

# Učinak proteina, ugljikohidrata i ulja na bioraspoloživost polifenola i biološke učinke ekstrakta lista vrste Ginkgo biloba L.

---

Nikša, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:012426>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Ema Nikša

**Učinak proteina, ugljikohidrata i ulja na  
bioraspoloživost polifenola i biološke učinke  
ekstrakta lista vrste *Ginkgo biloba* L.**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Ema Nikša

**The effect of proteins, carbohydrates and  
oils on bioavailability of polyphenols and  
bioactivities of *Ginkgo biloba* L. leaf extract**

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za fitokemiju na Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom prof. dr. sc. Gordane Rusak, te neposrednim voditeljstvom dr. sc. Valerije Vujčić Bok. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

## *Zahvale*

*Za početak najveća zahvala mentorici prof. dr. sc. Gordani Rusak na pruženoj prilici i predivnom iskustvu u sklopu kojeg sam dobila priliku upotpuniti znanje na ovom području i dodatno učiti. Hvala za sve prijedloge, komentare i sugestije prilikom izvedbe i izrade istraživanja odnosno diplomskog rada.*

*Neizmjereno hvala dr. sc. Valeriji Vujčić Bok koja mi je uvelike pomogla oko provedbe i realizacije ovog rada. U suradnji sam puno toga naučila zajedno s načinima razmišljanja i pristupom prema zadanoj temi. Hvala na svim komentarima i sugestijama, ali i ugodnom društvu i toplim čajevima prilikom izrade rada.*

*Hvala svim mojim curama (Mia, Ivona, Lorena, Jelena, Ivona) koje su vjerovale u mene cijelo vrijeme. Hvala Ani na svim satima koje smo provele zajedno učeći bez kojih bi se ovo studiranje odužilo.*

*Hvala Mariju na strpljenju, pozitivnoj energiji, svim šalama i društvu kad sam bila pod najvećim stresom.*

*Hvala kumi i kumu koji su bili tu u svakom trenutku.*

*I za kraj, najveće hvala mami i tati, ali i ostatku obitelji (Marinu, Vjeki, noni, baki i didu) koji su uvijek bili najveća podrška kako fizička tako i psihička i bez kojih ništa od ovog ne bih ostvarila.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Učinak proteina, ugljikohidrata i ulja na bioraspoloživost polifenola i biološke učinke ekstrakta lista vrste *Ginkgo biloba* L.

Ema Nikša

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

*Ginkgo biloba* L. biljna je vrsta iz porodice *Ginkgoaceae* i poznata je po imenu „Ginko“ ili prema lokalnim imenima „Yin-xing“ u Kini i „Icho“ u Japanu. Ekstrakt lišća ginka koristi se u fitoterapiji i kao dodatak prehrani. Ima utjecaj na poboljšanje cerebralne cirkulacije, na mršavljenje, antidiabetički, antihipertenzivni i hipolipemični učinak zbog čega se koriste za liječenje kardiovaskularnih bolesti. Cilj ovog rada je ispitati učinak proteina kazeina, glukoze i ulja na biodostupnost bioaktivnih tvari (fenola, flavonoida, fenolnih i hidroksicimetnih kiselina, flavanola, flavonola, proantocijanidina, terpenkih trilaktona) te na antioksidacijsku i antidijabetičku aktivnost i pomoć pri mršavljenju ekstrakta ginka u uvjetima probave *in vitro*. Koristeći spektrofotometrijske metode za određivanje koncentracije fitokemikalija, aktivnosti lipaze,  $\alpha$ -amilaze,  $\alpha$ -glukozidaze, glikacije albumina goveda i antioksidacijske aktivnosti, te analizu uzoraka ginka kromatografijom visoke moći razlučivanja i statističke metode (jednosmjerna ANOVA, Duncan test i analizu glavnih komponenti) utvrdila sam da primjena tableta ginka na prazan želudac ili uz hranu te sastav te hrane ovisi o tome koji biološki učinak prvenstveno želimo postići. Što znači da treba imati drugačiji pristup u kombinaciji tableta ginka i hrane ako se radi o poboljšanju cerebralne cirkulacije i pamćenja, antioksidativnom ili antidijabetičkom učinku ili pomoći pri mršavljenju.

(80 stranica, 28 slika, 12 tablica, 89 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: ginko, biodostupnost, antioksidativna aktivnost, antidijabetička aktivnost, mršavljenje.

Voditelj: prof. dr. sc. Gordana Rusak

Neposredni voditelj: dr. sc. Valerija Vujčić Bok

Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek

prof. dr. sc. Ines Radanović

Zamjena: prof. dr. sc. Tajana Begović

Rad prihvaćen: 13.01.2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master Thesis

# The effect of proteins, carbohydrates and oils on bioavailability of polyphenols and bioactivities of *Ginkgo biloba* L. leaf extract

Ema Nikša

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

*Ginkgo biloba* L. is a plant species from *Ginkgoaceae* family, and is famous by name „Ginko“ or by local names „Yin-xing“ in China and „Icho“ in Japan. Extract of ginkgo leaves is used in phytotherapy and as a dietary supplement. It has effect on cerebral circulation, weight loss and antidiabetic, antihypertensive and hypolipemic effect wherefore is used for cardiovascular disease treatment. The main purpose of this thesis is to evaluate the effect of proteins, carbohydrates and oils on bioavailability of bioactive compounds (phenols, flavonoids, phenolic and hydroxy cinnamic acids, flavanoids, flavonols, proanthocyanidins, triterpene lactones), antioxidant and antidiabetic effects, and weight loss effect of ginkgo leaves extracts in conditions of digestion *in vitro*. Using spectrophotometric methods to determine the concentration of phytochemicals, lipase,  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activity, BSA glycation and antioxidant activity, HPLC analysis as well as statistical methods (one-way ANOVA, Duncan test and principal component analysis), I have confirmed that the use of ginkgo tablets on an empty stomach or with food, as well as the composition of these foods, depend on which biological effect we primarily want to achieve. Therefore, a different approach should be taken when combining ginkgo tablets with food.

(80 pages, 28 figures, 12 tables, 89 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: ginkgo, bioavailability, antioxidant, antidiabetic activity, weight loss

Supervisor: prof. dr. sc. Gordana Rusak

Assistant Supervisor: dr. sc. Valerija Vujčić Bok

Reviewers: izv. prof. dr. sc. Draganja Mrvoš-Sermek

prof. dr. sc. Ines Radanović

prof. dr. sc. Tajana Begović

Thesis accepted: 13.01.2022.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Povijest i sistematika vrste <i>Ginkgo biloba</i> L. ....	1
1.2. Anatomija i morfologija vrste <i>Ginkgo biloba</i> L. ....	2
1.3. Fiziologija i specifični sekundarni metaboliti vrste <i>Ginkgo biloba</i> L. ....	2
1.3.1. Fenoli .....	3
1.3.2. Flavonoidi .....	4
1.3.3. Fenolne kiseline .....	5
1.3.4. Terpeni.....	6
1.4. Pozitivna svojstva i učinci ekstrakta lišća ginka .....	7
1.5. Toksikologija i sigurnosni podaci vrste <i>Ginkgo biloba</i> L. ....	8
1.6. Probava, apsorpcija i bioraspodivnost fenolnih spojeva i triterpenskikh laktona .....	8
1.7. Istraživanja o oralnoj primjeni ekstrakta ginka .....	9
1.8. Teoretske osnove spektrofotometrijskih metoda.....	10
1.9. Teoretske osnove kromatografije visoke moći razlučivanja (HPLC).....	11
<b>2. CILJ</b> .....	<b>13</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>14</b>
3.1. Probava u uvjetima <i>in vitro</i> .....	14
3.1.1. Materijali i pribor za probavu u uvjetima <i>in vitro</i> .....	14
3.1.2. Opis metode probave <i>in vitro</i> .....	14
3.2. Spektrofotometrijska mjerenja .....	15
3.2.1. Određivanje ukupnih fenola.....	15
3.2.2. Određivanje ukupnih flavonoida .....	16
3.2.3. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina.....	17
3.2.4. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola .....	17
3.2.5. Određivanje ukupnih flavanola .....	18
3.2.6. Određivanje ukupnih proantocijanidina.....	19
3.2.7. Određivanje ukupnih terpenskih trilaktona .....	19
3.2.8. Određivanje antioksidacijske aktivnosti metodom DPPH .....	20
3.2.9. Određivanje antioksidacijske aktivnosti metodom ABTS.....	21
3.2.10. Određivanje antioksidacijske aktivnosti metodom FRAP.....	21
3.2.11. Određivanje antidijabetičke aktivnosti – inhibicija enzima $\alpha$ -amilaze.....	22
3.2.12. Određivanje antidijabetičke aktivnosti – inhibicija enzima $\alpha$ -glukozidaze .....	23
3.2.13. Inhibicija lipaze .....	23



3.2.14.	Glikacija albumina seruma goveda (BSA) .....	24
3.3.	Kromatografija visoke moći razlučivanja (HPLC) .....	24
3.3.1.	Materijali i pribor za kromatografiju visoke moći razlučivanja .....	25
3.3.2.	Priprema uzoraka za HPLC.....	25
3.4.	HPLC analiza .....	25
3.5.	Biodostupnost fitokemikalija.....	26
3.6.	Statistička analiza .....	26
<b>4.</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>27</b>
4.1.	Ukupni fenoli .....	27
4.2.	Ukupni flavonoidi .....	29
4.3.	Ukupne fenolne kiseline .....	31
4.4.	Ukupne hidroksicimetne kiseline .....	33
4.5.	Ukupni flavonoli .....	35
4.6.	Ukupni flavanoli.....	37
4.7.	Ukupni proantocijanidini .....	39
4.8.	Ukupni terpenški trilaktoni.....	41
4.9.	Normirani rezultati biodostupnosti ukupnih polifenolnih skupina i triterpenskih laktona ..	45
4.10.	Određivanje antioksidacijske aktivnosti metodom DPPH .....	47
4.11.	Određivanje antioksidacijske aktivnosti metodom ABTS.....	48
4.12.	Određivanje antioksidacijske aktivnosti metodom FRAP.....	49
4.13.	Određivanje antidijabetičke aktivnosti – inhibicija enzima $\alpha$ -amilaze .....	50
4.14.	Određivanje antidijabetičke aktivnosti – inhibicija enzima $\alpha$ -glukozidaze .....	51
4.15.	Inhibicija enzima lipaze.....	52
4.16.	Glikacija albumina seruma goveda (BSA) .....	53
4.17.	Rezultati analize kromatografije visoke moći razlučivanja (HPLC) .....	54
4.17.1.	Kvercetin.....	55
4.17.2.	Kempferol.....	56
4.17.3.	Izoramnetin .....	57
4.18.	Ukupni identificirani flavonoli .....	58
4.19.	Biodostupnost pojedinačnih i ukupnih identificiranih flavonola .....	59
4.20.	Normirane vrijednosti biodostupnosti pojedinačnih i ukupnih identificiranih flavonola .	60
4.21.	Analiza glavnih komponenti (PCA) .....	62
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>64</b>
5.1.	Udio i biodostupnost fitokemikalija .....	64

5.2.	Antioksidacijska aktivnost .....	67
5.3.	Antidijabetička aktivnost i utjecaj na mršavljenje.....	69
5.4.	HPLC analiza .....	72
5.5.	Analiza glavnih komponenti (eng. Principal Component Analysis -PCA) .....	73
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>74</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>75</b>
<b>8.</b>	<b>ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>80</b>

## KRATICE

ABTS... 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonska kiselina

BSA...albumin seruma goveda (eng. bovine serum albumin)

C...katehin (eng. catechin)

CA...kavena kiselina (eng. caffeic acid)

CBG... citosolna  $\beta$ -glikozidaza

DMACA... *p*-dimetilaminocinamaldehyd

DPPH... 2,2-difenil- 1-pikrilhidrazil

FRAP...sposobnost plazme da reducira željezo (eng. ferric reducing ability of plasma)

GA...galna kiselina (eng. galic acid)

GIN-A...ginkolid A (eng. ginkgolid A)

GIN-B...ginkolid B (eng. ginkgolid B)

GRAS...generalno prepoznato kao sigurno (eng. Generally recognised as safe)

HPLC...kromatografija visoke moći razlučivanja (eng. High-Performance *Liquid Chromatography*)

IzoR...izoramnetin (eng. isorhamnetin)

K...kempferol (eng. kaempferol)

MetS...metabolički sindrom (eng. metabolic syndrome)

mg E/g sm...miligrami ekvivalenta po gramu suhe mase uzorka

*p*-NPB... *p*-nitrophenyl butyrat

PCA... analiza glavnih komponenti (eng. Principal Component Analysis)

Q...kvercetin (eng. quercetin)

SEDDS...samo emulzirajući sustav za raznošenje droga (eng. Self-emulsifying drug delivery systems)

SGLT1...natrij ovisni kotransporteri glukoze (eng. *sodium-glucose linked transporter*)

TF...ukupni flavonoidi (eng. total flavonoids)

TFLA...ukupni flavanoli (eng. total flavanoids)

TFLo...ukupni flavonoli (eng. total flavonols)

THA...ukupne hidroksicimetne kiseline (eng. total hidroksi cinnamic acids)

TiF...tolani identificirani flavonoli (eng. total identified flavonols)

TP...ukupni fenoli (eng. total phenols)

TPA...ukupne fenolne kiseline (eng. total phenolic acids)

TPAN...ukupni proantocijaninidni (eng. total proanthocyanidins)

TPTZ...2,4,6-tripiridil-s-triazin

Trolox...6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

TTL...ukupni triterpenski laktone (eng. total triterpene lactones)

UV-Vis... ultralubičasto-vidljivo (eng. ultraviolet-visible)

WHO... Svjetska zdravstvena organizacija (eng. World Health Organization)

## 1. UVOD

### 1.1. Povijest i sistematika vrste *Ginkgo biloba* L.

*Ginkgo biloba* L. (Slika 1) vrsta je iz porodice *Ginkgoaceae* i poznata je po imenu „Ginko“ ili prema lokalnim imenima „Yin-xing“ u Kini i „Icho“ u Japanu. Jedina je vrsta podrazreda *Ginkgooidae*. Charles Darwin prozvao ju je živim fosilom, zahvaljujući činjenicama da na Zemlji raste već tristo milijuna godina i nije u rodu ni s jednom danas živućom biljnom vrstom (Habtemariam, 2019.). Može dostići starost veću od tisuću godina. Nakon velike katastrofe eksplozije atomske bombe u središtu Hirošime pronađena je kao prva biljka čije je lišće bilo prisutno odnosno kao jedina biljka na koju radijacija nije utjecala. Nove biljke nisu se nimalo razlikovale od prethodnih, posjedovale su lišće jednakog oblika i veličine (Conti i Petersen, 2008.).



Slika 1. *Ginkgo biloba* L.

## 1.2. Anatomija i morfologija vrste *Ginkgo biloba* L.

Ginko je listopadna i diecična vrsta kod koje razlikujemo muške i ženske cvjetove. Muški i ženski reproduktivni organi nalaze se na odvojenim stablima. Ocvijeće (perijant) kod ove vrste izostaje. Muški cvjetovi grade rese s brojnim prašnicima s po dvije polenovnice. Ženski cvijet čine dvije plodnice na osi. Nakon oplodnje sjemeni zametci su goli na plodnim listovima što je bitna karakteristika biljaka iz skupine golosjemenjača (*Gymnoasermæ*). Ima specifične dvokrpaste listove od kud i dolazi naziv *biloba* (Slika 2). Listovi se beru zeleni tokom ljeta i jeseni, nakon čega se suše. Od tako osušenih listova rade se standardizirani biljni pripravci. Naspram ljekovitog svojstva listova, sjeme ove vrste je toksično. Oprašuje se pomoću vjetra, a takav način oprašivanja nazivamo anemofilija. Oprašivanje i oplodnja su dva vremenski odvojena procesa. Specifičnost ove vrste je ta što su muške spolne stanice pokretne (spermatozoidi), pa takav način oplodnje nazivamo zoogamija. Takav način oplodnje povlači i različitu građu arhegonijske komorice koja je ispunjena vodom. Pokretni spermatozoidi i sposobnost fotosinteze ženskog gametofita dvije su primitivne značajke ove vrste (Nikolić, 2013.).



Slika 2. Lišće biljke *Ginkgo biloba* L. (na lijevoj strani osušeni, na desnoj strani svježi list).

## 1.3. Fiziologija i specifični sekundarni metaboliti vrste *Ginkgo biloba* L.

Ova biljna vrsta otporna je na kukce, bakterijske i virusne infekcije, ali i na onečišćen zrak. U glavne bioaktivne tvari ekstrakta lišća ginka svrstavamo fenolne tvari među kojima su najzastupljeniji flavonoide koji uključuju flavone (kvercetin, kempferol i izoramnetin), flavonolne glikozide i biflavanoide (skiadopitisin, ginetin, izoginetin) Tu su i spojevi karakteristični za ginko kao što su triterpenski laktoni (ginkolid A,B,C i bilobalid) i organske kiseline (ginkolična kiselina). Flavonoidi su najvećim dijelom odgovorni za efekt uklanjanja slobodnih radikala i za antioksidativna svojstva, dok su ginkolidi potencijalno antagonisti antiplateletnog djelovanja (Chen i sur. 2007.; Habtemariam, 2019.).

Prema Johnston i sur. (2006) bilobalid i ginkolidi su antagonist GABA<sub>A</sub> receptora, a samim time imaju neuroprotektivnu ulogu i utječu na poboljšanje kognitivnih funkcija.

### 1.3.1. Fenoli

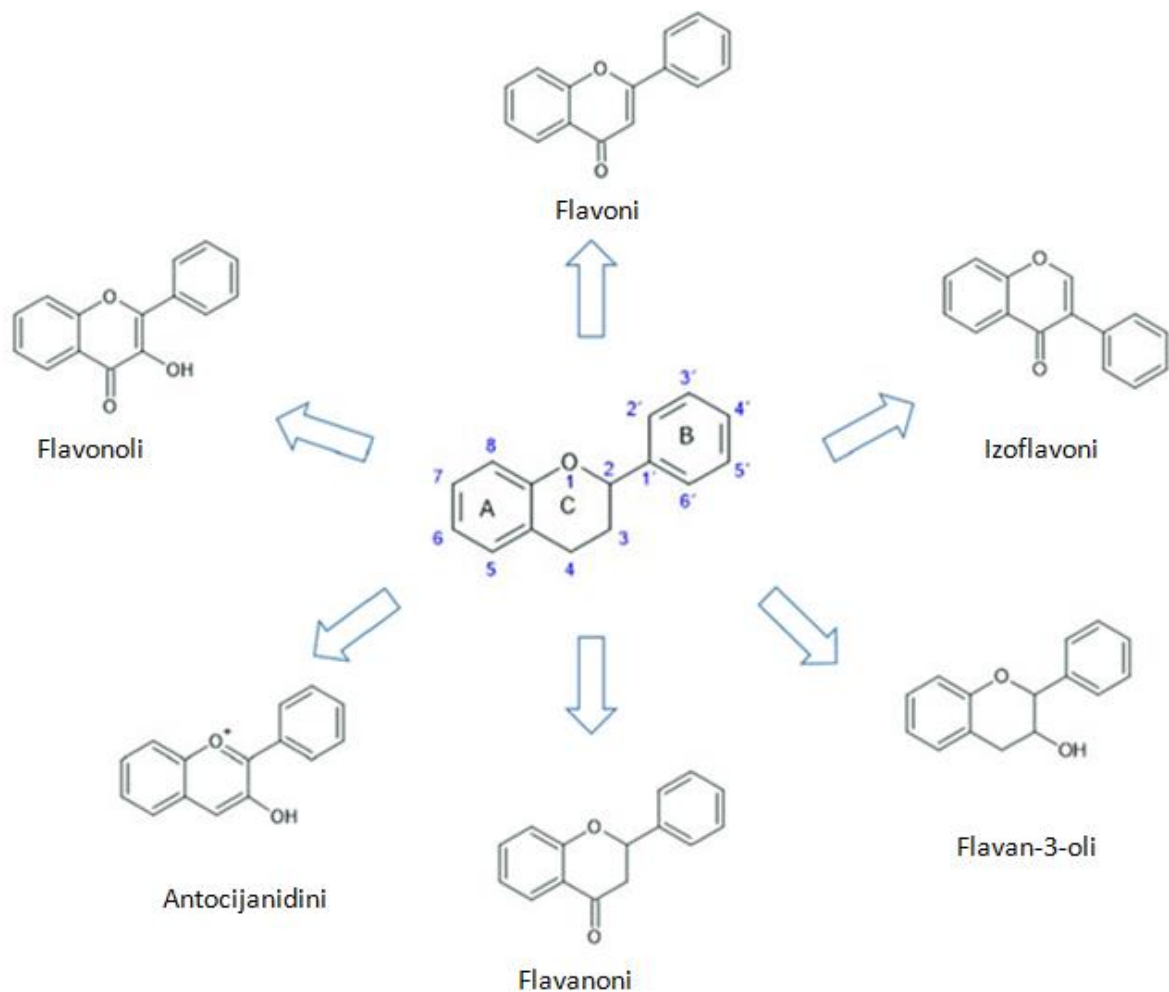
Fenoli su skupina organskih spojeva koji se sastoje od jedne ili više hidroksilne skupine vezane na aromatski prsten ugljikovodika. Kod biljaka se pojavljuju u raznim oblicima, od jednostavnih fenolnih molekula do visokopolimeriziranih spojeva, pa ih prema tome dijelimo na jednostavne fenole, benzokinone, fenolne kiseline, acetofenone i feniloctene kiseline, hidroksicimene kiseline, fenilpropane, kumarine, izokumarine, kromone, naftokinone, ksantone, stilbene, antrakinone, kalkone, flavonoide, izoflavonoide, neoflavonoide, lignane i neolignane, biflavonoide, lignine, kateholske melanine i kondenzirane tanine (Lattanzio, 2013.). U ovim oblicima mogu doći u biljnim plodovima, sjemenkama i listovima. Određivanje njihovog sadržaja u ekstraktima moguće je pomoću kromatografskih (npr. HPLC - High Performance Liquid Chromatography) i spektrofotometrijskih metoda. Šamec i sur. (2021.) napominju da struktura polifenola značajno utječu na njihovu ulogu u biološkim procesima. Da bi se saznalo kako točno djeluju i u kojim specifičnim biokemijskim putevima potrebno je koristiti multidisciplinarni pristup u istraživanju uz uporabu modernih metaboličkih modela i platforma. Fenolni spojevi jako su nam zanimljivi zahvaljujući svojoj antioksidativnoj sposobnosti koja je jača u slučaju većeg broja hidroksilnih skupina. Antioksidansi su molekule koje mogu donirati jedan elektron ili vodikov atom nekom reaktivnom, slobodnom radikalu. To je bitno jer na taj način dolazi do promjene djelovanja slobodnih radikala, a samim time antioksidansi štite naš organizam od mogućih bolesti i usporavaju procese koji su odgovorni za starenje. Fenolni spojevi imaju i vrlo važnu ulogu za rast i razmnožavanje biljaka, štite ih od patogena i predatora. Odgovorni su za regulaciju najvažnijih procesa, kao što su regulacija rasta, vezanje pojedinih komponenti na staničnu stjenku, biosinteza lignina, otpornost biljnog tkiva na različita oštećenja, nastajanje boje, okusa i arome svojstvene za pojedinu vrstu voća te utječu na gorčinu i trpkost. Fenolni spojevi pridonose boji i senzorskim svojstvima plodova iz čega i proizlazi pozitivan efekt na razmnožavanje velikog broja biljaka, odnosno rasprostiranje njihovih sjemenaka (Morandi Vuolo i sur., 2019). Sadržaj nekih fenolnih spojeva u biljkama može se povećati u uvjetima stresa izazvanih povećanim UV zračenjem, ozljedama pa samim time i patogenim stanjima, zagađenim zrakom ili nekim drugim ekstremnim uvjetima. Definišu se kao prirodni metaboliti koji se sintetiziraju u putovima šikiminske kiseline i fenilpropanoida. Fenolne spojeve moguće je podijeliti na više načina. Bate-Smith i Swain (1962) dijele ih na uobičajene i manje uobičajene spojeve. Ribéreau-Gayon (1972) podijelio ih je u tri grupe na široko rasprostranjene fenole (skoro u svim biljkama prisutni), na slabije rasprostranjene (samo kod nekih biljaka) i na fenole kao polimere. Jedna od korištenijih podjela je prema Harbornu (1980) prema kojoj se fenolni spojevi dijele prema broju C atoma u molekuli. Tako postoje jednostavni fenolni spojevi sa 6 C atoma, fenolske

kiseline i aldehidi sa C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> kosturom što znači sa 7 C atoma (za primjer: salicilna kiselina, vanilin), acetofenoni i feniloctene kiseline sa C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub> kosturom, cimetne kiseline sa C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> kosturom (cimetna kiselina, *p*-kumarinska kiselina, kavena kiselina, ferulinska kiselina), kumarini i izokumarini sa C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> kosturom (umbeliferon), spojevi sa 15 C atoma vezanim u obliku C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> koji se mogu podijeliti u tri velike grupe obzirom na strukturu središnjeg člana pa se dijele na: kalkone i hidrokalkone koji imaju linearan središnji lanac, aurone sa formiranim peteročlanim heterocikličkim prstenom i na flavonoide sa šestoročlanim heterocikličkim prestenom. Spojevi sa 30 C atoma nazivaju se biflavonili (gingetin), benzofenoni i ksantoni imaju C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> kostur (ksanton i benzofenon), stilibeni imaju C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> kostur (resveratrol, pinosilvin), kinoni ipak mogu biti građeni od 6, 10 i 14 C atoma (ubikinon, juglon), betacianini od 18 C atoma (betanidin). Mogući su dimeri, oligomeri i polimeri tih osnovnih jedinica, a jedni od poznatijih polimera fenolnih spojeva su lignani, lignin i tanini. Fenolni spojevi uglavnom su slabe kiseline (Vermerris i Nicholson, 2008.).

### 1.3.2. Flavonoidi

Flavonoidi su najbrojnija skupina polifenola čiju osnovnu strukturu gradi 15 atoma ugljika povezanih u jezgri od tri fenolna prstena (Tapas i sur., 2008.). Prethodno opisana osnovna struktura čini aglikonski dio molekule, ali to nije jedini oblik u kojem se pojavljuju. U prirodi su često u obliku glikozida. Ovisno o broju i položaju vezanih hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i oksidacijskom stupnju atoma koji grade most između aromatskih prstena dijele se na flavonole, flavone, flavan-3-ole, antocijanidine, flavanone i izoflavone (Slika 3). U tu skupinu spadaju i žuti pigmenti prema kojima je skupina i dobila naziv jer latinska riječ *flavus* znači žut. Njihov sadržaj moguće je odrediti spektrofotometrijski budući da s aluminijevim kloridom tvore kompleks, čiji nastanak je popraćen promjenom boje. Posjeduju širok spektar pozitivnih djelovanja poput antibakterijskog, vazodilatacijskog i antikancerogenog djelovanja.

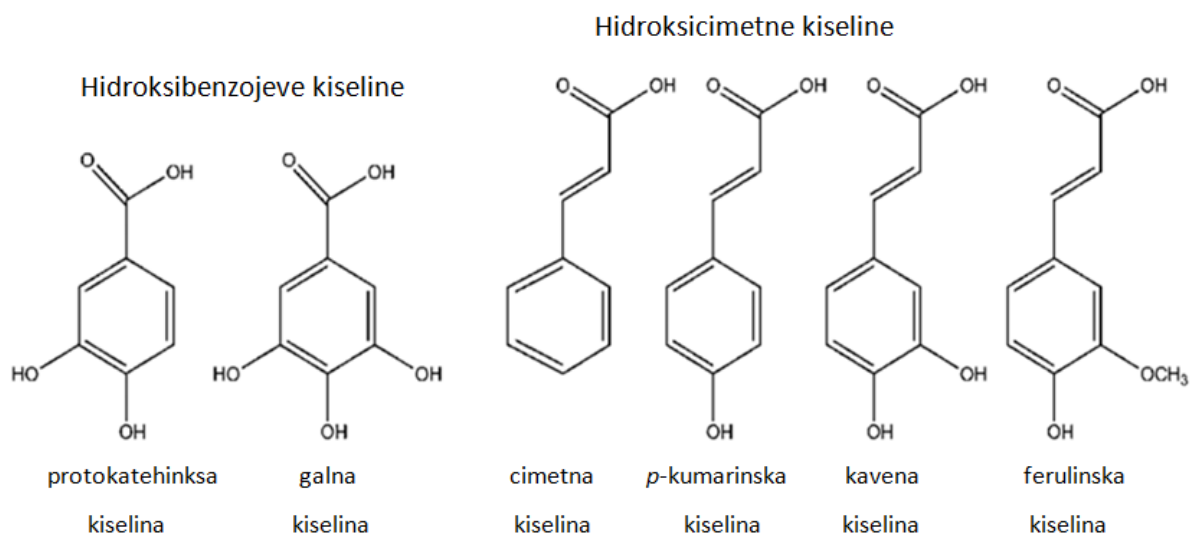




Slika 3. Osnovna podjela flavonoida (preuzeto i prilagođeno iz Šamec i sur., 2021.).

### 1.3.3. Fenolne kiseline

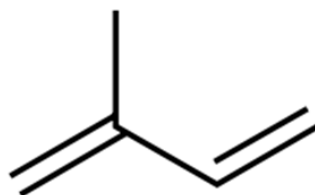
Fenolne kiseline sekundarni su biljni metaboliti iz skupine fenolnih spojeva i sastoje se od aromatske jezgre i različitih hidroliziranih substituenata. U biljkama imaju utjecaj na brojne fiziološke procese, od asimilacije hranjivih tvari, sinteze proteina, utjecaja na aktivnost enzima, signalizacijske uloge do antioksidacijskog djelovanja. Imaju i širok spektar pozitivnog utjecaja na zdravlje ljudi poput antiupalnog, antibakterijskog, antiproliferativnog, antikancerogenog i antioksidacijskog učinaka (Ambriz-Pérez i sur., 2016.). Postoje dvije skupine fenolnih kiselina ovisno o  $C_1 - C_6$  i  $C_3 - C_6$  vezama, pa ih dijelimo na derivate hidroksibenzojeve i cimetne kiseline (Slika 4). Hidroksicimetne kiseline su derivati cimetne kiseline i dijele se na *p*-kumarinsku, ferulinsku, sinapinsku, kavenu, klorogensku i ružmarinsku kiselinu. Hidroksicimetne kiseline imaju iznimnu važnost za sprječavanje oksidativnog stresa i uklanjanje radikala.



Slika 4. Strukturna formula fenolnih kiselina (preuzeto i prilagođeno iz Lojek i sur., 2014.).

#### 1.3.4. Terpeni

Terpeni su hlapljivi nezasićeni ugljikovodici. Osnovna građena jedinica sastoji se od 5 ugljikovih atoma, a naziva se izoprenska jedinica (molekulske formule:  $C_5H_8$ ; slika 5). Jedan od poznatih Hrvatskih znanstvenika Lavoslav (Leopold) Ružička 1939. godine dobio je Nobelovu nagradu za kemiju za rad na kemiji terpena (Šunjić, 2017.). Terpene je moguće podijeliti na monoterpene, seskviterpene (triterpene), diterpene i tako dalje ovisno o broju izoprenskih jedinica. Prema tome monoterpene su građeni od dvije izoprenske jedinice, seskviterpeni od tri, a diterpeni od četiri. Obzirom na specifičnu građu terpena Otto Wallace i Ružička su opisali građu izoprenske jedinice kao da sadrži glavu i rep, a prema tome definirali i moguće načine vezivanja izoprenskih jedinica u terpene i terpenoide. U terpene ubrajamo i spojeve koji su izvedeni iz terpena i u svom sastavu sadržavaju kisik u obliku alkohola, ketona i aldehida (terpenoidi). Nastaju u biljkama kao sekundarni metaboliti putem mevalonske kiseline (Bone i Simon, 2013.). Posjeduju više uloga kod biljaka, a najvažnije karakteristike su oprašivanje i zaštita od herbivora (Joshee i sur., 2019.). Karakteristični terpeni ginka su terpeniski trilaktone (ginkolidi A, B, C) i seskviterpen bilobalid, koji prema Jogueux i sur. (1995) pokazuju učinak na vaskularne i cerebralne metaboličke procese, ali isto tako pokazuju antiplateletni učinak. Prema Rimkien i sur. (2021) koncentracija ovih spojeva u lišću ginka najviša je u listopadu. Isto tako navode da su ginkolidi odgovorni za neuroprotektivni efekt i regulaciju sinteze glukokortikoida, antiplateletni učinak, a samim time sprječavaju agregaciju trombocita, povećavaju otpornost eritrocita, smanjuju viskoznost krvi i poboljšavaju mikrocirkulaciju, dok za derivate bilobalida navode da se koriste za liječenje neuropatije, encefalopatije, edema, kognitivnih funkcija i poremećaja vezanih uz cirkulaciju kao posljedice dijabetesa.



Izopren

Slika 5. Osnovna građevna jedinica terpena (izopren) (preuzeto i prilagođeno iz Aldred, 2009.) .

#### 1.4. Pozitivna svojstva i učinci ekstrakta lišća ginka

Ekstrakt lišća ginka koristi se kao dodatak prehrani sa specifičnim biološkim učincima. Prema Bones i Mills (2013.) biljka se koristi u liječenju poremećaja centralnog živčanog sustava, kao što su Alzheimerova bolest i demencija. Kao glavne pozitivne efekte lišća vrste *Ginkgo biloba* L. navode: povećanje krvne cirkulacije i tkivne oksigenacije, antagonističko djelovanje prema PAF (platelet-activating factor) receptorima, prevencija oštećenja stanica slobodnim radikalima, zaštita funkcije mitohondrija tokom staničnog stresa, povećanje pamćenja i kognitivne funkcije (pogotovo kod starijih osoba), zaštita živčanog tkiva, pomoć u prilagodbi na stresore, modulacija krvožilnog rizika, smanjenje tjeskobe. Prema Eisvand i sur. (2020.) ekstrakt lišća ginka ima utjecaj na mršavljenje; antidiabetički, antihipertenzivni i hipolipemični učinak koji je povezan sa metaboličkim sindromom (MetS) koji povećava rizik od kardiovaskularnih bolesti. Dobri učinci, na periferni i cerebralni krvni protok, javljaju se zahvaljujući kemijskim komponentama ekstrakta koje inhibiraju agregaciju trombocita i povećavaju otpuštanje dušikova oksida (NO) u krvne žile. Terapeutski mehanizmi djelovanja pripisuju se antioksidativnim svojstvima i svojstvu uklanjanja slobodnih radikala. Zahvaljujući antioksidacijskim svojstvima smanjuje se i oksidacijski stres koji je usko povezan sa oštećenjem i razvojem raznih bolesti, među kojima su kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti kao i pojava raka. U slučaju nedostatka antioksidansa često su povećane koncentracije kisikovih i dušikovih reaktivnih vrsta koje zatim dovode do lipidne peroksidacije. Antioksidansi iz ekstrakta lišća *G. biloba* reagiraju s reaktivnim vrstama i na taj način inhibiraju lipidnu peroksidaciju, pa se citoprotektivna aktivnost ekstrakta ove biljke pripisuje antioksidacijskoj aktivnosti i sposobnosti povišenja aktivnosti endogenih enzima koji uklanjaju slobodne radikale poput superoksid dismutaze i katalaze.

### 1.5. Toksikologija i sigurnosni podaci vrste *Ginkgo biloba* L.

Prema Bones i Mills (2013.) ekstrakt ginka ima nisku toksičnost. Nije zabilježena nijedna smrt štakora koji su oralno konzumirali doze čak do 10 g/kg standardiziranog ekstrakta. Istraživanja o kroničnoj oralnoj primjeni nisu zabilježila nikakve dokaze o biokemijskom, krvnom ili tkivnom oštećenju jetre ili bubrega štakora i psa koji su oralno konzumirali standardizirani ekstrakt kroz 6 mjeseci. Isto tako nisu pronađeni nikakvi kancerogeni učinci kod štakora. U istraživanju provedenom na skupini dobrovoljaca također nisu primijećeni nikakvi štetni učinci. Specijalne mjere i upozorenja postoje za osobe koje imaju probleme sa poremećajima vezanim uz zgrušavanje krvi, pa se isto tako ne preporuča konzumacija ekstrakta ginka 5-7 dana prije operacije jer može utjecati na dodatno krvarenje. Također bitno je naglasiti da neki od pripravaka mogu sadržavati određene doze ginkolične kiseline koje mogu izazvati alergijsku reakciju. Ekstrakt ginka može utjecati na sposobnost upravljanjem vozila ili nekih drugih mašina, ali u pozitivnom smislu utjecaja. Može samo poboljšati te funkcije, a pogotovo kod starijih osoba. Prema Komisiji E, standardizirani ekstrakti lišća ginka su prihvaćeni, dok samo lišće ginka nije, što znači da se moraju primjenjivati standardizirani ekstrakti. Ginko nema GRAS (generalno prepoznato kao sigurno, eng. Generally recognised as safe) status, a 2012. godine uvršten je u Europsku Farmakopeju.

### 1.6. Probava, apsorpcija i bioraspoloživost fenolnih spojeva i triterpenskih laktona

Probava općenito započinje u usnoj šupljini gdje se hrana mehanički usitnjava i izlučuje se slina koja sadrži enzime čija je uloga razgradnja složenih ugljikohidrata. Tamo se biodostupnost fenolnih spojeva može povećati djelovanjem  $\alpha$ -amilaze i smanjenjem veličine čestica zbog toga što se često nalaze povezani s vlaknima ili ugljikohidratima. Nakon usne šupljine hrana gutanjem prolazi kroz ždrijelo i jednjak do želudca. Daljnje oslobađanje fenolnih spojeva i triterpenskih laktona nastavlja se u želudcu gdje se odvija najveća razgradnja, uz pomoć želučanih sokova. Nasuprot fenolnih spojeva, triterpenski laktoni dolaze u prvobitnoj (izvornoj) formi (Choi i sur., 2019). U stjenkama želudca nalaze se mišići koji dodatno miješaju hranu koja dalje odlazi u tanko, a zatim u debelo crijevo nakon čega se izlučuje van organizma. U tankom crijevu se događa najveći dio apsorpcije hranjivih tvari. Dijeli se na tri dijela, a to su dvanaesnik (*duodenum*), *jejunum* i *ileum*. Apsorpcija fenolnih spojeva uglavnom se odvija u dvanaesniku i u proksimalnom jejunumu. Apsorpcija i metabolizam fenolnih sastojaka uvelike ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi, molekulskoj masi, stupnju polimerizacije ili glikozilacije, topljivosti i konjugaciji s drugim fenolima. S obzirom na građu i lipofilni karakter većina flavonoidnih aglikona i fenolnih kiselina prenosi se u stanice crijeva i apsorbira pasivnom difuzijom, isto kao i fenolne kiseline niske molekulske mase (za primjer galna kiselina, izoflavoni, flavoni i tako dalje). Ipak, većina fenolnih spojeva u biljkama nalazi se u glikoziranom obliku ili kao esteri i polimeri i ti se spojevi ne apsorbiraju

se na taj način te često netaknuti dospijevaju u dvanaesnik. Da bi se njihova apsorpcija ostvarila mora se provest hidroliza glikozida, nakon čega se slobodni aglikon može apsorbirati procesom pasivne difuzije. Inače glikozilirani spojevi prenose se u epitelne stanice transporterom glukoze ovisnim o natriju, SGLT1, a potom se hidroliziraju citosolnom  $\beta$ -glikozidazom (CBG). Zanimljivo je to da se proantocijanidini uglavnom moraju hidrolizirati u sitnije (monomerne ili dimerne) jedinice dok se antocijani mogu apsorbirati kao glikozidi i kao takvi pojaviti u krvotoku. Visokostabilni oligomerni i polimerni flavanoli slabo se apsorbiraju pa neapsorbirane komponente dospijevaju u debelo crijevo u kojem se dio apsorpira, a dio razgradi do fenolnih molekula uz pomoć mikroflore crijeva. Kao produkt razgradnje dobiju se fenolne molekule niske molekulske mase aromatskih kiselina, oksaloacetat i ugljikov dioksid (Carbonell-Capella i sur., 2014.; Guyton i Hall, 2012.). Prema Yu i sur. (2020) terapijski učinci terpenkih laktona su ometani obzirom na nestabilnu apsorpciju i opsežni metabolizam zahvaljujući laktonskom prstenu. Količina apsorbiranih tvari u ovom slučaju terpenkih laktona ovisi o pH želuca i aktivnim transporterskim proteinima („efflux“ transporterima). Za ginkolide je kiselo okruženje ključno da bi zadržali stabilne prototipove. Medij pH= 5 najpogodniji je za najbolje iskorištenje ginkolida i bilobalida. Glavni razlog je taj što su stabilni prototipovi skloni pasivnoj difuziji u kiselim uvjetima. Povećanjem alkaliniteta dolazi do povećanja električnog naboja hidroliziranih ginkolida što može povećati interakciju s prijenosnicima efluksa (Madgula i sur., 2010). Jedan od najpoznatijih proteina koji je odgovoran za transport laktonskih prstenova je P-glikoprotein koji se nalazi u crijevnom epitelu. Utjecaj crijevne mikroflore na razgradnju i apsorpciju triterpenih laktona ginka nije u potpunosti objašnjen. Choi i sur. (2019) nisu pronašli utjecaj crijevne mikroflore na cijevni metabolizam i apsorpciju glavnih terpenkih trilaktona ginka.

### 1.7. Istraživanja o oralnoj primjeni ekstrakta ginka

Prema M.E.V. Feller *Ginkgo Biloba* uputama propisanu količinu ekstrakta ginka (80-240 mg) bilo bi dobro uzimati podijeljeno u 2-3 doze dnevno uz obrok. Ginko je moćan lijek i ne preporuča se uzimati zajedno s drugim lijekovima protiv zgrušavanja krvi ili onima za epilepsiju, tjeskobu i depresiju. Prema Bones i Mills (2013.) tipična dnevna doza iznosi 120 do 240 mg standardiziranog biljnog ekstrakta u odnosu 50:1, s tim da sadrži 24 % flavonoidnih glikozida i oko 6 % terpenoida. Takav ekstrakt može biti u tekućem obliku ili u sklopu tablete. Njemačka komisija E i WHO (Svjetska zdravstvena organizacija) propisuju ekstrakt koji mora sadržavati manje od 5 ppm ginkolične kiseline. Do sad su napravljena neka istraživanja o povećanju oralne biodostupnosti falvonoida iz ginka. Tang i sur. (2008.) proveli su istraživanje o poboljšanju oralne biodostupnosti aktivnih komponenti iz ginka obzirom na to da su iste slabo topljive što rezultira nižim vrijednostima biodostupnosti. Proveli su *in vivo* istraživanje na uzorku od šest zdravih pasa čija masa je varirala između 20 i 28 kg. Oralno im je primijenjeno 800 mg tableta uz i bez primjene SEDDS-a („Self-emulsifying drug delivery systems“). SEDDS čine ulje, surfaktant i

kosurfaktant koji egzistiraju kao emulzija unutar vodenog medija. Uzimali su uzorke krvi i plazme iz kojih su LC-ESI-MS analizom detektirali koncentracije ginkolida i bilobalida. Pozitivnije rezultate dobili su za kombinaciju ginka i SEEDS-a budući da su koncentracije bilobalida, ginkolida A i B bile 162,1; 154,6 i 155,8 % veće u odnosu na čiste tablete. Kao zaključak iznijeli su da kombinacija uz SEEDS pospješuje uspješnije otapanje ovih fitokemikalija, a samim time i njihovu biodostupnost. Budući da je biodostupnost flavonoida u mozgu jako mala zbog moždane barijere krv-mozak i zbog niske topljivosti u lipofilnom mediju koja im onemogućava prolazak kroz biološke membrane razvijaju se novi pristupi bazirani na nanotehnologiji i proliposomima, koji uključuju dodatak tvari poput ulja, šećera ili proteina u svrhu povećanja biodostupnosti (Ahmad i Gani, 2021.). Olivera i sur. (2019.) proveli su istraživanje kojim su utvrdili da je model *in vitro* probave dobra metoda za proučavanje antioksidacijske aktivnosti i davanje uvida u biodostupnost fenolnih tvari iz ekstrakta lišća ginka jer se ovim modelom mogu jednostavno i brzo simulirati važni fizikalno-kemijski i biokemijski uvjeti probavnog trakta. Isto tako naglašavaju da metoda ne uključuje neke aspekte procesa *in vivo* kao što je aktivnost mikroorganizama duž probavnog trakta. S obzirom na lošu topljivost i dobru propusnost triterpensi i diterpensi laktoni imaju lošu biodostupnost (Charalabidis i sur., 2019). Wang i sur. (2019) su proveli istraživanje u kojem su priredili tablete od ginkolida u prahu i fosfolipida soje kako bi poboljšali biodostupnost laktone. Fosfolipid soje amfipatska je molekula koja se veže na laktone i pospješuje njihovo otapanje, a samim time i biodostupnost u *in vivo* sustavu.

#### 1.8. Teoretske osnove spektrofotometrijskih metoda

Svjetlost je elektromagnetsko zračenje koje je vidljivo ljudskom oku. Ljudsko oko može u prosjeku vidjeti svjetlost s valnom duljinom u rasponu od 390 do 750 nm. Elektromagnetsko zračenje možemo predočiti kao roj čestica koje se nazivaju fotoni. Svaki foton nosi određenu količinu energije. Cjelokupni raspon zračenja koje nastaje u svemiru nazivamo elektromagnetski spektar. Spektroskopija vidljivog zračenja koristi vidljivu svjetlost kao medij proučavanja. Vidljivo zračenje uzrokuje pobudu elektrona unutar atoma, molekula, kristalnih tvari ili amorfne tvari. Prilikom vraćanja atoma, molekule u prvobitno, ne pobuđeno stanje dolazi do otpuštanja energije u obliku fotona. Spektroskopijom vidljivog zračenja proučavaju se efekti prouzrokovani promjenom elektronske strukture atoma ili molekula te njihova elektronska struktura, kao i elektronska struktura kristaliničnih i amorfne tvari. Vidljivo zračenje emitiraju objekti čija je toplinska energija atoma ili molekula jednaka ili veća energiji pobude njihovih elektrona. Ti objekti moraju biti na temperaturi većoj od oko 1000 °C. Svaka molekula ima svoju građu koju možemo detektirati određenim spektrofotometrijskim metodama. Ako neke molekule ne možemo direktno detektirati postoje istražene metode koje se zasnivaju na nastanku kompleksnih spojeva koje možemo detektirati. U spektrofotometriji za određivanje koncentracije i apsorpcije bitne su sljedeće formule:

$$A = \epsilon \times l \times c$$

$$[tvar X] = \frac{A}{\epsilon \times l} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right]$$

$$tvar \frac{X}{g} = \frac{[tvar X] \left[ \frac{\text{mg}}{\text{g}} \right]}{m(\text{g})}$$

U toj formuli A predstavlja apsorbanciju pri određenoj valnoj duljini u nm,  $\epsilon$  ekstincijski koeficijent za tu valnu duljinu i l dužinu optičkog puta koja najčešće iznosi 1 cm. Sadržaj tvari X može se izraziti u miligramima ekvivalenta pozitivne kontrole po mililitru ili gramu suhe mase uzorka (Wade, 2017.).

### 1.9. Teoretske osnove kromatografije visoke moći razlučivanja (HPLC)

Kromatografija je analitička metoda koja se koristi za odvajanja određenih sastojaka iz smjese. Temelji se na kemijsko vezivanju između pokretne i nepokretne faze. Postoji više vrsta kromatografije, a razlikuju se obzirom na fizičko stanje faza, prema obliku sustava i prema mehanizmu razdvajanja. HPLC je kromatografska metoda, a skraćenica dolazi od engleskog naziva *High performance liquid chromatography*. HPLC spada pod odvedenije i sofisticiranije metode kromatografije. Prvi napravljeni HPLC uređaj radio je na način da je otapalo bilo nepolarno, a stacionarna faza polarna. Budući da bi se uzorak propuštao kroz stacionarnu fazu zajedno sa otapalom kao produkt dobile bi se sastavnice različite polarnosti, što bi značilo za taj uređaj da bi kroz kolonu prvo prolazile polarne sastavnice, a u koloni bi se zadržavale nepolarne sastavnice. Danas se takav način rjeđe koristi, učestalija je takozvana metoda *reverse phase chromatography* u kojoj je otapalo polarno, a stacionarna faza nepolarna ili manje polarna. Nepokretne faze u reverznoj-faznoj kromatografiji najčešće čine organosiloksani s vezanim oktilnim ili oktadecilnim ugljikovodikovim lancima, dok kao pokretne faze koriste vodene otopine polarnih otapala kao što su acetonitril, metanol ili tetrahidrofuran. Kao nepolarna faza u korištenom HPLC uređaju (Slika 6) koriste se C<sub>18</sub> lanci koji su hidrofobni, a samim time i nepolarni. Obzirom na to kakve su kemijske sastavnice koje želimo razdijeliti koristimo različite kolone (semipreparativne, semantičke). Samoj koloni prethodi predkolona koja ima funkciju filtera. Proteini, vosak i anorganske soli mogu zaštopati kolonu, pa prije ovakve metode provodi se pročišćavanje proteina iz uzorka. HPLC je metoda kojom se provode kvalitativna, ali i kvantitativna mjerenja. Da bi mogli detektirati traženu sastavnicu iz nekog uzorka potreban je detektor, unutar uređaja na slici 2 nalazi se UV-Vis detektor (Kazakevich i LoBrutto, 2007.). HPLC metoda ne koristi se samo u analitičke svrhe odnosno u svrhu identifikacije pojedinih spojeva nego se uz pomoć te metode može odrediti i koncentracija tih tvari. Kvalitativna i kvantitativna analiza pojedinih tvari u uzorku temelje se na usporedbi kromatograma istraženih tvari i tvari koje predstavljaju standarde poznate koncentracije.



Slika 6. HPLC uređaj Agilent 1100 Series s UV/VIS detektorom.



## 2. CILJ

Cilj ovog rada je odrediti biodostupnost bioaktivnih tvari ginka i biološke učinke (antioksidativni, antidijabetički) nakon konzumacije ekstrakta ginka u kombinaciji s proteinima, mastima i ugljikohidratima kako bi se odredilo koji je učinak pojedinih hranjivih tvari na biodostupnost i biološke učinke bioaktivnih tvari iz ginka, te je li bolje uzimati ekstrakt ginka poslije obroka ili na prazan želudac. U tu svrhu ispitan je učinak proteina (kazeina koncentracije 40 g/L), ugljikohidrata (glukoze koncentracije 25 g/L) i ulja (5 % maslinovog ulja) na biodostupnost polifenola te antioksidacijsku i antidijabetičku aktivnost ekstrakta *Ginkgo biloba* L. u uvjetima probave *in vitro*. Pretpostavka je da hranjive tvari neće imati jednak učinak na biodostupnost i biološke učinke bioaktivnih tvari iz ginka te da će ekstrakt ginka u kombinaciji s uljem pokazati najbolje rezultate obzirom na hidrofobni karakter.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Probava u uvjetima *in vitro*

##### 3.1.1. Materijali i pribor za probavu u uvjetima *in vitro*

Za izradu uzoraka ekstrakta koristila sam *M. E. V. Feller* tablete proizvođača marke Salvus d.o.o., kazein i glukozu proizvođača KEMIKA, te maslinovo ulje proizvođača ZVIJEZDA plus d.o.o.. Ostale potrebne kemikalije i reagensi su: deionizirana voda, dikalijevhidrogen fosfat proizvođača KEMIKA, klorovodična kiselina proizvođača Sigma Aldrich GmbH, natrijev hidrogen karbonat proizvođača KEMIKA, natrijev hidroksid proizvođača Sigma Aldrich GmbH, pankreasni sokovi proizvođača Sigma Aldrich GmbH, pepsin proizvođača Sigma Aldrich GmbH.

U potrebni pribor i uređaje spadaju: odmjerne tikvice ili menzure volumena (10-100 mL), pipete volumena (0-10 mL), mikropipete volumena (0-100  $\mu$ L), plastične epruvete (Eppendorf), vrtložna miješalica (TechnoKartell TK3S) i magnetna miješalica (TechnoKartell), vodena kupelj (Julabo SW22), centrifuga (Hettichmikro 220R), pH-metar (Sartorius), inkubator (Edmund Bühler GmbH KS-15), analitička vaga (ADAM i Precisa 62A).

##### 3.1.2. Opis metode probave *in vitro*

Dvije tablete od 80 mg, zajedno 160 mg, prvo bih usitnila, a zatim prebacila u epruvetu od 5 mL. U epruvetu s usitnjenim tabletama dodala sam po 4 mL vode, otopine ulja (5 % maslinovo ulje u vodi), kazeina (40 g/L) ili glukoze (25 g/L) kako bih dobila koncentraciju matičnog uzorka ginka koja iznosi 40 g/L. Dobivene otopine promiješala sam na Vortex miješalici 15 sekundi. Za svaku fazu *in vitro* probave od ishodne otopine oduzela bih po 0,3 mL. Pokus za svaku fazu probave provela sam u triplikatu.

Provela sam *in vitro* simulaciju probave prema protokolu Šola i sur. (2020). *In vitro* model probave sastoji se od tri faze probave, a to su usta, želudac i crijeva. Kako bi se te vrijednosti mogle staviti u nekakav odnos i analizirati, dodan je „nulti“ to jest inicijalni dio. Prema tome na samom početku postavila sam inicijalnu fazu (fazu prije probave *in vitro*) miješanjem 0,3 mL ekstrakta sa 0,3 mL fosfatnog pufera ( $c(\text{pufer})= 20 \text{ mmol/L}$ ,  $\text{pH}(\text{pufer})=7,0$ ). Sljedeću fazu koja se odnosi na probavu u ustima (oralna faza) postavila sam na sljedeći način. U smjesu za inicijalnu fazu dodala sam 10  $\mu$ L enzima slin ( $\gamma(\text{amilaza})= 0,48 \text{ g/L}$  u otopini fosfatnog pufera,  $\text{pH}(\text{fosfatni pufer})= 7,0$ ). Dobivenu otopinu inkubirala sam 5 minuta u vodenoj kupelji na 37 °C uz kontinuirano miješanje na 150 rpm. Sljedeću fazu probave (gastroičnu fazu) postavila sam na sljedeći način. U prethodnu smjesu dodala sam otopinu svinjskog pepsina volumena  $V(\text{otopina svinjskog pepsina})= 0,4 \text{ mL}$  ( $\gamma(\text{svinjskog pepsina})= 3 \text{ g/L}$  u otopini klorovodične kiseline,  $c(\text{HCl})= 0,1 \text{ mol/L}$ ). Uzorke sam inkubirala 60 minuta u vodenoj kupelji

na 37 °C uz kontinuirano miješanje na 150 rpm kako bih simulirala mehaničko miješanje u želudcu. Završnu odnosno crijevnu (intestinalnu) fazu provela sam na sljedeći način. U prethodnu smjesu dodavala sam otopinu natrijeva hidrogen karbonata ( $c(\text{NaHCO}_3) = 1 \text{ mol/L}$ ) kako bih podesila pH vrijednost na  $\text{pH} = 5,3$ . Na svaki uzorak dodala sam otopinu pankresinih sokova u volumenu  $V(\text{otopina pankresinih sokova}) = 0,9 \text{ mL}$  ( $\gamma(\text{žuči}) = 2,4 \text{ g/L}$ ;  $\gamma(\text{lipaza}) = 0,2 \text{ g/L}$ ;  $\gamma(\text{pankretin}) = 0,4 \text{ g/L}$ ; u fosfatnom puferu  $c(\text{fosfatni pufer}) = 20 \text{ mmol/L}$ ,  $\text{pH}(\text{fosfatni pufer}) = 7,0$ ). Pomoću lužine natrijevog hidroksida ( $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/L}$ ) volumena  $V(\text{NaOH}) = 1-10 \text{ }\mu\text{L}$  namjestila sam pH vrijednost uzoraka na  $\text{pH} = 7,0$ . Konačni volemen uzorka za sve faze *in vitro* probave nadopunila sam do volumena  $V = 2 \text{ mL}$  koristeći fosfatni pufer ( $c(\text{fosfatni pufer}) = 20 \text{ mmol/L}$ ,  $\text{pH}(\text{fosfatni pufer}) = 7,0$ ), nakon čega sam uzorke inkubirala u vremenu od 2 h na temperaturi od 37 °C. Uzorci su nakon inkubacije centrifugirani na 15 000 rpm na 4 °C u trajanju od 5 minuta, nakon čega je odliven supernatant i skladišten na -20 °C do spektrofotometrijskih mjerenja koja su slijedila.

Svaku fazu probave provela sam za uzorke s ekstraktom lišća ginkga, za uzorke s ekstraktom i glukozom, uzorke s ekstraktom i kazeinom, uzorke s ekstraktom i maslinovim uljem, ali i za njihove slijepe probe.

### 3.2. Spektrofotometrijska mjerenja

Uz pomoć spektrofotometrijskih metoda odredila sam:

- a) koncentraciju fenola, flavonoida, fenolnih kiselina, hidroksicimetnih kiselina, flavanola, flavonola, proantocijanidina, terpenkih trilaktona u ekstraktu ginka prije i nakon probave *in vitro* bez ili uz dodatak ispitivanih hranjivih tvari,
- b) antioksidacijsku aktivnost u ekstraktu ginka prije i nakon probave *in vitro* bez ili uz dodatak ispitivanih hranjivih tvari (ABTS, DPPH i FRAP metodom),
- c) antidijabetičku aktivnost i utjecaj na mršavljenje ekstrakta ginka inhibicijom  $\alpha$ -amilaze,  $\alpha$ -glukozidaze, lipaze i BSA glikacije prije i nakon probave *in vitro* bez ili uz dodatak ispitivanih hranjivih tvari.

#### 3.2.1. Određivanje ukupnih fenola

Prilikom provedbe istraživanja koristila sam sljedeće kemikalije i reagense: deionizirana voda, etanol proizvođača KEMIKA, Folin-Ciocalteu reagens proizvođača Sigma Aldrich GmbH, galna kiselina proizvođača Sigma Aldrich GmbH, natrijev karbonat proizvođača KEMIKA. Potrebni pribor i uređaji su: odmjerne tikvice ili menzure volumena (10-100 mL), pipete volumena (0-10 mL), mikropipete volumena (0-100  $\mu\text{L}$ ), plastične epruvete (Eppendorf) i pločice za spektrofotometrijsko mjerenje (pločice NUNC 442404), spektrofotometar (FLUOstar OPTIMA), vrtložna miješalica (TechnoKartell TK3S), inkubator (Edmund Bühler GmbH KS-15) i analitička vaga (ADAM i Precisa 62A).

Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima odredila sam mjerenjem apsorbancijskih vrijednosti pri valnoj duljini 740 nm prema metodi koju su koristili Zhishen i sur. (1999). Postupak sam započela pipetiranjem 1580  $\mu\text{L}$  destilirane vode u Eppendorf plastične epruvete. Nakon toga dodala sam 20  $\mu\text{L}$  biljnog ekstrakta (uzoraka) i 100  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa. Smjesu sam promiješala i u nju doda 300  $\mu\text{L}$  otopine natrijevog karbonata ( $c(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 1,88 \text{ mol/L}$ ). Zatim sam smjesu ponovo promiješala i inkubirala 30 minuta na  $45^\circ\text{C}$ . Izmjerila sam apsorbanciju u odnosu na slijepe probe za svaku skupnu uzoraka. Za izradu baždarne krivulje koristila sam etanolnu otopinu galne kiseline poznatih koncentracija od 0,05 do 2 g/L. Količinu sam preračunala prema baždarnom pravcu:

$$y = 0,352x + 0,001$$

$$R^2 = 0,990$$

Sadržaj ukupnih fenola izrazila sam u miligramima ekvivalenta (engl. gallic acid equivalents) po gramu suhe mase uzorka (mg GA/g sm).

### 3.2.2. Određivanje ukupnih flavonoida

Prilikom provedbe istraživanja koristila sam sljedeće kemikalije i reagens: aluminijev(III) klorid proizvođača KEMIKA, deionizirana voda, kvercetin proizvođača Sigma Aldrich GmbH, natrijev hidroksid proizvođača KEMIKA, natrijev nitrit proizvođača KEMIKA. Potrebni pribor i uređaji su: odmjerne tikvice ili menzure volumena (10-100 mL), pipete volumena (0-10 mL), mikropipete volumena (0-100  $\mu\text{L}$ ), plastične epruvete (Eppendorf) i pločice za spektrofotometrijsko mjerenje (pločice NUNC 442404), spektrofotometar (FLUOstar OPTIMA), vrtložna miješalica (TechnoKartell TK3S), inkubator (Edmund Bühler GmbH KS-15), analitička vaga (ADAM i Precisa 62A).

Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorku odredila sam mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 405 nm prema metodi Zhishen i sur. (1999). Prvo sam, u Eppendorf plastične epruvete, izpipetirala 80  $\mu\text{L}$  destilirane vode, 20  $\mu\text{L}$  ekstrakta i 6  $\mu\text{L}$  otopine natrijevog nitrita ( $W(\text{NaNO}_2) = 5 \%$ ). Smjesu sam zatim promiješala na vrtložnoj miješalici i inkubirala pet minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga dodala sam 6  $\mu\text{L}$  otopine aluminijeva(III) klorida ( $W(\text{AlCl}_3) = 10 \%$ ), te ponovo inkubirala šest minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije dodala sam 40  $\mu\text{L}$  otopine natrijevog hidroksida ( $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/L}$ ) i 48  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Kao standard koristila sam otopine kvercetina poznatih koncentracija od 0,07 do 10 g/L. Koncentraciju ukupnih flavonoida u ekstraktu izračunala sam pomoću baždarnog pravca:

$$y = 0,874x + 0,122$$

$$R^2 = 0,993$$

Dobivene koncentracije izrazila sam u miligramima ekvivalenta kvercetina po gramu suhe mase uzorka (mg QE/g sm).

### 3.2.3. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina

Prilikom provedbe istraživanja koristila sam sljedeće kemikalije i reagense: deionizirana voda, kavena kiselina proizvođača Sigma Aldrich GmbH, klorovodična kiselina proizvođača KEMIKA, natrijev hidroksid proizvođača KEMIKA, natrijev karbonat proizvođača KEMIKA, natrijev klorid proizvođača KEMIKA, natrijev nitrit proizvođača KEMIKA, natrijev molibdata dihidrata proizvođača KEMIKA. Potrebni pribor i uređaji su: odmjerne tikvice ili menzure volumena (10-100 mL), pipete volumena (0-10 mL), mikropipete volumena (0-100  $\mu$ L), plastične epruvete (Eppendorf) i pločice za spektrofotometrijsko mjerenje (pločice NUNC 442404), spektrofotometar (FLUOstar OPTIMA), vrtložna miješalica (TechnoKartell TK3S), inkubator (Edmund Bühler GmbH KS-15), analitička vaga (ADAM i Precisa 62A).

Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina odredila sam spektrofotometrijskim mjerenjem uzoraka pri valnoj duljini od 485 nm prema metodi iz Europske farmakopeje (2004). Na početku sam izpipetirala 40  $\mu$ L otopine klorovodične kiseline ( $c(\text{HCl}) = 0,5 \text{ mol/L}$ ) u 20  $\mu$ L uzorka. Nakon tog sam u otopinu dodala 40  $\mu$ L svježe pripremljenog reagensa koji je smjesa natrijevog nitrita ( $m(\text{NaNO}_2) = 1 \text{ g}$ ), natrijevog molibdata dihidrata ( $m(\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}) = 1,17 \text{ g}$ ) i 10 mL deionizirane vode. U smjesu sam dodala još 40  $\mu$ L otopine natrijevog hidroksida ( $W(\text{NaOH}) = 8,5 \%$ ) i 60  $\mu$ L destilirane vode. Kao standard koristila sam kavenu kiselinu poznatih koncentracija od 0,078 do 10 g/L. Nakon što sam izmjerila apsorbanciju uzoraka odredila sam sadržaj i koncentraciju pomoću baždarne krivulje:

$$y = 0,634x + 0,170$$

$$R^2 = 0,995$$

Dobivene koncentracije izrazila sam u miligramima ekvivalenta kavene kiseline po gramu suhe mase uzorka (mg CAE/g sm).

### 3.2.4. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i flavonola

Prilikom provedbe istraživanja koristila sam sljedeće kemikalije i reagense: deionizirana voda, etanol proizvođača KEMIKA, kavena kiselina proizvođača Sigma Aldrich GmbH, klorovodična kiselina proizvođača KEMIKA, kvercetin proizvođača Sigma Aldrich GmbH. Potrebni pribor i uređaji su: odmjerne tikvice ili menzure volumena (10-100 mL), pipete volumena (0-10 mL), mikropipete volumena (0-100  $\mu$ L), plastične epruvete (Eppendorf) i pločice za spektrofotometrijsko mjerenje (pločice NUNC 442404), spektrofotometar (FLUOstar OPTIMA), vrtložna miješalica (TechnoKartell TK3S) inkubator (Edmund Bühler GmbH KS-15), analitička vaga (ADAM i Precisa 62A).

Metodu sam provela po uzoru na metodu Howard i sur. (2003) pri valnim duljinama od 320 i 360 nm. Uzorke *in vitro* probave razrijedila sam dva puta u destiliranoj vodi (3 g/L) i pomiješala s 50 µL 1 g/L HCl u 96% etanolu i 0,91 mL 2 g/L HCl. Kao standard za sadržaj hidroksicimetnih kiselina koristila sam otopine kavene kiseline, a otopine kvercetina kao standard za određivanje flavonola. Pripremila sam razrjeđenja u rasponu koncentracija od 0,00625 do 1 g/L za kavenu kiselinu i 0,00625 do 0,5 g/L za kvercetin.

Jednadžba baždarnog pravca za kavenu kiselinu:

$$y = 2,2172x + 0,0435$$

$$R^2 = 0,95$$

Jednadžba baždarnog pravca za kvercetin:

$$y = 1,346x + 0,0239$$

$$R^2 = 0,998$$

Sadržaj flavonola izrazila sam kao miligram ekvivalenta kvercetina po gramu suhe mase uzorka (mg QE/g sm), a sadržaj ukupnih hidroksicimetnih kiselina kao miligram ekvivalenta kavene kiseline po gramu suhe mase uzorka (mg CAE/g sm).

### 3.2.5. Određivanje ukupnih flavanola

Prilikom provedbe istraživanja koristila sam sljedeće kemikalije i reagense: 4-(Dimethylamino)-cinnamaldehyde solution (DMACA) proizvođača Sigma Aldrich GmbH, katehin proizvođača Sigma Aldrich GmbH, klorovodična kiselina proizvođača KEMIKA, metanol proizvođača KEMIKA. Potrebni pribor i uređaji su: odmjerne tikvice ili menzure volumena (10-100 mL), pipete volumena (0-10 mL), mikropipete volumena (0-100 µL), plastične epruvete (Eppendorf) i pločice za spektrofotometrijsko mjerenje (pločice NUNC 442404), spektrofotometar (FLUOstar OPTIMA), vrtložna miješalica (TechnoKartell TK3S), inkubator (Edmund Bühler GmbH KS-15), analitička vaga (ADAM i Precisa 62A).

Sadržaj ukupnih flavanola odredila sam *p*-dimetilaminocinamaldehyd (DMACA) metodom koju su opisali Kusznierevicz i sur. (2008). U 30 µL uzorka dodala sam 45 µL DMACA otopine ( $W(\text{DMACA}) = 0,1\%$ ; klorovodična kiselina  $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/L}$ , metanol). Smjesu sam inkubirala 10 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim izmjerila apsorbanciju pri valnoj duljini od 640 nm. Sadržaj ukupnih flavonola odredila sam pomoću baždarne krivulje:

$$y = 1,566x$$

$$R^2 = 0,985$$

Baždarnu krivulju dobila sam mjerenjem apsorbancije otopina katehina koncentracijskog raspona od 0,01 mol/L do 0,16 g/L. Sadržaj sam izrazila u miligramima ekvivalenta katehina po gramu suhe mase uzorka (mg CE/g sm).

### 3.2.6. Određivanje ukupnih proantocijanidina

Prilikom provedbe istraživanja koristila sam sljedeće kemikalije i reagense: etanol proizvođača KEMIKA, katehin proizvođača Sigma Aldrich GmbH, klorovodična kiselina proizvođača KEMIKA, vanilin proizvođača Sigma Aldrich GmbH. Potrebni pribor i uređaji su: odmjerne tikvice ili menzure volumena (10-100 mL), pipete volumena (0-10 mL), mikropipete volumena (0-100 µL), plastične epruvete (Eppendorf) i pločice za spektrofotometrijsko mjerenje (pločice NUNC 442404), spektrofotometar (FLUOstar OPTIMA), vrtložna miješalica (TechnoKartell TK3S), inkubator (Edmund Bühler GmbH KS-15), analitička vaga (ADAM i Precisa 62A).

Sadržaj ukupnih proantocijanidina odredila sam volumenom korigiranom vanilin-HCl metodom (Sun i sur., 1998.) pri valnoj duljini od 492 nm. Pomiješala sam 60 µL vanilina ( $W(\text{vanilin}) = 4\%$ , metanolna otopina) sa 10 µL ekstrakta i 30 µL koncentrirane klorovodične kiseline. Otopine sam inkubirala 15 minuta na sobnoj temperaturi. Kao standard za izradu baždarnu krivulje koristila sam otopine katehina raspona koncentracije  $\gamma(\text{katehin}) = 0,09 - 0,5$  mg/L. Koristeći baždarnu krivulju:

$$y = 0,2128 x$$

$$R^2 = 0,966$$

Izrazila sam rezultate kao miligrami katehin ekvivalenta po gramu suhe mase uzorka (mg CE/g sm).

### 3.2.7. Određivanje ukupnih terpenskih trilaktona

Prilikom provedbe istraživanja koristila sam sljedeće kemikalije i reagense: deionizirana voda, etanol proizvođača KEMIKA, ginkolid A proizvođača Sigma Aldrich GmbH, ginkolid B proizvođača Sigma Aldrich GmbH, hidroksilamin proizvođača KEMIKA, klorovodična kiselina proizvođača KEMIKA, natrijev hidroksid proizvođača KEMIKA, željezo(III) klorid proizvođača KEMIKA. Potrebni pribor i uređaji su: odmjerne tikvice ili menzure volumena (10-100 mL), pipete volumena (0-10 mL), mikropipete volumena (0-100 µL), plastične epruvete (Eppendorf) i pločice za spektrofotometrijsko mjerenje (pločice NUNC 442404), spektrofotometar (FLUOstar OPTIMA), vrtložna miješalica (TechnoKartell TK3S), inkubator (Edmund Bühler GmbH KS-15), analitička vaga (ADAM i Precisa 62A).

Određivanje terpenskih trilaktona odredila sam metodom prema Su i sur. (2017) pri valnoj duljini od 520 nm. Uzorku ekstrakta volumena 40 µL razrijeđenog u 96 % etanolu u omjeru 1:9 dodala sam 16 µL otopine hidroksilamina koja sadrži 13,9 % otopine hidroksilamonijevog klorida i natrijevog hidroksida ( $c(\text{NaOH}) = 3,5$  mol/L) u volumnom omjeru 1:2. Nakon toga otopinu sam inkubirala 5 minuta na 25 °C.

Nakon inkubacije u otopinu sam dodala 16  $\mu\text{L}$  otopine klorovodične kiseline ( $c(\text{HCl})= 3 \text{ mol/L}$ ), 8  $\mu\text{L}$  otopine željezovog(III) klorida ( $W(\text{FeCl}_3)= 6 \%$ ) i 200  $\mu\text{L}$  otopina etanola ( $W(\text{etanol})= 70 \%$ ). Kao standard koristila sam ginkolide A i B. Koristeći baždarne krivulje za:

a) ginkolid A

$$y = 0,0336x - 0,1116$$

$$R^2 = 0,9996$$

b) ginkolid B

$$y = 0,0249x - 0,0021$$

$$R^2 = 0,9916$$

Izrazila sam rezultate kao miligrame ginkolid ekvivalenta po gramu suhe mase uzorka (mg GIN-AE/g sm odnosno mg GIN-BE/g sm).

### 3.2.8. Određivanje antioksidacijske aktivnosti metodom DPPH

Prilikom provedbe istraživanja koristila sam sljedeće kemikalije i reagense: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) proizvođača Sigma Aldrich GmbH; 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox) proizvođača Sigma Aldrich GmbH; etanol proizvođača KEMIKA. Potrebni pribor i uređaji su: odmjerne tikvice ili menzure volumena (10-100 mL), pipete volumena (0-10 mL), mikropipete volumena (0-100  $\mu\text{L}$ ), plastične epruvete (Eppendorf) i pločice za spektrofotometrijsko mjerenje (pločice NUNC 442404), spektrofotometar (FLUOstar OPTIMA), vrtložna miješalica (TechnoKartell TK3S), analitička vaga (ADAM i Precisa 62A).

Antioksidacijsku aktivnost DPPH metodom provela sam prema protokolu Radić Brkanac i sur. (2015). U Ependorf epruvetu otpipetirala sam 950  $\mu\text{L}$  otopine DPPH u etanolu ( $c(\text{DPPH})= 0,1 \text{ mmol/L}$ ) i 50  $\mu\text{L}$  uzorka probave. Kao pozitivnu kontrolu koristila sam otopinu Troloxa ( $\gamma(\text{Trolox})= 6 \text{ g/L}$ ) iste koncentracije kao i uzorci *in vitro* probave. Reakcijsku smjesu promiješala sam pomoću vrtložne miješalice, a zatim inkubirala 30 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbanciju sam izmjerila pri valnoj duljini od 520 nm. Postotak inhibicije DPPH radikala izračunala sam prema sljedećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100$$



Gdje  $A_0$  predstavlja apsorbanciju kontrole (bez ekstrakta *Ginkgo biloba*), a  $A_t$  apsorbanciju uzorka (s ekstraktom *Ginkgo biloba*). Rezultate sam izrazila kao % inhibicije u odnosu na pozitivnu kontrolu Trolox.

### 3.2.9. Određivanje antioksidacijske aktivnosti metodom ABTS

Prilikom provedbe istraživanja koristila sam sljedeće kemikalije i reagense: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)diamonijeva sol (ABTS) proizvođača BioChemica; 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox) proizvođača Sigma Aldrich GmbH; etanol proizvođača KEMIKA; kalijev peroksidisulfat proizvođača VWR Chemicals. Potrebni pribor i uređaji su: odmjerne tikvice ili menzure volumena (10-100 mL), pipete volumena (0-10 mL), mikropipete volumena (0-100  $\mu$ L), plastične epruvete (Eppendorf) i pločice za spektrofotometrijsko mjerenje (pločice NUNC 442404), spektrofotometar (NanoDrop i Thermo scientific Multiskan Sky), spektrofotometar (FLUOstar OPTIMA), vrtložna miješalica (TechnoKartell TK3S) inkubator (Edmund Bühler GmbH KS-15), analitička vaga (ADAM i Precisa 62A).

Metodu sam provela prema protokolu Re i sur. (1999). Otopina ABTS radikala priprema se tako da se 7 mmol/L otopinu ABTS-a oksidira s 140 mmol/L otopinom kalijevog peroksidisulfata. Otopinu sam razrijedila s etanolom tako da apsorbancija pri 736 nm bude oko  $0,700 \pm 0,02$  na NanoDrop-u. Volumen od 10  $\mu$ L biljnog ekstrakta pomiješala sam s 1 mL otopine ABTS+ radikala, nakon toga smjesu sam inkubirala 6 minuta, a onda tek izmjerila apsorbanciju pri valnoj duljini 740 nm na čitaču mikrotitar pločica FLUOstar Optima. Kao pozitivnu kontrolu koristila sam otopinu Troloxa ( $\gamma$ (Trolox)= 6 g/L). Postotak inhibicije ABTS radikala izračunala sam prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100$$

Gdje je  $A_0$  apsorbancija kontrole (bez ekstrakta), a  $A_t$  apsorbancija uzorka (sa ekstraktom). Rezultate sam izrazila kao % inhibicije u odnosu na pozitivnu kontrolu Trolox.

### 3.2.10. Određivanje antioksidacijske aktivnosti metodom FRAP

Prilikom provedbe istraživanja koristila sam sljedeće kemikalije i reagense: 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) proizvođača Sigma Aldrich GmbH; 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox) proizvođača Sigma Aldrich GmbH; acetatni pufer (natrijev acetat i octena kiselina) proizvođača Sigma Aldrich GmbH; deionizirana voda; željezo(III) klorid proizvođača KEMIKA. Potrebni pribor i uređaji su: odmjerne tikvice ili menzure volumena (10-100 mL), pipete volumena (0-10 mL), mikropipete volumena (0-100  $\mu$ L), plastične epruvete (Eppendorf) i pločice za spektrofotometrijsko mjerenje (pločice NUNC 442404), spektrofotometar (FLUOstar OPTIMA), vrtložna miješalica (TechnoKartell TK3S), inkubator (Edmund Bühler GmbH KS-15), analitička vaga (ADAM i Precisa 62A).

FRAP (Ferric reducing/Antioxidant power) metodu provela sam prema metodi koju su proveli Benzie i Strain (1999). Radni reagens FRAP pripremila sam miješanjem 25 ml acetatnog pufera, 2,5 mL TPTZ otopine, 2,5 mL FeCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O. Potrebno ga je pripremiti prije samog korištenja i zagrijati na 37 °C. Volumen od 5 µL biljnog ekstrakta pomiješala sam sa 95 µL FRAP reagensa, inkubirala sam 4 minute i nakon toga izmjerila apsorbanciju pri valnoj duljini od 593 nm. Postotak redukcije Fe<sup>3+</sup> - TPTZ izračunala sam prema formuli:

$$\% \text{ redukcije} = \frac{A_t - A_0}{A_t} \times 100$$

gdje je A<sub>0</sub> apsorbancija kontrole (bez ekstrakta), a A<sub>t</sub> apsorbancija uzorka (sa ekstraktom). Rezultate sam izrazila kao % inhibicije u odnosu na pozitivnu kontrolu Trolox (γ(Tolox)= 6 g/L).

### 3.2.11. Određivanje antidiijabetičke aktivnosti – inhibicija enzima α-amilaze

Prilikom provedbe istraživanja koristila sam sljedeće kemikalije i reagense: akarboza proizvođača KEMIKA, α-amilaza proizvođača Sigma Aldrich GmbH, deionizirana voda, dinitro salicilna kiselina proizvođača Sigma Aldrich GmbH, etanol proizvođača KEMIKA, kalijhidrogen fosfat proizvođača KEMIKA, kalij natrijev tartarat proizvođača KEMIKA, natrijev klorid proizvođača KEMIKA, škrob proizvođača KEMIKA. Potrebni pribor i uređaji su: odmjerne tikvice ili menzure volumena (10-100 mL), pipete volumena (0-10 mL), mikropipete volumena (0-100 µL), plastične epruvete (Eppendorf) i pločice za spektrofotometrijsko mjerenje (pločice NUNC 442404), spektrofotometar (FLUOstar OPTIMA), vrtložna miješalica (TechnoKartell TK3S) i magnetna miješalica (TechnoKartell), vodena kupelj (Julabo SW22), inkubator (Edmund Bühler GmbH KS-15), analitička vaga (ADAM i Precisa 62A).

Antidiijabetičku aktivnost α-amilaze testirala sam prema metodi koju su opisali Šola i sur. (2020). U 80 µL Na-fosfatnog pufera (c(fosfatni pufer)= 20 mmol/L + c(NaCl)= 6,7 mmol/L; pH= 6,9) dodala sam 40 µL uzorka i 40 µL α-amilaze (5 jedinica/mL). Smjesu sam inkubirala 15 minuta na temperaturi od 37 °C. Nakon inkubacije u smjesu sam dodala 40 µL škroba (W(škrob)= 1 % u fosfatnom puferu pH= 6,9). Smjesu sam ponovno inkubirala 15 minuta pri temperaturi od 37 °C, a nakon toga dodala sam 100 µL reagensa dinitrosalicilne kiseline koji se sastoji od 12 mL destilirane vode, 8 mL kalij natrijevog tartarata (c(kalij natrijev tartarat)= 5,3 mol/L), 20 mL tetrahidratne otopine 3,5-dinitrosalicilne kiseline (c(3,5-dinitrosalicilna kiselina)= 96 mmol/L). Smjesu sam zatim inkubirala 15 minuta u vodenoj kupelji pri temperaturi od 85 °C, nakon čega sam dodala 900 µL destilirane vode. Otopinu akarboze (γ(akarboza)= 6 g/L) koristila sam kao pozitivnu kontrolu. Apsorbanciju otopina mjerila sam pri valnoj duljini od 545 nm. Inhibitornu aktivnost enzima izračunala sam prema jednadžbi:

$$\% \text{inhibicije} = \left[ 100 - \frac{A_t - A_{tb}}{A_c - A_{cb}} \right] \times 100,$$

gdje simbol  $A_t$  predstavlja apsorbanciju testiranog uzorka sa enzimom,  $A_b$  apsorbanciju sljepe probe bez enzima,  $A_c$  apsorbanciju kontrole sa enzimom i  $A_{cb}$  apsorbanciju kontrole bez enzima.

### 3.2.12. Određivanje antidijabetičke aktivnosti – inhibicija enzima $\alpha$ -glukozidaze

Prilikom provedbe istraživanja koristila sam sljedeće kemikalije i reagense: akarboza proizvođača KEMIKA, deionizirana voda, etanol proizvođača KEMIKA,  $\alpha$ -glukozidaza proizvođača Sigma Aldrich GmbH, kalijhidrogen fosfat proizvođača KEMIKA, natrijev karbonat proizvođača KEMIKA,  $p$ -nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranozid proizvođača KEMIKA,  $p$ -nitrophenyl butyrat ( $p$ -NPB) proizvođača KEMIKA. Potrebni pribor i uređaji su: odmjerne tikvice ili menzure volumena (10-100 mL), pipete volumena (0-10 mL), mikropipete volumena (0-100  $\mu$ L), plastične epruvete (Eppendorf) i pločice za spektrofotometrijsko mjerenje (pločice NUNC 442404), spektrofotometar (FLUOstar OPTIMA), vrtložna miješalica (TechnoKartell TK3S), inkubator (Edmund Bühler GmbH KS-15), analitička vaga (ADAM i Precisa 62A).

Antidijabetičku aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze testirala sam prema modificiranoj metodi koju su opisali Salahuddin i sur. (2020). U 130  $\mu$ L fosfatnog pufera ( $c(\text{fosfatni pufer}) = 50 \text{ mmol/L}$ ,  $\text{pH} = 6,5$ ) dodala sam 10  $\mu$ L uzorka i 10  $\mu$ L  $\alpha$ -glukozidaze (1,5 jedinica/mL u fosfatnom puferu). Dobivenu smjesu inkubirala sam 15 minuta pri temperaturi od 37 °C. Nakon toga dodala sam 50  $\mu$ L  $p$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranozid ( $c(p\text{-nitrofenil-}\alpha\text{-D-glukopiranozid}) = 1 \text{ mmol/L}$  u fosfatnom puferu). Smjesu sam zatim inkubirala 5 minuta pri temperaturi od 37 °C, nakon čega sam dodala 50  $\mu$ L otopine natrijevog karbonata ( $c(\text{natrijev karbonat}) = 0,1 \text{ mol/L}$ ,  $\text{pH} = 10$ ). Akarbozu ( $\gamma(\text{akarboza}) = 6 \text{ g/L}$ ) sam koristila kao pozitivnu kontrolu. Apsorbanciju sam izmjerila pri valnoj duljini od 405 nm. Inhibitornu aktivnost enzima izračunala sam prema jednadžbi:

$$\%inhibicije = \left[ 100 - \frac{A_t - A_b}{A_c - A_{cb}} \right] \times 100,$$

gdje simbol  $A_t$  predstavlja apsorbanciju testiranog uzorka sa enzimom,  $A_b$  apsorbanciju sljepe probe bez enzima,  $A_c$  apsorbanciju kontrole sa enzimom i  $A_{cb}$  apsorbanciju kontrole bez enzima.

### 3.2.13. Inhibicija lipaze

Prilikom provedbe istraživanja koristila sam sljedeće kemikalije i reagense: deionizirana voda, etanol proizvođača KEMIKA, kalijhidrogen fosfat proizvođača KEMIKA, lipaza proizvođača Sigma Aldrich GmbH,  $p$ -nitrophenyl butyrat ( $p$ -NPB) proizvođača KEMIKA, orlistat proizvođača Sigma Aldrich GmbH. Potrebni pribor i uređaji su: odmjerne tikvice ili menzure volumena (10-100 mL), pipete volumena (0-10 mL), mikropipete volumena (0-100  $\mu$ L), plastične epruvete (Eppendorf) i pločice za spektrofotometrijsko mjerenje (pločice NUNC 442404) spektrofotometar (FLUOstar OPTIMA), vrtložna miješalica (TechnoKartell TK3S), inkubator (Edmund Bühler GmbH KS-15), analitička vaga (ADAM i Precisa 62A).

Ovo mjerenje provela sam prema metodi koju su opisali Spinola i sur. (2018). Apsorbanciju sam izmjerila pri valnoj duljini od 405 nm. Volumen od 40  $\mu$ L uzorka pomiješala sam s 20  $\mu$ L supstratne otopine (10 mmol/L *p*-NPB u etanolu *W*= 96 %) i 40  $\mu$ L enzima (2,5 g/L u 0,1 mol/L fosfatnom puferu, pH= 8,0). Dobivenu smjesu inkubirala sam 20 minuta na temperaturi od 37 °C. Kao pozitivnu kontrolu koristila sam otopinu orlistata (6 g/L u etanolu). Inhibitornu aktivnost enzima izračunala sam prema jednadžbi:

$$\%inhibicije = \left[ 100 - \frac{At-Atb}{Ac-Acb} \right] \times 100,$$

gdje simbol *At* predstavlja apsorbanciju testiranog uzorka sa enzimom, *Atb* apsorbanciju sljepe probe bez enzima, *Ac* apsorbanciju kontrole sa enzimom i *Acb* apsorbanciju kontrole bez enzima.

### 3.2.14. Glikacija albumina seruma goveda (BSA)

Prilikom provedbe istraživanja koristila sam sljedeće kemikalije i reagense: albumin seruma goveda (Bovine serum albumin - BSA) proizvođača Sigma Aldrich GmbH, deionizirana voda, etanol proizvođača KEMIKA, D-fruktoza proizvođača KEMIKA, katehin proizvođača Sigma Aldrich GmbH. Potrebni pribor i uređaji su: odmjerne tikvice ili menzure volumena (10-100 mL), pipete volumena (0-10 mL), mikropipete volumena (0-100  $\mu$ L), plastične epruvete (Eppendorf) i pločice za spektrofotometrijsko mjerenje (tamne pločice NUNC F 96 MICROWELL 96), spektrofotometar i fluorimetar (FLUOstar OPTIMA), vrtložna miješalica (TechnoKartell TK3S) i magnetna miješalica (TechnoKartell), inkubator (Edmund Bühler GmbH KS-15), analitička vaga (ADAM i Precisa 62A).

Metodu glikacije BSA provela sam prema metodi Spinola i sur. (2020). Fluorescenciju sam mjerila u tamnim pločicama NUNC F 96 MICROWELL 96. Volumen od 100  $\mu$ L otopine BSA (10 g/L) pomiješala sam s 100  $\mu$ L otopine fruktoze (0,5 mol/L) i 40  $\mu$ L uzorka. Smjesu sam inkubirala 24 sata pri temperaturi od 37 °C i nakon toga izmjerila fluorescenciju pri valnoj duljini ekscitacije od 405 nm i valnoj duljini emisije od 460 nm. Kao pozitivnu kontrolu koristila sam otopinu katehina ( $\gamma$ (katehin)= 6 g/L). Inhibitornu aktivnost enzima izračunala sam prema jednadžbi:

$$\%inhibicije = \left[ 100 - \frac{Ft-Fo}{Ft} \right] \times 100,$$

gdje simbol *Ft* predstavlja fluorescenciju testiranog uzorka sa enzimom, *Fo* fluorescenciju slijepe probe bez enzima, *Fc* fluorescenciju kontrole sa enzimom i *Fcb* fluorescenciju kontrole bez enzima.

### 3.3. Kromatografija visoke moći razlučivanja (HPLC)

Uz pomoć HPLC metode odredila sam:

- a) kvalitativnu analizu flavona iz ekstrakta ginka prije i nakon probave in vitro bez ili uz dodatak ispitivanih hranjivih tvari,

- b) kvantitativnu analizu flavona iz ekstrakta ginka prije i nakon probave in vitro bez ili uz dodatak ispitivanih hranjivih tvari.

### 3.3.1. Materijali i pribor za kromatografiju visoke moći razlučivanja

Potrebne kemikalije i reagensi su: deionizirana voda, etanol proizvođača KEMIKA, klorovodična kiselina proizvođača KEMIKA, metanol proizvođača KEMIKA, octena kiselina proizvođača SigmaAldrich GmbH, standardi kvercetin proizvođača SigmaAldrich GmbH, kempefola proizvođača SigmaAldrich GmbH i izoramnetina proizvođača SigmaAldrich GmbH. U potrebni pribor i uređaje spadaju: odmjerne tikvice ili menzure volumena (10-100 mL), pipete volumena (0-10 mL), mikropipete volumena (0-100 µL), plastične epruvete (Eppendorf), vrtložna miješalica (TechnoKartell TK3S), termoblok (Eppendorf), HPLC uređaj (Agilent 1100 Series s UV/VIS detektorom), inkubator (Edmund Bühler GmbH HKS-15), analitička vaga (ADAM i Precisa 62A).

### 3.3.2. Priprema uzoraka za HPLC

Za početak potrebno je uzorke pročistiti od proteina, taj proces zovemo precipitacija proteina. Proteine unutar uzorka odvojila sam prema Kendrick Labs Inc. protokolu. Pripremila sam smjesu uzorka i etanola u volumnom omjeru 1:9. Pripremljenu smjesu hladila sam u trajanju 2 h na temperaturi od -80 °C. Zatim sam smjesu centrifugirala u trajanju 15 minuta na 13 000 rpm. Zatim je potrebno provesti kiselu hidrolizu. Ona podrazumijeva dodatak klorovodične kiseline i zagrijavanje u termobloku 2h na temperaturi od 80 °C i 300 rpm. Nakon toga uzorci se centrifugiraju tri puta (13,000 rpm, 5 min). Nakon kiselinske hidrolize upotrebom klorovodične kiseline (c(HCl)= 1,2 mol/L) u trajanju od 2 h pri 80°C i 300 rpm, uzorci su spremni za propuštanje kroz HPLC uređaj.

### 3.4. HPLC analiza

Razdvajanje sam provela na nepolarnoj koloni Poroshell 120 SB-C18 dimenzija 4,6 x 75 mm s veličinom čestica 2,7 µm uz upotrebu pretkolone Zorbax Rx-C18 dimenzija 4,6 x 12,5 mm s veličinom čestica 5 µm. Mobilna faza A bila je 0,2 %-tna octena kiselina, a mobilna faza B smjesa 0,2 %-tne octene kiseline i 80 %-tnog metanola. Brzina protoka otapala bila je 1 mL/min, aplicirani volumen uzorka 20 µL, a gradijent otapala kao u radu Šola i sur. (2020). Flavonoide od interesa detektirala sam pri 360 nm, uspoređujući njihova s retencijskim vremenima komercijalnih standarda. Kvantifikaciju spojeva u uzorku provela sam upotrebom baždarnih pravaca odgovarajućih standarda prema formuli:

$$x = \frac{y - b}{a} \left( \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right)$$

Pri čemu  $x$  označava masu spoja, a  $y$  apsorbanciju. Baždarne pravce za svaki spoj definirala sam analizom otopina različitih koncentracija (0,01-0,25 g/L) standarda istom metodom kao i za ekstrakte.

### 3.5. Biodostupnost fitokemikalija

Za svaku fazu probave ekstrakta ginka sa ili bez dodatak ispitivanih hranjivih tvari izračunala sam biodostupnost fitokemikalija (fenola, flavonoida, fenolnih kiselina, hidroksicimetnih kiselina, flavanola, flavonola, proantocijanidina, terpenkih trilaktona, kempferola, kvercetina i izoramnetina) prateći sljedeće formule:

$$\text{biodostupnost u usnoj fazi} = \left( \frac{\text{BC usna faza}}{\text{BC prije probave } in vitro} \right) \times 100\%$$

$$\text{biodostupnost u želučanoj fazi} = \left( \frac{\text{BC želučana faza}}{\text{BC prije probave } in vitro} \right) \times 100\%$$

$$\text{biodostupnost u crijevnoj fazi} = \left( \frac{\text{BC cijevna faza}}{\text{BC prije probave } in vitro} \right) \times 100\%$$

gdje BC usna faza, BC želučana faza i BC crijevna faza odgovaraju ukupnoj ili pojedinačnoj srednjoj koncentraciji bioaktivnih spojeva usne, želučane i crijevnog faze, a BC prije probave *in vitro* ukupnoj ili pojedinačnoj koncentraciji bioaktivnih spojeva prije probave *in vitro*.

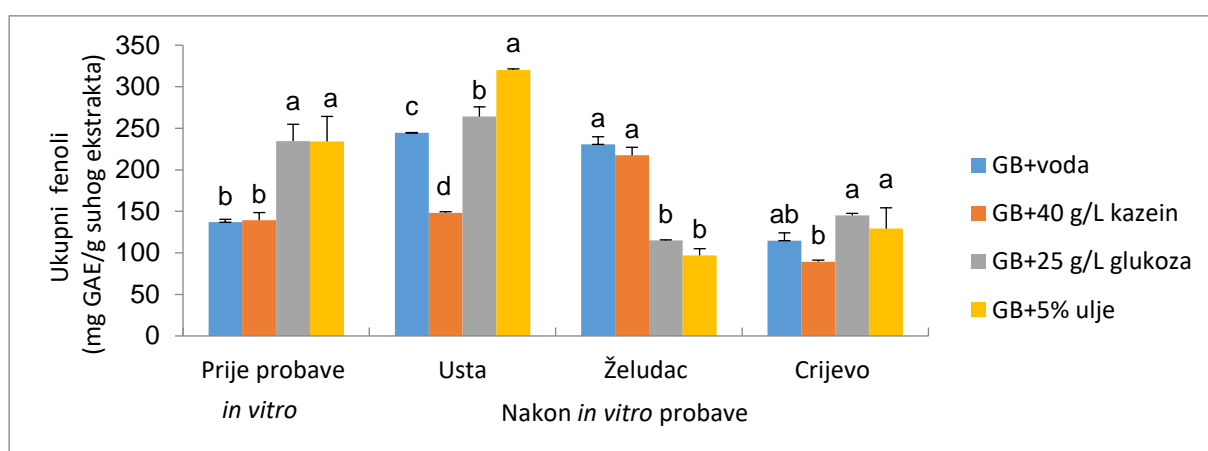
### 3.6. Statistička analiza

Sve dobivene rezultate prikazala sam kao aritmetičku sredinu tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statističku analizu provela sam pomoću računalnog programa Statistica 13.5.0.17 (Stat Soft Inc., SAD). Usporedbu kontrole i tretmana (pojedinačno i međusobno) provela sam pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA) te primjenom "Duncan's New Multiple Range Test" to jest post hoc testa višestrukih usporedbi. Provela sam i analizu glavnih komponenti (eng. Principal Component Analysis -PCA) kako bih dobila vizualni uvid u odnos između fitokemikalija i biološke aktivnosti. Ovakva statistička metoda zasniva se na postavljanju korelacije između varijabli te grupiranju uzorka u glavne komponente (engl. principal components PCs). Isto tako pruža opis odnosa između varijabli zbog čega nam omogućuje vizualizaciju njihovog odnosa, govori nam jesu li te varijable u konačnici slične ili različite. One varijable koje se nalaze zajedno biti će slične, dok će one udaljenije biti različite. Statistički značajnim smatrane su vrijednosti koje se razlikuju na razini  $p \leq 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Ukupni fenoli

Prema Slici 7 statistički značajno veći sadržaj ukupnih fenola (TP) prije probave *in vitro* pronađen je za uzorak ekstrakta lišća *Ginkgo biloba* L. u kombinacijama s glukozom ( $\gamma= 25$  g/L) i uljem ( $w= 5$  %). Za oralnu fazu probave najviši sadržaj TP zabilježen je za kombinaciju ekstrakta ginka s uljem ( $w= 5$  %), a najmanji je zabilježen za kombinaciju ginka s kazeinom ( $\gamma= 40$  g/L). U sljedećoj fazi u želudcu najviši sadržaj TP pronađen je za kombinaciju ginka s vodom i kazeinom ( $\gamma= 40$  g/L). U završnoj fazi (crijevna faza) najmanji sadržaj ispitivanih TP ima kombinacija ginka s kazeinom, a najviši kombinacija ginka s uljem i glukozom.



Slika 7. Ukupni fenoli izraženi u mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po g suhog ekstrakta za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro* i svaku skupinu uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-d (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

Rezultati prikazani u Tablici 1 pokazuju da je trend najviše biodostupnosti TP kroz sve faze probave za kombinaciju ekstrakta ginka s vodom te u uzorku ekstrakta ginka s kazeinom u želučanoj fazi.

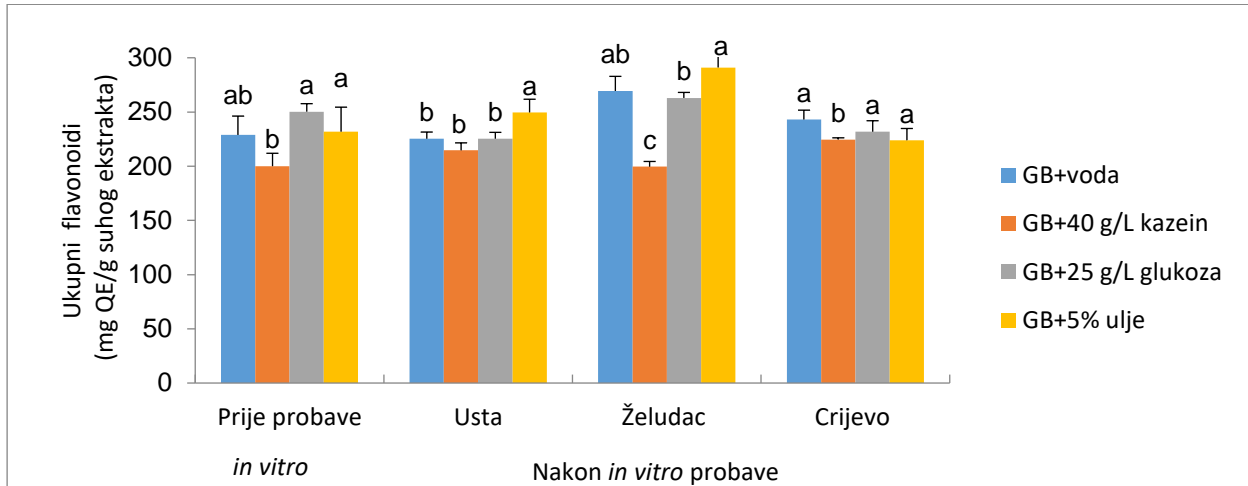
Tablica 1. Biodostupnost (%) ukupnih fenola (TP) za usnu, želučanu i crijevnu fazu probave *in vitro* i za sve skupine uzoraka ekstrakta ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

<b>Biodostupnost TP - usta</b>	<b>%</b>
GB+voda	178,54 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>
GB+40 g/L kazein	106,20 $\pm$ 1,09 <sup>c</sup>
GB+25 g/L glukoza	112,52 $\pm$ 4,98 <sup>c</sup>
GB+5% ulje	136,74 $\pm$ 0,53 <sup>b</sup>
<b>Biodostupnost TP – želudac</b>	<b>%</b>
GB+voda	168,47 $\pm$ 6,76 <sup>a</sup>
GB+40 g/L kazein	156,03 $\pm$ 6,92 <sup>a</sup>
GB+25 g/L glukoza	49,05 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>
GB+5% ulje	41,46 $\pm$ 3,40 <sup>b</sup>
<b>Biodostupnost TP - crijevo</b>	<b>%</b>
GB+voda	83,81 $\pm$ 6,85 <sup>a</sup>
GB+40 g/L kazein	64,07 $\pm$ 1,43 <sup>b</sup>
GB+25 g/L glukoza	61,83 $\pm$ 1,05 <sup>b</sup>
GB+5% ulje	55,17 $\pm$ 10,70 <sup>b</sup>



## 4.2. Ukupni flavonoidi

Sadržaj ukupnih flavonoida (TF) u ustima i želucu, prema Slici 8, najviši je za uzorke ekstrakta ginka s uljem ( $w= 5\%$ ). Za sve faze prije i nakon probave *in vitro*, osim oralne, sadržaj TF najmanji je za kombinaciju ginka s kazeinom ( $\gamma= 40\text{ g/L}$ ).



Slika 8. Ukupni flavonoidi izraženi u mg ekvivalenta kvercetina (QE) po g suhog ekstrakta za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro* i svaku skupinu uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

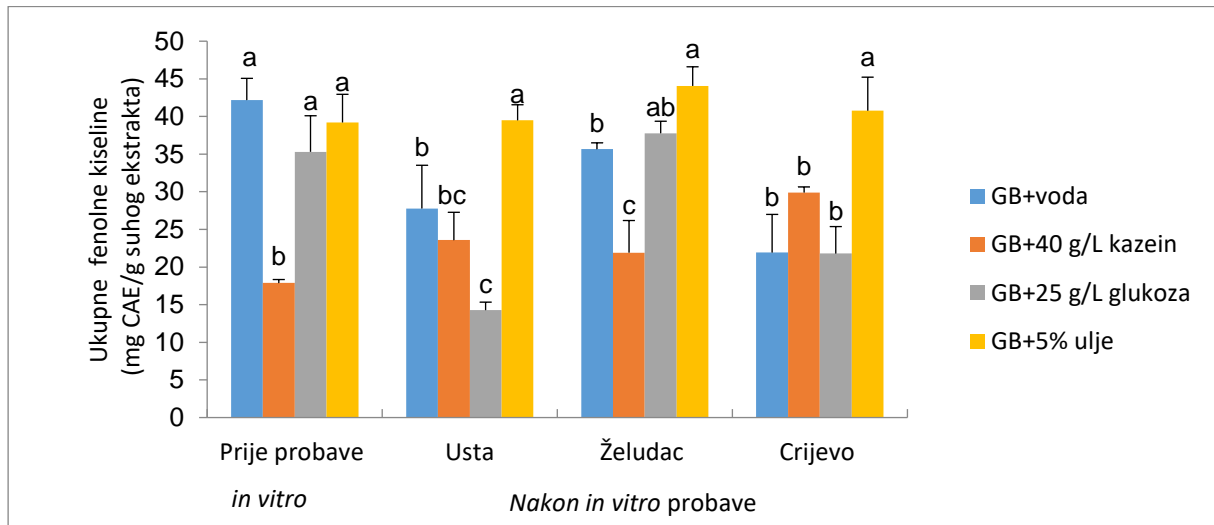
Biodostupnost TF različita je za svaku fazu probave (Tablica 2). Najviši postotak biodostupnosti flavonoida u ustima izmjeren je uzorcima ginka sa dodatkom kazeina i ulja. U želučanoj fazi najviša biodostupnost TF je u uzorcima ginka uz dodatak ulja te ginka sa vodom, a u crijevnoj fazi u uzorku ginka u kombinaciji s kazeinom.

Tablica 2. Biodostupnost (%) ukupnih flavonoida (TF) za usnu, želučanu i crijevnu fazu probave *in vitro* za sve skupine uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

<b>Biodostupnost TF - usta</b>	<b>%</b>
GB+voda	98,46 $\pm$ 2,73 <sup>b</sup>
GB+40 g/L kazein	107,28 $\pm$ 3,41 <sup>a</sup>
GB+25 g/L glukoza	90,04 $\pm$ 2,34 <sup>b</sup>
GB+5% ulje	107,67 $\pm$ 5,24 <sup>a</sup>
<b>Biodostupnost TF - želudac</b>	<b>%</b>
GB+voda	117,73 $\pm$ 5,89 <sup>a</sup>
GB+40 g/L kazein	99,73 $\pm$ 2,42 <sup>b</sup>
GB+25 g/L glukoza	105,06 $\pm$ 2,03 <sup>b</sup>
GB+5% ulje	125,53 $\pm$ 5,00 <sup>a</sup>
<b>Biodostupnost TF - crijevo</b>	<b>%</b>
GB+voda	106,24 $\pm$ 3,77 <sup>ab</sup>
GB+40 g/L kazein	112,24 $\pm$ 0,78 <sup>a</sup>
GB+25 g/L glukoza	92,61 $\pm$ 4,05 <sup>c</sup>
GB+5% ulje	96,60 $\pm$ 4,65 <sup>bc</sup>

#### 4.3. Ukupne fenolne kiseline

Prema Slici 9 statistički najmanja vrijednost sadržaja ukupnih fenolnih kiselina (TPA) prije probave *in vitro* pokazana je za kombinaciju ginka s kazeinom ( $\gamma$ = 40 g/L), glukozom ( $\gamma$ = 25 g/L) i uljem ( $w$ = 5 %). U oralnoj fazi najviše vrijednosti očitane su za kombinaciju ginka s uljem, takav trend zabilježen je i u ostalim fazama probave. U oralnoj i želučanoj fazi uzorak ginka u kombinaciji s glukozom pokazao je najniže vrijednosti TPA. U završnoj (crijevnoj) fazi nije pronađena statistička razlika između uzoraka ginka u kombinaciji s vodom, kazeinom i glukozom.



Slika 9. Ukupne fenolne kiseline izražene u mg ekvivalenta kavene kiseline (CAE) po g suhog ekstrakta za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro* i svaku skupinu uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

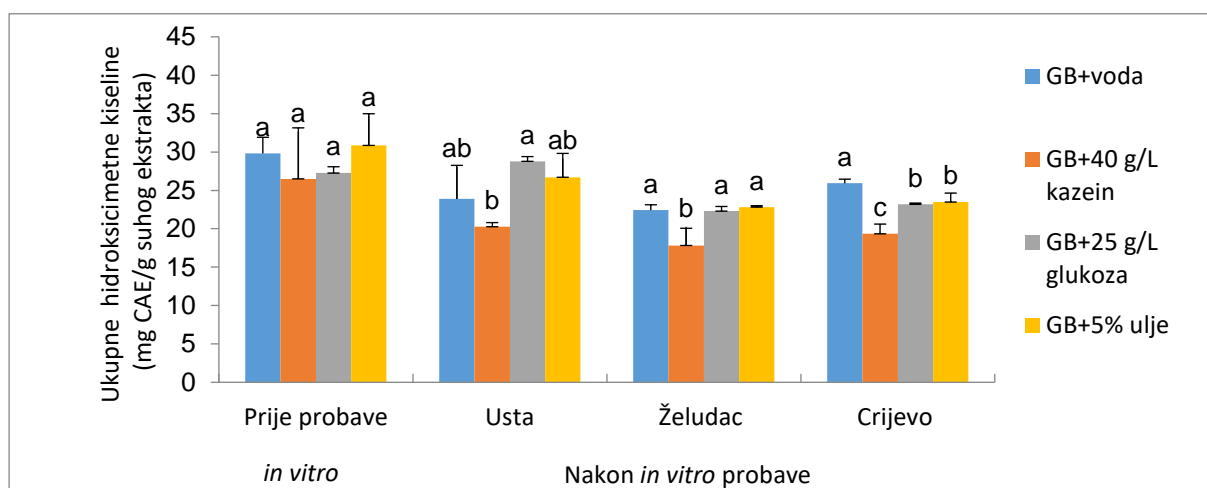
Najviša biodostupnost TPA izmjerena je za kombinaciju ekstrakta ginka s kazeinom u svim fazama probave (Tablica 3).

Tablica 3. Biodostupnost (%) ukupnih fenolnih kiselina (TPA) za usnu, želučanu i crijevnu fazu probave *in vitro* za sve skupine uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

<b>Biodostupnost TPA - usta</b>	<b>%</b>
GB+voda	65,85 $\pm$ 13,60 <sup>bc</sup>
GB+40 g/L kazein	131,89 $\pm$ 20,68 <sup>a</sup>
GB+25 g/L glukoza	40,44 $\pm$ 3,00 <sup>c</sup>
GB+5% ulje	100,73 $\pm$ 5,26 <sup>ab</sup>
<b>Biodostupnost TPA - želudac</b>	<b>%</b>
GB+voda	84,53 $\pm$ 1,98 <sup>b</sup>
GB+40 g/L kazein	122,56 $\pm$ 23,90 <sup>a</sup>
GB+25 g/L glukoza	106,99 $\pm$ 4,52 <sup>ab</sup>
GB+5% ulje	112,37 $\pm$ 6,48 <sup>ab</sup>
<b>Biodostupnost TPA - crijevo</b>	<b>%</b>
GB+voda	51,96 $\pm$ 12,02 <sup>c</sup>
GB+40 g/L kazein	167,23 $\pm$ 4,16 <sup>a</sup>
GB+25 g/L glukoza	61,72 $\pm$ 10,15 <sup>c</sup>
GB+5% ulje	103,97 $\pm$ 11,37 <sup>b</sup>

#### 4.4. Ukupne hidroksicimetne kiseline

Prije probave *in vitro* nije pronađena statistički značajna razlika u sadržaju ukupnih hidroksicimetnih kiselina u nijednoj kombinaciji s ekstraktom ginka (Slika 10). Tokom faza probave primijećen je statistički značajan pad sadržaja hidroksicimetnih kiselina u kombinaciji ekstrakta ginka s kazeinom ( $\gamma=40$  g/L). U završnom dijelu probave statistički najviši udio hidroksicimetnih kiselina sadržava uzorak ekstrakta ginka u kombinaciji s vodom.



Slika 10. Ukupne hidroksicimetne kiseline izražene u mg ekvivalenta kavene kiseline (CAE) po g suhog ekstrakta za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro* i svaku skupinu uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

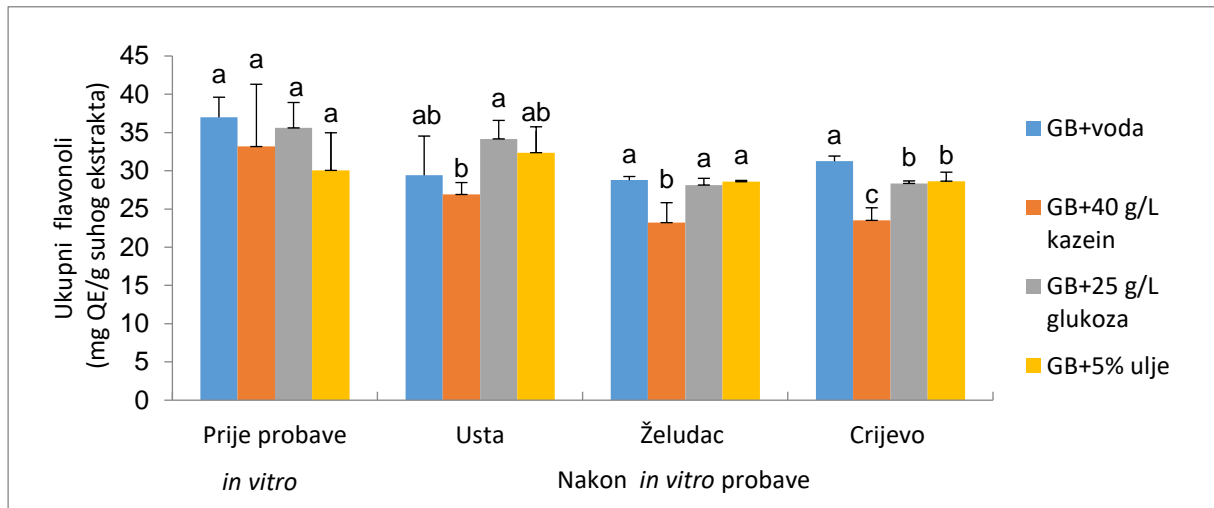
U Tablici 4 primjetan je trend povećane biodostupnosti THA za uzorak ginka u kombinaciji s glukozom u ustima i želucu. U završnoj fazi u crijevu najviša biodostupnost THA izmjerena je u uzorku ginka u kombinaciji s vodom i glukozom.

Tablica 4. Biodostupnost (%) ukupnih hidroksicimetnih kiselina (THA) za usnu, želučanu i crijevnu fazu probave *in vitro* za sve skupine uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

<b>Biodostupnost THA - usta</b>	<b>%</b>
GB+voda	80,08 $\pm$ 14,69 <sup>ab</sup>
GB+40 g/L kazein	76,47 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>
GB+25 g/L glukoza	105,60 $\pm$ 2,26 <sup>a</sup>
GB+5% ulje	86,55 $\pm$ 10,06 <sup>ab</sup>
<b>Biodostupnost THA – želudac</b>	<b>%</b>
GB+voda	75,19 $\pm$ 2,35 <sup>ab</sup>
GB+40 g/L kazein	67,26 $\pm$ 8,47 <sup>b</sup>
GB+25 g/L glukoza	81,80 $\pm$ 2,22 <sup>a</sup>
GB+5% ulje	73,96 $\pm$ 0,59 <sup>ab</sup>
<b>Biodostupnost THA – crijevo</b>	<b>%</b>
GB+voda	86,93 $\pm$ 1,82 <sup>a</sup>
GB+40 g/L kazein	72,98 $\pm$ 4,81 <sup>b</sup>
GB+25 g/L glukoza	85,03 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>
GB+5% ulje	76,10 $\pm$ 3,79 <sup>b</sup>

#### 4.5. Ukupni flavonoli

Statistički značajan pad sadržaja ukupnih flavonola (TFLo) primjećuje se u usnoj fazi probave *in vitro* za uzorak ekstrakta ginka u kombinaciji s kazeinom u odnosu na uzorak ekstrakta ginka u kombinaciji s glukozom (Slika 11). Uzorak ekstrakta ginka u kombinaciji s kazeinom ima statistički najmanji udio TFLo u odnosu na ostale uzorke u želučanoj i crijevnoj fazi probave *in vitro*. U završnoj fazi probave uzorak ginka u kombinaciji s vodom ima statistički najviši sadržaj TFLo.



Slika 11. Ukupni flavonoli izraženi u mg ekvivalenta kvercetina (QE) po g suhog ekstrakta za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro* i svaku skupinu uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

Biodostupnost TFLo prema Tablici 5 najviša je za uzorak ginka u kombinaciji s uljem za sve faze probave *in vitro*.

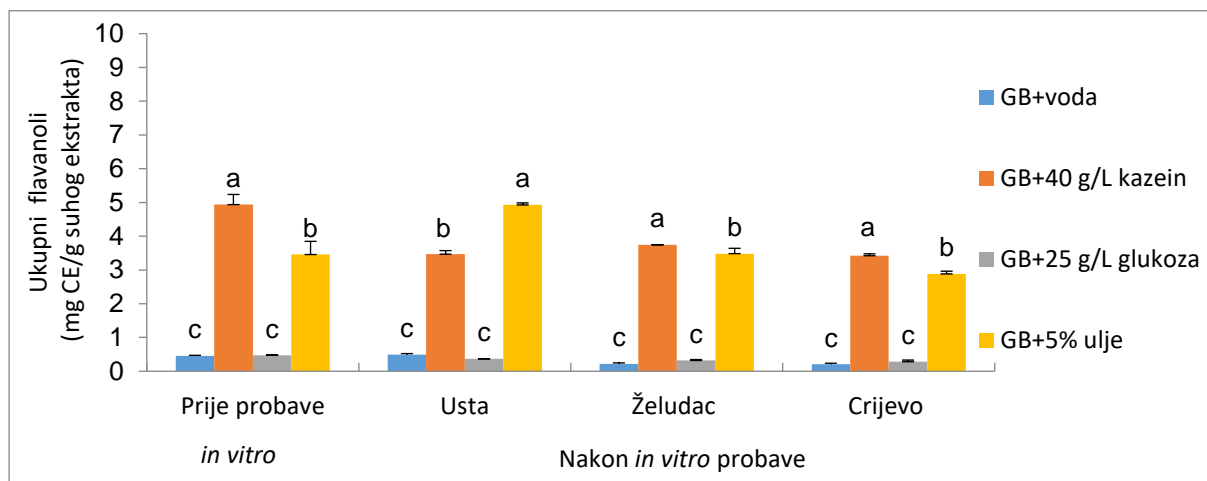
Tablica 5. Biodostupnost (%) ukupnih flavonola (TFLo) za usnu, želučanu i crijevnu fazu probave *in vitro* za sve skupine uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

<b>Biodostupnost TFLo - usta</b>	<b>%</b>
GB+voda	79,50 $\pm$ 13,87 <sup>b</sup>
GB+40 g/L kazein	81,10 $\pm$ 4,71 <sup>b</sup>
GB+25 g/L glukoza	95,96 $\pm$ 6,81 <sup>ab</sup>
GB+5% ulje	107,72 $\pm$ 11,25 <sup>a</sup>
<b>Biodostupnost TFLo - želudac</b>	<b>%</b>
GB+voda	77,78 $\pm$ 1,28 <sup>b</sup>
GB+40 g/L kazein	70,01 $\pm$ 7,87 <sup>b</sup>
GB+25 g/L glukoza	79,04 $\pm$ 2,46 <sup>b</sup>
GB+5% ulje	95,07 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup>
<b>Biodostupnost TFLo - crijevo</b>	<b>%</b>
GB+voda	84,46 $\pm$ 1,85 <sup>b</sup>
GB+40 g/L kazein	70,89 $\pm$ 4,96 <sup>c</sup>
GB+25 g/L glukoza	79,62 $\pm$ 0,91 <sup>b</sup>
GB+5% ulje	95,33 $\pm$ 3,91 <sup>a</sup>



#### 4.6. Ukupni flavanoli

Statistički gledano sadržaj ukupnih flavanola (TFLA) najniži je u kombinaciji ginka s vodom i glukozom ( $\gamma = 25$  g/L) za sve faze prije i nakon probave *in vitro* (Slika 12). Prije probave najviši sadržaj TFLA sadrži uzorak ginka u kombinaciji s kazeinom ( $\gamma = 40$  g/L). U usnoj fazi najviši udio TFLA sadrži uzorak ginka u kombinaciji s uljem ( $w = 5\%$ ). U završne dvije faze probave (probava u želucu i u crijevu) trend se ponavlja kao i prije probave.



Slika 12. Ukupni flavanoli izraženi u mg ekvivalenta katehina (CE) po g suhog ekstrakta za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro* i svaku skupinu uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

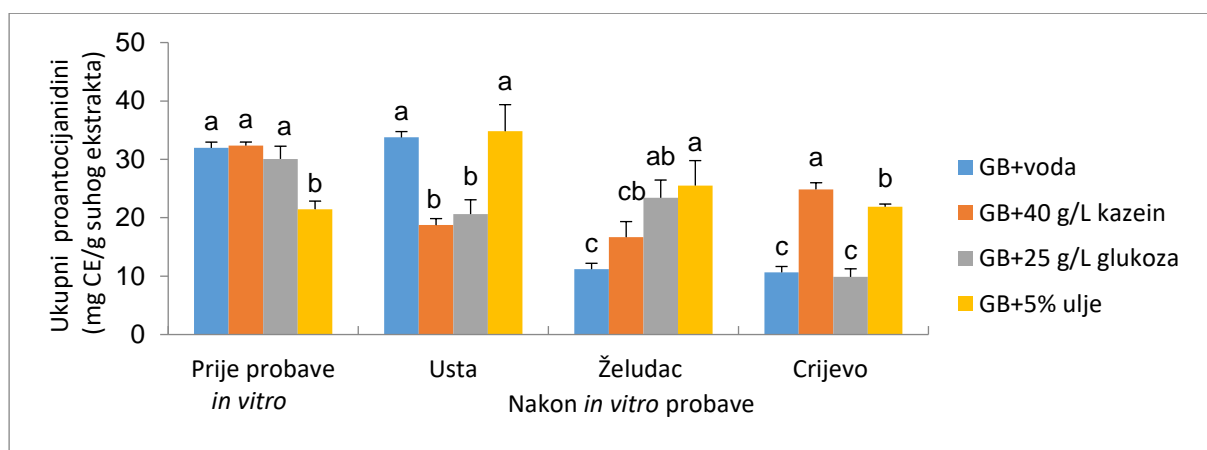
Prema Tablici 6 najviša izmjerena biodostupnost TFLA je za kombinaciju ginka s uljem u usnoj, želučanoj i crijevnoj fazi probave u odnosu na sve ostale kombinacije ginka (voda, kazein i glukoza).

Tablica 6. Biodostupnost (%) ukupnih flavanola (TFLA) za usnu, želučanu i crijevnu fazu probave *in vitro* za sve skupine uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

<b>Biodostupnost TFLA - usta</b>	<b>%</b>
GB+voda	108,11 $\pm$ 7,48 <sup>b</sup>
GB+40 g/L kazein	70,26 $\pm$ 2,13 <sup>c</sup>
GB+25 g/L glukoza	77,75 $\pm$ 0,48 <sup>c</sup>
GB+5% ulje	142,46 $\pm$ 1,74 <sup>a</sup>
<b>Biodostupnost TFLA - želudac</b>	<b>%</b>
GB+voda	48,65 $\pm$ 6,15 <sup>c</sup>
GB+40 g/L kazein	75,83 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>
GB+25 g/L glukoza	67,30 $\pm$ 5,72 <sup>b</sup>
GB+5% ulje	100,77 $\pm$ 4,57 <sup>a</sup>
<b>Biodostupnost TFLA - crijevo</b>	<b>%</b>
GB+voda	45,48 $\pm$ 6,98 <sup>c</sup>
GB+40 g/L kazein	69,30 $\pm$ 1,15 <sup>ab</sup>
GB+25 g/L glukoza	59,44 $\pm$ 10,65 <sup>bc</sup>
GB+5% ulje	83,33 $\pm$ 2,39 <sup>a</sup>

#### 4.7. Ukupni proantocijanidini

Prema Slici 13 prije probave *in vitro* nije pronađena statistički značajna razlika u sadržaju ukupnih proantocijanidina (TPAN) između uzoraka ginka s vodom, kazeinom ( $\gamma= 40$  g/L) i glukozom ( $\gamma= 25$  g/L) dok je statistički značajan pad zamijećen između navedenih uzoraka i uzorka ginka u kombinaciji s uljem ( $w= 5$  %). U oralnoj fazi probave najviši sadržaj TPAN pokazuju uzorci s vodom i uljem ( $w= 5$  %). U želučanoj fazi najviši sadržaj pokazuje i dalje uzorak u kombinaciji s uljem, a najmanji uzorak u kombinaciji s vodom. U crijevnoj fazi najviši sadržaj TPAN pokazuje uzorak s kazeinom, a najniže vrijednosti uzorci u kombinaciji s vodom i glukozom.



Slika 13. Ukupni proantocijanidini izraženi u mg ekvivalenta katehina (CE) po g suhog ekstrakta za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro* i svaku skupinu uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

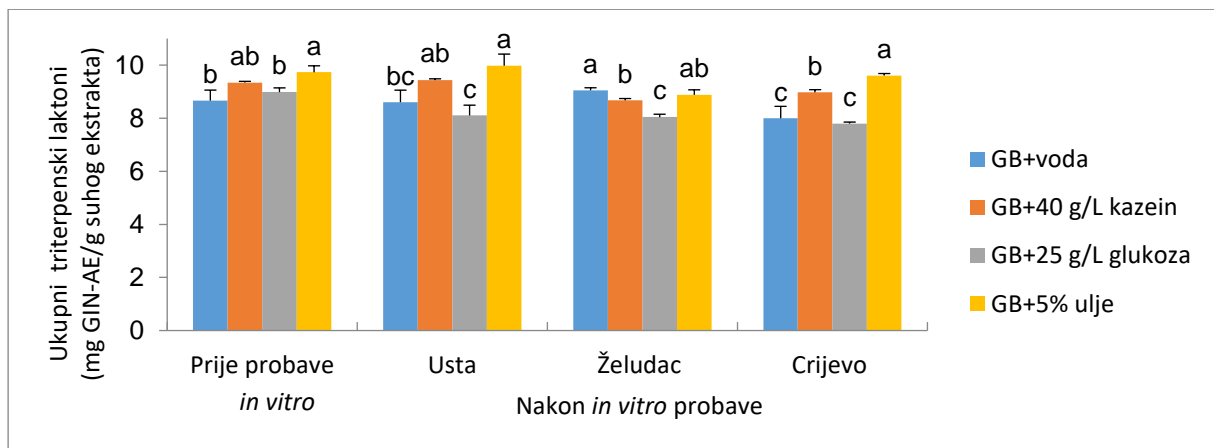
U svim fazama probave najviša biodostupnost TPAN izmjerena je u kombinaciju ginka s uljem u odnosu na sve druge kombinacije (Tablica 7).

Tablica 7. Biodostupnost (%) ukupnih proantocijanidina (TPAN) za usnu, želučanu i crijevnu fazu probave *in vitro* za sve skupine uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

<b>Biodostupnost TPAN - usta</b>	<b>%</b>
GB+voda	105,64 $\pm$ 15,77 <sup>b</sup>
GB+40 g/L kazein	57,93 $\pm$ 3,42 <sup>c</sup>
GB+25 g/L glukoza	68,62 $\pm$ 8,10 <sup>bc</sup>
GB+5% ulje	162,19 $\pm$ 21,15 <sup>a</sup>
<b>Biodostupnost TPAN - želudac</b>	<b>%</b>
GB+voda	35,05 $\pm$ 3,29 <sup>c</sup>
GB+40 g/L kazein	51,55 $\pm$ 8,21 <sup>bc</sup>
GB+25 g/L glukoza	77,86 $\pm$ 10,13 <sup>b</sup>
GB+5% ulje	118,84 $\pm$ 19,86 <sup>a</sup>
<b>Biodostupnost TPAN - crijevo</b>	<b>%</b>
GB+voda	33,33 $\pm$ 3,81 <sup>c</sup>
GB+40 g/L kazein	76,85 $\pm$ 3,48 <sup>b</sup>
GB+25 g/L glukoza	32,81 $\pm$ 4,60 <sup>c</sup>
GB+5% ulje	100,67 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>

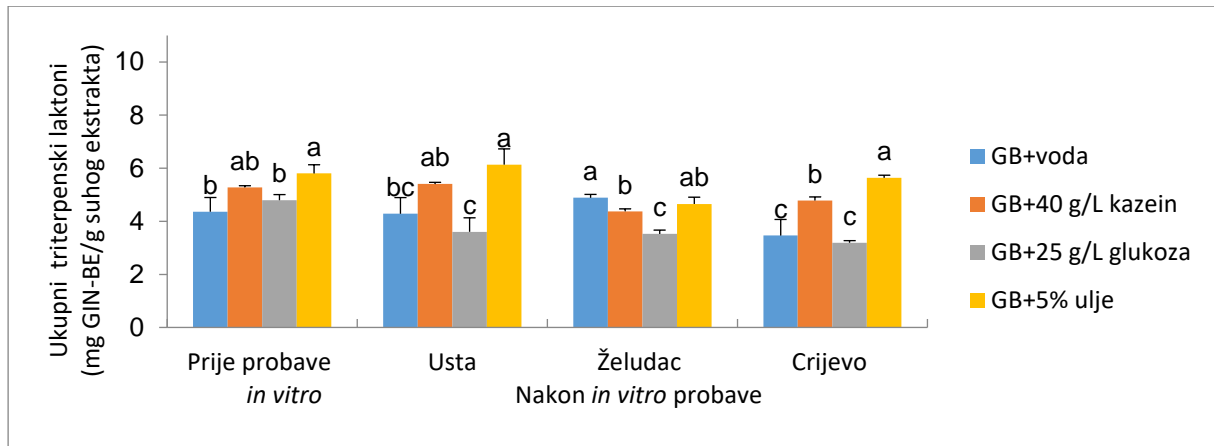
#### 4.8. Ukupni terpenški trilaktoni

Prema Slici 14 uzorak ginka u kombinaciji s uljem ( $w= 5\%$ ) pokazuje najviše vrijednosti ukupnih triterpenskikh laktona (TTL) izraženim u ekvivalentima ginkolida A u svim fazama prije i nakon probave *in vitro*, osim u želučanoj fazi u kojoj najviši udio pokazuje uzorak ginka u kombinaciji s vodom. Uzorak ginka u kombinaciji s glukozom ( $\gamma= 25\text{ g/L}$ ) pokazuje najniži udio TTL izraženim u ekvivalentima ginkolida A u svim fazama prije i nakon probave *in vitro*. Ginko u kombinaciji sa vodom također pokazuje najniže vrijednosti TTL izraženim u ekvivalentima ginkolida A prije probave *in vitro* te u intestinalnoj fazi probave *in vitro*.



Slika 14. Ukupni triterpenski laktoni izraženi u mg ekvivalenta ginkolida A (GIN-AE) po g suhog ekstrakta za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro* i svaku skupinu uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

Prema Slici 15 uzorak ginka u kombinaciji s uljem pokazuje najviše vrijednosti ukupnih triterpenih laktona izraženim u ekvivalentima ginkolida B u svim fazama prije i nakon probave *in vitro*, osim u želučanoj fazi u kojoj uzorak ginka u kombinaciji s vodom pokazuje najviše vrijednosti. Nasuprot tome uzorak ginka u kombinaciji s glukozom pokazuje najniže vrijednosti kao i uzorak ginka u kombinaciji s vodom prije probave *in vitro* i u intestinalnoj fazi.



Slika 15. Ukupni triterpenski laktoni izraženi u mg ekvivalenta ginkolida B (GIN-BE) po g suhog ekstrakta za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro* i svaku skupinu uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

Prema Tablici 8 biodostupnost ukupnih triterpenskih laktona izraženih u ekvivalentima ginkolida A najviša je za uzorak ginka u kombinaciji s uljem za usnu i crijevnu fazu probave, a za želučanu za uzorak ginka u kombinaciji s vodom.

Tablica 8. Biodostupnost (%) ukupnih triterpenskih laktona (TTL) izraženih u ekvivalentima ginkolida A (GIN-A) za usnu, želučanu i crijevnu fazu probave *in vitro* za sve skupine uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

<b>Biodostupnost TTL (GIN-A) - usta</b>	<b>%</b>
GB+voda	99,33 $\pm$ 5,22 <sup>ab</sup>
GB+40 g/L kazein	101,01 $\pm$ 0,49 <sup>ab</sup>
GB+25 g/L glukoza	90,17 $\pm$ 4,33 <sup>b</sup>
GB+5% ulje	102,53 $\pm$ 4,51 <sup>a</sup>
<b>Biodostupnost TTL (GIN-A) - želudac</b>	<b>%</b>
GB+voda	104,49 $\pm$ 1,09 <sup>a</sup>
GB+40 g/L kazein	92,85 $\pm$ 0,71 <sup>b</sup>
GB+25 g/L glukoza	89,48 $\pm$ 1,21 <sup>b</sup>
GB+5% ulje	91,24 $\pm$ 1,95 <sup>b</sup>
<b>Biodostupnost TTL (GIN-A) - crijevo</b>	<b>%</b>
GB+voda	92,32 $\pm$ 5,18 <sup>bc</sup>
GB+40 g/L kazein	96,08 $\pm$ 1,05 <sup>ab</sup>
GB+25 g/L glukoza	86,77 $\pm$ 0,64 <sup>c</sup>
GB+5% ulje	98,74 $\pm$ 0,76 <sup>a</sup>

Prema Tablici 9 uzorak ginka u kombinaciji s uljem pokazuje najveće izmjerene vrijednosti biodostupnosti triterpenskih laktona izraženim u ekvivalentima ginkolida B u oralnoj i crijevnoj fazi dok uzorak ginka u kombinaciji s vodom pokazuje najviše izmjerene vrijednosti u crijevnoj fazi probave *in vitro*.

Tablica 9. Biodostupnost (%) ukupnih triterpenskih laktona (TTL) izraženim u ekvivalentima ginkolida B (GIN-B) za usnu, želučanu i crijevnu fazu probave *in vitro* za sve skupine uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

<b>Biodostupnost TTL (GIN-B) - usta</b>	<b>%</b>
GB+voda	98,21 $\pm$ 14,00 <sup>ab</sup>
GB+40 g/L kazein	102,41 $\pm$ 1,17 <sup>ab</sup>
GB+25 g/L glukoza	75,14 $\pm$ 10,95 <sup>b</sup>
GB+5% ulje	105,73 $\pm$ 10,20 <sup>a</sup>
<b>Biodostupnost TTL (GIN-B) - želudac</b>	<b>%</b>
GB+voda	112,02 $\pm$ 2,93 <sup>a</sup>
GB+40 g/L kazein	82,92 $\pm$ 1,70 <sup>b</sup>
GB+25 g/L glukoza	73,42 $\pm$ 3,06 <sup>c</sup>
GB+5% ulje	80,18 $\pm$ 4,40 <sup>bc</sup>
<b>Biodostupnost TTL (GIN-B) - crijevo</b>	<b>%</b>
GB+voda	79,41 $\pm$ 13,89 <sup>bc</sup>
GB+40 g/L kazein	90,64 $\pm$ 2,51 <sup>ab</sup>
GB+25 g/L glukoza	66,56 $\pm$ 1,62 <sup>c</sup>
GB+5% ulje	97,15 $\pm$ 1,71 <sup>a</sup>



#### 4.9. Normirani rezultati biodostupnosti ukupnih polifenolnih skupina i triterpenskih laktona

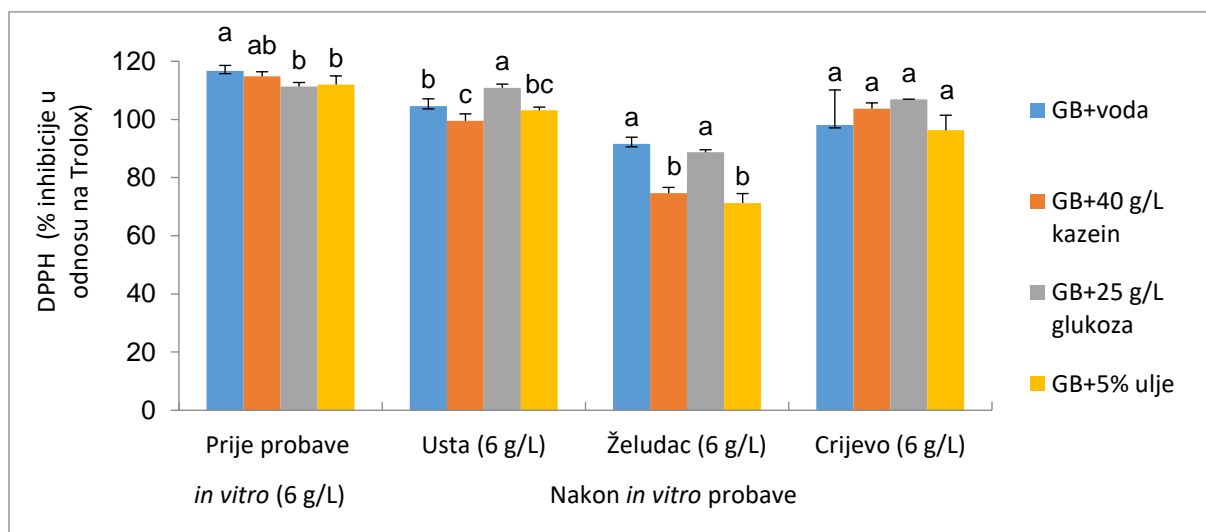
U Tablici 10 prikazan je postotak biodostupnosti ukupnih polifenola, pojedinih skupina ukupnih polifenola i triterpenskih laktona za usnu, želučanu i crijevnu fazu probave *in vitro* u odnosu na stanje prije probave *in vitro* za sve skupine uzoraka. Vrijednosti su normirane prema maksimalnim izmjerenim vrijednostima ukupnih polifenola, pojedinih skupina ukupnih polifenola ili triterpenskih laktona za sve skupine uzoraka ginka. Najviša biodostupnost ukupnih flavonola (TFLo), ukupnih flavanola (TFLA) i ukupnih proantocijanidina (TPAN) izmjerena je u uzorcima ginka u kombinaciji sa 5% maslinovim uljem u svim fazama probave *in vitro* (usta, želuac i crijevo) u odnosu na sve druge tretmane ginka (ginko u kombinaciji sa vodom, kazeinom i glukozom). Biodostupnost ukupnih fenolnih kiselina (TPA) je najviša u uzorcima ginka u kombinaciji sa kazeinom u usnoj, želučanoj i crijevnoj fazi probave *in vitro*. Najviše vrijednosti biodostupnosti ukupnih hidroksicimetnih kiselina (THA) izmjerene su u uzorcima ginka u kombinaciji s glukozom u usnoj i želučanoj fazi, te u uzorcima ginka u kombinaciji sa vodom i glukozom u crijevnoj fazi probave *in vitro*. Postotak biodostupnosti flavonoida (TF) u ustima najviši je uzorcima ginka s dodatkom kazeina i ulja. U želučanoj fazi najviša biodostupnost TF je u uzorcima ginka uz dodatak ulja te ginka s vodom, a u crijevnoj fazi u uzorku ginka u kombinaciji sa kazeinom. Trend najviše biodostupnosti ukupnih fenola (TP) kroz sve faze probave uočen je za kombinaciju ekstrakta ginka u kombinacijama s vodom te u kombinaciji sa kazeinom u želučanoj fazi probave. Najviše vrijednosti biodostupnosti TTL (GIN-A i B) izmjerene su uzorcima ginka u kombinaciji s uljem te kazeinom i vodom u usnoj fazi probave *in vitro*. U uzorcima ginka s vodom u želučanoj fazi, te u uzorcima ginka s uljem i kazeinom u crijevnoj fazi probave *in vitro*.

Tablica 10. Postotak biodostupnosti ukupnih polifenola, pojedinih skupina ukupnih polifenola i triterpenskikh laktona za usnu, želučanu i crijevnu fazu probave *in vitro* u odnosu na stanje prije probave *in vitro* za sve skupine uzoraka. Vrijednosti su normirane prema maksimalnim izmjerenim vrijednostima ukupnih polifenola, pojedinih skupina ukupnih polifenola ili triterpenskikh laktona za sve skupine uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*. TP - ukupni fenoli, TF – ukupni flavonoidi, TPA – ukupne fenolne kiseline, THA – ukupne hidroksicimetne kiseline, TFLO – ukupni flavonoli, TFLA – ukupni flavanoli i TPAN – ukupni proantocijanidini.

<b>Biodostupnost - usta</b>	<b>TP</b>	<b>TF</b>	<b>TPA</b>	<b>THA</b>	<b>TFLO</b>	<b>TFLA</b>	<b>TPAN</b>	<b>TTL (GIN A)</b>	<b>TTL (GIN B)</b>
GB+voda	100,00 <sub>a</sub>	78,44 <sup>b</sup>	39,38 <sup>bc</sup>	75,83 <sup>ab</sup>	73,80 <sup>b</sup>	75,89 <sup>b</sup>	65,13 <sup>b</sup>	95,07 <sup>ab</sup>	87,67 <sup>ab</sup>
GB+40 g/L kazein	59,49 <sup>c</sup>	85,46 <sup>a</sup>	78,87 <sup>a</sup>	72,41 <sup>b</sup>	75,29 <sup>b</sup>	49,32 <sup>c</sup>	35,72 <sup>c</sup>	96,67 <sup>ab</sup>	91,42 <sup>ab</sup>
GB+25 g/L glukoza	63,02 <sup>c</sup>	71,72 <sup>b</sup>	24,18 <sup>c</sup>	100,00 <sup>a</sup>	89,08 <sup>ab</sup>	54,58 <sup>c</sup>	42,31 <sup>bc</sup>	86,30 <sup>b</sup>	67,07 <sup>b</sup>
GB+5% ulje	76,59 <sup>b</sup>	85,77 <sup>a</sup>	60,23 <sup>ab</sup>	81,96 <sup>ab</sup>	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	98,13 <sup>a</sup>	94,38 <sup>a</sup>
<b>Biodostupnost - želudac</b>									
GB+voda	94,36 <sup>a</sup>	93,79 <sup>a</sup>	50,55 <sup>b</sup>	71,20 <sup>ab</sup>	72,21 <sup>b</sup>	34,15 <sup>c</sup>	21,61 <sup>c</sup>	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>
GB+40 g/L kazein	87,39 <sup>a</sup>	79,44 <sup>b</sup>	73,29 <sup>a</sup>	63,69 <sup>b</sup>	64,99 <sup>b</sup>	53,23 <sup>b</sup>	31,78 <sup>bc</sup>	88,86 <sup>b</sup>	74,02 <sup>b</sup>
GB+25 g/L glukoza	27,47 <sup>b</sup>	83,69 <sup>b</sup>	63,98 <sup>ab</sup>	77,46 <sup>a</sup>	73,38 <sup>b</sup>	47,24 <sup>b</sup>	48,01 <sup>b</sup>	85,64 <sup>b</sup>	65,54 <sup>c</sup>
GB+5% ulje	23,22 <sup>b</sup>	100,00 <sup>a</sup>	67,19 <sup>ab</sup>	70,04 <sup>ab</sup>	88,26 <sup>a</sup>	70,74 <sup>a</sup>	73,27 <sup>a</sup>	87,32 <sup>b</sup>	71,57 <sup>bc</sup>
<b>Biodostupnost - crijevo</b>									
GB+voda	46,94 <sup>a</sup>	84,63 <sup>ab</sup>	31,07 <sup>c</sup>	82,32 <sup>a</sup>	78,41 <sup>b</sup>	31,92 <sup>c</sup>	20,55 <sup>c</sup>	88,36 <sup>bc</sup>	70,88 <sup>bc</sup>
GB+40 g/L kazein	35,89 <sup>b</sup>	89,41 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	69,11 <sup>b</sup>	65,81 <sup>c</sup>	48,65 <sup>ab</sup>	47,38 <sup>b</sup>	91,96 <sup>ab</sup>	80,91 <sup>ab</sup>
GB+25 g/L glukoza	34,63 <sup>b</sup>	73,78 <sup>c</sup>	36,91 <sup>c</sup>	80,52 <sup>a</sup>	73,91 <sup>b</sup>	41,72 <sup>bc</sup>	20,23 <sup>c</sup>	83,05 <sup>c</sup>	59,41 <sup>c</sup>
GB+5% ulje	30,90 <sup>b</sup>	76,96 <sup>bc</sup>	62,17 <sup>b</sup>	72,06 <sup>b</sup>	88,50 <sup>a</sup>	58,49 <sup>a</sup>	62,07 <sup>a</sup>	94,50 <sup>a</sup>	86,73 <sup>a</sup>

#### 4.10. Određivanje antioksidacijske aktivnosti metodom DPPH

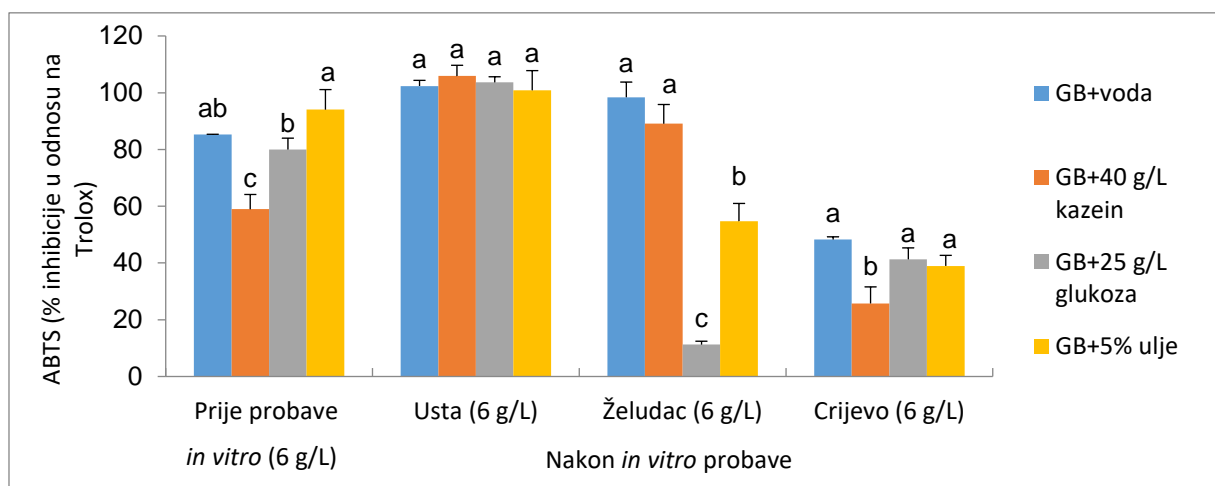
DPPH metodom mjereno je postotak inhibicije DPPH radikala u odnosu na Trolox. Najveći postotak inhibicije u odnosu na Trolox prije probave *in vitro* pronađen je za kombinaciju ginka s vodom, dok za oralnu fazu najveći postotak inhibicije u odnosu na Trolox pokazuje uzorak ginka u kombinaciji sa glukozom ( $\gamma = 25$  g/L) (Slika 16). U želučanoj fazi najviši postotak inhibicije pokazuju uzorci ginka s vodom i glukozom, te između ta dva uzorka nije pronađena statistički značajna razlika. U završnoj fazi probave nije pronađena statistički značajna razlika između testiranih skupina uzoraka.



Slika 16. Postotak inhibicije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala u odnosu na Trolox za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro* i svaku skupinu uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

#### 4.11. Određivanje antioksidacijske aktivnosti metodom ABTS

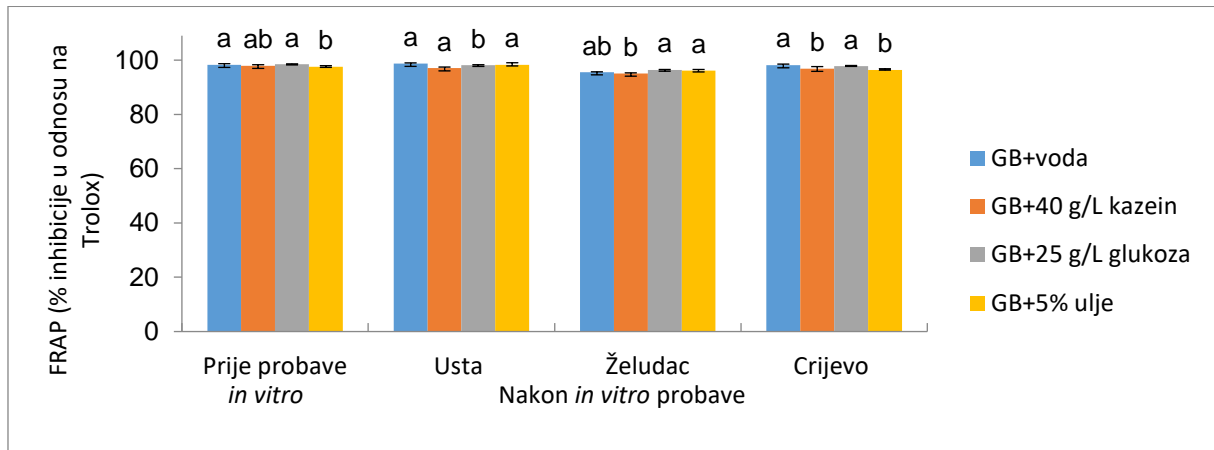
Određivanjem antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom mjeren je postotak inhibicije ABTS radikala u odnosu na Trolox. Iz Slike 17 vidljivo je da prije probave *in vitro* najmanji postotak inhibicije ABTS radikala pokazuje uzorak ginka u kombinaciji s kazeinom ( $\gamma = 40$  g/L), a najviši u uzorku ginka u kombinaciji sa uljem. U oralnoj fazi probave nije pronađena statistička razlika između uzoraka. U želučanoj fazi najveći postotak inhibicije ABTS radikala pokazali su uzorci ginka u kombinaciji s vodom i kazeinom, dok je najniži postotak inhibicije manji od 20% zabilježen u uzorku ginka u kombinaciji s glukozom. U intestinalnoj fazi probave uzorak ginka s kazeinom odstupa od ostalih i pokazuje statistički manji postotak inhibicije.



Slika 17. Postotak inhibicije radikala 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonske kiseline (ABTS) u odnosu na Trolox za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro* i svaku skupinu uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

#### 4.12. Određivanje antioksidacijske aktivnosti metodom FRAP

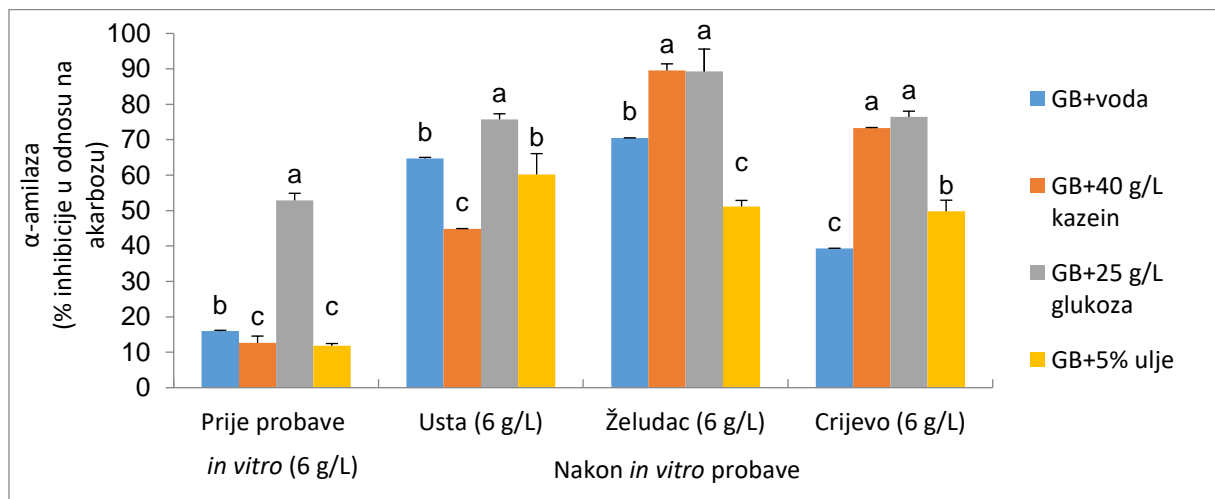
FRAP metodom mjeren je postotak redukcije  $\text{Fe}^{3+}$  u odnosu na Trolox. Iz Slike 18 vidljivo je da su prije probave *in vitro* viši postotak redukcije pokazali uzorci ginka u kombinaciji s vodom i glukozom ( $\gamma=25$  g/L), te da između tih uzoraka nije pronađena statistički značajna razlika. U oralnoj fazi primjetni je niži postotak inhibicije za uzorak ginka u kombinaciji s kazeinom. Za sljedeću fazu primjetan je viši postotak inhibicije za uzorke ginka s glukozom i uljem ( $w=5\%$ ). U intestinalnoj fazi probave statistički viši postotak inhibicije zabilježen je za uzorke ginka s vodom i glukozom.



Slika 18. Postotak redukcije  $\text{Fe}^{3+}$  mjeren metodom FRAP u odnosu na Trolox za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro* i svaku skupinu uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

#### 4.13. Određivanje antidijabetičke aktivnosti – inhibicija enzima $\alpha$ -amilaze

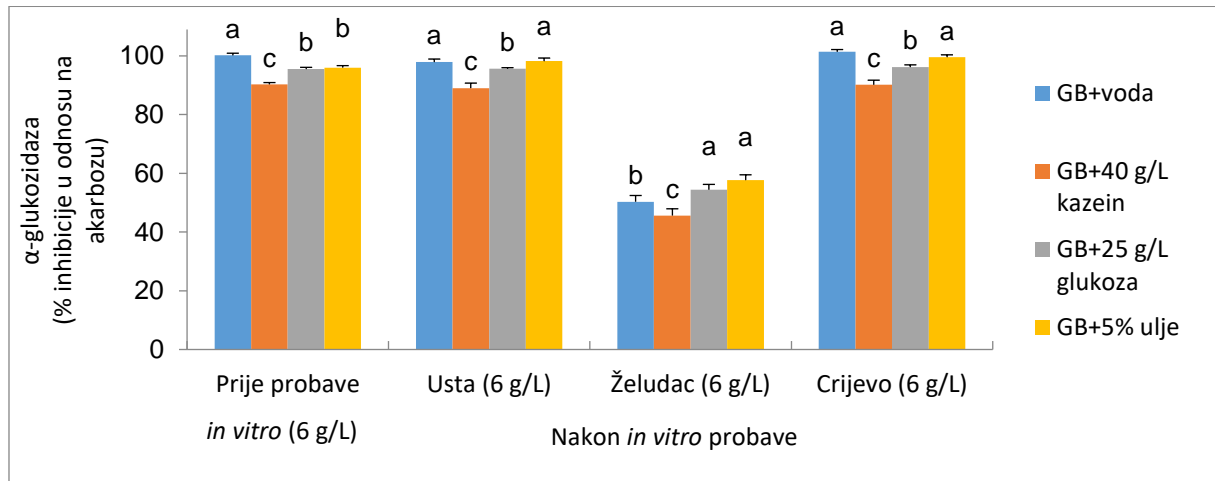
Antidijabetička aktivnost praćena je mjerenjem postotka inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze u odnosu na akarbozu. Prije probave *in vitro* znaćajan porast postotka inhibicije primjetan je za uzorak ekstrakta ginka u kombinaciji s glukozom ( $\gamma$ = 25 g/L). Prije probave znaćajan pad inhibicije  $\alpha$ -amilaze uoćen je u uzorku ginka s vodom te u uzorcima ginka u kombinaciji s kazeinom ( $\gamma$ = 40 g/L) i uljem ( $w$ = 5%). U fazama probave koje slijede uzorak ekstrakta ginka u kombinaciji s glukozom zadržava i dalje najviši postotak inhibicije enzima međutim u želućanoj i crijevnoj fazi raste postotak inhibicije za uzorak s kazeinom te između njih ne postoji statistićki znaćajna razlika. U želućanoj fazi najniži postotak inhibicije izmjeren je u uzorku ginka u kombinaciji s uljem, dok je za crijevnu fazu probave najmanji postotak inhibicije dobiven za uzorak ginka u kombinaciji s vodom (Slika 19).



Slika 19. Postotak inhibicije  $\alpha$ -amilaze u odnosu na akarbozu za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro* i svaku skupinu uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistićki znaćajno razlićite vrijednosti oznaćene su razlićitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistićka analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

#### 4.14. Određivanje antidijabetičke aktivnosti – inhibicija enzima $\alpha$ -glukozidaze

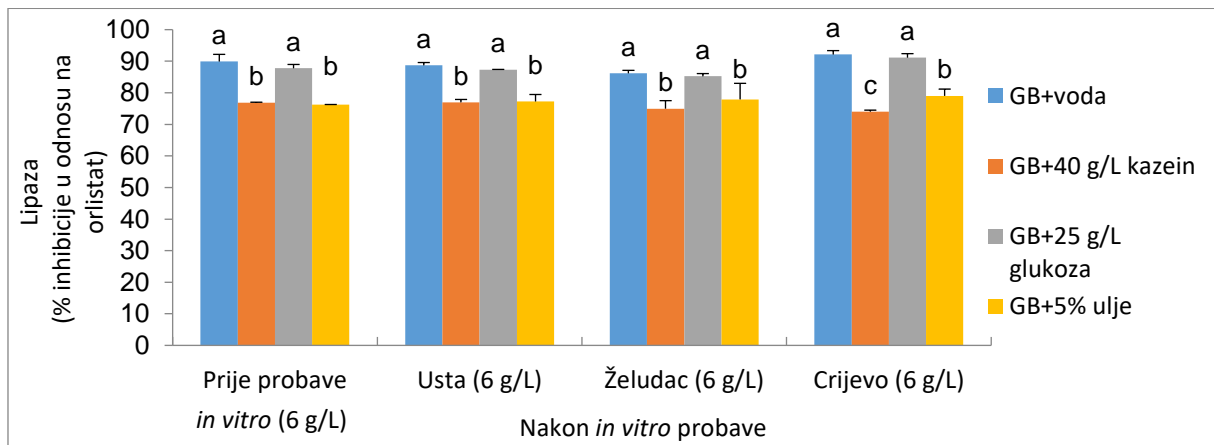
Antidijabetička aktivnost praćena je mjerenjem i postotka inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze u odnosu na akarbozu. Prije probave *in vitro* najviši postotak inhibicije enzima pokazao je uzorak ginka u kombinaciji s vodom. Najniži postotak inhibicije pokazao je uzorak u kombinaciji s kazeinom ( $\gamma= 40$  g/L) u svim fazama prije i nakon probave *in vitro*. Za oralnu i intestinalnu fazu probave najviši postotak inhibicije enzima pokazuju uzorci ginka u kombinaciji s vodom i uljem ( $w= 5\%$ ). U želućanoj fazi najviši postotak inhibicije pokazali su uzorci s glukozom ( $\gamma= 25$  g/L) i uljem (Slika 20).



Slika 20. Postotak inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze u odnosu na akarbozu za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro* i svaku skupinu uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

#### 4.15. Inhibicija enzima lipaze

Antidijabetička aktivnost praćena je mjerenjem postotka inhibicije enzima lipaze u odnosu na orlistat. Najviše vrijednosti inhibicije u svim fazama prije i nakon probave *in vitro*, imaju uzorci ginka u kombinaciji s vodom i glukozom ( $\gamma = 25$  g/L), između te dvije skupine uzoraka nije pronađena statistički značajna razlika. Najniže vrijednosti pokazali su uzorci ginka u kombinaciji s kazeinom ( $\gamma = 40$  g/L) i uljem ( $w = 5$  %). Takav trend popraćen je u svim fazama osim u intestinalnoj gdje uzorak ginka u kombinaciji s uljem pokazuje više vrijednosti postotka inhibicije lipaze (Slika 21).

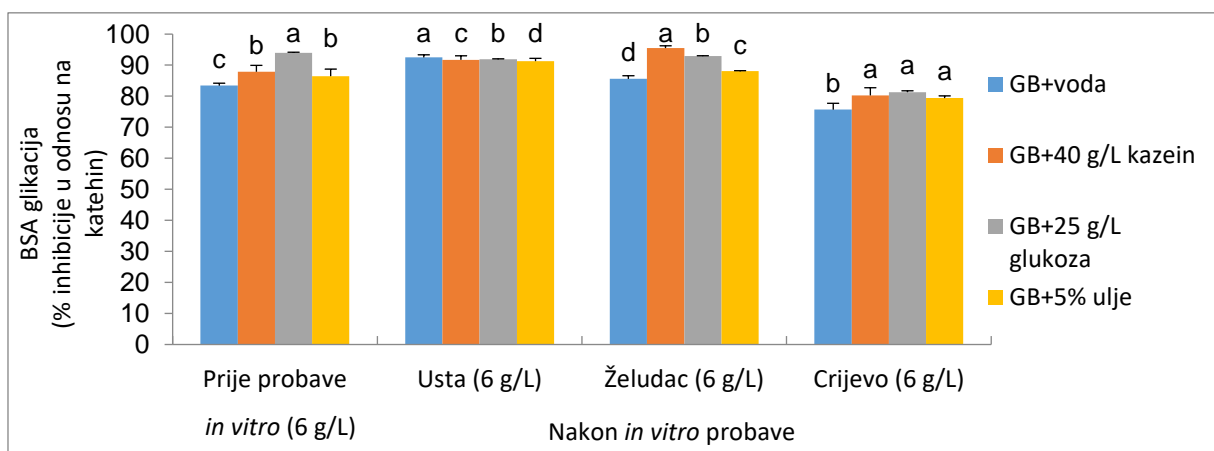


Slika 21. Postotak inhibicije lipaze u odnosu na orlistat za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro* i svaku skupinu uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.



#### 4.16. Glikacija albumina seruma goveda (BSA)

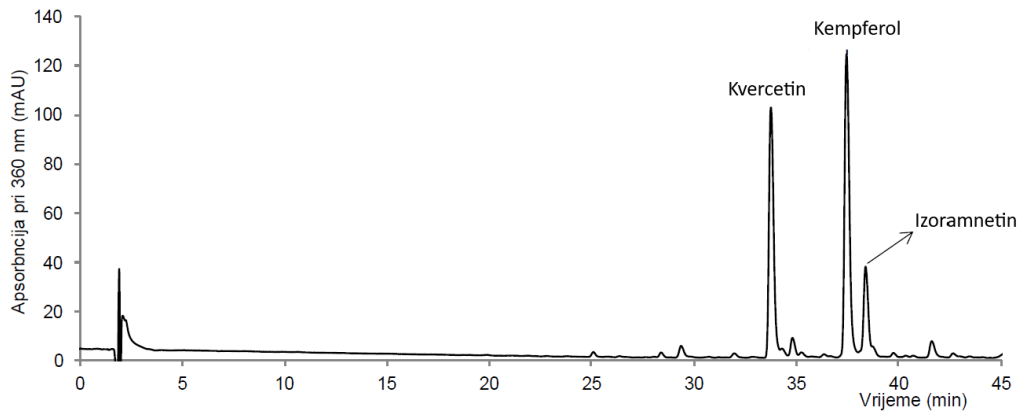
Antidijabetička aktivnost praćena je i mjerenjem postotka inhibicije BSA (bovine serum albumine) glikacije u odnosu na katehin. Prije probave *in vitro* najviši postotak inhibicije pokazao je uzorak ginka u kombinaciji s glukozom ( $\gamma=25$  g/L). Najnižu vrijednost inhibicije prije probave i nakon probave *in vitro* za želućanu i crijevnu fazu pokazao je uzorak u kombinaciji s vodom. U oralnoj fazi najviši postotak inhibicije pokazao je uzorak ginka u kombinaciji s vodom, a najniži uzorak u kombinaciji s uljem, a zatim u kombinaciji s kazeinom ( $\gamma=40$  g/L) koji u sljedećoj želućanoj fazi posjeduje najviši postotak inhibicije. U završnoj crijevnoj fazi nije pronađena statistički znaćajna razlika između uzoraka ginka u kombinaciji s kazeinom, glukozom i uljem ( $w=5\%$ ) (Slika 22).



Slika 22. Postotak inhibicije BSA (bovine serum albumine) glikacije u odnosu na katehin za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro* i svaku skupinu uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički znaćajno različite vrijednosti oznaćene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistićka analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

#### 4.17. Rezultati analize kromatografije visoke moći razlučivanja (HPLC)

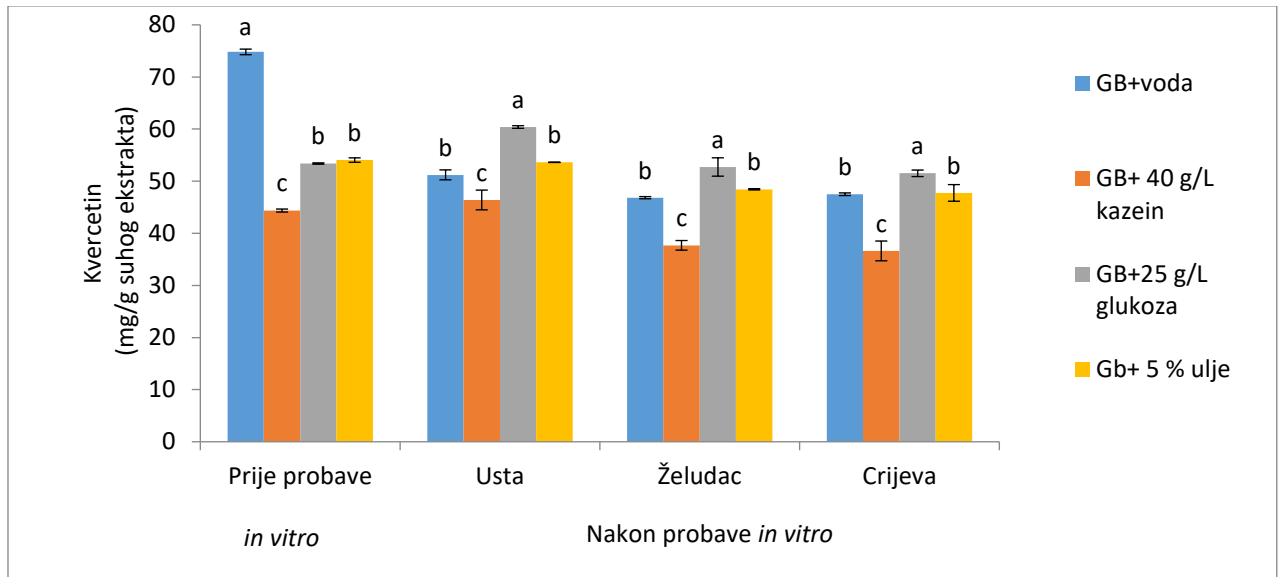
HPLC metodom detektirala sam i odredila biodostupnost kvercetina, kempferola i izoramnetina (Slika 23) u svim uzorcima ginka za sve faze prije i nakon probave *in vitro*.



Slika 23. Kromatogram flavonoida na primjeru hidroliziranog uzorka ginka u kombinaciji s vodom prije probave *in vitro* dobiven visokotlačnom tekućinskom kromatografijom pri 360 nm na nepolarnoj koloni Poroshell 120 SB-C18 dimenzija 4,6 x 75 mm s veličinom čestica 2,7  $\mu\text{m}$  uz upotrebu pretkolone Zorbax Rx-C18 dimenzija 4,6 x 12,5 mm s veličinom čestica 5  $\mu\text{m}$ . Mobilna faza A bila je 0,2 %-tna octena kiselina, a mobilna faza B smjesa 0,2 %-tne octene kiseline i 80 %-tnog metanola. Brzina protoka otapala bila je 1 mL/min, aplicirani volumen uzorka 20  $\mu\text{L}$ , a gradijent otapala kao u radu Šola i sur. (2020).

#### 4.17.1. Kvercetin

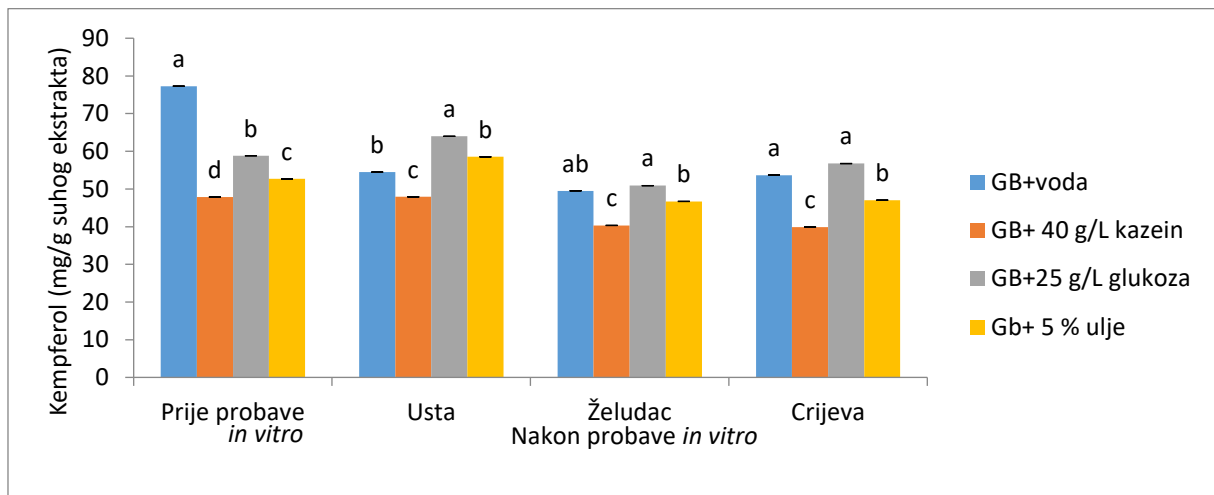
Najviša koncentracija flavonola kvercetina (Q) izmjerena je u uzorku ginka u kombinaciji s vodom prije probave *in vitro* (Slika 24). Tijekom svih faza probave najveća koncentracija Q izmjerena je u kombinaciji ginka s glukozom ( $\gamma = 25$  g/L). Uzorak ginka u kombinaciji s kazeinom pokazuje najniže vrijednosti Q za sve faze probave.



Slika 24. Sadržaj kvercetina u mg po g suhog ekstrakta za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro* i svaku skupinu uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

#### 4.17.2. Kempferol

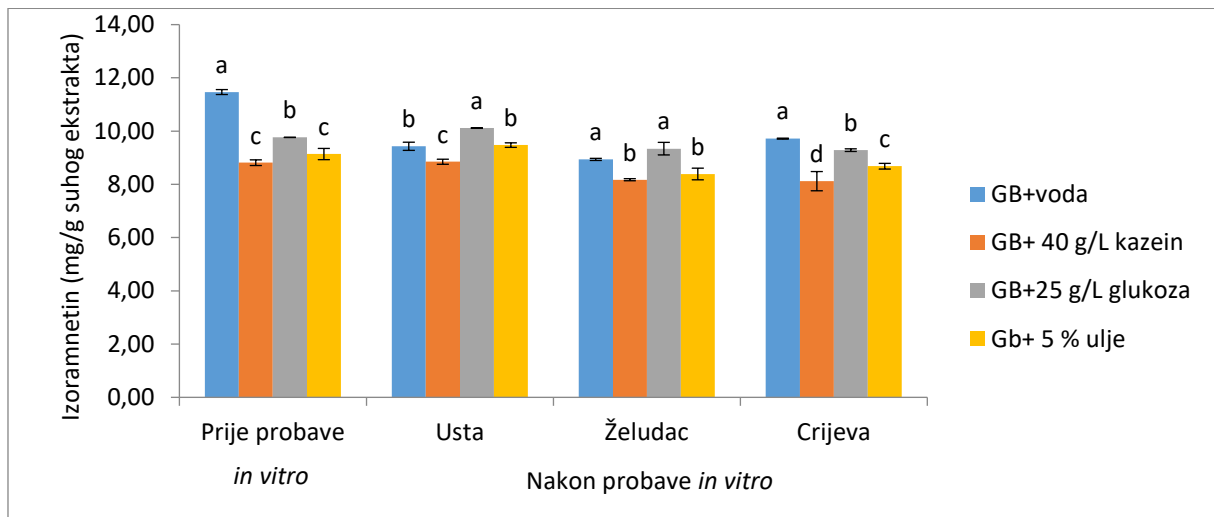
Kempferol (K) izmjeren je u najvećoj koncentraciji u uzorku ginka u kombinaciji s vodom prije probave *in vitro* (Slika 25), te nakon probave *in vitro* u usnoj i želučanoj fazi probave u kombinaciji s glukozom ( $\gamma = 25$  g/L). U crijevnoj fazi probave ova dva uzorka ponovo imaju najveću koncentraciju K s tim da nije pronađena statistički značajna razlika između ta dva uzorka. Uzorak ginka u kombinaciji s kazeinom pokazuje najmanju koncentraciju flavonola K.



Slika 25. Sadržaj kempferola u mg po g suhog ekstrakta za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro* i sve skupine uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

#### 4.17.3. Izoramnetin

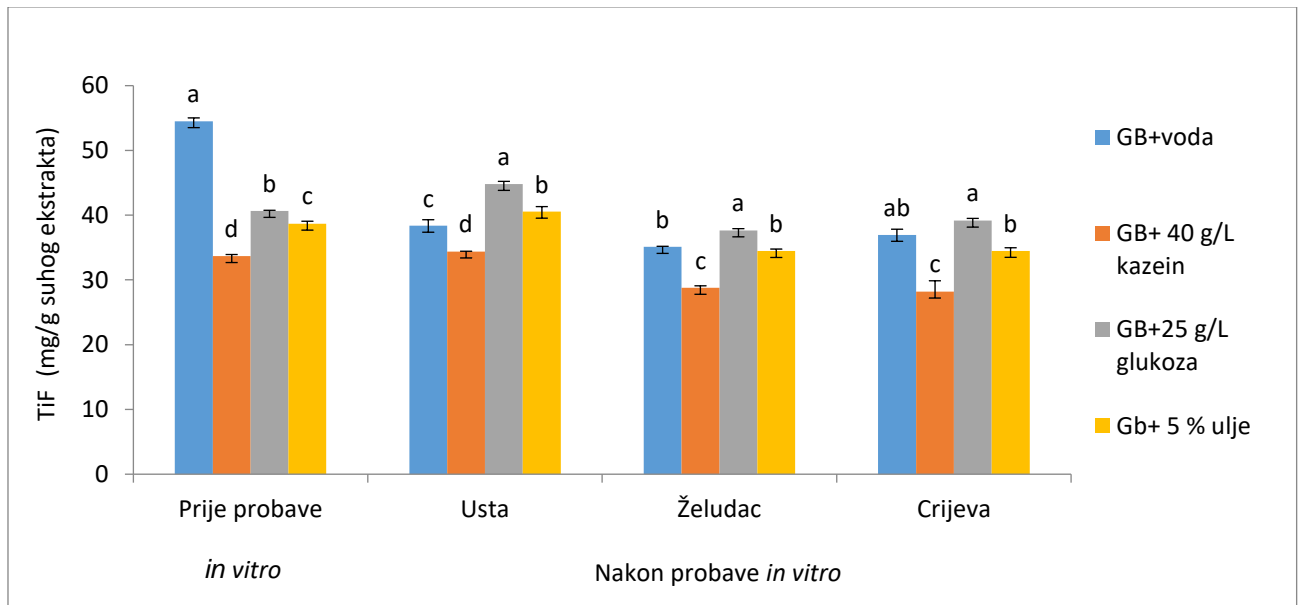
Prema Slici 26 flavonol izoramnetin (IzoR) izmjeren je u najvećoj koncentraciji u uzorku ginka u kombinaciji s vodom prije probave *in vitro* i nakon probave *in vitro* u želučanoj i crijevnoj fazi probave. U usnoj i želučanoj fazi uzorak ginka u kombinaciji s glukozom pokazao je najveću koncentraciju IzoR. U najmanjoj koncentraciji IzoR izmjeren je u kombinaciji ginka s kazeinom i uljem prije probave *in vitro* te u želučanoj fazi. Nakon probave *in vitro* u ustima i crijevu uzorak ginka u kombinaciji s kazeinom pokazuje najmanje detektirane koncentracije IzoR.



Slika 26. Sadržaj izoramnetina u mg po g suhog ekstrakta za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro* i sve skupine uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

#### 4.18. Ukupni identificirani flavonoli

Prema Slici 27 uzorak ginka u kombinaciji s vodom pokazao je najveću koncentraciju ukupnih identificiranih flavonola (TiF) prije probave *in vitro*. U svim fazama probave *in vitro* uzorak ginka u kombinaciji s glukozom pokazao je najveću koncentraciju TiF. Uzorak ginka u kombinaciji s kazeinom prije i nakon probave *in vitro* pokazao je najnižu vrijednost koncentracije TiF-a.



Slika 27. Sadržaj ukupnih identificiranih flavonola (TiF) u mg po g suhog ekstrakta za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro* i sve skupine uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

#### 4.19. Biodostupnost pojedinačnih i ukupnih identificiranih flavonola

Najviša izmjerena biodostupnost Q je za kombinaciju ginka s glukozom i uljem u želučanoj i crijevnoj fazi te u kombinaciji ginka s glukozom u usnoj fazi, a najniža u uzorku ginka s vodom u svim fazama probave. Najviše vrijednosti biodostupnosti K u usnoj fazi izmjerene su u uzorku ginka s uljem, u želučanoj fazi u uzorku ginka u kombinaciji s kazeinom, glukozom i uljem te u crijevnoj fazi u uzorku ginka s glukozom. U uzorcima ginka u kombinacijama s uljem i glukozom izmjerena je najviša biodostupnost IzoR u usnoj fazi. Uzorci ginka u kombinaciji s kazeinom, glukozom i uljem pokazuju najvišu biodostupnost IzoR u želučanoj i crijevnoj fazi. Biodostupnost TiF najviša je za uzorak ginka u kombinaciji s glukozom, a najniža za uzorak ginka u kombinaciji s vodom u svim fazama probave *in vitro* (Tablica 11). Najnižu izmjerenu biodostupnost Q, K, IzoR i TiF pokazuje uzorak ginka u kombinaciji s vodom u svim fazama probave *in vitro*.

Tablica 11. Biodostupnost (%) kvercitina (Q), kempferola (K), izoramnetina (IzoR), ukupnih identificiranih flavonola (TiF) za usnu, želučanu i crijevnu fazu *in vitro* za sve skupine uzoraka ginka (GB). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-c (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

Biodostupnost % - usta	Q	K	IzoR	TiF
GB+voda	68,45 $\pm$ 1,27 <sup>d</sup>	70,48 $\pm$ 2,17 <sup>c</sup>	82,23 $\pm$ 1,34 <sup>c</sup>	70,38 $\pm$ 1,70 <sup>c</sup>
GB+40 g/L kazein	97,92 $\pm$ 4,01 <sup>c</sup>	100,09 $\pm$ 4,43 <sup>b</sup>	100,41 $\pm$ 1,08 <sup>b</sup>	102,08 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>
GB+25 g/L glukoza	113,13 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>	108,76 $\pm$ 1,56 <sup>ab</sup>	103,58 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	110,26 $\pm$ 0,96 <sup>a</sup>
GB+5% ulje	104,17 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	111,11 $\pm$ 4,67 <sup>a</sup>	103,68 $\pm$ 0,92 <sup>a</sup>	105,66 $\pm$ 2,04 <sup>b</sup>
Biodostupnost % - želudac	Q	K	IzoR	TiF
GB+voda	62,60 $\pm$ 0,28 <sup>c</sup>	64,08 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	77,93 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>	64,38 $\pm$ 0,18 <sup>d</sup>
GB+40 g/L kazein	79,55 $\pm$ 1,95 <sup>b</sup>	84,26 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>	92,75 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup>	85,45 $\pm$ 0,90 <sup>c</sup>
GB+25 g/L glukoza	98,76 $\pm$ 3,29 <sup>a</sup>	86,51 $\pm$ 4,73 <sup>a</sup>	95,67 $\pm$ 2,42 <sup>a</sup>	92,61 $\pm$ 0,65 <sup>a</sup>
GB+5% ulje	94,11 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	88,66 $\pm$ 1,76 <sup>a</sup>	91,80 $\pm$ 2,40 <sup>a</sup>	89,83 $\pm$ 0,80 <sup>b</sup>
Biodostupnost % - crijevo	Q	K	IzoR	TiF
GB+voda	63,49 $\pm$ 0,33 <sup>c</sup>	69,47 $\pm$ 3,72 <sup>c</sup>	84,74 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	67,80 $\pm$ 1,59 <sup>c</sup>
GB+40 g/L kazein	77,29 $\pm$ 4,01 <sup>b</sup>	83,32 $\pm$ 5,66 <sup>b</sup>	92,13 $\pm$ 4,09 <sup>a</sup>	83,74 $\pm$ 4,92 <sup>b</sup>
GB+25 g/L glukoza	96,50 $\pm$ 1,18 <sup>a</sup>	96,47 $\pm$ 0,44 <sup>a</sup>	95,10 $\pm$ 0,51 <sup>a</sup>	96,31 $\pm$ 0,84 <sup>a</sup>
GB+5% ulje	92,77 $\pm$ 3,10 <sup>a</sup>	89,29 $\pm$ 0,49 <sup>ab</sup>	95,01 $\pm$ 1,16 <sup>a</sup>	89,89 $\pm$ 1,25 <sup>ab</sup>

#### 4.20. Normirane vrijednosti biodostupnosti pojedinačnih i ukupnih identificiranih flavonola

U Tablici 12 prikazan je postotak biodostupnosti pojedinačnih flavonola kvercetina (Q), kempferola (K), izoramnetina (IzoR) i ukupnih identificiranih flavonola (TiF) za usnu, želučanu i crijevnu fazu probave *in vitro* u odnosu na njihovu biodostupnost prije probave *in vitro* za sve skupine uzoraka ginka. Vrijednosti su normirane prema najvišim vrijednostima istih. Najviša vrijednost biodostupnosti Q i TiF izmjerena je u uzorcima ginka u kombinaciji s glukozom 25 g/L dok najviša vrijednost K i IzoR pokazuje uzorak ginka u kombinaciji s 5 %. Najviše izmjerene vrijednosti su u usnoj fazi probave *in vitro*. Najviše vrijednosti za želučanu fazu probave su izmjerene za Q, K, IzoR i TiF za uzorak ginka u kombinaciji s glukozom. Uzorak ginka u kombinaciji s uljem pokazuje jednako visoke vrijednosti kao s glukozom za Q, K i IzoR kao i uzorak s kazeinom za K i IzoR. U crijevnoj fazi uzorak ginka u kombinaciji s glukozom ponovo pokazuje najviše vrijednosti biodostupnosti Q, K, IzoR i TiF. Jednako visoke vrijednosti kao s glukozom u crijevnoj fazi pokazuju uzorci u kombinaciji sa uljem za Q i IzoR te uzorak s kazeinom za IzoR. Uzorak ginka u kombinaciji s vodom pokazuje najniže izmjerene vrijednosti biodostupnosti Q, K, IzoR i TiF u svim fazama probave *in vitro*.

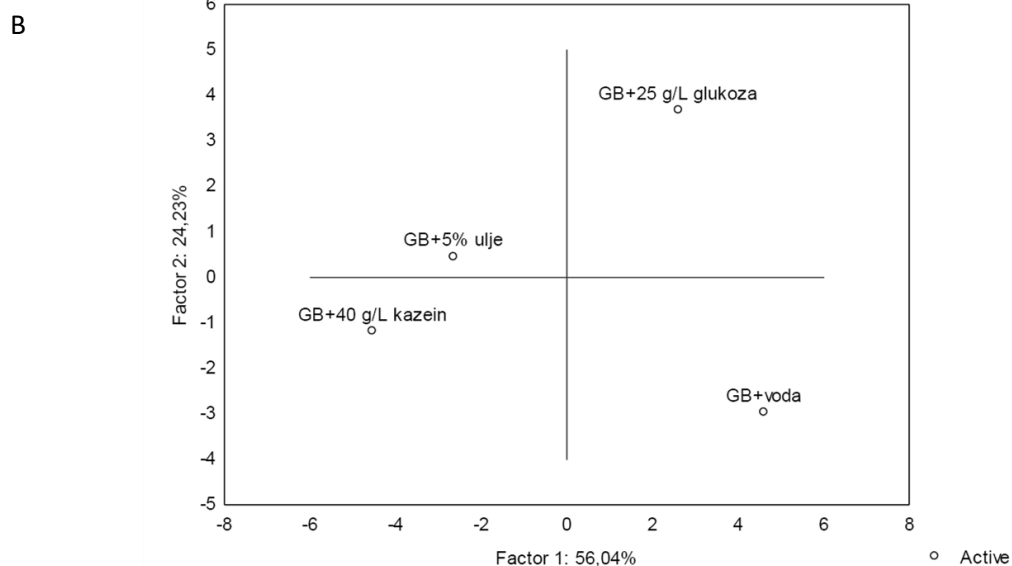
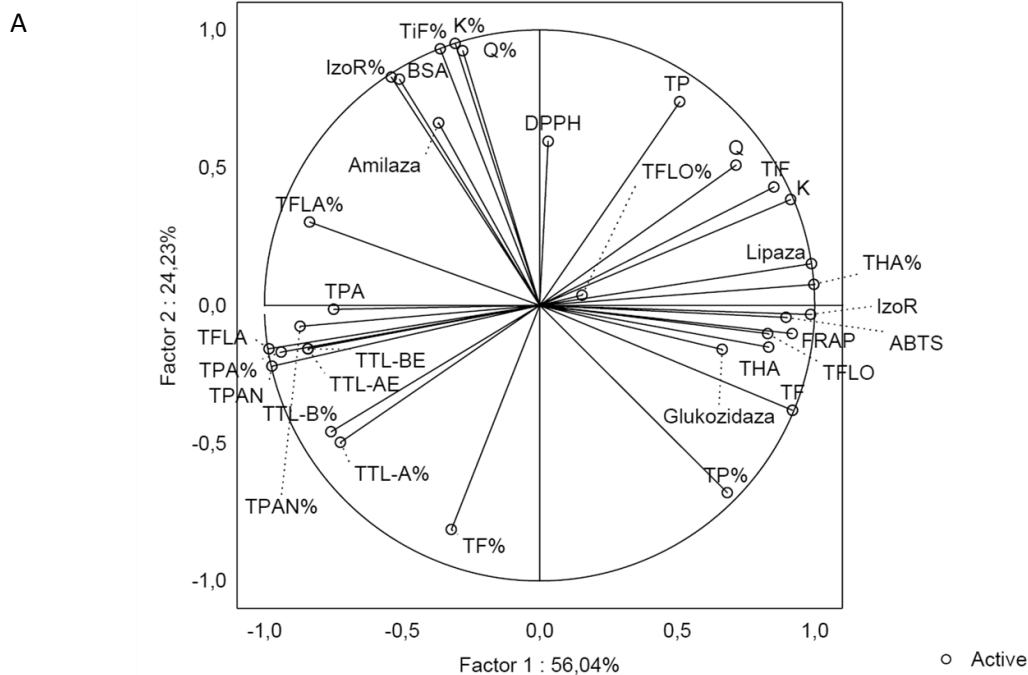


Tablica 12. Postotak biodostupnosti pojedinačnih flavonola kvercetina (Q), kempferola (K), izoramnetina (IzoR) i ukupnih identificiranih flavonola (TiF) za usnu, želučanu i crijevnu fazu probave *in vitro* u odnosu na njihovu biodostupnost prije probave *in vitro* za sve skupine uzoraka ginka (GB). Vrijednosti su normirane prema najvišim vrijednostima istih. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri replike. Statistički značajno različite vrijednosti označene su različitim slovima a-d (jednosmjerna ANOVA, Duncan test,  $p \leq 0,05$ ). Statistička analiza provedena je zasebno za svaku fazu prije i nakon probave *in vitro*.

Biodostupnost % - usta	Q	K	IzoR	TiF
GB+voda	60,51 <sup>d</sup>	63,44 <sup>c</sup>	79,32 <sup>c</sup>	63,83 <sup>c</sup>
GB+40 g/L kazein	86,55 <sup>c</sup>	90,09 <sup>b</sup>	96,85 <sup>b</sup>	92,59 <sup>b</sup>
GB+25 g/L glukoza	100,00 <sup>a</sup>	97,89 <sup>ab</sup>	99,90 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>
GB+5% ulje	92,09 <sup>b</sup>	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	95,83 <sup>b</sup>
Biodostupnost % - želudac				
GB+voda	55,34 <sup>c</sup>	57,67 <sup>b</sup>	75,17 <sup>b</sup>	58,39 <sup>d</sup>
GB+40 g/L kazein	70,32 <sup>b</sup>	75,84 <sup>a</sup>	89,46 <sup>a</sup>	77,50 <sup>c</sup>
GB+25 g/L glukoza	87,30 <sup>a</sup>	77,86 <sup>a</sup>	92,28 <sup>a</sup>	83,99 <sup>a</sup>
GB+5% ulje	83,19 <sup>a</sup>	79,80 <sup>a</sup>	88,55 <sup>a</sup>	81,47 <sup>b</sup>
Biodostupnost % - crijevo				
GB+voda	56,12 <sup>c</sup>	62,52 <sup>c</sup>	81,73 <sup>b</sup>	61,49 <sup>c</sup>
GB+40 g/L kazein	68,32 <sup>b</sup>	74,99 <sup>b</sup>	88,86 <sup>a</sup>	75,95 <sup>b</sup>
GB+25 g/L glukoza	85,30 <sup>a</sup>	86,83 <sup>a</sup>	91,72 <sup>a</sup>	87,35 <sup>a</sup>
GB+5% ulje	82,00 <sup>a</sup>	80,36 <sup>ab</sup>	91,64 <sup>a</sup>	81,53 <sup>ab</sup>

#### 4.21. Analiza glavnih komponenti (PCA)

PCA dijagram pruža nam pregled sličnosti i razlika između različitih uzorka ginka (ginko u kombinaciji s vodom, kazeinom, glukozom i maslinovim uljem) i mjerenih metoda s kojim sam određivala fitokemijski sastav, postotak biodostupnosti fitokemikalija (normirani podatci) te antioksidacijsko i antidijabetičko djelovanje (Slika 28). Prva (faktor 1) i druga (faktor 2) glavna komponenta opisuju 56,04% i 24,23% varijance za uzorke ginka nakon intestinalne faze probave *in vitro* što zajedno predstavlja 80,27% ukupne varijabilnosti podataka. U desnom gornjem kvadratu PCA dijagrama intestinalne faze probave *in vitro* smješten je uzorak ginka s glukozom i metode DPPH %, TP, Q, TiF, K, TFLO%, THA% i lipaza, u lijevom gornjem kvadratu smješten uzorak ginka sa uljem i metode za određivanje biodostupnosti kvercetina, kemfeola, izoramnetina, ukupnih indentificiranih flavona i ukupnih flavanola (Q%, K%, IzoR%, TiF% i TFLA%) i metode za određivanje antidijabetičke aktivnosti (amilaza i BSA glikacija), u desnom donjem kvadratu smješten je uzorak ginka s vodom i metode TFLO, THA, TF, IzoR, TP%, ABTS, FRAP i glukozidaza), a u lijevom donjem kvadratu uzorak ginka sa kazeinom i metode TPA, TPA%, TPAN, TPAN%, TTL-A, TTL-A%, TTL-B, TTL-B%, TF% i TFLA. Iz udaljenosti među metodama je vidljivo da je antioksidacijska i antidijabetička aktivnost povezana sa sadržajem i biodostupnosti većine pojedinačnih i ukupnih polifenola. Iz PCA dijagrama je vidljivo da su uzorci ginka s uljem i kazeinom najmanje međusobno udaljeni dok je udaljenost između svih ostalih uzoraka ginka veća.



Slika 28. Dijagram analize glavnih komponenti (PCA) A) mjenjenih metoda odnosno fitokemijskog sastava, normirane % biodostupnosti ukupnih fenola (TP), flavonoida (TF), fenolnih kiselina (TPA), hidroksicimetnih kiselina (THA), flavonola (TFLo), flavanola (TFLA), proantocijanidina (TPAN), triterpenskih laktona izraženih u ekvivalentima ginkolida A (TTL-AE) i B (TTL-BE), kvercitina (Q), kempferola (K), izoramnetina (IzoR) i ukupnih identificiranih flavona (TiF); antioksidacijskih metoda (DPPH, ABTS i FRAP) i antidijabetičkih metoda koje uključuju inhibiciju enzima amilaze, glukozidaze i lipaze, te glikacije albumin seruma goveda (BSA) za intestinalnu fazu probave *in vitro*; B) uzorci ginka (GB) u kombinaciji s vodom, kazeinom, glukozom i maslinovim uljem za intestinalnu fazu probave *in vitro*.

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Udio i biodostupnost fitokemikalija

Prije probave *in vitro* udio fitokemikalija u uzorcima je raznolik, međutim uzorak ginka u kombinaciji s glukozom pokazao se kao uzorak s najvećim udjelom mjerenih fitokemikalija iz polifenolnih skupina spojeva, a uzorak u kombinaciji s uljem kao uzorak s najvećim udjelom mjerenih fitokemikalija iz skupine triterpenskih laktona. Udio TP i TF najveći je za uzorke ginka u kombinaciji s uljem i glukozom; udio TPA jednako je visok za uzorke ginka u kombinaciji s uljem, glukozom i vodom; udio THA i TFLo jednak je za sve uzorke, dok je udio TFLA najviši za uzorak ginka u kombinaciji s kazeinom; udio TPAN je jednako visok za uzorke ginka u kombinaciji s vodom, kazeinom i glukozom; udio TTL izražen u ekvivalentima ginkolida A i B najviši je za uzorke ginka u kombinaciji s uljem. Prema dostupnim literaturnim podacima nema relevantnih istraživanja s kojima bih mogla usporediti ove rezultate. U prvoj fazi probave, u ustima uzorak s najviše fitokemikalija je uzorak ginka s uljem, a isti trend se nastavlja i u sljedećoj fazi, dok u završnoj fazi jednako često su zastupljeni uzorci ginka s vodom i uljem. Primjetan je porast TP za sve uzorke u odnosu na fazu prije probave što je u skladu s tvrdnjama Ginsburg i sur. (2012). U svom radu napominju da je slina jako bitna za topljivost polifenola koji su prisutni u voću i biljnim napitcima i da se tako povećava njihova biodostupnost. Isto tako navode da hidroliza flavonoidnih glikozida započinje u ustima pomoću  $\beta$ -glikozidaze, ali njezina učinkovitost ovisi o tipu šećera koji su prisutni u molekulama. Uzorak ginka u kombinaciji s uljem pokazuje najviše vrijednosti ukupnih triterpenskih laktona (TTL) izraženim u ekvivalentima ginkolida A i B u svim fazama prije i nakon probave *in vitro*, osim u želučanoj fazi u kojoj najviši udio pokazuje uzorak ginka u kombinaciji s vodom, a zatim uzorak ginka s uljem. Uzorci ginka u kombinaciji s uljem i vodom u želučanoj fazi se statistički značajno ne razlikuju. Ding i sur. (2004) napominju da pH vrijednost utječe na udio TTL i navode raspone pH vrijednosti 6,5-8,0 i 7,5-8,0 kao optimalne za najviši udio bilobalida, ginkolida A i B u uzorku. Ako pogledamo vrijednosti TTL u ekvivalentima ginkolida A i B nakon probave u ustima (pH 7), možemo uočiti pad vrijednosti TTL za uzorke ginka u kombinaciji s kazeinom, glukozom i uljem u želučanoj fazi (pH 2). Iako u želučanoj fazi probave svi uzorci imaju jednaku pH vrijednost otopine uzorci ginka u kombinaciji s vodom i uljem pokazuju najviše vrijednosti TTL-a što je i primjenjivo za *in vivo* sustav u kojem konzumacija hrane potiče lučenje želučane kiseline, što samim time snižava pH želuca i utječe na ove spojeve. Fenolni spojevi apsorbiraju se najvećim dijelom u završnoj (crijevno) fazi probave, zbog čega ju smatram najvažnijom kada gledamo biodostupnost polifenolnih spojeva. Biodostupnost fitokemikalija dobila sam uzevši u obzir vrijednosti prije probave. Prema Shahidi i Peng (2018) biodostupnost uključuje probavu i apsorpcijsku učinkovitost određenih konstituenata hrane i droga koje se probavljaju oralnom primjenom. Uglavnom se izražava kao postotak stvarnog iznosa oslobođene tvari i ukupnog apsorbiranog iznosa. Isto tako napominju da je razlika ukoliko govorimo o

nutrijentima i ne-nutrijentima poput lijekova. U slučaju da govorimo o fenolnim spojevima u sklopu konkretne hrane sama biodostupnost je izrazito manja. Najveću biodostupnost TP pokazao je uzorak ginka s vodom kroz sve faze probave te u kombinaciji s kazeinom u želučanoj fazi probave. Kod TF biodostupnost se razlikuje ovisno o fazi *in vitro* probave: postotak u ustima najviši je uzorcima ginka s dodatkom kazeina i ulja, u želučanoj fazi najviša biodostupnost je u uzorcima ginka uz dodatak ulja te ginka s vodom, a u crijevnoj fazi u uzorku ginka u kombinaciji sa kazeinom. Uzorak ginka s kazeinom pokazao je najveću biodostupnost TPA u svim fazama *in vitro* probave. Najveću biodostupnost THA ima uzorak ginka s glukozom u usnoj i želučanoj fazi te uzorci ginka u kombinaciji s vodom i glukozom u crijevnoj fazi *in vitro* probave. U uzorku ginka s uljem najveća biodostupnost TFLo, TFLA i TPAN je u svim fazama probave. Prema Haratifar i sur. (2014) više od 60 % flavanola zelenog čaja nestaju u intestinalnoj, odnosno crijevnoj fazi probave, što je pokazano i ovim istraživanjem gdje se u svakoj sljedećoj fazi probave nalazi sve manji udio TFLA. Čvorović i sur. (2018) navode da se u crijevnoj fazi probave najbolje apsorbiraju izoflavoni, katehini, flavanoni i glikozidi kvetcetina. Nasuprot tome najslabije se apsorbiraju proantocijanidini. Bermúdez-Soto i sur. (2007) istraživali su utjecaj želučane probave i gušterače na stabilnost spojeva polifenola i nisu pronašli utjecaj na bilo koji od glavnih polifenola u uzorcima. Smatraju da je za tako visoku stabilnost odgovoran pH želuca koji ustvari čuva polifenole od degradacije, što bi moglo povezati s njihovom manjom stabilnošću u tankom crijevu. Analizom TP primjetno je smanjenje udjela za uzorke ginka u kombinaciji s vodom i ginka u kombinaciji s kazeinom. Takav trend ostali uzorci nisu pokazali. Ozdal i sur. (2013) napominju da pH otopine ima utjecaj na vezu između proteina i polifenola. U simuliranoj probavi *in vitro* jedino je u želučanoj fazi probave pH 2 dok je u svim ostalim fazama pH 7. Budući da pri niskim pH vrijednostima (pH < 7,0) dolazi do disocijacije proteina dolazi i do izlaganja mjesta vezanja za interakciju proteina s polifenolima putem elektrostatskih interakcija. Nijedan uzorak nije pokazao povećanje biodostupnosti svih fitokemikalija u tabletama ginka, ali ako se želi maksimalno iskoristiti neka specifična fitokemikalija ili skupina spojeva mogu se primijeniti ovi rezultati istraženih kombinacija prilikom konzumacije ovih tableta. Prema tome ako osoba želi iskoristiti što više fenolnih spojeva iz tableta dobro bi bilo konzumirati tablete na prazan želudac uz vodu. Ako želimo iskoristiti što više fenolnih kiselina bilo bi poželjno konzumirati tablete u kombinaciji s kazeinom, odnosno proteinskom hranom na bazi mlijeka. Ulje bi bilo poželjno konzumirati za povećanje biodostupnosti flavonola, flavanola, proantocijanidina i triterpenskih laktone. Glukozu, odnosno šećer bi bilo poželjno konzumirati za povećanje biodostupnosti hidroksicimetnih kiselina. Također biodostupnost hidroksicimetnih kiselina može se postići i konzumacijom tableta samo s vodom. Ako uzmemo gradaciju postotaka koje su koristili Vujčić i sur. (2017), svi uzorci ginka pokazuju postotak biodostupnosti iznad 70 % što se smatra visokom biodostupnošću u usnoj fazi za TP, TF, THA, TFLo, TFLA i TTL u ekvivalentima ginkolida A i B, u želučanoj fazi za TF, TPA, THA, TFLo i TTL u ekvivalentima ginkolida A i B, te u crijevnoj fazi za TF, THA, TFLo i TTL

u ekvivalentima ginkolida A. Umjerena biodostupnost (35-70%) u usnoj fazi izmjerena je u uzorcima ginka s vodom i glukozom za TPA, u uzorcima ginka s kazeinom i glukozom za TPAN. U želučanoj fazi umjerena biodostupnost izmjerena je u uzorcima ginka s glukozom i uljem za TP, u uzorku ginka s kazeinom za THA, u uzorcima ginka s vodom i glukozom za TFLA, te u uzorcima s vodom i kazeinom za TPAN. Umjerena biodostupnost u crijevnoj fazi izmjerena je u uzorcima ginka s kazeinom, glukozom i uljem za TP, uzorcima ginka s vodom i glukozom za TPA, u uzorcima ginka s vodom, kazeinom i glukozom za TFLA te u uzorku s glukozom za TTL u ekvivalentima ginkolida B, a slaba biodostupnost (<35%) izmjerena je samo u uzorcima ginka s vodom i glukozom za TPAN. Normirane vrijednosti biodostupnosti skupina ukupnih polifenola i ukupnih triterpanskih laktona daju malo jasniju sliku iz koje možemo očitati u kojim je uzorcima biodostupnost 100%. U usnoj fazi izmjerena je biodostupnost od 100% za većinu ukupnih polifenolnih skupina kada promatramo sve faze *in vitro* probave zajedno. U uzorku ginka s vodom u usnoj fazi izmjerena je biodostupnost od 100% za TP, u uzorku ginka s glukozom za THA, a u uzorku ginka s uljem za TFLO, TFLA i TPAN. U želučanoj fazi izmjerena je biodostupnost od 100% za TF u uzorku ginka s uljem i za TTL u ekvivalentima ginkolida A i B u uzorku ginka s vodom. Također je primjetno da uzorak ginka u kombinaciji s uljem u intestinalnoj fazi probave sadrži najviše vrijednosti triterpanskih laktona i polifenola iz skupina flavonola, flavanola i proantocijanidina. Kardum i sur. (2018) navode da je maslinovo ulje najbolji izvor oleinske kiseline koja uz ostale pozitivne učinke ima i stabilizirajući utjecaj na fenolne spojeve. Guo i sur. (2013) navode kako konzumacijom hrane bogate lipidima povećavamo apsorpciju flavonoida. Probava *in vitro* dobra je metoda za procjenu koncentracije i biodostupnosti bioaktivnih spojeva u tijeku probave. Ova metoda ima svoje prednosti i mane. Neke od prednosti su te što je jeftina i tehnički jednostavna za izvesti, moguće ju je izvesti za više vrsta uzoraka, međutim neki od nedostataka ove metode su ti što homeostatski uvjeti nisu prisutni, nisu uzete u obzir crijevne bakterije i jetreni metabolizam. Isto tako važno je naglasiti da obzirom na amfipatski karakter fenolnih spojeva i hidrofilni karakter vode kao ekstrakcijskog otapala većina sastojaka ne može se izdvojiti postupkom ekstrakcije, stoga fenolni sastojci zaostaju u talogu koji se ne uzima u obzir prilikom provedbi mjerenja (Olenikov i sur., 2019.). Pomoću ove metode ne može se prikazati potpuna slika najpovoljnijih uvjeta za konzumaciju ginko tableta u *in vivo* sustavu, ali ovi podaci mogu pripomoći prilikom usmjeravanja i osmišljavanja modela *in vivo* istraživanja kojim bi se ova slika mogla upotpuniti. Isto tako obzirom na teze koje iznose Bermúdez-Soto i sur. (2007) konzumacija hrane koja za posljedicu ima produkciju kiseline u želucu imat će pozitivan učinak na očuvanje i sprečavanje degradacije polifenola.

## 5.2. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidansi su spojevi koji imaju bitnu ulogu u zaštiti organizma od štetnog utjecaja slobodnih radikala za sve žive sustave što je jako bitno jer su slobodni radikali odgovorni za starenje, oštećenje stanične membrane, proteinskih struktura unutar stanica, DNK i drugih biološki važnih molekula. Česti slobodni radikali u stanici su oni koje ubrajamo u reaktivne kisikove vrste (ROS- reactive oxygen species). Imaju u vanjskoj ljusci jedan ili više nesparenih elektrona zbog čega imaju veću tendenciju reagirati s drugim kemijskim vrstama pri čemu uzimaju elektrone drugim molekulama ili predaju svoje u svrhu ostvarivanja stabilne elektronske konfiguracije. Antioksidansi ili neutraliziraju slobodne radikale ili spriječe njihov nastanak. Flavonoidi imaju sposobnost djelovanja kao antioksidansi, odnosno sposobnost inaktivacije slobodnih radikala. Mogu i direktno reagirati sa slobodnim radikalima zahvaljujući reaktivnim hidroksilnim skupinama ili stvoriti kelatne komplekse s ionima metala bakra ili željeza. Dokazano je da imaju sposobnost inhibicije enzima poput ciklooksigenaze, lipoksigenaze, glutation S-transferaze i NADH-oksgenaze koji su vezani uz stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (Lobo i sur., 2010.). Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS, DPPH i FRAP metodom temelji se na određivanju postotka inhibicije oksidacije u odnosu na Trolox. Trolox je standardni antioksidans koji se koristi u biološkim ili biokemijskim procesima za smanjenje oksidativnog stresa, stoga uzorak koji pokazuje veći postotak inhibicije u odnosu na Trolox smatra se uzorkom većeg antioksidacijskog kapaciteta. Prema Vujčić i sur. (2017) za uzorke s postotkom inhibicije slobodnih radikala većim od 70 % smatra se da imaju jak antioksidacijski kapacitet, uzorci s postotkom inhibicije slobodnih radikala između 35 % i 70% smatra se da imaju umjeren antioksidacijski kapacitet, dok oni s postotkom inhibicije ispod 35 % imaju slab antioksidacijski kapacitet. Obzirom na dobivene rezultate nije moguće istaknuti jedan uzorak koji najviše pokazuje antioksidacijsku aktivnost, ali primjetno je da sve skupine uzoraka imaju iznimno visoki postotak inhibicije u odnosu na Trolox, pa samim time i jak antioksidacijski kapacitet. Prema DPPH metodi sve skupine uzoraka prije probave *in vitro* te u oralnoj i crijevnoj fazi pokazuju postotak inhibicije oko 100 %, dok u želučanoj fazi toliki postotak pokazuju samo uzorci ginka u kombinaciji s vodom i glukozom. U ABTS metodi može se uočiti da ovisno o fazi probave uzorci pokazuju jaku, umjerenu ili slabu antioksidacijsku aktivnost. Prije probave uzorak ginka u kombinaciji s kazeinom ima umjerenu antioksidacijsku aktivnost dok sve ostali uzorci posjeduju jaki antioksidacijski potencijal. U usnoj fazi svi uzorci pokazuju jaku antioksidacijsku aktivnost u odnosu na Trolox, ali već u sljedećoj fazi (želučanoj) postoji značajna razlika između uzoraka (uzorci ginka u kombinaciji s vodom i kazeinom pokazuju jaku antioksidacijsku aktivnost, uzorak ginka s uljem umjerenu, a uzorak s glukozom slabu antioksidacijsku aktivnost). Završna faza, crijevna faza, popraćena je postotkom koji je niži od 50 % inhibicije. Uzorci ginka u kombinaciji s vodom, glukozom i uljem ukazuju na umjerenu antioksidacijsku aktivnost, dok uzorak u kombinaciji s kazeinom ima slabu antioksidacijsku aktivnost.

FRAP metoda pokazuje slične rezultate kao i DPPH metoda, jer svi uzorci u svim fazama pokazuju oko 100 % inhibicije u odnosu na Trolox. Što ukazuje da svi uzorci imaju jaki antioksidacijski potencijal u FRAP metodi. Prema Wojtunik-Kulesza i sur. (2020) polifenoli su skupina sekundarnih metabolita koja ima izrazita antioksidativna svojstva, a kako je i dokazano ovim istraživanjem ekstrakt ginka pokazuje visoku biodostupnost polifenolnih spojeva koji bi mogli biti odgovorni i za snažnu antioksidativnu aktivnost ekstrakta ginka. Isto tako utvrdila sam kako se udio polifenolnih spojeva u probavi smanjuje, a isto je primjetno i s antioksidativnom aktivnošću. Prema Gayoso i sur. (2016) većina fenolnih spojeva ostaje stabilna tijekom usne i želučane faze probave, međutim kad se rezultati odnose na liofilizirane uzorake probave njihova stabilnost i udio pada čak ispod 70 %. Moja istraživanja su pokazala smanjenje antioksidativnog kapaciteta za neke fenolne spojeve nakon usne i želučane faze probave. Takve rezultate pokazala je ABTS metoda, ali DPPH i FRAP metode nisu. U želucu se nalaze želučani sokovi niskih *pH* vrijednosti zbog čega dolazi do degradacije flavonoidnih oligomera na manje jedinice. U tankom crijevu *pH* vrijednost raste stoga dolazi do deglikolizacije, glukoronidacije, metilacije, sulfonacije i hidrosilacije flavonoida, zbog čega se mogu oksidirati do još aktivnijih antioksidansa (Spencer, 2003.). Takav trend primjetan je u slučaju DPPH metode ako se usporede postotci inhibicije u odnosu na Trolox za želučanu i crijevnu fazu probave. Dabeek i Marra (2019) navode kvercetin i kempferol kao izrazite antioksidanse koje sam također detektirala kao sastavne dijelove ekstrakta ginka. Isto tako oni navode da i previsoke koncentracije kempferola mogu izazvati samooksidaciju. Guo i sur. (2013) te Yun Lee i sur. (2020) također navode kvercetin kao jak antioksidans. Procházková i sur. (2011) navode flavonoide kao jake antioksidanse, međutim navode da ovo njihovo svojstvo u sustavu *in vivo* nije toliko dobro istraženo kao i moguće prooksidativno koje može uzrokovati oštećenja stanica i njezinih fragmenata.



### 5.3. Antidijabetička aktivnost i utjecaj na mršavljenje

Diabetes mellitus ili dijabetes ozbiljan je višefaktorski poremećaj kojeg karakterizira hiperglikemija koju prati povećana koncentracija glukoze u krvi. Osobe koje pate od dijabetesa tipa 1 iako imaju povećanu razinu glukoze u krvi ne mogu ju iskoristiti jer pate od manjka inzulina koji je odgovoran za prijenos glukoze unutar stanica. Dijabetes tipa 2 karakterizira prisustvo inzulina, ali su stanice rezistentne na inzulin i on ne vrši normalan transport glukoze. Dijabetes tipa 2 znatno je zastupljeniji među oboljelima od dijabetesa tipa 1. Poznato je da najvažniji organi i organski sustavi poput mozga koriste glukozu kao izvor energije, što rezultira negativnim posljedicama za te osobe i prema tome ako se takvi poremećaji ne liječe mogu dovesti do ozbiljnijih poteškoća. Glukoza je osmotski aktivna tvar pa ako se nalazi u povećanim koncentracijama u krvi u mokraćnom sustavu veže na sebe veće količine vode pa osobe pate i od povećane potrebe za mokrenjem (poliurija), ali i od stalnog osjećaja žeđi (polidipsija). Uz poliuriju i polidipsiju česti su simptomi pojačane gladi (polifagija) i neobjašnjivog gubitka tjelesne težine i ketoacidoza koji spadaju u metaboličke poremećaje. Ketoacidoza u krvi nastaje u slučaju manjka inzulina zbog ubrzane razgradnje masti do acetyl-CoA koji se konvertira u acetoacetat i  $\beta$ -hidroksibutirat (koji uzrokuju acidozu) i aceton (keton) (Rang i sur., 2005). Polifenoli često uz antioksidativno djelovanje imaju i antihiperglikemijski efekt jer se vežu na glukozne transportere i kompetativno inhibiraju probavne enzime. Poznato je da polifenolni spojevi reagiraju s enzimima nespecifičnim vezanjem i na taj način inhibiraju enzimsku aktivnost. Prema Wang i sur. (2013) polifenoli veće molekulske mase i višeg stupnja polimerizacije posjeduju veći kapacitet za inhibiciju enzimске aktivnosti. Enzimi za hidrolizu ugljikohidrata  $\alpha$ -amilaza i  $\alpha$ -glukozidaza su odgovorni za razlaganje oligosaharida do glukoze, a samim time i za „šećerni udar“ nakon konzumacije nekog jela. Upravo zbog toga važno je pronaći inhibitore tih dvaju enzima, a akarboza je jedna od najpoznatijih inhibitornih tvari za ta dva enzima. Iz literaturnih podataka i dobivenih mjerenja vidljivo je da uzorci ginka sadrže polifenolne spojeve prema čemu bi trebali pokazivati i antihiperglikemijski efekt. U životinjskim modelima ekstrakt ginka (EGB 761) pokazao je antidijabetičku aktivnost na streptozotocin-induciranim (STZ) miševima s dijabetesom kojima je oralno aplicirano 100/200/300 mg/kg ekstrakta u trajanju od 30 dana (Cheng i sur., 2013; Rhee i sur., 2015). STZ je antibiotik koji uništava pankreasne  $\beta$ -stanice koje su odgovorne za produkciju inzulina, te se na taj način omogućuje promatranje organizma koji nema mogućnost stvaranja inzulina (Wu i Huan, 2008). Enzim  $\alpha$ -amilaza je glikozidna hidrolaza koja slučajnim odabirom kida unutarnje  $\alpha$ -1,4-glikozidne veze. Posljedica inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze jest smanjena razgradnja ugljikohidrata u gornjem dijelu crijeva i usporena apsorpcija oralno unesenog škroba i disaharida u donjem dijelu tankog crijeva. Spojevi poput kempferola i kvercetina poznati su po sposobnosti inhibicije  $\alpha$ -amilaze (Proenca i sur., 2019). Povećanje te njihove sposobnosti primjetno je za uzorak ginka u kombinaciji s glukozom za sve faze probave, ali s obzirom na to da je sam šećer

glukoza je problem kod dijabetesa sljedeći uzorak koji pokazuje dobre rezultate je uzorak ginka u kombinaciji s kazeinom u crijevnom dijelu probave. Obzirom na postotak inhibicije naspram kontrole antidijabetička aktivnost može se klasificirati kao slaba (<35%), umjerena (35-70%) i jaka (70-100%)(Rusak i sur., 2021.). Prema tome u crijevnom dijelu probave uzorci ginka u kombinaciji s kazeinom i glukozom pokazuju jaku antidijabetičku aktivnost, a uzorci ginka u kombinaciji s uljem i vodom umjerenu antidijabetičku aktivnost. Glavna uloga enzima  $\alpha$ -glukozidaze je hidroliziranje terminalnih glikozidnih veza oligosaharida, sintetskih  $\alpha$ -glikozida koji sadrže  $\alpha$ -glikozidne veze, kao i  $\alpha$ -glukane poput hidrosolubilnog škroba i glikogena. Cijepanjem veze dolazi do oslobađanja  $\alpha$ -glukoze s kraja lanca. Neke  $\alpha$ -glukozidaze mogu katalizirati i reakcije transglukozilacije pa se ponekad nazivaju transglukozidazama. Nalazi se u epitelu tankog crijeva zbog čega je to najvažnija faza probave kada se gleda sposobnost inhibicije ovog enzima (Kang i sur., 2013.). Sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze pokazali su sekundarni biljni metaboliti koji prema svojoj kemijskoj strukturi spadaju u terpene, alkaloidne, kinine, flavonoide, fenole, fenilpropanoide kao i steroidne strukture bogate funkcionalnim skupinama poput organskih kiselina, estera, alkohola i alilnih grupa (Yin i sur., 2014). Kang i sur. (2013) navode akarbozu, voglibozu, nojimiricin i 1-deoksinojimiricin kao komercijalne inhibitor  $\alpha$ -glukozidaze. Isto tako navode i brojne negativne nuspojave poput glavobolje, nesanice, povraćanja, proljeva i nadutosti zbog čega naglašavaju važnost pronalaska novih rješenja. Uzevši u obzir činjenicu da je akarboza dobar antidijabetički lijek sve istražene kombinacije ekstrakta ginka pokazuju jaku antidijabetičku sposobnost budući da postotci inhibicije u odnosu na akarbozu iznose više od 70 % u crijevnoj fazi probave. Tanaka i sur. (2004) proveli su *invitro* istraživanje u kojem su dokazali da ekstrakt ginka ima dobru moć inhibicije  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze. Isto tako dokazali su da su flavonoidi ti koji su odgovorni za tu sposobnost. Iste rezultate navode i Feng i sur. (2013). S obzirom na rezultate ovog mog rada i vizualizaciju rezultata uz pomoć PCA dijagrama, možemo zaključiti da je inhibicija navedenih enzima povezana sa sadržajem i biodostupnošću većine pojedinačnih i ukupnih polifenola iz skupine flavonoida u ekstraktu ginka. Proteinska glikacija poznata je kao Maillardova reakcija između molekula proteina i molekula glukoze. To je neenzimska reakcija reducirajućih šećera i proteina koja uključuje korake nastanka Schiffove baze, Amadorijevih produkata i naprednih glikacijskih završnih produkata koji su odgovorni za brojne poremećaje poput vaskulopatije, retinopatije, neuropatije, katarakte i kronične bolesti bubrega. Obzirom na patološke posljedice glikacije važno nam je otkriti inhibitore proteinske glikacije koji bi mogli spriječiti komplikacije vezane uz dijabetes (Muniz-Ramirez i sur., 2020). Prema Van der Lugt i sur. (2020) produkti glikacije nastaju u intestinalnoj fazi probave. Prema tome u ovom mom radu najvažniji su rezultati intestinalne probave u kojoj uzorci ginka u kombinaciji s glukozom, kazeinom i uljem pokazuju veći postotak inhibicije BSA glikacije od uzorka ginka u kombinaciji s vodom. Postotci iznose oko 80 % što predstavlja jak postotak inhibicije za sve uzorke ginka. Pankreasna lipaza sudjeluje u razgradnji masti uključujući triacilgliceride

i fosfolipide koji imaju bitnu ulogu u samom metabolizmu lipida. Prema tome inhibitori lipaze predstavljaju potencijalni terapijski put protiv pretilosti zahvaljujući smanjenju probave lipida i apsorpciji na perifernoj razini. Prema Shahidi i Ambigaipalan (2015) konzumacija hrane s visokim udjelom fenolnih spojeva povezana je sa smanjenim rizikom za razvoj pretilosti. Uzorci ginka u kombinaciji s vodom i glukozom pokazali su najbolje rezultate u odnosu na orlistat, standardni inhibitor pankreasne lipaze, budući da je postotak inhibicije u svim fazama probave iznosio oko 90 % (raspon vrijednosti 85-95 %). Međutim i ostali uzorci pokazuju jaku inhibitornu aktivnost budući da se postotci inhibicije u odnosu na orlistat nalaze između 75 i 83 %.

#### 5.4. HPLC analiza

HPLC analizom uzoraka ekstrakta lišća ginka u kombinaciji s vodom, glukozom, kazeinom i uljem u modelu probave *in vitro* detektirala sam 3 flavonola. Detektirani flavonoli su kvercetin, kempferol i izoramnetin. Među flavonolima kempferol je bio prisutan u najvišoj koncentraciji, zatim kvercetin pa izoramnetin. Goh i Barlow (2004) pokazali su da je degradacija ovih flavonola kroz model probave minimalna što je primjetno i u dobivenim rezultatima. Koncentracija svih flavonola prije probave *in vitro* najviša je za kombinaciju ginka s vodom, dok kombinacija ginka s glukozom pokazuje najviše koncentracije u svim fazama probave *in vitro*. Boyer i sur. (2005) navode da je kvercetin stabilniji pri nižim vrijednostima pH zbog čega bi trebao biti primjetan porast u koncentraciji tokom crijevne probave. Rezultati ovog istraživanja nisu u skladu s tim tezama budući da u ovom istraživanju nije zabilježen porast kvercetina. Takve rezultate nisu dobili ni Lee i sur. (2020). Guo i sur. (2013) navode da konzumacijom prehrambenih masti u umjerenim količinama povećavamo bioraspoloživost kvercetina i izoramnetina jer takva kombinacija potiče lučenje žuči što pospješuje bolju apsorpciju i micelarizaciju u crijevima. To se najviše odnosi na aglikonske oblike budući da su u takvom obliku lipofilni (topljivi u mastima), dok su glikozilirani oblici lipofobni (topljiviji u vodi) (Dabeek i Marra, 2019.). Rezultati ovog istraživanja su u skladu s tim tvrdnjama budući da maslinovo ulje spada pod nezasićene masti i primjetan je porast biodostupnosti kvercetina i izoramnetina u uzorku ginka u kombinaciji s maslinovim uljem naspram uzorka ginka u kombinaciji s vodom. Dabeek i Marra (2019) napominju da veću biodostupnost imaju glikozilirani od aglikonskih oblika kvercetina i kempferola. Isto tako navode da kempferol ima veću kemijsku stabilnost od kvercetina budući da ima jednu hidroksilnu skupinu manje. Međutim navode i da veća koncentracija ovih flavonola u hrani ne dovodi nužno do povećanja biodostupnosti u *in vivo* sustavu. Uzevši u obzir postotke koje su koristili Vujčić i sur. (2017) svi uzorci ginka osim kombinacije ginka s vodom pokazuju vrijednosti biodostupnosti totalnih identificiranih flavonola iznad 70 % što se smatra visokom biodostupnošću. Uzorak ginka u kombinaciji s vodom pokazuje vrijednosti biodostupnosti između 40 i 70 % što predstavlja umjerenu biodostupnost. Najviše vrijednosti biodostupnosti TiF-a pokazao je uzorak ginka u kombinaciji s glukozom u svim dijelovima probave. Normirane vrijednosti biodostupnosti individualnih flavonola i ukupnih identificiranih flavonola daju malo jasniju sliku iz koje možemo očitati u kojim je uzorcima biodostupnost 100 %. U usnoj fazi izmjerena je biodostupnost od 100 % za sve individualne flavonole (Q, K i IzoR) kao i za ukupne identificirane flavonole u svim fazama probave *in vitro*. Normiranjem vrijednosti biodostupnosti omogućuje nam i usporedbu s drugim metodama koje smo koristili za određivanje antioksidacijske i antidijabetičke aktivnosti.

## 5.5. Analiza glavnih komponenti (eng. Principal Component Analysis -PCA)

Analiza glavnih komponenti (PCA) do sada je korištena kako bi se dobio uvid u odnos između fitokemijskog sastava biljaka i biološke aktivnosti (npr. antioksidacijske i antidijabetičke) u različitim biljnim pripravcima (Boeing i sur., 2014.; Russo i sur., 2015.). Kako bih i ja vidjela, sličnosti i razlike između tretmana ginka (ginko u kombinaciji s vodom, kazeinom, glukozom i maslinovim uljem) i mjerenih metoda napravila sam analizu glavnih komponenti s normiranim podacima biodostupnosti, podacima mjerenja ukupnih i individualnih fitokemikalija i podacima antioksidacijske i antidijabetičke aktivnosti nakon probave *in vitro*, tj. nakon intestinalne faze. Uz pomoć PCA dijagrama dobila sam jasno odvajanje pojedinih uzoraka na temelju različitih tretmana. U desnom gornjem kvadratu PCA dijagrama nalazi se uzorak ginka s glukozom, u lijevom gornjem kvadratu uzorak ginka s uljem, u desnom donjem kvadratu smješten uzorak ginka s vodom, a u lijevom donjem kvadratu uzorak ginka s kazeinom. Uzorci ginka s uljem i kazeinom su najmanje udaljeni što upućuje na sličnosti između ta dva uzorka. Također iz PCA dijagrama je vidljivo da je udaljenost između uzorka ginka s vodom i glukozom veća od udaljenosti koja je između uzoraka ginka s uljem i kazeinom. Uzorak ginka s kazeinom je najudaljeniji od uzorka s glukozom i vodom što upućuje na njihovu različitost. Uzorak s uljem pokazuje nešto manju udaljenost od uzorka s glukozom i vodom u odnosu na uzorak s kazeinom. Metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti možemo najviše povezati s uzorcima ginka s vodom i glukozom jer je među njima najmanja udaljenost na PCA dijagramu. Uzorci ginka s uljem i glukozom imaju najmanju udaljenost s metodom inhibicije enzima amilaze što upućuje na jaku antidijabetičku aktivnost tih dvaju uzoraka. Udaljenost metode za inhibiciju enzima glukozidaze u odnosu na uzorke ginka s vodom i uljem je također mala na PCA dijagramu što nam isto upućuje na jaku antidijabetičku aktivnost tih dvaju uzoraka. Uzorci ginka s vodom i glukozom imaju najmanju udaljenost s inhibicijom enzima lipaze što upućuje na pozitivan utjecaj na mršavljenje što smanjuje rizik od razvoja hiperglikemije te razvoja kompleksne kronične bolesti dijabetesa tipa 2. Udaljenost metode za određivanje inhibicije BSA glikacijena PCA dijagramu je najmanja za uzorke ginka u kombinaciji s uljem, kazeinom i glukozom što upućuje na zaključak o njihovoj protektivnoj ulozi od patoloških stanja uzrokovanih glikacijom proteina među kojima su i ona koja se javljaju kao komplikacije pri dijabetesu. Ovisno o samom položaju metoda na PCA dijagramu te njihovoj međusobnoj udaljenosti možemo vidjeti da su antioksidacijska i antidijabetička aktivnost povezane sa sadržajem i biodostupnošću većine pojedinačnih i ukupnih polifenola što je u skladu sa literaturom (Boeing i sur., 2014.; Russo i sur., 2015.). Triterpenski laktoni su udaljeni od metoda za mjerenje antioksidacijske i antidijabetičke aktivnosti što upućuje da oni nemaju značajnu antioksidacijsku i antidijabetičku aktivnost. Prema literaturi, triterpenskim laktonima pripisuje se najviše antiplateletno (Chen i sur. 2007.; Habtemariam, 2019.) te neuro protektivno djelovanje (Johnston i sur. 2006).

## 6. ZAKLJUČAK

Istraživanja su pokazala da ekstrakt ginka poboljšava cerebralnu cirkulaciju i time pospješuje pamćenje. Za to svojstvo najvećim dijelom su odgovorni triterpenski laktoni. Povećanjem biodostupnosti triterpenskih laktona pospješujemo taj učinak. Prema tome tablete ginka ne bi trebali uzimati na prazan želudac, nego uz mlijeko koje sadrži kazein ili uz maslinovo ulje, što djelomično i potvrđuje postavljenu pretpostavku. Znanstvena literatura potvrđuje i druge biološke učinke. Ukoliko odlučimo uzimati tablete ginka s ciljem zaštite stanica od oksidacijskog stresa, trebali bi ih uzimati ili na prazan želudac ili uz dodatak šećera glukoze. Dijabetes uzrokuje štetne posljedice na proteine. U svrhu njihove zaštite, zajedno s ostvarivanjem maksimalnog antidijabetičkog učinka, najbolje je konzumirati tablete ginka uz kazein ili maslinovo ulje. Rezultati inhibicije lipaze ukazuju na pozitivan učinak ekstrakta ginka s dodatkom vode i glukoze u crijevnoj fazi *in vitro* probave, što dovodi do smanjene hidrolize lipida i njihove apsorpcije. Dakle, u svrhu mršavljenja najbolje je preparat ginka uzimati na prazan želudac. Obzirom na PCA dijagram može se zaključiti da su antioksidacijska i antidijabetička aktivnost povezane sa sadržajem i biodostupnošću većine pojedinačnih i ukupnih polifenola. Triterpenski laktoni su udaljeni od metoda za mjerenje antioksidacijske i antidijabetičke aktivnosti, zbog čega mogu zaključiti da oni nemaju značajnu antioksidacijsku i antidijabetičku aktivnost. Iz svega navedenog proizlazi da primjena tableta ginka na prazan želudac ili uz hranu, kao i sastav te hrane, ovisi o tome koji biološki učinak prvenstveno želimo postići. Dakle, rezultati upućuju da treba imati drugačiji pristup prilikom kombinacije tableta ginka i hrane, ako se radi o poboljšanju cerebralne cirkulacije i poboljšanju pamćenja, antioksidativnom, antidijabetičkom učinku ili mršavljenju.

## 7. LITERATURA

- Abramovič, H. (2015): Antioxidant Properties of Hydroxycinnamic Acid Derivates: A Focus on Biochemistry Physicochemical Parameters, Reactive Species, and Biomolecular Interactions. *Coffe in Health and Disease Prevention*, 93, 843-852.
- Ahmad M., Gani, A. (2021): Ultrasonicated resveratrol loaded starch nanocapsules: Characterization, bioactivity and release behaviour under *in vitro* digestion. *Carbohydrate Polymers* 251, 1-28.
- Aldred, E. (2009): Terpenes. *Pharmacology*, 167–174.
- Ambriz-Pérez D. L., Leyva-López N., Gutierrez-Grijalva E.P., Heredia J.B. (2016): Phenolic compounds: natural alternative in inflammation treatment. A review. *Cogent Food Agriculture*, 2, 1-14.
- Bahukhandi A., Belwal T., Bhatt D. I., Giri L., Kewlani P., Rawal S. R., Tariq, M. (2019): Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements. Elsevier inc., 241-250.
- Bate-Smith E. C., Swain, T. (1962): Flavonoid compounds. In: Mason HS, Florkin AM (eds) *Comparative biochemistry*, 3, 705–809.
- Benzie I. F. F., Strain J. J. (1999): Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299, 15-27.
- Bermúdez-Soto M. J., Tomás-Barberán F. A., García-Conesa M. T. (2007): Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 102, 865–874.
- Boeing J. S., Barizão É. O., e Silva B. C., Montanher P. F., de Cinque Almeida V., Visentainer J. V. (2014): Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chemistry Central Journal*, 8.
- Bones K., Mills S. (2013): Principles and practice of phytoterapy: modern herbal medicine. Elsevier Health Science, 596-627.
- Boyer J., Brown D., Liu R. H. (2005): *In vitro* digestion and lactase treatment influence uptake of quercetin and quercetin glucoside by the Caco-2 cell monolayer. *Nutrition Journal*, 4(1), 1-15.
- Bao-chang C., Hao C., Jun C., Hong-xuan C., Zhi-peng C., Dan L., Jun S., Yan-yu X. (2010): Comparative pharmacokinetics and bioavailability of quercetin, kaempferol and isorhamnetin after oral administration of *Ginkgo biloba* extracts, *Ginkgo biloba* extract phospholipid complexes and *Ginkgo biloba* extract solid dispersion in rats. *Fitoterapia* 81, Elsevier, 1045-1052.
- Carbonell-Capella J. M., Buniowska M., Barba F. J., Esteve M. J., Frígola A. (2014): Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 155–171.
- Charalabidis A., Sfouni M., Bergström C., Macheras P. (2019): The Biopharmaceutics Classification System (BCS) and the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS): Beyond guidelines. *International Journal of Pharmaceutics*, 566, 264-281.
- Chen P., Ozcan M., Harnly J. (2007): Chromatographic fingerprint analysis for evaluation of *Ginkgo biloba* products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 251–261.
- Cheng D., Liang B., Li Y. (2013): Antihyperglycemic effect of *Ginkgo biloba* extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Biomed Research International*, 162724, 1-8.
- Choi M. S., Kim Y. K., Kim D. H., Yoo H. H. (2019): Effects of Gut Microbiota on the Bioavailability of Bioactive Compounds from *Ginkgo* Leaf Extracts. *Metabolites*, 9, 132.
- Conti M., Petersen D.(2008): *Survivors: The A-bombed Trees of Hiroshima*; Lulu press, Morrisville, N. C., USA, 27-31.
- Čvorović J., Ziberna L., Fornasaro S., Tramer F., Passamonti S. (2018): Bioavailability of Flavonoids: The Role of Cell Membrane Transporters. *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease*; Elsevier Inc., 2(22), 1-26.
- Dabeek W. M., Marra M. V. (2019): Dietary Quercetin and Kaempferol: Bioavailability and Potential Cardiovascular-Related Bioactivity in Humans. *Nutrients*, 11(10), 2288.

- Ding C., Chen E., Zhou W., Lindsay C. R. (2004): A Method for Extraction and Quantification of Ginkgo Terpene Trilactones. *Analytical Chemistry*, 76, 4332-4336.
- Eisvand F., Razavi B. M., Hosseinzadeh H. (2020): The effects of *Ginkgo biloba* on metabolic syndrome: A review. *Phytotherapy Research*, 34(8), 1798-1811.
- Europska farmakopeja (2004): Peto izdanje, vijeće Europe, Strasbourg, 2377-2378.
- Feng S., Song L., Liu Y., Lai F., Zuo G., He G., Chen M., Huang D. (2013): Hypoglycemic Activities of Commonly-Used Traditional Chinese Herbs. *The American Journal of Chinese Medicine*, 41(4), 849–864.
- Gayoso L., Claerhout A.S., Calvo M.I., Cavero R.Y., Astiasarán I., Ansorena D. (2016): Bioaccessibility of rutin, caffeic acid and rosmarinic acid: Influence of the *in vitro* gastrointestinal digestion models. *Journal of Functional Foods*, 26, 428–438.
- Ginsburg I., Koren E., Shalish M., Kanner J., Kohen R. (2012): Saliva increases the availability of lipophilic polyphenols as antioxidants and enhances their retention in the oral cavity. *Archives of Oral Biology*, 57, 1327– 1334.
- Goh L. M. L., Barlow P. J. (2004): Flavonoid recovery and stability from *Ginkgo biloba* subjected to a simulated digestion process. *Food Chemistry*, 86 (2), 195-202.
- Guo Y., Mah E., Davis C. G., Jalili T., Ferruzzi M. G., Chun O. K., Bruno R. S. (2013): Dietary fat increases quercetin bioavailability in overweight adults. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(5), 896–905.
- Guyton A. C., Hall J. E. (2012): *Medicinska fiziologija*. Elsevier, dvanaesto izdanje; 753-809.
- Haratifar S., Corredig M.(2014): Interactions between tea catechins and casein micelles and their impact on renneting functionality. *Food Chemistry*, 143, 27–32.
- Harborne J. B. (1980): Plant phenolics. In: Bell EA, Charlwood BV (eds) *Encyclopedia of plant physiology*, vol 8, Secondary plant products. Springer, Berlin, 329–402.
- Habtemariam S. (2019): Medicinal Foods as Potential Therapies for Type-2 Diabetes and Associated Diseases. *The Chemical and Pharmacological Basis of their Action*; 1069-1075.
- Howard L. R., Clark J. R., Brownmiller C. R. (2003): Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(12), 1238-1247.
- Kardum N., Glibetic M. (2018): Polyphenols and Their Interactions With Other Dietary Compounds: Implications for Human Health. *Advances in Food and Nutrition Research*, 103–144.
- Kang M. G., Yi S. H., Lee J. S. (2013): Production and characterization of a new alpha-glucosidase inhibitory peptide from *Aspergillus oryzae* N159-1. *Mycobiology*, 41:149–154.
- Kazakevich Y., LoBrutto R. (2007): HPLC for pharmaceutical scientists. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 3-25, 140-151.
- Kendrick Labs Inc (2008): Ethanol Precipitation of Protein: Protocol and % Recovery; 800-462-3417.
- Kusznierewicz B., Bartoszek A., Wolska L., Drzewiecki J., Gorinstein S., Namiesnik J. (2008): Partial characterization of white cabbages (*Brassica oleracea var. Capitata f. alba*) from different regions by glucosinolates, bioactive compounds, total antioxidant activities and proteins. *LWT-Food Science and Technology*, 41(1), 1-9.
- Johnston G. A. R., Hanrahan J. R., Chebib M., Duke R. K., Mewett K. N. (2006): Modulation of Ionotropic GABA Receptors by Natural Products of Plant Origin. *Advances in Pharmacology*, 285–316.
- Jogeu M., Lobstein A., Anton R., Mortier F. (1995): Comparative Antilipoperoxidant, Antinecrotic and Scavenging Properties of Terpenes and Biflavones from Ginkgo and some Flavonoids. *Planta Medica*, 61(1995), 126-129.
- Joshee N., Dhekney S. A., Parajuli P. (2019): *Medicinal Plants*. Springer Nature Switzerland AG, 1-445.
- Lattanzio V. (2013): Phenolic Compounds: Introduction. *Natural Products*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1544-1573.
- Lee S. Y., Lee S. J., Yim D. G., Hur S. J. (2020): Changes in the Content and Bioavailability of Onion Quercetin and Grape Resveratrol During In Vitro Human Digestion. *Foods*, 9(6), 694.
- Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. (2010): Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4 (8), 118-126.



- Lojek A., Denev P., Ciz M., Vasicek O., Kratchanova M. (2014): The effects of biologically active substances in medicinal plants on the metabolic activity of neutrophils. *Phytochemistry reviews*, 13(2), 499-510.
- Madgula V. L., Avula B., Yu Y. B., Wang Y. H., Tchantchou F., Fisher S., Luo Y., Khan I. A., Khan S. I. (2010): Intestinal and blood-brain barrier permeability of ginkgolides and bilobalide: *in vitro* and *in vivo* approaches. *Planta Medica*, 76 (06), 599-606.
- Mahadevan S., Park Y. (2008): Multifaceted Therapeutic Benefits of Ginkgo biloba L.: Chemistry, Efficacy, Safety and Uses. *Journal of food science*, 73 (1), 14-19.
- Morandi Vuolo M., Lima V. S., Maróstica Junior M. R. (2019): Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. U: *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications* (Segura Campos M. R., ured.), Woodhead, Cambridge, 33-50.
- Muñiz-Ramirez A., Perez R. M., Garcia E., Garcia F. E. (2020): Antidiabetic Activity of Aloe vera Leaves. *Hindawi; Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 6371201, 1-9.
- Nikolić T. (2013): *Sistematska botanika - Raznolikost i evolucija biljnog svijeta*, Alfa d.d., Zagreb.
- Olenikov D. N., Kashchenko N. I., Chirikova N. K., Vasil'eva A. G., Gadimli A. I., Isaev J. I., Vennos C. (2019): Caffeoylquinic Acids and Flavonoids of Fringed Sagewort (*Artemisia frigida* Willd.): HPLC-DAD-ESI-QQQ-MS Profile, HPLC-DAD Quantification, *in Vitro* Digestion Stability, and Antioxidant Capacity. *Antioxidants (Basel)*, 8(8), 307.
- Oliveira D., Latimer C., Parpot P., Gill C. I. L., Oliveira R. (2019): Antioxidant and antigenotoxic activities of *Ginkgo biloba* L. leaf extract are retained after *in vitro* gastrointestinal digestive conditions. *European Journal of Nutrition*. Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature, 1-12.
- Ortega N., Reguant J., Romero M. P., Macia A., Motilva M. J. (2009): Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenol by an *in vitro* digestion model. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 57, 5743–5749.
- Ozidal T., Capanoglu E., Altay F. (2013): A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51(2), 954–970.
- Procházková D., Boušová I., Wilhelmová N. (2011): Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4):513–523.
- Proença C., Freitas M., Ribeiro D., Tomé S. M., Oliveira E. F. T., Viegas M. F., Araújo A. N., Ramos M. J., Silva A. M. S., Fernandes P. A., Fernandes E. (2019): Evaluation of a flavonoids library for inhibition of pancreatic  $\alpha$ -amylase towards a structure–activity relationship. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 577–588.
- Radić Brkanac S., Gerić M., Gajski G., Vujčić V., Garaj-Vrhovac V., Kremer D., Domijan A. M. (2015): Toxicity and antioxidant capacity of *Frangula alnus* Mill. bark and its active component emodin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(3), 923-929.
- Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M., Moore P. K. (2005): Endokrina gušterača i kontrola glukoze u krvi. U: *Farmakologija*, Golden marketing- Tehnička knjiga, Zagreb, 385- 392.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (9-10), 1231–1237.
- Rhee K. J., Lee C. G., Kim S. W., Gim D. H., Kim H. C., Joung B. D. (2015): Extract of *Ginkgo biloba* ameliorates streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus and high-fat diet-induced Type 2 diabetes mellitus in mice. *International Journal of Medical Science*, 12(12), 987-994.
- Ribéreau-Gayon P. (1972): *Plant Phenolics*, Oliver and Boyd, Edinburgh, 254.
- Rimkiene L., Ivanauskas L., Zevzikovas A., Nenortiene P., Jakstas V. (2021): Variation of terpene lactones composition in *Ginkgo biloba* (L.) leaves under the influence of harvesting time and growing location. *Acta Physiologiae Plantarum*, 43:46.
- Rusak G., Šola I., Vujčić Bok V. (2021): Matcha and Sencha green tea extracts with regard to their phenolics pattern and antioxidant and antidiabetic activity during *in vitro* digestion. *Journal of Food Science and Technology*, 58, 3568–3578.
- Russo D., Valentão P., Andrade P., Fernandez E., Milella L. (2015): Evaluation of antioxidant, antidiabetic and anticholinesterase activities of *Smallanthus sonchifolius* landraces and

- correlation with their phyto chemical profiles. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 17696–17718.
- Salahuddin M. A. H., Ismail A., Kassim N. K., Hamid M., Ali M. S. M. (2020): Phenolic profiling and evaluation of *in vitro* antioxidant,  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of *Lepisanthes fruticosa* (Roxb) Leenh fruit extracts. *Food Chemistry*, 331, 127240.
- Shahidi F., Ambigaipalan P. (2015): Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820–897.
- Shahidi F., Peng H. (2018): Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. *Journal of Food Bioactives*, 4, 11–68.
- Sun B. S., Ricardo-da-Silva J. M., Spranger I. (1998): Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4267-4274.
- Spencer J. (2003): Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *Journal of Nutrition*, 133, 3255–3261.
- Spinola V., Llorent-Martinez E. J., Castilho P. C. (2019): Inhibition of  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase by phenolic compounds of *Rumex maderensis* (Madeira sorrel). Influence of simulated gastrointestinal digestion on hyperglycaemia-related damage linked with aldose reductase activity and protein glycation. *LWT - Food Science and Technology*, 118, 108727.
- Spínola V., Pinto J., Castilho P.C. (2018): Hypoglycemic, anti-glycation and antioxidant *in vitro* properties of two *Vaccinium* species from Macaronesia: a relation to their phenolic composition. *Journal of Functional Foods*, 40, 595–605.
- Su E., Yang M., Cao J., Lu C., Wang J., Cao F. (2017): Deep eutectic solvents as green media for efficient extraction of terpenoid lactones from *Ginkgo biloba* leaves. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 40(8), 385-391.
- Šamec D., Karalića E., Šola I., Vujčić Bok V., Salopek-Sondi B. (2021): The Role of Polyphenols in Abiotic Stress Response: The Influence of Molecular Structure. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(1), 118.
- Šola I., Vujčić Bok V., Pinterić M., Auer S., Ludwig-Mueller J., Rusak G. (2020): Improving the phytochemical profile and bioactivity of Chinese cabbage sprouts by interspecific transfer of metabolites. *Food Research International*, 137, 109726.
- Šunjić V. (2017): O heleninu od Srećka Bošnjakovića do Lavoslava Ružičke i najnovijih saznanja – ogledni primjer razvoja organske kemije u XX. stoljeću. *Kemija u industriji : Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske*, 66, (1-2).
- Tanaka S. L. K., Han Y. N., Zheng and H. Okuda. (2004): Effects of the flavonoid fraction from *Ginkgo biloba* extract on the postprandial blood glucose elevation in rats. *Journal of Pharmaceutical Society of Japan Yakugaku Zasshi*, 124, 605–612.
- Tang J., Sun J., Cui F., Zhang T., Liu X, He Z. (2008): Self-Emulsifying Drug Delivery Systems for Improving Oral Absorption of *Ginkgo biloba* Extracts. *Drug Delivery*, 15 (8), 477-484.
- Tapas A. R., Sakarkar D. M., Kakde R. B. (2008): Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7, 1089-1099.
- Van der Lugt T., Venema K., van Leeuwen S., Vrolijk M. F., Opperhuizen A., Bast A. (2020): Gastrointestinal digestion of dietary advanced glycation endproducts using an *in vitro* model of the gastrointestinal tract (TIM-1); *Food Function*, 11, 6297.
- Vermerris W., Nicholson R. (2008): Phenolic compound biochemistry. Springer, Dordrecht, 1-196.
- Vujčić V., Radić Brkanac S., Radojčić Redovniković I., Ivanković S., Stojković R., Žilić I., Radić Stojković M. (2017): Phytochemical and bioactive potential of *in vivo* and *in vitro* grown plants of *Centaurea ragusina* L.–Detection of DNA/RNA active compounds in plant extracts via thermal denaturation and circular dichroism. *Phytochemical analysis*, 28(6), 584- 592.
- Wade L. G. (2017): *Organska kemija, Školska knjiga, d.d., Zagreb*; 510-515;1153-1200.
- Wang H., Liu T., Huang D. (2013): Starch hydrolases inhibitors from edible plants. *Advances in Food Nutrition Research*, 70, 103-36.
- Wang P., Cao X., Chu Y., Wang P. (2019): Ginkgolides-loaded soybean phospholipid-stabilized nanosuspension with improved storage stability and *in vivo* bioavailability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 181, 910–917.

- Wojtunik-Kulesza K., Oniszczyk A., Oniszczyk T., Combrzyński M., Nowakowska D., Matwijczuk A. (2020): Influence of *In Vitro* Digestion on Composition, Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Food Polyphenols—A Non-Systematic Review. *Nutrients*, 1401, 1-107.
- Wu K., Huan Y. (2008): *Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats*. John Wiley & Sons, Inc; 1-14.
- Yin Z., Zhang W., Feng F., Zhang Y., Kang W. (2014):  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Sci Hum Wellness*, 3(3-4), 136-74.
- Yu Z., Yang K., Chen Z., Li Q., Huang Z., Wang W., Hu H. (2020): What dominates the changeable pharmacokinetics of natural sesquiterpene lactones and diterpene lactones: a review focusing on absorption and metabolism. *Drug Metabolism Reviews*, 1-44.
- 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.

## 8. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Ema Nikša

Email: eniksa@stud.biol.pmf.hr

### **Obrazovanje**

2012. – 2016. Opća gimnazija Jurja Barakovića Zadar

2016. – 2022. Integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije – smjer nastavnički na Prirodoslovno – matematičkom fakultetu u Zagrebu

### **Publikacije**

Petelinec, A., Nikša, E., Grudiček, D., Sertić Perić, M. (2020): Poučavanje teme Prehrana čovjeka putem istraživačkog učenja i osnovnih načela teorije izbora i kvalitetne škole. *Educatio biologiae*. 6: 65-79.

### **Popularizacija znanosti, volontiranja, certifikati**

Noć biologije u sklopu Otvorenih dana Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu 2018.

Smotra sveučilišta 2019.

Noć biologije u sklopu Otvorenih dana Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu 2022.

The GLOBE program Teacher certification 2020.