivne sile rezanja i trenja, koje uzrokuju lomljenje staničnih struktura i oslobađanje intracelularnih komponenti u otapalo [9]. Ključni aspekt MAE je njegova sposobnost da učinkovito razbije stanične stijenke. Mehanički udarci razbijaju stanične barijere, omogućujući lakši pristup otapala unutarnjim bioaktivnim komponentama. MAE također dovodi do finog usitnjavanja uzorka, što povećava površinu izloženu otapalu. Povećana površina kontakta između otapala i uzorka omogućuje bržu i učinkovitiju ekstrakciju ciljanih komponenti. Velika prednost ovakve metode je što ne zahtijeva nikakve dodatne kemikalije niti specifičnu temperaturu s čime se štedi na energiji i materijalima.

Kemijski potpomognuta ekstrakcija (engl. *Chemical assisted extraction*, CAE) podrazumijeva tretman uzorka s kemijskim reagensima ili otapalima poput deterdženta Triton X, blagog deterdženta koji se često koristi za otapanje bioloških materijala, izolaciju proteina i

analizu staničnih membrana, te natrijev hipoklorit, NaClO. Upotreba dodatnih kemikalija omogućava poboljšanu izolaciju specifičnih komponenti iz uzorka. Ovisno o zahtjevima ekstrakcije, odabrane kemikalije se mogu prilagoditi kako bi se optimizirala selektivnost i učinkovitost ekstrakcije određenih komponenti [7, 30, 31].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

S obzirom na značajan farmakološki potencijal povezan s biflavonoidima i dostupnost lišća ginka kao isplativog izvora ovih spojeva, cilj ovog rada je usporediti različite ekstrakcije metode, uključujući ekstrakciju sa 70% etanolom, te ekstrakciju sa 70% etanolom potpomognutu enzimski, ultrazvučno, mehanički te kemijski u svrhu izolacije biflavonoida iz lišća ginka. Korištenjem HPLC-DAD metode, u dobivenim ekstraktima su potvrđeni najzastupljeniji biflavonoidi tj. amentoflavon, ginkgetin, izoginkgetin, bilobetin i sciadopitisin te su određene njihove koncentracije. Nadalje, provedena je i morfološka analiza skenirajućim elektronskim mikroskopom praha listova ginka prije i nakon svake pojedine ekstrakcije. Razvijene ekstrakcije ispitane su na uzorcima ginka koji su ručno prikupljeni u Dugom Selu.

3.1 Materijali

3.1.1 Kemikalije

Za provedbu eksperimenta korištene su sljedeće kemikalije:

- Acetonitril, VWR Chemicals BDH, Francuska
- Aluminijev klorid, Kemika, Hrvatska
- Dimetil sulfoksid (DMSO), Gram mol, Hrvatska
- Etanol, Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
- Folin-Ciocalteuov reagens, Fluka, SAD
- Galna kiselina, Acros Organics, SAD
- Katehin, Fluka, SAD
- Kava kiselina, Fluka, SAD
- Klorovodična kiselina, VWR-Chemicals, Njemačka
- Mravlja kiselina, Kemika, Hrvatska
- Natrij hipoklorit, Kemika, Hrvatska
- Natrijev acetat, Kemika, Hrvatska
- Natrijev hidroksid, Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
- Natrijev karbonat, Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
- Natrijev molibdat dihidrat, CARLO ERBA Reagents, Njemačka
- Natrijev nitrit, Laphoma, Jugoslavija

- Octena kiselina, Gram-mol, Hrvatska
- Standardna otopina za amentoflavon (CAS 1617-53-4), Phytolab, Njemačka
- Standardna otopina za bilobetin (CAS 521-32-4), Phytolab, Njemačka
- Standardna otopina za ginkgetin (CAS 481-46-9), Phytolab, Njemačka
- Standardna otopina za izoginkgetin (CAS 548-19-6), Phytolab, Njemačka
- Standardna otopina za sciadopitisin (CAS 521-34-6), Phytolab, Njemačka
- Triton X, Fluka, SAD
- Viscozyme, Novozymes, Danska

Uzorak ginka prikupljen je u Dugom Selu, 14. lipnja 2023.

Kemikalije korištene u ovom radu su analitičke čistoće te su primjerene za provođenje HPLC analiza. Voda korištena za pripremu potrebnih otopina bila je ultračista.

3.1.2 Aparatura

U eksperimentima je korištena sljedeća oprema:

- Centrifuga, Universal 320 R, Hettich, SAD
- 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
- Mlina za usitnjavanje, IKA-Werke M20, Njemačka
- pH-metar Lab 860, Schott Instruments, Njemačka
- Spektrofotometar, Shimadzu, UV-1800, Japan
- Ultrazvuk, SONOPLUS HD 3100, horn type SH 70 G, 20 kHz, Bandelin GmbH, 62% amplituda
- Ultrazvučna kupelj, Bandelin DT 103 H, Njemačka
- Skenirajući elektronski mikroskop, Tescan Vega 3 SEM, Tescan Brno S.R.O., Češka

3.2 Metode

3.2.1 Mehanička obrada lišća

Kako bi se uzorak listova ginka pripremio za provedbu eksperimenta bilo je potrebno mehanički obraditi prikupljene listove. Prikupljeni listovi prvo su sušeni kroz dva tjedna na zraku na sobnoj temperaturi ($T = 22 - 25 \text{ }^\circ\text{C}$) do konstantne mase. Nakon sušenja uzorci su usitnjeni u mlinu za usitnjavanje ($t = 10 \text{ min}$) te u tarioniku te kako bi se dobile što sitnije čestice. Dobiveni uzorak pohranjen je na suho i tamno mjesto do korištenja.

3.2.2 Priprema otopina

- **Arnowljev reagens**

Za pripremu Arnowljeva reagensa potrebno je otopiti 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.

- **Zasićena otopina natrijevog karbonata**

Zasićena otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3) priprema se otapanjem 50 g Na_2CO_3 u 200 mL ultračiste vode. Otopina se potom zagrijava do vrenja ($T = 100 \text{ }^\circ\text{C}$) nakon čega se dodaje nekoliko kristalića Na_2CO_3 . Otopina se zatim hladi sljedeća 24 h na $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, profiltrira i nadopuni ultračistom vodom do 250 mL.

- **Otopina 0,1 mol/L acetatnog pufera pH 4**

Za pripremu 200 mL 0,1 mol/L acetatnog pufera pH 4 potrebno je u odmjerenoj tikvici od 200 mL dodati 160 mL ultračiste vode. Potom se u tikvicu dodaje 372,187 mg natrijevog acetata ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) te 928,5 mg octene kiseline (CH_3COOH). Željena pH vrijednost od 4 postignuta je dodavanjem HCl-a ili NaOH. Nakon što je postignuta željena pH vrijednost, tikvice se nadopuni ultračistom vodom do 200 mL.

- **0,1% otopina Triton X**

Kako bi se dobila 0,1% otopina Triton X potrebno je u tikvici od 100 mL dodati 100 μL zasićene otopine Triton X te nadopuniti ultračistom vodom do željenog volumena od 100 mL.

- **10% otopina natrijeva hipoklorita**

U tikvici volumena od 100 mL potrebno je pomiješati 10 mL otopine natrijeva hipoklorita (NaClO) s 90 mL ultračiste vode.

3.2.3 Ekstrakcija kruto-kapljevito

Ekstrakcija kruto-kapljevito (engl. *Solid – liquid extraction*, SLE) provodi se kako bi se iz lišća ginka izolirali specijalizirani metaboliti. U *Eppendorf* tubice potrebno je odvagati 60 mg prethodno usitnjenog uzorka lišća ginka i dodati 2 mL 70% etanola. Nakon toga sadržaj se kratko homogenizira na homogenizatoru kako bi se sav uzorak resuspendirao u otapalu. Uzorak se potom stavlja u ultrazvučnu kupelj ($t = 8$ min, $T = 20$ °C), a nakon toga u inkubacijsku tresilicu na 450 rpm u vremenu od 5 do 45 min i $T = 25$ °C, ovisno o eksperimentu. Nakon provedene ekstrakcije, sadržaj se centrifugira 5 min na 14000 rpm/min pri sobnoj temperaturi ($T = 25$ °C). Dobiveni talog se odvoji za potrebe morfološke analiza, a ekstrakt se filtrira (nesterilni hidrofobni PTFE filtar za šprice, Chromafil Xtra RC-20/25 0,45 μ m, Macherey-Nagel, Njemačka) i čuva u hladnjaku do daljnje analize tj. do određivanja koncentracije specijaliziranih metabolita: ukupnih polifenola, flavonoida, fenolnih kiselina i pojedinačnih biflavonoida.

3.2.4 Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija

Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija specijaliziranih metabolite iz skupine polifenola provodi se tako što se u *Eppendorf* tubice odvaže 60 mg usitnjenog uzorka lišća ginka i pomiješa s 0,6 mL ultračiste vode. Tubica se potom stavi na led, a sadržaj tretira ultrazvukom (20 kHz, amplituda od 62%) 20 minuta. Nakon tretmana u uzorak se dodaje 1,4 mL 100% etanola kako bi se u konačnom uzorku dobila otopina 70% etanola. Sadržaj se potom homogenizira uz pomoć homogenizatora, a ostatak postupka isti je kako je to opisano u poglavlju 3.2.3..

3.2.5 Mehanički potpomognuta ekstrakcija

Mehanički potpomognuta ekstrakcija specijaliziranih metabolita iz skupine polifenola provodi se tako što se u u *Eppendorf* tubice odvaže 60 mg usitnjenog uzorka lišća ginka i pomiješa s 0,6 mL ultračiste vode. U uzorak se doda 120 mg staklenih kuglica promjera 4 mm. Sadržaj se potom homogenizira na maksimalnom broju okretaja (600 rpm, $t = 20$ min). Nakon tretmana u uzorak se dodaje 1,4 mL 100% etanola kako bi se u konačnom uzorku dobila otopina 70% etanola. Sadržaj se potom homogenizira uz pomoć homogenizatora, a ostatak postupka isti je kako je to opisano u poglavlju 3.2.3..

3.2.6 Enzimski potpomognuta ekstrakcija

Enzimski potpomognuta ekstrakcija specijaliziranih metabolita iz skupine polifenola provodi se tako što se u u *Eppendorf* tubice odvaže 60 mg usitnjenog uzorka lišća ginka i pomiješa s 0,6 mL 0,1 mol/L acetatnog pufera pH 4 s 6% (v/v) enzima (*Viscozyme L*, smjesa betaglukanaze, pektinaze, hemicelulaze i ksilanaze deklarirane aktivnost ≥ 100 FBGU/g). Nakon toga se sadržaj kratko homogenizira pomoću homogenizatora te se uzorak podvrgne enzimskoj razgradnji kroz 4 ili 24 h ovisno o eksperimentu, pri sobnoj temperaturi ($T = 25$ °C) i 200 rpm. Nakon isteka vremena, uzorak se 3 min kuha na $T = 90$ °C kako bi se enzimi deaktivirali nakon čega se brzo hladi u ledenoj kupelji. Nakon tretmana u uzorak se dodaje 1,4 mL 100% etanola kako bi se u konačnom uzorku dobila otopina 70% etanola. Sadržaj se potom homogenizira uz pomoć homogenizatora, a ostatak postupka isti je kako je to opisano u poglavlju 3.2.3.

Isti postupak ponavlja se s uzorkom u koji nije dodan enzim (slijepa proba) te s uzorkom u koji je dodan enzim ali bez denaturacije enzima kuhanjem na $T = 90$ °C kako bi se izbjegla deaktivacija bioaktivnih komponenti.

3.2.7 Kemijski potpomognuta ekstrakcija

Kemijski potpomognuta ekstrakcija specijaliziranih metabolita iz skupine polifenola provodi se tako što se u u *Eppendorf* tubice odvaže 60 mg usitnjenog uzorka lišća ginka i pomiješa s 2 mL 0,1% otopine TritonX i 10% otopine NaClO. Uzorak se inkubira 48h na sobnoj temperaturi ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) pri 200 rpm. Nakon tretmana u uzorak se dodaje 1,4 mL 100% etanola kako bi se u konačnom uzorku dobila otopina 70% etanola. Sadržaj se potom homogenizira uz pomoć homogenizatora, a ostatak postupka isti je kako je to opisano u poglavlju 3.2.3..

3.2.8 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. Metoda se temelji na redukciji fosfomolibdatnog-fosfovolframatnog kompleksa pomoću fenola u plave reakcijske produkte koji imaju maksimum apsorbancije pri $\lambda = 765\text{ nm}$ [32].

Spektrofotometrijska metoda provodi se 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 (70 % etanol) 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 $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 2 h. Tijekom provedbe ovog eksperimenta poželjno je održavati izotermne uvjete jer temperatura ima utjecaj na razvoj boje [32]. Nakon 2 h u uzorcima je izmjerena apsorbancija pri $\lambda = 765\text{ nm}$

Za izradu baždarnog pravca, pripremljena je otopina galne kiseline koncentracije 2 mg/mL u 70% etanolu. 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 ($\mu\text{g}_{\text{GAE}}/\text{mg ST}$).

3.2.9 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 [33].

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.

U plastične kivete od 2 mL otpipetirano je 400 μL ultračiste vode, 100 μL ekstrakta ili standarda (razrjeđenje temeljne otopine katehina za baždarni pravac) ili otapala (70% etanol) te 30 μL otopine NaNO_2 . Sadržaj u kivetama se homogenizira pomoću homogenizira te se 5 min nakon toga u smjesu doda 30 μL otopine AlCl_3 . Nakon 6 min u smjesu se doda 200 μL otopine NaOH za zaustavljanje reakcije i 240 μL ultračiste vode. Kivete se dobro promiješaju te se mjeri apsorbancija uzoraka na $\lambda = 510$ nm.

Za izradu baždarnog pravca, pripremljena je otopina katehina koncentracije 1 mg/mL u 70% etanolu. Budući da se katehin sporo otapa, odmjerna 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 apsorbancije pripremljenih razrjeđenja, izrađen je baždarni dijagram (Prilog 2) za linearno područje ovisnosti apsorbancije 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 ($\mu\text{g}_{\text{CE}}/\text{mg ST}$).

3.2.10 Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije fenolnih kiselina

Koncentracija ukupnih fenolnih kiselina određena je spektrofotometrijskom metodom razvijenom i opisanom u Polish Phaarmacopeia [34].

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 (70 % etanol), 100 μL otopine HCl (0,5 mol/L) i 100 μL Arnowljevog reagensa. Kivete je potrebno dobro promiješati pomoću homogenizatora te dodati 100 μL otopine 1 mol/L NaOH i 100 μL 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 75% metanolu. Tako dobivena temeljna otopina razrjeđivana je na potrebne 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 ($\mu\text{g}_{\text{CAE}}/\text{mg ST}$).

3.2.11 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 $150 \times 4,6, 3,5 \mu\text{m}$ na $30 \text{ }^\circ\text{C}$. 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 μL 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 baždarne pravce standarada koji su korišteni za identifikaciju i kvantifikaciju. Standardne otopine pet biflavonoida koncentracije 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pripremljene su pojedinačno u DMSO. Odgovarajuća količina svake standardne osnovne otopine razrijeđena je sa 70% etanola 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 (Prilog 4). Standardne otopine, zajedno s radnim otopinama, skladištene su u mraku na $T = -20 \text{ }^\circ\text{C}$ do upotrebe. Kromatogram dobiven pomoću standardnih otopina nalazi se u Prilogu 5.

3.2.12 Morfološka analiza uzoraka

Kako bi se usporedila morfologija uzoraka prije i nakon svakog postupka korišten je skenirajući elektronski mikroskop (SEM). Prije samog snimanja, uzorci su uronjeni u argon plazmu s zlatnim/platininskim konduktivnim premazom u vremenu od 1 min. Uz SEM korišten je sekundarni detektor elektrona (SE) uz napon od 10 kV.

3.2.13 Statistička obrada podataka

Svaka ekstrakcija provedena je tri puta kako bi se smanjio utjecaj heterogenosti uzorka. Rezultati su prikazani aritmetičkom vrijednosti podataka sa odstupanjima \pm standardne devijacije. Statistička analiza podataka provedena je u Excelu pomoću XLSTAT dodatka, verzija 2024.1.

4. REZULTATI I RASPRAVA

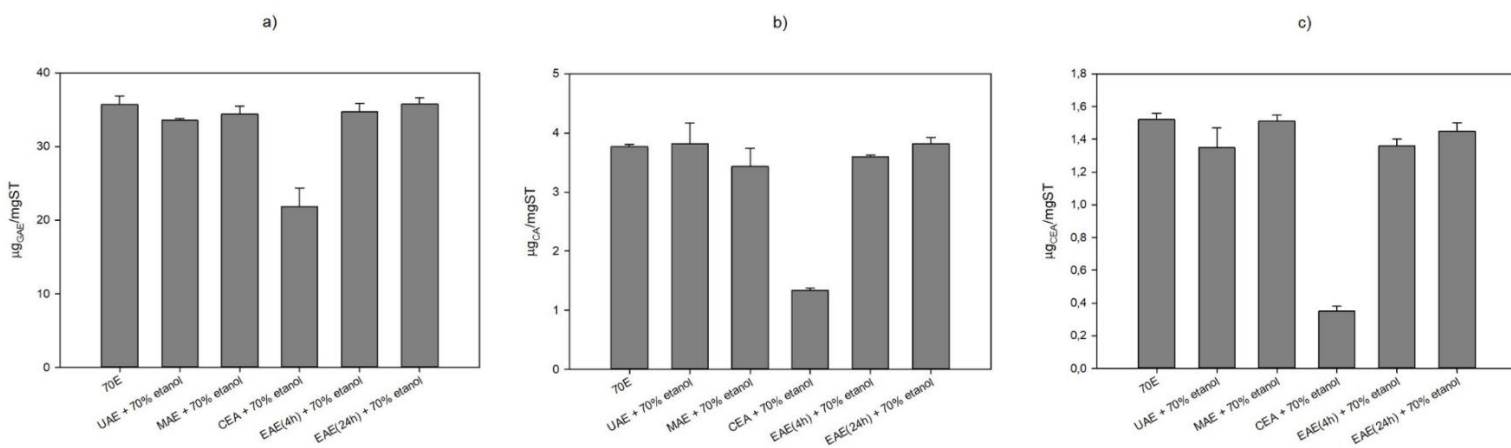
Cilj ovog rada je usporediti različite ekstrakcije metode, uključujući ekstrakciju sa 70% etanolom, i ekstrakciju sa 70% etanolom potpomognutu enzimski, mehanički, ultrazvučno i kemijski u svrhu izolacije biflavonoida iz lišća ginka. Korištenjem HPLC-DAD metode, u dobivenim ekstraktima su potvrđeni najzastupljeniji biflavonoidi tj. amentoflavon, ginkgetin, izoginkgetin, bilobetin i sciadopitisin te su određene njihove koncentracije. Istražen je utjecaj trajanja procesa ekstrakcije (5, 10, 20, 30 i 45 min) na učinkovitost ekstrakcije ciljanih komponenti iz lišća ginka. Nadalje, provedena je i morfološka analiza skenirajućim elektronskim mikroskopom praha listova ginka prije i nakon svake pojedine ekstrakcije. Razvijene ekstrakcije ispitane su na uzorcima ginka koji su ručno prikupljeni u Dugom Selu.

4.1 Utjecaj različitih metoda ekstrakcija na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida, fenolnih kiselina i biflavonoida

Posljednjih godina tradicionalne metode ekstrakcije koje najčešće uključuju organska otapala, doživjele su značajne promjene, otvarajući put modernim tehnikama koje su pažljivo osmišljene kako bi se smanjila ovisnost o organskim otapalima te općenito unaprijedili procesi ekstrakcije. Dva glavna pokretača ovih promjena su povećanje učinkovitosti i promicanje ekološke održivosti. U ovom radu uspoređene su različite metode ekstrakcije: ekstrakcija sa 70% etanolom, i ekstrakcija sa 70% etanolom potpomognuta enzimski, mehanički, ultrazvučno i kemijski. Prije samog istraživanja pretpostavljeno je kako će svaka potpomognuta metoda rezultirati boljom učinkovitošću ekstrakcije u odnosu na tradicionalnu ekstrakciju samo sa 70% etanolom. Rezultati dobiveni nakon provedbe eksperimenata prikazani su u Tablici 1. te na Slikama 4. i 5.

Tablica 1. Usporedba primjene različitih ekstrakcijskih metoda na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida, fenolnih kiselina i biflavonoida

Ekstrakcijska metoda	Ukupni polifenoli ($\mu\text{g}_{\text{GAE}}/\text{mg}_{\text{ST}}$)	Ukupni flavonoidi ($\mu\text{g}_{\text{CE}}/\text{mg}_{\text{ST}}$)	Ukupne fenolne kiseline ($\mu\text{g}_{\text{CAE}}/\text{mg}_{\text{ST}}$)	Ukupni sadržaj biflavonoida ($\mu\text{g}/\text{g}_{\text{ST}}$)
<i>70% etanol</i>	35,69 ± 1,20	3,77 ± 0,04	1,52 ± 0,04	3169,32 ± 64,22
<i>UAE + 70% etanol</i>	33,56 ± 0,24	3,82 ± 0,35	1,35 ± 0,12	3322,55 ± 47,49
<i>MAE + 70% etanol</i>	34,42 ± 1,06	3,43 ± 0,31	1,51 ± 0,04	3242,13 ± 16,61
<i>CAE + 70% etanol</i>	21,87 ± 2,48	1,34 ± 0,03	0,35 ± 0,03	2305,34 ± 38,44
<i>EAE+ 70% etanol (4h)</i>	34,74 ± 1,14	3,60 ± 0,03	1,36 ± 0,04	3356,52 ± 46,33
<i>EAE + 70% etanol (24h)</i>	35,78 ± 0,82	3,82 ± 0,10	1,45 ± 0,05	3264,67 ± 49,71

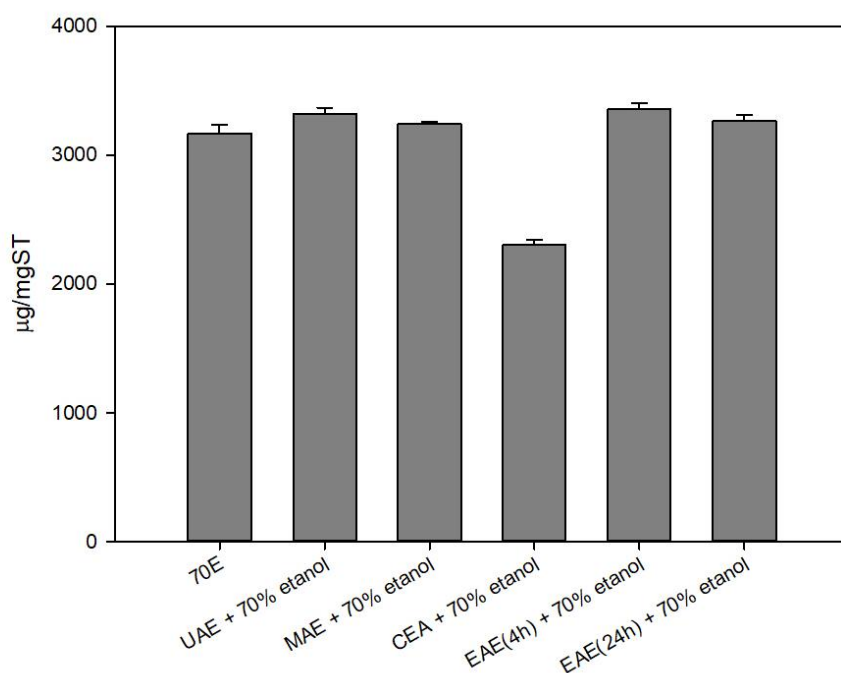


Slika 4. Usporedba primjene različitih ekstrakcijskih metoda na sadržaj a) ukupnih polifenola, b) flavonoida i c) fenolnih kiselina

Kao što je vidljivo, korištenjem potpomognutih metoda, izuzev CAE + 70% etanola, dobivene su usporedive količine ukupnih polifenola i flavonoida, koje su bile znatno veće nego kod CAE + 70% etanol. Ekstrakti dobiveni s CAE + 70% etanol pokazali su značajno niži sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u usporedbi s onima iz SLE sa 70% etanolom te UAE + 70%

etanol i MAE + 70% etanol, što ukazuje na veću učinkovitost spomenutih metoda. Prilikom ekstrakcije polifenola dobivene koncentracije su čak do 39% niže od onih dobivenih klasičnom ekstrakcijom. Isti učinak uočen je i za flavonoide gdje je koncentracija za 65% niža, te za fenolne kiseline gdje je dobivena koncentracija bila čak 77% niža. Analizom biflavonida također je uočeno smanjenje koncentracije. Mogući razlog dobivenih rezultata je vjerojatno dugotrajno (48 h) izlaganje NaClO i TritonX koji su negativno djelovali na ciljane bioaktivne komponente (Slika 5.). Zbog svega navedeno, CAE + 70% etanol je isključena iz daljnjeg istraživanja.

U slučaju ekstrakcije flavonoida, povećanje koncentracija uočeno je za UAE + 70% etanol i EAE + 70% etanol (24h). Obje metode rezultirale su jednako većim koncentracijama flavonoida i to za 1,33%. Za EAE + 70 % etanol u ovom istraživanju korištena je mješavina beta-glukanaze, pektinaze, hemicelulaze i ksilanaze. Iako su ovi enzimi korišteni kako bi se povećala učinkovitost ekstrakcije, rezultati su pokazali da nisu ekstrahirane veće količine ukupnih polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina u odnosu na ekstrakciju sa 70% etanolom. Dobiveni rezultati razlikuju se od rezultata koje su u istraživanju prikazali Chen i sur. [35]. Spomenuti autori su korištenjem enzima, pektinaza i celulaza, znatno poboljšali ekstrakciju flavonoida iz listova ginka. S obzirom na minimalne razlike između EAE + 70% etanol u trajanju od 4 h i 24 h, metoda u trajanju od 24 h također je isključena iz daljnjeg istraživanja.

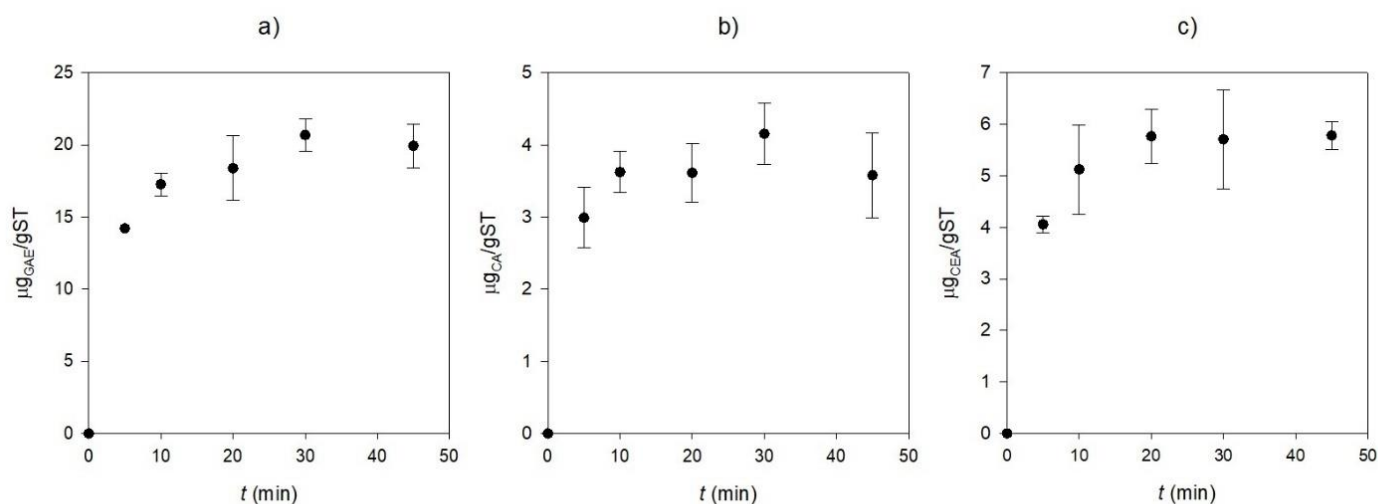


Slika 5 . Usporedba primjene različitih metoda ekstrakcije na ekstrakciju ukupnih biflavonoida

4.2 Utjecaj trajanja procesa ekstrakcije sa 70% etanolom na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida, fenolnih kiselina i biflavonoida

U drugom dijelu istraživanja ispitan je utjecaj vremena trajanja ekstrakcije na sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida, fenolnih kiselina i biflavonoida. Ekstrakcija je provedena 45 min, a uzorci su uzimani u različitim vremenskim intervalima (5, 10, 20, 30 i 45 min). Vrijeme se mjerilo od trenutka kada je etanol dodan u epruvete sa suhim uzorkom ginka. Dobiveni rezultati prikazani su na Slikama 6. do 9. te u Tablicama 2. do 3.

Na Slici 6. prikaza je dinamička promjena koncentracije ukupnih polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina tijekom ekstrakcije sa 70% etanolom. Kao što se može uočiti, povećanjem vremena, povećava se i udio pojedinih bioaktivnih komponenti u uzorku, a maksimalna koncentracija doseže se negdje oko 30 min.



Slika 6 . Dinamička promjena koncentracije a) ukupnih polifenola, b) flavonoida i c) fenolnih kiselina u vremenu

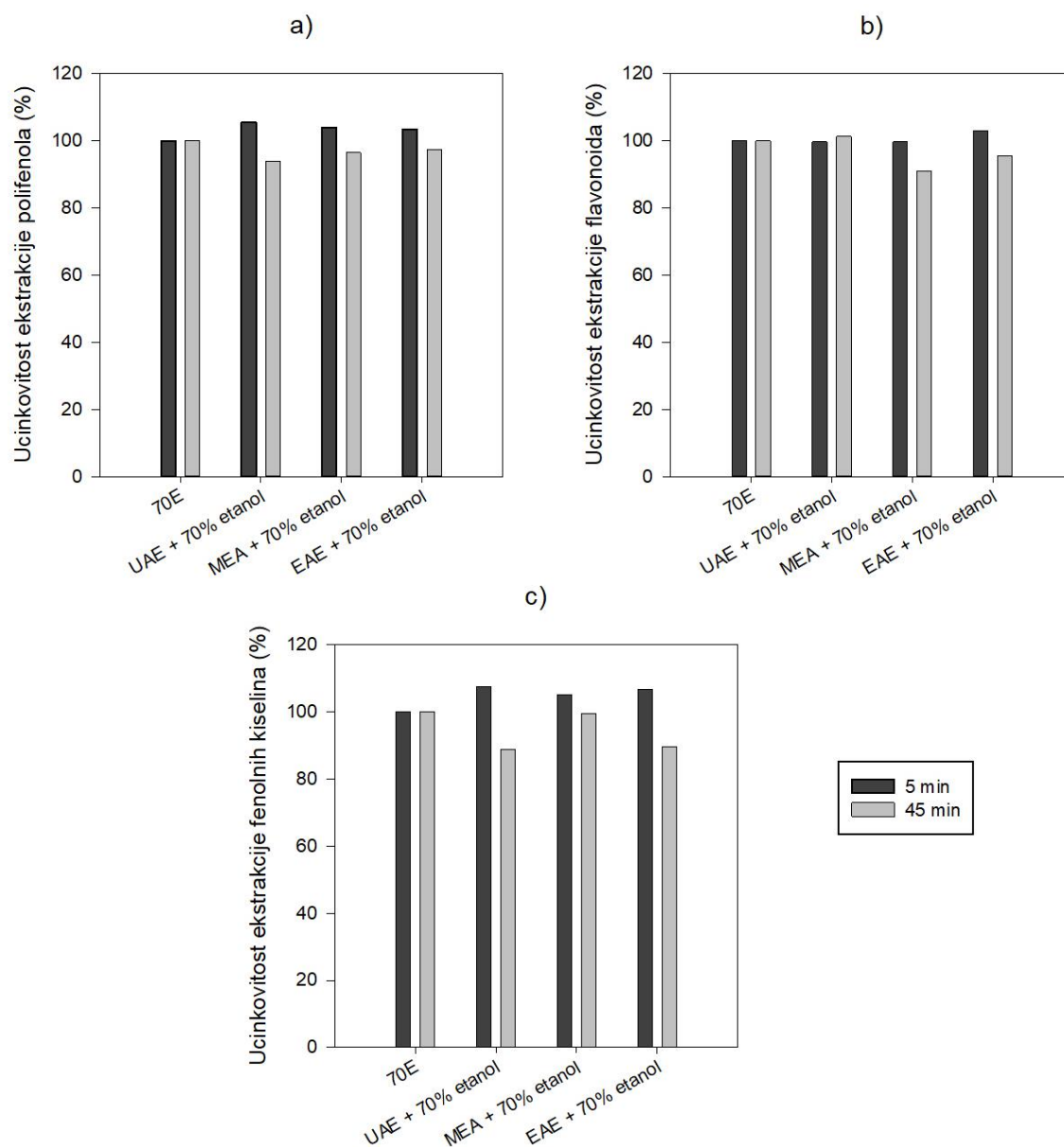
Radi dodatne usporedbe koncentracije bioaktivnih komponenti nakon 5 i 45 min izdvojene su u Tablici 2.

Tablica 2. Usporedba koncentracija ukupnih polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina nakon pojedinih ekstrakcija pri različitom vremenu (5 i 45 min)

Ekstrakcijska metoda	Ukupni polifenoli ($\mu\text{g}_{\text{GAE}}/\text{mg ST}$)		Ukupni flavonoidi ($\mu\text{g}_{\text{CE}}/\text{mg ST}$)		Ukupne fenolne kiseline ($\mu\text{g}_{\text{CAE}}/\text{mg ST}$)	
	5 min	45 min	5 min	45 min	5 min	45 min
70% etanol	28,42 \pm 0,000	35,69 \pm 1,20	2,89 \pm 0,84	3,77 \pm 0,04	1,21 \pm 0,32	1,52 \pm 0,04
UAE + 70% etanol	30,01 \pm 1,83	33,56 \pm 0,24	2,88 \pm 0,16	3,82 \pm 0,35	1,30 \pm 0,25	1,35 \pm 0,12
MAE + 70% etanol	29,56 \pm 0,25	34,42 \pm 1,06	2,88 \pm 0,68	3,43 \pm 0,31	1,27 \pm 0,25	1,51 \pm 0,04
EAE + 70% etanol (4h)	29,38 \pm 1,91	34,74 \pm 1,14	2,98 \pm 0,85	3,60 \pm 0,03	1,29 \pm 0,75	1,36 \pm 0,04

UAE + 70% etanol se često preporučuje u literaturi [36, 37] za ekstrakciju ukupnih flavonoida iz lišća ginka zbog njezine učinkovitosti i kratkog vremena ekstrakcije. Dobiveni rezultati pokazuju da se primjenom UAE + 70% etanol postižu slični rezultate nakon samo 5 min kao i kod ekstrakcije sa 70% etanolom u trajanju od 45 min, sugerirajući ubrzanu ekstrakciju ukupnih polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina. Slično UAE + 70% etanol, provedeni eksperimenti pokazuju da se i primjenom MAE + 70% etanol postižu slični rezultati. Literatura [38, 39] se razlikuje u pogledu vremena ekstrakcije ovih spojeva iz ginka, pri čemu su pojedine studije pokazale da je moguće dobiti najveće količine ukupnih polifenola i flavonoida u ekstraktima etanola i metanola već nakon 4 sata ekstrakcije. Druge studije sugeriraju da je dulja ekstrakcija potrebna za potpunu ekstrakciju flavonoida, iako rezultati ovog istraživanja sugeriraju da tako dugotrajna ekstrakcija možda nije nužna.

Dok su mjerenja ukupnih polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina često korištena za optimizaciju ekstrakcije flavonoida iz lišća ginka, poznato je da ovim metodama nedostaje specifičnosti.



Slika 7. Grafički prikaz dinamičke promjene pojedinih ekstrakcija u periodu od 5 i 45 minuta za a) polifenole, b) flavonoide i c) fenolne kiseline

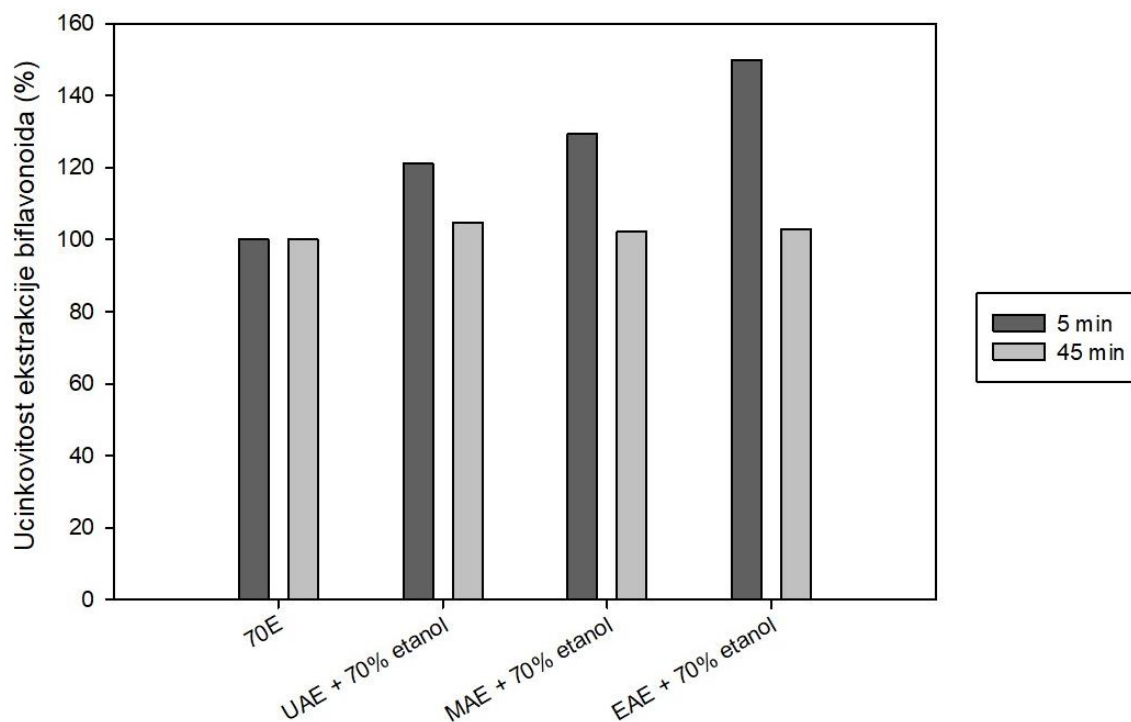
S obzirom na raznolike kemijske strukture flavonoida, preporučljivo je procijeniti učinkovitost ekstrakcije svakog pojedinog spoja, umjesto da se oslanjamo na nespecifične tehnike koje mjere ukupni sadržaj spojeva unutar grupe. U ovim istraživanju naglasak je stavljen na manje proučavanu skupinu flavonoida - biflavonoide, uključujući pet najzastupljenijih biflavonoida u lišću ginka. U svim analiziranim ekstraktima identificirani su amentoflavon, bilobetin, ginkgetin, izoginkgetin i sciadopitisin (Tablica 3.).

Tablica 3. Usporedba koncentracija ukupnih biflavonoida zajedno s identificiranim vrstama (amentoflavon, bilobetin, ginkgetin, izoginkgetin i sciadopitisin) nakon pojedinih ekstrakcija pri različitom vremenu (5 i 45 min)

Ekstrakcijska metoda	70% etanol		UAE + 70% etanol		MAE + 70% etanol		EAE+ 70% etanol (4 h)	
	5 min	45 min	5 min	45 min	5 min	45 min	5 min	45 min
Amentoflavon ($\mu\text{g/g ST}$)	49,69 \pm 0,58	64,36 \pm 4,17	56,82 \pm 1,59	65,95 \pm 1,84	59,07 \pm 0,70	64,08 \pm 0,38	60,39 \pm 1,94	66,81 \pm 2,77
Bilobetin ($\mu\text{g/g ST}$)	99,21 \pm 3,70	163,90 \pm 14,5	124,89 \pm 5,55	177,36 \pm 12,12	133,89 \pm 1,09	167,21 \pm 0,98	150,83 \pm 11,24	166,01 \pm 3,14
Ginkgetin ($\mu\text{g/g ST}$)	357,37 \pm 13,49	607,68 \pm 50,30	439,37 \pm 21,24	634,54 \pm 9,23	467,50 \pm 7,23	622,57 \pm 3,25	538,48 \pm 40,63	627,45 \pm 10,33
Izoginkgetin ($\mu\text{g/g ST}$)	486,72 \pm 24,81	945,83 \pm 90,12	632,18 \pm 37,92	994,31 \pm 15,45	684,37 \pm 11,44	969,24 \pm 4,69	812,89 \pm 74,21	975,23 \pm 18,60
Sciadopitisin ($\mu\text{g/g ST}$)	866,35 \pm 26,68	1387,56 \pm 105,51	999,26 \pm 72,14	1450,34 \pm 18,57	1061,32 \pm 19,88	1419,03 \pm 6,87	1223,56 \pm 30,96	1430,17 \pm 21,30
Ukupni sadržaj biflavonoida ($\mu\text{g/g ST}$)	1859,34 \pm 69,28	3169,32 \pm 64,22	2252,52 \pm 36,93	3322,55 \pm 47,49	2406,16 \pm 3,15	3242,13 \pm 16,61	2786,14 \pm 52,28	3264,67 \pm 49,71

Kao što je vidljivo, sciadopitisin je najzastupljeniji, a slijedi ga je izoginkgetin, što je u skladu s podacima iz literature [19, 40, 41, 42]. Slično kao i kod ukupnih polifenola i flavonoida, UAE + 70% etanol, MAE + 70% etanol i EAE + 70% etanol dale su usporedive rezultate. Iznimka je bio amentoflavon, koji je pokazao značajno veće količine u ekstraktima nakon EAE + 70% etanol u trajanju od 24 sata u usporedbi s ekstrakcijom samo sa 70% etanolom i MAE + 70% etanol. Dobiveni rezultati ukazuju da položaj amentoflavona unutar biljnih tkiva pogoduje primjeni enzimskog tretmana, poboljšavajući njegovu ekstrakciju. Prema podacima iz literature i MALDI snimkama, amentoflavon se nalazi u vanjskom dijelu listova/tkiva [42, 44] odnosno tamo gdje navedeni enzimi djeluju. Isto tako, vrijeme značajno utječe na ekstrakciju svih biflavonoida kada se koristi samo 70% etanol bez prethodnih tretmana; stalni porast pojedinačnog kao i ukupnog sadržaja biflavonoida zabilježen je tijekom 45 min.

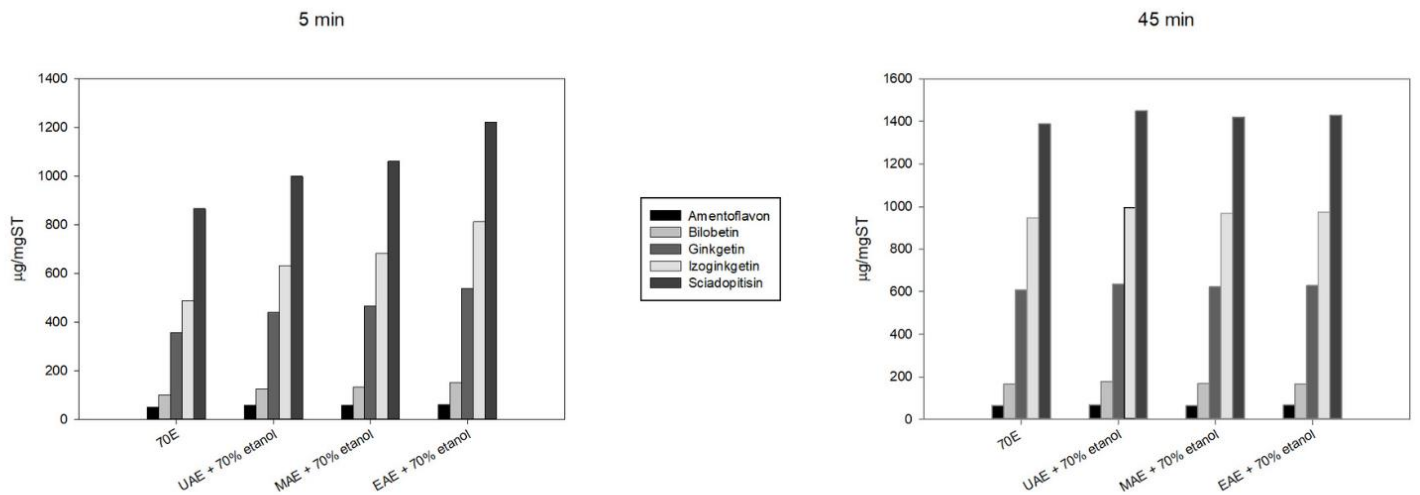
Učinkovitost ekstrakcija ukupnih biflavonoida prikazana je na Slici 8. gdje je klasična ekstrakcija 70% etanolom iskazana kao 100% učinkovitost. Kod rezultata ekstrakcija provedenih nakon 5 min jasno je vidljivo koliko pojedina metoda pozitivno utječe na količinu ekstrahiranih biflavonoida. Primjena EAE + 70% etanol rezultirala je s najboljim rezultatima i to do 50% bolje u usporedbi s ekstrakcijom provedenom u 70% etanolu. MEA + 70% etanol je za 30% više poboljšala ekstrakciju dok je UAE + 70% etanol također imala pozitivan utjecaj za oko 20% u odnosu na ekstrakciju provedenu sa 70% etanolom.



Slika 8. Usporedna učinkovitosti ekstrakcije biflavonoida upotrebom različitih metoda ekstrakcije

Prema rezultatima ovog istraživanja, najznačajnije povećanje količine biflavonoida zabilježeno je u prvih 10 min, pri čemu su metode UAE + 70% etanol, MAE + 70% etanol i EAE + 70% etanol omogućile ekstrakciju značajno većih količina svih pojedinačnih i ukupnih biflavonoida. Korištenje ovih metoda rezultiralo je većim količinama biflavonoida već nakon 5 minuta, osobito kod MAE + 70% etanol i EAE + 70% etanol.

Što se tiče pojedinih vrsta biflavonoida koje su identificirane u uzorcima, omjer raspodjele pojedinih vrsta biflavonoida jednaka je pri 5 i 45 min (Slika 9.). U oba slučaja najprisutniji je sciadopitisin i to u velikoj mjeri dok najmanje ima amentoflavona. Kako je i prema literaturi sciadopitisin najzastupljeniji biflavonoid [19, 41], dobiveni rezultati bili su očekivani.



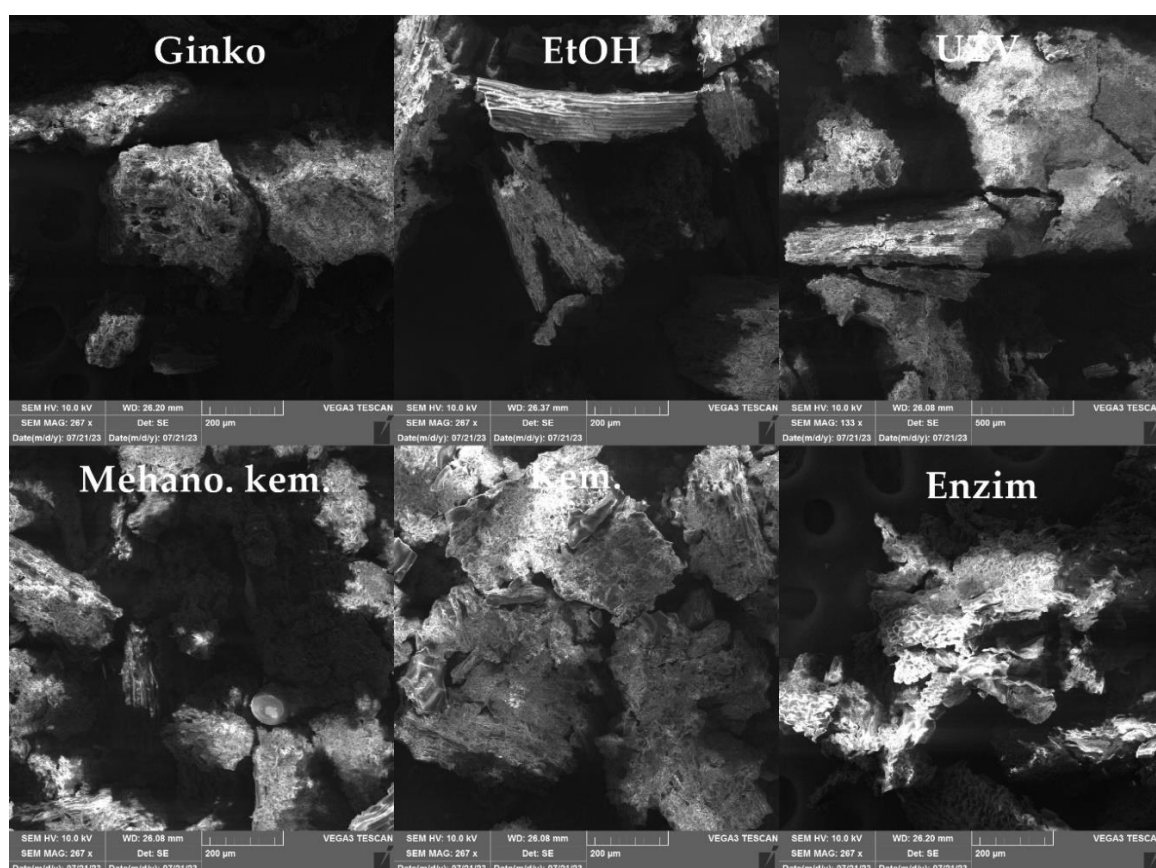
Slika 9. Usporedba učinkovitosti pojedinih ekstrakcija u periodu od 5 i 45 min za pojedine biflavonoide (amentoflavon, bilobetin, ginkgetin, izoginkgetin i sciadopitisin)

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da ispitane metode značajno smanjuju vrijeme potrebno za ekstrakciju, omogućujući postizanje najvećih količina biflavonoida u kraćem vremenu, što je u skladu s postojećim istraživanjima koja ističu ove tehnike kao ekološki prihvatljive zbog njihove sposobnosti da skrate vrijeme ekstrakcije i smanje troškove obrade [4, 28].

4.3 Morfološka analiza uzoraka lišća ginka

Svaka ispitana metoda izazvala je različite morfološke promjene na površini praha lišća ginka, što je potvrđeno analizom slike (Slika 8.) dobivene skeniranjem elektronskim mikroskopom (SEM).

Na uzorcima nakon obrade vide se razne pukotine i oštećenja (Slika 8.) dok se uzorku prije tretmana može uočiti kako je površina pretežno glatka. Mogu se uočiti ravnomjerno raspoređene rupice koje su prisutne zbog same raspodjele staničnih stijenki ginka. Najmanja razlika u strukturi ginka bila je nakon klasične ekstrakcije (70% etanol). Takvi rezultati morfološke analize su i očekivani jer kod klasične ekstrakcije nije bilo utjecaja dodatnih mehaničkih sila koje bi razbile stanice uzorka. S druge strane, UAE + 70 % etanol i MAE + 70 % etanol rezultirale su mnogim pukotinama na uzorku. U slučaju UAE + 70 % etanol došlo je do razaranja staničnih stijenki zbog utjecaja kavitacije prilikom tretiranja uzorka s ultrazvukom [6].



Slika 10. Morfološka analiza praha lišća ginka prije obrade i nakon ekstrakcije sa (redom) 70% etanolom, UAE + 70% etanol, MAE + 70% etanol, CAE + 70% etanol i EAE + 70% etanol

Ovakve morfološke strukture nakon tretmana sa ultrazvukom podudaraju se s onima dobivenim u ostalim literaturama [41, 44]. Zabilježene su vrlo slične pukotine na uzorcima i sama struktura površine.

Nadalje, kod uzorka nakon MAE + 70% etanol vidljiv je utjecaj staklenih perlica koje su mehaničkom silom dovele do dodatnog usitnjavanja uzorka kao i do razaranja staničnih stijenki. Kao i kod UAE + 70% etanol, dodatno usitnjavanje rezultira povećanjem aktivne površine koja u doticaju s otapalom rezultira boljom učinkovitošću ekstrakcije [9].

Morfološka analiza uzorka nakon CAE + 70% etanol ukazuje na minimalne promjene u strukturi. Pukotine na površini nisu toliko izražene kao nakon ostalih ekstrakcija. Kada se usporedi s ostalim analizama može se zaključiti kako dodani kemijski reagensi nisu značajno utjecali na površinu tretiranog uzorka.

Posljednja morfološka analiza provedena je na uzorku nakon EAE + 70% etanol. Kao i kod UAE + 70% etanol i MAE + 70% etanol vidljive su nastale promjene u strukturi. Pojavile su se pukotine no uzorak nije uništen u tolikoj mjeri kao kod MAE + 70% etanol. U ovom slučaju je do dodatne destrukcije uzorka došlo zbog samog utjecaja enzima koji su uz etanol može katalizirati razgradnju stanične stijenki ginka.

5. ZAKLJUČAK

Ginkgo biloba L., jedno od najstarijih stabala na svijetu, a prepoznato je po svojoj bogatoj kemijskoj strukturi koja uključuje raznovrsne bioaktivne spojeve. Među njima, posebno mjesto zauzimaju flavonoidi, s čak 110 različitih vrsta identificiranih u ovoj biljci, od kojih je 13 biflavonoida. Biflavonoidi su specifični flavonoidni dimeri, koje karakterizira spoj dva flavonoidna monomera. Zbog svojih širokih ljekovitih svojstava, biflavonoidi su od velikog interesa za medicinsku i kozmetičku industriju. Kako bi se ključne komponente uspješno izolirale iz ginka, znanstvenici neprestano razvijaju i usavršavaju ekstrakcijske metode. Cilj je postići maksimalnu učinkovitost dok se istovremeno smanjuje utjecaj na okoliš i štedi na vremenu i resursima. Ekstrakcijske metode se kontinuirano poboljšavaju kako bi bile ekološki prihvatljivije i učinkovitije.

Pojedine metode ekstrakcije rezultirale su različitim morfološkim obilježjima na uzorcima nakon provedbe ekstrakcije. Iako je primjena različitih metoda rezultirala različitim učinkovitostima, klasična ekstrakcija s 70% etanolom pokazala se najpouzdanijom metodom za ekstrakciju polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina iz osušenih listova ginka. Primjena potpomognutih metoda nije značajno povećala učinkovitost ekstrakcije, osim kod biflavonoida gdje su UAE + 70% etanol i EAE + 70% etanol metode pokazale bolje rezultate. CAE + 70% etanol nije se pokazala uspješnom, regulirajući s vrlo lošim rezultatima koncentracija za sve komponente. Također, ispitan je utjecaj vremena ekstrakcije na koncentraciju izoliranih bioaktivnih spojeva te je zaključeno kako ono značajno utječe na učinkovitost procesa, a ekstrakcija dulja od 20 minuta omogućuje optimalno oslobađanje komponenti. Uz to je dokazano kako nije potrebna uvoditi metode za potpomognutu ekstrakciju ukoliko se ekstrakcija provodi kroz period od 45 minuta.

Daljnja istraživanja trebala bi se fokusirati na optimizaciju vremena ekstrakcije i istraživanje novih metoda koje bi mogle ponuditi dodatne prednosti u odnosu na klasičnu ekstrakciju.

6. LITERATURA

1. Twaij, B. M., Hasan, M. N. (2022) Bioactive secondary metabolites from plant sources: types, synthesis, and their therapeutic uses. *International Journal of Plant Biology*, 13(1), 4-14.
2. Wen, L., Zhang, Z., Sun, D. W., Sivagnanam, S. P., Tiwari, B. K. (2020) Combination of emerging technologies for the extraction of bioactive compounds. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(11), 1826-1841.
3. Rodríguez De Luna, S. L., Ramírez-Garza, R. E., Serna Saldívar, S. O. (2020). Environmentally friendly methods for flavonoid extraction from plant material: Impact of their operating conditions on yield and antioxidant properties. *The Scientific World Journal*, 2020(1), 6792069.
4. Tzanova, M., Atanasov, V., Yaneva, Z., Ivanova, D., Dinev, T. (2020) Selectivity of current extraction techniques for flavonoids from plant materials. *Processes*, 8(10), 1222.
5. Šamec, D., Karalija, E., Dahija, S., Hassan, S. T. (2022) Biflavonoids: Important contributions to the health benefits of Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.). *Plants*, 11(10), 1381.
6. Drmić, H., Režek Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of Food Science and Technolgy*, 2(2), 22-33.
7. Šalić, A., Šepić, L., Turkalj, I., Zelić, B., Šamec, D. (2024) Comparative Analysis of Enzyme-, Ultrasound-, Mechanical-, and Chemical-Assisted Extraction of Biflavonoids from Ginkgo Leaves. *Processes*, 12(5), 982.
8. Puri, M., Sharma, D., Barrow, C. J. (2012) Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in biotechnology*, 30(1), 37-44.
9. Gligor, O., Mocan, A., Moldovan, C., Locatelli, M., Crişan, G., Ferreira, I. C. (2019) Enzyme-assisted extractions of polyphenols – A comprehensive review. *Trends in Food Science and Technology*, 88, 302-315.
10. Peter R. (2019) An evolutionary and cultural biography of ginkgo. *Plants, People, Planet*, 1(1), 32-37.
11. Zhao, Y., Paule, J., Fu, C., Koch, M. A. (2010) Out of China: Distribution history of *Ginkgo biloba* L. *Taxon*, 59(2), 495-504.
12. Singh, B., Kaur, P., Singh, R. D., Ahuja, P. S. (2008). Biology and chemistry of Ginkgo biloba. *Fitoterapia*, 79(6), 401-418.

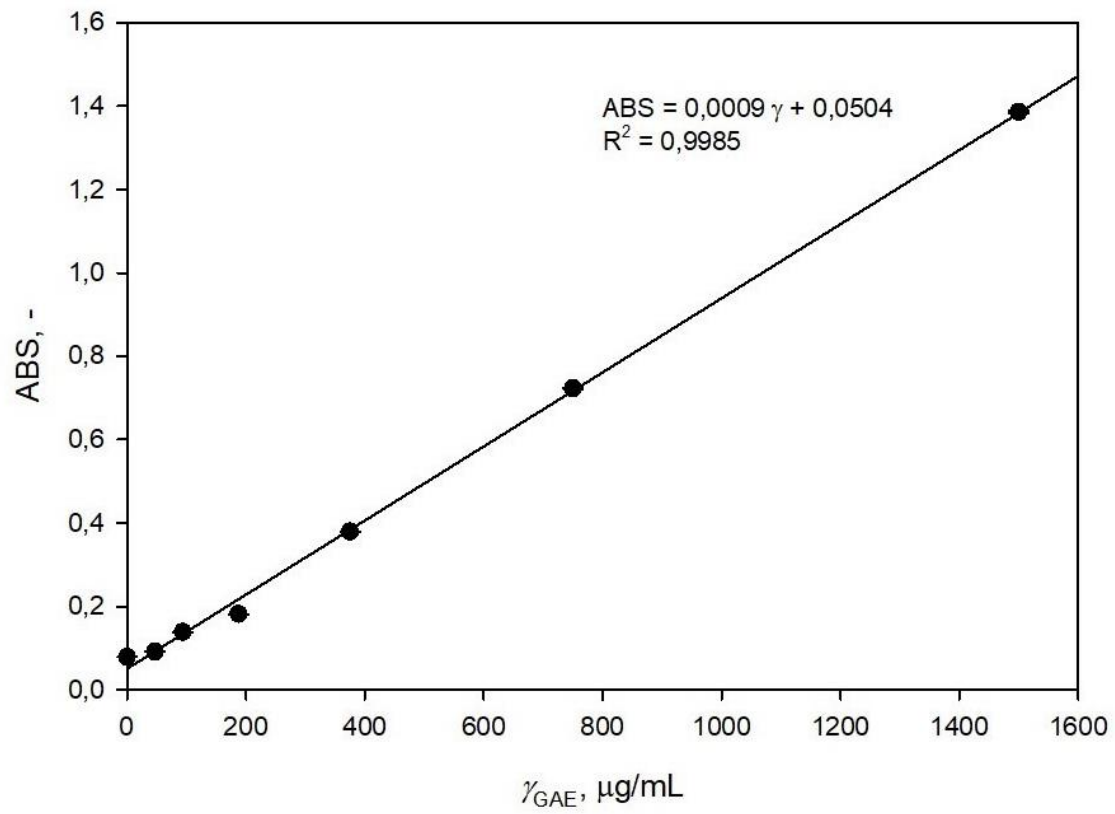
13. Elshafie, H. S., Camele, I., Mohamed, A. A. (2023) A Comprehensive review on the biological, agricultural and pharmaceutical properties of secondary metabolites based-plant origin. *International journal of molecular sciences*, 24(4), 3266.
14. Ghasemzadeh, A., Ghasemzadeh, N. (2011) Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(31), 6697-6703.
15. Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R. (2016) Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5, e47.
16. Chagas, M. D. S. S., Behrens, M. D., Moragas-Tellis, C. J., Penedo, G. X., Silva, A. R., Gonçalves-de-Albuquerque, C. F. (2022) Flavonols and flavones as potential anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial compounds. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2022(1), 9966750.
17. Šamec, D., Karalija, E., Šola, I., Vujčić Bok, V., Salopek-Sondi, B. (2021). The role of polyphenols in abiotic stress response: The influence of molecular structure. *Plants*, 10(1), 118.
18. Kazazić, S. P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 55(4), 279-290.
19. Kovač Tomas, M., Jurčević, I., Šamec, D. (2022) Tissue-specific profiling of biflavonoids in ginkgo (*Ginkgo biloba* L.). *Plants*, 12(1), 147.
20. He, X., Yang, F., Huang, X. A. (2021) Proceedings of chemistry, pharmacology, pharmacokinetics and synthesis of biflavonoids. *Molecules*, 26(19), 6088.
21. Gontijo, V. S., Dos Santos, M. H., Viegas Jr, C. (2017) Biological and chemical aspects of natural biflavonoids from plants: a brief review. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 17(10), 834-862.
22. Wang, L. T., Fan, X. H., Jian, Y., Dong, M. Z., Yang, Q., Meng, D., Fu, Y. J. (2019) A sensitive and selective multiple reaction monitoring mass spectrometry method for simultaneous quantification of flavonol glycoside, terpene lactones, and biflavonoids in *Ginkgo biloba* leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 170, 335-340.
23. Menezes, J. C., Campos, V. R. (2021) Natural biflavonoids as potential therapeutic agents against microbial diseases. *Science of The Total Environment*, 769, 145168.
24. Xiong, X., Tang, N., Lai, X., Zhang, J., Wen, W., Li, X., Li, A., Wu, Y., Liu, Z. (2021) Insights into amentoflavone: a natural multifunctional biflavonoid. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 768708.

25. Feng, X., Zhang, X., Chen, Y., Li, L., Sun, Q., Zhang, L. (2020) Identification of bilobetin metabolites, in vivo and in vitro, based on an efficient ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry strategy. *Journal of Separation Science*, 43(17), 3408-3420.
26. Adnan, M., Rasul, A., Hussain, G., Shah, M. A., Zahoor, M. K., Anwar, H., Selamoglu, Z. (2020) Ginkgetin: A natural biflavone with versatile pharmacological activities. *Food and Chemical Toxicology*, 145, 111642.
27. Wen, L., Zhang, Z., Sun, D. W., Sivagnanam, S. P., Tiwari, B. K. (2020) Combination of emerging technologies for the extraction of bioactive compounds. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(11), 1826-1841.
28. Li, J., Chen, Z., Shi, H., Yu, J., Huang, G., Huang, H. (2023) Ultrasound-assisted extraction and properties of polysaccharide from *Ginkgo biloba* leaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 93, 106295.
29. Wu, K., Ju, T., Deng, Y., Xi, J. (2017) Mechanochemical assisted extraction: A novel, efficient, eco-friendly technology. *Trends in Food Science and Technology*, 66, 166-175.
30. Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A., Simons, K. (2003) Resistance of cell membranes to different detergents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(10), 5795-5800.
31. Deamer, D. W., Crofts, A. (1967) Action of Triton X-100 on chloroplast membranes: Mechanisms of Structural and Functional Disruption. *The Journal of Cell Biology*, 33(2), 395-410.
32. Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Ravent, R.M. (1999) Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent, *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
33. Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, *Food Chemistry*, 64, 555-559.
34. European Pharmacopoeia (2004) 4th ed. Council of Europe, Strasbourg, 2377–2378.
35. Chen, S., Xing, X. H., Huang, J. J., Xu, M. S. (2011) Enzyme-assisted extraction of flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves: Improvement effect of flavonol transglycosylation catalyzed by *Penicillium decumbens* cellulase. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(1), 100-105.

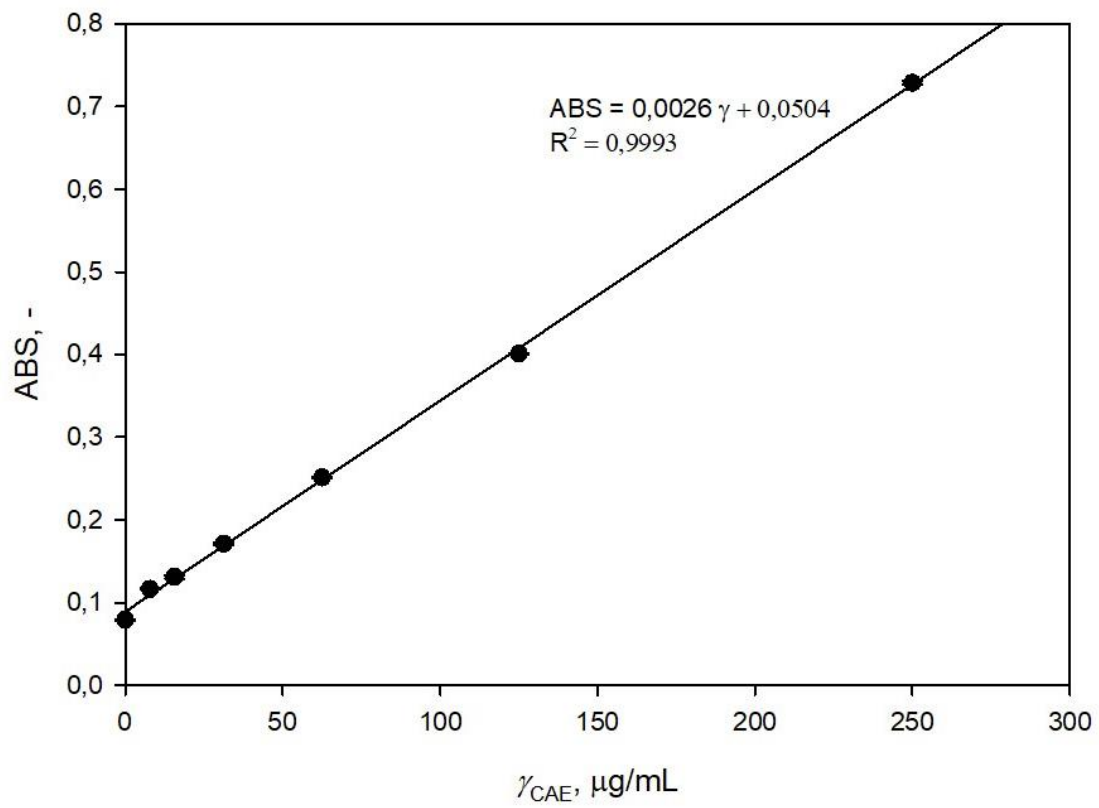
36. Gao, H., Liu, B., Nan, H., Chen, C., Li, L. Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Flavonoids with Ethanol from Ginkgo Leaves by Response Surface Methodology. In Proceedings of the 2009 IEEE International Symposium on IT in Medicine & Education, Albuquerque, NM, USA, 3–4 August 2009; 1154–1157.
37. Zhou, G., Ma, J., Tang, Y., Wang, X., Zhang, J., Yao, X., Jiang, W., Duan, J. A. (2018) Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction Followed by Macroporous Resin Purification for Maximal Recovery of Functional Components and Removal of Toxic Components from Ginkgo Biloba Leaves. *BioMed Research International*, 2018, 4598067.
38. Cui, N., Zhang, L., Quan, M., Xu, J. (2020) Profile of the Main Bioactive Compounds and in Vitro Biological Activity of Different Solvent Extracts from *Ginkgo Biloba* Exocarp. *RSC Advances*, 10, 45105–45111.
39. Kobus, J., Flaczyk, E., Siger, A., Nogala-Kałużka, M., Korczak, J., Pegg, R.B. (2009) Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Extracts of Ginkgo Leaves. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111, 1150–1160.
40. Sati, P., Dhyani, P., Bhatt, I.D., Pandey, A. (2019) *Ginkgo Biloba* Flavonoid Glycosides in Antimicrobial Perspective with Reference to Extraction Method. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 9, 15–23.
41. Lei, J., Jiang, Y., Luo, X., Zheng, Y., Zhu, L., Sun, C., Lang, L., Cheng, Q., Gang, W. (2021) Ultrasonic-Assisted Ionic Liquid Extraction of Four Biflavonoids from *Ginkgo biloba* L. *ChemistrySelect*, 6(14), 3297-3307.
42. Beck, S., Stengel, J. (2016) Mass Spectrometric Imaging of Flavonoid Glycosides and Biflavonoids in *Ginkgo Biloba* L. *Phytochemistry*, 130, 201–206.
43. Šamec, D., Pierz, V., Srividya, N., Wüst, M., Lange, B.M. (2019) Assessing Chemical Diversity in *Psilotum Nudum* (L.) Beauv., a Pantropical Whisk Fern That Has Lost Many of Its Fern-like Characters. *Frontiers in Plant Science*, 10, 459690.
44. Zhang, C.W., Wang, C. Z., Tao, R. (2016) Analysis on the Physicochemical Properties of Ginkgo Biloba Leaves after Enzymolysis Based Ultrasound Extraction and Soxhlet Extraction. *Molecules*, 21, 97

7. PRILOZI

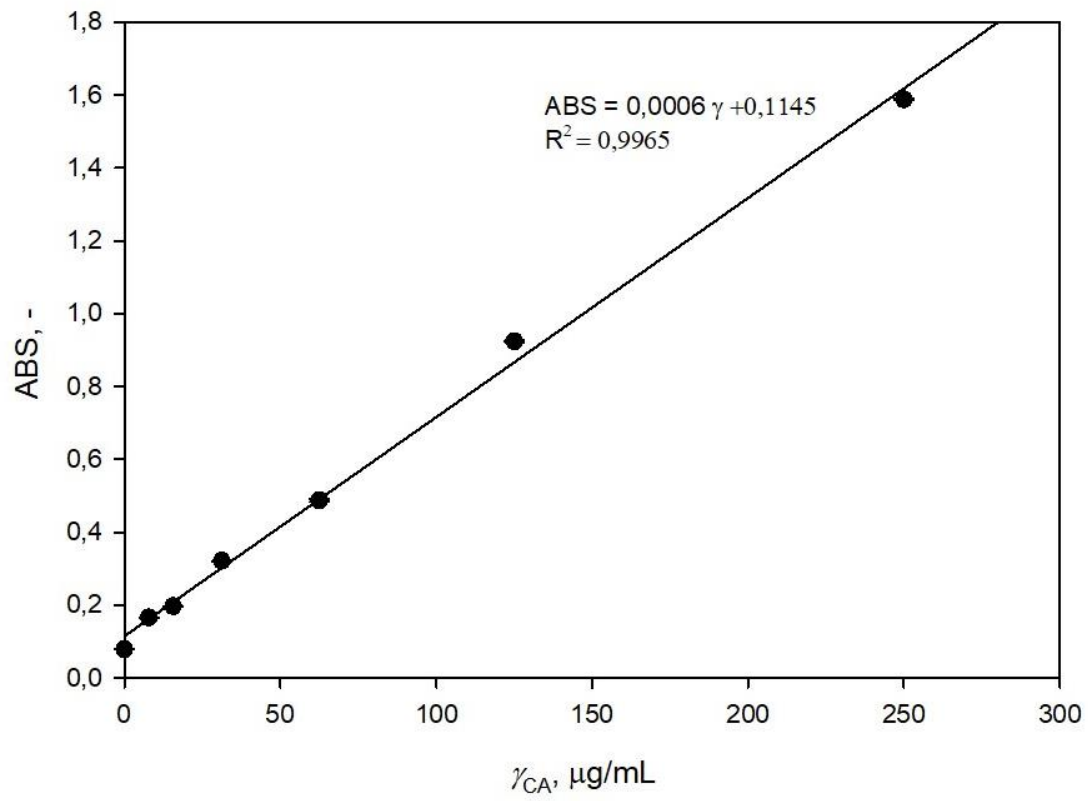
Prilog 1. Baždarni pravac za određivanje koncentracije polifenola



Prilog 2. Baždarni pravac za određivanje koncentracije flavonoida



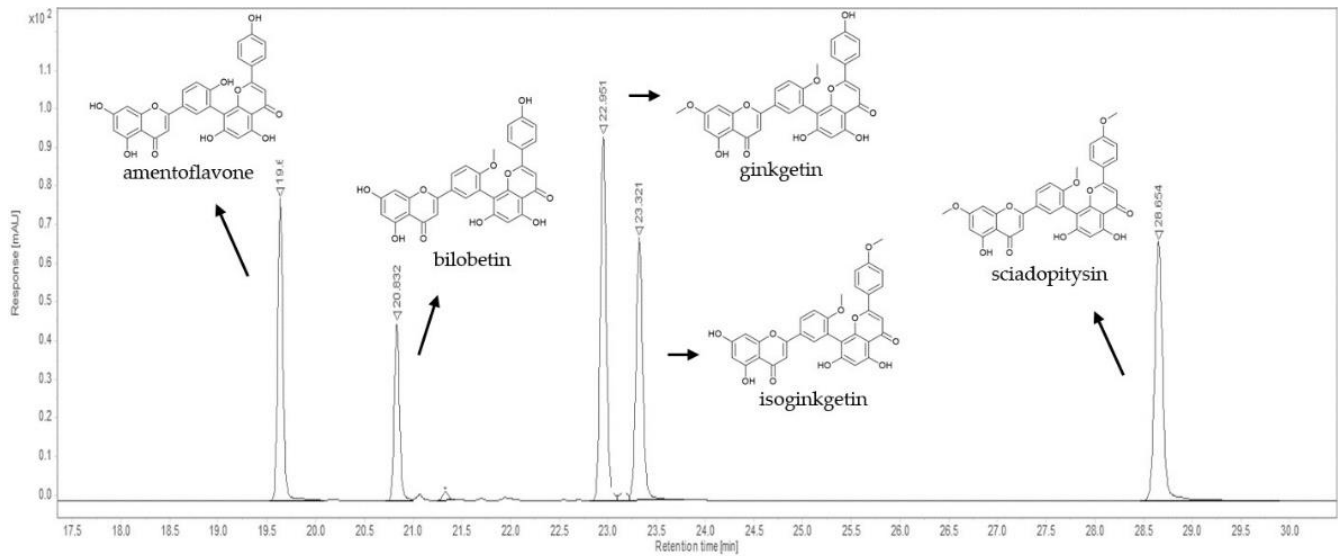
Prilog 3. Baždarni pravac za određivanje koncentracije fenolnih kiselina



Prilog 4. Jednadžbe baždarnih krivulja korištene za izračun pojedinih biflavonida

Biflavonoid	Jednadžba baždarne krivulje
amentoflavon	$A_{\text{pik}} = 21,5079 * \gamma_{\text{amentoflavon}} - 11,4385$
bilobetin	$A_{\text{pik}} = 22,5934 * \gamma_{\text{bilobetin}} + 3,3722$
ginkgetin	$A_{\text{pik}} = 23,2590 * \gamma_{\text{ginkgetin}} - 0,1023$
izoginkgetin	$A_{\text{pik}} = 12,0599 * \gamma_{\text{izoginkgetin}} + 51,3053$
sciadopitisin	$A_{\text{pik}} = 25,8955 * \gamma_{\text{sciadopitisin}} - 75,3704$

Prilog 5. Kromatogram pet najzastupljenijih biflavonoida u lišću ginka (amentoflavon, bilobetin, ginkgetin, izoginkgetin i sciadopitysin) dobiven HPLC-DAD analizom pri $\lambda = 330$ nm



Prilog 6.

Šalić, A., Šepić, L., Turkalj, I., Zelić, B., Šamec, D. (2024) Comparative Analysis of Enzyme-, Ultrasound-, Mechanical-, and Chemical-Assisted Extraction of Biflavonoids from Ginkgo Leaves. *Processes*, 12(5), 982.

Ideja za istraživanje: Anita Šalić i Dunja Šamec

Plan pokusa: Anita Šalić

Provedba pokusa: Lina Šepić i Iva Turkalj

Obrada podataka: Lina Šepić i Iva Turkalj

Izrada prve inačice rada: Dunja Šamec




Interna recenzija rada: Anita Šalić i Bruno Zelić

Izrada konačne verzije rada: Dunja Šamec, Anita Šalić i Bruno Zelić

Open-access časopis, autor zadržava autorska prava.

Article

Comparative Analysis of Enzyme-, Ultrasound-, Mechanical-, and Chemical-Assisted Extraction of Biflavonoids from Ginkgo Leaves

Anita Šalić¹, Lina Šepić¹, Iva Turkalj¹, Bruno Zelić^{1,2} and Dunja Šamec^{2,*}

¹ Faculty of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb, Marulićev trg 19, HR-10000 Zagreb, Croatia; asalic@fkit.unizg.hr (A.Š.); lsepic@fkit.unizg.hr (L.Š.); iturkalj@fkit.unizg.hr (I.T.); bzelic@fkit.unizg.hr (B.Z.)

² University North, Trg dr. Žarka Dolinara 1, HR-48000 Koprivnica, Croatia

* Correspondence: dsamec@unin.hr

Abstract: The biflavonoid extraction from ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) leaves using solvent-based extraction with 70% ethanol, alone and in combination with enzyme-assisted, ultrasound-assisted, mechanical-assisted, and chemically assisted methods was investigated and the influence of extraction duration was explored. The total content of polyphenols, flavonoids, and phenolic acids in the extracts was determined spectrophotometrically, while individual biflavonoids were identified and quantified using HPLC-DAD. Amentoflavone, bilobetin, ginkgetin, isoginkgetin, and sciadopitysin were identified in all our extracts. Among these, sciadopitysin emerged as the most prevalent biflavonoid with an amount above 1 mg g⁻¹ dw, followed by isoginkgetin. Comparative analysis of the extraction methods revealed that, except for chemically assisted extraction, similar levels of compounds were obtained after 45 min of extraction. However, enzymatic (EAE) and mechanical-assisted extraction (MAE) exhibited significantly higher individual (EAE: 19–41% higher; MAE: 22–67% higher) and total biflavonoid (EAE: 29% higher; MAE 50% higher) levels after just 5 min, suggesting their potential to abbreviate extraction duration and facilitate the efficient retrieval of target compounds. However, as extraction efficiency varies between individual biflavonoids, our findings also underscore the importance of considering specific compounds and extraction kinetics in the optimization of ginkgo leaf extraction processes.

Keywords: amentoflavone; assisted extraction; biflavonoids; bilobetin; ginkgo; ginkgetin; isoginkgetin; sciadopitysin



Citation: Šalić, A.; Šepić, L.; Turkalj, I.; Zelić, B.; Šamec, D. Comparative Analysis of Enzyme-, Ultrasound-, Mechanical-, and Chemical-Assisted Extraction of Biflavonoids from Ginkgo Leaves. *Processes* **2024**, *12*, 982. <https://doi.org/10.3390/pr12050982>

Academic Editors: Yanlin Zhang and Prashant K. Sarswat

Received: 19 April 2024

Revised: 10 May 2024

Accepted: 10 May 2024

Published: 12 May 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The ginkgo (*Ginkgo biloba* L.), often referred to as the “maidenhair tree”, is a living fossil that has withstood the test of time for over 270 million years [1]. Revered for its unique fan-shaped leaves and remarkable adaptability, this ancient tree has not only survived but has also become a fascinating topic in modern research and wellness practice. Ginkgo extract, derived from the leaves of the ancient ginkgo tree, has a rich history steeped in traditional medicine and cultural significance [2]. This herbal remedy has endured through the centuries, evolving from its roots in traditional Eastern medicine to a globally recognized dietary supplement with a variety of potential health benefits [1,3]. The standardized extract preparation of ginkgo leaves contains 24% flavonoids, 6% terpenoid trilactones (TTLs), and less than 5 ppm ginkgolic acid [4]. To date, 110 different flavonoid structures have been identified in a ginkgo, including flavonol and its glycosides, flavone and its glycosides, flavanone and its glycosides, isoflavone and its glycosides, flavan-3-ols, biflavonoids and biginkgosides [4]. Biflavonoids are dimeric structures of flavonoids that have recently gained attention as antimicrobial, especially antiviral agents, and as molecules with the potential for the prevention and treatment of cancer and neurological diseases [3,5]. The

first characterized biflavonoid, ginkgetin, was isolated from ginkgo leaves and so far 13 different biflavonoids have been identified in a ginkgo, with amentoflavone, bilobetin, ginkgetin, isoginkgetin, and sciadopitysin being the most abundant [3,6] (Figure 1).

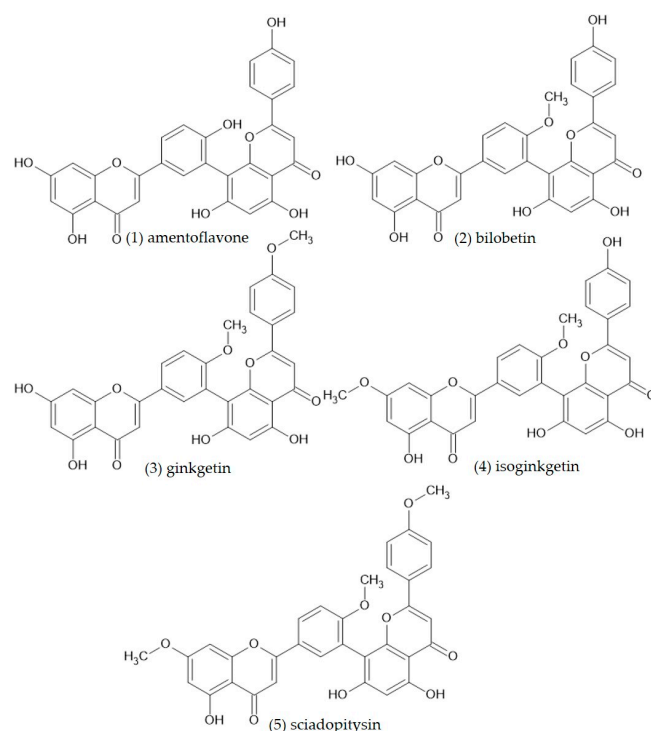


Figure 1. Chemical structure of five biflavonoids from ginkgo leaves (1) amentoflavone, (2) bilobetin, (3) ginkgetin, (4) isoginkgetin, and (5) sciadopitysin.

Flavonoids, a diverse group of polyphenolic compounds consisting of 6000 different structures, are known for their strong antioxidant properties and numerous health benefits [7]. However, the biological activity of flavonoids can vary considerably due to their structure [7,8]. For example, biflavonoids have significantly lower antioxidant activity than monomeric subunits, but higher neuroprotective potential [9]. The extraction of flavonoids from plant sources requires careful optimization to increase both extraction efficiency and yield without overtaxing resources [10]. Optimizing extraction processes for flavonoids from plant sources is paramount for ensuring maximum yield, minimizing production costs, and facilitating reliable results in research while maintaining product quality [11,12]. By carefully controlling extraction parameters, such as temperature and solvent choice, the degradation of bioactive compounds is minimized, thus preserving their health benefits [12]. Furthermore, optimized processes contribute to reducing environmental impact by minimizing solvent usage and waste generation [13]. Selective extraction techniques enable the isolation of specific compounds tailored to desired applications, thereby unlocking the full potential of plant-derived compounds across various fields [12]. The extraction technique used for flavonoids extraction may be divided into two groups: Conventional techniques (maceration, reflux, and Soxhlet extraction) and modern techniques (extraction by ultrasound, microwaves, pressurized liquid, supercritical fluid, enzyme assistance, matrix solid-phase dispersion, etc.) [12]. Ultrasound-assisted extraction (UAE) uses high-frequency sound waves to break down the cell walls and accelerate the release of bioactive compounds from the plant material. In this method, the plant material is immersed in a solvent and simultaneously sonicated with ultrasonic waves, creating cavitation that breaks down the cell walls and facilitates the extraction of the compounds. UAE is known for its ability to speed up processes, shorten extraction time, and increase yields. It is often used to extract polyphenols, flavonoids, and essential oils [14–16]. In enzyme-assisted

extraction (EAE), specific enzymes are used to break down the cell walls and release the target compounds. It is selective, environmentally friendly, improves efficiency, and is often used to extract polyphenols, polysaccharides, and proteins [17,18]. Mechanically assisted extraction (MAE) uses mechanical force such as crushing or pressing to break up the plant tissue and improve the release of the substances. It is simple, cost-effective, and suitable for large-scale processes and is generally used for the extraction of oils and lipophilic compounds [19,20]. In chemically assisted extraction (CAE), solvents or reagents are used to dissolve and extract bioactive compounds. This versatile method can be tailored to specific compounds and is efficient for the extraction of polyphenols, alkaloids, and terpenoids from plant material on an industrial scale. Each of the mentioned techniques offer various advantages, which are selected based on the target compounds, the properties of the plant material, and the desired extraction efficiency.

Over the years, numerous research endeavors have been dedicated to refining the extraction methods for flavonoids from ginkgo leaves, with a predominant focus on total flavonoids or monomeric flavonoids [21–27]. Information regarding the targeted extraction of biflavonoids from ginkgo leaves remains scarce. As per our current knowledge, only one study [28] has addressed this issue. Lei et al. [28] optimized the extraction process for four biflavonoids—bilobetin, ginkgetin, isoginkgetin, and sciadopitysin—from ginkgo using ultrasonic-assisted ionic liquid extraction (UAILE). However, it is noteworthy that the authors did not specify the specific part of the ginkgo plant from which the biflavonoids were extracted in their paper. Considering the significant pharmacological potential associated with biflavonoids and the accessibility of ginkgo leaves as a cost-effective source of these compounds, our study aims to assess various extraction techniques, including solvent-based extraction, enzyme-assisted extraction, ultrasound-assisted extraction, mechanical-assisted extraction, and chemically assisted extraction, for isolating biflavonoids from ginkgo leaves. We meticulously examined parameters such as solvent composition and extraction duration to evaluate their impact on the content of total phenolics, total flavonoids, total phenolic acids determined spectrophotometrically, as well as the five most abundant flavonoids from ginkgo leaves—amentoflavone, bilobetin, ginkgetin, isoginkgetin, and sciadopitysin—along with the total biflavonoid content using HPLC-DAD analysis.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material and Extraction

Ginkgo leaves were collected from a ginkgo tree in an urban area in Croatia, air-dried, and stored in a drying cabinet until analysis.

Solid–liquid extraction (SLE): Extracts were prepared by mixing 60 mg of dried and ground ginkgo leaves with 2 mL of 70% ethanol. The samples were briefly mixed and placed in an ultrasonic bath for 10 min, followed by 45 min in the rotator. This is a commonly used method in our laboratory for the preparation of various plant extracts. At the end, the samples were centrifuged and the supernatant was used for further analysis.

Enzyme-assisted extraction (EAE): 60 mg amount of dried and ground leaves were mixed with 0.6 mL of 0.1 M acetate buffer pH 4 with 6% (*v/v*) enzyme (*Viscozyme L* (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) a blend of beta-glucanases, pectinases, hemicellulases and xylanases with declared activity \geq FBGU/g. Each FBG is the amount of enzyme required to hydrolyze β -glucans under the standard condition (30 °C, pH 5.0). The content was briefly homogenized with a vortex and the enzymatic degradation of the lignocellulose was carried out for 4 and 24 h at 50 °C and 200 rpm. After enzymatic treatment, 1.4 mL of 100% ethanol was added to the sample to obtain 70% ethanol in the sample. The procedure that followed was the same as for solid–liquid extraction.

Ultrasound-assisted extraction (UAE): 60 mg amounts of dried and ground leaves were mixed with 0.6 mL of distilled water. The content was briefly homogenized and treated with ultrasound (Sonoplus HD 3100, Berlin, Germany, horn type SH 70 G, 20 kHz, Bandelin GmbH, 62% amplitude) for 10 min with constant cooling. After the ultrasound treatment,

1.4 mL of 100% ethanol was added to the sample to obtain 70% ethanol in the sample. The procedure that followed was the same as for solid–liquid extraction.

Mechanically assisted extraction (MAE): 60 mg of dried and ground leaves were mixed with 0.6 mL of distilled water followed by adding 120 mg of 4 mm glass beads to the sample. The content was shaken at maximum speed of 600 rpm for 20 min. After the mechanical treatment, 1.4 mL of 100% ethanol was added to the sample to obtain 70% ethanol in the sample. The procedure that followed was the same as for solid–liquid extraction.

Chemically assisted extraction (CAE): 60 mg of dried and ground leaves were mixed with 0.5 mL of 0.1% TritonX solution and 10% NaClO solution. The samples were stirred for 48 h at 25 °C at 200 rpm. After chemical treatment, 1.4 mL of 100% ethanol was added to the sample to obtain 70% ethanol in the sample. The procedure that followed was the same as for solid–liquid extraction.

Schematically, extraction process is shown in Figure 2.

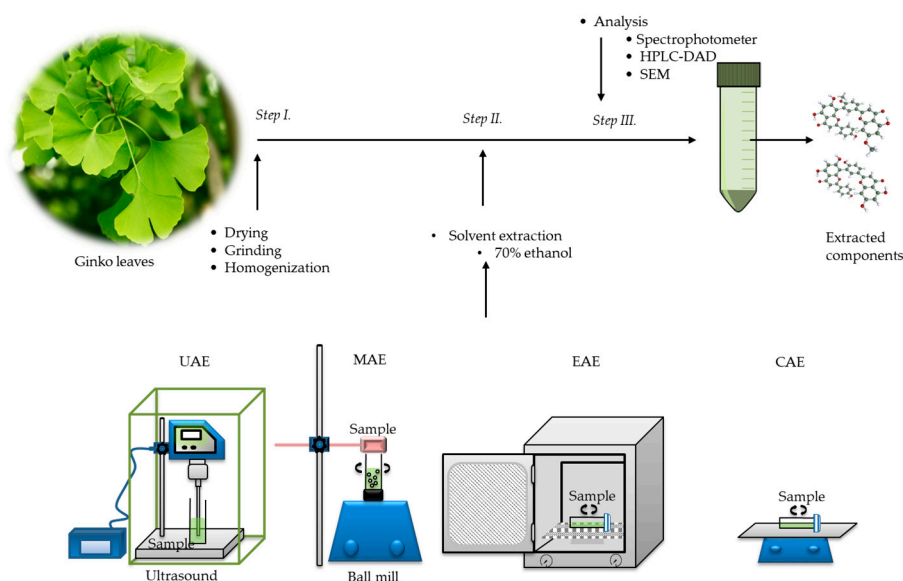


Figure 2. Schematic representation of extraction process.

2.2. Determination of Total Polyphenols, Flavonoids and Phenolic Acids Content

Determination of total phenolic compounds was carried out through a colorimetric reaction involving Folin–Ciocalteu reagent [29]. Absorbance readings at 765 nm were taken after a 2 h incubation period. Gallic acid was employed for the calibration curve, and the outcomes are presented as gallic acid equivalents per dry weight ($\mu\text{g GAE mg}^{-1} \text{ dw}$).

For the determination of total flavonoids, the methodology outlined by Zhinshen et al. [30], adapted to a reduced scale, was employed. The absorbance of the resulting mixture was measured at 510 nm. Catechin was utilized for the calibration curve, and the findings are expressed as catechin equivalents per dry weight ($\mu\text{g CE mg}^{-1} \text{ dw}$).

Total phenolic acids were determined using Arnow's reagent [31]. Absorbance readings were taken at 505 nm. Caffeic acid served as the standard for constructing the calibration curve, and the results were expressed as caffeic acid equivalents per dry weight ($\mu\text{g CAE mg}^{-1} \text{ dw}$).

2.3. Determination of Individual Biflavonoids Using HPLC-DAD

The analysis of individual biflavonoids, amentoflavone, bilobetin, ginkgetin, isoginkgetin, and sciadopitysin, was performed utilizing an Agilent 1260 Infinity II High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) system (Agilent, Santa Clara, CA, USA) equipped with a quaternary pump, autosampler, column compartment, and a diode array detector (DAD). The acquisition and subsequent data processing were carried out employing the Agilent OpenLAB CDS software (version 2.6, Agilent, Santa Clara, CA, USA). Chromatographic

separation was achieved using a Zorbax 300Extend-C18 column (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Analysis parameters were similar to those published elsewhere [6]. Identification and quantification were accomplished employing commercially available biflavonoid standards, as previously detailed in our report where we also reported curve equation, R^2 , LOD, and LOQ [6]. Results were expressed per dry weight (dw).

2.4. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Scanning electron microscopy (SEM) was used to examine the morphology of the samples using a Tescan Vega 3 SEM (Tescan Brno S.R.O., Brno, Czech Republic) apparatus. The samples were coated for 60 s in an argon plasma with a gold/platinum conductive coating prior to scanning. A 10 kV voltage and a secondary electron (SE) detector were utilized in the study.

2.5. Statistical Analysis

All extractions and measurements were conducted in at least in triplicate, and the results are expressed as mean \pm standard deviation (SD). All statistical analyses were performed using XLSTAT Excel data add-on, version 2024.1. One-way ANOVA and subsequent multiple mean comparisons with Tukey's HSD test were executed, and distinctions between measurements were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Influence of Pretreatment on Total Polyphenols, Flavonoids, Phenolic Acids and Individual and Total Biflavonoids

In the initial phase of this research, the impact of various pretreatment processes (EAE, MAE, CAE, and UAE) on the levels of total polyphenols, phenolic acids, and flavonoids was analyzed. The findings from this investigation are shown in Figure 3.

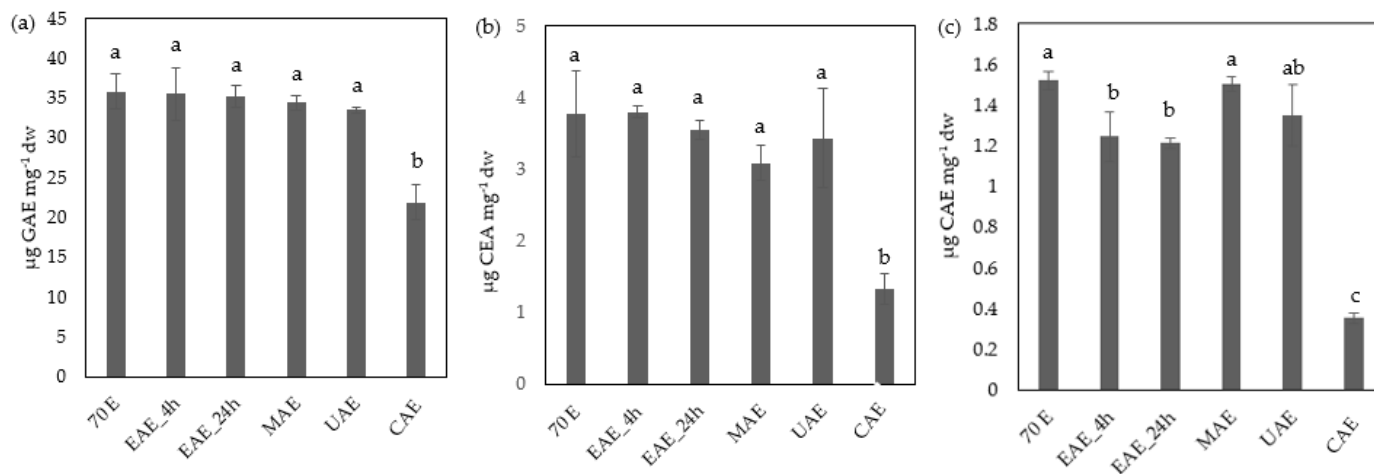


Figure 3. Influence of different pretreatment methods, enzyme-assisted for 4 h (EAE_4h), enzyme-assisted for 24 h (EAE_24h), mechanical-assisted (MAE), chemically assisted (CAE), and ultrasound-assisted (UAE), and time of extraction on the content of total polyphenols (a), total flavonoids (b) and total phenolic acids (c) in comparison with commonly used solid–liquid extraction using 70% ethanol (70 E). Values marked with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

Overall, the pretreatment methods UAE, MAE, and EAE combined with 70% extraction exhibited comparable outcomes in terms of total polyphenols and total flavonoids when compared to extraction with 70% ethanol alone. However, regarding total phenolic acids, extraction with 70% ethanol alone and MAE yielded the highest content, while CAE and EAE proved to be less effective. Moreover, a comparison of the total polyphenols, total flavonoids, and total phenolic acids obtained after 4 h and 24 h enzymatic treatments of the sample showcased similar extraction efficiencies. Conversely, CAE extraction resulted

in significantly lower yields for total polyphenols, flavonoids, and total phenolic acids compared to other methods.

A similar trend across both individual (Table 1) and total biflavonoids (Figure 3) was observed, where UAE, MAE, and EAE yielded comparable results, while CAE resulted in lower amounts. The only exception was amentoflavone, which exhibited the highest concentration, significantly surpassing extraction solely in 70% ethanol, MAE, and CAE in an extract after EAE extraction over 24 h. Notably, in the analyzed sample, amentoflavone appeared in the lowest concentration among the biflavonoids, whereas sciadopitysin followed by isoginkgetin was the most abundant (Table 1).

Table 1. Influence of different pretreatment methods, enzyme-assisted for 4 h (EAE_4h), enzyme-assisted for 24 h (EAE_24h), mechanical-assisted (MAE), chemically assisted (CAE), and ultrasound-assisted (UAE), and time of extraction on the content of individual biflavonoids in comparison with commonly used solid–liquid extraction using 70% ethanol (70 E). Values marked with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

	70 E	EAE_4 h	EAE_24 h	MAE	UAE	CAE
Amentoflavone $\mu\text{g g}^{-1}\text{ dw}$	64.36 ± 4.17^b	66.81 ± 2.77^{ab}	69.95 ± 2.77^a	64.08 ± 0.38^b	65.95 ± 1.84^{ab}	44.72 ± 7.03^c
Bilobetin $\mu\text{g g}^{-1}\text{ dw}$	163.89 ± 14.50^a	166.01 ± 3.14^a	172.22 ± 1.58^a	167.21 ± 0.97^a	177.36 ± 12.12^a	108.52 ± 23.73^b
Ginkgetin $\mu\text{g g}^{-1}\text{ dw}$	607.68 ± 50.29^a	627.45 ± 10.33^a	646.03 ± 7.37^a	622.57 ± 3.25^a	634.54 ± 9.23^a	466.39 ± 55.55^a
Isoginkgetin $\mu\text{g g}^{-1}\text{ dw}$	945.83 ± 90.12^a	974.23 ± 18.60^a	1007.06 ± 13.21^a	969.24 ± 4.69^a	994.31 ± 15.45^a	630.82 ± 123.53^b
Sciadopitysin $\mu\text{g g}^{-1}\text{ dw}$	1387.56 ± 105.51^a	1430.17 ± 21.34^a	1461.27 ± 105.51^a	1419.03 ± 6.87^a	1450.39 ± 18.57^a	1054.89 ± 99.93^b

The individual biflavonoid contents mirror those of total biflavonoids (Figure 4), which ranged between 3169 and 3322 $\mu\text{g mg}^{-1}\text{ dw}$ in extracts prepared by all tested methods except CAE, which yielded significantly lower amounts of total biflavonoids ($2305.33 \pm 308.44 \mu\text{g g}^{-1}\text{ dw}$). Consequently, based on the obtained results, the CAE + 70% ethanol and EAE + 70% ethanol (24 h) methods were excluded from further experiments.

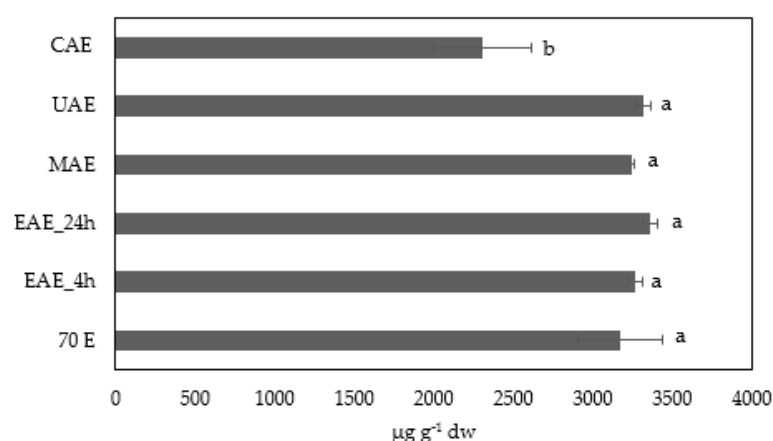


Figure 4. Influence of different pretreatment methods, enzyme-assisted for 4 h (EAE_4h), enzyme-assisted for 24 h (EAE_24h), mechanical-assisted (MAE), chemically assisted (CAE), and ultrasound-assisted (UAE), and time of extraction on the content of total biflavonoids in comparison with commonly used solid–liquid extraction using 70% ethanol (70 E). Values marked with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

3.2. Influence of Extraction Time on Total Polyphenols, Flavonoids, Phenolic Acids and Individual and Total Biflavonoids

In the second phase of the research, the impact of varying durations of the extraction process with 70% ethanol on the levels of total polyphenols, phenolic acids, flavonoids, individual biflavonoids (amentoflavone, bilobetin, ginkgetin, isoginkgetin, and sciadopitysin), and total bioflavonoids was explored. The results for total polyphenols, total flavonoids, and total phenolic acids can be observed in Figure 5.

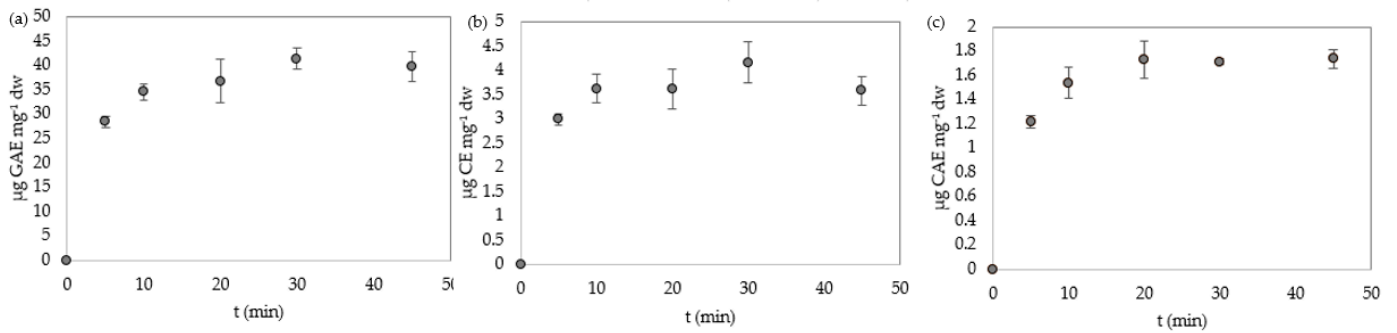


Figure 5. Dynamic change in total polyphenols (a), total flavonoids (b), and total phenolic acids (c) in extract of ginkgo leaves prepared with 70% ethanol.

As illustrated in Figure 5, within the first 10 min, the majority of total polyphenols, flavonoids, and phenolic acids are extracted in 70% ethanol, reaching their peak content within 20 min under the tested material–solvent ratio. Additionally, the extraction dynamics of biflavonoids, with results for individual (a–e) and total biflavonoids (f) were examined and presented in Figure 6.

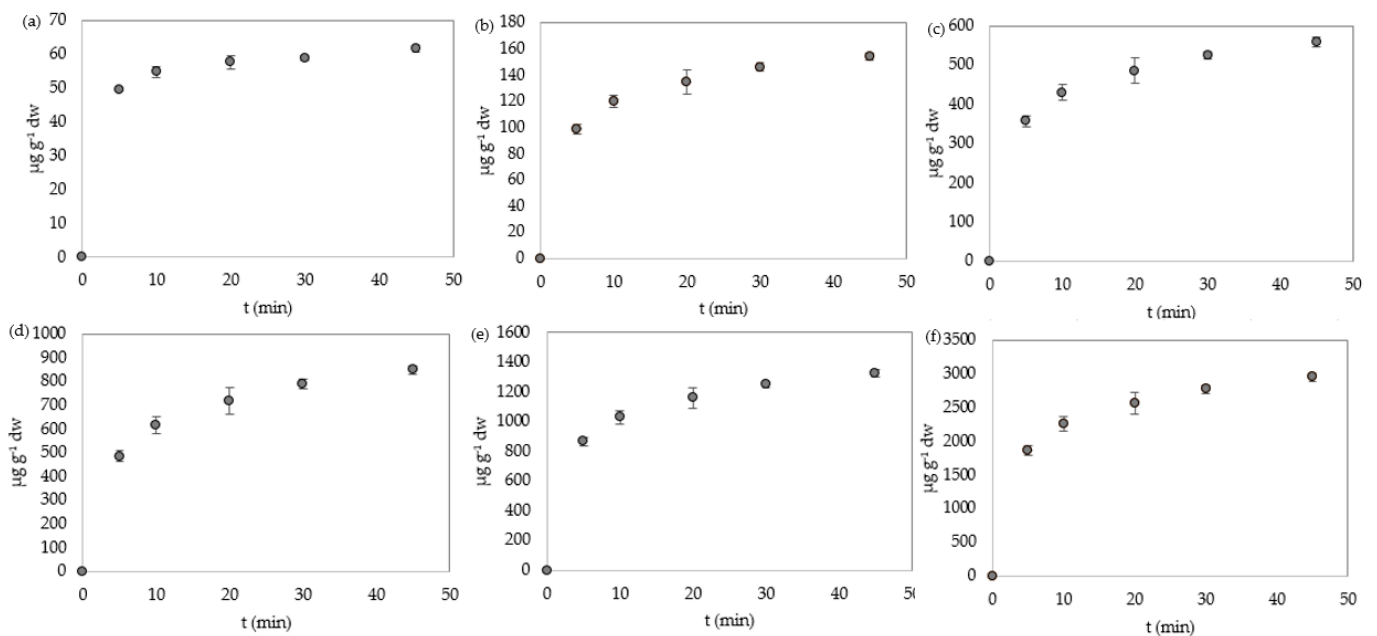


Figure 6. Dynamic change in amentoflavone (a), bilobetin (b), ginkgetin (c), isoginkgetin (d), sciadopitysin (e), and total biflavonoids (f) in an extract of ginkgo leaves prepared with 70% ethanol.

The obtained results revealed a positive correlation between the duration of the extraction process and the efficiency of extracting both individual and total biflavonoids content. This was evidenced by the consistent increase in the content of all tested biflavonoids within the extract. While intensive extraction occurred predominantly within the first 10–20 min, performed experiments demonstrated a time-dependent increase in biflavonoids throughout the 45 min duration, suggesting that prolonged extraction may enhance biflavonoids content.

Furthermore, the extraction efficiency of total polyphenols, total flavonoids, and total phenolic acids, along with individual and total biflavonoids, using assisted extraction methods such as UAE, MAE, and EAE was explored. Morphological SEM analyses of ginkgo leaf powder before and after extraction were also conducted (Figure 7). The results unveiled distinct morphological alterations on the surface of the ginkgo leaf powder induced by various treatments. Across all treated samples, microcracks and cellular-level changes were observed, resulting in a visibly different surface structure of the sample.

A comparative analysis of assisted extraction efficiency, employing UAE, MAE, and EAE, against extraction with 70% ethanol alone at both 5 min and 45 min durations was conducted (Figure 8, Table 2). Consistent with earlier observations, after 45 min of extraction using all three tested assisted methods, results comparable to those obtained using 70% ethanol alone were observed. Additionally, at the 5 min mark, comparable results for total polyphenols, flavonoids, and phenolic acids were observed.

Table 2. Comparison of the content of individual biflavonoids in extracts for different durations (5 min and 45 min) of the solid–liquid extraction using 70% ethanol (70 E), ultrasound-assisted (UAE), mechanical-assisted (MAE), and enzyme-assisted (EAE) extraction processes. Values marked with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

		Amentoflavone $\mu\text{g g}^{-1} \text{dw}$	Bilobetin $\mu\text{g g}^{-1} \text{dw}$	Ginkgetin $\mu\text{g g}^{-1} \text{dw}$	Isoginkgetin $\mu\text{g g}^{-1} \text{dw}$	Sciadopitysin $\mu\text{g g}^{-1} \text{dw}$
70 E	5 min	49.69 \pm 0.58 ^d	99.21 \pm 3.70 ^e	357.37 \pm 13.49 ^e	486.72 \pm 24.81 ^d	866.35 \pm 26.68 ^d
	45 min	64.36 \pm 4.17 ^{ab}	163.90 \pm 14.5 ^{ab}	607.68 \pm 50.30 ^{ab}	945.83 \pm 90.12 ^a	1387.56 \pm 105.51 ^a
UAE	5 min	56.82 \pm 1.59 ^c	124.89 \pm 5.55 ^{de}	439.37 \pm 21.24 ^{de}	632.18 \pm 37.92 ^{cd}	999.26 \pm 72.14 ^{cd}
	45 min	65.95 \pm 1.84 ^a	177.36 \pm 12.12 ^a	634.54 \pm 9.23 ^a	994.31 \pm 15.45 ^a	1450.34 \pm 18.57 ^a
MAE	5 min	59.07 \pm 0.70 ^{bc}	133.89 \pm 1.09 ^{cd}	467.50 \pm 7.23 ^{cd}	684.37 \pm 11.44 ^{bc}	1061.32 \pm 19.88 ^c
	45 min	64.08 \pm 0.38 ^{ab}	167.21 \pm 0.98 ^{ab}	622.57 \pm 3.25 ^a	969.24 \pm 4.69 ^a	1419.03 \pm 6.87 ^a
EAE	5 min	60.39 \pm 1.94 ^{bc}	150.83 \pm 11.24 ^{bc}	538.48 \pm 40.63 ^{bc}	812.89 \pm 74.21 ^b	1223.56 \pm 30.96 ^b
	45 min	66.81 \pm 2.77 ^a	166.01 \pm 3.14 ^{ab}	627.45 \pm 10.33 ^a	975.23 \pm 18.60 ^a	1430.17 \pm 21.30 ^a

However, assisted extraction (UAE, MAE, and EAE) exhibited higher amounts of amentoflavone, bilobetin, ginkgetin, isoginkgetin, sciadopitysin, and total biflavonoids compared to extraction with 70% ethanol alone at the 5 min mark (Table 2, Figure 9).

At 5 min, both EAE and MAE resulted in significantly higher amounts of total biflavonoids compared to extraction with 70% ethanol alone (Figure 9). This suggests that the tested assisted extraction methods may effectively reduce the extraction time for biflavonoids.

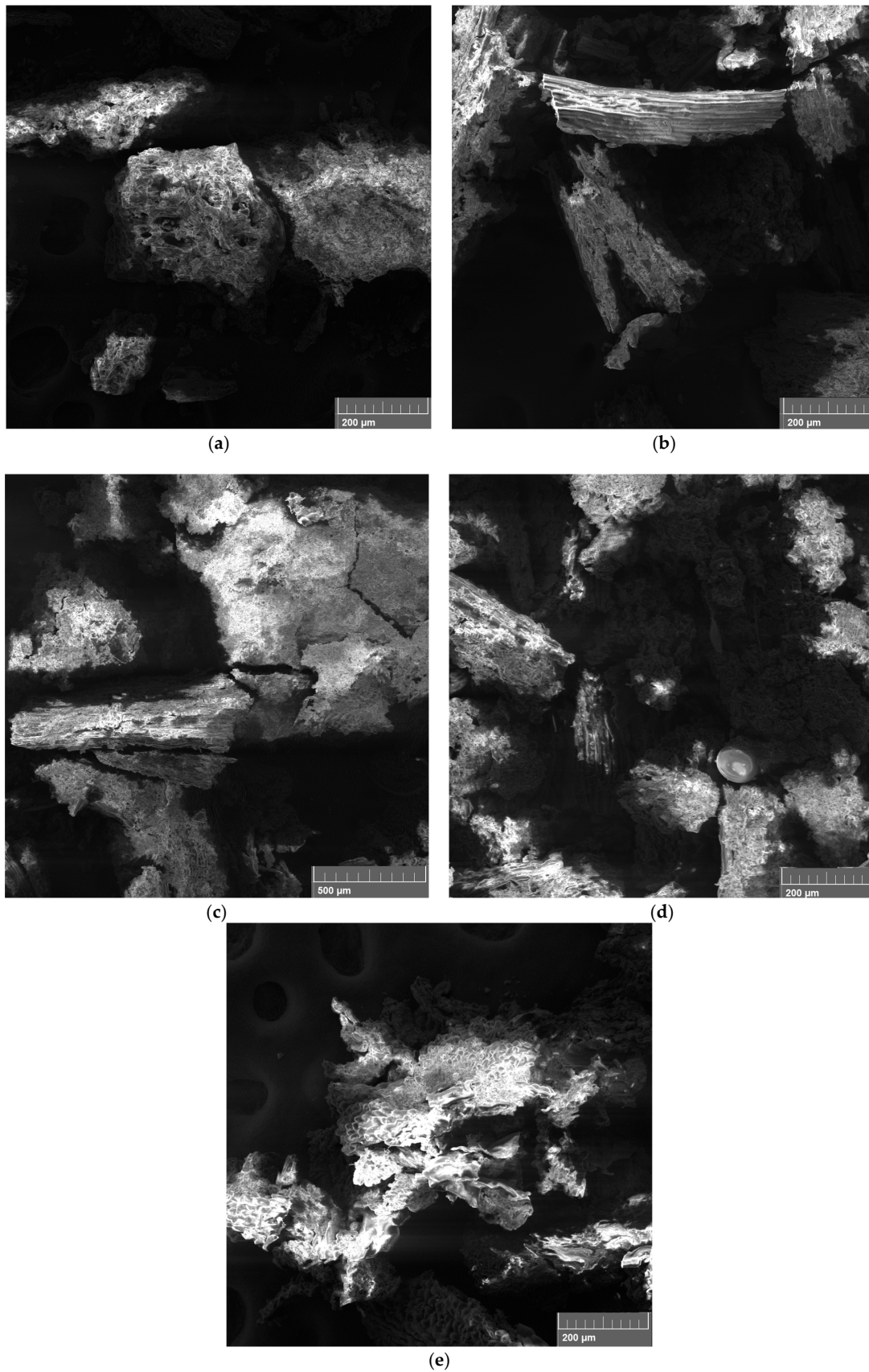


Figure 7. Morphological analysis of ginkgo sample (a) before extraction and after extraction with (b) 70% ethanol, (c) ultrasound-assisted (UAE) + 70% ethanol, (d) mechanical-assisted (MEA) + 70% ethanol and (e) enzyme-assisted (EAE) + 70% ethanol.

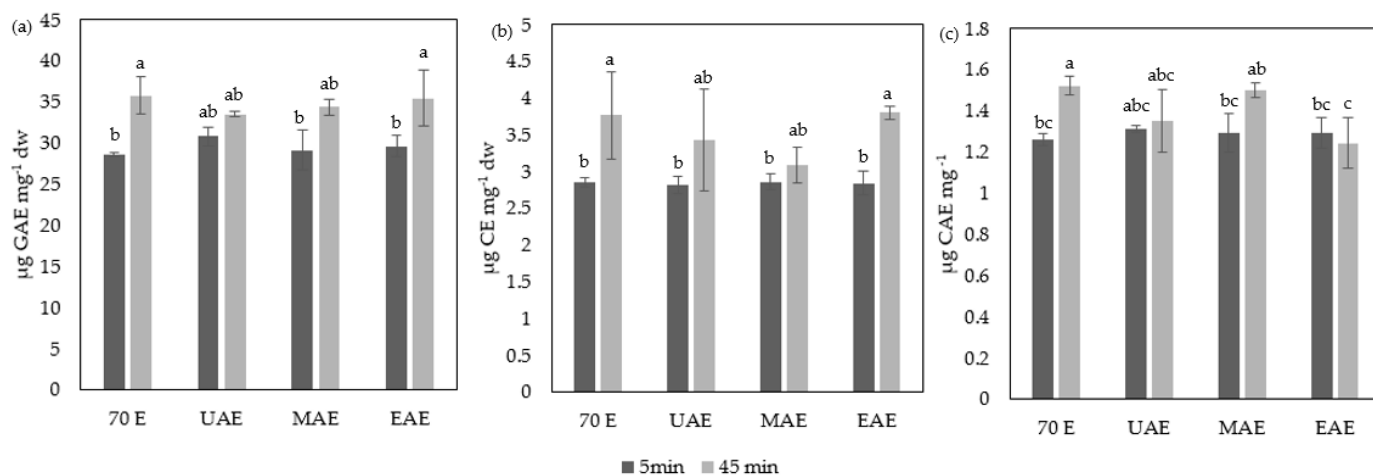


Figure 8. Comparison of the content of total polyphenols (a), flavonoids (b), and phenolic acids (c) in solid-liquid extraction using 70% ethanol (70 E), ultrasound-assisted (UAE), mechanical-assisted (MAE), and enzyme-assisted (EAE) extracts for different durations (5 min and 45 min) of the extraction process. Values marked with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

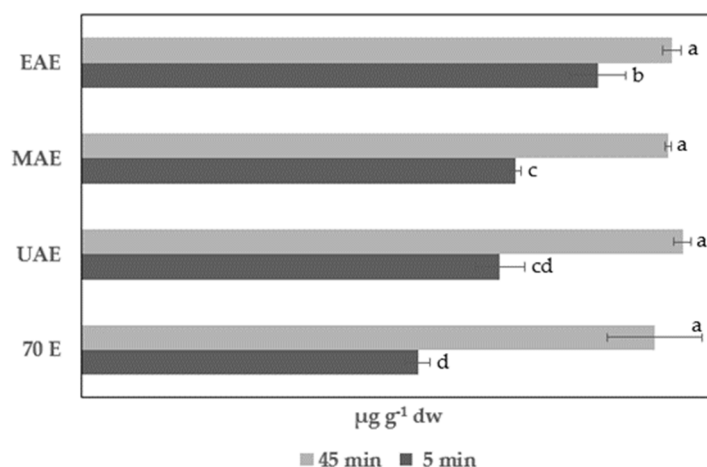


Figure 9. Comparison of the content of total biflavonoids in solid-liquid extraction using 70% ethanol (70 E), ultrasound-assisted (UAE), mechanical-assisted (MAE), and enzyme-assisted (EAE) extracts for different durations (5 min and 45 min) of the extraction process. Values marked with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

4. Discussion

In recent years, traditional extraction methods have undergone a significant transformation, giving way to modern techniques meticulously designed to reduce reliance on organic solvents and streamline extraction processes [32]. These innovations are underpinned by a dual commitment to enhancing efficiency and promoting environmental sustainability. In this study, SLE, EAE, UAE, MEA, and CAE were compared. Different treatments induced varied morphological changes on the surface of ginkgo leaf powder (Figure 7), aligning with the existing literature findings [33]. The analysis of SEM photos (Figure 7) of ginkgo leaf powder before and after the application of various extraction methods revealed significant changes in morphological structure. While the structure of the powder before treatment was smooth with adjacent holes of the cell wall arranged densely, the surface of ginkgo leaf powder was damaged severely after the treatments. After the mechanical and ultrasound treatment many cracks appeared on the samples due to cavitation and mechanical friction. When it comes to samples treated with enzymes, lots of new holes appeared and adjacent holes were loosely arranged like in the results reported

by Zhang et al. [34]. In the sample treated with 70% ethanol, no significant morphological change was noticed.

Among all evaluated assisted methods, except CAE, comparable amounts of total polyphenols and total flavonoids were obtained, significantly higher than those from CAE (Figure 3). Furthermore, extracts prepared with CAE exhibited significantly lower total phenolic acids content compared to those from SLE with 70% ethanol and UAE and MAE, indicating the superior efficiency of the latter methods. Thus far, it has been reported that mechanochemical-assisted extraction (MCAE), employing 21% solid reagent (NaHCO_3) followed by milling, enhances the content of both total flavonoids and monomeric ones in ginkgo extracts [26]. Conversely, in contrast to our findings, CAE yielded significantly lower amounts and was not investigated further regarding extraction time. For EAE in our study, a blend of beta-glucanases, pectinases, hemicellulases, and xylanases was employed, which did not yield higher amounts of total polyphenols, flavonoids, and phenolic acids than in an extraction using just 70% ethanol for 45 min. This contrasts with the findings by Chen et al. [24], who reported increased total flavonoid content in ginkgo leaves pretreated with cellulose and pectinase compared to the control without enzymes. Han et al. [23] also highlighted the significant role of enzymes like polygalacturonase and β -glucosidase in flavonoid extraction. UAE is often recommended in the literature for extracting total flavonoids from ginkgo leaves [35,36], and presented results show comparable efficacy after 45 min as with extraction using 70% ethanol alone. However, as evident from Figure 8, UAE yielded statistically similar results after 5 min as after 45 min, suggesting accelerated extraction of total polyphenols, flavonoids, and total phenolic acids. The literature data showed the beneficial effects of UAE also for extracting other compounds from ginkgo leaves such as polysaccharides [37,38] and ginkgolides [39]. Also, UAE has shown promising results for extraction compounds such as terpene lactones from ginkgo seeds [40]. Similar to UAE, in our experiments MAE demonstrated comparable results for total polyphenols, flavonoids, and phenolic acids after 5 min and 45 min, indicating accelerated extraction with this method as well. In the case of extraction with 70% ethanol alone, the majority of total polyphenols, flavonoids, and phenolic acids were extracted within the first 20 min, after which the amount plateaued (Figure 5). The literature varies regarding extraction times for these compounds from ginkgo without assisted extraction, with Cui et al. [41] performing extractions for 4 h by shaking ginkgo leaves material on a laboratory rotary shaker with different solvents, reporting the highest amounts of total polyphenols and flavonoids in ethanol and methanol extracts. Kobus et al. [42] used maceration for 16 h hours for total flavonoid extraction, but results obtained in our study suggest that such prolonged extraction may not be necessary.

While measurements of total polyphenols, flavonoids, and phenolic acid content are commonly used for optimizing flavonoid extraction from ginkgo leaves [22,26,35,36,41,42], these methods are known to lack specificity [43]. Considering the diverse chemical structures of flavonoids, it is imperative to evaluate the extraction efficiency of each individual compound. In this study, we focused on a less studied group of flavonoids—biflavonoids, specifically the five most abundant biflavonoids in ginkgo leaves [6]. In all the extracts analyzed, amentoflavone, bilobetin, ginkgetin, isoginkgetin, and sciadopitysin were identified. Sciadopitysin was the most abundant, followed by isoginkgetin, which is consistent with the literature data [6,21,28,44]. Similar to total polyphenols and flavonoids, UAE, MAE, and EAE yielded comparable results, while CEA resulted in lower amounts of individual (Table 1) and total biflavonoids (Figure 4) after 45 min of extraction. The exception was amentoflavone, which showed significantly higher amounts in extracts after EAE for 24 h compared to extraction in 70% ethanol alone, MAE, and CEA. This suggests that the localization of amentoflavone within plant tissue/cells benefits from applied enzyme treatments, enhancing its extraction. According to the literature data and MALDI imaging, amentoflavone is localized in the outer part of leaves/tissues [44,45]. Time significantly influences the extraction of all biflavonoids when using only 70% ethanol without pretreatments; a constant increase in individual as well as total biflavonoid content over a 45 min

period, with the highest increase occurring in the first 10 min was observed in this study (Figure 6). With assisted extractions (UAE, MAE, and EAE), longer extraction durations also resulted in higher amounts of all individual and total biflavonoids (Table 2, Figure 9). However, similar to the results for total polyphenols, flavonoids, and phenolic acids, higher amounts of all biflavonoids in extracts prepared with pretreatments compared to those without at the 5 min mark were observed. Significantly higher amounts were observed, especially for MAE and EAE. According to the results of this study, these techniques reduce extraction time, enabling the extraction of the highest amounts of biflavonoids in a shorter period using these methods. This aligns with the existing literature, where these techniques are acknowledged as green extraction methods due to their ability to shorten extraction duration and thereby decrease processing costs [20,46]. According to our results, UAE demonstrated higher total and individual biflavonoids content after 5 min of extraction compared to extraction with 70% ethanol alone. However, this increase was statistically significant only for amentoflavone. Lei et al. [28] reported that ultrasonic-assisted ionic liquid extraction may be utilized for extracting four biflavonoids from ginkgo: bilobetin, isoginkgetin, ginkgetin, and sciadopitysin. Similar to our findings, they noted sciadopitysin as the most abundant biflavonoids, followed by isoginkgetin and ginkgetin, with bilobetin being the least abundant. Our findings concerning individual biflavonoids underscore slight variability in extraction dynamics and kinetics due to their diverse chemical structures (Table 2) which is consistent with the finding of Lei et al. [28]. Consequently, for extraction optimization, it is preferable to employ methods capable of identifying individual compounds rather than relying on nonspecific techniques that measure the total content of compounds within a group, as is commonly seen in the literature.

5. Conclusions

In recent years, advancements in extraction techniques have aimed to enhance efficiency and environmental sustainability by minimizing reliance on organic solvents. In this study, various assisted extraction methods, including SLE, EAE, UAE, MAE, and CAE were compared focusing on ginkgo leaf powder. Distinct morphological changes induced by different treatments, consistent with previous research, were observed. Except for CAE extraction, comparable levels of total polyphenols and flavonoids were obtained, surpassing those from CAE. UAE showed comparable efficiency to SLE after 45 min, while EAE and MAE demonstrated higher efficiency after 5 min of extraction. Time significantly influenced extraction efficiency, particularly for biflavonoids, with the highest increase observed within the first 10 min. As per our results, assisted extraction methods such as EAE and MAE may reduce extraction time, facilitating efficient extraction of target compounds. This marks the initial report on biflavonoids, and we advocate for further studies delving into the kinetics of each assisted extraction method and its impact on specific biflavonoids. This study also underscores the importance of considering specific compounds and extraction dynamics when optimizing extraction processes for ginkgo leaves.

Author Contributions: Conceptualization, A.Š. and D.Š.; methodology, A.Š.; formal analysis, L.Š. and I.T.; investigation, L.Š. and I.T.; writing—original draft preparation, D.Š.; writing—review and editing, D.Š., A.Š. and B.Z.; visualization, D.Š. and A.Š.; supervision, A.Š. and B.Z.; project administration, D.Š.; funding acquisition, D.Š. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Croatian Science Foundation project “Biflavonoids role in plants: *Ginkgo biloba* L. as a model system” under Project No. UIP-2019-04-1018.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors on request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Akaberi, M.; Baharara, H.; Amiri, M.S.; Moghadam, A.T.; Sahebkar, A.; Emami, S.A. Ginkgo Biloba: An Updated Review on Pharmacological, Ethnobotanical, and Phytochemical Studies. *Pharmacol. Res.-Mod. Chin. Med.* **2023**, *9*, 100331. [[CrossRef](#)]
2. Lin, H.; Li, W.; Lin, C.; Wu, H.; Zhao, Y. International Biological Flora: Ginkgo Biloba. *J. Ecol.* **2022**, *110*, 951–982. [[CrossRef](#)]
3. Šamec, D.; Karalija, E.; Dahija, S.; Hassan, S.T.S. Biflavonoids: Important Contributions to the Health Benefits of Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.). *Plants* **2022**, *11*, 1381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. 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.* **2021**, *193*, 113704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Tatlı Çankaya, İ.İ.; Devkota, H.P.; Zengin, G.; Šamec, D. Neuroprotective Potential of Biflavone Ginkgetin: A Review. *Life* **2023**, *13*, 562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Kovač Tomas, M.; Jurčević, I.; Šamec, D. Tissue-Specific Profiling of Biflavonoids in Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.). *Plants* **2022**, *12*, 147. [[CrossRef](#)]
7. Shen, N.; Wang, T.; Gan, Q.; Liu, S.; Wang, L.; Jin, B. Plant Flavonoids: Classification, Distribution, Biosynthesis, and Antioxidant Activity. *Food Chem.* **2022**, *383*, 132531. [[CrossRef](#)]
8. Kumar, S.; Pandey, A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci. World J.* **2013**, *2013*, 162750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Jurčević Šangut, I.; Šarkanj, B.; Karalija, E.; Šamec, D. A Comparative Analysis of Radical Scavenging, Antifungal and Enzyme Inhibition Activity of 3'-8''-Biflavones and Their Monomeric Subunits. *Antioxidants* **2023**, *12*, 1854. [[CrossRef](#)]
10. Jurinjak Tušek, A.; Šamec, D.; Šalić, A. Modern Techniques for Flavonoid Extraction—To Optimize or Not to Optimize? *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 11865. [[CrossRef](#)]
11. Chávez-González, M.L.; Sepúlveda, L.; Verma, D.K.; Luna-García, H.A.; Rodríguez-Durán, L.V.; Ilina, A.; Aguilar, C.N. Conventional and Emerging Extraction Processes of Flavonoids. *Processes* **2020**, *8*, 434. [[CrossRef](#)]
12. Tzanova, M.; Atanasov, V.; Yaneva, Z.; Ivanova, D.; Dinev, T. Selectivity of Current Extraction Techniques for Flavonoids from Plant Materials. *Processes* **2020**, *8*, 1222. [[CrossRef](#)]
13. Kumar, M.; Dahuja, A.; Tiwari, S.; Punia, S.; Tak, Y.; Amarowicz, R.; Bhoite, A.G.; Singh, S.; Joshi, S.; Panesar, P.S.; et al. Recent Trends in Extraction of Plant Bioactives Using Green Technologies: A Review. *Food Chem.* **2021**, *353*, 129431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Yi Ling, Y.; Sook Fun, P.; Yeop, A.; Yusoff, M.M.; Gimbin, J. Assessment of Maceration, Ultrasonic and Microwave Assisted Extraction for Total Phenolic Content, Total Flavonoid Content and Kaempferol Yield from Cassia Alata via Microstructures Analysis. *Mater. Today Proc.* **2019**, *19*, 1273–1279. [[CrossRef](#)]
15. Liao, J.; Guo, Z.; Yu, G. Process Intensification and Kinetic Studies of Ultrasound-Assisted Extraction of Flavonoids from Peanut Shells. *Ultrason. Sonochem.* **2021**, *76*, 105661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Zimare, S.B.; Mankar, G.D.; Barmukh, R.B. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Total Phenolics and Flavonoids from the Leaves of Lobelia Nicotianifolia and Their Radical Scavenging Potential. *Curr. Res. Green Sustain. Chem.* **2021**, *4*, 100109. [[CrossRef](#)]
17. Saeed, R.; Ahmed, D.; Mushtaq, M. Ultrasound-Aided Enzyme-Assisted Efficient Extraction of Bioactive Compounds from *Gymnema Sylvestre* and Optimization as per Response Surface Methodology. *Sustain. Chem. Pharm.* **2022**, *29*, 100818. [[CrossRef](#)]
18. Krakowska, A.; Rafińska, K.; Walczak, J.; Buszewski, B. Enzyme-Assisted Optimized Supercritical Fluid Extraction to Improve *Medicago Sativa* Polyphenolics Isolation. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *124*, 931–940. [[CrossRef](#)]
19. Wu, K.; Ju, T.; Deng, Y.; Xi, J. Mechanochemical Assisted Extraction: A Novel, Efficient, Eco-Friendly Technology. *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *66*, 166–175. [[CrossRef](#)]
20. Fan, L.; Fan, W.; Mei, Y.; Liu, L.; Li, L.; Wang, Z.; Yang, L. Mechanochemical Assisted Extraction as a Green Approach in Preparation of Bioactive Components Extraction from Natural Products—A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2022**, *129*, 98–110. [[CrossRef](#)]
21. Sati, P.; Dhyani, P.; Bhatt, I.D.; Pandey, A. Ginkgo Biloba Flavonoid Glycosides in Antimicrobial Perspective with Reference to Extraction Method. *J. Tradit. Complement. Med.* **2019**, *9*, 15–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Yang, M. Efficient Extraction of Bioactive Flavonoids from Ginkgo Biloba Leaves Using Deep Eutectic Solvent/Water Mixture as Green Media. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **2018**, *32*, 315–324. [[CrossRef](#)]
23. Han, S.; Chio, C.; Ma, T.; Mokale Kognou, A.L.; Shrestha, S.; Chen, F.; Qin, W. Extracting Flavonoid from Ginkgo Biloba Using Lignocellulolytic Bacteria *Paenarthrobacter* sp. and Optimized via Response Surface Methodology. *Biofuels Bioprod. Biorefining* **2021**, *15*, 867–878. [[CrossRef](#)]
24. Chen, S.; Xing, X.-H.; Huang, J.-J.; Xu, M.-S. Enzyme-Assisted Extraction of Flavonoids from Ginkgo Biloba Leaves: Improvement Effect of Flavonol Transglycosylation Catalyzed by *Penicillium Decumbens* Cellulase. *Enzyme Microb. Technol.* **2011**, *48*, 100–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Wang, J.; Cao, F.; Su, E.; Wu, C.; Zhao, L.; Ying, R. Improving Flavonoid Extraction from Ginkgo Biloba Leaves by Prefermentation Processing. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 5783–5791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Zhu, X.-Y.; Mang, Y.-L.; Xie, J.; Wang, P.; Su, W.-K. Response Surface Optimization of Mechanochemical-Assisted Extraction of Flavonoids and Terpene Trilactones from Ginkgo Leaves. *Ind. Crops Prod.* **2011**, *34*, 1041–1052. [[CrossRef](#)]

27. Amoussa, A.M.O.; Zhang, L.; Lagnika, C.; Riaz, A.; Zhang, L.; Liu, X.; Beta, T. Effects of Preheating and Drying Methods on Pyridoxine, Phenolic Compounds, Ginkgolic Acids, and Antioxidant Capacity of *Ginkgo Biloba* Nuts. *J. Food Sci.* **2021**, *86*, 4197–4208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Lei, J.; Jiang, Y.; Luo, X.; Zheng, Y.; Zhu, L.; Sun, C.; Linghu, L.; Qin, C.; Gang, W. Ultrasonic-Assisted Ionic Liquid Extraction of Four Biflavonoids from *Ginkgo biloba* L. *ChemistrySelect* **2021**, *6*, 3297–3307. [[CrossRef](#)]
29. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158. [[CrossRef](#)]
30. Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and Their Scavenging Effects on Superoxide Radicals. *Food Chem.* **1999**, *64*, 555–559. [[CrossRef](#)]
31. *European Pharmacopoeia*; Council of Europe: Strasbourg, France, 2004; pp. 2377–2378.
32. López-Cruz, R.; Sandoval-Contreras, T.; Iñiguez-Moreno, M. Plant Pigments: Classification, Extraction, and Challenge of Their Application in the Food Industry. *Food Bioprocess Technol.* **2023**, *16*, 2725–2741. [[CrossRef](#)]
33. Chemat, F.; Rombaut, N.; Sicaire, A.-G.; Meullemiestre, A.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Abert-Vian, M. Ultrasound Assisted Extraction of Food and Natural Products. Mechanisms, Techniques, Combinations, Protocols and Applications. A Review. *Ultrason. Sonochem.* **2017**, *34*, 540–560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zhang, C.-W.; Wang, C.-Z.; Tao, R. Analysis on the Physicochemical Properties of Ginkgo Biloba Leaves after Enzymolysis Based Ultrasound Extraction and Soxhlet Extraction. *Molecules* **2016**, *21*, 97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Gao, H.; Liu, B.; Nan, H.; Chen, C.; Li, L. Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Flavonoids with Ethanol from Ginkgo Leaves by Response Surface Methodology. In Proceedings of the 2009 IEEE International Symposium on IT in Medicine & Education, Albuquerque, NM, USA, 3–4 August 2009; pp. 1154–1157.
36. Zhou, G.; Ma, J.; Tang, Y.; Wang, X.; Zhang, J.; Yao, X.; Jiang, W.; Duan, J.-A. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction Followed by Macroporous Resin Purification for Maximal Recovery of Functional Components and Removal of Toxic Components from Ginkgo Biloba Leaves. *Biomed. Res. Int.* **2018**, *2018*, 4598067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Li, J.; Chen, Z.; Shi, H.; Yu, J.; Huang, G.; Huang, H. Ultrasound-Assisted Extraction and Properties of Polysaccharide from Ginkgo Biloba Leaves. *Ultrason. Sonochem.* **2023**, *93*, 106295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Zhang, L.; Guo, S.; Wang, M.; He, L. PEG-Based Ultrasound-Assisted Enzymatic Extraction of Polysaccharides from Ginkgo Biloba Leaves. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *80*, 644–650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Zhou, G.; Ma, J.; Tang, Y.; Wang, X.; Zhang, J.; Duan, J.-A. Multi-Response Optimization of Ultrasonic Assisted Enzymatic Extraction Followed by Macroporous Resin Purification for Maximal Recovery of Flavonoids and Ginkgolides from Waste Ginkgo Biloba Fallen Leaves. *Molecules* **2018**, *23*, 1029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Zhou, G.; Yao, X.; Tang, Y.; Qian, D.; Su, S.; Zhang, L.; Jin, C.; Qin, Y.; Duan, J. An Optimized Ultrasound-Assisted Extraction and Simultaneous Quantification of 26 Characteristic Components with Four Structure Types in Functional Foods from Ginkgo Seeds. *Food Chem.* **2014**, *158*, 177–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Cui, N.; Zhang, L.; Quan, M.; Xu, J. Profile of the Main Bioactive Compounds and in Vitro Biological Activity of Different Solvent Extracts from Ginkgo Biloba Exocarp. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 45105–45111. [[CrossRef](#)]
42. Kobus, J.; Flaczyk, E.; Siger, A.; Nogala-Kałucka, M.; Korczak, J.; Pegg, R.B. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Extracts of Ginkgo Leaves. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2009**, *111*, 1150–1160. [[CrossRef](#)]
43. Ignat, I.; Volf, I.; Popa, V.I. A Critical Review of Methods for Characterisation of Polyphenolic Compounds in Fruits and Vegetables. *Food Chem.* **2011**, *126*, 1821–1835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Beck, S.; Stengel, J. Mass Spectrometric Imaging of Flavonoid Glycosides and Biflavonoids in Ginkgo Biloba L. *Phytochemistry* **2016**, *130*, 201–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Šamec, D.; Pierz, V.; Srividya, N.; Wüst, M.; Lange, B.M. Assessing Chemical Diversity in *Psilotum nudum* (L.) Beauv., a Pantropical Whisk Fern That Has Lost Many of Its Fern-like Characters. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 459690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Nadar, S.S.; Rao, P.; Rathod, V.K. Enzyme Assisted Extraction of Biomolecules as an Approach to Novel Extraction Technology: A Review. *Food Res. Int.* **2018**, *108*, 309–330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.