Kemijski i biološki profil odabranih biljnih vrsta korištenih u tradicionalnoj medicini BiH

Bektašević, Mejra

Doctoral thesis / Disertacija

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:588120

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Mejra Bektašević

KEMIJSKI I BIOLOŠKI PROFIL ODABRANIH BILJNIH VRSTA KORIŠTENIH U TRADICIONALNOJ MEDICINI BIH

DOKTORSKI RAD

Split, 2018.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

Mejra Bektašević

CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROFILE OF SELECTED PLANT SPECIES USED IN TRADITIONAL BIH MEDICINE

DOCTORAL THESIS

Split, 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

KEMIJSKI I BIOLOŠKI PROFIL ODABRANIH BILJNIH VRSTA KORIŠTENIH U TRADICIONALNOJ MEDICINI BIH

DOKTORSKI RAD

Mentor:
izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo

Split, 2018.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

Mejra Bektašević

CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROFILE OF SELECTED PLANT SPECIES USED IN TRADITIONAL BIH MEDICINE

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Dr. Olivera Politeo, Associate Professor

Split, 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Kandidat mr. sc. Mejra Bektašević
predao je dana: 1. 3. 2018. godine disertaciju izrađenu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu

Povjerenstvo u sastavu:

prof. dr. sc. Mladen Miloš, Kemijsko-tehnološki fakultet Split,

doc. dr. sc. Marin Roje, Institut Ruđer Bošković Zagreb,

doc. dr. sc. Ivica Ljubenkov, Prirodoslovno-matematički fakultet Split,

doc. dr. sc. Mila Radan, Kemijsko-tehnološki fakultet Split,

izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo, Kemijsko-tehnološki fakultet Split.

povoljno je ocijenilo disertaciju, a Fakultetsko vijeće je na sjednici dana _____ prihvatilo ocjenu i odobrilo obranu pred povjerenstvom u istom sastavu.

Obrana disertacije održana je dana _____

D e k a n

UDK: 582.943 (497.6) (043.3)

Znanstveno područje: prirodne znanosti

Znanstveno polje: kemija

Znanstvena grana: medicinska kemija i biokemija

Institucija: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Zavod za biokemiju

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo

Broj stranica: 194

Broj slika: 90

Broj tablica: 22

Broj literaturnih referenci: 150

Datum obrane: 29. lipnja 2018. godine

Sastav povjerenstva za obranu:

prof. dr. sc. Mladen Miloš, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu,

doc. dr. sc. Marin Roje, Institut Ruđer Bošković u Zagrebu,

doc. dr. sc. Ivica Ljubenkov, Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu,

doc. dr. sc. Mila Radan, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu,

izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu.

Rad je pohranjen u knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35; Sveučilišnoj knjižnici u Splitu, Ruđera Boškovića 31; Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb.

Tema rada prihvaćena je na 25. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta, Sveučilište u Splitu, održanoj dana 6. srpnja 2015. godine.

Uraditi i napisati doktorsku disertaciju nije jednostavno, međutim budući da sam se kroz disertaciju bavila tematikom koju volim, kao i da sam prilikom njene izrade surađivala i dolazila u kontakt s divnim ljudima, za mene je predstavljalo pored izazova i veliko zadovoljstvo. To je nastavak mog gimnazijskog sna koji je, mada prekinut, završio na najljepši mogući način, kojem se tada nisam nadala i na kojem sam izuzetno zahvalna.

Kod izrade ove doktorske disertacije najveću pomoć i uzor sam imala u svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Oliveri Politeo. Neizmjerno sam zahvalna profesorici Politeo što je prihvatila mentorstvo. Svojim znanjem, iskustvom i divnom osobnošću, profesorica Politeo me vodila, usmjeravala, upućivala i na najjednostavniji način rješavala probleme na koje sam prilikom rada nailazila. Treba spomenuti i divna druženja i susrete koji su mi, svaki pojedinačno, ostali u lijepom sjećanju.

Na Zavodu za biokemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu sam dočekana srdačno. Svaki njegov član mi je pomagao u radu, kad god je to bilo potrebno. Posebno bih istakla prof. dr. sc. Mladena Miloša, koji me podržavao tijekom studija i izrade doktorske disertacije. Njegove riječi ohrabrenja, po obrani teme doktorske disertacije, dale su mi veliki poticaj da nastavim dalje. Zahvalnost dugujem i doc. dr. sc. Mili Radan, od koje sam također imala priliku učiti, kao i doc. dr. sc. Franku Burčulu, koji mi je pomogao kod izvođenja dijela eksperimentalnog rada, kao i kod pronalaženja literature. Za mene poseban člana Zavoda za biokemiju je dr. sc. Ivana Carev. Velika je privilegija surađivati i moći nazvati prijateljicom osobu poput Ivane. Zahvalna sam joj na pomoći i uputama koje mi je pružila pri izradi ove doktorske disertacije. Vjerujem da je naš rad na eksperimentalnom dijelu doktorske disertacije, suradnja kod pisanja znanstvenih radova, početak jedne uspješne suradnje i prijateljstva.

Na doktorskom studiju i pri izradi ove doktorske disertacije, imala sam priliku učiti i od profesora sa Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, među kojima je i doc. dr. sc. Marin Roje. Pod njegovim nadzorom, u suradnji s dipl. ing. kemije Mladenkom Jurin, urađen je jedan dio eksperimentalnog rada na Institutu Ruđer Bošković, čime je ova doktorska disertacija dodatno dobila na vrijednosti. Na tome sam docentu Roje i kolegici Jurin izuzetno zahvalna.

Dio eksperimentalnog dijela rada je urađen i na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Splitu, ljubaznošću doc. dr. sc. Ivice Ljubenkova. Zahvalnost docentu Ljubenkovu dugujem i zbog toga što je kao član Povjerenstva za ocjenu ove doktorske disertacije svojim primjedbama i uputama dao doprinos njenoj kvaliteti. Pri identifikaciji ispitivanih biljnih vrsta pomogao mi je doc. dr. sc. Mirko Ruščić s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu, kojem također dugujem zahvalnost.

Zahvalnost dugujem i svom osoblju te profesorima na doktorskom studiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, a posebno izv. prof. dr. sc. Mariji Bralić, prof. dr. sc. Zoranu Grubaču i dekanu, prof. dr. sc. Igoru Jerkoviću, koji su bili moj prvi kontakt s Kemijsko-tehnološkim fakultetom i koji su mi pomagali tijekom doktorskog studija. Izrazila bih veliku zahvalnost izv. prof. dr. Vesni Sokol, koja mi je kao voditeljica doktorskog studija svojim uputama i savjetima puno pomogla. Tu su također i doc. dr. sc. Marijo Buzuk, koji mi je kao CEEPUS koordinator pomogao da proširim svoje znanje tijekom boravka na PMF-u u Novom Sadu, te uvijek ljubazna gospođa Smiljana Kapov.

Zahvalna sam profesoricama i profesorima, kolegicama i kolegama s Biotehničkog fakulteta Sveučilišta u Bihaću, koji su me podržavali i koji me podržavaju u radu. Istakla bih izv. prof. dr. sc. Halida Makića, koji je prepoznao moju ljubav prema Biokemiji i Instrumentalnim metodama analize te mr. sc. Edinu Šertović i mr. Dinka Bećirspahića, koji su mi pomogli kod statističke obrade rezultata. Tu su i moje kancelarijske kolegice mr. Anita Vuković, mr. sc. Sebila Rekanović i mr. sc. Elvisa Hodžić, koje su mi omogućile ugodnu radnu atmosferu.

Naravno, smisao svemu ovome dala je moja obitelj, koja je uvijek bila uz mene. Hvala mojim roditeljima Senadi i Ismetu Čustović, kao i mojoj svekrvi Hatidži, koji su mi pružili ljubav i podršku. Hvala mom bratu Muhamedu, mojoj snahi Suzani te mom Maku i Dini. Hvala mom sinu Harisu i kćeri Hanan, koji su moj najveći životni motiv i poticaj. Hvala mom suprugu Nedžadu na ljubavi, razumijevanju i strpljenju.

Split, 2018. godine

Sažetak

U usporedbi s zemljama Centralne i Zapadne Europe, tradicionalna medicina Bosne i Hercegovine je većinom neistražena. Cilj ovoga doktorskog rada bio je odrediti fitokemijski i biološki profil četiri biljne vrste iz porodice Lamiaceae; *Mentha pulegium* L., *Teucrium montanum* L., *Satureja subspicata* L. i *Clinopodium vulgare* L., koje su karakteristične i nedovoljno istražene ljekovite biljne vrste za područje BiH. Fitokemijski profil je određen kroz kemijski sastav izoliranih eteričnih ulja te vodenih i metanolnih ekstrakata. Analiza eteričnih ulja provedena je vezanim sustavom GC/MS, dok je analiza ekstrakata provedena veznim sustavom HPLC/DAD. Eterična ulja *M. pulegium* i *T. montanum*, u usporedbi s uljima istih biljaka s drugih područja, pokazuju sličan sastav s razlikom u udjelu glavnih komponenti, dok ulja *S. subspicata* i *C. vulgare* pokazuju veću varijabilnost u sastavu i sadržaju. Vodene i metanolne ekstrakte karakterizira visok sadržaj fenola i flavonoida, s ružmarinskom kiselinom, kao dominantnom komponentom. Izuzetak su ekstrakti *T. montanum*, s *p*-kumarinskom kiselinom kao dominantnom komponentom. Eterična ulja pokazuju slab antioksidacijski potencijal i umjerenu sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE. Ispitivani ekstrakti pokazuju dobar antioksidacijski potencijal. Vodeni ekstrakti pokazuju vrlo dobre, a metanolni ekstrakti dobre rezultate u zaštiti lipida od oksidacije. U pogledu zaštite proteina od oksidacije svi ekstrakti pokazuju prooksidacijsko djelovanje. Ispitivani ekstrakti pokazuju slabu sposobnost inhibicije AChE. Slabu sposobnost inhibicije BChE pokazuju samo metanolni ekstrakt *S. subspicata* te vodeni ekstrakti *M. pulegium* i *T. montanum*.

Ključne riječi: eterično ulje, vodeni i metanolni ekstrakti, GC/MS, HPLC/DAD, biološka aktivnost, Lamiaceae.

Abstract

Unlike the countries of Central and Western Europe, the traditional medicine of Bosnia and Herzegovina is mostly unexplored. The aim of this work was to determine the phytochemical and biological profile of four plant species from the Lamiaceae family; *Mentha pulegium* L., *Teucrium montanum* L., *Satureja subspicata* L. and *Clinopodium vulgare* L., which are characteristic and insufficiently researched healing plant species in the area of BiH. The phytochemical profile is determined through the chemical composition of isolated essential oils, water and methanolic extracts. Essential oils analyses were performed by GC/MS, while extracts analyses were performed by HPLC/DAD. The *M. pulegium* and *T. montanum* essential oils, compared to the oils of the same plants from other regions, show a similar chemical composition with the difference in the proportion of the main components, while the *S. subspicata* and *C. vulgare* essential oils show greater variability in chemical composition and content. Water and methanol extracts are characterized by the high phenol and flavonoid content, with rosemary acid as the major compound, except for *T. montanum* extracts, where the dominant component is *p*-coumaric acid. Essential oils show low antioxidative potential and moderate inhibitory potential on AChE and BChE. Tested extracts show a good antioxidant potential. Water extracts show very good, while methanolic extracts show good potential in lipid protection against oxidation. In the sense of protein protection against oxidation, all extracts show prooxidant activity. The tested extracts show low inhibitory potential on AChE. Only the *S. subspicata* methanolic extract and the *M. pulegium* and *T. montanum* water extracts show the low inhibitory potential on BChE.

Key words: essential oil, water and metanolic extracts, GC/MS, HPLC/DAD, biological activity, Lamiaceae.

Sadržaj

1. Uvod **1**
2. Opći dio **4**
2.1. Ispitivane biljke iz porodice Lamiaceae (Labiatae) 5
2.1.1. Značaj ispitivanih biljaka u tradicionalnoj medicini 8
2.2. Sekundarni metaboliti 10
2.2.1. Eterična ulja 12
2.2.1.1. Terpeni 13
2.2.1.2. Fenoli 18
2.2.2. Biosinteza sekundarnih metabolita 25
2.2.2.1. Biosinteza terpena 25
2.2.2.2. Biosinteza fenolnih spojeva 29
2.3. Antioksidacija 34
2.3.1. Slobodni radikali 34
2.3.2. Antioksidacijska obrana 37
2.3.3. Antioksidansi 41
2.3.4. Oksidacijski stres 43
2.3.5. Oksidacija i hrana 44
2.3.5.1. Oksidacija lipida u hrani 44
2.3.6. Antioksidacijski učinak eteričnih ulja i ekstrakata 47
2.4. Neurotransmiter acetilkolin i kolinesteraze - struktura i mehanizam djelovanja ... 50
2.4.1. Inhibitori kolinesteraza 55
2.4.1.1. Fitokemikalije kao inhibitori kolinesteraza 56
2.5. Tehnike određivanja kemijskog sastava eteričnih ulja i ekstrakata 58
2.5.1. Vezni sustav plinski kromatograf - maseni spektrometar (GC/MS) 58
2.5.2. Visokoučinska tekućinska kromatografija (HPLC) 61
2.5.3. UV/VIS spektroskopija 64
2.5.3.1. Određivanja ukupnih fenola i flavonoida 66
2.6. Metode određivanja biološke aktivnosti eteričnih ulja i ekstrakata 67
2.6.1. Određivanje antioksidacijskog potencijala eteričnih ulja i ekstrakata 67
2.6.1.1. Metoda testiranja redukcijskog potencijala 68
2.6.1.2. Metoda testiranja sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala 69
2.6.1.3. Metoda zaštite lipida od oksidacije 69
2.6.1.4. Metoda zaštite proteina od oksidacije 70
2.6.2. Metoda određivanja inhibicije enzima kolinesteraza 71
2.7. Pregled literature na temu dosadašnjih istraživanja 72
3. Metodika **76**
3.1. Kemikalije 77
3.2. Biljni materijal 78
3.3. Metoda izolacije hlapljivih spojeva iz biljnog materijala 79
3.4. Metode pripreme vodenih i metanolnih ekstrakata 80
3.4.1. Vodeni ekstrakti - infuzije 80
3.4.2. Metanolni ekstrakti 81
3.5. Metoda analize hlapljivih spojeva iz eteričnih ulja vezanim sustavom plinska kromatografija - masena spektrometrija 81
3.6. Metoda analize fenolnih komponenti u ekstraktima veznim sustavom visokoučinska tekućinska kromatografija - detektor s nizom dioda 82
3.7. Metoda određivanje sadržaja ukupnih fenolnih komponenti 84
3.8. Metoda dređivanje sadržaja ukupnih flavonoida 86
3.9. Metode testiranja biološkog potencijala hlapljivih i nehlapljivih spojeva 87
3.9.1. Metode testiranja antioksidacijskog potencijala eteričnih ulja i ekstrakata .. 87
3.9.1.1. FRAP metoda 87
3.9.1.2. DPPH metoda 89
3.9.1.3. Ukupni antioksidacijski indeks 89

3.9.1.4. Metoda testiranja sposobnosti zaštite lipida od oksidacije..... 90
3.9.1.5. Metoda testiranja sposobnosti zaštite proteina od oksidacije..... 90
3.9.2. Metoda određivanja sposobnosti inhibicije enzima kolinesteraza..... 91
3.10. Statistička obrada podataka..... 92
4. Rezultati i rasprava..... **94**
4.1. Fitokemijski profil ispitivanih biljnih vrsta..... 95
4.1.1. Kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva eteričnih ulja..... 95
4.1.2. Kemijski sastav i sadržaj nehlapljivih spojeva vodenih i metanolnih ekstrakata..... 106
4.1.2.1. Udio ekstrakta u biljnom materijalu testiranih biljnih vrsta..... 106
4.1.2.2. Sadržaj ukupnih fenola vodenih i metanolnih ekstrakata testiranih biljnih vrsta..... 108
4.1.2.3. Sadržaj ukupnih flavonoida vodenih i metanolnih ekstrakata testiranih biljnih vrsta..... 111
4.1.2.4. HPLC/DAD analiza vodenih i metanolnih ekstrakata testiranih biljaka..... 113
4.2. Biološki potencijal eteričnih ulja te vodenih i metanolnih ekstrakata ispitivanih biljnih vrsta..... 124
4.2.1. Antioksidacijski potencijal eteričnih ulja te vodenih i metanolnih ekstrakata..... 124
4.2.1.1. Ukupni antioksidacijski indeks..... 130
4.2.2. Antioksidacijski potencijal vodenih i metanolnih ekstrakata u pogledu zaštite lipida i proteina od oksidacije..... 131
4.2.2.1. Zaštita lipida od oksidacije..... 131
4.2.2.2. Zaštita proteina od oksidacije..... 134
4.2.3. Inhibicija enzima kolinesteraza eteričnim uljima i ekstraktima odabranih biljnih vrsta..... 138
4.3. Rezultati analize glavnih komponenti..... 148
4.3.1. Rezultati analize glavnih komponenti za eterična ulja..... 148
4.3.2. Rezultati analize glavnih komponenti za vodene i metanolne ekstrakte... 151
5. Zaključak..... **154**
6. Literatura..... **160**
7. Prilog..... **169**
8. Kratice..... **191**
Životopis..... **194**

1. UVOD

Potencijali bioloških resursa se i danas intenzivno istražuju za dobrobit čovječanstva te za poboljšanje kvaliteta života ljudi na održiv način. Ova istraživanja, engl. „*bioprospecting*“, podrazumijevaju potragu za vrijednim spojevima u prirodi. Tako samonikle biljke, koje se tradicionalno koriste u liječenju i prehrani ljudi, kao i njihovi sekundarni metaboliti, bivaju predmet proučavanja. One predstavljaju potencijalne izvore novih i efikasnih terapeutskih agenasa.[1]

Sekundarni biljni metaboliti imaju važnu ulogu u razvoju biljaka, a posebno u njihovoj prilagodbi i preživljavanju u nepovoljnim uvjetima. Budući da imaju blagotvoran učinak na zdravlje ljudi, često ih se naziva i bioaktivnim spojevima, fitokemikalijama i nutraceuticima. Do sada ih je otkriveno oko 100.000, a ta brojka gotovo svakodnevno raste. Fenoli dokazano imaju značajnu ulogu u borbi protiv kroničnih bolesti ljudi. Brojni terpeni također pokazuju biološku aktivnost i koriste se u prevenciji i tretmanu raznih patoloških stanja. Iz tog razloga ovi spojevi bivaju tim zanimljiviji i značajniji.[1]

Oksidacijski stres je povezan s etiologijom i patogenezom brojnih bolesti, pa se smatra da je uklanjanjem uzroka oksidacijskog stresa moguće prevenirati ili odgoditi pojavu patoloških promjena i reducirati pojavu bolesti. Prirodni antioksidansi pojedinačno ili u sastavu ekstrakata, mogu biti korisni u terapiji takvih bolesti, što je ujedno razlog velikog interesa za istraživanje antioksidacijske aktivnosti aromatičnih, ljekovitih i jestivih biljaka.[2]

Oksidacija lipidnih molekula predstavlja veliki problem prehrambene industrije, jer dovodi do promjene oragnoleptičkih svojstava hrane, do smanjenja njene nutritivne vrijednosti, kao i tvorbe reaktivnih spojeva koji mogu ugroziti zdravlje potrošača. Kako korištenje nekih antioksidansa sintetskog podrijetla ima negativne efekte po zdravlje ljudi, postoji tendencija njihove zamjene netoksičnim antioksidansima prirodna podrijetla.[3]

Ključni enzim u hidrolizi acetilkolina je acetilkolinesteraza (AChE), pa je njena inhibicija jedna od strategija u tretmanu Alzheimerove bolesti i drugih sličnih poremećaja. Potencijalnim izvorima inhibitora smatraju se biljke, pa su brojne od njih, kao i različite fitokemikalije, predmet velikog broja istraživanja.[4]

U usporedbi s zemljama Centralne i Zapadne Europe, tradicionalna medicina Bosne i Hercegovine je većinom neistražena.[5] Uvidom u postojeće sistematske

studije,[5,6] izdvojene su karakteristične i nedovoljno istražene ljekovite biljne vrste, među kojima i jedna endemska: *Mentha pulegium* L., *Teucrium montanum* L., *Satureja subspicata* L. i *Clinopodium vulgare* L. Postoje određena istraživanja u pogledu biološke aktivnosti i sastava fitokemikalija ovih biljaka, ali ne i/ili nedovoljno za one sa područja BiH. Uvidom u postojeću dostupnu literaturu, ispitivanje eteričnih ulja i ekstrakata sve četiri biljke prvo je takve vrste za navedene biljne vrste s područja Bosne i Hercegovine, osim za eterično ulje *S. subspicata* s područja BiH, za koje postoji jedna prethodno objavljena studija.[7]

Cilj ovoga doktorskog rada jest:

- odrediti sastav hlapljivih komponenti izoliranih ekstrakata odabranih biljnih vrsta, korištenjem vezanog sustava plinski kromatograf - maseni spektrometar,
- odrediti sastav nehlapljivih komponenti izoliranih ekstrakata odabranih biljnih vrsta, spektrofotometrijski i vezanim sustavom visokoučinska tekućinska kromatografija - detektor s nizom dioda,
- odrediti antioksidacijski potencijal hlapljivih i nehlapljivih spojeva odabranih biljnih vrsta,
- odrediti inhibicijski potencijal hlapljivih i nehlapljivih spojeva odabranih biljnih vrsta na enzime acetilkolinesterazu i butirilkolinesterazu.

U ovom doktorskom radu ispitivan je kemijski sastav eteričnih ulja te vodenih i metanolnih ekstrakata. Također je testiran antioksidacijski potencijal eteričnih ulja i ekstrakata, kao i sposobnost inhibicije enzima kolinesteraza.

Kemijski sastav eteričnih ulja ispitan je pomoću spregnute tehnike plinska kromatografija - spektrometrija masa (GC/MS), dok je kemijski sastav vodenih i metanolnih ekstrakata ispitan spregnutom tehnikom visokoučinska tekućinska kromatografija - detektor s nizom dioda (HPLC/DAD). Antioksidacijski potencijal je testiran standardnim metodama DPPH i FRAP,[8,9] dok su odabrani uzorci dodatno testirani u smislu zaštite lipida i proteina od oksidacije.[10,11,12] Inhibicija enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze ispitana je metodom po Ellmanu.[13]

2. OPĆI DIO

2.1. Ispitivane biljke iz porodice Lamiaceae (Labiatae)

Lamiaceae (Labiatae, usnače) je porodica biljaka cvjetnica. Pripada redu Lamiales s unakrsno-nasuprotnim listovima. Kozmopolitski je distribuirana. Porodica obuhvaća 236 rodova i 6.900 do 7.200 vrsta. Najbrojniji rodovi su *Salvia* (900), *Scutellaria* (360), *Stachys* (300), *Plectranthus* (300), *Hyptis* (280), *Teucrium* (250), *Vitex* (250), *Thymus* (220) i *Nepeta* (200).[14]

Lamiaceae imaju vrat usađen duboko između plodnih listova. Ova bogata porodica obuhvaća polugrmove, trajnice ili zeleni s četverobridastom stabljikom, s nasuprotnim listovima i aromatskim mirisom. Dorziventralni cvjetovi su skupljeni u guste, dihazijalne i monohazijalne „prividne pršljene“, smještene u pazušcu brakteja. Sulapna, često dvousnata čaška obavija vjenčić s dugom cijevi i gornjom i donjom usnom. Prva se sastoji od 2 srasle latice, a druga trodjelna od 3. Od 4 prašnika 2 i 2 su nejednake dužine. Bogate su eteričnim uljima, pa se brojne od njih koriste kao začini i ljekovite biljke. Lako se uzgajaju, pa su mnoge biljke iz ove porodice kultivirane.[15] U ovom doktorskom radu ispitivane su četiri biljne vrste iz porodice Lamiaceae; *Mentha pulegium* L., *Teucrium montanum* L., *Satureja subspicata* L. i *Clinopodium vulgare* L.



Slika 2.1. *Mentha pulegium* L. (mirisna metvica)

Mentha pulegium L. (mirisna metvica) je višegodišnja biljka iz porodice Lamiaceae, visine od 40 do 60 cm (**slika 2.1.**). Listovi su jajasti ili izduženo eliptični, prekriveni sitnim dlačicama. Cvjetovi su brojni, skupljeni u okruglaste pršljenove promjera od 1 do 2 cm, koji su smješteni u pazušcima listova. Biljka je zastupljena na području Europe i Mediterana. Naseljava vlažne livade sa pjeskovitim tlom. Cvjeta od lipnja do rujna.[16]



Slika 2.2. *Teucrium montanum* L. (trava iva)

Teucrium montanum L. (trava iva, dubčac mali) je grm visine od 5 do 25 cm (**slika 2.2.**). Naseljava mediteranske i submediteranske pašnjake, mediteransko-montane pašnjake i subalpinske rudine na krešnjacima. Može se naći na području Europe i Male Azije. Cvjeta od lipnja do kolovoza.[17]



Slika 2.3. *Satureja subspicata L.* (klasoliki vrisak)

Satureja subspicata L. (klasoliki vrisak) je grm visine od 8 do 20 cm (**slika 2.3.**). Stabljike su četverobride i glatke, dok su listovi kožasti i žljezdasto točkasti. Cvjetovi su po 2 do 5 složeni u dihazije, obrazujući rahle prividne klasove. Čaška je široko zvonasta, u prosjeku duga 4 do 5 mm, posuta je brojnim uljnim žlijezdama. Biljka cvjeta od kolovoza do listopada. Zastupljena je u višim položajima Dinarskog krša, gdje se javlja na izloženim grebenima ili vrhovima. Naseljava vjetru izložena mjesta, na plitkim humoznim rendzinama, na krečnjaku i dolomitu, od 200 do 800 m nadmorske visine.[18]

Clinopodium vulgare L. (čepac, talac) je biljka visine od 25 do 60 cm (**slika 2.4.**). Naseljava rubove šuma, šikare, od nizine do subalpinskog vegetacijskog pojasa. Može se naći na područjima Europe, sjeverozapadne Azije, sjeverne Afrike i Amerike. Cvjeta u periodu od lipnja do listopada.[17]



Slika 2.4. *Clinopodium vulgare* L. (čepić)

2.1.1. Značaj ispitivanih biljaka u tradicionalnoj medicini

Usporedbom rezultata istraživanja biljnih vrsta, koje se upotrebljavaju u tradicionalnoj medicini BiH, sa biljnim vrstama koje se upotrebljavaju u tradicionalnoj medicini drugih regija, izdvojene su spomenute četiri biljne vrste iz porodice Lamiaceae, kao karakteristične i nedovoljno istražene.

U okviru tradicionalne medicine BiH, jedna od najefikasnijih biljaka u tretmanu bolesti poremećaja nervnog sustava je *Mentha pulegium*. Prema vjerovanju lokalnog stanovništva *Teucrium montanum* „liječi svaku bolest“, dok se *Satureja subspicata* koristi u liječenju leukemije, anemije i drugih bolesti.[6] *Clinopodium vulgare* se koristi u liječenju poremećaja probave.[5]

Biljke iz porodice Lamiaceae pokazuju brojne biološke aktivnosti; antimikrobnu, antiinflamatornu, antioksidacijsku, antiviralnu, citotoksičnu i neuroprotektivnu aktivnost. Djeluju na zacjeljivanje rana, kao i na inhibiciju enzima AChE.[19]

Na području Irana i Španije *M. pulegium* se tradicionalno koristi u tretmanu prehlade, upale sinusa, kolere, trovanja hranom, bronhitisa i tuberkuloze,[20,21] dok se na području Alžira koristi u tretmanu dispepsije i probavnih grčeva, zahvaljujući svom karminativnom i antispazmolitičkom djelovanju. Ova svojstva se pripisuju monoterpenima prisutnima u eteričnom ulju, kao i derivatima polifenola.[22] *M. pulegium* stimulira probavne sokove, pomaže kod nadutosti i grčeva. Koristi se kod glavobolje te blažih respiratornih infekcija. Jak je stimulans za mišiće materice u poticanju menstruacije. Može se koristiti izvana za ublažavanje reumatskih tegoba, uključujući i giht.[23]

Rod *Teucrium* obuhvaća oko 200 biljnih vrsta zastupljenih diljem svijeta, posebno u regiji Mediterana, gdje je prisutno oko 140 vrsta. *Teucrium* vrste se stoljećima koriste u narodnoj medicini zbog holagogičkog, diuretičkog, antispasmolitičkog, antidijabetičkog, antireumatskog, protuupalnog, antiseptičkog, anthelmintičkog djelovanja. Koriste se protiv nadimanja, kao sredstva za aromatiziranje, kao antipiretici i stimulansi. Neke od *Teucrium* vrsta se koriste u tradicionalnoj medicini Hrvatske i Bosne i Hercegovine. *T montanum* pokazuje antibakterijsko, antifungalno, antiinflamatorno i antioksidacijsko djelovanje.[24] Koristi se u tretmanu bolesti jetre i želuca.[25]

Rod *Satureja* sadrži 30 biljnih vrsta zastupljenih u umjerenim klimatskim područjima, posebice na području istočnog Mediterana. Jedanaest vrsta se može naći u Europi. *Satureja* vrste su poznate kao aromatične i ljekovite. Mnoge od njih se koriste u industriji parfema i kozmetičkoj industriji, kao začinsko bilje te u tradicionalnoj medicini.[26] Nadzemni dijelovi *S. subspicata* se koriste u obliku infuzija u liječenju bolesti limfnog sustava, u tradicionalnoj medicini Bosne i Hercegovine. Biljka se koristi se i u liječenju bolesti dišnog sustava, kao i za poboljšanje opće krvne slike. Med od *S. subspicata* L. se koristi u liječenju srčanih tegoba.[26]

Infuzije *C. vulgare* se u tradicionalnoj medicini Bugarske koriste za liječenje želučanih čireva, dijabetesa i karcinoma.[23] Na području Bugarske listovi i cvjetovi *C. vulgare* se koriste kao imunostimulanti, kardiotonici te za liječenje virusnih bolesti kože.[27]

2.2. Sekundarni metaboliti

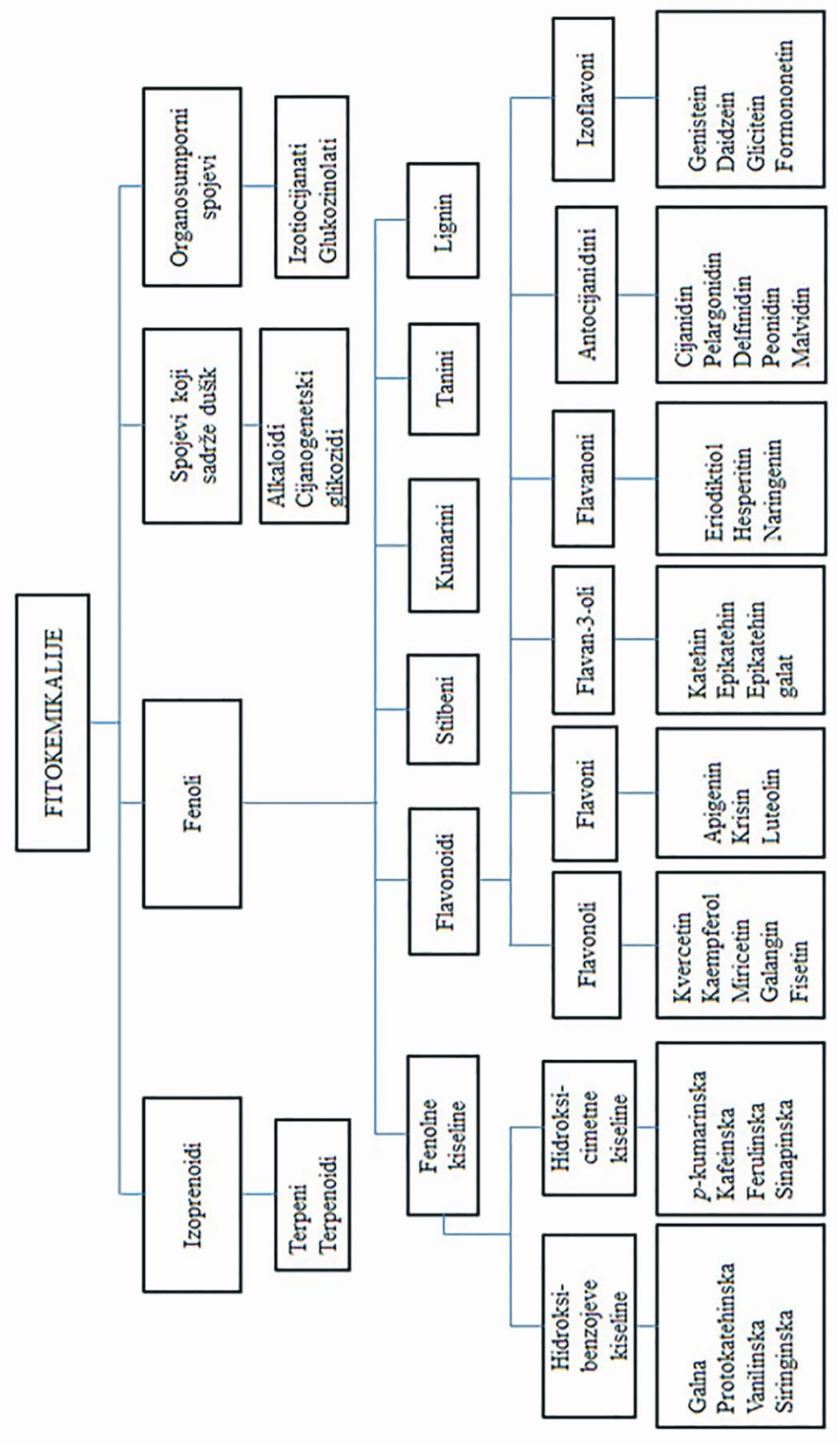
Biljke sintetiziraju brojne organske spojeve, koji se tradicionalno klasificiraju kao primarni i sekundarni metaboliti. Primarni metaboliti su spojevi koji sudjeluju u procesima fotosinteze, disanja, rasta i razvoja. To su: fitosteroli, lipidi, nukleotidi, aminokiseline i organske kiseline. Ostale fitokemikalije, od kojih se mnoge mogu naći u visokim koncentracijama kod nekih biljnih vrsta, su sekundarni metaboliti. Strukturno su raznoliki. Neki od njih su karakteristični za određene biljne vrste, pa se koriste u kemotaksonomskim studijama.[28]

Njihova funkcija u biljkama je predmet proučavanja, budući da se pretpostavlja da imaju ključnu ulogu u zaštiti biljke od biljojeda i mikrobnih infekcija, privlače oprašivače i životinje koje raznose sjemenke, djeluju kao alelopatska sredstva, pružaju zaštitu od UV zračenja, djeluju kao signalne molekule u formiranju nitrofiksirajućih kvržica na korijenu leguminoza, djeluju kao sastavnice podupirućih i zaštitnih tkiva, obrambeni su signali i signalne molekule u interakciji biljke s okolinom.[28]

Sekundarni metaboliti su također interesantni zbog njihove uporabe kao boja, vlakana, ljepila, ulja, voskova, sredstva za okus, lijekova i parfema. Predstavljaju potencijalne izvore novih prirodnih lijekova, antibiotika, insekticida i herbicida.[29]

Posljednjih nekoliko decenija je proučavanje zaštitne uloge pojedinih sekundarnih metabolita postalo jedno od važnijih područja u istraživanju prehrane ljudi, kako zbog zdravstvenog, tako i zbog komercijalnog interesa. Za razliku od vitamina, oni nisu esencijalni za kratkoročno zdravstveno blagostanje, ali raste broj dokaza, koji upućuju na to da njihov dugoročan unos u manjim količinama može imati povoljan utjecaj na smanjenje incidencije raka i mnogih kroničnih bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti i dijabetes tipa II, koji su sve učestaliji u populaciji zemalja zapada. Zbog njihovog blagotvornog učinka na zdravlje ljudi, često ih se naziva bioaktivnim komponentama, fitokemikalijama i nutraceuticima. Do sada je otkriveno više od 100 000 različitih bioaktivnih spojeva.[1]

S obzirom na njihovo biosintetsko podrijetlo, biljni sekundarni metaboliti se mogu podijeliti u tri glavne skupine: 1. flavonoidi i srodni fenolni i polifenolni spojevi, 2. terpenoidi te 3. spojevi koji sadrže dušik - alkaloidi i spojevi koji sadrže sumpor (**slika 2.5.**).[28]



Slika 2.5. Sekundarni biljni metaboliti[28,30]

2.2.1. Eterična ulja

Eterična ulja su smjese prirodnih, hlapljivih spojeva jakog mirisa; sekundarni biljni metaboliti. Obično se iz biljaka dobivaju destilacijom vodom ili vodenom parom. Budući da su dobro poznata zbog svojih medicinskih svojstava i mirisa, imaju široku primjenu. Koriste se pri konzerviranju hrane te kao antimikrobni, analgetski, sedativni, protuupalni, spazmolitički lijekovi i lokalni anestetici.

U prirodi imaju važnu ulogu u zaštiti biljaka od bakterija, virusa i gljivica. Djeluju odbojno na herbivore i nepoželjne insekte, a privlače insekte polinatore. Ona su tekuća, hlapljiva, prozirna i rijetko obojena. Topljiva su u mastima i organskim otapalima, najčešće su manje gustoće od vode. Mogu se sintetizirati u svim biljnim organima; pupoljcima, cvjetovima, listovima, stabljikama, granama, sjemenkama, plodovima, korijenu, drvetu ili kori te se pohranjuju u sekrecijskim stanicama, šupljinama, kanalima, epidermalnim stanicama ili glandularnim trihomama. Zbog njihovih baktericidnih i fungicidnih svojstava, farmaceutskih i prehrambenih karakteristika, sve češće se koriste kao alternativa sintetskim spojevima, kako bi se zaštitila ekološka ravnoteža.

Više je načina ekstrakcije eteričnih ulja, što ovisi o njihovoj namjeni. Pored destilacije vodom i vodenom parom, za ekstrakciju se koriste različita otapala, kombinacija vode i otapala, tekući ugljikov(IV) oksid i mikrovalovi. Na kemijski sastav i sadržaj eteričnog ulja, osim načina ekstrakcije, utječu i klimatski uvjeti, sastav tla, korišteni biljni organ, starost i vegetativni stadij biljke.

Trenutno je poznato oko 3000 različitih eteričnih ulja, od kojih 300 ima posebnu komercijalnu vrijednost zbog njihove uporabe u farmaceutskoj, prehrambenoj, poljoprivrednoj i kozmetičkoj industriji. I pored njihove široke uporabe, potrebno je bolje razumijevanje njihove biološke aktivnosti, kako bi se dodatno razvila njihova primjena. Neka od njih predstavljaju ili mogu predstavljati alternativu ili dodatak sintetskim spojevima, bez popratnih neželjenih efekata.

Eterična ulja su kopleksne smjese, koje često sadrže veliki broj komponenti u različitim koncentracijama. Karakteriziraju ih dvije do tri glavne komponente u dosta visokim koncentracijama (20-70%), dok su ostale komponente prisutne u tragovima. Ove dominantne komponente često određuju biološka svojstva ulja, dok je ponekad za

biološki učinak odgovorna jedna ili više komponenti ulja zastupljenih s minornim udjelom.

Spojevi prisutni u eteričnim uljima se mogu svrstati u dvije skupine s obzirom na njihovo biosintetsko podrijetlo. Prvu skupinu čine oksidirani i neoksidirani terpeni, a drugu aromatski i alifatski spojevi male molekulske mase. Biosintetski putevi terpena i aromatskih spojeva izvedenih iz fenilpropana su kod biljaka uglavnom odvojeni, iako kod nekih biljaka mogu biti prisutna oba s dominacijom jednog biosintetskog puta (npr. klinčić i komorač).[31]

Ostali spojevi, koji mogu biti prisutni u eteričnim uljima, su brojni hlapljivi lančasti ugljikovodici i njihovi oksidirani derivati te stearopteni, parafinu slični ugljikovodici s 15 do 30 ugljikovih atoma, koji stajanjem postupno kristaliziraju. U manjem broju eteričnih ulja prisutni su spojevi sa sumporom (crveni i bijeli luk), dušikom (derivati antranilne kiseline i indol u ulju cvijeta naranče i jasmina) te dušikom i sumporom (hren, gorušica, kupus, repa). Mnogi od ovih spojeva u biljnim tkivima nisu slobodni već su vezani u glikozide, pa je za njihovo oslobađanje potrebna hidroliza.[32]

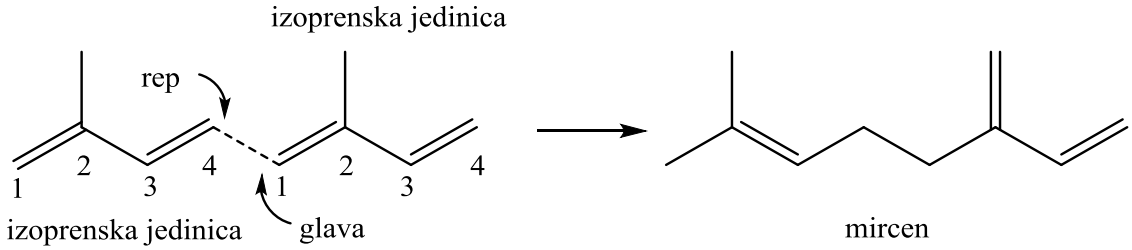
2.2.1.1. Terpeni

Terpeni su cijenjeni više od 2000 godina kao sastavnice eteričnih ulja i mirisa. Sačuvani su zapisi iz srednjeg vijeka o eteričnim uljima baziranim na terpenima. Početkom osamnaestog stoljeća započela je kemijska analiza eteričnih ulja. Danas je poznato je da su eterična ulja smjese velikog broja različitih kemijskih spojeva, od kojih je najviše terpena, oko 90%.

Naziv „terpen“ potječe od terpentina. Pored terpena u sastavu eteričnih ulja se nalaze i terpenoidi, koji za razliku od terpena sadrže i neki od heteroatoma u sastavu funkcionalnih skupina, najčešće kisik. Zbog tog razloga se u novijoj literaturi za ovu skupinu spojeva koristi termin terpenoidi umjesto terpeni.[32]

I najjednostavniji terpeni su strukturno značajno različiti. Unatoč njihovoj raznovrsnosti, terpeni imaju jedinstvenu značajku, na osnovu koje se definiraju i na osnovu koje se mogu klasificirati. To se odnosi na pravilo izoprena, koje je ustanovio Otto Wallach 1887. godine. Ovo pravilo opisuje sve terpene, kod kojih se u osnovi ponavlja „izoprenska jedinica“.

Izopren sadrži pet ugljikovih atoma, a kemijski je poznat kao 2-metil-1,3-butadien. Prema izoprenskom pravilu Leopolda Ružičke, terpeni nastaju povezivanjem izoprenskih jedinica, mehanizmom „glava na rep“ (**slika 2.6.**).[33]



Slika 2.6. Mehanizam povezivanja izoprenskih jedinica kod nastanka monoterpena mircena

Povezivanjem „glava na rep“ nastaju pravilni terpeni, koji su najčešći u prirodi. Manje zastupljeni, nepravilni terpeni, nastaju mehanizmom povezivanja „glava na glavu“ ili „glava na sredinu“, kao i pregradnjom pravilnih terpena.

S obzirom na pravilo izoprena, terpeni se mogu definirati kao jedinstvena skupina ugljikovodikovih prirodnih produkata, koji imaju strukturu, koja se hipotetski može izvesti iz izoprena, $(C_5H_8)_n$.[33] Ovisno o broju izoprenskih jedinica u strukturi terpeni se dijele na: hemiterpene (C_5), monoterpene (C_{10}), seskviterpene (C_{15}), diterpene (C_{20}), sesterpene (C_{25}), triterpene (C_{30}), tetraterpene (C_{40}) i politerpene (> C_{40}).

Kao kod svih prirodnih spojeva, ova jednostavna klasifikacija obuhvaća ogroman broj strukturnih različitosti, koji vodi velikoj raznovrsnosti terpenima srodnih ili terpenoidnih spojeva, kojih je do sada identificirano oko 30 000.

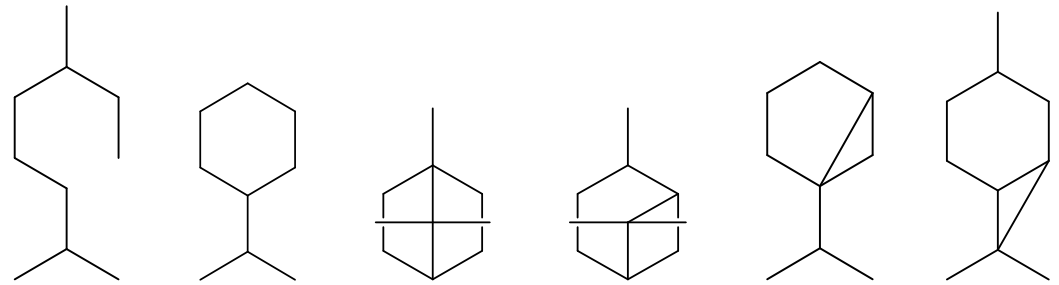
Terpeni mogu biti aciklički ili ciklički. Ciklički spojevi mogu biti mono-, bi- ili triciklički s prstenovima različitih opsega, pri čemu su najčešći šesteročlani. Do danas je poznato dvadesetak monoterpenskih i preko stotinu seskviterpenskih skeleta. Pojedini skeleti mogu imati i dvostruke veze i različite funkcionalne skupine, pa se pored ugljikovodika javljaju i alkoholi, eteri, oksidi, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline i esteri.[32]

Niži terpeni, monoterpeni i seskviterpeni, su hlapljivi spojevi i karakteristični sastojci eteričnih ulja. Iako se terpeni uglavnom dobivaju iz eteričnih ulja, neki od njih

se sintetiziraju i u stanicama životinja. Kod nekih vrsta životinja oni se mogu naći kao primjese u uljima i voskovima. Općenito se smatra da biljni terpeni imaju ekološku i fiziološku funkciju. Mnogi od njih inhibiraju rast kompeticijskih biljaka (alelopatija). Za neke od terpena se zna da su insekticidni, dok drugi privlače insekte polinatore. Svake godine se otkriju nove strukture terpena. Terpenoidi su pronađeni u svim dijelovima viših biljaka, a nalaze se i u mahovinama, algama i lišajevima. Pronađeni su i terpeni porijeklom od insekata i mikroorganizama.[33]

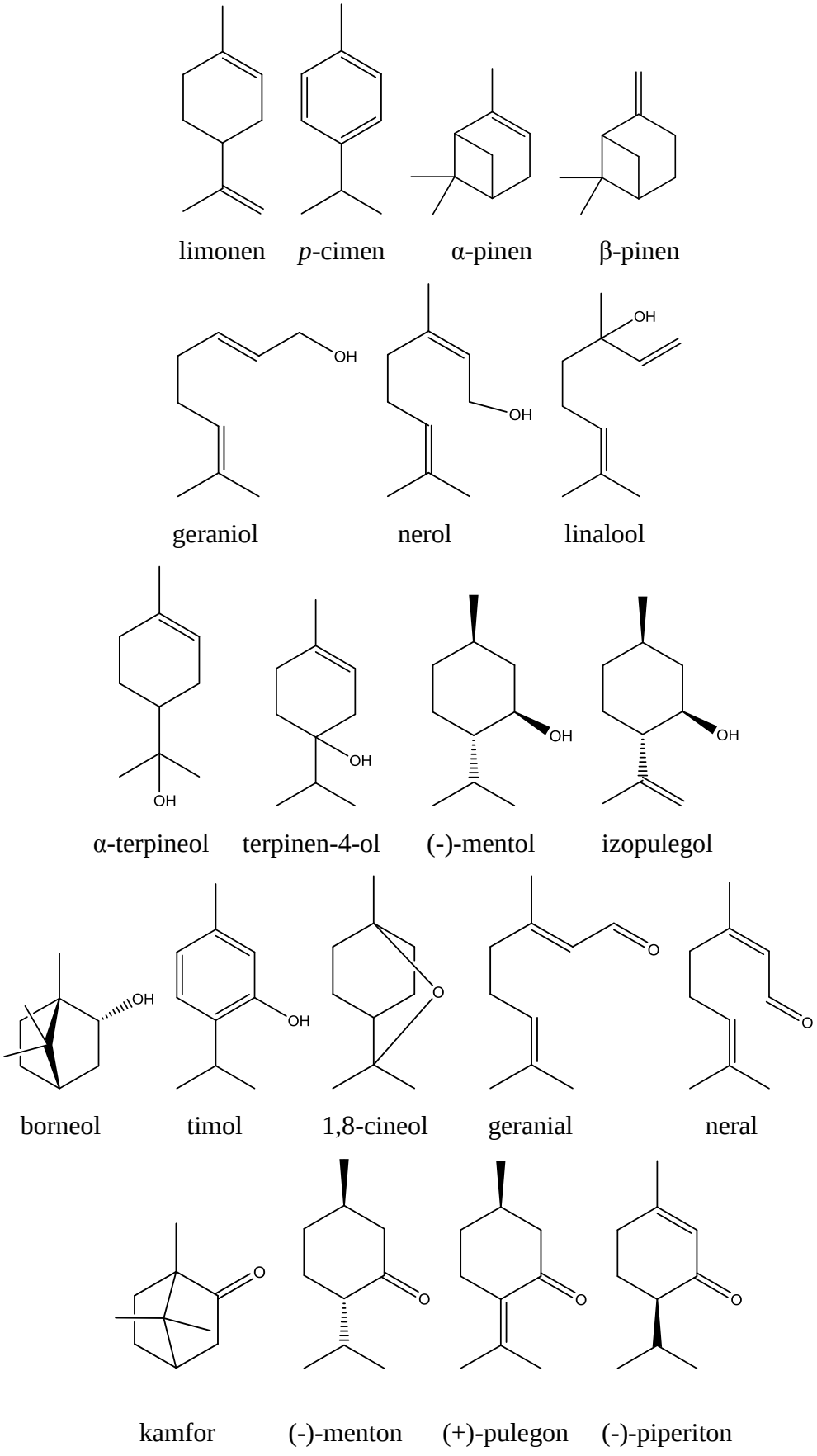
Monoterpeni

U prirodi postoje brojni dekani bazirani na izoprenu. Kao glavne sastavnice eteričnih ulja, imaju ekonomsku važnost zbog uporabe kao komponenata aroma i parfema te primjene u medicini. Osnovni tipovi monoterpenskih skeleta su prikazani na **slici 2.7.**



Slika 2.7. Osnovni tipovi monoterpenskih skeleta

Najznačajniji predstavnici ove skupine terpenskih spojeva su aciklički: geraniol, nerol i linalool, monociklički: limonen, α-terpinen, γ-terpinen, terpinolen, α-terpineol, *p*-cimen, timol, karvakrol, terpinen-4-ol, mentol te biciklički: α-pinen, ß-pinen, borneol i kamfor. Na **slici 2.8.** su prikazani neki monoterpenski ugljikovodici, aciklički i ciklički alkoholi, eteri, aldehidi i ketoni.[32]



Slika 2.8. Neki monoterpeni

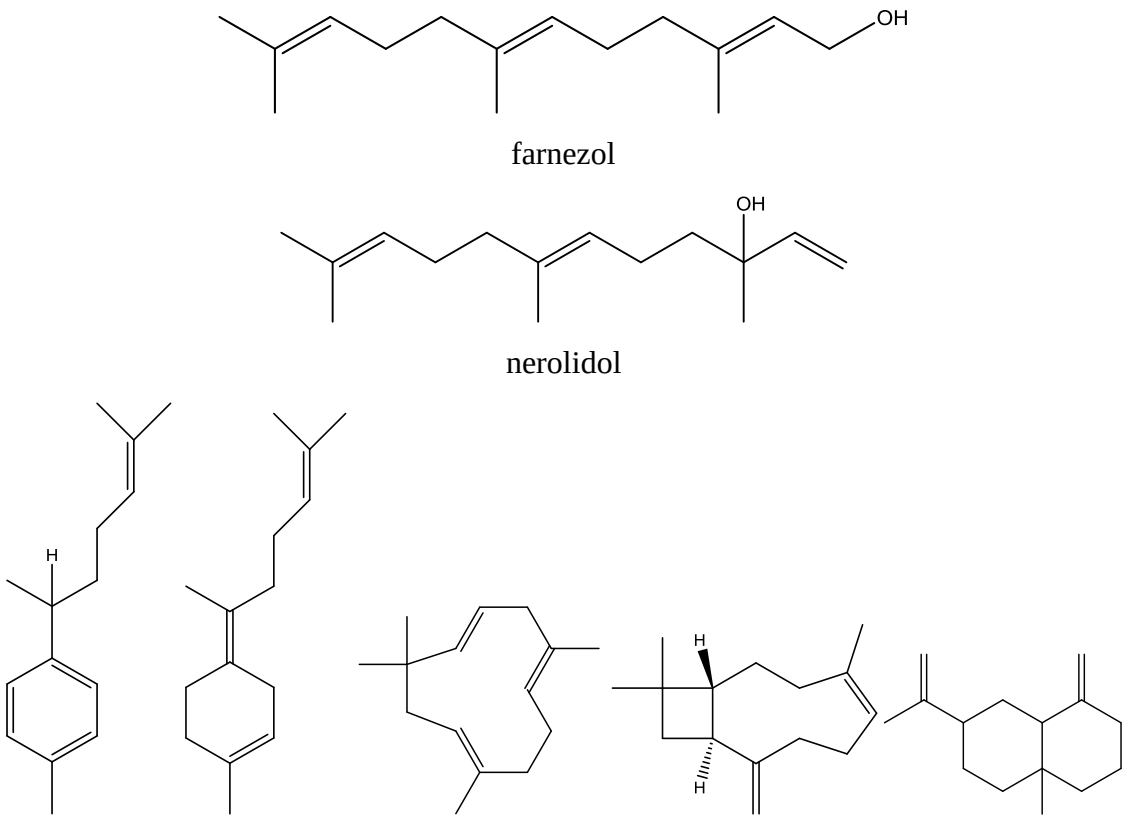
Geraniol se nalazi u različitim biljkama, posebno u eteričnom ulju ruže. Nerol također ima miris po ruži, a posebno je prisutan u cvijetu naranče i ciklame. Linalool je jedna od komponenti biljnog mirisa biljaka u cvatu, a koristi se kao komponenta arome brojnih čajeva. Timol i mentol pokazuju antiseptička svojstva. Mentol je uobičajena komponenta eteričnih ulja biljaka iz porodice Lamiaceae. Prirodni mentol je (-)-izomer i ima miris mente, dok njegov (+)-izomer ima miris plijesni. Limonen je najviše zastupljen u eteričnom ulju limuna, naranče i kima. Optički izomeri limonena se razlikuju po mirisu; (+)-limonen miriše na naranču, a (-)-limonen na limun. Pinen je sastojak mnogih terpentinskih ulja. U terpentinu drveta bora uglavnom se nalazi α-pinen, dok je β-pinen prisutan u manjoj količini. Toksični su za brojne insekte. Pretpostavlja se da α-pinen ima i značajnu ulogu u regulaciji aktivnosti bakterija, koje razgrađuju ugljikovodike u prirodi. Kamfor je glavna komponenta eteričnog ulja kamforovog drveta. Primjenjuje se u medicini, jer povisuje krvni tlak, čime se postiže dublje disanje. Također se koristi za dobivanje plastičnih masa.[34]

Seskviterpeni

Seskviterpeni su veoma raznolika skupina spojeva s više od stotinu različitih tipova skeleta. Dijele se na acikličke i cikličke (monicikličke, bicikličke, tricikličke) seskviterpene. U eteričnim uljima aromatičnih biljaka najčešće su prisutni aciklički: farnezol i nerolidol, monociklički: bisabolen, ar-kurkumen i humulen te biciklički: ß-selinen i ß-kariofilen (**slika 2.9.**).

α-Bisabolol je najjednostavniji ciklički seskviterpenski alkohol. Može se naći u eteričnom ulju kamilice, lavande i ružmarina. Poznat je po protuupalnom djelovanju, te doprinosi ukupnim ljekovitim svojstvima ulja kamilice. Farnezol je veoma rasprostranjen u eteričnim uljima cvjetova mnogih biljaka; đurđevka, lipe, ljiljana. Ima ugodan miris, pa se koristi u parfumeriji. U ispitivanjima je pokazao kemopreventivnu aktivnost. Proučavanjem sinteze farnezola i nerolidola, Lavoslav Ružička je došao do rezultata, koji se odnose na njihovu reaktivnost i transformaciju. Odredio je strukture i konfiguraciju većeg broja seskviterpena, kao što su: kadinen, eudezmol, elemol i santonin.[34] Ružička je ustanovio postojanje jedinstvenih prekursora u sintezi svake skupine terpena iz kojih se klasičnim reakcijama pregradnje i ciklizacije izvode poznati sastojci skupine. Ovo pravilo je poznato kao „biogenetsko izoprensko pravilo“. Ružička

je za svoj rad na polju istraživanja terpenskih spojeva dobio Nobelovu nagradu 1939. godine.[35]



Slika 2.9. Neki seskviterpeni

2.1.1.2. Fenoli

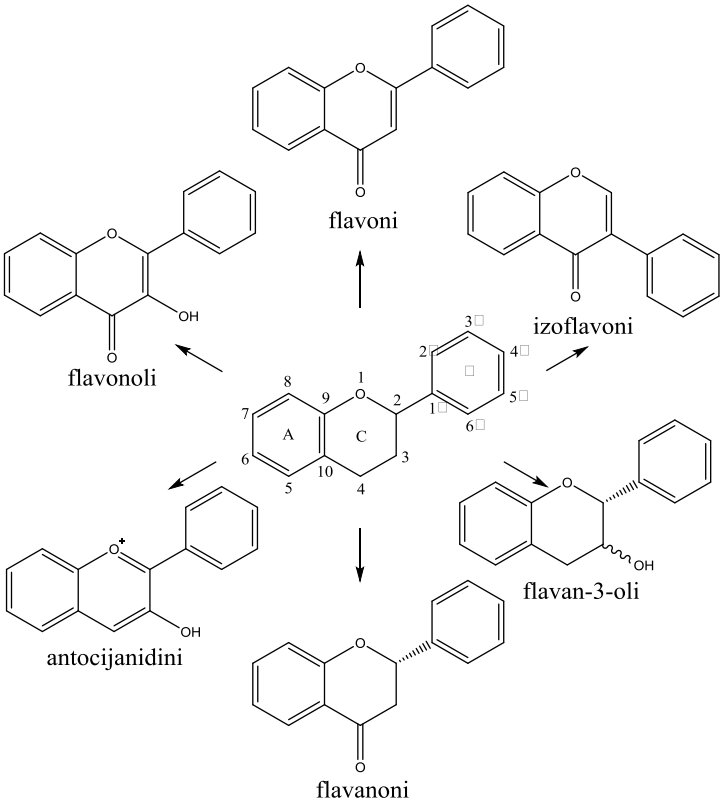
Strukturu fenola karakterizira postojanje najmanje jednog aromatskog prstena, s jednom ili više hidroksilnih skupina. Polifenoli imaju više od jedne polifenolne hidroksilne skupine vezane na jedan ili više benzenskih prstenova. Postoje izvješća o više od 8000 fenolnih struktura široko rasprostranjenih u biljnom carstvu.[36]

Fenolni spojevi obuhvaćaju jednostavne, niskomolekulske spojeve, spojeve s jednim aromatskim prstenom te velike i kompleksne tanine i polifenole. Oni se mogu klasificirati na temelju broja i rasporeda ugljikovih atoma. Najčešće su konjugirani sa šećerima i organskim kiselinama. Svrstavaju se u dvije skupine: flavonoidi i neflavonoidi.[28]

Flavonoidi

Flavonoidi su polifenolni spojevi koji sadrže petnaest atoma ugljika i grade dva aromatska prstena spojena tročlanim mostom (C_6-C_3-C_6). Najbrojnija su skupina fenola i široko su zastupljeni u biljnom carstvu. Do sad je identificirano oko 6000 flavonoida.[37] Prisutni su u visokim koncentracijama u epidermi lišća i egzokarpu voća i imaju važne i raznolike uloge kao sekundarni metaboliti. Kod biljaka su flavonoidi uključeni u različite procese kao što su: UV zaštita, pigmentacija, poticanje razvoja nitrogenfiksirajućih kvržica te otpornosti na bolesti.[36]

Glavne potklase flavonoida su: flavoni, flavonoli, flavan-3-oli, izoflavoni, flavanoni i antocijanidini (**slika 2.10.**).

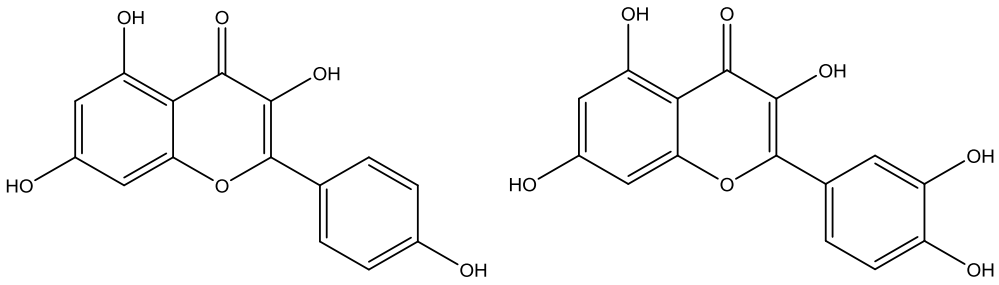


Slika 2.10. Osnovna struktura i glavne potklase flavonoida

Ostale potklase flavonoida, kvantitativno manje zastupljene kao komponente prehrane su: dihidroflavonoli, flavan-3,4-dioli, kumarini, halkoni, dihidrohalkoni i auroni. Osnovna struktura flavonoida može imati brojne supstituente. Hidroksilne skupine su obično prisutne na pozicijama 4′, 5 i 7. Česta komponenta su i šećeri, koji su kod većine flavonoida prisutni u formi glikozida. Dok šećeri i hidroksilne skupine

povećavaju topljivost flavonoida, drugi supstituenti, kao metil skupine i izopentenil jedinice, čine flavonoide lipofilnim.[28] U ovom doktorskom radu ispitivani su spojevi iz sljedećih potklasa flavonoida: flavonoli, flavoni i flavanoni.

Flavonoli su najvjerojatnije najrašireniji flavonoidi, prisutni kod biljaka, s izuzetkom gljiva i algi. Distribucija i strukturne varijacije flavonola su opsežne i dobro istražene. Flavonoli, kao što su miricetin, kvercetin, izorhamnetin i kempferol (**slika 2.11.**) se najčešće nalaze kao *O*-glikozidi. Konjugacija se najčešće javlja na prstenu C na položaju 3, ali se supstitucija može pojaviti i na 5, 7, 3′, 4′ i 5′ poziciji. Iako je broj aglikona ograničen, postoje brojni konjugati flavonola. Sam kempferol ima konjugate sa više od 200 različitih šećera.[36]

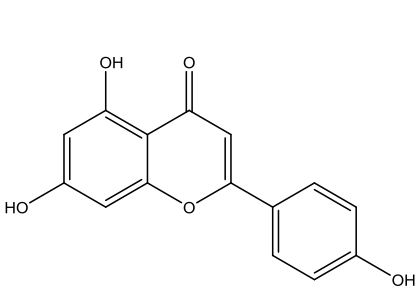


kempferol kvercetin

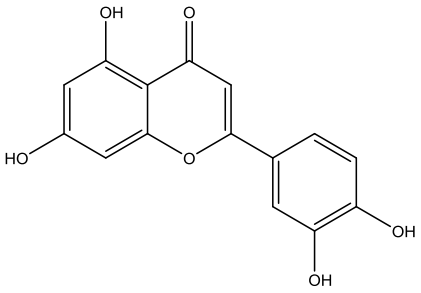
Slika 2.11. Flavonoli kempferol i kvercetin

Postoje podatci o razinama flavonola određenih u najčešće konzumiranom voću, povrću i piću. Pri tom su prisutne značajne razlike u naizgled sličnim proizvodima, vjerojatno uzrokovane sezonskim promjenama i razlikama u sorti. Procesi prerade također imaju utjecaj na razinu flavonola, ali su informacije o tome nedostatne.[28]

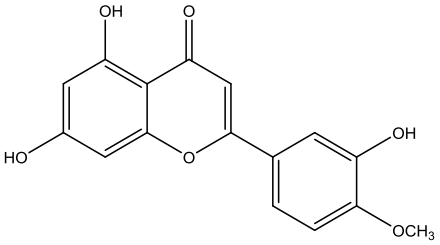
Flavoni su strukturno slični flavonolima. Iako flavoni, kao što su luteolin i apigenin (**slika 2.12.**), imaju supstituciju na prstenu A i C, nedostaje im hidroksilna skupina na C-3. Kod flavona je moguć širok spektar supstitucija, uključujući hidroksilaciju, metilaciju, *O* i *C*-alkilaciju i glikozilaciju. Mnogi flavoni se javljaju kao 7-*O*-glikozidi. Za razliku od flavonola, flavoni nisu široko zastupljeni; značajnije su prisutni u celeru, peršinu i još nekim biljkama. Polimetoksilirani flavoni, kao nobiletin i tangeretin, nađeni su u citrusnim vrstama.[36]



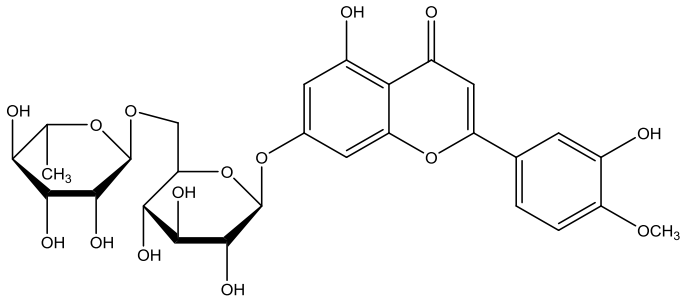
apigenin



luteolin



diozmetin

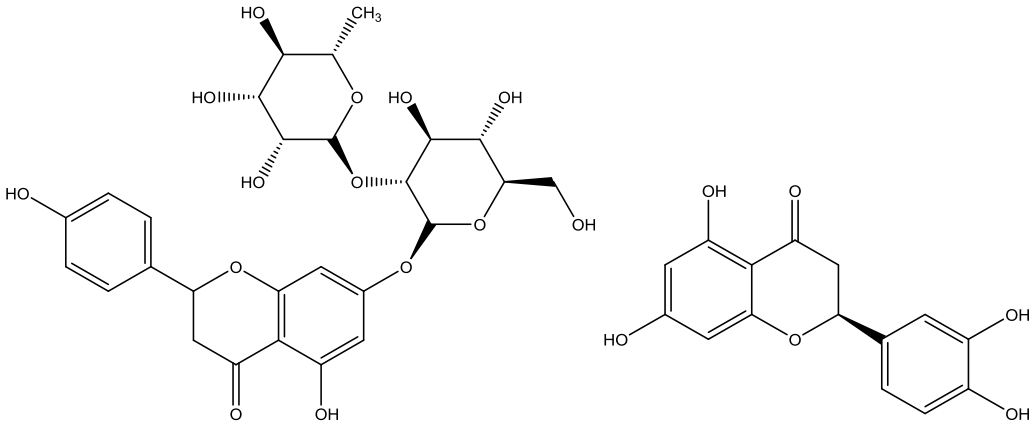


diozmin (diozmetin-7-*O*-rutinozid)

Slika 2.12. Flavoni apigenin, luteolin, diozmetin i 7-*O*-glikozid diozmin

Flavanone karakterizira odsutnost dvostruke veze i prisustvo kiralnog centra na C-2. U većini flavanona prisutnih u prirodi, C-prsten je vezan za B-prsten na C-2 u α-konfiguraciji. Struktura flavanona je veoma reaktivna i postoje izvještaji o reakcijama hidroksilacije, glikozilacije i *O*-metilacije.

Flavanoni su komponente hrane, prisutne u visokim koncentracijama u citrusima. Najzastupljeniji flavanon glikozid je hesperetin-7-*O*-neohesperidosid (neohesperidin) iz gorke naranče i naringenin-7-*O*-neohesperidozid (naringin) iz kore grejpfruta intenzivno gorkog okusa (**slika 2.13.**).[36]



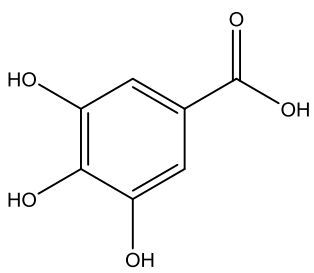
naringin eriodiktiol

Slika 2.13. Flavanoni naringin i eriodiktiol

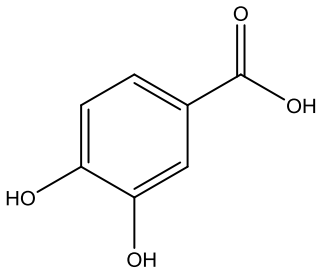
Neflavonoidi

Najznačajniji dijetalni neflavonoidi su C_6-C_1 fenolne kiseline (kao što je galna kiselina, koja je prekursor hidrolizabilnih tanina), C_6-C_3 hidroksicinamati i njihovi konjugirani derivati te polifenolni C_6-C_2-C_6 stilbeni.

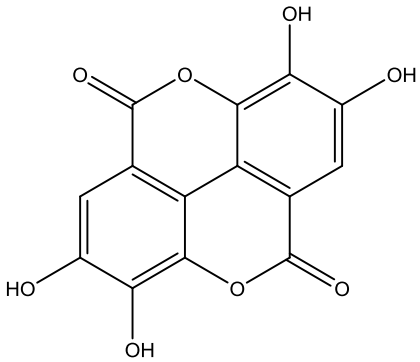
Fenolne kiseline su poznate kao hidroksibenzoati (C_6-C_1), s galnom kiselinom kao predstavnikom (**slika 2.14.**). Njeno ime potječe od francuske riječi „*galle*“, koja označava oteklinu u tkivu biljke koja nastaje nakon napada parazitskih insekata. Pored galne kiseline, u hidroksibenzojeve kiseline spadaju protokatehinska kiselina i *p*-hidroksibenzojeva kiselina. Galna kiselina je osnovna jedinica galotanina, dok su galna kiselina i heksahidroksidifenoil podjedinice elagitanina, hidrolizabilnih tanina.[33,36]



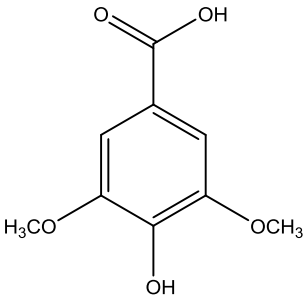
galna kiselina



protokatehinska kiselina



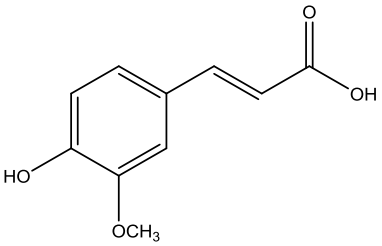
elaginska kiselina



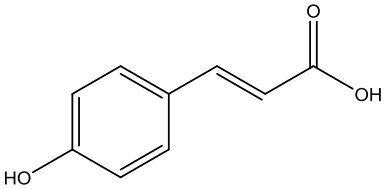
siringinska kiselina

Slika 2.14. Neke fenolne kiseline

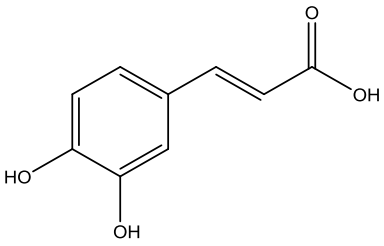
Hidroksicimetne kiseline - cimetna kiselina je C_6-C_3 spoj koji se ubraja u hidroksicinamate, produkte fenilpropanoidnog puta, pa se nazivaju i fenilpropanoidi. Najčešći hidroksicinamati su *p*-kumarinska, kafeinska kiselina i ferulinska kiselina (**slika 2.15.**) koje se često akumuliraju kao njihovi tartaratni esteri.



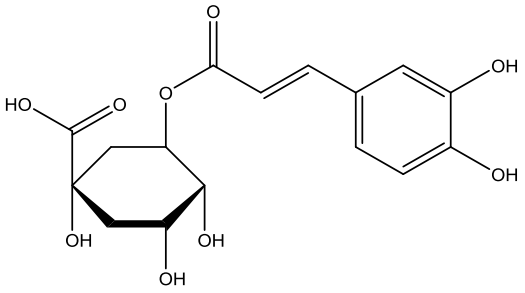
ferulinska kiselina



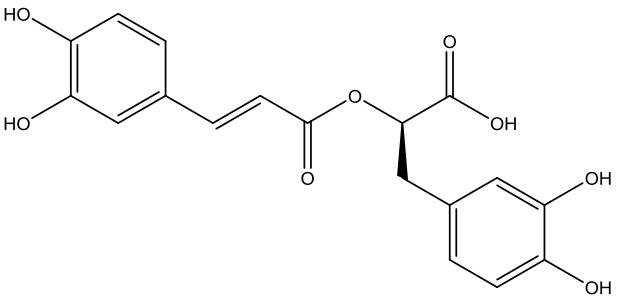
p-kumarinska kiselina



kafeinska kiselina



klorogenska kiselina



ružmarinska kiselina

Slika 2.15. Strukture nekoliko hidroksicimetnih kiselina

Kininski derivati kafeinske kiseline, kao npr. 3, 4 i 5-*O*-kafeoilkininska kiselina, česti su sastojci voća i povrća. Klorogenska kiselina čini oko 10% listova zelene mate (*Ilex paraguariensis* L.) i zelenih zrna kave robusta (obrađeno sjeme biljke *Coffea canephora* L.). Redovni konzumenti kave tako mogu imati dnevni unos u suvišku od 1 g.[28]

U ostale fenolne spojeve, koji nisu ispitivani u ovoj disertaciji, spadaju: **kumarini** (C_6-C_4) široko zastupljena porodica laktona, zvanih benzopiranoni, za koje je poznato da djeluju kao antimikrobni agensi, odvraćaju od hranjenja i inhibitori su klijanja; **stilbeni** (C_6-C_2-C_6) fitoaleksini, spojevi koje proizvode biljke kao odgovor na napad gljivičnih, bakterijskih i virusnih patogena; **tanini** (hidrolizabilni galotanini i

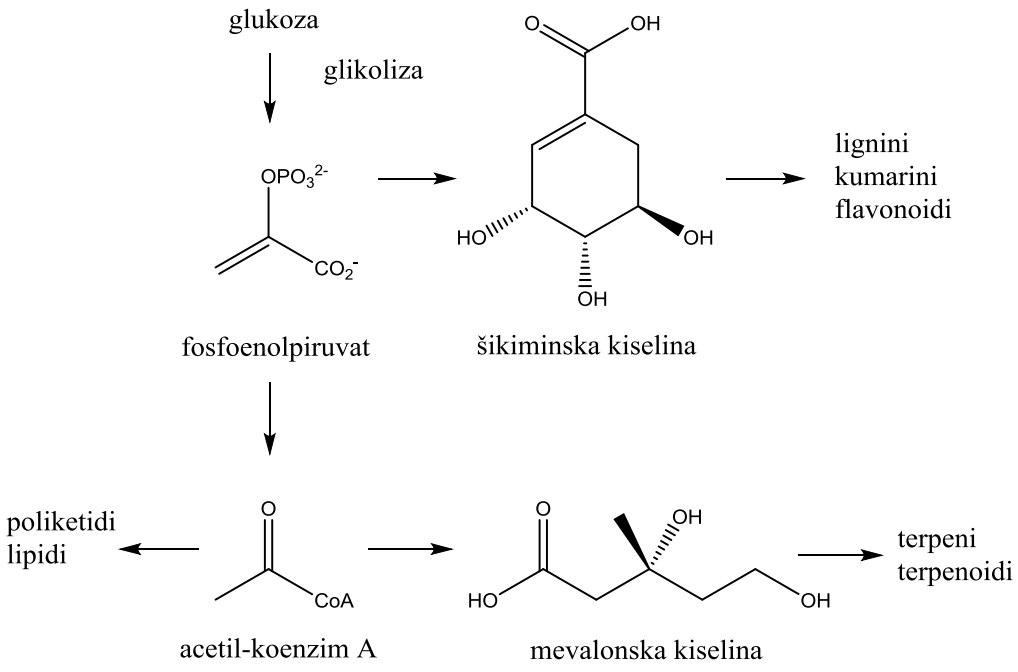
elagitanini te kondenzirani), mnogi su vrlo opori i čine biljna tkiva nejestivim; **lignin,** visoko razgranati polimer u staničnom zidu stanica ksilema, koji pored strukturne ima i obrambenu ulogu.[33,36]

2.2.2. Biosinteza sekundarnih metabolita

2.2.2.1. Biosinteza terpena

Sekundarni metaboliti nastaju iz intermedijera, koji su dio primarnog metabolizma. Primarni metaboliti iz osnovnih metaboličkih reakcija poput fotosinteze, glikolize i Krebsovog ciklusa služe kao gradivni elementi za sekundarne metabolite. Iako su primarni i sekundarni metabolički procesi složeni, osnovnih zajedničkih intermedijera, koji ulaze u složene metaboličke puteve primarnog i sekundarnog metabolizma zapravo ima samo nekoliko.

Najznačajnije gradivne molekule koje ulaze u biosintezu sekundarnih metabolita šikimatskog puta, puta mevalonske kiseline, acetatnog puta ili metil-eritrolnog puta nastaju iz zajedničkog intermedijera acetil-koenzima A (acetil-CoA). Kombinacijom intermedijera iz osnovnih metaboličkih puteva nastaje veliki broj različitih sekundarnih metabolita (**slika 2.16.**).[29]



Slika 2.16. Metabolički putevi sekundarnih metabolita[32]

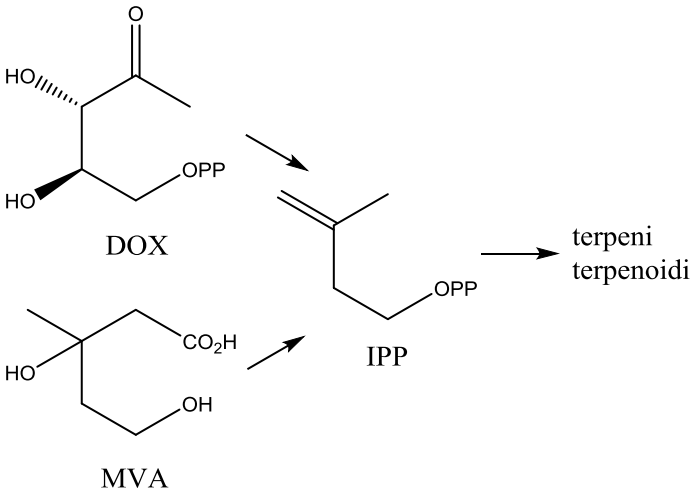
Proizvodnja, akumulacija, emisija i sekrecija izoprenoida u biljkama je omogućena prisustvom visoko specijaliziranih anatomskih struktura. Glanduralne trihome i sekretorne šupljine lišća i glandularni epiderm cvjetnih peteljki stvaraju i odlažu terpenska eterična ulja, koja potiču polinaciju koju vrše insekti. Smolni kanali i mjehurići u četinjača proizvode i akumuliraju obrambene smole, koje se sastoje od terpentina (monoterpenski olefini) i kalofonijuma (diterpenoidne smolne kiseline). Triterpenski površinski voskovi stvaraju se i luče iz specijaliziranih epiderma, a laticiferi (biljke koje luče lateks, kao npr. kaučukovo drvo) proizvode određene triterpene i politerpene.

Iako postoji velika raznovrsnost u njihovoj formi i funkciji, izoprenoidi imaju zajedničko biosintetsko podrijetlo. Biosinteza svih terpena, iz primarnih metabolita, odvija se kroz četiri faze:

- sinteza osnovnog prekursora izopentenil-pirofosfata (IPP),
- adicije IPP-a, pri čemu nastaje serija prenil-pirofosfatnih homologa, koji služe kao neposredni prekursori različitih klasa terpenoida,
- detaljnije razrađivanje ovih alilprenil-pirofosfata specifičnim terpenoidnim sintezama, koje rezultiraju različitim terpenoidnim skeletima,
- sekundarne enzimske modifikacije na skeletima (najčešće su to redoks reakcije) koje određuju funkciju i kemijsku raznovrsnost ovih prirodnih produkata.

Dva su različita biosintetska načina proizvodnje IPP-a (**slika 2.17.**). Prvi način se odnosi na metileritritol-fosfat (MEP) ili 1-deoksi-D-ksilulozu (DOX). IPP se formira u kloroplastu, uglavnom za hlapljivije monoterpene i diterpene.[29,32]

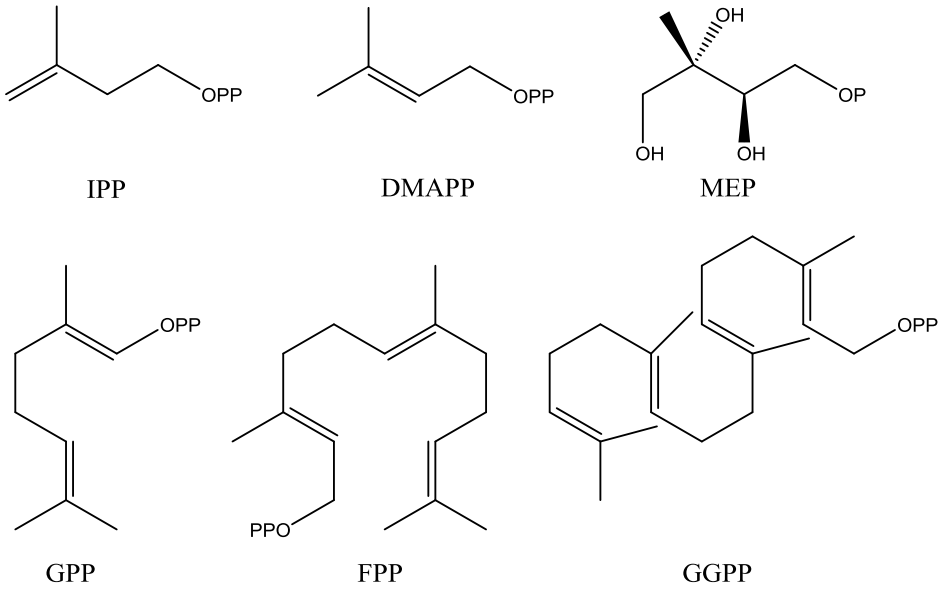
Drugi sintetski način je poznat kao put mevalonske kiseline (MVA). On se odvija u citosolu i rezultira nastankom seskviterpena.[38]



Slika 2.17. Dva načina sinteze izopentenil-pirofosfata (IPP)[32]

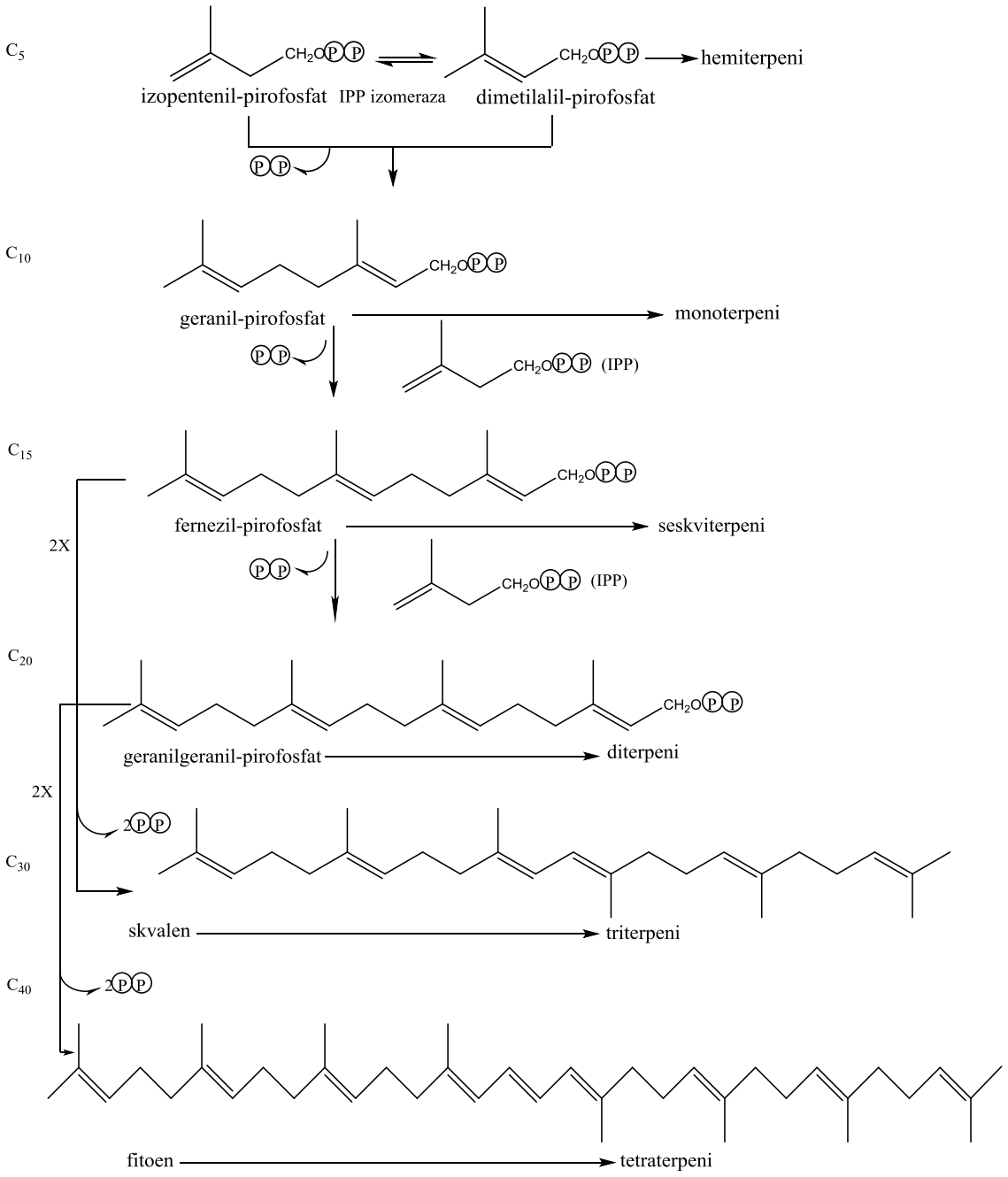
3R-(+)-mevalonska kiselina je jedan od prekursora terpena. Enzimi mevalonat kinaza i fosfomevalonat kinaza kataliziraju fosforilaciju mevalonske kiseline do 3R-(+)-mevalonska kiselina-5-pirofosfata, koji se zatim transformira do izopentenil-pirofosfata (IPP), eliminacijom karboksilne i hidroksilne skupine, djelovanjem enzima mevalonat-5-difosfat dekarboksilaze.

Izoprenil-pirofosfat se izomerizira djelovanjem izoprenil izomeraze, do dimetilalil-pirofosfata (DMAPP). Jedinice IPP i DMAPP se spajaju po pravilu „glava na rep“, djelovanjem dimetilalil transferaze i formiraju geranil-pirofosfat, koji se hidrolizira do geraniola, jednostavnog monoterpena. Geranil-pirofosfat je prekursor svih monoterpena.[32]



Slika 2.18. Prekursori različitih terpena

Seskviterpeni se formiraju iz prekursora 2*E*, 6*E*-farnezil-pirofosfata (FPP), a diterpeni iz 2*E*, 6*E*, 10*E*-geranilgeranil-pirofosfata (GGPP). Na sličan način, C_{25} spojevi nastaju postepenim dodavanjem C_5 dijelova izvedenih iz IPP do početne jedinice izvedene iz DMAPP. Prekursori triterpena i tetraterpena nastaju reduktivnim spajanjem dva FPP-a ili GGPP-a (**slika 2.19.**). Gume i drugi politerpeni nastaju dodavanjem C_5 jedinica, početnoj jedinici GGPP.[35]



Slika 2.19. Sinteza terpena iz različitih prekursora[35]

2.2.2.2. Biosinteza fenolnih spojeva

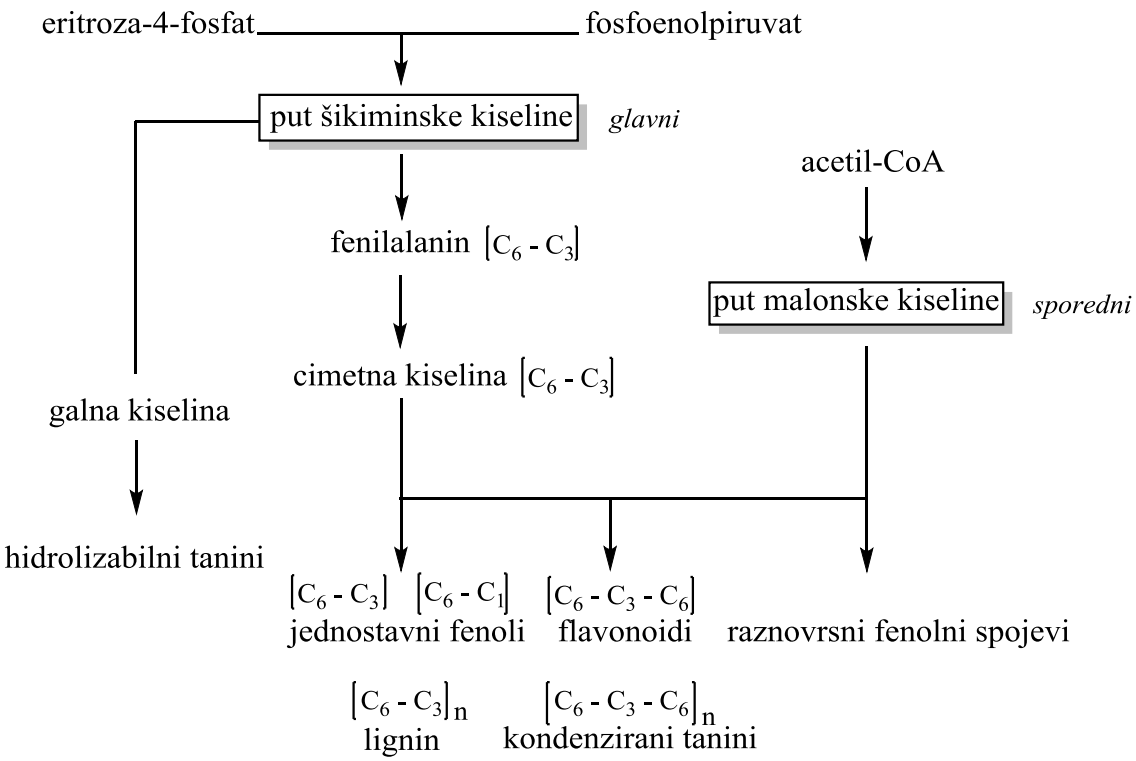
Važni sekundarni metaboliti koji nastaju od intermedijera iz acetatnog puta uključuju i fenilpropanske spojeve. Biosinteza većine fenilpropanoida počinje od aromatskih aminokiselina: fenilalanina, tirozina i triptofana. One se sintetiziraju iz

fosfoenolpiruvata i eritroza-4-fosfata, u procesu poznatom kao put šikiminske kiseline. On je uobičajen kod bakterija, gljiva i biljaka, ali ne i kod životinja.

Od jedne molekule eritroza-4-fosfata iz pentoza-fosfatnog puta i molekule fosfoenolpiruvata, nastale u procesu glikolize, nizom reakcija nastaje šikiminska kiselina. Iz šikiminske kiseline nastaju aromatske aminokiseline L-fenilalanin, L-tirozin i L-triptofan, a iz njih fenilpropanski spojevi. Fenilpropanski spojevi sadrže u svojoj strukturi fenilni prsten s jednim pobočnim propanskim lancem.

Fenilalanin i tirozin su prekursori za sintezu brojnih prirodnih spojeva. Tvore fenilpropansku jedinicu C_6-C_3, iz koje nastaju brojni fenilpropanski derivati, poput cimetne kiseline, kumarina, lignina i drugih.

Osim složenih prirodnih spojeva u šikiminskom putu nastaju i jednostavni derivati benzojeve kiseline, C_6-C_1 spojevi. Nastaju direktno iz interemedijera u ranom šikiminskom putu ili od C_6-C_3 fenilpropanskih spojeva (**slika 2.20.**).[39,40] Njima pripadaju eugenol, galna kiselina, salicilna kiselina, benzojeva kiselina, vanilin i drugi.



Slika 2.20. Glavni i sporedni putevi u biosintezi fenolnih spojeva[39]

Čini se da se galna kiselina primarno formira preko šikiminskog puta iz 3-dehidrošikiminske kiseline, iako postoji i alternativni put iz hidroksibenzojeve kiseline. Penta-*O*-galoil-glukoza, koja nastaje iz galne kiseline, je ključni prekursor u sintezi hidrolizabilnih tanina, galotanina i elagitanina. Elagitanini imaju veliku strukturnu raznolikost zbog formiranja dimernih i oligomernih derivata. Raširenији su od galotanina.

Točno podrijetlo elaginske kiseline, koja se nalazi u relativno malim količinama u biljnom tkivu, još nije razjašnjeno. Umjesto iz galne kiseline, ona može nastati iz elagitanina, koji nakon hidrolize daje slobodnu heksahidroksi-difensku kiselinu, koja podliježe konverziji u elaginsku kiselinu.[28]

U biosintezi većine sekundarnih fenolnih spojeva, početni korak je deaminacija fenilalanina, pri čemu nastaje cimetna kiselina. Ključni enzim u ovom procesu je fenilalanin-amonij liaza (PAL).[39]

Cimetna kiselina, reakcijom kataliziranom cinamat-4-hidroksilazom (C4H), prelazi u *p*-kumarinsku kiselinu, koja djelovanjem *p*-kumarat-CoA ligaze (4CL) biva metabolizirana u *p*-kumaroil-CoA.

p-kumarinska kiselina se metabolizira putem niza reakcija hidroksilacije i metilacije, kojima nastaju kafeinska, ferulinska, 5-hidroksiferulinska i sinapinska kiselina. Sinapska i ferulinska kiselina su prekursori lignina. *p*-Kumaroil-CoA je centralni prekursor u sintezi flavonoida i stilbena.

Cimetna kiselina također biva metabolizirana u benzojevu i salicilnu kiselinu. Sinteza salicilne kiseline nije česta i javlja se kod biljaka otpornih na bolesti, kod kojih infekcija uzrokuje nakupljanje salicilne kiseline. Nakupljanje pokreće niz događaja koji ograničavaju širenje gljivičnih, bakterijskih ili virusnih patogena, nastajanjem nekrotičnih lezija oko početne točke infekcije.[28]

C_6-C_3-C_6 struktura flavonoida je produkt dva odvojena biosintetska puta (**slika 2.20.**). Most i B-prsten čini fenilpropanoidna jedinica sintetizirana iz *p*-kumaroil-CoA. Kondenzacijom tri acetata, preko puta malonske kiseline, nastaje šestočlani A-prsten. Spajanje ovih dijelova dešava se postepenom kondenzacijom *p*-kumaroil-CoA s tri ostatka malonil-CoA, što je katalizirano halkon sintazom (CHS). Produkt ove reakcije je naringenin-halkon.

Sljedeći korak u biosintezi flavonoida je stereospecifična pretvorba naringenin-halkona u naringenin, djelovanjem halkon izomeraze (CHI). Naringenin je nadalje

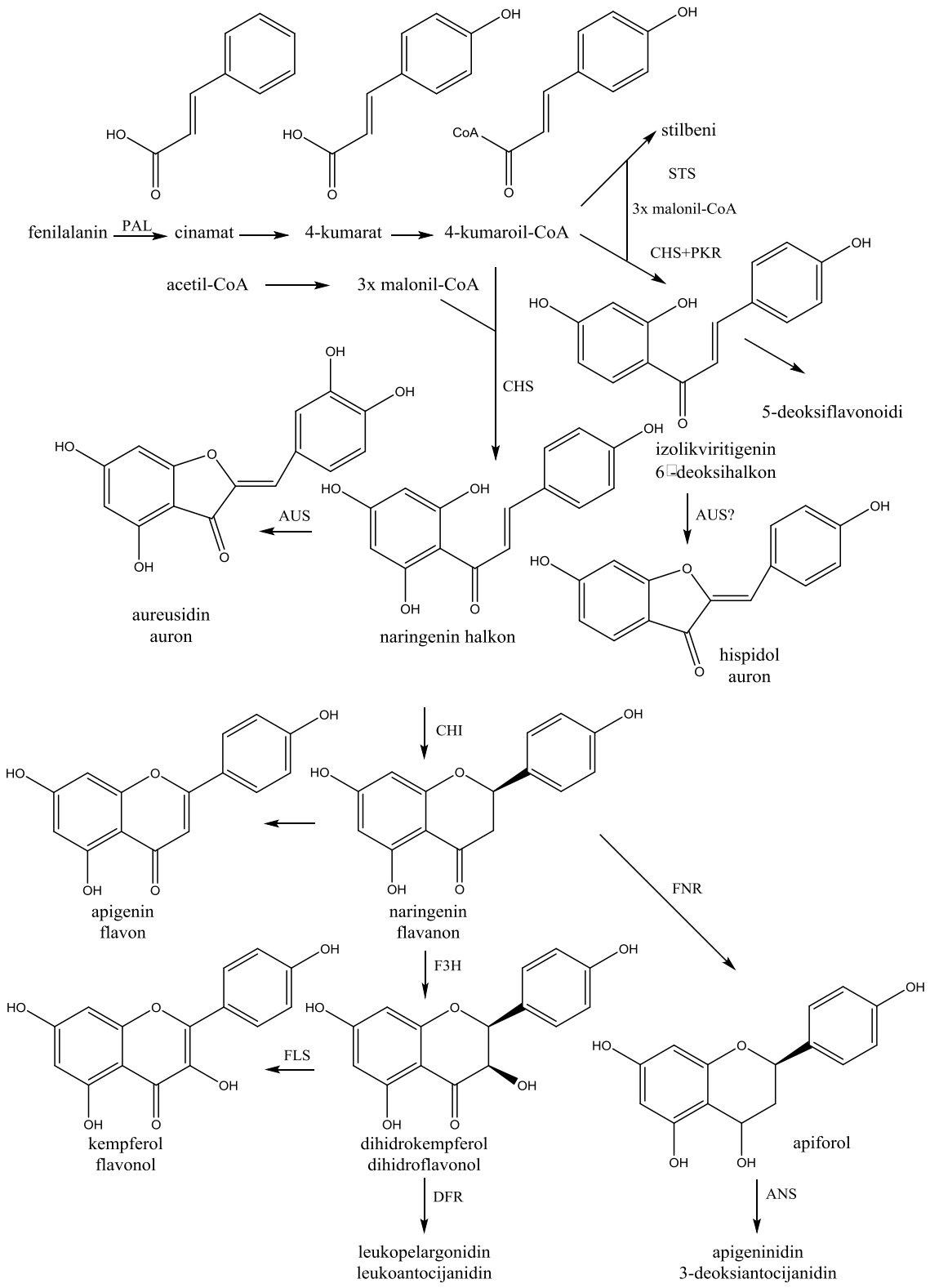
središnji prekursor u daljnjoj sintezi različitih skupina flavonoida; izoflavona, flavanona, flavona, flavonola, flavan-3-ola i antocijana (**slika 2.21.**).

Izoflavonoidi se nalaze uglavnom u mahunarkama i identificirana je većina enzima koji su uključeni u njihovu biosintezu. Enzim izoflavon sintaza (IFS) katalizira prvi korak konverzije naringenina i izolikviritigenina u izoflavone genistein, odnosno daidzein. Djelovanjem izoflavon-*O*-metiltransferaze nastaje formononetin, a 7-metiliranjem nastaje izoformononetin. Formononetin prolazi niz reakcija, uključujući hidroksilaciju, redukciju i dehidriranje, koje rezultiraju nastajanjem fitoaleksina medikarpina.[28,39,40]

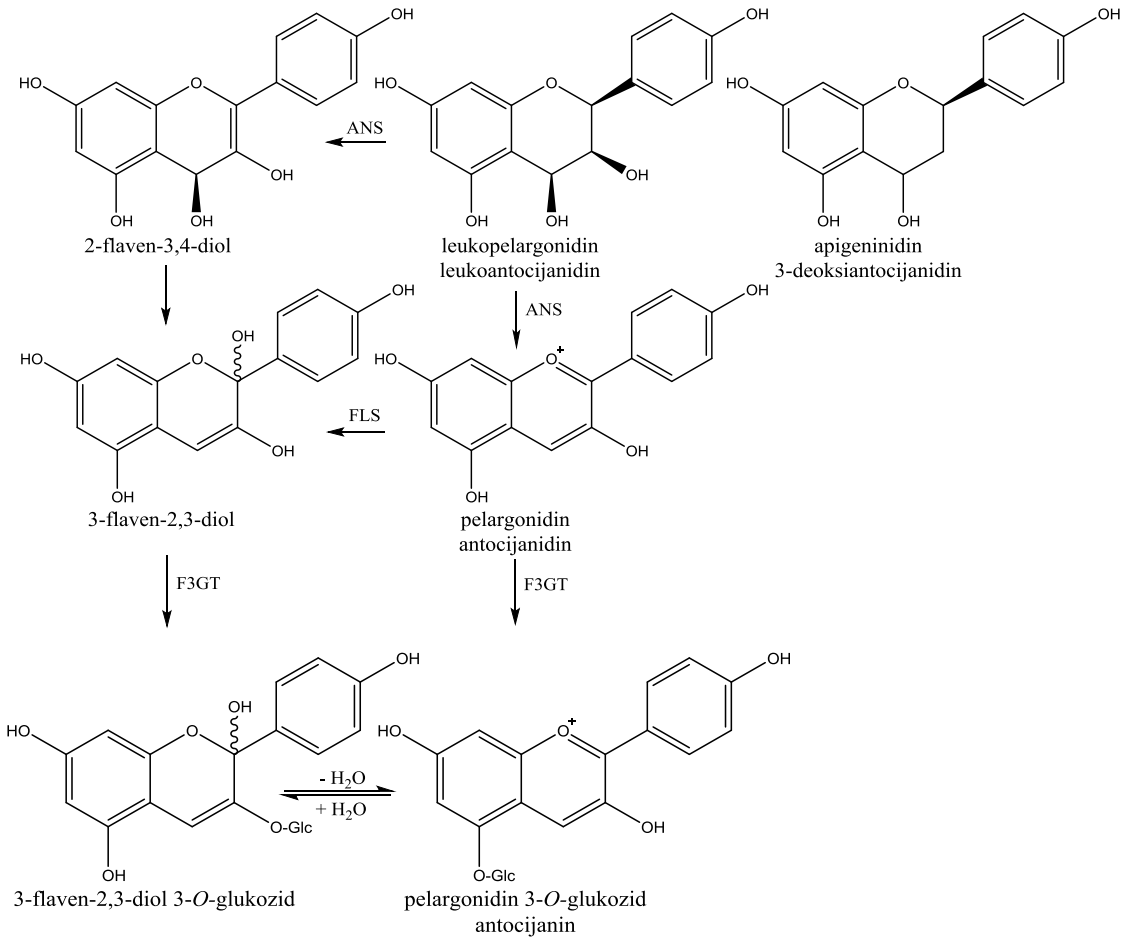
Flavon sintaza (FNS) je enzim odgovoran za oksidaciju flavanona u flavone. Flavanoni djelovanjem flavanon-3-hidroksilaze (F3H) prelaze u dihidroflavonole. Dihidroflavonol, djelovanjem dihidroflavonol 4-reduktaze (DFR) prelazi u leukoantocijanidine, koji su ključni prekursori u nastajanju flavan-3-ola, proantocijanidina i antocijanidina.

Stilben *trans*-resveratrol se sintetizira kondenzacijom *p*-kumaroil CoA i tri jedinice malonil CoA, od kojih svaki donira dva ugljikova atoma, katalizirano stilben sintazom (STS). Djelovanjem enzima CHS nastaje naringnin-halkon, središnji prekursor flavonoida. CHS je prisutan u tkivu, dok je stilben sintaza inducirana stresom, uključujući UV zračenje, traume i infekcije.[28]

Na **slici 2.21.** su prikazani osnovni biosintetski putevi fenilpropanoida i flavonoida. Pored ranije navedenih, važnu ulogu u spomenutim biosintetskim procesima imaju i enzimi: halkon izomeraza (CHI), flavonol sintaza (FLS), antocijanidin 4-reduktaza (ANS), acetil-CoA karboksilaza (ACC), flavonoid 3-*O*-glikozil-transferaza (F3GT), poliketid reduktaza (PKR), poliketid sintaza (PKS), flavanon 4-reduktaza (FNR), aureunidin sintaza (AUS) i drugi.[40]



Slika 2.21. Osnovni biosintetski putevi fenilpropanoida i flavonoida[40]



Slika 2.21. Osnovni biosintetski putevi fenilpropanoida i flavonoida[40] (nastavak)

2.3. Antioksidacija

2.3.1. Slobodni radikali

Izuzev nekih anaerobnih i aerotolerantnih jednostaničnih organizama, sve životinje, biljke i bakterije za efikasnu proizvodnju energije trebaju kisik. Oko 85-90% kisika kod životinjskiha organizama biva iskorišteno u mitohondrijima. Ove organele su glavni izvor energije ATP-a u životinja, nefotosintetskih biljnih tkiva i u biljaka tijekom reakcije u tami. Oksidacija hranjivih tvari je bit proizvodnje metaboličke energije. Elektroni koji se pri tom oslobađaju reduciraju nosače elektrona NAD^+, FMN i FAD, a reducirani NADH, $FMNH_2$ i $FADH_2$ se ponovno oksidiraju kisikom u mitohondrijima, te se stvaraju velike količine ATP-a. Ovaj proces se odvija u elektron-transportnom lancu smještenom na unutrašnjoj membrani mitohondrija. Oko 10-15% kisika koji se

kod aerobnih organizama ne iskoristi u mitohondrijima iskorištavaju različiti oksidaza i oksigenaza enzimi ili pak neke druge „neenzimske“ reakcije.

Sposobnost kisika da izvrši oksidaciju čini ga potencijalno toksičnim, pa u aerobnim organizmima postoje obrambeni sustavi koji ih štite od njegova štetna utjecaja. U aerobnim uvjetima dolazi do nastanka slobodnih radikala, čija se razina vraća u ravnotežu aktivnošću antioksidacijskih enzima i neenzimske obrane. Slobodni radikali su vrste spojeva koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona.[41] Prisutnost nesparenih elektrona uzrok su njihovih paramagnetskih svojstava, što ih čini veoma reaktivnima. Reaktivnost ovisi o vrsti slobodnog radikala, kao i o reakciji u koju ulazi. Reakcijom dvaju radikala nastaje neradikalni produkt, međutim, u reakciju radikala s neradikalom dolazi do lančane reakcije formiranja novih radikala.

Brojni biokemijski procesi u živim organizmima dovode do nastanka slobodnih radikala, čiji najvažniji oblici potječu od kisika i dušika, tzv. reaktivne kisikove (ROS) i dušikove vrste (RNS) (ROS, RNS, engl. *Reactive oxygen / nitrogen species*). ROS i RNS su zajednički nazivi za sve radikale, ali i druge reaktivne vrste koje potječu od kisika, odnosno dušika.[42]

Tablica 1. Reaktivni oblici kisika (ROS)

Radikali	***Neradikali***
Superoksid, $O_2^{\bullet-}$	Vodikov peroksid, H_2O_2
Hidroksil, $OH^{\bullet}$	Hipokloritna kiselina, HOCl
Peroksil, $RO_2^{\bullet}$	Ozon, O_3
Alkoksil, $RO^{\bullet}$	Singlet kisik, $^1\Delta O_2$
Hidroperoksil, $HO_2^{\bullet}$	Peroksinitrit, $ONOO^-$

Reaktivni oblici kisika nastaju različitim mehanizmima:

- Djelovanjem ionizirajućeg zračenja na biološke molekule,
- Kao nepoželjni produkti staničnog disanja (neki od elektrona u respiratornom lancu skrenu „iscure“ s glavnog puta),

- Kao produkti sinteze nekih enzima (NADPH-oksidaza i mijeloperoksidaza) u stanicama fagocita (neutrofila i makrofaga),
- uslijed patoloških stanja, i dr. [43]

Hidroksil radikal, $OH^{\bullet}$, je najreaktivniji radikal kisika. U biološkom sustavu nastaje kao posljedica velikog broja reakcija, kao što je Fentonova reakcija:[44]

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^-$$

Hidroksil radikali nastaju također kao posljedica djelovanja ionizirajućeg zračenja te kao produkti reakcije hipokloridne kiseline sa superoksid radikalom. Nastanak ovih radikala najodgovorniji je za brojna oštećenja stanične DNA, proteina i lipida.

Superoksid radikal, $O_2^{\bullet-}$, istodobno je i radikal i anion kisika. Slabije je reaktivan u usporedbi s hidroksil radikalom. U vodenom mediju brzo dolazi do reakcije dismutacije:

$$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Ovaj radikal sam rijetko izaziva oštećenja stanica, ali se smatra toksičnim, jer stvara H_2O_2 i $OH^{\bullet}$. Najčešće nastaje tijekom metaboličkih procesa ili aktivacijom kisika, kada se molekuli kisika u osnovnom stanju doda jedan elektron, kao i kod upalnih procesa ili napada patogena.

Peroksil i alkoksil radikali, $RO_2^{\bullet}$ i $RO^{\bullet}$, nastaju razgradnjom organskih peroksida. Mogu otrgnuti proton s drugih molekula u reakciji poznatoj pod nazivom peroksidacija lipida.

Vodikov peroksid, H_2O_2, nastaje *in vivo* djelovanjem nekih enzima (ksantin-oksidaza, urat-oksidaza, oksidaze D-amino kiselina). Slabo je reaktivan u odsutnosti iona prijelaznih metala, ali kako lako prolazi stijenku staničnih membrana, u stanici može reagirati s ionima željeza ili bakra, te formirati puno reaktivnije vrste, kao što je $OH^{\bullet}$. H_2O_2 može razgraditi i neke hem proteine (mioglobin, hemoglobin, citokrom c), pri čemu se oslobađaju ioni željeza.

Hipokloridna kiselina, HOCl, nastaje kao produkt djelovanja enzima mijeloperoksidaze (MPO) kod aktiviranih neutrofila. Ima važnu ulogu u procesu

fagocitoze, kod obrane organizma od napada bakterija. Zbog svoje reaktivnosti lako ostećuje biološke molekule, direktno ili indirektno preko klora Cl_2.

Singlet kisik nije slobodni radikal, jer ne sadrži slobodne elektrone. Ipak ovo je veoma reaktivan oblik kisika koji sadrži dva nesparena elektrona s paralelnim spinom. Nastaje u biološkom sustavu reakcijom hipokloritne kiseline i vodikovog peroksida, foto osjetljivim reakcijama te kao posljedica brojnih patoloških stanja.

Ozon, O_3, ima važnu ulogu u atmosferi Zemlje kod zaštite od UV zračenja, ali na Zemljinoj je površini nepoželjan i veoma toksičan.

Peroksinitrit, $ONOO^-$, je jak oksidans, u stanju da ošteti veliki broj bioloških molekula. U kiselim uvjetima razgrađuje se na hidroksil radikal i N_2O, slatkasti bezbojni plin koji se koristi kao anestetik.

Reaktivni oblici dušika (RNS) također imaju važan utjecaj na ljudsko tijelo. Među njima su najvažniji radikali dušikovih oksida. Dušikovi oksidi, nastali djelovanjem različitih enzima su osnova normalne fiziologije stanice. Dušikov(II) oksid radikal, $NO^{\bullet}$ je zadužen za niz fizioloških reakcija i signalnih procesa, kao što su imunoregulacija, regulacija krvnog tlaka, neurotransmisija i opuštanje mišića. U reakciji s kisikom iz zraka tvori reaktivniji dušikov(IV) oksid radikal, $NO_2^{\bullet}$. $NO^{\bullet}$ reagira i s endogenim radikalima (npr. superoksidnim) stvarajući jake oksidanse; peroksinitrite.[45,46,47]

2.3.2. Antioksidacijska obrana

Biološki sistem kontrole razine slobodnih radikala čine antioksidacijski enzimi i drugi antioksidansi, inhibitori oksidacijskih enzima, kofaktori antioksidacijskih enzima i kelatori prijelaznih metala, koji održavaju redoks homeostazu stanice.

Antioksidacijsku obranu sačinjavaju:

- *Antioksidacijski enzimi* koji katalitički uklanjaju slobodne radikale i druge „reaktivne vrste“. Takvi su superoksid-dismutaza (SOD), katalaza, peroksidaza i tiol-specifični antioksidansi.

- *Proteini velikih molekulskih masa* koji umanjuju dostupnost prooksidansa, kao što su ioni željeza, bakra i hem. To su transferini, haptoglobini, hemopeksin i metalotionein. Ovdje se ubrajaju i proteini koji nekim drugim mehanizmima štite biološke molekule od oštećenja (proteini toplinskog stresa).
- *Antioksidansi malih relativnih molekulskih masa* koji hvataju reaktivne oblike kisika i dušika, ROS i RNS. Takvi su glutation, bilirubin, α-tokoferol, askorbinska kiselina i mokraćna kiselina. Neke od takvih tvari u organizam dospijevaju prehranom, osobito α-tokoferol i askorbinska kiselina.[48,49]

Antioksidacijski enzimi

Superoksid- dismutaza (SOD) je metaloenzim u čijem se aktivnom centru nalaze atomi bakra i zinka (CuZnSOD), mangana (MnSOD) ili željeza (FeSOD). Ovi enzimi kataliziraju reakciju dismutacije dvaju superoksid aniona u molekulu kisika i molekulu vodikovog peroksida:

$$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Najvažniji enzim je CuZnSOD, dimerni protein koji se nalazi otopljen u citosolu svih eukariotskih stanica, dok se MnSOD nalazi u mitohondrijima. Dismutacijom superoksid aniona nastaje toksičan vodikov peroksid, koji nastaje i kao posljedica aktivnosti nekih oksidaza enzima *in vivo*. Stoga se SOD-sustav nadovezuje na onaj koji će ukloniti H_2O_2. Kod aerobnih organizama dvije vrste enzima uklanjaju H_2O_2. To su katalaza i peroksidaza enzimi.

Katalaza je veliki enzim koji sadrži feri ion (Fe^{3+}) u aktivnom mjestu. Jedan je od najaktivnijih poznatih enzima. Kod sisavaca dolazi u peroksizomima te u mitohondrijima stanica srčanog tkiva. Ovaj enzim katalizira reakciju uklanjanja vodikovog peroksida iz stanica, razgrađujući ga na kisik i vodu:

$$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$$

Peroksidaze su enzimi koji koriste vodikov peroksid za oksidaciju supstrata. Ako supstrat označimo kao SH_2, reakcija se može pisati kao:

$$SH_2 + H_2O_2 \rightarrow S + 2H_2O$$

Biljke i bakterije koriste velik broj peroksidaza za oksidaciju velikog broja supstrata. U tkivima čovjeka teško se mogu pronaći nespecifične peroksidaze. Riječ je o proteinima koji sadrže hem, a čiji je afinitet za H_2O_2 dosta veći od afiniteta katalaze. U tkivima čovjeka dolaze *glutation-peroksidaze (GPX)*, kao glavni enzimi za uklanjanje H_2O_2. Pri tome se reducirani oblik glutationa (GSH) oksidira i prelazi u svoj oksidirani oblik (GSSG):

$$2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$$

GSH je tripeptid sa slobodnom tiolnom skupinom koji u stanicama sisavaca dolazi u visokim koncentracijama. GSSG se uz pomoć enzima glutation-reduktaze prevodi natrag u GSH, koristeći pritom NADPH kao izvor reduktivne snage:

$$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$$

GSH posjeduje i mnoštvo drugih funkcija u tijelu čovjeka. Jedna od važnijih je njegova uloga antioksidansa. Osim toga, GSH sudjeluje u metabolizmu askorbinske kiseline, herbicida, pesticida i ksenobiotika, održavanju komunikacija među stanicama i druge.

Glutation- peroksidaze su tetrapeptidi koji za svoju aktivnost zahtjevaju atom selena. On u aktivnom mjestu enzima dolazi kao selenocistein; aminokiselina cistein kojoj je atom sumpora zamjenjen atomom selena (R-SeH umjesto R-SH). Selen je stoga važan u prehrani čovjeka, iako su veće količine selena toksične za organizam.

Antioksidacijski proteini

Ioni željeza i bakra imaju sposobnost katalize reakcija peroksidacije. Fenton je opisao reakciju kojom fero ioni razgrađuju vodikov peroksid tvoreći pri tom veoma reaktivan hidroksil radikal. Lipidni hidroperoksidi također mogu reagirati s fero ionima reakcijom koja dosta nalikuje Fentonovoj:

$$Fe^{2+} + ROOH \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + RO^\bullet$$

Budući u izvanstaničnom fluidu (plazmi) ne postoje enzimi, kao SOD, katalaze ili glutation-peroksidaze, a koncentracija GSH je veoma niska, važnu ulogu imaju kompleksirajuće tvari, osobito proteini kompleksirani metalnim ionima.

Transferini su proteini plazme koji transportiraju željezo iz krvi do jetre, slezene i koštane srži. **Laktoferini** se izlučuju iz neutrofila. Poput transferina, kompleksiraju dva atoma željeza. **Haptoglobini** imaju sposobnost vezivanja oksi- i methemoglobina, tvoreći pritom stabilan kompleks. Time sprječavaju postojanje slobodnog hemoglobina u plazmi koji može katalizirati reakcije peroksidacije. Štoviše, razgradnjom hemoglobina može nastati željezo koje bi dovelo do Fentonove reakcije. **Hemopeksin** također čvrsto kompleksira hem i na taj način sprječava reakciju peroksidacije katalizirane hemom. **Albumin** ima važnu ulogu u procesu antioksidacije. Ima sposobnost kompleksiranja iona metala i apsorpcije hipokloritne kiseline, HOCl.

U svim stanicama i svim oblicima života predstavljena je skupina proteinskih molekula, koje nazivamo i proteinima toplinskog stresa. Riječ je o „*heat shock proteinima*“ **(HSPs)**. Aktiviraju se onog trenutka kad je stanica izložena stresnim uvjetima, kao što su ekstremni temperaturni uvjeti ili smanjen dotok kisika. U normalnim uvjetima ovi proteini su u stanici prisutni kao šaperoni, s funkcijom kontrole ispravnog smatanja proteinskih molekula i njihove ispravne lokalizacije.

Antioksidansi malih relativnih molekulskih masa

U antioksidacijskoj obrani važnu zadaću imaju i neke tvari malih relativnih molekulskih masa koje u organizmu nastaju *in vivo* sintezom ili u organizam dospijevaju prehranom. Među one koji nastaju *in vivo* sintezom ubrajaju se bilirubin, neke α-keto kiseline, spolni hormoni, melatonin, lipoična kiselina, koenzim Q, mokraćna kiselina, melanini i drugi.

Bilirubin je krajnji produkt razgradnje hema kod sisavaca. Njegov prekursor biliverdin je plavo-zelene boje, za razliku od žutog bilirubina. *In vitro*, bilirbin je snažni hvatač peroksil radikala i singlet kisika, no malo se zna o njegovim antioksidacijskim svojstvima *in vivo*. Neke keto kiseline, uključujući **piruvat** i **α-ketoglutarat**, reagiraju neenzimski s H_2O_2 i djeluju kao njegovi hvatači ako se nalaze u stanicama kultura. Ženski spolni hormoni **estradiol**, **estron** i **estriol** mogu inhibirati peroksidaciju lipida *in vitro* prije svega stoga što posjeduju fenolne -OH skupine. Hormon **melatonin** nastaje metilacijom i acetilacijom serotonina. Melatonin pokazuje antioksidacijsku aktivnost *in vitro*. Njegov prekursor **serotonin** je u *in vitro* uvijetima puno bolji inhibitor peroksidacije lipida. **Lipoična kiselina** je esencijalni kofaktor multienzimskih

kompleksa koji kataliziraju reakcije dekarboksilacije α-keto kiselina u Krebsovom ciklusu. I reducirani (disulfid) i oksidirani oblik (ditiol) lipoične kiseline pokazuju antioksidacijska svojstva *in vitro*. Oni uništavaju $RO_2^{\bullet}$, HOCl, $OH^{\bullet}$ i ONOOH. **Koenzim Q**, CoQ, ima važnu ulogu u mitohondrijskom lancu prijenosa elektrona. Derivat je kinona, naziva se i ubikinonom, jer se nalazi posvuda u biološkim sustavima. Mobilni je nosač elektrona u respiratornom lancu. Ima ulogu veoma pokretljivog nosača elektrona između flavoproteina i citokroma u lancu prijenosa elektrona. *In vitro*, reducirani oblik ubikinol, $CoQH_2$, može hvatati $RO_2^{\bullet}$ radikale i inhibirati peroksidaciju lipida. Ubikinol može regenerirati α-tokoferol iz njegovog radikalnog oblika u lipoproteinima i membranama. Cjelokupni udio ubikonola u antioksidacijskoj obrani *in vivo* nije poznat. Njegova uloga može biti posebno važna u mitohondrijima, gdje se $CoQH^{\bullet}$ lako oksidira ili reducira. **Mokraćna kiselina** je produkt reakcije oksidacije hipoksantina i ksantina pod utjecajem enzima ksantin- oksidaze i dehidrogenaze. Istraživanja *in vitro* pokazuju da je urat dobar hvatač $RO_2^{\bullet}$, $OH^{\bullet}$ i singlet kisika. Većina tkiva sisavaca, osobito mišićno i moždano, sadrže mikromolarne količine dipeptida koji sadrži histidin kao aminokiselinu. To su **karnosin**, **homokarnosin** i **anserin**. *In vitro*, ovi dipeptidi pokazuju antioksidativna svojstva. **Melanini** su pigmenti koji nastaju oksidacijom ili polimerizacijom tirozina. Nalaze se u svih životinja i nekih gljiva. Smeđi ili crni pigmenti (eumelanini) u koži štite od UV zračenja. Za razliku od njih, crveno-smeđi ili žuti pigmenti (feomelanini) manje su efikasni kao hvatači radikala.[48,49]

2.3.3. Antioksidansi

U biološkim sustavima postoji nekoliko načina obrane od oksidacijskog stresa, pa ne postoji jedinstvena definicija pojma antioksidans. Najčešće se antioksidans definira kao tvar koja, prisutna u maloj količini u odnosu na količinu oksidabilnog supstrata, sprječava ili odlaže proces oksidacije supstrata.[42] Postoji više načina podjele antioksidanasa:

Prema mehanizmu djelovanja:

- oni koji zaustavljaju lančane reakcije (inhibitori slobodnih radikala),
- razlagači peroksida,
- inaktivatori (kelatori) metalnih iona,

- „hvatači“ kisika.[50]

Tijekom lančanih reakcija antioksidansi mogu djelovati kao:

- preventivni antioksidansi (sprječavaju stvaranje slobodnih radikala),
- enzimski antioksidansi (enzimi koji sprječavaju lančane reakcije slobodnih radikala),
- „hvatači slobodnih radikala“ (reagiraju s nastalim slobodnim radikalima stabilizirajući ih te predstavljaju najveću skupinu farmakoloških antioksidansa).[51]

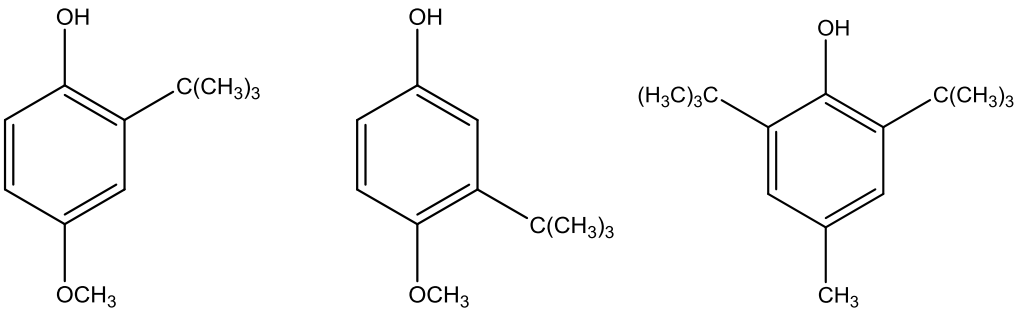
Prema biosintetskom podrijetlu antioksidanse možemo podijeliti na:

- prirodne antioksidanse (bilirubin, glutation, vitamini C i E),
- sintetske antioksidanse (butil-hidroksianisol, butil-hidroksitoluen).[52,53]

Prema podrijetlu u tijelu možemo antioksidanse podijeliti na:

- endogene (enzimi, proteini, glutation, mokraćna kiselina),
- egzogene (vitamini C i E, terpeni, karotenoidi).

Najznačajniji prirodni antioksidansi su vitamin C (askorbinska kiselina), vitamin E (tokoferol), karotenoidi i fenolni spojevi, dok su najčešće korišteni sintetski antioksidansi butil-hidroksianisol (BHA), butil-hidroksitoluen (BHT) (**slika 2.22.**), propil-galat (PG) i tert-butilhidrokinon (TBHQ).[52,53]



2-BHA 3-BHA BHT

Slika 2.22. Sintetski antioksidansi 2-BHA, 3-BHA i BHT

2.3.4. Oksidacijski stres

U normalnim fiziološkim uvjetima oksidansi i antioksidacijska obrana su u ravnoteži. Ukoliko proizvodnja slobodnih radikala nadvlada antioksidacijski kapacitet živog sustava, reaktivne kisikove i dušikove vrste mogu reagirati s makromolekulama, uzrokujući strukturna i/ili funkcionalna oštećenja staničnih enzima i genetskog materijala. Suvišak oksidanasa i oštećenja uzrokovana njihovim djelovanjem naziva se oksidacijski stres.

U stanju oksidacijskog stresa višak slobodnih radikala može oštetiti lipide, proteine, ugljikohidrate i nukleinske kiseline.

Slobodni radikali napadaju nezasićene masne kiseline u biološkim membranama uzrokujući peroksidaciju lipida. Peroksidacija lipida je enzimska reakcija, katalizirana enzimom lipoksigenaza.[54] Taj se enzim nalazi u eritrocitima i leukocitima životinja te u mnogim biljnim organizmima. Njegov je supstrat linolna i linolenska kiselina, kod biljaka te arahidonska kiselina kod životinja, dok se oleinska kiselina ne oksidira. Peroksidacija lipida ima za posljedicu smanjenje fluidnosti membrana, gubitak enzima i receptorske aktivnosti, oštećenje membranskih proteina i drugih makromolekula, što dovodi do apoptoze.[10]

Oksidacijska modifikacija proteina, reverzibilna i ireverzibilna, javlja se tijekom redoks signaliziranja i drugih staničnih procesa. Također se javlja i kao posljedica oksidacijskog stresa. Izloženost proteina $OH^{\bullet}$ i/ili $O_2^{\bullet -}$ vodi njihovim strukturnim modifikacijama. Modificirani proteini mogu dalje proći spontanu fragmentaciju i unakrsno povezivanje ili pokazati značajno povećanje proteolize. Oksidativni napad na polipeptidnu osnovu obično je iniciran od strane $OH^{\bullet}$. Eksperimentalnim generiranjem radikala, upotrebom radiolize vode ili razlaganjem H_2O_2 u reakciji kataliziranoj metalima, u međudjelovanju s lipidima može doći do formiranja alkilnih, alkoksilnih i alkilperoksilnih radikalnih međuprodukata, koji utječu na kidanje peptidne veze na nekoliko načina.

Na djelovanje reaktivnih spojeva kisika najosjetljiviji su triptofan, histidin i cistein. Pored fragmentacije, oksidacija aminokiselinskih ostataka lizina, arginina, prolina i treonina povećava koncentraciju karbonila, pa se prisustvo karbonilnih skupina može koristiti kao pokazatelj oksidacije proteina.

Oksidacijska modifikacija proteina se također javlja reakcijom s aldehidima, koji nastaju tijekom peroksidacije lipida. Krajnji produkti peroksidacije lipida, kao što su malondialdehid (MDA) i 4-hidroksi-2-nonenal (HNE), kao i produkti oksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina uzrokuju oksidacijska oštećenja proteina.[12]

Oksidacijska modifikacija proteina je zastupljena kod bolesti i promjena povezanih sa procesom starenja, kao što su: ateroskleroza, tumor, neurodegenerativne bolesti i sam proces starenja. Karbonilacija proteina se javlja pri velikom broju modifikacija i predstavlja marker oksidacijskog stresa. Tijekom prve dvije trećine životnog vijeka razina karbonilacije proteina se polako povećava, dok u zadnjoj trećini njena razina naglo raste. Karbonilacija proteina negativno utječe na funkcije samih proteina, što upućuje na to da ova modifikacija može biti jedan od uzročnika ranije spomenutih nepoželjnih procesa.[55]

2.3.5. Oksidacija i hrana

Osim u živim organizmima, proces oksidacije zauzima važno mjesto i u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Proces oksidacije obuhvaća oksidaciju proteinskih molekula, vitamina, ali prije svega oksidaciju lipidnih molekula.[56]

2.3.5.1. Oksidacija lipida u hrani

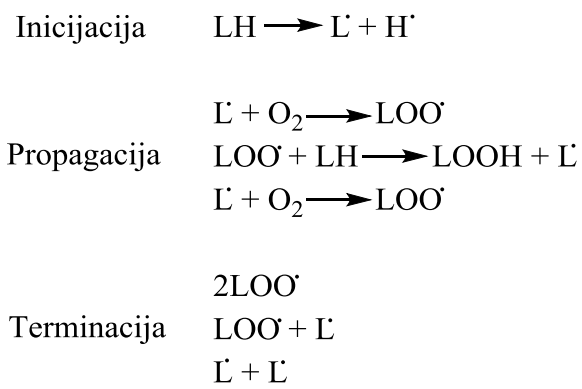
Oksidacija lipidnih molekula predstavlja veliki problem prehrambene industrije, jer dovodi do promjene oragnoleptičkih svojstava hrane, do smanjenja njene nutritivne vrijednosti, kao i tvorbe radikalnih komponenti koje mogu ugroziti zdravlje potrošača.

Pod oksidacijom lipida u hrani podrazumijeva se čitav niz kemijskih promjena koje su posljedica interakcije lipida sa kisikom. Triacilgiceroli i fosfolipidi su teško hlapljive molekule i ne utječu direktno na aromu proizvoda. Tijekom oksidacije lipida iz masnih kiselina nastaju hlapljivi spojevi koji dovode do nepoželjne arome proizvoda poznate kao ranciditet.[57]

Višestruko nezasićene masne kiseline oksidiraju se puno brže od mononezasićenih ili zasićenih. Na brzinu oksidacije lipida utječu broj i položaj dvostrukih veza.[54] Metilenska skupina (-CH_2-) koja se nalazi između dviju dvostrukih

veza veoma je podložna oksidaciji. Linolna kiselina je podložna oksidaciji, budući posjeduje metilensku skupinu između dviju dvostrukih veza, na poziciji 11. Njenom oksidacijom stvaraju se dva hidroperoksida. Osnovni sekundarni produkt autooksidacije linolne kiseline je heksanal. Autooksidacija lipida je autokatalitička reakcija, što znači da s vremenom napreduje zbog nastanka produkata koji sami kataliziraju reakciju.

Tri su osnovne faze u oksidaciji lipida: inicijacija, propagacija i terminacija (**slika 2.23.**). Iz peroksida nastalih na početku, nastaju sekundarni oksidacijski produkti: aldehidi, ketoni, epoksidi i drugi spojevi, koji imaju i negativne biološke efekte, kao npr. gubitak esencijalnih aminokiselina i vitamina topljivih u lipidima.[58]



Slika 2.23. Faze oksidacije lipida[58]

U prvoj fazi kisik iz zraka napada nezasićene masne kiseline (LH) pri čemu se stvaraju slobodni radikali masnih kiselina (peroksi $LO_2^{\bullet}$, alkolsi $LO^{\bullet}$ ili alkil radikali $L^{\bullet}$). U drugoj fazi reakcije iz slobodnih se radikala stvaraju hidroperoksidi (LOOH) i slobodni radikali peroksida ($LOO^{\bullet}$) vezivanjem kisika na slobodne radikale masnih kiselina. Hidroperoksidi (primarni oksidacijski produkti) su labilni, pa se dalje razgrađuju na slobodne radikale i razgradne produkte oksidacije. Ti razgradni produkti oksidacije (sekundarni oksidacijski produkti) su karbonilni spojevi (aldehidi i ketoni), masne kiseline, alkoholi, epoksidi i drugi, od kojih neki daju neugodan, užegli miris karakterističan za oksidiranu mast.

Autooksidacija lipida je često inicirana slobodnim radikalima nepoznatog izvora. Ubrzava je povišenje temperature, svjetlost i prisustvo metala u tragovima. Reducirani oblici prijelaznih metala su efikasniji u razlaganju vodikovog peroksida, pa reducirajuće komponente, kao npr. superoksid anion ($O_2^{\bullet-}$) i askorbinska kiselina dodatno potiču

oksidaciju lipida. Redoks ciklus željeza u prisustvu superoksid aniona pri oksidaciji lipida poznat je kao Haber-Weiss reakcija, dok je drugi korak ove reakcije poznat kao Fentonova reakcija:

$$Fe^{3+} + O_2^{\bullet-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^-$$

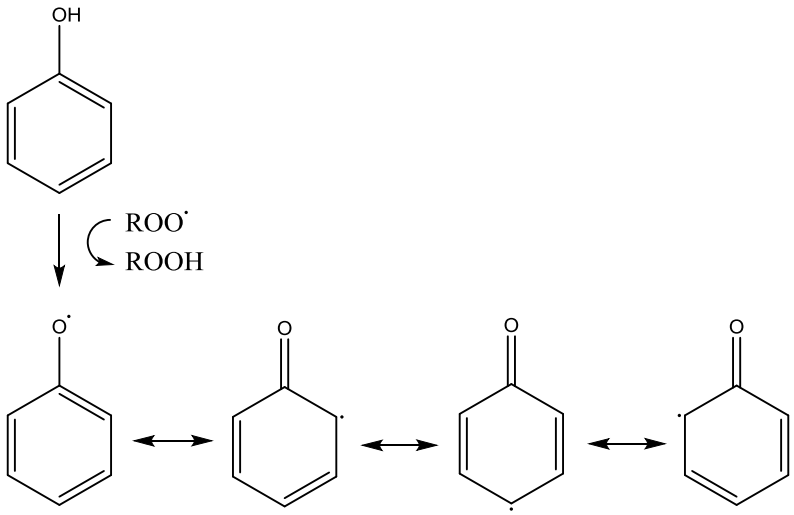
I askorbinska kiselina može sudjelovati u reakciji Haber-Weiss tipa, međutim za razliku od superoksid aniona, askorbinska kiselina pri višim koncentracijama može djelovati i kao antioksidans.

U zaštiti lipidnih sastojaka hrane od oksidacije koristi se kontrola razine slobodnih radikala, prooksidanasa i oksidacijskih intermedijera.

Hvatači slobodnih radikala (HSR) inhibiraju oksidaciju lipida reagirajući brže od nezasićenih masnih kiselina sa slobodnim radikalima. Oni mogu reagirati sa peroksil ($LOO^{\bullet}$) ili alkoksil ($LO^{\bullet}$) radikalima sljedećom reakcijom:

$$LOO^{\bullet} \text{ ili } LO^{\bullet} + HSR \rightarrow LOOH \text{ ili } LOH + HSR^{\bullet}$$

Za fenolne komponente je poznato da su dobri hvatači slobodnih radikala, budući da doniraju vodikov atom, pri čemu nastali radikal ima nisku energiju zbog njegove delokalizacije u strukturi fenolnog prstena (**slika 2.24.**).[57]



Slika 2.24. Delokalizacija fenolnog radikala[57]

Najčešće korišteni sintetski antioksidansi su supstituirani monofenolni spojevi, kao što su: 2,6-di-*tert*-butil-4-hidroksitoluen (BHT), 2-*tert*-butil-4-hidroksianisol i 3-*tert*-butil-4-hidroksianisol (2- i 3-BHA) (**slika 2.22.**), propil-galat (PG) i *tert*-butil-hidrokinon (TBHQ).

Dodatak antioksidansa BHA produžava vrijeme stabilnosti namirnica na bazi lipida (npr. maslaca, masti, mesa, mliječnih proizvoda, biljnih ulja) za par mjeseci do par godina. BHT je manje efikasan od BHA iz razloga što dvije tercijalne butilne skupine sterički ometaju reakciju s radikalima. PG je slabo topljiv u vodi. Rjeđe se koristi u prehrambenoj industriji, jer veže Fe^{3+} ione i reducira ih u njihov Fe^{2+} oblik. Kada se ovaj antioksidans koristi u hrani, mora se kombinirati s kelirajućim tvarima (kao što je citrat) da se spomenuta pojava spriječi. TBHQ je je jedan od najboljih antioksidansa koji se dodaje ulju namijenjenom prženju. Za razliku od PG-a, ne kompleksira s ionima željeza i bakra.

Prema europskim pravilima, dozvoljena količina BHT, BHA i PG-a u hrani je 100 μg/g lipida.[59] BHA i BHT su veoma efikasni u svojoj ulozi, ali su lako hlapljivi i termolabilni zbog čega je njihova primjena ograničena.[60] Neke studije su pokazale da korištenje nekih antioksidansa sintetskog podrijetla ima negativne efekte po zdravlje ljudi, zbog promocije procesa kancerogeneze.[61,62]

Zbog navedenih razloga postoji tendencija zamjene sintetskih antioksidansa, tamo gdje je to moguće, netoksičnim antioksidansima prirodna podrijetla. U novije vrijeme se eterična ulja također koriste kao zamjena sintetskim antioksidansima, u onim sektorima konzerviranja hrane, u kojim njihova uporaba ne utječe negativno na aromu proizvoda.[63]

2.3.6. Antioksidacijski učinak eteričnih ulja i ekstrakata

Posljedica oksidacijskog stresa, pored oksidativnih oštećenja i smrti stanica, mogu biti oštećenja tkiva i različita patološka stanja. Smatra se da su brojni oblici malignih bolesti rezultat oksidativnih oštećenja DNA i mutacija koje uslijed toga nastaju. Negativni utjecaj slobodnih radikala, smatra se, dovodi do različitih autoimunih bolesti, šećerne bolesti, reumatskih bolesti, kardiovaskularnih bolesti i srčanog udara, bolesti bubrega, infektivnih bolesti, neurodegenerativnih bolesti (Alzheimerova bolest) i drugih. I sam proces starenja se opisuje kao proces kumulacije brojnih oksidativnih oštećenja nakupljenih tijekom vremena.

Kako je oksidacijski stres povezan sa etiologijom i patogenezom brojnih bolesti, smatra se da je uklanjanjem uzroka oksidacijskog stresa moguće prevenirati ili odgoditi pojavu patoloških promjena i reducirati pojavu bolesti. Brojne studije pokazuju da redovan unos voća, povrća, žitarica i njihovih napitaka djeluje pozitivno na bolesti koje su posredovane djelovanjem slobodnih radikala. Stoga, prirodni antioksidansi pojedinačno ili u sastavu ekstrakata, mogu biti korisni u terapiji takvih bolesti. To je ujedno razlog velikog interesa za istraživanje antioksidacijske aktivnosti aromatičnih, ljekovitih i jestivih biljaka.[2]

U situacijama narušene homeostaze, kao i u prevenciji razvoja bolesti, unošenje antioksidanasa hranom može biti od velikog značaja. U tom pogledu se mogu koristiti eterična ulja, biljni ekstrakti ili njihove pojedinačne sastavnice, s dobrom antioksidacijskom aktivnošću. S kemijskog stanovišta eterična ulja su kompleksne smjese velikog broja spojeva što otežava ispitivanje njihove aktivnosti. Ako se izuzmu neke fenolne komponente, čija je antimikrobna i antioksidacijska aktivnost dobro poznata, za većinu ostalih komponenti eteričnih ulja takvi podatci nisu dostupni. Brojni radovi o eteričnim uljima spominju sinergizam, antagonizam, aditivnost, međutim takve tvrdnje su rijetko praćene eksperimentalnom potvrdom.[63]

U studiji Ruberto i Baratta (2000)[63] ispitana je antioksidacijska aktivnost 100 čistih spojeva, uobičajenih sastavnica eteričnih ulja, dvjema metodama. Od trinaest neoksidiranih monoterpena, terpinolen, α-terpinen, γ-terpinen i sabinen su pokazali vrlo visoku aktivnost. Aktivnost α-terpinena i γ-terpinena je bila slična aktivnosti koju je pokazao α-tokoferol. Smatra se da ovakvoj aktivnosti spomenutih spojeva doprinosi aktivna metilenska skupina. Od 34 ispitana oksidirana monoterpena, timol i karvakrol su pokazali aktivnost kao i α-tokoferol. Poznato je da timol i karvakrol najviše doprinose antioksidacijskoj aktivnosti eteričnih ulja koja ih sadrže. Kod ove klase spojeva najaktivniji su bili alkoholi, s izuzetkom linaloola koji je pokazao prooksidacijsku aktivnost. Slabiju aktivnost su pokazali ketoni. Neoksidirani seskviterpeni nisu bili aktivni, dok su oksidirani seskviterpeni pokazali aktivnost sličnu onoj kod oksidiranih monoterpena. Nešto izraženiju aktivnost pokazao je ciklički keton germakron, dok je prooksidacijsku aktivnost pokazao nerolidol. Derivati benzena, fenoli, su pokazali najbolje rezultate. Oni su efikasniji kod sprječavanja nastanka primarnih oksidacijskih produkata, za razliku od preveniranja nastanka sekundarnih oksidacijskih produkata. Neterpenski spojevi, koji su u eteričnim spojevima prisutni u

manjoj količini, pokazali su slabu antioksidacijsku aktivnost, kao i neoksidirani seskviterpeni.[63]

U novije vrijeme se eterična ulja također koriste kao zamjena sintetskim antioksidansima, u onim sektorima konzerviranja hrane, u kojim njihova uporaba ne utječe negativno na aromu proizvoda.[63] Zbog svoje specifične kemijske strukture biljni fenolni spojevi mogu djelovati kao jaki antioksidansi, budući da imaju sposobnost prekidanja lančanih reakcija doniranjem atoma vodika ili elektrona slobodnom radikalu, pri čemu sami poprimaju stabilnu nereaktivnu konformaciju. Međutim, njihova aktivnost ovisi o većem broju faktora: stupnju hidroksilacije, polarnosti, topljivosti, redukcijskom potencijalu, stabilnosti nastalog radikala i dr.

Antioksidacijsko djelovanje fenolnih kiselina ovisi o broju i položaju hidroksilnih skupina u odnosu na karboksilne skupine.[64] Tako *m*-hidroksibenzojeve kiseline pokazuju antioksidacijsko djelovanje. Antioksidacijsko djelovanje fenolnih kiselina raste s povećanjem broja hidroksilnih grupa, iako fenolne kiseline koje na poziciji 3 i 5 imaju metoksilne skupine imaju smanjenu aktivnost. Hidroksicimetne kiseline pokazuju jaču aktivnost u usporedbi s hidroksibenzojevim kiselinama, jer lakše doniraju vodikove atome.[65]

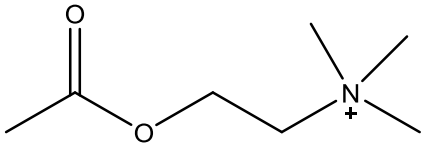
Antioksidacijsko djelovanje flavonoida ovisi o značajkama i prirodi supstituenata na B i C prstenu kod osnovne strukture flavonoida.[64] Brojne studije su pokazale da flavonoidi pokazuju antioksidacijsko djelovanje. Oni mogu prevenirati oksidaciju lipoproteina male gustoće, čime mogu smanjiti rizik za razvoj ateroskleroze.[36] Za polifenole je dokazano da pozitivno djeluju na kognitivne sposobnosti i neurodegenerativne promjene uzrokovane starenjem.[66] Postoji veći broj dokaza o tome da je medijator oksidacijskih oštećenja uzrokovan β-amiloidnim peptidom u patogenezi Alzheimerove bolesti (AD) vodikov peroksid. Polifenoli, kao što je kvercetin, lako prolaze krvnomoždanu barijeru i djeluju neuroprotektivno djelujući na vodikov peroksid. Povišena razina ukupnog homocisteina u serumu je jedan od faktora rizika u razvoju AD. Tiolna skupina homocisteina podliježe autooksidaciji u plazmi i time generira reaktivne kisikove spojeve. Djelovanjem na iste polifenoli mogu imati preventivno djelovanje. Zaštitno djelovanje katehina iz čaja u pogledu neuroloških bolesti može biti posljedica hvatanja slobodnih radikala, sposobnosti keliranja sa željezom i/ili regulaciji protektivnih antioksidacijskih enzima. Postoje izvješća o neuroprotektivnom djelovanju kurkumina, koji inhibira neurotoksični homocistein, a time i peroksidaciju lipida induciranu istim.[37]

Mnoge studije potvrđuju da biljni ekstrakti s izrazitom *in viro* aktivnošću pokazuju aktivnost i u *in vivo* uvjetima,[67] pa se *in vitro* metode koriste kao prvi korak u ispitivanju potencijalne antioksidacijske aktivnosti nekog biljnog spoja. Trenutno postoji nesrazmjer u znanju o *in vivo* i *in vitro* djelovanju polifenola kao antioksidanasa.[37] Zbog nedostatka saznanja u pogledu sigurnosti unošenja viših doza, smatra se da razina polifenola, koji se unose u organizam, ne bi trebala prelaziti onu u kojoj se isti inače mogu naći u hrani.[36]

Zbog znanja o postojanju negativnih nuspojava pri uporabi sintetskih antioksidanasa postoji tendencija njihove zamjene antioksidansima iz prirode. Tako se ekstrakt ružmarina često koristi kao prehrambeni aditiv u sprječavanju oksidacije lipida. Karnozinska kiselina, karnozol i ružmarinska kiselina su njegove najznačajnije antioksidacijske komponente.[2]

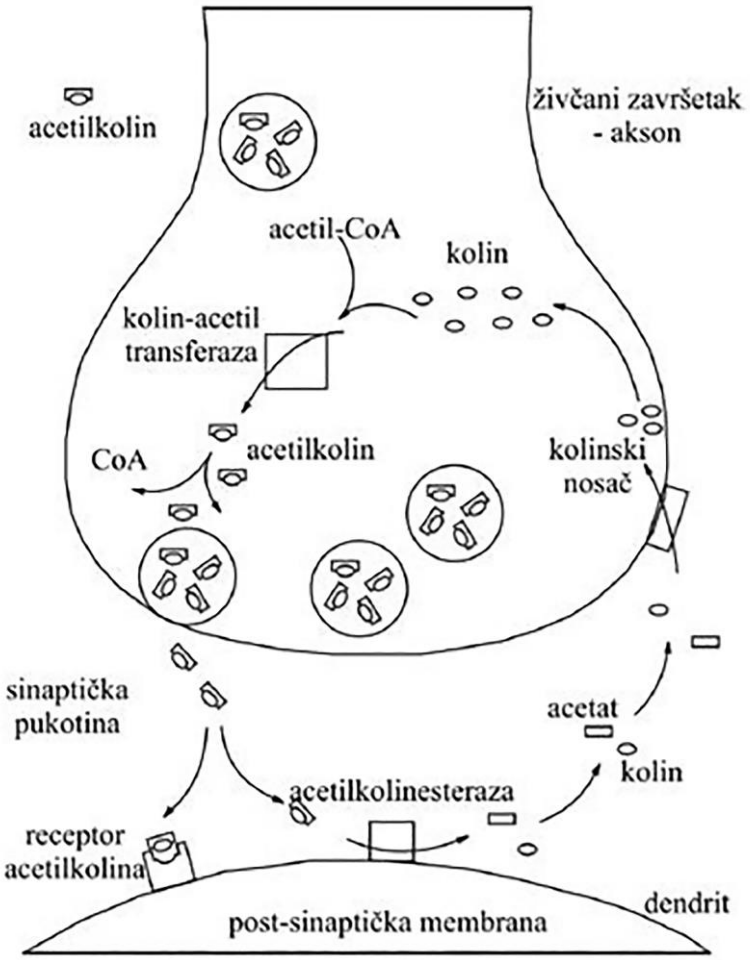
2.4. Neurotransmiter acetilkolin i kolinesteraze - struktura i mehanizam djelovanja

Neurotransmiter acetilkolin (ACh) je prisutan u nervnom sustavu, gdje omogućava cerebralno-kortikalnu aktivnost i razvoj, kontrolu protoka cerebralne krvi, kontrolu ciklusa spavanja i budnosti te procesa učenja i pamćenja (**slika 2.25.**). Enzim kolinacetiltransferaza (ChAT) katalizira stvaranje acetilkolina (ACh) u kolinergičnim neuronima, iz kolina i acetil koenzima A.



Slika 2.25. Strukturna formula acetilkolina (ACh)

Ispuštanjem acetilkolina iz sinaptičkog mjehurića predsinaptičke membrane u sinaptičku pukotinu isti se veže na kolinergičke receptore (nikotinski i muskarinski receptori) na postsinaptičkoj membrani kolinergičke sinapse (**slika 2.26.**) ili na mišićnim stanicama. Time se pokreće niz procesa koji rezultiraju depolarizacijom membrane i daljim prijenosom signala.[68]



Slika 2.26. Prikaz kolinergične sinapse i kružnog toka acetilkolina[69]

U centralnom živčanom sustavu stimulacija nikotinskih receptora djelovanjem ACh je povezana sa procesima učenja i pamćenja, dok stimulacija receptora na mišićnim stanicama dovodi do njihovih kontrakcija. Muskarinski receptori su uglavnom povezani s perifernim živčanim sustavom, glatkim i srčanim mišićima. Simptomi parasimpatičke stimulacije su: smanjenje broja otkucaja srca i krvnog pritiska, stezanje bronha, povećanje salivacije, poticanje probave i povećanje intestinalne peristaltike, oslobađanje tekućine iz mokraćnog mjehura i kontrakcija zjenica.[70]

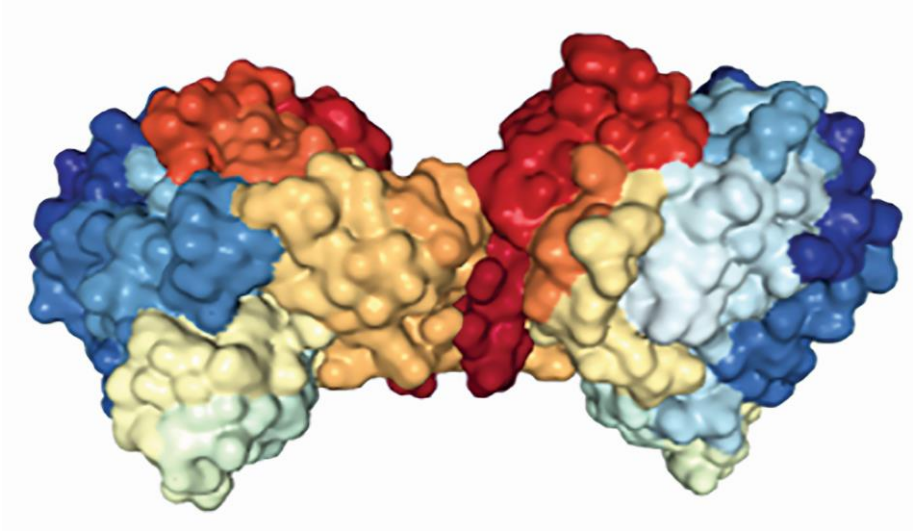
Hidrolizom ACh kontrolira se prijenos živčanih impulsa u kolinergičnoj sinapsi centralnog i perifernog živčanog sustava. Razgradnjom acetilkolina u sinaptičkoj pukotini djelovanjem enzima acetilkolinesteraze (AChE) uspostavlja se polarizacija postsinaptičke membrane i prijenos impulsa prestaje.

Otpušteni ACh ima kratak poluživot, budući da je AChE jedan od najučinkovitijih enzima; brzina hidrolize za ljudsku AChE, *kcat*, iznosi oko 400 000 min^{-1}.[71]

Trenutno su poznata dva tipa ChE; acetilkolinesteraza (AChE) i butirilkolinesteraza (BChE). AChE se naziva i „prava kolinesteraza“, dok je BChE je poznata i kao „pseudokolinesteraza“, jer hidrolizira brojne estere kolina i druge nekolinske estere (butirilkolin, sukcinilkolin, acetilkolin, acetilsalicilnu kiselinu, kokain i heroin).

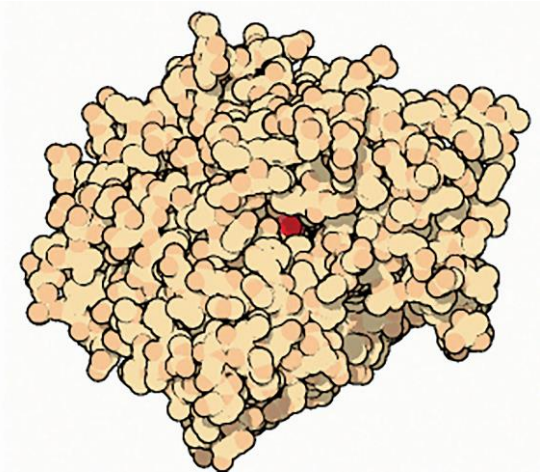
Prema enzimskoj nomenklaturi iz 1992. godine, kolinesteraze se svrstavaju u skupinu hidrolaza, podskupinu esteraza i pod-podskupinu hidrolaza estera karboksilnih kiselina. Građene su od 12 β-nabranih ploča okruženih i s 14 α-uzvojnica, što ih klasificira u skupinu hidrolaza α/β-strukture.[68,70,71]

U normalnom mozgu BChE je prisutna, u odnosu na ukupne ChE, s udjelom od 10%, dok je više zastupljena u jetri, plućima, srčanom tkivu i krvnoj plazmi. Obje ChE su serinske esteraze, koje se javljaju kao globularni monomeri (G1), dimeri (G2) i tetrameri (G4) katalitičkih subjedinica, kao i asimetrične molekule s jednim, dva ili tri tetramera. Katalitička aktivnost ChE u ljudskom mozgu je najviše povezana sa G4.[68]



Slika 2.27. Kristalna struktura dimera ljudske AChE (EC 3.1.1.7) (RCS PDB 4PQE)[72]

Mehanizam hidrolize acetilkolina je prilično složen. Supstrat se u početku hidrolize veže za vanjski rub aktivnog mjesta, na perifernom alosteričkom mjestu. Hidroliza supstrata se odvija u unutrašnjosti enzima koju sačinjava *katalitička trijada*, *oksianionska šupljina*, *mjesto vezivanja kolina* i *acilni džep*. Veličina aktivnog mjesta, oblika ždrijela, koje sačinjavaju prethodno spomenute domene, je 5 x 20 Å.



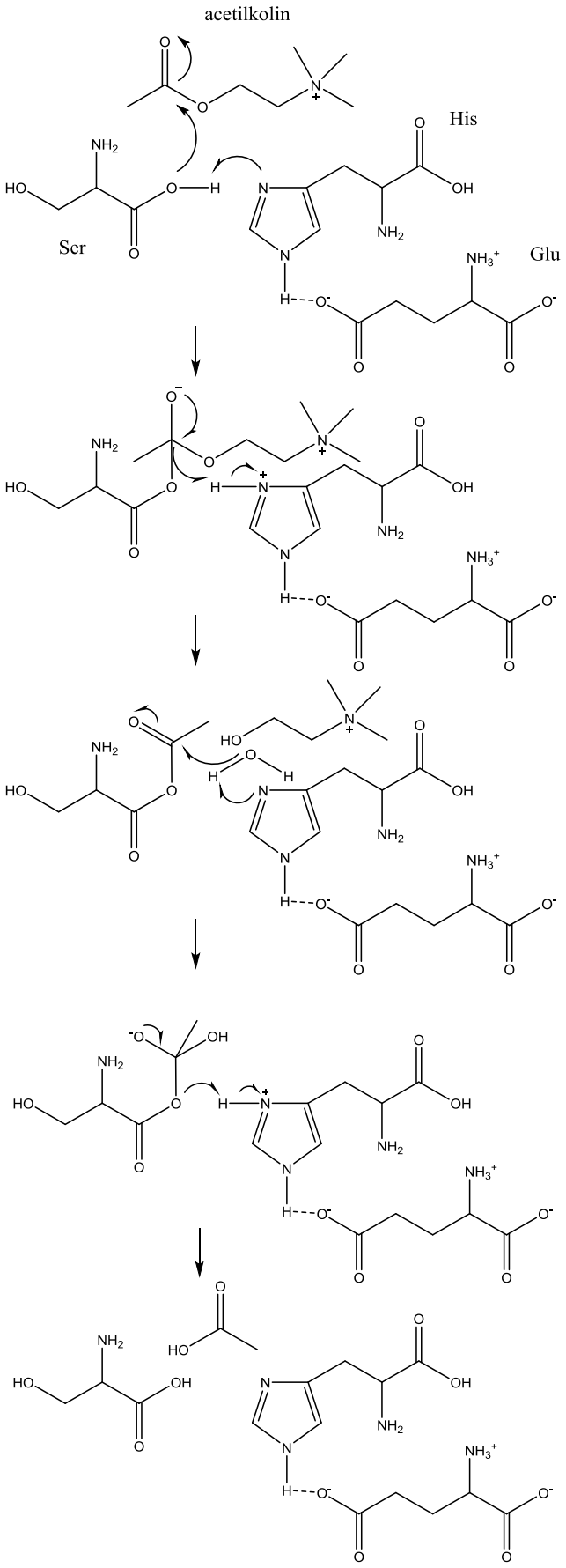
Slika 2.28. Aktivno mjesto ljudske AChE - označeno crveno (RCS PDB 101)[73]

Katalitičku trijadu čine serin, histidin i glutaminska kiselina. Aminokiselinski ostatci serina sudjeluju u nukleofilnom napadu na karbonilni ugljik supstrata. Pri tom histidin stabilizira serin vodikovim vezama, a negativno naelektrizirani glutamat stabilizira kation histidina (**slika 2.29.**). Donori vodika iz *oksianionske šupljine* stabiliziraju nastali tetraedarski intermedijer.

Mjesto vezanja kolina sadrži aromatske aminokiseline koje reagiraju s veznim mjestom kolina kroz kation-π interakcije. Triptofan orijentiranjem omogućava smještanje naelektriziranog dijela supstrata. Kolinsko mjesto BChE nije specifično za pozitivno nabijene ligande.

Acilni džep omogućava smještanje acilne skupine supstrata, određujući tako njegovu orijentaciju prema aktivnom serinu i ostatku enzima.

Kod BChE su neke aromatske aminokiseline u acilnom džepu i perifernom mjestu zamijenjene alifatskim aminokiselinama, čime se omogućava prolaz većih molekula supstrata k aktivnom mjestu enzima, tako da je selektivnost BChE manja u odnosu na AChE.[68,70]



Slika 2.29. Hidroliza acetilkolina katalizirana ChE[68]

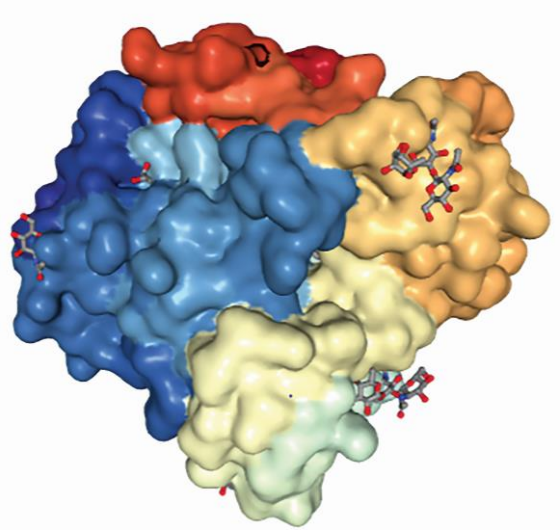
2.4.1. Inhibitori kolinesteraza

Inhibicija AChE onemogućava hidrolizu ACh, pa se time produžava njegova aktivnost u prijenosu živčanih impulsa. Ovaj koncept se primjenjuje u tretmanu bolesti koje karakterizira niska razina ACh, a proučava se i u okviru toksikologije zbog bolesnih stanja i smrti izazvanih povećanom kolinergičkom stimulacijom.[70]

Alzheimerova demencija (AD) je najčešći neurodegenerativni poremećaj i uzrok demencije kod starije populacije. Pogađa oko 2% populacije u industrijski razvijenim zemljama. U sljedećih pedeset godina čekuje se povećanje broja oboljelih za oko tri puta. AD karakterizira nastanak neuritičkih plakova; ekstracelularnih nakupina fibrila i amiloid-β-pepida te neurofibrilarnih čvorova; intracelularnih nakupina τ-proteina, u regijama mozga odgovornim za učenje, pamćenje i emocionalno ponašanje. Ove promjene uzrokuju degeneraciju neurona, gubitak kolinacetiltransferaza (ChAT) i acetilkolinesteraza (AChE), što se očituje u gubitku neurotransmitera i drugih neuromodulatora te onemogućavanju sinaptičke transmisije.[68] Trenutno je terapija ove bolesti ograničena na tretman simptoma bolesti, za što se koriste inhibitori enzima kolinesteraza (ChE).

Inhibitori ChE mogu biti reverzibilni; koji se vežu nekovalentnim interakcijama ili ireverzibilni; koji se kovalentno vežu za serin katalitičke trijade. Reverzibilni inhibitori vežu se u aktivno mjesto, na periferno mjesto ili na oba, pa inhibicija nastaje kao posljedica konformacijskih promjena enzima, elektrostatskih interakcija inhibitora i kationskog dijela supstrata te steričkih i/ili elektrostatskih smetnji ulasku supstrata u aktivni centar enzima. Obilježje strukture dobrih inhibitora kolinesteraza je prisustnost pozitivnog naboja i/ili aromatskih ili hidrofobnih supstituenata koji olakšavaju ulazak i smještanje inhibitora u aktivno mjesto enzima.[68]

Sintetski AChE inhibitori kao što su fizostigmin, takrin i donepezil izazivaju nuspojave, kao što su hepatotoksičnost i gastrointestinalne smetnje. Ireverzibilni inhibitori mogu izazvati ozbiljne posljedice, pa i smrt, kao što je slučaj sa otrovnim plinom sarinom, pa se reverzibilnim inhibitorima u tom pogledu daje prednost.[74]

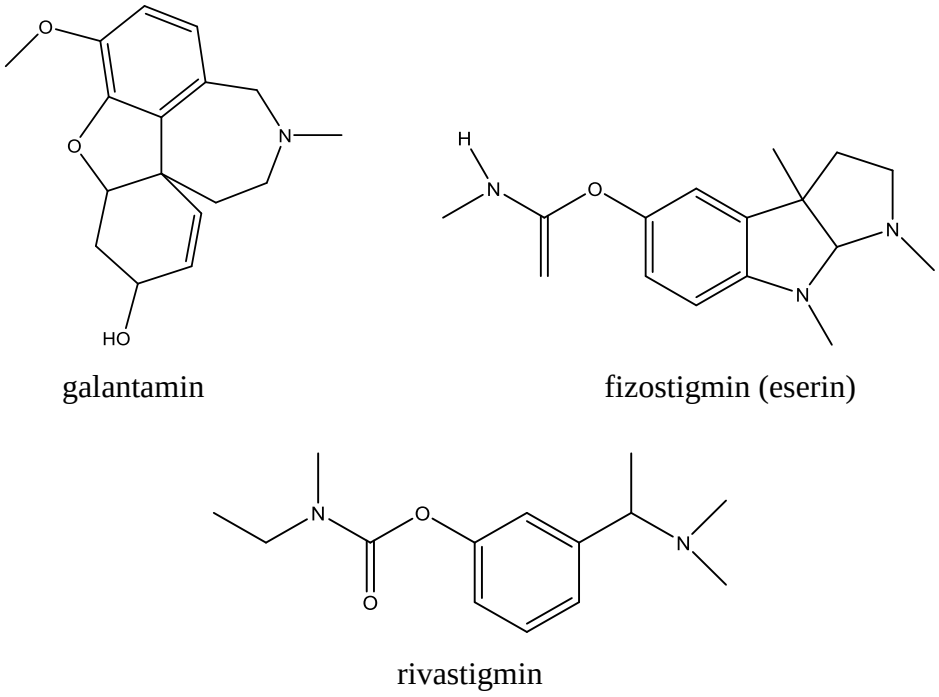


Slika 2.30. Kompleks ljudske BChE i inhibitora takrina (RCS PDB 4BDS)[75]

2.4.1.1. Fitokemikalije kao inhibitori kolinesteraza

Mnoge fitokemikalije su bioaktivni spojevi, od kojih neke pokazuju ChE inhibicijsku aktivnost i predstavljaju model za razvoj novih lijekova, inhibitora ChE.

Galantamin, prirodni alkaloid i rivastigmin, sintetski alkaloid, su dva inhibitora kolinesteraza koji se koriste kao terapeutici. Rivastigmin je razvijen prema modelu prirodnog alkaloida fizostigmina (eserin) (**slika 2.31.**). Inače, veći broj alkaloida je aktivan u pogledu inhibicije kolinesteraza, pri submikromolarnim koncentracijama. Sljedeće klase spojeva, kvinoni i stilbeni, se također ispituju u pogledu inhibicije kolinesteraza. Među njima se ističu sargakvinolinska kiselina i (+)-α-viniferin.[68]

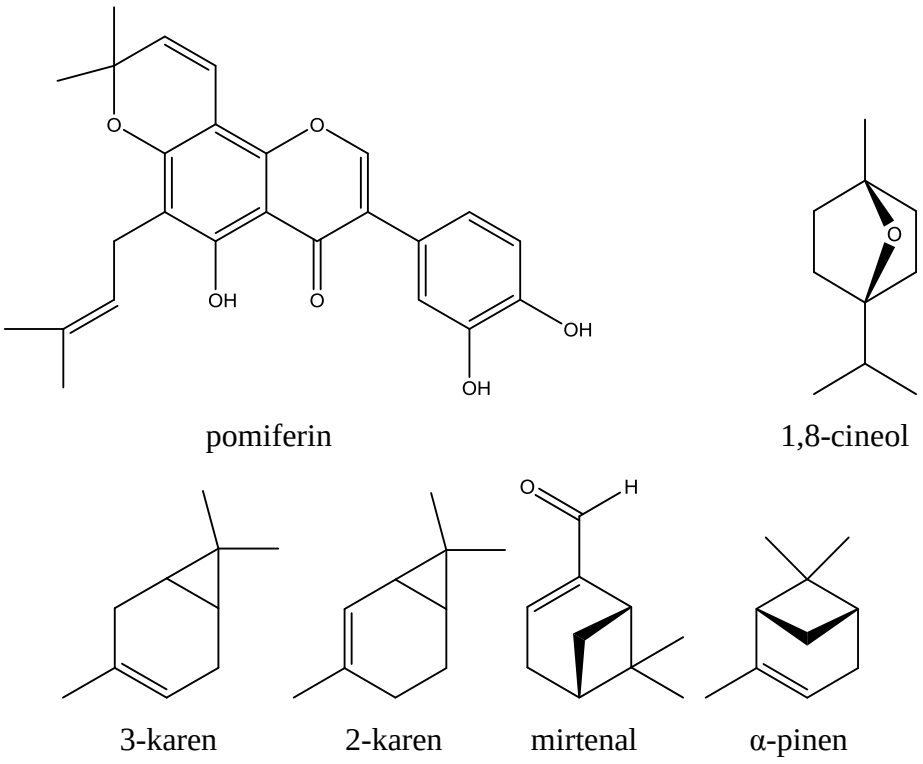


galantamin fizostigmin (eserin)

rivastigmin

Slika 2.31. Neki alkaloidi inhibitori kolinesteraza

Od flavonoida najbolju aktivnost pokazuju flavoni i izoflavoni, dok ksantoni i monoterpeni pokazuju slabiju aktivnost pri inhibiciji kolinesteraza (**slika 2.32.**).[68]



pomiferin 1,8-cineol

3-karen 2-karen mirtenal α-pinen

Slika 2.32. Neki izoflavoni i monoterpeni inhibitori kolinesteraza

Budući da BChE ima regulacijsku ulogu u hidrolizi ACh, terapeutici koji bi inhibirali obje ChE mogli bi djelovati na dodatne pozitivne učinke u tretmanu AD, u odnosu na inhibitore, koji inhibiraju samo AChE. Tako je rivastigmin, koji inhibira obje ChE, veoma uspješan u terapiji AD. Do sad nema saznanja o tome da su BChE inhibitori efikasniji u reduciranju simptoma AD, u odnosu na inhibitore AChE.[68]

U tradicionalnoj medicini brojne biljke se koriste u tretmanu kognitivnih poremećaja, uključujući i neurodegenerativne bolesti. Etnofarmakološki pristup, testiranje biološke aktivnosti i izolacije omogućili su identifikaciju potencijalnih AChE inhibitora biljnog podrijetla. Pri tom su od posebnog interesa multifunkcionalni spojevi s više komplementarnih bioloških funkcija. Biljni ekstrakti su glavni izvori novih spojeva, inhibitora AChE.[4] Poseban interes u tom pogledu izazivaju polifenoli, zbog njihovog pozitivnog učinka na zdravlje ljudi.[74]

S obzirom na prethodno navedeno, brojni biljni ekstrakti i eterična ulja, kao i njihove komponente, se proučavaju u smislu ChE inhibicijske aktivnosti.[68,70,74]

2.5. Tehnike određivanja kemijskog sastava eteričnih ulja i ekstrakata

2.5.1. Vezni sustav plinski kromatograf - maseni spektrometar (GC/MS)

Eterična ulja su kompleksne smjese sačinjene uglavnom od monoterpenskih i seskviterpenskih ugljikovodika te njihovih oksidiranih derivata. Zbog svoje jednostavnosti, brzine i efikasnosti u identifikaciji i kvantizaciji sastavnica eteričnih ulja najčešće se koristi plinska kromatografija.[76]

Primarni cilj kromatografske separacije je potpuno odvajanje spojeva od interesa u što kraćem vremenu. Plinski kromatograf koristi zagrijane kapilarne kolone iznutra obložene odgovarajućom stacionarnom fazom za razdvajanje sastojaka smjese. Mala količina uzorka, oko 10^{-6} g ubacuje se u zagrijani injektor, gdje laganim protokom plina helija biva unesen u kolonu. Komponente se odvajaju u kromatografskoj koloni na osnovu njihovih relativnih tlakova para i afiniteta prema stacionarnoj fazi, pa iz kolone izlaze pri različitom vremenu zadržavanja ili retencijskom vremenu (Rt). Hlapljive komponente, koje se slabije vežu za stacionarnu fazu, prolaze brže od manje hlapljivih komponenti. Spojevi se detektiraju, a dobiveni signali bilježe u obliku kromatograma, grafika funkcije vremena i zabilježenog signala. Podatci iz kromatograma se koriste za

kvalitativnu i kvantitativnu analizu; retencijsko vrijeme spoja za njenu identifikaciju, dok površina ispod pika i njegov intenzitet ovise o količini ispitivane tvari.

Pri analizi eteričnih ulja plinskom kromatografijom najčešće se koriste kapilarne kolone, duljine 25 - 50 m, s unutarnjim promjerom 0,20 – 0,32 mm i debljinom stacionarne faze od 0,25 μm. U kolonama s nepolarnom stacionarnom fazom separacija se odvija na osnovu razlike u točkama vrelišta različitih spojeva, dok se na polarnim stacionarnim fazama supstance odvajaju na osnovu razlike u polarnosti. S obzirom da sastavnice eteričnih ulja imaju slične točke vrelišta, na nepolarnim kolonama one imaju slična retencijska vremena. Da bi se to izbjeglo koristi se postepeno povećanje temperature u peći ili se koriste polarne kolone u kojima se više zadržavaju oksidirani spojevi u odnosu na neoksidirane. Tako se u početku separacije koriste niže temperature da bi se odvojile najhlapljivije komponente, a potom se temperatura povećava od 5 do 10 ºC po minuti, da bi se postigla temperatura od 200 ºC, pri kojoj hlape terpeni najveće mase.

S ciljem identifikacije i kvantizacije sastojaka složenih smjesa tvari, kakva su eterična ulja, plinski kromatograf se vezuje uz različite detektore. Takvi su: plameno-ionizacijski detektor (FID, engl. *Flame Ionization Detector*), detektor toplinske vodljivosti (TCD, engl. *Thermal Conductivity Detector*), spektrometar masa (MS, engl. *Mass Spectrometer*) i drugi detektori. Kao važan parametar kod identifikacije sastojaka smjesa koriste se i retencijski indeksi. Sustav retencijskih indeksa se zasniva na činjenici da se svaki analit referira u odnosu na njegovu poziciju između dva susjedna *n*-alkana, između čijih retencijskih vremena je njegovo retencijsko vrijeme. Računanje indeksa se zasniva na linearnoj interpolaciji duljine lanca ugljika susjednih *n*-alkana. Najčešće se primjenjuju logaritamska jednadžba koju je razvio Kovats 1958. godine za izotermalne uvjete te jednadžba koja je predložena od strane Van den Doola i Kratza, 1963. godine, koja nema logaritamski oblik i koristi se u slučajevima temperaturno programiranih uvjeta. Sustav retencijskih indeksa je zasnovan na odnosu povećanja strukture i retencije, što znači da ovaj koncept nije ograničen na uporabu *n*-alkana kao standarda, koji se najčešće koriste kod karakterizacije hlapljivih komponenti.[77]

Masena spektrometrija daje podatak o molekulskoj masi te informacije o molekulskoj strukturi. Uzorak se bombardira elektronima visoke energije koji cijepaju molekulu. Mjere se mase nastalih fragmenata i te se informacije rabe da bi se

rekonstruirala molekula. Analit se može ionizirati na više načina: termalno, pomoću električnog polja ili djelovanjem visokoenergetskih elektrona, iona ili fotona. Iako se uzorak uništava pri analizi ovom tehnikom, ona je osjetljiva i potrebna je manja količina uzorka.

Maseni spektrometar ionizira molekule u visokom vakuumu, razvrstava dobivene ione prema njihovim masama te bilježi zastupljenost iona svake vrste. Maseni je spektar graf na čiju se x-os nanose mase, a na y-os relativni broj iona određene mase. Za ionizaciju uzorka i za odvajanje iona različitih masa primjenjuje se nekoliko metoda, među kojima su najčešće ionizacija udarom elektrona i magnetsko otklanjanje pri odvajanju iona. Fragmentiranjem molekule se dobiva smjesa iona; molekulski ion (M^+) čija masa odgovara masi početne molekule i fragmenti čija je masa manja. Maseni spektrometar detektira pozitivno i negativno nabijene fragmente.

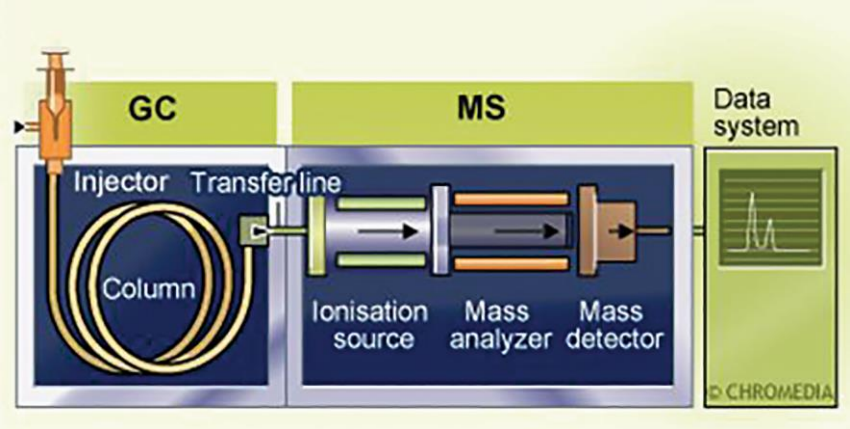
Ioni se najčešće odvajaju otklanjanjem u magnetskom polju. Pozitivno nabijeni ioni bivaju privučeni akceleratorskom pločom. Ulaskom u evakuiranu cijev, smještenu između polova magneta, nabijene čestice se otklanjaju od pravocrtnog gibanja zbog magnetskog polja okomitog na smjer njihovog kretanja. Lakši ioni se otklanjaju više od težih iona. Točan promjer otklona puta ovisi o omjeru mase i naboja iona *m/z*. Na kraju cijevi je drugi otvor, iza kog je smješten detektor iona spojen na pojačalo. Signal u detektoru proporcionalan je zastupljenosti iona koji udaraju u njega. Često korišteni analizator je i stupica za ione (engl. *Ion Trap*). Ioni generirani u ionizatoru dospijevaju u stupicu za ione, gdje bivaju zadržani unutar trodimenzionalnog električnog polja koje se nalazi u vakuumu. Prostor u kom dolazi do zadržavanja iona je najčešće okružen dvjema kružnim i dvjema polukružnim elektrodama. Ioni u stupici osciliraju sve dok se zbog promjene napona iz stupice ne izbace, a potom dolaze do detektora.

U tiskanom masenom spektru, koji se prikazuje kao histogram ili tablica relativne zastupljenosti masa, sve su mase zaokružene na najbliži cijeli broj masenih jedinica. Zastupljenost signala je prikazana kao postotak od najvećeg tzv. baznog (osnovnog) signala.[78]

Poznat je veliki potencijal spregnutih tehnika plinska kromatografija - masena spektrometrija (GC/MS) kod analize hlapljivih komponenti (**slika 2.33.**). Najjednostavnija i najčešće korištena metoda identifikacije kod GC/MS tehnike se

zasniva na usporedbi nepoznatog masenog spektra sa masenim spektrima u referentnoj biblioteci masenih spektara.

Većina sustava koji su kombinacija plinskog kromatografa i masenog spektrometra za razdvajanje iona imaju kvadrupolni analizator masa. U visokom vakuumu ioni prolaze duljinom četiriju šipki koje stvaraju oscilirajuće električno polje, koje uzrokuje da ioni prolaze složenim putovima i samo oni određene mase mogu doći u detektor. Mijenjanjem napona se u manje od 1 sekunde može mjeriti širok raspon masa. Tako je moguće snimiti brojne masene spektre komponenata uzorka, te ih snimiti na računalne diskove. Kombinacijom plinske kromatografije i masene spektrometrije omogućeno je odvajanje komponenata smjesa u plinskom kromatografu te njihova identifikacija prema masenim spektrima.[77]



Slika 2.33. Shema veznog sustava GC/MS

2.5.2. Visokoučinska tekućinska kromatografija (HPLC)

Visokoučinska tekućinska kromatografija (HPLC, engl. *High-Performance Liquid Chromatography*) je tehnika koja se može koristiti u preparativne i analitičke svrhe. Kod analitičke primjene HPLC tehnike, ista se koristi za kvantitativno određivanje pojedinih spojeva, kontrolu čistoće prirodnih proizvoda te pri kemotaksonomskim ispitivanjima.

HPLC tehnika se najčešće koristi za separaciju i kvantifikaciju pojedinih fenolnih komponenti iz smjese. Kod HPLC obrnutih faza uzorak i kolona su nepolarani, dok je mobilna faza polarno otapalo ili smjesa otapala. Silika gel (SiO_2) u koloni je

modificiran, tj. presvučen je nepolarnim ugljikovodicima, najčešće C-18 duljine lanca (oktadecilsilil vezana - ODC, RF-18 ili C_{18} faza).

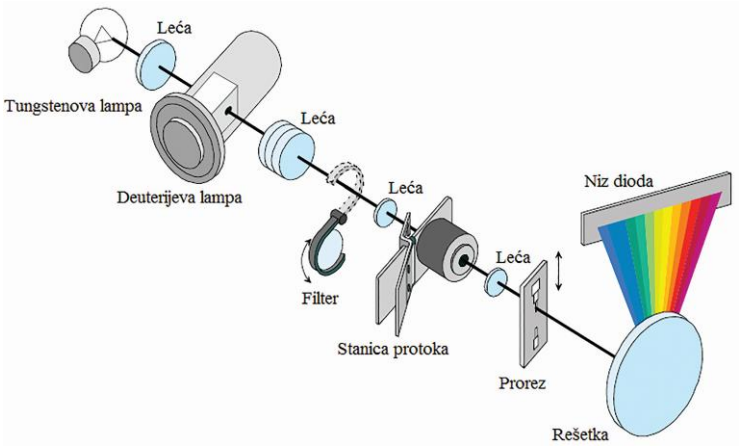
Na ovim fazama flavonoid glikozidi se eluiraju prije aglikona, a flavonoidi sa većim brojem hidroksilnih skupina se eluiraju prije manje supstituiranih analoga. Flavanoni se eluiraju prije odgovarajućih flavona, zbog efekta nezasićene veze između C-2 i C-3.

Najčešće se koristi binarni sistem otapala, od kojih je jedno zakiseljena voda, a drugo polarno organsko otapalo. Uobičajena je primjena smjesa acetonitril-voda ili metanol-voda, sa ili bez dodatka kiseline, pri čemu se koristi gradijentno ispiranje i UV detekcija. Dodatak kiseline suzbija ionizaciju hidroksilnih skupina, što rezultira oštrijim vrpcama i manjem proširivanju istih. Kada se odvajaju kisele forme fenolnih spojeva, najčešće se koristi pH otopine od 2,5 do 3, dok se pH od 5 do 7 koristi za odvajanje fenolnih spojeva u disociranom obliku. Parcijalna disocijacija rezultira dodatnim pikovima, širenjem i asimetrijom pikova, zbog koeluiranja kisele forme i baznog konjugiranog oblika.[79]

Odvajanje je moguće izvršiti izokratskim ili gradijentnim eluiranjem. Izokratsko eluiranje podrazumijeva istu mobilnu fazu tijekom odvajanja i ovakva separacija je dobra za polarnije spojeve. Gradijentno eluiranje je bazirano na modificiranju organskog otapala, najčešće acetonitrila i metanola tijekom analize. Ovakav režim je pogodan kada su fenolni spojevi širokog raspona polarnosti. Pri tom je potrebno više vremena za stabiliziranje kolone, a može doći i do promjena na baznoj liniji, zbog promjene sastava mobilne faze.

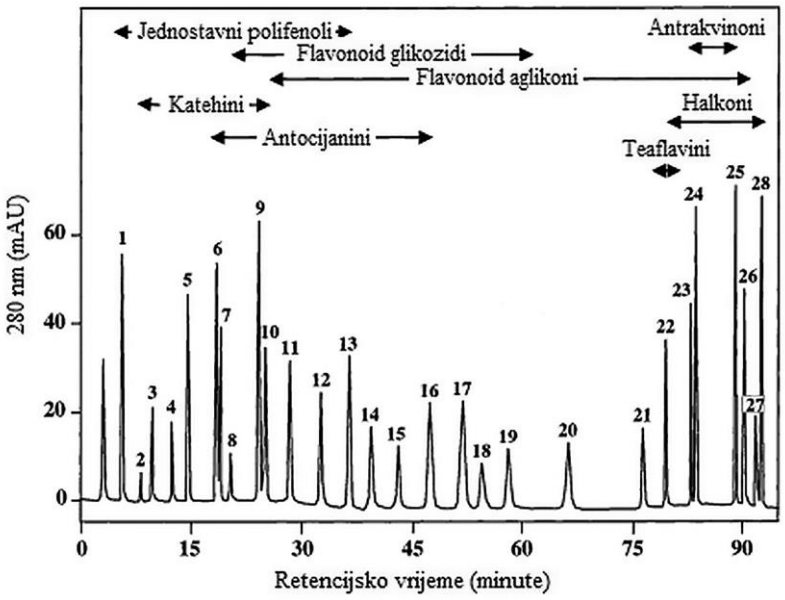
Komponente smjese nepolarnog karaktera provode više vremena u stacionarnoj fazi, dok se polarne brže kreću kolonom nošene polarnom mobilnom fazom. Duljina kolona se kreće od 100 do 300 mm, a unutarnji promjer između 2 i 5 mm. Promjer čestica stacionarne faze je od 3 do 10 μm, najčešće 5 μm. Razdvajanje može trajati od 5 i više od 90 minuta.[79]

Najčešće korištena metoda detekcije za HPLC je UV spektrofotometrija. Pored UV detektora u sprezi s HPLC, mogu se koristiti i maseni (MS) te NMR detektori (NMR, engl. *Nuclear Magnetic Resonance Detectors*). Primjenom UV-VIS detektora sa nizom fotodioda (DAD, engl. *Diode Array Detection*) moguće je simultano snimanje kromatograma na različitim valnim duljinama (**slika 2.34.**). Isti se pohranjuju te kasnije usporedbom sa spektrima iz baze podataka koriste za identifikaciju signala pojedinih vrpci, odnosno spojeva te za njihovu kvantifikaciju.[28]



Slika 2.34. Shematski prikaz DAD detektora

Ne postoji jedna idealna valna duljina za određivanje svih klasa flavonoida, budući da isti pokazuju apsorpcijski maksimum na različitim valnim duljinama. Kod rutinske detekcije uobičajena je valna duljina od 280 nm, koja predstavlja prihvatljiv kompromis.[80] Tipičan HPLC profil za 28 referentnih polifenola je prikazan na **slici 2.35.** Za ovu analizu je korištena kolona C18 UG120 Shiseido, mobilna faza A - 50 mM natrijev fosfat i 10% metanol te mobilna faza B - 70% metanol.



Slika 2.35. Tipičan HPLC profil 28 referentnih polifenola[80]

(1. galna kiselina, 2. galokatehin, 3. protokatehinska kiselina, 4. β-rezorcilna kiselina, 5. klorogenska kiselina, 6. kafeinska kiselina, 7. epigalokatehin galat, 8. sesamol, 9. *p*-kumarinska kiselina, 10. daidzein-7-*O*-glukozid, 11. katehin galat, 12. luteolin-3',7 *O*-glukozid, 13. *o*-kumarinska kiselina, 14. luteolin-7-*O*-glukozid, 15. kvercetin-3-*O*-rutinozid, 16. hesperetin-7-*O*-rutinozid, 17. miricetin, 18. apigenin-7-*O*-glukozid, 19. kempferol-3-*O*-glukozid, 20. daidzein, 21. kvercetin, 22. luteolin, 23. kempferol, 24. apigenin, 25. flavon, 26. galangin, 27. flavonol, 28. halkon)

2.5.3. UV/VIS spektroskopija

Spektroskopske metode analize se zasnivaju na interakciji elektromagnetskog zračenja i ispitivane supstance. Dijele se na emisijske, apsorpcijske i spektroskopiju raspršenja. UV/VIS spektroskopija spada u spektroskopske apsorpcijske metode analize.

Apsorpcijski spektri u ultraljubičastom (UV) i vidljivom (VIS) dijelu spektra nastaju zbog prijelaza elektrona s nižih na više energetske razine. Položaj apsorpcijske vrpce u spektru je definiran razlikom između dvije energetske razine. U molekulskoj UV/VIS spektroskopiji ektronska struktura molekule određuje apsorpciju zračenja. Apsorpcija/emisija energije zračenja je kvantizirana, tako da do apsorpcije energije fotona dolazi samo ako je ta energija jednaka razlici energija između osnovnog i pobuđenog stanja ΔE:

$$\Delta E = \frac{hc}{\lambda}$$

pri tom su: h – Planckova konstanta $6{,}63 \cdot 10^{-34}$ Js, c – brzina svjetlosti u vakuumu $3{,}0 \cdot 10^{8}$ m/s i λ - valna duljina zračenja u nm. Apsorpcija zračenja kvantitativno je definirana Lambert-Beerovim zakonom:

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I0}{Ib} = \varepsilon bc$$

gdje su: A – apsorbancija, T – transmitancija, I_0 – intenzitet upadnog zračenja, I_b – intenzitet propuštenog zračenja, ε – molarna apsorptivnost, b – debljina prozračnog sloja u cm i c – količinska koncentracija rastvora u mol/dm^3.

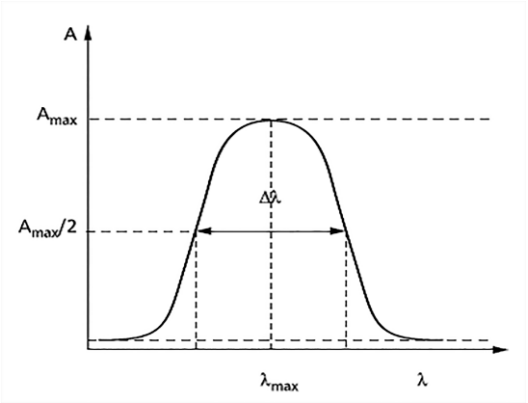
Molarna apsorptivnost ε je konstanta koja karakterizira sposobnost molekule da vrši karakterističnu apsorpciju zračenja. Ona je jednaka apsorbanciji neke molekulske vrste pri jediničnoj debljini prozračenog sloja i jediničnoj količinskoj koncentraciji. Apsorpcijski spektri prikazuju krivulju ovisnosti ε ili log ε i valne duljine zračenja izražene u nm ili valnog broja izraženog u cm^{-1}.

Elektronski spektri se obično snimaju u opsegu valnih duljina od 200 - 780 nm, pri čemu je ultravioletno (UV) područje od 200 - 380 nm i područje vidljive svjetlosti od 380 - 780 nm. Za snimanje spektara u vakuumskom UV području od 100 - 200 nm se koristi posebna vakuumska tehnika.

Apsorpciju zračenja u UV i VIS području spektra vrše elektroni u n, σ i π orbitalama, koji apsorpcijom energije zračenja prelaze u neku energetski višu protuveznu σ* ili π* orbitalu. Prema kvantnomehaničkim izbornim pravilima, u zavisnosti o strukturi molekule, mogući su sljedeći tipovi elektronskih prijelaza: $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$. Svakom od dozvoljenih elektronskih prijelaza odgovara jedna apsorpcijska vrpca u spektru, čija je valna duljina maksimuma (λ_{max}) mjera energije prijelaza, a ε_{max} mjera intenzivnosti apsorpcije zračenja.

U lako dostupnom UV dijelu spektra javljaju se apsorpcijske vrpce koje pripadaju $\pi \rightarrow \pi^*$ i $n \rightarrow \pi^*$ prijelazima, što znači da se UV spektri najčešće koriste za analizu spojeva sa višestrukim vezama. Skupine atoma u molekuli, koje sadrže bar jednu dvostruku vezu i daju sposobnost čitavoj molekuli da apsorbira elektromagnetsko zračenje u UV ili vidljivom dijelu spektra nazivaju se kromofori. Kromofori mogu biti izolirani; kad sadrže samo jednu nezasićenu vezu ili složeni (konjugirani); u koje spadaju atomske skupine koje sadrže više konjugiranih dvostrukih veza. Složeni kromofori, za razliku od izoliranih, pokazuju apsorpciju na višim valnim duljinama.

Apsorpcijski spektar ovisi o sastavu i strukturi molekula, te se njegovim tumačenjem može izvršiti kvalitativna analiza, odnosno identificiranje analizirane supstance. Apsorpcijsku vrpcu (**slika 2.36.**) karakterizira položaj vrpce, odnosno valna duljina na kojoj molekula maksimalno apsorbira (λ_{max}), poluširina vrpce ($\Delta\lambda$) i molarni apsorpcijski koeficijent (ε).

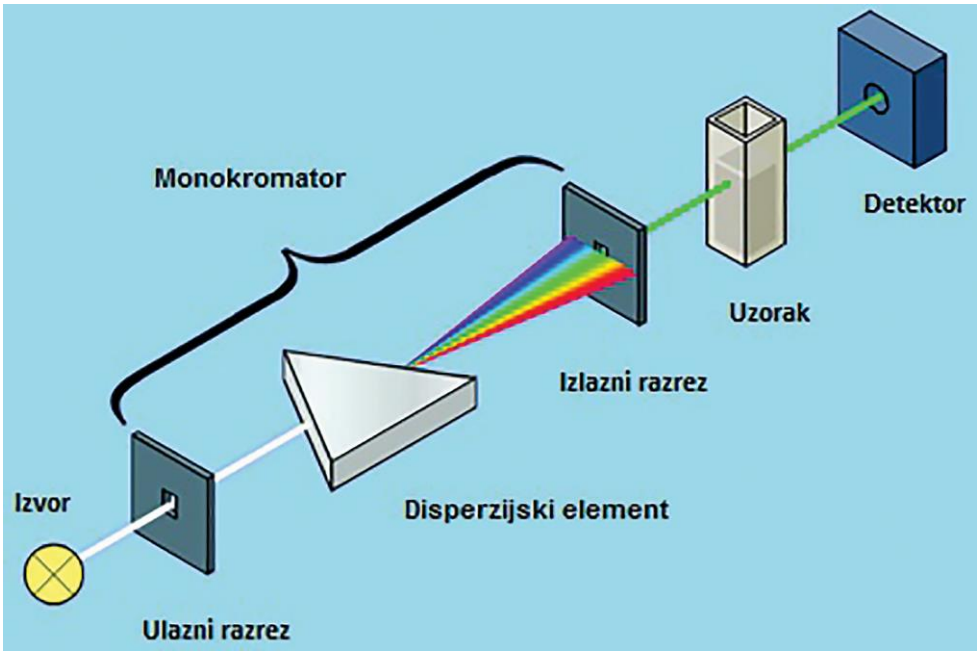


Slika 2.36. Apsorpcijska vrpca

Spektralni parametri koji se koriste u kvalitativnoj analizi su λ_{max} i ε jedne ili više apsorpcijskih vrpci. Poznavanjem ovih parametara i njihovom usporedbom s tabličnim vrijednostima te usporedbom cijelog spektra sa spektrima iz baze spektara

može se identificirati prisutni kromofor ili prisutni spoj. Za izračunavanje ε potrebno je poznavanje relativne molekulske mase spoja.

Kvantitativna analiza se zasniva na Lambert-Beerovom zakonu. Za određivanje koncentracije analizirane otopine najčeše se koristi metoda kalibracijske krivulje. Mjerenje apsorbancije vrši se na valnoj duljini na kojoj analizirana otopina najviše apsorbira ili nekoj drugoj optimalnoj valnoj duljini, čime se postiže najveća osjetljivost metode, koja je data koeficijentom $\Delta A/\Delta c$. Za niz otopina poznatih koncentracija izmjere se apsorbancije na valnoj duljini λ_{max} i konstruira dijagram A = f(c). Iz izmjerene apsorbancije Ax za otopinu nepoznate koncentracije, s kalibracijske krivulje se grafičkim putem odredi cx.[81]



Slika 2.37. Shematski prikaz UV-VIS spektrofotometra

2.5.3.1. Određivanja ukupnih fenola i flavonoida

Kvantifikacija fenolnih komponenti ovisi o njihovim kemijskim svojstvima, metodi ekstrakcije, veličini korištenog uzorka za ekstrakciju, uvjetima skladištenja, metodi određivanja, izboru standarda, prisustvu interferirajućih supstanci (voskovi, masti, terpeni i klorofil).[79]

Određivanje ukupnih fenola

Za određivanje ukupnih fenola nekog uzorka najčešće se koristi metoda po Folin-Ciocalteu,[82] koji se zasniva na prijenosu elektrona sa fenolne komponente na heksavalentni fosfomolibdo/fosfovolframov kiseli kompleks u baznoj sredini. Pri tom se boja iz žute mijenja u plavu, zbog nastanka kompleksa, s maksimumom apsorbancije kod valne duljine od 765 nm.

Određivanje ukupnih flavonoida

Kvantifikacija ukupnih flavonoida zasniva se na formiranju kompleksa flavonoida sa Al(III).[83] Jedna od osobina flavonoida je kompleksiranje metalnih kationa (kao što je Al^{3+}), pri čemu dolazi do formiranja kelata, proširenja delokalizacije i pomijeranja UV i VIS apsorpcijskih vrpci za oko 50 nm prema višim valnim duljinama (batokromni efekt), tj. boja otopine se mijenja iz žute u žuto-zelenu ili intenzivniju žutu. Za nastanak stabilnih kompleksa potrebna je okso-skupina u položaju 4 i -OH skupina u položaju 3 ili 5. Optimalna pH vrijednost za formiranje kompleksa je oko pH 6. Kod valne duljine od 415 nm flavonoli najjače apsorbiraju, flavoni znatno slabije, dok flavanoni i izoflavoni vrlo slabo.

2.6. Metode određivanja biološke aktivnosti eteričnih ulja i ekstrakata

2.6.1. Određivanje antioksidacijskog potencijala eteričnih ulja i ekstrakata

Antioksidansi su molekule koje sprječavaju, inhibiraju ili zaustavljaju proces oksidacije bioloških molekula u različitim fazama ovog složenog procesa. Za mjerenje antioksidacijskog potencijala tvari iz prirodnih izvora koristi se veliki broj različitih metoda, koje je moguće podijeliti u dvije skupine: metode kojima se mjeri sposobnost hvatanja slobodnih radikala i metode kojima se mjeri sposobnost inhibicije procesa oksidacije. Da bi se izbjegli lažni, bilo pozitivni ili negativni rezultati, potrebno je pri testiranju molekula ili smjesa tvari koristiti različite metode.[84]

U ovom radu za mjerenje antioksidacijskog potencijala eteričnih ulja i ekstrakata korištene su sljedeće *in vitro* metode; metoda mjerenja redukcijskog potencijala

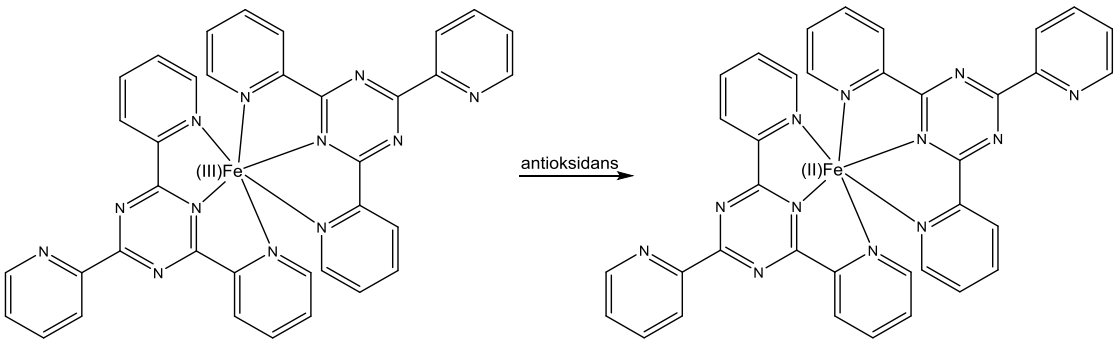
antioksidansa (FRAP, engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*), metoda koja uključuje mjerenje sposobnosti uklanjanja slobodnih DPPH radikala (DPPH, engl. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical*), metoda testiranja sposobnosti zaštite lipida od oksidacije te metoda testiranja sposobnosti zaštite proteina od oksidacije.

Pored metoda koje se temelje na prijenosu elektrona, kao što su spomenute FRAP i DPPH, često se kod određivanja antioksidacijske aktivnosti koriste metode koje se zasnivaju na prijenosu atoma vodika, kao što su ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) i metoda izbjeljivanja *β-karotena* te ostale metode, kao što su kelatiranje s ionima željeza ili bakra i BROR (inhibicija Briggs-Rauscher oscilirajućih reakcija).[85]

2.6.1.1. Metoda testiranja redukcijskog potencijala

FRAP metodom se testira ukupni redukcijski potencijal neke otopine. Metoda se temelji na prijenosu elektrona, pri čemu se kompleks željeza s 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazinom (Fe(III)-TPTZ kompleks) koristi kao oksidans.[9] Redukcijom žuto obojenog Fe(III)-TPTZ kompleksa u Fe(II)-TPTZ (**slika 2.38**), u prisutnosti antioksidansa i pri niskom pH, reakcijska smjesa mijenja boju u plavo s maksimumom apsorbancije kod valne duljine od 593 nm.

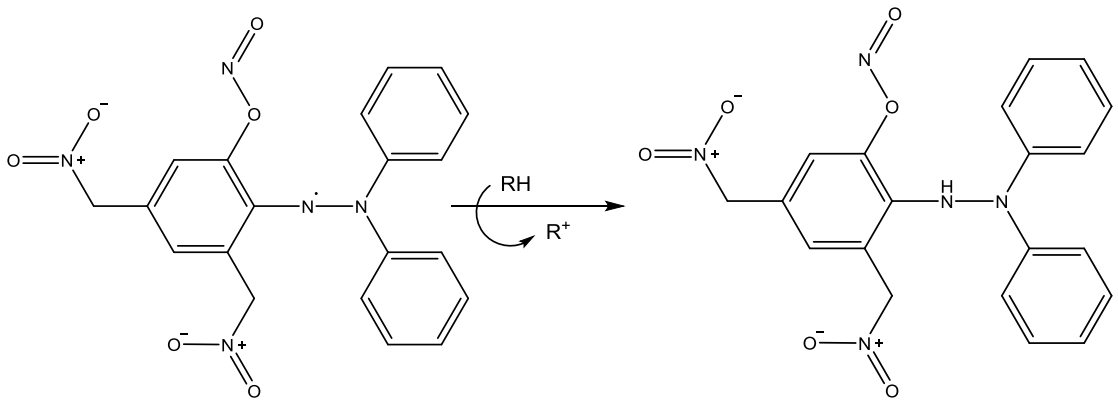
Usporedbom promjene apsorbancije reakcijske smjese pri λ=593 nm, sa onom za otopine fero iona poznate koncentracije, iz kalibracijske krivulje se očita ukupna redukcijska sposobnost antioksidansa u reakcijskoj otopini.



Slika 2.38. Mehanizam FRAP reakcije

2.6.1.2. Metoda testiranja sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala

DPPH metoda se zasniva na „gašenju“ slobodnih DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala antioksidansom. Antioksidans donira atom vodika ili elektron radikalu, pri čemu se isti reducira, a boja otopine slobodnih radikala prelazi iz izrazito ljubičaste u žutu (**slika 2.39.**). Promjena boje detektira se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 517 nm.[8]

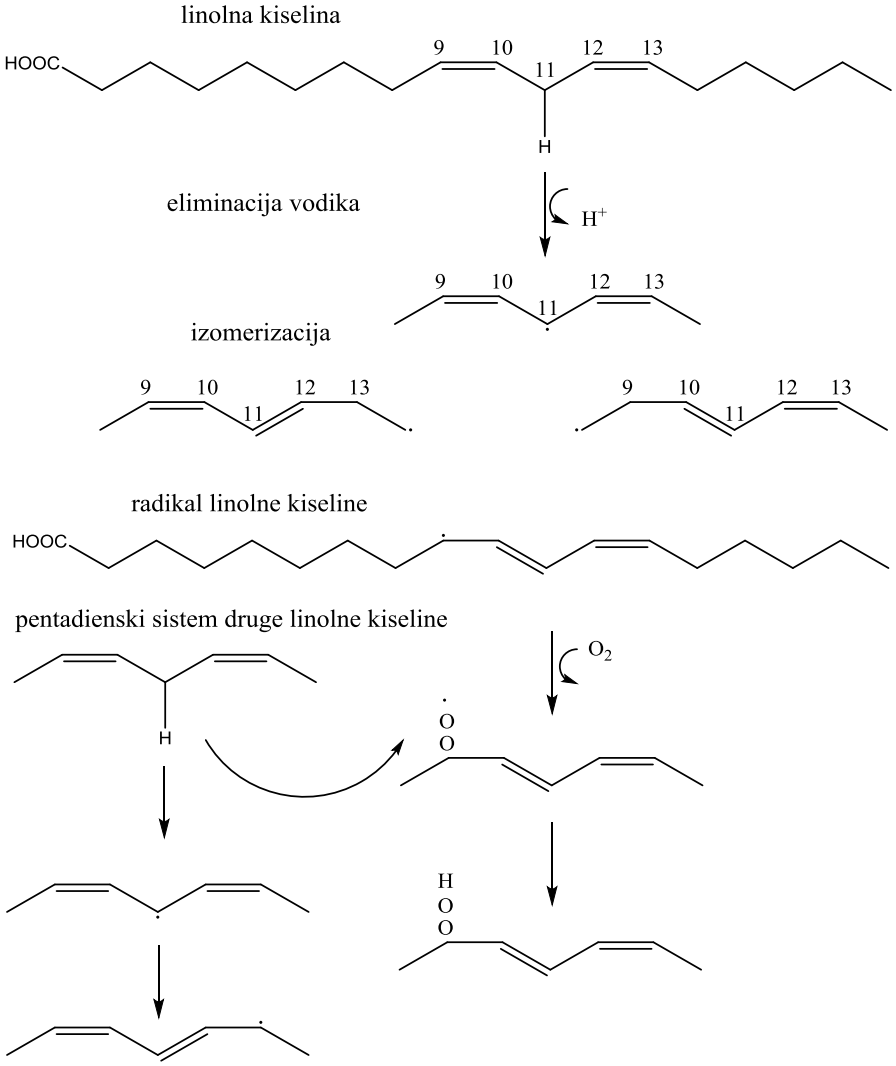


Slika 2.39. Mehanizam reakcije DPPH radikala s antioksidansom

2.6.1.3. Metoda zaštite lipida od oksidacije

Za mjerenje zaštitne uloge ekstrakata na razini lipida koristi se metoda s amonijevim tiocijanatom.[10] Metoda se zasniva na mjerenju količine nastalih peroksida nakon inkubacije linolne kiseline s ili bez dodatka antioksidansa. Nastali peroksidi reagiraju sa amonijevim tiocijanatom, pri čemu nastaje crveno obojeni kompleks s maksimumom apsorbancije pri λ=500 nm.

Linolna kiselina sadrži dvije dvostruke veze, te je podložna oksidaciji (**slika 2.40.**). Antioksidansi iz biljnog ekstrakta mogu ukloniti slobodan radikal u reakciji oksidacije linolne kiseline, te time prekinuti reakciju, što kao posljedicu ima nastanak manjeg broja peroksida.[3]



Slika 2.40. Oksidacija linolne kiseline - inicijacija i propagacija[3]

Hvatači slobodnih radikala (HSR) reagiraju s -peroksil ($LOO^{\bullet}$) i -alkoksil ($LO^{\bullet}$) radikalima sljedećom reakcijom:

$$LOO^{\bullet} \text{ ili } LO^{\bullet} + HSR \rightarrow LOOH \text{ ili } LOH + HSR^{\bullet}$$

2.6.1.4. Metoda zaštite proteina od oksidacije

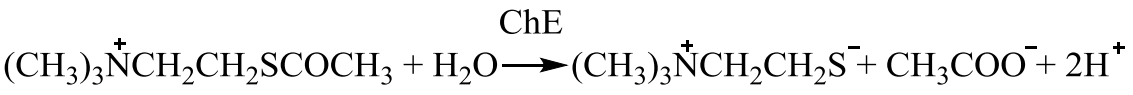
Metoda zaštite proteina od oksidacije se zasniva na praćenju oksidacije goveđeg serumskog albumina, BSA (BSA, engl. *Bovine Serum Albumin*) u reakciji kataliziranoj metalom Cu^{2+}/ H_2O_2 s ili bez prisustva ispitivanog ekstrakta.

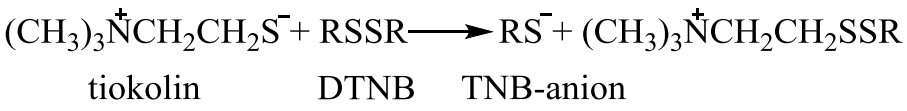
Zagrijavanjem reakcijske smjese potiče se oksidacija proteina, koja se prati mjerenjem količine karbonila, nastalih uslijed direktne oksidacije aminokiselinskih bočnih lanaca. Reakcijom nastalih aldehidnih ili keto funkcijskih skupina s 2,4-dinitrofenil hidrazinom (DNPH) nastaje DNP-hidrazon, čija se apsorbancija mjeri pri λ=370 nm. Reakcija se odvija u kiseloj sredini, a preostali DNPH se uklanja ispiranjem istaloženih proteina organskim otapalom.[11,12]

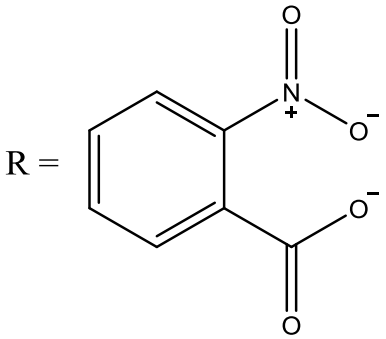
2.6.2. Metoda određivanja inhibicije enzima kolinesteraza

Za praćenje inhibicije enzima acetilkolinesteraza (AChE) i butirilkolinesteraza (BChE) eteričnim uljima ili ekstrakatima korištena je metoda po Ellmanu.[13]

Djelovanjem enzima AChE ili BChE dolazi do hidrolize acetiltiokolina, pri čemu nastaje tiokolin (TCh). U reakciji TCh s 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzojevom kiselinom) (Ellmanov reagens) nastaje 2-nitro-5-merkaptobenzojeva kiselina (TNB). Kod neutralnog ili alkalnog pH u vodenoj otopini TNB ionizira u TNB-anion. Nastali TNB-anion ima intenzivno žutu boju, s maksimumom apsorbancije pri λ=412 nm (**slika 2.41.**).







Slika 2.41. Ellmanova reakcija[13]

2.7. Pregled literature na temu dosadašnjih istraživanja

Određen je kemijski sastav eteričnog ulja *M. pulegium* s područja Rumunije,[86] Bugarske,[87] Urugvaja,[88] Srbije[89] i Egipta, gdje je ispitana i njegova antioksidacijska aktivnost DPPH metodom.[90] U više studija je određen je kemijski sastav eteričnog ulja *M. pulegium* s područja Maroka te je ispitana njegova antibakterijska,[91,92] antifungalna,[93] insekticidna[94] i antioksidacijska aktivnost DPPH metodom i metodom određivanja reducijske sposobnosti.[92] Određen je kemijski sastav eteričnog ulja *M. pulegium* s područja Irana, kao i njegova antimikrobna aktivnost.[95,96] Ispitan je utjecaj eteričnog ulja, vodenog i metanolnog ekstrakta *M. pulegium* s područja Irana na stabilnost biljnog ulja tijekom skladištenja. Njihova antioksidacijska aktivnost je ispitana DPPH metodom i metodom β-karoten/linolna kiselina.[97] Ispitan je kemijski sastav eteričnog ulja *M. pulegium* s područja Tunisa, njegova antimikrobna aktivnost,[98] te varijabilnost kemijskog sastava eteričnog ulja više populacija.[99]

Vodeni, etanolni ekstrakti i eterično ulje *M. pulegium* s područja Portugala ispitani su u pogledu inhibicije AChE te u pogledu antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom i metodom β-karoten/linolna kiselina.[100] Vodeni ekstrakti *M. pulegium* s područja Portugala ispitani su u pogledu inhibicije AChE prije i poslije gastrointestinalne digestije.[101] Vodeni, etanolni ekstrakt i eterično ulje *M. pulegium* s područja Portugala ispitani su u pogledu antibakterijske i antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom i metodom redu**c**irajuće sposobnost. Određen je kemijski sastav eteričnog ulja te sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima.[102] Etanolni ekstrakti *M. pulegium* s područja Hrvatske su ispitani u pogledu inhibicije AChE i antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom. Sadržaj ukupnih hidroksicimetnih kiselina je određen spektrometrijski, a HPLC tehnikom je određen sadržaj četiri hidroksicimetne kiseline.[66] U metanolnom ekstraktu *M. pulegium* s područja Turske određen je sadržaj ukupnih fenola, antoksidacijska aktivnost je ispitana ABTS i CUPRAC metodama te je ispitana aktivnost antioksidacijskih enzima.[103] *n*-Heksanski, diklormetanski, metanolni i vodeni ekstrakti *M. pulegium* s područja Maroka su ispitani u pogledu sadržaja ukupnih fenola te antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom, metodom β-karoten/linolna kiselina i metodom određivanja reducijske sposobnosti.[104] Etanolni ekstrakti *M. pulegium* s područja Alžira ispitani su u pogledu sadržaja ukupnih fenola i flavonoida te antioksidcijske aktivnosti ABTS i DPPH metodom i metodom cikličke

voltametrije. Ispitana je njihova antitirozinazna aktivnost. HPLC tehnikom je određen kemijski sastav ekstrakata.[22] Tankoslojnom kromatografijom je određen sadržaj ružmarinske kiseline u etanolnom ekstraktu *M. pulegium* s područja Alžira te je *in vitro* ispitana njegova sposobnost inhibicije oksidacije linolne kiseline.[105] Vodeni, metanolni i etil-acetatni ekstrakti *M. pulegium* s područja Alžira su ispitani u pogledu sadržaja ukupnih fenola te antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom i metodom β-karoten/linolna kiselina.[106] Etanolni ekstrakt *M. pulegium* s područja Irana je ispitan u pogledu sadržaja ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti DPPH i ABTS metodom.[107] Određen je sadržaj ružmarinske kiseline u *M. pulegium* s područja Irana.[23] HPLC tehnikom je ispitan kemijski sastav metanolnog ekstrakta *M. pulegium* s područja Grčke, određen je sadržaj ukupnih fenola, ispitan je antioksidacijski kapacitet rancimat metodom, a testirana je i antioksidacijska aktivnost.[108]

Ispitan je kemijski sastav eteričnog ulja *S. subspicata* s područja Bosne i Hercegovine, s jedne lokacije u dvije faze razvoja. Dodatno je ispitana njegova antibakterijska aktivnost, kao i antioksidacijska aktivnost DPPH metodom.[7] Određen je kemijski sastav eteričnog ulja četiri biljne vrste roda *Satureja* s područja Hrvatske, među kojima je ispitana i *S. subspicata* te je njihov kemijski profil uspoređen s njihovim DNK profilom.[109] Ispitan je kemijski sastav eteričnog ulja *S. subspicata* s područja Hrvatske, kao i njegova antibakterijska aktivnost.[110] Praćen je kemijski sastav eteričnog ulja *S. subspicata* s područja Hrvatske, u tri različite faze razvoja, kao i njena glanduralna struktura.[111] Sedam populacija *S. subspicata* s područja Hrvatske ispitano je u pogledu kemijskog sadržaja eteričnog ulja, sadržaja mikroelemenata i elemenata u tragovima, sadržaja ukupnih fenola, tanina, flavonoida te u pogledu tipa i distribucije trihoma.[112]

Etanolni i metanolni ekstrakti sedam populacija *S. subspicata* s područja Hrvatske ispitani su u pogledu sadržaja ukupnih fenola, flavonoida, antibakterijske i antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom i metodom β-karoten/linolna kiselina. Sadržaj pojedinih fenolnih komponenti je određen HPLC tehnikom.[26] Za etanolne ekstrakate *S. subspicata* s područja Hrvatske ispitana je aktivnost u pogledu inhibicije AChE i antioksidacijska aktivnost DPPH metodom. Sadržaj ukupnih hidroksicimetnih kiselina je određen spektrometrijski, a HPLC tehnikom je određen sadržaj četiri hidroksicimetne kiseline.[66]

Ispitan je kemijski sastav eteričnog ulja *T. montanum* s područja Turske[113] i Srbije,[114,115] te njegova *in vitro* antioksidacijska aktivnost.[24] Ukupni fenoli, tanini, β-sitosterol i vrijednost gorčine su određeni u nativnoj i kultiviranoj *T. montanum* s područja Hrvatske.[25] Za etanolne ekstrakate *T. montanum* s područja Hrvatske ispitana je aktivnost u pogledu inhibicije AChE i antioksidacijska aktivnost DPPH metodom. Sadržaj ukupnih hidroksicimetnih kiselina je određen spektrometrijski, a HPLC tehnikom je određen sadržaj četiri hidroksicimetne kiseline.[66] U metanolnom, petrol-eterskom, kloroformskom, etil-acetatnom, 1-butanolnom i vodenom ekstraktu *T. montanum* s područja Srbije je određen sadržaj ukupnih fenola i fenolnih kiselina.[116] Metanolni ekstrakti *T. montanum* s područja Srbije su ispitani u pogledu sadržaja ukupnih fenola.[117,118] i antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom.[118] Spomenuti ekstrakti su ispitani i u pogledu citotoksičnosti prema pet različitih staničnih linija HeLa, Fem-x, K562, MDA-MB-361[119] i HCT-116.[117] U biljci je određen i sadržaj deset različitih metala.[118] Ispitana je antibakterijska i antioksidacijska aktivnost DPPH metodom petrol-eterskog, kloroformskog, etil-acetatnog, *n*-butanolnog i vodenog ekstrakta *T. montanum* s područja Srbije.[120] Kemijski sastav dietil-eterskog, etil-acetatnog i *n*-butanolnog ekstrakta *T. montanum* s područja Makedonije ispitan je HPLC tehnikom, dok je antioksidacijska aktivnost ispitana DPPH metodom i metodom β-karoten/linolna kiselina.[121]

Ispitan je kemijski sastav eteričnog ulja *C. vulgare* s područja Turske[122,123] i Hrvatske, kao i njegova antifitoviralna aktivnost.[124] Eterično ulje *C. vulgare* s područja Turske je ispitano i u pogledu njegove antioksidacijske aktivnost DPPH metodom i metodom β-karoten/linolna kiselina.[123]

Za etanolne ekstrakate *C. vulgare* s područja Hrvatske ispitana je aktivnost u pogledu inhibicije AChE i antioksidacijska aktivnost DPPH metodom. Sadržaj ukupnih hidroksicimetnih kiselina je određen spektrometrijski, a HPLC tehnikom je određen sadržaj četiri hidroksicimetne kiseline.[66] Sadržaj ukupnih fenola je određen kod etanolnih i metanolnih ekstrakata s područja Bugarske, dok je njihova antioksidacijska aktivnost ispitana DPPH i ABTS metodama.[27] Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida određen u vodenim[125] i metanolnim ekstraktima *C. vulgare* s područja Bugarske.[126] Vodeni ekstrakti su ispitani i u pogledu zaštite DNA te antioksidacijske aktivnosti ispitane DPPH metodom.[125] Vodeni ekstrakti *C. vulgare* s područja Bugarske su ispitani u pogledu LPS-induciranog inflamatornog odgovora mišjih RAW 264.7

makrofaga, kao i u pogledu antioksidacijske aktivnosti DPPH i DCFH-DA metodama.[23] Vodeni ekstrakti *C. vulgare* s područja Bugarske su ispitani u pogledu sadržaja 19 elemenata u listovima, stabljikama i cvjetovima, ICP-MS i FAAS tehnikom.[127] Vodeni ekstrakt *C. vulgare* s područja Bugarske pokazao je snažno antitumorsko djelovanje u *in vitro* testu prema staničnim linijama A2058, Hep-2 i L5178Y. U istom testu hloroformski ekstrakt je pokazao slabije djelovanje.[128] Etanolni i propilenglikolni ekstrakti *C. vulgare* s područja Bugarske su pokazali značajnu aktibakterijsku aktivnost, pa i prema višestruko rezistentnim bakterijskim kulturama.[129] Etanolni, etil-acetatni i acetonski ekstrakti *C. vulgare* s područja Srbije su ispitani u pogledu sadržaja ukupnih fenola i flavonoida, antibakterijske aktivnosti, kao i sinergističkih interakcija sa antibioticima.[130] Iz nadzemnih dijelova *C. vulgare*, uzgojenih na području Japana, izolirano je devet novih homologa saikosaponina.[131]

3. METODIKA

3.1. Kemikalije

Pri izradi ovoga rada korištene su sljedeće kemikalije analitičkog stupnja čistoće:

Od tvrtke *Acros Organics* (New Jersey, USA) korišteni su: butilirani hidroksianisol, 2,4-dinitrofenil hidrazin, kvercetin, natrijev karbonat, rutin i željezov(II) klorid tetrahidrat.

Od tvrtke *Betahem* (Beograd, Srbija) korišten je amonijev rodanid, od tvrtke *Carlo Erba* (Chaussee du Vexin, Francuska) dikalijev hidrogenfosfat, dok je od tvrtke *Carl Roth* (Karlsruhe, Njemačka) korištena galna kiselina.

Od tvrtke *Kemika* (Zagreb, Hrvatska) korišteni su: bezvodni natrijev sulfat, dietileter, etanol 96%; kloridna kiselina, mravlja kiselina, vodikov peroksid, željezov(III) klorid heksahidrat, željezov(II) sulfat.

Od tvrtke *Lach-Ner* (Neratovice, Češka) korišteni su: aluminijev(III) klorid, etil-acetat, kalijev dihidrogenfosfat, kalijev acetat, natrijev hidrogenkarbonat, natrijev hidroksid, natrijev nitrit, pentan i triklorooctena kiselina.

Od tvrtke *Merck* (Darmstadt, Njemačka) korištene su kemikalije: albumin (iz goveđeg seruma) i Folin-Ciocalteu reagens.

Od tvrtke *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Njemačka) korišteni su: acetilkolinesteraza Tip V-S (E.C. 3.1.1.7, iz elektrofora električne jegulje), acetiltiokolin-jodid, butirilkolinesteraza (E.C. 3.1.1.8, iz konjskog seruma), butilirani hidroksitoluen, butiriltiokolin-jodid, 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina), eserin, gvanidin-HCl i 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazin. Također, od tvrtke *Sigma-Aldrich* (St. Louis, SAD) korišteni su: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), L(+)-askorbinska kiselina, linolna kiselina i Tween-20 (polietilenglikol sorbitan monolaurat).

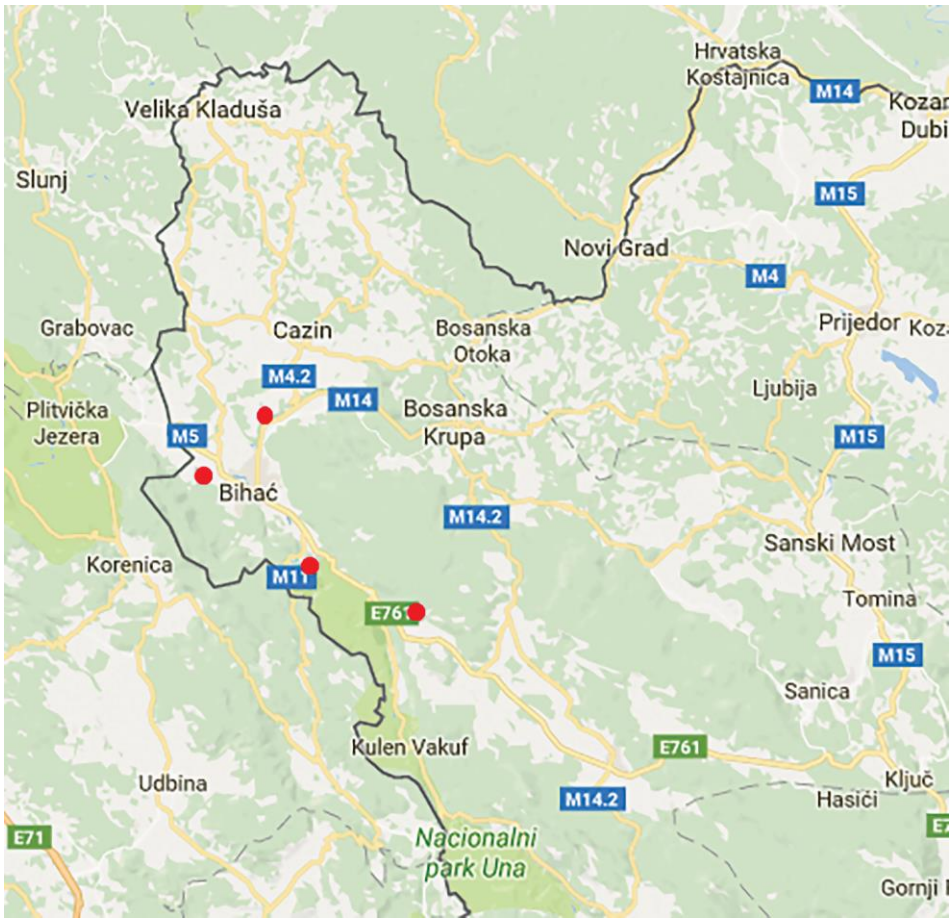
U ovom radu su korištene sljedeće kemikalije HPLC čistoće:

Od tvrtke *Extrasynthese* (Lyon, Francuska) korišteni su: apigenin, diozmetin, diozmin, elaginska kiselina, eriodiktiol, ferulinska kiselina, kempferol, kafeinska kiselina, klorogenska kiselina, krizoeriol, luteolin, miricetin, naringenin, *p*-kumarinska kiselina, protokatehinska kiselina, ružmarinska kiselina i siringinska kiselina.

Od tvrtke *J.T. Baker* (Center Valley, SAD) korišten je metanol i dimetilsulfoksid (DMSO).

3.2. Biljni materijal

Za potrebe ovog rada korišten je biljni materijal, odnosno nadzemni dijelovi samoniklih biljaka porodice Lamiaceae: *Mentha pulegium* L. (mirisna metvica), *Teucrium montanum* L. (trava iva), *Satureja subspicata* L. (klasoliki vrisak) i *Clinopodium vulgare* L. (čepić). Prikupljanje je izvršeno u periodu od lipnja do rujna 2015. godine. Biljni materijal je u vrijeme pune cvatnje, na različitim lokalitetima na području Unsko-sanskog kantona (BiH) (**slika 3.1.**).



Slika 3.1. Lokacije uzorkovanja biljnog materijala

Potvrda identifikacije biljnih vrsta izvršena je botaničkim metodama identifikacije, putem morfologije, od strane botaničara doc. dr. sc. Mirka Ruščića, s odjela za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Nadzemni dijelovi svježih biljaka su korišteni za izolaciju eteričnog ulja i pripremu vodenih i metanolnih ekstrakata.

Uzorci biljnog materijala su osušeni na sobnoj temperaturi, a potom pohranjeni u laboratorij Zavoda za biokemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Splitu, pod oznakama navedenim u **tablici 3.1.**

Tablica 3.1. Lokaliteti sakupljenog biljnog materijala

Biljna vrsta		***Lokalitet***	***Herbarijska oznaka***
Mentha pulegium L.	Račić	44°44'34.0"N 15°57'23.6"E	MP_2015
Teucrium montanum L.	Lipa	44°41'15.5"N 16°06'34.9"E	TI_2015
Satureja subspicata L.	Brekovica	44°52'44.7"N 15°53'15.2"E	SS_2015
Clinopodium vulgare L.	Garavice	44°49'04.0"N 15°50'41.9"E	CV_2015

3.3. Metoda izolacije hlapljivih spojeva iz biljnog materijala

Za izolaciju eteričnog ulja iz ispitivanih biljaka korištena je aparatura tipa Claevenger (**slika 3.2.**).

U okruglu tikvicu je dodano 50 g svježeg, grubo usitnjenog biljnog materijala i 0,5 litre destilirane vode zagrijane do temperature vrenja. Daljim zagrijavanjem hlapljive komponente eteričnog ulja i vodena para su iz tikvice prolazile kroz cijev aparature, hladile se i kondenzirale u hladilu izrađenom po Allihnu. U cijevi aparature nalazila se i smjesa organskih otapala pentana i dietiletera u omjeru 1:3, tzv. „klopka“ ili „trap“. „Trap“ ima zadaću zadržavanja hlapljivih sastojaka, dok je voda padala na dno graduirane cijevi. Nakon 150 minuta hidrodestilacije smjesa eteričnog ulja i organskih otapala iz „trapa“ u graduiranoj cijevi je prebačenau suhu bočicu. Ostatci vode iz eteričnog ulja uklonjeni su dodatkom bezvodnog natrijevog-sulfata, koji je potom uklonjen dekantiranjem. Nakon sušenja smjesa je prebačena u suhu, izvaganu bočicu u kojoj je ulje hermetički zatvoreno i čuvano u zamrzivaču na -20 °C za potrebe daljnjih analiza.



Slika 3.2. Aparatura po Clevengeru

Za mjerenje biološke aktivnosti eteričnog ulja, pojedinačno je svako eterično ulje otopljeno u etanolu te mu je određena početna masena koncentracija.

3.4. Metode pripreme vodenih i metanolnih ekstrakata

3.4.1. Vodeni ekstrakti - infuzije

Odmjerena masa svježeg biljnog materijala je prelivena je ključalom vodom i ostavljena stajati pri sobnoj temperaturi tijekom 24 h, uz povremeno miješanje (~ 7mL deionizirane vode po 1 g biljnog materijala). Ekstrakti su profiltrirani, a potom upareni pod vakuumom pri 40 °C (**slika 3.3.**). Nakon sušenja u eksikatoru tijekom 48 h, ekstrakti su liofilizirani, izmjerena je masa i izračunato je iskorištenje. Za potrebe analiza osušeni ekstrakti su otapani u vodi. Uzorci su čuvani u staklenim bočicama na -20 °C.

3.4.2. Metanolni ekstrakti

Odmjerena masa svježeg biljnog materijala macerirana je u 70 % metanolu w/w (~7mL MeOH po 1 g biljnog materijala) pri sobnoj temperaturi, uz povremeno miješanje tijekom 48 h. Ekstrakti su profiltrirani, a potom upareni pod vakuumom pri 40 °C (**slika 3.4.**). Nakon sušenja u eksikatoru tijekom 48 h, ekstrakti su liofilizirani, izmjerena je masa i izračunato je iskorištenje. Za potrebe analiza osušeni ekstrakti su otapani u 86 % etanolu. Uzorci su čuvani u staklenim bočicama pri - 20 °C.



Slika 3.3. Uparavanje vodenog ekstrakta



Slika 3.4. Uparavanje MeOH ekstrakta

3.5. Metoda analize hlapljivih spojeva iz eteričnih ulja vezanim sustavom plinska kromatografija - masena spektrometrija

Kvalitativna i kvantitativna analiza sastavnica eteričnih ulja izvršena je metodom plinske kromatografije, pomoću veznog sustava plinska kromatografija - masena spektrometrija (GC i GC/MS). Za analize je korišten plinski kromatograf Varian 3900 (Lake Forest, SAD) opremljenim detektorom masa, masenim spektrometrom (model 2100 T) te računalom (**slika 3.5.**).

Za separaciju je korištena nepolarna kapilarna kolona VF-5MS, dimenzija 30 m x 0,25 mm i debljine stacionarne faze 0,25 mm. Temperaturni program za kolonu bio je:

tijekom 3 minute izoterman pri 60 ^{o}C, zatim se stopom od 3 ^{o}C min.$^{-1}$ povisio na 246 ^{o}C i zadržao izotermno kroz 25 minuta pri istoj temperaturi.

Mobilna faza je bio plin helij, sa stopom protoka od 1 mL min.$^{-1}$. Temperatura injektora je bila 250 ^{o}C, dok je injekcijski volumenom bio 1 μL, s omjerom raspodjele od 1:20. Korištena ionizacijska voltaža masenog spektrometra je iznosila 70 eV, raspon skeniranja masa je bio od 40 do 350 masenih jedinica, a temperatura izvora iona od 200 ^{o}C.



Slika 3.5. Vezni sustav plinski kromatograf - maseni spektrometar (GC/MS)

3.6. Metoda analize fenolnih komponenti u ekstraktima veznim sustavom visokoučinska tekućinska kromatografija - detektor s nizom dioda

Za razdvajanje i identifikaciju pojedinih spojeva korišten je HPLC/DAD uređaj Agilent serije 1200 (**slika 3.6.**) i kolona InertSustain C18, veličina čestice stacionarne faze 5μm, dimenzija 250 x 4,6 mm (GL sciences Inc, S/N 2BR98021, C/N 5020-07346). Korišteni su standardi i metanol HPLC čistoće te mravlja kiselina (98-100%) p.a. čistoće.

Za razdvajanje i identifikaciju fenolnih kiselina i flavonoida korištena je metoda s obrnutim fazama. Prilikom pripreme svakog uzorka 25 mg ekstrakta je otopljeno u 10 mL 50% otopine metanola. Korištena je ultrazvučna kupelj u trajanju od 30 sekundi, nakon čega su uzorci filtrirani kroz PTFE filter (CHROMAFIL Xtra PTFE-45/25,

Macherey-Nagel). U 0,4 mL pripremljene otopine uzorka je dodano 0,06 mL metanola, tako da je konačna koncentracija ekstrakta u otopini iznosila 2,1739 mg/mL.

Standardi: kempferol, miricetin, kvercetin, rutin, krizoeriol, naringenin, eriodiktiol, galna kiselina, siringinska kiselina, elaginska kiselina, ferulinska kiselina, kafeinska kiselina, klorogenska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ružmarinska kiselina, protokatehinska kiselina su pripremljeni otopanjem u metanolu, dok su četiri standarda: luteolin, diozmetin, apigenin i diozmin otopljeni u dimetilsulfoksidu (DMSO). Pripremljena je početna otopina u kojoj je koncentracija svakog pojedinog standarda bila 0,5 mg/mL. Miješanjem 0,4 mL otopine uzorka i 0,06 mL početne otopine standarda pripremljen je standardni dodatak, tzv. spike. Konačna koncentracija svakog standarda u standardnom dodatku je iznosila 0,0652 mg/mL. Metoda je prethodno optimizirana, analizom otopine standarda na različitim kolonama, korištenjem različitih mobilnih faza i gradijenata. Eluacija je praćena na 280, 270, 254, 220, 310, 350 i 370 nm.

Korištena je sljedeća metoda: 0,1% mravlja kiselina (mobilna faza A), metanol (mobilna faza B); 0-60 min. gradijentno ispiranje: 90% faze A do 90% faze B; 60-65 min. izokratsko ispiranje: 10% A i 90% B; 65,1-70 min. izokratsko ispiranje 90% A i 10% B. Ukupno vrijeme analize je iznosilo 70 minuta. Protok mobilne faze je bio 0,5 mL/min., temperatura kolone 30 ˚C, injektirani volumen uzorka je iznosio 20 µL. Kromatogrami su snimani pri 280 nm.

Identifikacija je izvršena usporedbom retencijskih vremena i UV spektara komponenti u uzorku s istim kod odgovarajućih standarda. Kvantifikacija komponenti u uzorcima je izvršena usporedbom integriranih površina ispod pikova pojedinih komponenti u uzorku s odgovarajućim integriranim površinama ispod pikova u standardnom dodatku, pomoću formule (A - površina):

$$\gamma_{spoja} = \frac{\gamma_{standarda\ u\ spike-u}\ x\ A_{spoja\ u\ uzorku}}{A_{spike-a} - A_{uzorka}}$$

Rezultati su izraženi u mg po g suhog ekstrakta.



Slika 3.6. Uređaj HPLC/DAD Agilent 1200

3.7. Metoda određivanje sadržaja ukupnih fenolnih komponenti

Sadržaj ukupnih fenolnih komponenti u ekstraktima je određen metodom po Folin-Ciocalteu.[82]

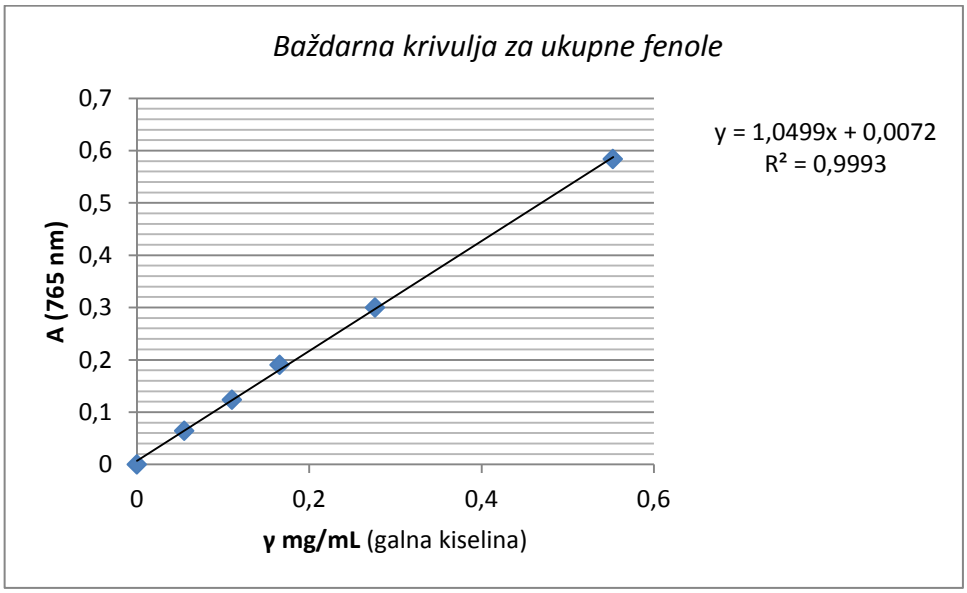
U odmjerne tikivce od 25 mL otpipetirano je po 0,25 mL ekstrakta te je dodano po 15 mL deionizirane vode i 1,25 mL Folin-Ciocalteu reagensa, prethodno razrijeđenog s vodom u omjeru 1:2. Pripravljene otopine su dobro promiješane, a potom je u vremenskom intervalu od tri do osam minuta dodano po 3,75 mL 20% otopine Na_2CO_3. Odmjerne tikvice su dopunjene do oznake deioniziranom vodom.

Otopine su ostavljene stajati na sobnoj temperaturi tijekom 2 sata, nakon čega je očitana apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm. Mjerenje je izvršeno na spektrofotometru photoLab 6600 UV-VIS (**slika 3.7.**).



Slika 3.7. Spektrofotometar photoLab 6600 UV-VIS

Za izradu baždarne krivulje pripravljene su otopine galne kiseline kao standarda, sljedećih koncentracija: 0, 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz izmjerenih apsorbancija otopina galne kiseline, izrađen je baždarni pravac (**slika 3.8.**) na temelju kojeg su očitane vrijednosti ukupnih fenola u uzorcima, izražene kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po 1 g ekstrakta.

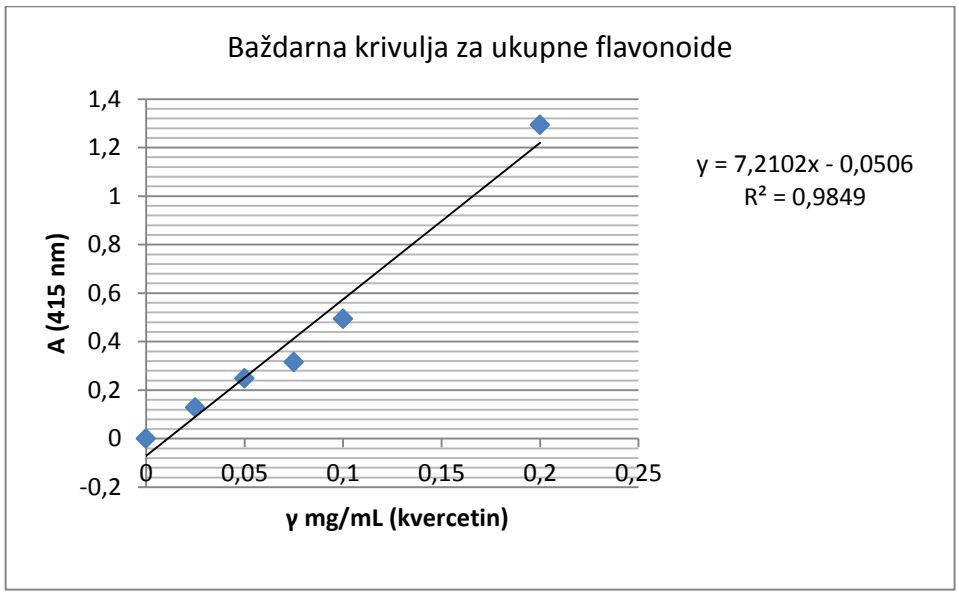


Slika 3.8. Baždarna krivulja galne kiseline kao standarda

3.8. Metoda određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Ukupni flavonoidi određeni su metodom s aluminijevim kloridom.[83] U odmjernu tikvicu od 5 mL stavljeno je 0,5 mL otopine ekstrakta. Dodano je 1,5 mL etanola, 0,1 mL 10% $AlCl_3$ i 0,1 mL 1 M CH_3COOK. Ukupni volumen je dodatkom vode dopunjen do 5 mL. Uporedo s uzorcima pripremane su i kontrole u koje je umjesto 0,1 mL $AlCl_3$ dodano 0,1 mL vode.

Nakon 30 minuta apsorbancija otopina je mjerena pri valnoj duljini od 415 nm, na spektrofotometru photoLab 6600 UV-VIS. Kao standard, pri izradi baždarnog pravca (**slika 3.9.**) korišten je kvercetin u rasponu koncentracija od: 0, 25, 50, 75, 100 i 200 mg/L. Na temelju baždarnog pravca su očitane vrijednosti ukupnih flavonoida u uzorcima, koje su izražene kao mg ekvivalenta kvercetina (QE) po 1 g ekstrakta.

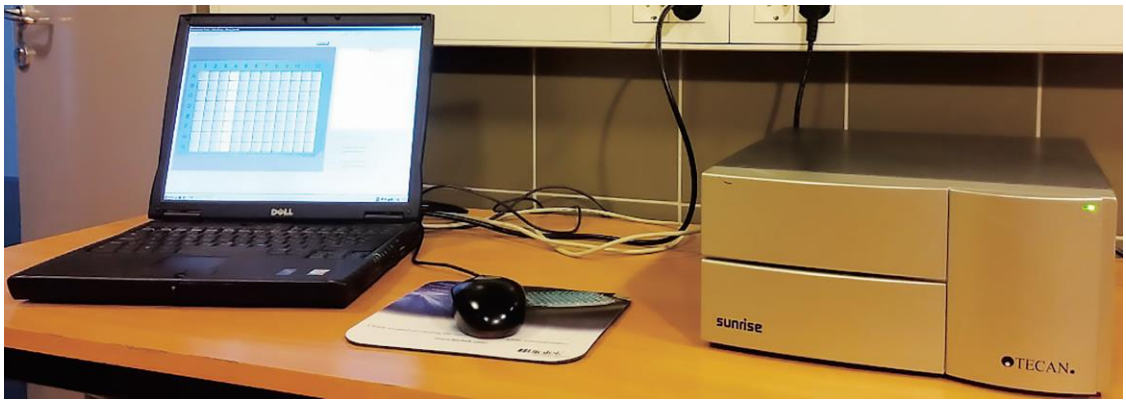


Slika 3.9. Baždarna krivulja kvercetina kao standarda

3.9. Metode testiranja biološkog potencijala hlapljivih i nehlapljivih spojeva

3.9.1. Metode testiranja antioksidacijskog potencijala eteričnih ulja i ekstrakata

Za ispitivanje antioksidacijske aktivnosti eteričnih ulja i ekstrakata odabrane su četiri *in vitro* metode: metoda testiranja redukcijskog potencijala (FRAP-metoda), metoda testiranja sposobnosti hvatanja slobodnog DPPH radikala (DPPH-metoda), metoda testiranja sposobnosti zaštite lipida od oksidacije i metoda testiranja sposobnosti inhibicije karbonilacije proteina. Usporedo s testiranjem antioksidacijskog potencijala biljnih ekstrakata testirani su i antioksidacijski potencijali komercijalno dostupnih, poznato dobrih antioksidanasa; vitamina C, BHA i/ili BHT. U tu svrhu su korišteni čitač mikrotitarskih pločica „Sunrise“ (Tecan GmbH, Austrija) (**slika 3.10.**), UV-VIS spektrofotometar Perkin-Elmer Lambda EZ 201 i UV-VIS spektrofotometar photoLab 6600.



Slika 3.10. Višekanalni spektrofotometarski čitač mikrotitarskih pločica „Sunrise“

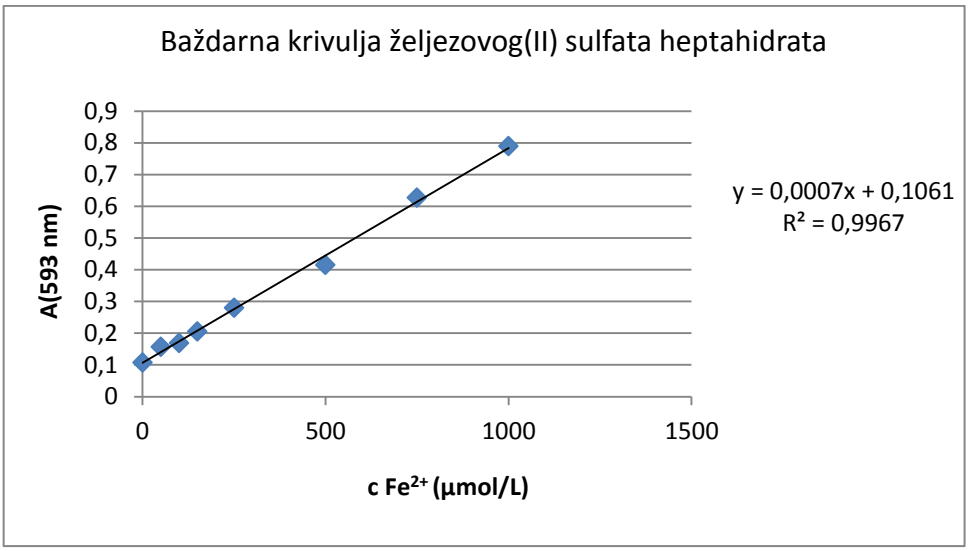
3.9.1.1. FRAP metoda

Redukcijski potencijal eteričnih ulja i ekstrakata testiran je pomoću FRAP metode (eng. *Ferric ion Reducing Antioxidant Power*),[9] koja se zasniva na usporedbi reducirajuće sposobnosti ispitivanih uzoraka s onim za otopine poznatih koncentracija Fe^{2+} iona.

Kod mjerenja antioksidacijskog potencijala FRAP metodom u jažice na mikrotitarskoj pločici je otpipetirano 30 µL vode, a potom 10 µL uzorka (eterično ulje

ili ekstrakt masene koncentracije 1 g/L). Potom je dodano 300 µL prethodno pripremljenog FRAP reagensa, dobivenog miješanjem 25 mL 0,3 M acetatnog pufera (pH=3,6), 2,5 mL otopine TPTZ-a (10 mM u 40 mM HCl) i 2,5 mL svježe 0,02 M otopine željezovog(III) klorida heksahidrata ($FeCl_3$ x $6H_2O$). Nakon točno 4 minute izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 593 nm.

Usporedo s uzorcima, na isti način, su mjerene apsorbancije kontrola (10 µL uzorka i 330 µL destilirane vode), čije su vrijednosti oduzete od vrijednosti apsorbancija dobivenih za uzorke. Dobivene vrijednosti su uspoređene sa kalibracijskom krivuljom (**slika 3.11.**) za čiju izradu su korištene otopine željezovog(II) sulfata heptahidrata ($FeSO_4$ x $7H_2O$), sljedećeg raspona koncentracija: 0, 50, 100, 150, 250, 500, 750 µM.



Slika 3.11. Krivulja odnosa poznate koncentracije Fe^{2+} iona i apsorbancije očitane kod 593 nm

Za mjerenja je korišten višekanalni čitač mikrotitarskih pločica „Sunrise“ (Tecan GmbH, Austrija) uz automatsko miješanje uzoraka i računalno snimanje podataka. Rezultati su izraženi u mikromolima Fe^{2+} iona po gramu suhe tvari uzorka (µmol Fe^{2+}/g).

3.9.1.2. DPPH metoda

Antioksidacijski kapacitet eteričnih ulja i ekstrakata u uklanjanju slobodnih DPPH radikala određen je DPPH metodom.[8]

Reakcijska smjesa se sastojala od 1 mL otopine DPPH radikala koncentracije 0,04 g/L i 50 µL otopine uzorka (eteričnog ulja ili ekstrakta) poznate koncentracije. Za pripremu otopina DPPH radikala i uzoraka korišten je 96% etanol, koji je upotrijebljen i za namještanje nulte točke aparata. Apsorbancija reakcijske smjese je očitana nakon 60 minuta, pri valnoj duljini od 517 nm, pri čemu je korišten spektrofotometar Perkin-Elmer Lambda EZ 201. Sposobnost inhibicije DPPH radikala, izražen kao % inhibicije DPPH radikala, izračunat je prema formuli:

$$\%\ inhibicije = \frac{A0 - Auzorka}{A0} x\ 100$$

pri čemu je A_0- apsorbancija otopine DPPH bez uzorka, izmjerena na početku mjerenja (t = 0), a A_{uzorka} - apsorbancija uzorka (eteričnog ulja ili ekstrakta) izmjerena nakon 60 minuta.

3.9.1.3. Ukupni antioksidacijski indeks

Rezultate antioksidacijske aktivnosti izmjerene različitim metodama teško je međusobno uspoređivati, kako zbog različitih mehanizama djelovanja tako i zbog različitih mjernih jedinica koje se koriste za izražavanje rezultata. Da bi se rezultati antioksidacijske aktivnosti dobiveni različitim metodama sveli na međusobno usporedive vrijednosti izračunat je ukupni antioksidacijski indeks (ACI, engl. *Antioxidant Composite Index*).

Najvišoj vrijednosti za svaki set mjerenja u pojedinoj metodi data je vrijednost 100, dok su za ostale uzorke antioksidacijski indeksi (ACI uzorka) računati prema formuli:

$$ACI\ uzorka = \frac{vrijednost\ za\ uzorak}{vrijednost\ za\ uzorak\ s\ najvišom\ aktivnosti} x\ 100$$

Ukupni antioksidacijski indeks nekog uzorka izražen je kao srednja vrijednost antioksidacijskog indeksa uzorka za FRAP i DPPH metodu.

3.9.1.4. Metoda testiranja sposobnosti zaštite lipida od oksidacije

Za testiranje sposobnosti biljnih ekstrakata da zaštite lipide od oksidacije, korištena je metoda s amonijevim tiocijanatom.[10]

Otopina ekstrakta volumena 0,5 mL, koncentracije 1 g/L, je homogenizirana s 2,5 mL emulzije linolne kiseline i 2 mL Na-fosfatnog pufera (0,2 M; pH 7). Emulzija linolne kiseline je pripremljena miješanjem 0,2804 g linolne kiseline, 0,2804 g emulgatora Tween-20 i 50 mL Na-fosfatnog pufera.

Reakcijska smjesa je inkubirana na 37 °C tijekom 24 h. Stupanj oksidacije linolne kiseline je mjeren tako što su alikvotu od 0,1 mL uzorka dodani: etanol (4,7 mL; 75%), amonijev tiocijanat (0,1 mL; 30%) i željezov(II) klorid (0,1 mL; 0,02 M u 3,5% HCl).

Nakon što je reakcijska smjesa ostavljena stajati 3 minute, sadržaj peroksida u uzorcima je određen očitavanjem apsorbancije pri valnoj duljini od 500 nm. Kontrole su pripremane dodatkom vode, odnosno 86% etanola umjesto otopine ekstrakta. Mjerenje je izvršeno na spektrofotometru photoLab 6600 UV-VIS. Sposobnost inhibicije oksidacije lipida je izračunata prema formuli:

$$\%\ inhibicije\ oksidacije\ lipida = \left(1 - \frac{A\ uzorka}{A\ kontrole}\right)\ x\ 100$$

3.9.1.5. Metoda testiranja sposobnosti zaštite proteina od oksidacije

Metoda se zasniva na praćenju oksidacije proteina goveđeg serumskog albumina (BSA) u reakciji kataliziranoj metalom s ili bez prisustva ispitivanog ekstrakta. Reakcijom nastalih aldehidnih ili keto funkcijskih skupina s dinitrofenil hidrazin (DNPH) reagensom nastaje DNP-hidrazon, s maksimumom apsorbancije pri valnoj duljini od 370 nm.[11,12]

Reakcijska smjesa je sadržavala BSA (4 g/L), $FeCl_3$ (0,05 mM), askorbinsku kiselinu (0,1 mM), H_2O_2 (1 mM) te biljni ekstrakt koncentracije 167 mg/L. Ukupni volumen reakcijske smjese je bio 600 µL. Kao slijepa proba je za infuzije korištena voda, a za MeOH ekstrakte 86% etanol. Smjesa je inkubirana 1 h, odnosno 24 h pri 37 °C.

Količina nastalih karbonila je određena spektrofotometrijski.[12] Nakon inkubacije, smjesi je dodan 1 mL otopine DNPH (10 mM) te je otopina inkubirana 60 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon toga je u uzorak dodan 1 mL 10% otopine trikloroocteneе kiseline (TCA) te je otopina držana 15 minuta na ledu, nakon čega su uzorci centrifugirani 40 minuta na 5 000 RPM (RPM, engl. *Rotation Per Minute*).

Supernatant je odbačen, talog je ispran 3 puta s 2 mL smjese otapala etanol/etil-acetat (1:1 v/v). Nakon posljednjeg centrifugiranja talozi su otopljeni u 6M gvanidin-HCl-u u 2 mL 2 M HCl (pH 2) vorteksiranjem i inkubiranjem pri 37 °C.

Nakon što su talozi resuspendirani, prebačeni su u kivete pogodne za mjerenje u ultravioletnom dijelu spektra te je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 370 nm. Za mjerenje je korišten spektrofotometru photoLab 6600 UV-VIS. Rezultati su izraženi u % inhibicije oksidacije u odnosu na slijepu probu.

$$\%\ inhibicije\ oksidacije = \frac{A\ slijepe\ probe\ na\ 370\ nm - A\ uzorka\ na\ 370\ nm}{A\ slijepe\ probe\ na\ 370\ nm}\ x\ 100$$

3.9.2. Metoda određivanja sposobnosti inhibicije enzima kolinesteraza

Za određivanje sposobnosti inhibicije enzima kolinesteraza korištena je Ellmanova metoda, koja se zasniva na reakciji Ellmanovog reagensa (DTNB) i tiokolina, pri čemu nastaje žuto obojen produkt.[13]

Reakcijska smjesa se sastojala od 180 µL fosfatnog pufera (0,1 M; pH = 8), 10 µL 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeve kiseline) (DTNB), 10 µL acetiltiokolin-jodida (ATChI), 10 µL acetilkolinesteraze (AChE) iz elektrofora električne jegulje i 10 µL uzoraka određene koncentracije. Uzorci eteričnog ulja i metanolnih ekstrakata su otopljeni u 86% etanolu, dok je za otapanje vodenih ekstrakata korištena voda. Za

kontrolno mjerenje su korišteni voda i 86% etanol. Ukupan volumen reakcijske smjese je iznosio 220 μL.

Početna otopina DTNB-a (6,6 mM) je pripremljena korištenjem fosfatnog pufera (0,1 M; pH = 7) s dodatakom natrijevog-hidrogenkarbonata (0,12 M). Početne otopine AChE (0,66 U/mL) i ATChI (11 mM) pripremljene su korištenjem fosfatnog pufera (0,1 M; pH = 8).

Za mjerenja je korišten višekanalni čitač mikrotitarskih pločica „Sunrise“ (Tecan GmbH, Austrija) uz automatsko miješanje uzoraka i računalno snimanje podataka. Mjerenja su izvršena pri 25 °C i valnoj duljini od 412 nm.

Mjerenja aktivnosti enzima su provedena u uvjetima stalne količine supstrata, u trajanju od 6 minuta s po tri ponavljanja. Postotak inhibicije enzima AChE eteričnim uljima ili ekstraktima je izračunat prema formuli:

$$\%\ inhibicije\ AChE = \frac{(Ae - Abe) - (Au - Abu)}{(Ae - Abe)}\ x\ 100$$

gdje su: A_e - apsorbancija otopine enzima bez uzorka (inhibitora), A_{be} - apsorbancija slijepe probe otopine enzima u kojoj se ne nalazi supstrat, A_u - apsorbancija otopine enzima s uzorkom (inhibitorom), A_{bu}– apsorbancija slijepe probe otopine enzima u kojoj se ne nalazi uzorak (inhibitor).

Kod testiranja sposobnosti inhibicije enzima butirilkolinesteraze (BChE) djelovanjem eteričnih ulja ili ekstrakata, kao supstrat je korišten sintetski butiriltiokolin-jodid (BTChI) i enzim butirilkolinesteraza (BChE) iz konjskog seruma. Početne otopine BTChI-a (11 mM) i BChE (0,66 U/mL) su pripremljene korištenjem fosfatnog pufera (0,1 M; pH = 8). Ostali sastojci reakcijske smjese, kao i mehanizam reakcije bili su jednaki kao i kod testiranja inhibicije enzima AChE.

3.10. Statistička obrada podataka

Mjerenja su izvršena u triplikatima te su rezultati izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). Statistička obrada izvršena je primjenom programa Microsoft Office Excel 2010, nadograđenog statističkim programom XLStat 2018, Addinosoft.

Univarijantna statistička analiza - Rezultati su prikazani tablično i grafički te su im izračunati parametri deskriptivne statistike: aritmetička sredina i standardna devijacija.

Multivarijantna statistička analiza - Metoda analize glavnih komponenti (PCA, engl. *Principal Component Analysis*) je korištena kako bi se vizualizirao odnos između sastava analiziranih hlapljivih i fenolnih komponenti, antioksidacijske aktivnosti, aktivnosti u pogledu inhibicije AChE i BChE i ispitivanih uzoraka. Ova metoda se zasniva na korelaciji između varijabli te grupira uzorke u glavne komponente (PCs, engl. *Principal Components*). Metoda daje opis odnosa između varijabli, te omogućava njegovu vizualizaciju. Objekti koji su slični jedan drugome grupiraju se zajedno, dok su oni različiti udaljeniji. PCA je primijenjena na set podatka koje čine srednje vrijednosti mjerenja. U okviru PCA izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Fitokemijski profil ispitivanih biljnih vrsta

Fitokemijski su proučavane četiri biljne vrste: *Mentha pulegium* s lokaliteta Račić, *Teucrium montanum* s lokaliteta Lipa, *Satureja subspicata* s lokaliteta Brekovica i *Clinopodium vulgare* s lokaliteta Garavice, na području Unsko-sanskog kantona, BiH.

Iz svježe ubranih nadzemnih dijelova spomenutih biljaka izolirana su eterična ulja destilacijom vodenom parom, dok su ekstrakcijom s vodom pripremljeni vodeni ekstrakti, a ekstrakcijom s 70% metanolom su pripremljeni metanolni ekstrakti. Izolirana eterična ulja su bila prozirna, blagožućkaste boje i karakterističnog mirisa.

4.1.1. Kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva eteričnih ulja

Sastav hlapljivih komponenti eteričnih ulja određen je vezanim sustavom plinska kromatografija - spektrometrija masa (GC/MS). Identifikacija spojeva je izvršena usporedbom njihovih retencijskih indeksa (izračunatih usporedbom s onima za seriju *n*-alkana C_9-C_{40}) s internom bazom retencijskih indeksa te onima iz literature koristeći NIST2002 bazu podataka (NIST, engl. *National Institute of Standards and Technology*, Gaithersburg, MD, USA) i usporedbom masenih spektara s onima iz komercijalnih baza Wiley 7 library (Wiley, New York, NY, USA) i NIST 02 library. Interna baza podataka nastala je tijekom vremena i tijekom brojnih analiza bilo eteričnih ulja, bilo komercijalno dostupnih čistih komponenti, sastavnica eteričnih ulja.

Prikazani su kromatogrami ukupne ionske struje istraživanih eteričnih ulja, dok su u tablicama prikazani kemijski sastavi pojedinih eteričnih ulja s masenim udjelima pojedinih uljnih sastavnica, koji predstavljaju udio površine signala te komponente u ukupnoj površini svih signala.

S obzirom na postojeće literaturne podatke, istraživanje eteričnih ulja biljaka *M. pulegium, T. montanum* i *C. vulgare* u ovom doktorskom radu, prva su istraživanja eteričnih ulja ovih biljnih vrsta sabranih na području Bosne i Hercegovine. Za eterično ulje *S. subspicata* s područja BiH, postoji jedna prethodno objavljena studija. Također, uvidom u postojeću dostupnu literaturu, ispitivanje ekstrakata sve četiri biljke prvo je takve vrste za navedene biljne vrste s područja Bosne i Hercegovine. Dio istraživanja

prezentiranih ovom disertacijom, vezanih za biljku *S. subspicata* objavljen je u radu Bektašević i suradnici (2017).[132]

Kemijski sastav hlapljivih spojeva eteričnog ulja biljke *Mentha pulegium* prikazan je **tablicom 4.1.** Kromatogram ukupne ionske struje istog eteričnog ulja se nalazi u prilogu (**prilog 1.**).

Tablica 4.1. Vrste i sadržaj hlapljivih spojeva eteričnog ulja biljke *Mentha pulegium*

Rb.	Naziv komponente	Sadržaj[a]	KI	Identifikacija[b]
Terpenski spojevi		***95,5***		
Monoterpeni		*3,3*		
1.	α-pinen	0,9	938	KI, MS
2.	sabinen	0,2	977	KI, MS
3.	ß-pinen	0,6	986	KI, MS
4.	ß-mircen	0,4	992	KI, MS
5.	pseudolimonen	tr	1007	KI, MS
6.	*p*-cimen	tr	1029	KI, MS
7.	limonen	1,2	1033	KI, MS
Monoterpenoidi		*90,4*		
8.	linalool	0,1	1101	KI, MS
9.	1,8-cineol (eukaliptol)	0,2	1036	KI, MS
10.	*p*-menton	14,0	1162	KI, MS
11.	izomenton	2,0	1169	KI, MS
12.	izopulegon	2,5	1180	KI, MS
13.	α-terpineol	0,2	1199	KI, MS
14.	*cis*-karveol	0,2	1240	KI, MS
15.	pulegon	54,4	1255	KI, MS
16.	piperiton	3,7	1263	KI, MS
17.	izopiperitenon	0,3	1276	-, MS
18.	piperitenon	12,8	1350	KI, MS
Seskviterpeni		*1,7*		
19.	α-kopaen	0,1	1378	KI, MS
20.	α-burbonen	0,1	1387	KI, MS
21.	ß-kubeben	0,1	1391	KI, MS
22.	β-elemen	0,1	1394	KI, MS
23.	ß-kariofilen	0,1	1421	KI, MS
24.	α-humulen	0,1	1456	KI, MS
25.	germakren D	1,1	1483	KI, MS
26.	δ-kadinen	tr	1525	KI, MS

Seskviterpenoidi		*0,1*		
27.	toreiol	tr	1657	KI, MS
28.	α-kadinol	0,1	1672	KI, MS
Neterpenski spojevi		***2,5***		
Aldehidi		*tr*		
29.	benzen acetaldehid	tr	1048	KI, MS
Ketoni		*0,1*		
30.	3-metilcikloheksanon	0,1	954	-, MS
31.	3-oktanon	tr	987	KI, MS
Alkoholi		*2,3*		
32.	3-oktanol	2,3	997	KI, MS
Esteri		*0,1*		
33.	3-oktil acetat	0,1	1127	KI, MS
34.	neomentil acetat	tr	1280	KI, MS
UKUPNO		**98,0**		

[a] Sadržaj % (w/w). [b] Kovačev indeks. (KI) određen na VF-5MS koloni korištenjem homologne serije *n*-alkana (C_9-C_{40}). MS - identifikacija pomoću spektra masa. tr = tragovi (< 0,1 %).

U eteričnom ulju *M. pulegium* identificirane su 34 komponente, odnosno 98% sastavnica ulja. Najzastupljenija skupina spojeva su bili monoterpenoidi (90,4%) s dominantnim: pulegon (54,4%), *p*-menton (14,0%), piperitenon (12,8%), piperiton (3,7%) i izopulegon (2,5%). Monoterpeni su bili zastupljeni s ukupno 3,3%, od kojih su najzastupljeniji bili: limonen (1,2%), α-pinen (0,9%) i ß-pinen (0,6%). Među seskviterpenima (1,7%) najviše je bio zastupljen germakren D sa 1,1%. Od neterpenskih spojeva, zastupljenih s ukupno 2,5%, najzastupljeniji je bio 3-oktanol (2,3%).

Monoterpenoid pulegon je također bio najzastupljenija komponenta u većini ranije ispitivanih eteričnih ulja *M. pulegium*, pri čemu je njegov sadržaj bio od 19,89%[96] na području Irana do 85,4% na području Maroka.[93]

Dominantne sastavnice ovih ulja su bile: Portugal - pulegon (35,1%) i piperitenon (27,4%),[100] Iran - pulegon (19,89%) i 1,8-cineol (19,38%),[96] odnosno pulegon (40,5%), menton (35,4%) i piperiton (5,2%),[97] Tunis - pulegon (41,8%) i izomenton (11,3%),[99] Urugvaj - pulegon (73,4%), izomenton (12,9%) i menton (3,6%),[88] Egipat - pulegon (43,5 %) i piperiton (12,2 %).[90] Na području Maroka rađen je veći broj studija, u kojima se kao dominantne satavnice ulja navode: pulegon (68,86 do 81,46%) i piperitenon (24,79 do 26,04%),[94] pulegon (85,4%), mentadien-3,8-α-

tujon (5,3%) i piperitenon (1%),[93] pulegon (40,98%) i menton (21,16%),[92] pulegon (69,8%), piperitenon (3,1%) i isopulegon (1,8%).[91]

U svom radu Chalchat i suradnici (2000)[89] navode klasifikaciju eteričnih ulja *M. pulegium* u tri kemotipa, predloženu od strane Lawrence-a: I - ulje pulegon tipa (bogata pulegonom, s različitim količinama mentona i izomentona), II - ulje piperitenon/piperiton tipa (bogata piperitenonom ili piperitonom, s različitim količinama pulegona, mentona ili izomentona), III - ulje izomenton/neoizomentol tipa (bogata izomentonom i neoizomentolom, s različitim količinama pulegona i mentona).

Prema navedenoj klasifikaciji ulje *M. pulegium* ispitivano u ovom radu, kao i prethodno spomenuta ispitivana ulja, mogla bi se svrstati u ulja pulegon tipa, tj. I kemotip. Dominantne sastavnice eteričnog ulja *M. pulegium* s područja Rumunije bile su *cis*-β-ocimen (67,27%) i menton (15,36%),[86] s područja Portugala menton (35,9%) i pulegon (23,2%),[102] s područja Srbije menton (30,9%) i pulegon (14,1%),[89] Irana - piperiton (38,0%) i piperitenon (33,0%).[95] S obzirom na klaifikaciju po Lawrencu spomenuta ulja bi se mogla svrstati u III kemotip, dok bi se ulje s područja Irana[95] moglo svrstati u II kemotip.

Za ostale dominantne sastavnice ispitivanog ulja, postoje sljedeći literaturni podatci. Menton je, kao jedna od komponenti, bio zastupljen u eteričnom ulju *M. pulegium* s područja: Portugala, Irana, Maroka, Tunisa, Urugvaja, Rumunije i Srbije sa sadržajem od 2,8% (Tunis) do 35,9% (Portugal). Piperitenon je u eteričnom ulju iste biljke također određen na području Portugala, Irana, Maroka i Bugarske, a njegov sadržaj je bio od 1% (Maroko) do 33% (Iran). Detaljan pregled literaturnih izvora za sadržaj pulegona, mentona i piperitenona prikazan je **tablicom 4.2**.

Tablica 4.2. Sadržaj pulegona, mentona i piperitenona u eteričnom ulju *M. pulegium* prema postojećim literaturnim izvorima

Spoj	w/w (%)	Zemlja	Literaturni izvor
pulegon	19,89	Iran	Khosravi Zanjani i sur. (2015)[96]
	40,5	Iran	Kamkar i sur. (2010)[97]
	35,1	Portugal	Mata i sur. (2007)[100]
	40,98	Maroko	Bouyahya i sur. (2017)[92]
	68,86 do 81,46	Maroko	Zekri i sur. (2013)[94]
	69,8	Maroko	Ait-Ouazzou i sur. (2012)[91]
	85,4	Maroko	Bouchra i sur. (2003)[93]
	41,8	Tunis	Mkaddem i sur. (2007)[99]
	42,9 do 45,4	Bugarska	Stoyanova i sur. (2005)[87]
	43,5	Egipt	El-Ghorab (2006)[90]
	73,4	Urugvaj	Lorenzo i sur. (2002)[88]
menton	2,8	Tunis	Mkaddem i sur. (2007)[99]
	3,6	Urugvaj	Lorenzo i sur. (2002)[88]
	4,42	Iran	Khosravi Zanjani i sur. (2015) [96]
	35,4	Iran	Kamkar i sur. (2010)[97]
	15,36	Rumunija	Andro i sur. (2010)[86]
	21,16	Maroko	Bouyahya i sur. (2017)[92]
	30,9	Srbija	Chalchat i sur. (2000)[89]
	35,9	Portugal	Teixeira i sur. (2012)[102]
piperitenon	1	Maroko	Bouchra i sur. (2003)[93]
	3,1	Maroko	Ait-Ouazzou i sur. (2012)[91]
	24,79 do 26,04	Maroko	Zekri i sur. (2013)[94]
	15,14	Iran	Khosravi Zanjani i sur. (2015)[96]
	33	Iran	Mahboubi i Haghi (2008)[95]
	21,7 do 23,1	Bugarska	Stoyanova i sur. (2005)[87]
	27,4	Portugal	Mata i sur. (2007)[100]

Piperiton je identificiran u eteričnom ulju *M. pulegium* s područja Irana (38,0%)[95] i (40,5%),[97] i Egipta (12,2%),[90] dok je izopulegon kao jedna od dominantnih sastavnica identificiran u eteričnom ulju *M. pulegium* s područja Maroka (1,8%).[91] Većina spomenutih komponenti se nalazi u svim ispitivanim uljima, ali u različitim koncentracijama, ovisno o faktorima okoliša. Posebno su zastupljeni pulegon, piperiton ili piperitenon.[96]

Brojne studije pokazuju varijabilnost u sastavu eteričnog ulja *M. pulegium*.[91] Kvalitativni sastav eteričnog ulja *M. pulegium* ovisi o geografskom podrijetlu i ekološkim specifičnostima mjesta na kojem je prikupljen biljni materijal. Također veoma varira i sadržaj komponenti ulja. Međutim, nema značajne razlike u sadržaju

komponenti eteričnih ulja izoliranih iz svježih i suhih dijelova biljke (lišće i stabljika), kao ni u sastavu ulja biljke u vegetativnoj fazi i fazi cvjetanja.[98]

Kemijski sastav hlapljivih spojeva eteričnog ulja biljke *Teucrium montanum* prikazan je **tablicom 4.3.** Kromatogram ukupne ionske struje istog eteričnog ulja nalazi se u prilogu (**prilog 2.**).

Tablica 4.3. Vrste i sadržaj hlapljivih spojeva eteričnog ulja biljke *Teucrium montanum*

Rb.	Naziv komponente	Sadržaj[a]	KI	Identifikacija[b]
Terpenski spojevi				
Monoterpeni		*15,3*		
1.	α-tujen	0,3	930	KI, MS
2.	α–pinen	6,4	937	KI, MS
3.	verbenen	0,2	958	KI, MS
4.	sabinen	3,3	976	KI, MS
5.	ß-pinen	2,7	980	KI, MS
6.	ß-mircen	0,2	991	KI, MS
7.	α-terpinen	0,2	1020	KI, MS
8.	*p*-cimen	0,6	1027	KI, MS
9.	limonen	1,0	1032	KI, MS
10.	γ-terpinen	0,4	1062	KI, MS
Monoterpenoidi		*10,0*		
11.	linalool	0,3	1101	KI, MS
12.	α-kamfolen aldehid	0,5	1129	KI, MS
13.	pinokarveol	0,6	1143	KI, MS
14.	*cis*-verbenol	0,4	1145	KI, MS
15.	*cis*-citral (neral)	1,7	1150	KI, MS
16.	menton	0,4	1158	KI, MS
17.	pinokarvon	0,5	1166	KI, MS
18.	*p*-menta-1,5-dien-8-ol	0,4	1171	KI, MS
19.	terpinen-4-ol	0,6	1180	KI, MS
20.	mirtenal	1,0	1197	KI, MS
21.	verbenon	0,5	1212	KI, MS
22.	pulegon	2,3	1243	KI, MS
23.	bornil acetat	0,3	1287	KI, MS
24.	*p*-menta-1,4-dien-7-ol	0,5	1332	KI, MS
Seskviterpeni		*29,7*		
25.	β-elemen	0,7	1393	KI, MS
26.	α-gurjunen	0,5	1410	KI, MS
27.	*trans*-kariofilen	2,8	1420	KI, MS

28.	α-humulen	1,8	1455	KI, MS
29.	aloaromadendren	0,5	1463	KI, MS
30.	germakren D	1,7	1482	KI, MS
31.	ß-selinen	9,0	1488	KI, MS
32.	δ-selinen	2,0	1496	KI, MS
33.	α-muurolen	1,2	1500	KI, MS
34.	γ-kadinen	1,7	1516	KI, MS
35.	δ-kadinen	6,9	1526	KI, MS
36.	α-kadinen	0,4	1540	KI, MS
37.	kadalen	0,5	1677	KI, MS
Seskviterpenoidi		*36,0*		
38.	endo-1-bourbonanol	2,6	1519	KI, MS
39.	germakren D-4-ol	6,8	1578	KI, MS
40.	kariofilen oksid	2,4	1584	KI, MS
41.	guaiol	1,5	1599	KI, MS
42.	viridiflorol	1,1	1603	KI, MS
43.	T-kadinol	6,9	1645	KI, MS
44.	δ-kadinol	0,9	1649	KI, MS
45.	α-kadinol	9,0	1659	KI, MS
46.	bulnezol	2,2	1670	KI, MS
47.	α-ciperon	2,6	1752	KI, MS
UKUPNO		**91,0**		

[a] Sadržaj % (w/w). [b] Kovačev indeks (KI) određen na VF-5MS koloni korištenjem homologne serije *n*-alkana (C_9-C_{40}). MS - identifikacija pomoću spektra masa.

U eteričnom ulju *T. montanum* identificirano je 47 komponenti (91% od ukupne površine signala). Pojedine klase spojeva bile su zastupljene kako slijedi: seskviterpenoidi (36%), seskviterpeni (29,7%), monoterpeni (15,3%) i monoterpenoidi (10%). Najzastupljeniji spojevi su bili α-kadinol (9%), ß-selinen (9%), T-kadinol (6,9%), δ-kadinen (6,9%), germakren D-4-ol (6,8%), α–pinen (6,4%), *trans*-kariofilen (2,8%) i ß-pinen (2,7%).

U eteričnom ulju *T. montanum* s područja Hrvatske identificirano je 37 komponenti (99,5%) od kojih su najzastupljeniji bili: germakren D (17,2%), *β*-pinen (12,3%) i *β*-kariofilen (7,1%).[124] Sličan sastav pokazalo je ulje *T. montanum* s područja Srbije (Orjen), gdje su od 46 identificiranih komponenti (98,12%) najzastupljenije bile germakren D (15,0%), α-pinen (12,4%), β-eudesmol (10,1%) i β-kariofilen (6,9%).[114]

Germakren D (31%) bio je najzastupljeniji spoj u eteričnim ulju *T. montanum* (Jabuka, Srbija), dok su manje zastupljene komponente bile δ-kadinen (8.1%), β-kariofilen (5.1%), τ-muurolol (4.2%) i α-pinen (4.1%).[115]

Za eterično ulje *T. montanum* s područja Srbije (Jadovnik) navode se sljedeće komponente kao dominantne: δ-kadinen (17,19%), β-selinen (8,16%), α-kalakoren (4,97%), 1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-naftalen (4,91%), kariofilen (4,35%) i kopaen (4,23%).[24] Dominantne sastavnice ulja iste biljke s područja Turske su bile sabinen (11,3%), δ-kadinen (6,3%), germakren D (5,8%), α-kopaen (5,7%), (E)-β-farnesen (5,5%) i α-pinen (5,2%).[113]

Rod *Teucrium* karakterizira prisustvo seskviterpena; kao što su kariofilen, germakren D, α-humulen, α-muurolen, (*E*)-*β*-farnesen, seskviterpenoida kariofilen oksida i monoterpenoida karvakrola.[124]

Usporedbom s prethodno navedenim literaturnim podatcima za eterično ulje *T. montanum* s drugih područja ispitivano ulje je imalo sličan sastav, s razlikom u udjelu glavnih komponenti. Većinu identificiranih spojeva činili su seskviterpenoidi i seskviterpeni, što je u suglasju s prethodno objavljenim radovima u kojima se navodi da je dominacija seskviterpena i seskviterpenoida karakteristična odlika eteričnih ulja biljaka roda *Teucrium*.[113,115]

Kemijski sastav hlapljivih spojeva eteričnog ulja biljke *Satureja subspicata* prikazan je **tablicom 4.4.** Kromatogram ukupne ionske struje istog eteričnog ulja se nalazi u prilogu (**prilog 3.**).

Tablica 4.4. Vrste i sadržaj hlapljivih spojeva eteričnog ulja biljke *Satureja subspicata*

Rb.	Naziv komponente	Sadržaj[a]	KI	Identifikacija[b]
Terpenski spojevi				
Monoterpeni		*46,6*		
1.	α–pinen	10,2	936	KI, MS
2.	kamfen	0,4	952	KI, MS
3.	sabinen	0,9	977	KI, MS
4.	ß-pinen	4,6	988	KI, MS
5.	2-karen	0,4	1004	KI, MS
6.	α-terpinen	0,1	1016	KI, MS
7.	*cis*-ß-ocimen	12,1	1031	KI, MS

8.	limonen	4,1	1036	KI, MS
9.	*trans*-ß-ocimen	8,8	1047	KI, MS
10.	γ–terpinen	0,2	1062	KI, MS
11.	neoaloocimen	4,8	1128	KI, MS
Monoterpenoidi		*10,4*		
12.	linalool	2,0	1104	KI, MS
13.	terpineol	1,2	1190	KI, MS
14.	mirtenol	6,1	1194	KI, MS
15.	karvon	0,7	1248	KI, MS
16.	mirtenilacetat	0,4	1320	KI, MS
Seskviterpeni		*34,8*		
17.	biciklоelemen	1,3	1331	KI, MS
18.	δ-elemen	0,4	1340	KI, MS
19.	α-kubeben	0,1	1353	KI, MS
20.	α-kopaen	0,5	1376	KI, MS
21.	α-burbonen	1,6	1385	KI, MS
22.	β-elemen	0,9	1389	KI, MS
23.	ß-kariofilen	14,0	1416	KI, MS
24.	ß-kopaen	2,5	1431	KI, MS
25.	ß-farnezen	1,8	1436	KI, MS
26.	kalaren	0,6	1444	KI, MS
27.	aloaromadendren	0,4	1458	KI, MS
28.	germakren D	7,1	1474	KI, MS
29.	γ-muurolen	0,1	1478	KI, MS
30.	valencen	1,2	1488	KI, MS
31.	α-amorfen	1,2	1494	KI, MS
32.	γ-kadinen	1,1	1514	KI, MS
33.	δ-kadinen	0,1	1531	KI, MS
Seskviterpenoidi		*6,2*		
34.	kariofilen oksid	6,2	1580	KI, MS
UKUPNO		**98,0**		

[a] Sadržaj % (w/w). [b] Kovačev indeks (KI) određen na VF-5MS koloni korištenjem homologne serije *n*-alkana (C_9-C_{40}). MS – identifikacija pomoću spektra masa.

U eteričnom ulju *S. subspicata* identificirane su 34 sastavnice (98,0%). Glavne klase identificiranih spojeva bili su monoterpeni sa 46,6% i seskviterpeni s 34,8%, za kojima su slijedili monoterpenoidi (10,4%) i seskviterpenoidi (6,1%).

Dominantne sastavnice ulja su bile seskviterpen ß-kariofilen (14%) te monoterpeni *cis*-ß-ocimen (12,1%) i α-pinen (10,2%). Druge kvantitativno važne

sastavnice su bili *trans*-ß-ocimen (8,8%), germakren D (7,1%), kariofilen oksid (6,2%) i mirtenol (6,1%).

Usporedbom dobivenih rezultata s ranije objavljenim rezultatima za uzorke s područja Hrvatske[109-112] i BiH,[7] može se uočiti varijacija u sastavu i sadržaju komponenti eteričnog ulja. Dominantan spoj u eteričnom ulju *S. subspicata* s područja Hrvatske u periodu cvatnje je bio α-pinen (52,9%).[111] Dominantni spojevi eteričnog ulja *S. subspicata* s područja planine Kozjak u Hrvatskoj bili su monoterpenski ugljikovodici α-pinen (24,2%), limonen (7,1%) i α-terpinen (6,2%)[109], odnosno karvakrol (16,76%), α-pinen (13,58%), *p*-cimen (10,76%) i γ-terpinen (9,54%).[110] Glavna komponenta eteričnog ulja *S. subspicata* uzorkovane na planinama Učka i Velebit u Hrvatskoj bio je α-eudesmol (18,4; 25,8; 20,2 i 29,3%), dok je β-eudesmol bio glavna komponenta iste biljke s područja planine Snježnica u Hrvatskoj.[112] Dominantne komponente eteričnog ulja *S. subspicata* s područja BiH, u dvije različite faze razvoja, bile su timol (28,6%) i spatulenol (37,6%).[7]

Ove razlike se mogu pripisati geografskim i klimatskim varijacijama,[112] kao i različitim fazama razvoja biljke.[133] Za biljke roda *Satureja* je poznato da pokazuju visoku varijabilnost, posebno izraženu kod populacija s udaljenih staništa.[134]

Kemijski sastav hlapljivih spojeva eteričnog ulja biljke *Clinopodium vulgare* prikazan je **tablicom 4.5.** Kromatogram ukupne ionske struje istog eteričnog ulja se nalazi u prilogu (**prilog 4.**)

Tablica 4.5. Vrste i sadržaj hlapljivih spojeva eteričnog biljke ulja *Clinopodium vulgare*

Rb.	Nazivkomponente	Sadržaj[a]	KI	Identifikacija[b]
Terpenski spojevi		***77,0***		
Monoterpeni		*20,9*		
1.	α-tujen	1,2	928	KI, MS
2.	sabinen	3,1	977	KI, MS
3.	ß-pinen	3,5	989	KI, MS
4.	limonen	1,1	1030	KI, MS
5.	(*Z*)-ß-ocimen	3,4	1035	KI, MS
6.	(*E*)-ß-ocimen	2,2	1048	KI, MS
7.	γ-terpinen	1,1	1058	KI, MS
8.	terpinolen	0,1	1084	KI, MS
9.	*alo*-ocimen	5,2	1130	KI, MS

Monoterpenoidi		*1,0*		
10.	linalool	0,2	1103	KI, MS
11.	piperitol	0,6	1206	KI, MS
12.	bornil acetat	0,2	1280	KI, MS
Seskviterpeni		*52,2*		
13.	bicikloelemen	3,5	1326	KI, MS
14.	α-kopaen	0,2	1371	KI, MS
15.	ß-burbonen	3,3	1379	KI, MS
16.	β-elemen	1,5	1387	
17.	α-gurjunen	10,9	1416	KI, MS
18.	ß-gurjunen (kalaren)	4,7	1427	KI, MS
19.	aromadendren	1,4	1440	KI, MS
20.	(*Z*)-ß-farnezen	1,7	1449	KI, MS
21.	(*E*)-ß-farnezen	0,6	1457	KI, MS
22.	*epi*-bicikloseskvifelandren	18,1	1483	KI, MS
23.	pačulen	1,9	1493	KI, MS
24.	valencen	1,2	1495	KI, MS
25.	ß-guaien	0,2	1496	KI, MS
26.	α-muurolen	1,9	1499	KI, MS
27.	γ-kadinen	1,1	1516	KI, MS
Seskviterpenoidi		*2,9*		
28.	ledol	0,4	1565	KI, MS
29.	spatulenol	1,1	1587	KI, MS
30.	toreiol	1,1	1658	KI, MS
31.	α-kadinol	0,3	1671	KI, MS
Neterpenski spojevi		***16,3***		
Ugljikovodici		*0,3*		
32.	trikozan	tr	2300	KI, MS
33.	pentakozan	0,1	2500	KI, MS
34.	heptakozan	0,1	2700	KI, MS
35.	oktakozan	0,1	2800	KI, MS
Alkoholi		*2,2*		
36.	3-oktanol	2,2	1005	KI, MS
Kiseline		*13,8*		
37.	heksadekanska kiselina	10,5	2004	KI, MS
38.	α-linolenska kiselina	3,3	2185	KI, MS
UKUPNO		**93,3**		

[a] Sadržaj % (w/w). [b] Kovačev indeks (KI) određen na VF-5MS koloni korištenjem homologne serije *n*-alkana (C_9-C_{40}). MS - identifikacija pomoću spektra masa. tr = tragovi (< 0,1 %).

U eteričnom ulju *C. vulgare* identificirano je 38 komponenti od kojih su najzastupljenije klase spojeva bili seskviterpeni (52,2%), monoterpeni (20,9%) i neterpenski spojevi (16,3%). Najzastupljeniji spojevi su *epi*-biciklosesquifelandren (18,1%), α-gurjunen (10,9%), heksadekanska kiselina (10,5%) i *alo*-ocimen (5,2%).

Uvidom u postojeće literaturne podatake može se zaključiti da trenutno postoje dvije objavljene studije koje se odnose na kemijski sastav eteričnog ulja vrsta roda *Clinopodium*. U dva uzorka eteričnog ulja *C. vulgare* s područja Turske identificirano je 37 komponenti, odnosno 89,6 i 90,5% eteričnog ulja. Seskviterpeni su bili zastupljeni s 68,8% i 89,3%. Glavne komponente ulja su bili germakren D (19,4% i 37,1%), β-kariofilen (10,4% i 11,6%) i β-kariofilen oksid (6,9% i 10%). Monoterpeni su bili zastupljeni s 31,2% i 10,7%, od kojih su najzastupljeniji bili piperiton oksid (11,4%), limonen (5,9%) i karvakrol (3,1%), odnosno bornil acetat (3,4%) i *(Z)*-β-ocimen (1,6%).[122]

U drugoj studiji za eterično ulje *C. vulgare*, također s područja Turske, identificirano je 40 spojeva (99,4%). Timol (38,9%), γ-terpinen (29,6%) i *p*-cimen (9,1%) su bile glavne komponente ulja s udjelom od 77,6%. Tepe i suradnici (2007)[123] navode da biljke *C. vulgare* imaju visok sadržaj monoterpena ili značajan udio seskviterpena, što je fenomen uobičajen za vrste iz porodice Lamiaceae.

Usporedbom rezultata ove disertacije s prethodno navedenim literaturnim podatcima može se uočiti sličnost u dominantnom sadržaju seskviterpena za rezultate prve studije, dok kod sadržaja glavnih komponenti za obje studije postoje značajne razlike. Tako u analiziranom eteričnom ulju nisu identificirani: germakren D, β-kariofilen, kariofilen oksid te timol i *p*-cimen, koji se navode kao glavne komponente eteričnih ulja *C. vulgare* s područja Turske.

4.1.2. Kemijski sastav i sadržaj nehlapljivih spojeva vodenih i metanolnih ekstrakata

4.1.2.1. Udio ekstrakta u biljnom materijalu testiranih biljnih vrsta

Vodeni i metanolni ekstrakti testiranih biljaka dobiveni su iz svježeg biljnog materijala uz pomoć vode i 70%-tnog metanola kao ekstrakcijskih sredstava. Nakon

priprave ekstrakata i vaganja istih izračunat je udio pojedinih ekstrakata u početnom biljnom materijalu (**tablica 4.6.**).

Tablica 4.6. Udio vodenih (VE) i metanolnih ekstrakata (ME) testiranih biljnih vrsta u početnom biljnom materijalu

Biljna vrsta	Herbarijska oznaka	Iskorištenje	
		VE	ME
Mentha pulegium	MP_2015	13,9%	6,5%
Teucrium montanum	TI_2015	10,7%	6,4%
Satureja subspicata	SS_2015	14,1%	10,7%
Clinopodium vulgare	CV_2015	9,8%	3,5%

VE - vodeni ekstrakt; ME - metanolni ekstrakt

Udio vodenih ekstrakata u početnom, svježem, biljnom materijalu bio je veći u odnosu na udio kod metanolnih ekstrakata. Tako je najveće iskorištenje od 14,1% bilo kod vodenog ekstrakta *S. subspicata*. Slijedi iskorištenje kod vodenih ekstrakata *M. pulegium* 13,9%, *T. montanum* 10,7% i *C. vulgare* 9,8%. Kod metanolnih ekstrakata iskorištenja su bila: *S. subspicata* 10,7%, *M. pulegium* 6,5%, *T. montanum* 6,4% i *C. vulgare* 3,5%.

Udio vodenog i metanolnog ekstrakta biljke *M. pulegium* s područja Maroka iznosilo je 6,42 i 3,41%,[104] dok je udio etanolnog ekstrakta iste biljke s područja Alžira iznosio 4,6%.[22] Udio za *M. pulegium* sa područja Portugala je bio kod ekstrakta u vrućoj vodi 21,5%, ekstrakta u hladnoj vodi 12,3%, ekstrakta u etanolu 5,4%.[102]

Udio etanolnih ekstrakata nadzemnog dijela suhe biljke s područja Hrvatske je kod *M. pulegium* iznosilo 7,52%, *C. vulgare* 7,98%, *T. montanum* 14,44% i *S. subspicata* 17,60%.[66]

Dobiveni rezultati, za udio ekstrakata biljaka ispitivanih ovom disertacijom, u suglasju su s rezultatima prethodnih istraživanja.

4.1.2.2. Sadržaj ukupnih fenola vodenih i metanolnih ekstrakata testiranih biljnih vrsta

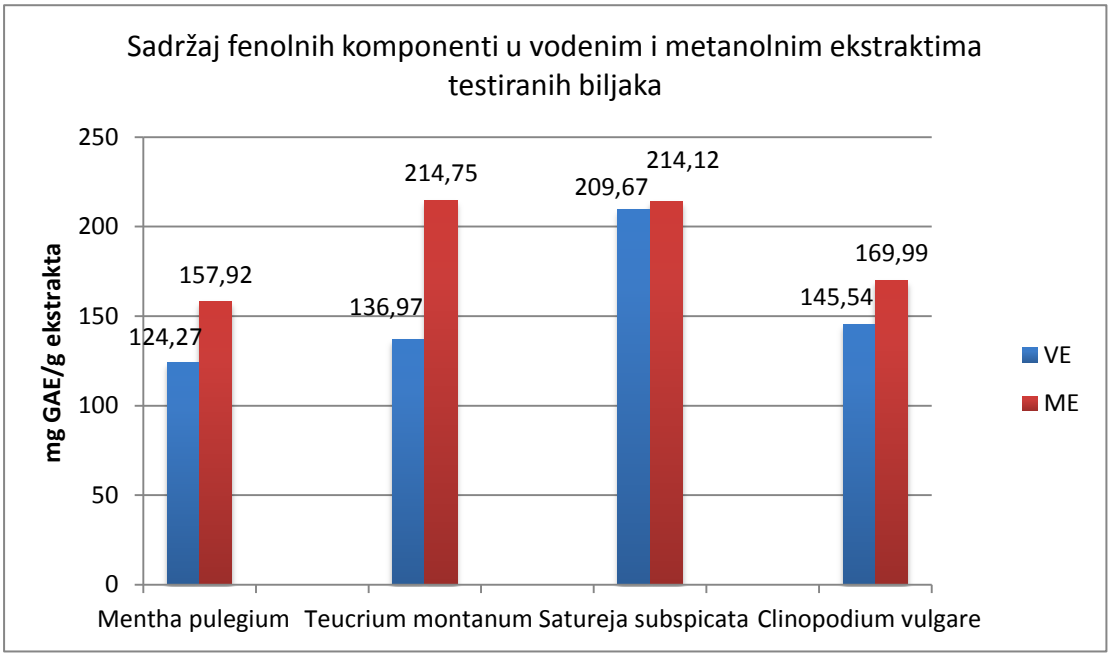
Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva biljnih ekstrakata testiran je Folin-Ciocalteu metodom. U **tablici 4.7.** prikazani su sadržaji ukupnih fenolnih komponenti analiziranih vodenih i metanolnih ekstrakata testiranih biljnih vrsta:

Tablica 4.7. Sadržaj ukupnih fenola u vodenim i metanolnim ekstraktima

Ukupni fenoli mg GAE/g ekstrakta		
	VE	ME
Mentha pulegium	124,27±0,55	157,92±1,91
Teucrium montanum	136,97±1,65	214,75±1,98
Satureja subspicata	209,67±1,98	214,12±0,95
Clinopodium vulgare	145,54±4,15	169,99±3,85

VE - vodeni ekstrakt; ME - metanolni ekstrakt;
GAE-ekvivalent galne kiseline

Najviši sadržaj ukupnih fenolnih komponenti bio je u metanolnom ekstraktu biljaka *T. montanum* 214,75±1,98 i *S. subspicata* 214,12±0,95 mg GAE/g ekstrakta. Slijedi sadržaj ukupnih fenolnih komponenti u vodenom ekstraktu *S. subspicata* 209,67±1,98 te u metanolnim ekstraktima *C. vulgare* 169,99±3,85 i *M. pulegium* 157,92±1,91. Manji sadržaj ukupnih fenolnih spojeva bio je kod vodenih ekstrakata *C. vulgare* 145,54±4,15, *T. montanum* 136,97±1,65 i *M. pulegium* 124,27±0,55 mg GAE/g ekstrakta (**slika 4.1.**).



Slika 4.1. Sadržaj ukupnih fenolnih komponenti u vodenim i metanolnim ekstraktima testiranih biljaka

Ukupni fenolni spojevi u vodenom i metanolnom ekstraktu biljke *M. pulegium* s područja Maroka iznosili su 238,4±1,29, odnosno 167,2±0,41 mg TAE/g (ekvivalenti taninske kiseline).[104] Sadržaj ukupnih fenola za *M. pulegium* s područja Alžira je iznosio 6,1±0,5 mg GAE/g suhih listova korištenih za ekstrakciju.[22] Sadržaj ukupnih fenola u *M. pulegium* s područja Grčke je bio 8,4±0,1 mg GAE/g suhog uzorka.[108] Metanolni ekstrakt *M. pulegium* s područja Alžira sadržavao je 183,45±0,13 ukupnih fenola, dok je vodeni sadržavao 88,84±0,11 µg GAE/g ekstrakta.[106] Vodeni ekstrakt *M. pulegium* s područja Portugala je pokazao najviši sadržaj fenolnih komponenti od 13,3 mg GAE/g uzorka.[102] Sadržaj ukupnih fenola u etanolnom ekstraktu *M. pulegium* s područja Portugala bio je 71,7±2,1 mg PE/g ekstrakta (pirogalol ekvivalenta), dok je u vodenom ekstraktu isti iznosio 57,9±1,6.[100] Sadržaj fenolnih komponenti u vrstama roda *Mentha* se kretao od 128,1 do 230,8 mg GAE/g za vodene ekstrakate.[135]

Rezultati za sadržaj ukupnih fenolnih spojeva dobiveni disertacijom za *M. pulegium* najsličniji su rezultatima za biljke iz roda *Mentha* dobivenih od strane Dormana i suradnika (2003).[135]

Sadržaj ukupnih fenola u *T. montanum* s područja Hrvatske kretao se od 12,80±0,05 za kultivirane do 13,68±0,07% za samonikle osušene biljke.[25] Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva vodenih i metanolnih ekstrakata *T. montanum* s područja Srbije (Zlatibor) bio je 59,80±2,54 i 154,00±6,7 mg CAE/g ekstrakta (CAE, ekvivalenti klorogenske kiseline).[116] Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u metanolnom ekstraktu iste biljke, također s područja Srbije, bio je 169,06±0,75 mg GAE/g ekstrakta,[117] odnosno kretao se od 143,42 do 190,20 mg GAE/ g ekstrakta za biljke s područja Srbije (Goč, Kopaonik) i Crne Gore (Durmitor).[118]

Rezultati za sadržaj ukupnih fenolnih spojeva dobivenih u ovom radu za *T. montanum* za oko 10% su manji u odnosu na rezultate dobivene od strane Jurešić-Grubešić i suradnika (2012).[25] Dobiveni rezultati za vodeni i metanolni ekstrakt nešto su viši u odnosu na iste ekstrakte *T. montanum* s područja Srbije i Crne Gore.

Sadržaj ukupnih fenola za biljku *S. subspicata* se kretao od 240,84±2,25 do 271,35±11,65 mg GAE/g metanolnog ekstrakta.[26] Rezultati dobiveni u ovom radu za *S. subspicata* u skladu su s prethodno navedenim rezultatima Kremera i suradnika (2015).[26]

Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva metanolnog ekstrakta *C. vulgare* s područja Bugarske iznosio je 41,83±6,5 mg GAE/g ekstrakta,[126] dok je sadržaj istih u vodenom ekstraktu iznosio 86,22±3,00 mg GAE/g ekstrakta.[125] Sadržaj fenola u etanolnom ekstraktu iz listova i cvjetova *C. vulgare* je iznosio 10,18±0,68, a u metanolnom 27,37±2,14 mg GAE/g suhe tvari biljke (listovi i cvjetovi).[27] Za metanolni ekstrakt iste biljke s područja Alžira navodi se sadržaj ukupnih fenolnih spojeva od 59,87±0,01 i 183,45±0,13 μg GAE/g ekstrakta, dok se za vodeni ekstrakt navode podatci od 1,19±0,00 i 88,84±0,11.[106]

Dobiveni rezultati za sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktima *C. vulgare* veći su od rezultata dobivenih od strane Nikolove (2011)[126] Khennouf i sur. (2013)[106] i Todorove i sur. (2016).[125] Rezultati su također veći od rezultata dobivenih za etanolni i manji od rezultata dobivenih za metanolni ekstrakt određenih od strane Georgieva i Mihaylova (2015).[27]

4.1.2.3. Sadržaj ukupnih flavonoida vodenih i metanolnih ekstrakata testiranih biljnih vrsta

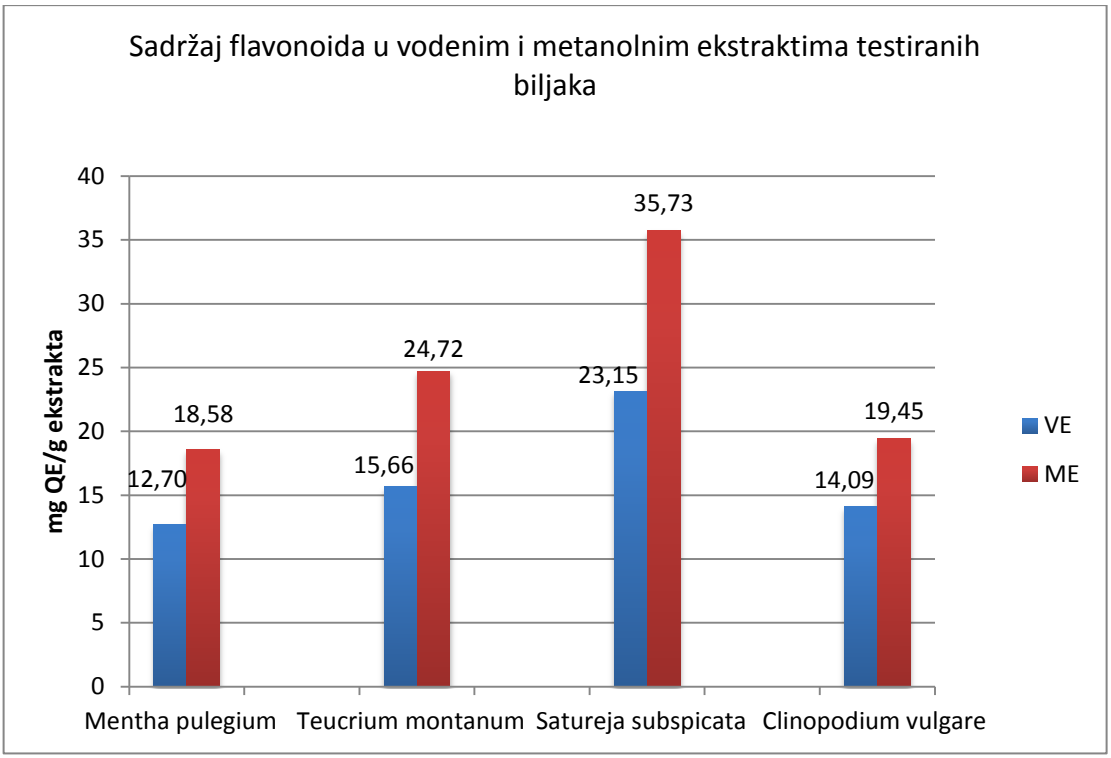
Sadržaj ukupnih flavonoida ekstrakata biljaka testiran je metodom s aluminijevim kloridom.[83] U **tablici 4.8.** prikazani su sadržaji ukupnih flavonoida analiziranih vodenih i metanolnih ekstrakata testiranih biljnih vrsta:

Tablica 4.8. Sadržaj ukupnih flavonoida u vodenim i metanolnim ekstraktima

Ukupni flavonoidi mg QE/g ekstrakta		
	VE	ME
Mentha pulegium	12,70±0,00	18,58±0,08
Teucrium montanum	15,66±0,42	24,72±0,92
Satureja subspicata	23,15±0,08	35,73±0,14
Clinopodium vulgare	14,09±0,00	19,45±0,08

VE - vodeni ekstrakt; ME - metanolni ekstrakt;
QE - ekvivalent kvercetina

Kod sadržaja ukupnih flavonoida, jednako kao i kod ukupnih fenola, najviši sadržaj pokazali su metanolni ekstrakti *S. subspicata* 35,73±0,14 i *T. montanum* 24,72±0,92 mg QE/g ekstrakta (QE, kvercetin ekvivalent). Slijedi vodeni ekstrakt *S. subspicata* 23,15±0,08 te metanolni ekstrakti *C. vulgare* 19,45±0,08 i *M. pulegium* 18,58±0,08 mg QE/g ekstrakta. Manji sadržaj ukupnih flavonoida bio je kod vodenih ekstrakata *T. montanum* 15,66±0,42, *C. vulgare* 14,09±0,00 i *M. pulegium* 12,70±0,00 mg QE/g ekstrakta (**slika 4.2.**).



Slika 4.2. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima

Sadržaj ukupnih flavonoida za *M. pulegium* s područja Alžira je iznosio 0,85±0,01 mg QE/g suhih listova korištenih za ekstrakciju,[22] dok je vrijednost za metanolni ekstrakt, također s područja Alžira, iznosila 59,87±0,01, a za vodeni 1,19±0,00 µg QE/g ekstrakta.[106]

Sadržaj flavonoida u nadzemnim dijelovima *T. montanum* s područja Bugarske iznosio je 0,15%,[121] dok je sadržaj flavonoida za istu biljku s područja Srbije i Crne Gore bio od 46,50 do 53,91 mg RE/g ekstrakta (RE, rutin ekvivalenata).[118] Sadržaj ukupnih flavonoida za biljku *S. subspicata*, prikupljenu sa više lokacija na području Hrvatske, kretao se od 16,65±0,5 do 118,09±10,58 mg QE/g ekstrakta.[26]

Sadržaj ukupnih flavonoida u *C. vulgare* s područja Bugarske u metanolnom ekstraktu je iznosio 2,41±0,5 mg QE/g ekstrakta,[126] dok je njihov sadržaj u vodenom ekstraktu, također s područja Bugarske bio 7,87±0,68 mg QE/g ekstrakta.[125]

Sadržaj ukupnih flavonoida za vodene i metanolne ekstrakte biljaka *M. pulegium, C. vulgare* i *T. montanum* bio je veći u odnosu na postojeće literaturne podatake za ekstrakte istih biljnih vrsta s područja Alžira i Bugarske. Sadržaj ukupnih

flavonoida u vodenim i metanolnim ekstraktima biljke *S. subspicata* odgovarao je sadržaju flavonoida u etanolnim ekstraktima iste biljne vrste s područja Hrvatske.

Razlike u sadržaju flavonoida mogu biti uzrokovane trajanjem ekstrakcijske procedure, karakteristikama same biljke, podrijetlom biljke te sezonom prikupljanja.[102] Utjecaj mogu imati i količina uzorka za ekstrakciju, uvjeti skladištenja, metoda određivanja, izbor standarda, prisustvo interferirajućih supstanci (voskovi, masti, terpeni i klorofil).

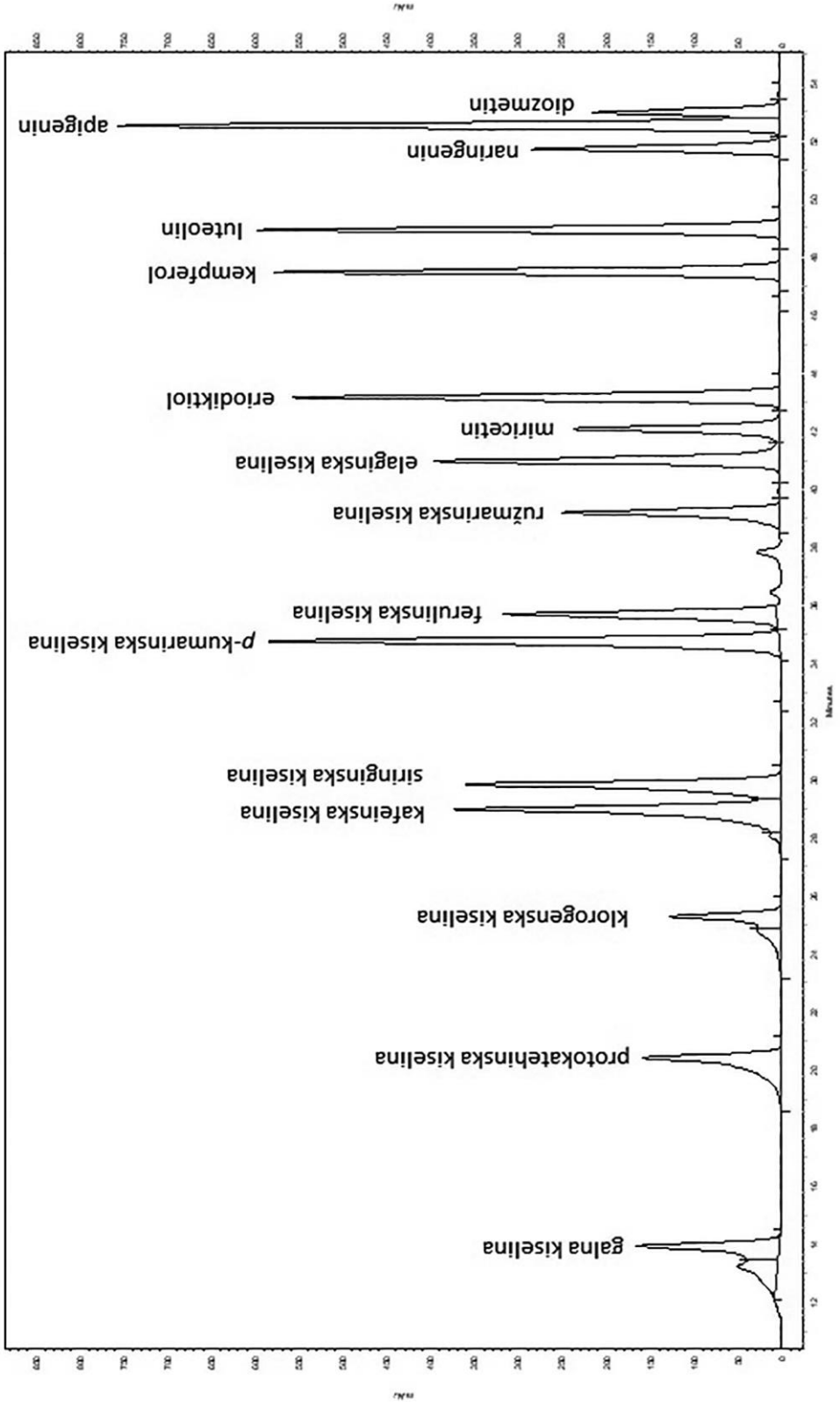
U odnosu na vodene ekstrakte, metanolni ekstrakti su pokazali veći sadržaj ukupnih fenola i flavonoida. Manje polarni flavonoidi (izoflavoni, flavanoni, metilirani flavoni i flavonoli) se bolje ekstrahiraju kloroformom, diklorometanom, dietil eterom ili etil acetatom, dok se flavonoidni glikozidi i polarniji aglikoni ekstrahiraju alkoholom ili smjesom voda-alkohol. Glikozidi povećavaju topljivost u vodi, pa su za njih prikladne spomenute smjese ekstrakcijskih sredstava.[79]

4.1.2.4. HPLC/DAD analiza vodenih i metanolnih ekstrakata testiranih biljaka

Vodeni i metanolni ekstrakti dobiveni izolacijom iz svježeg biljnog materijala biljaka *Mentha pulegium, Teucrium montanum, Satureja subspicata* i *Clinopodium vulgare* analizirani su uz pomoć sustava visokoučinske tekućinske kromatografije i detektora s nizom dioda, HPLC/DAD.

Ekstrakti su analizirani u pogledu sadržaja dvadeset različitih fenolnih spojeva, a kvalitativno i kvantitativno je određeno njih šesnaest. Preliminarnim ispitivanjem utvrđeno da ispitivani uzorci ne sadrže kvercetin, rutin, diozmin i krizoeriol.

Na **slici 4.3.** je prikazan kromatogram (**prilog 5.**) za šesnaest različitih standarda. Retencijska vremena za standarde, izražena u minutama, su bila sljedeća: galna kiselina Rt = 13,93; protokatehinska kiselina Rt = 20,41; klorogenska kiselina Rt = 25,28; kafeinska kiselina Rt = 28,97; siringinska kiselina Rt = 29,83; *p*-kumarinska kiselina Rt = 34,76; ferulinska kiselina Rt = 35,69; ružmarinska kiselina Rt = 39,19; elaginska kiselina Rt = 40,96; miricetin Rt = 42,07; eriodiktiol Rt = 43,15; kempferol Rt = 47,47; luteolin Rt = 48,92; naringenin Rt = 51,71; apigenin Rt = 52,50 i diozmetin Rt = 52,97. Rezultati za šesnaest kvalitativno i kvantitativno određenih spojeva su dati u **tablici 4.9.** i **tablici 4.10.**



Slika 4.3. Kromatogram šesnaest različitih standarda korištenih kod HPLC/DAD analiza

Tablica 4.9. Sadržaj pojedinih fenolnih spojeva u vodenim ekstraktima

	Mentha pulegium	***Teucrium montanum***	***Satureja subspicata***	***Clinopodium vulgare***
	vodeni ekstrakti (mg/g ekstrakta)			
Flavonoli				
kempferol	nd	0,07±0,00	0,06±0,00	0,18±0,00
miricetin	0,15±0,00	0,13±0,01	**0,47±0,01**	0,83±0,01
Flavoni				
apigenin	nd	nd	0,01±0,00	0,004±0,00
diozmetin	0,09±0,00	nd	0,04±0,00	0,01±0,00
luteolin	nd	0,03±0,00	0,29±0,01	0,07±0,00
Flavanoni				
naringenin	0,11±0,00	0,13±0,00	0,17±0,00	0,01±0,00
eriodiktiol	**0,73±0,15**	0,03±0,01	0,17±0,07	0,84±0,05
Hidroksib. kis.				
galna	nd	0,01±0,00	nd	0,10±0,01
siringinska	0,04±0,00	0,27±0,01	0,13±0,00	nd
elaginska	**2,02±0,04**	**3,51±0,99**	**0,33±0,02**	**23,11±4,41**
Hidroksic. kis.				
ferulinska	0,05±0,00	0,18±0,01	**0,38±0,00**	**3,99±0,07**
kafeinska	0,22±0,01	**0,71±0,01**	0,20±0,00	nd
klorogenska	**0,79±0,02**	0,40±0,00	0,16±0,01	1,58±0,01
p-kumarinska	0,13±0,00	**15,95±0,11**	0,25±0,01	**2,53±0,01**
ružmarinska	**24,19±0,36**	**0,51±0,07**	**45,11±0,84**	**26,63±0,57**
protokatehinska	0,33±0,03	nd	nd	0,32±0,01
Σ mg/g ekstrakta	28,85±0,05	21,91±0,09	48,94±0,07	60,22±0,37
% g/100 g ekstrakta	2,88±0,01	2,19±0,01	4,89±0,01	6,02±0,04

*nd - nije identificiran

Tablica 4.10. Sadržaj pojedinih fenolnih spojeva u metanolnim ekstraktima

	Mentha pulegium	***Teucrium montanum***	***Satureja subspicata***	***Clinopodium vulgare***
	metanolni ekstrakti (mg/g ekstrakta)			
Flavonoli				
kempferol	1,18±0,03	0,02±0,00	**1,53±0,01**	0,15±0,01
miricetin	0,49±0,01	nd	0,43±0,00	1,09±0,11
Flavoni				
apigenin	0,18±0,01	0,01±0,00	0,07±0,00	0,14±0,01
diozmetin	0,14±0,01	0,05±0,05	0,02±0,00	nd
luteolin	0,02±0,00	0,04±0,00	0,41±0,01	0,22±0,01
Flavanoni				
naringenin	**1,9±0,02**	**0,76±0,01**	0,43±0,02	0,01±0,00
eriodiktiol	**5,56±0,05**		**7,73±0,79**	0,83±0,06
Hidroksib. kis.				
galna	nd	nd	nd	nd
siringinska	0,11±0,00	0,02±0,00	0,16±0,00	nd
elaginska	**5,44±1,52**	**7,25±0,42**	**1,05±0,17**	**29,31±4,79**
Hidroksic. kis.				
ferulinska	nd	0,08±0,02	0,14±0,01	**2,19±0,14**
kafeinska	0,32±0,01	**10,73±0,09**	0,37±0,02	0,18±0,01
klorogenska	1,61±0,01	0,21±0,00	0,34±0,01	1,47±0,11
p-kumarinska	0,17±0,01	**21,98±0,23**	0,17±0,01	**1,94±0,11**
ružmarinska	**37,33±0,47**	0,18±0,01	**49,13±1,07**	**34,21±1,49**
protokatehinska	0,30±0,02	nd	nd	0,04±0,00
Σ mg/g ekstrakta	54,74±0,15	41,34±0,07	61,97±0,15	71,77±0,53
% g/100 g ekstrakta	5,47±0,02	4,134±0,01	6,20±0,02	7,18±0,05

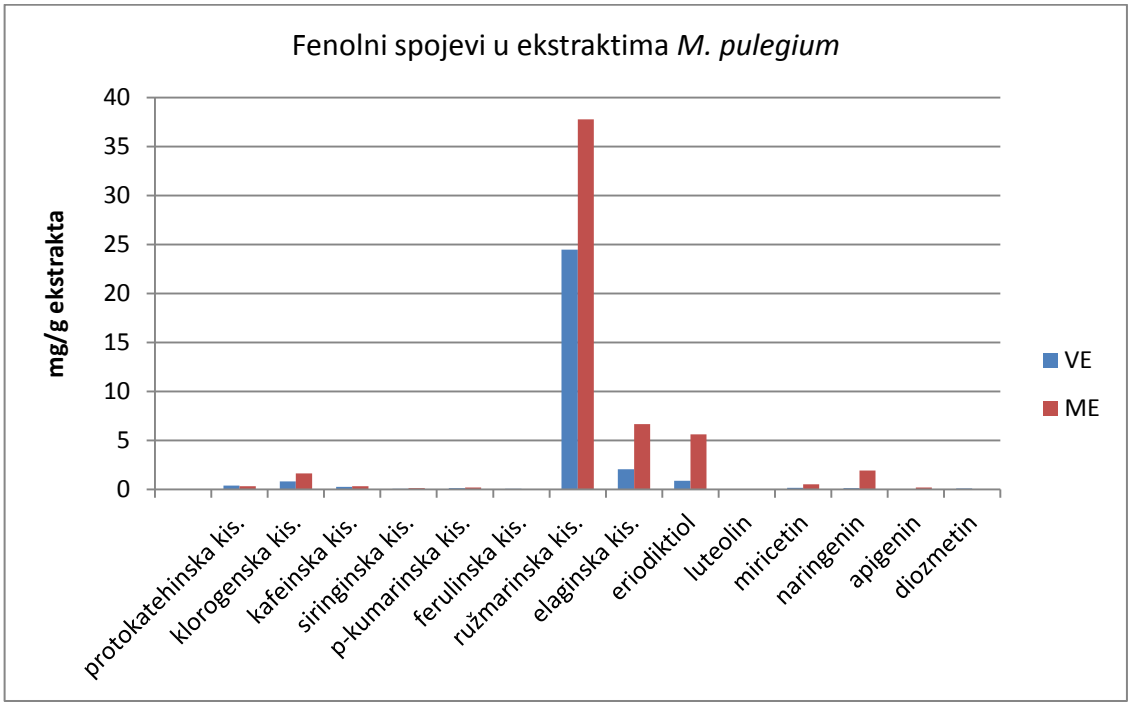
*nd - nije identificiran

Od identificiranih spojeva u vodenom ekstraktu *M. pulegium* najveći je udio hidroksicimetnih kiselina s 89,15% (25,71 mg/g ekstrakta), hidroksibenzojevih kiselina 7,14% (2,06 mg/g ekstrakta), flavanona 2,91% (0,84 mg/g ekstrakta), flavonola 0,52% (0,15 mg/g ekstrakta) i flavona 0,31% (0,09 mg/g ekstrakta). Najzastupljenije

hidroksicimetne kiseline su ružmarinska (24,19±0,36 mg/g ekstrakta) i klorogenska kiselina (0,79±0,02 mg/g ekstrakta), najzastupljenija hidroksibenzojeva kiselina je elaginska kiselina (2,02±0,04 mg/g ekstrakta), dok je od ostalih identificiranih spojeva najzastupljeniji flavanon eriodiktiol (0,73±0,15 mg/g ekstrakta). Kromatogrami vodenog ekstrakta biljke *M. pulegium* dobiveni HPLC/DAD analizom nalaze se u prilogu (**prilog 6.** i **7.**).

U odnosu na identificirane spojeve u metanolnom ekstraktu *M. pulegium* udio hidroksicimetnih kiselina je 72,58% (39,73 mg/g ekstrakta), flavanona 13,63% (7,46 mg/g ekstrakta), hidroksibenzojevih kiselina 10,14% (5,55 mg/g ekstrakta), flavonola 3,05% (1,67 mg/g ekstrakta) i flavona 0,62% (0,34 mg/g ekstrakta). Od identificiranih spojeva najzastupljeniji su: hidroksicimetna kiselina; ružmarinska kiselina (37,33±0,47 mg/g ekstrakta), flavanon eriodiktiol (5,56±0,05 mg/g ekstrakta) te hidroksibenzojeva kiselina; elaginska kiselina (5,44±1,52 mg/g ekstrakta). Kromatogrami metanolnog ekstrakta biljke *M. pulegium* dobiveni HPLC/DAD analizom nalaze se u prilogu (**prilog 8.** i **9.**).

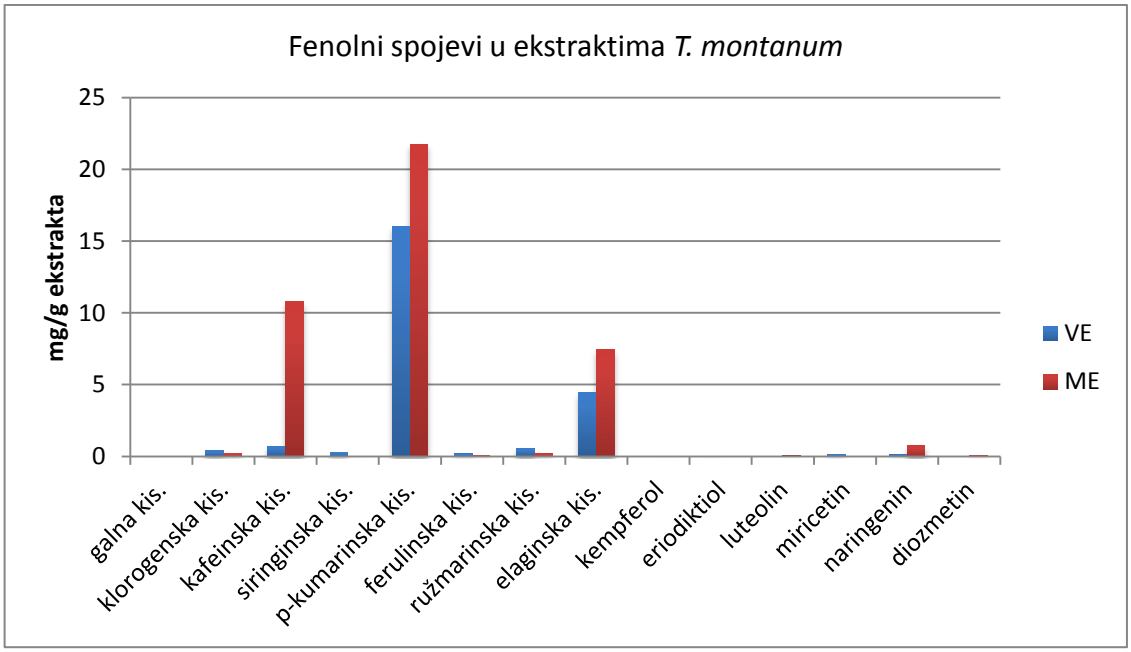
Na **slici 4.4.** je prikazan sadržaj pojedinih fenolnih spojeva u vodenom i metanolnom ekstraktu biljke *M. pulegium*.



Slika 4.4. Fenolni spojevi u ekstraktima biljke *M. pulegium*

U ukupnoj masi identificiranih spojeva u vodenom ekstraktu *T. montanum* najviše je hidroksicimetnih kiselina 81,01% (17,75 mg/g ekstrakta), slijede hidroksibenzojeve kiseline 17,28% (3,79 mg/g ekstrakta), flavonoli 0,9% (0,2 mg/g ekstrakta), flavanoni 0,73% (0,16 mg/g ekstrakta) te flavoni 0,14% (0,03 mg/g ekstrakta). Najzastupljeniji spoj je *p*-kumarinska kiselina (15,95±0,11 mg/g ekstrakta), slijede elaginska kiselina (3,51±0,99 mg/g ekstrakta), kafeinska kiselina (0,71±0,01 mg/g ekstrakta) i ružmarinska kiselina (0,51±0,07 mg/g ekstrakta). Kromatogrami vodenog ekstrakta biljke *T. montanum* dobiveni HPLC/DAD analizom nalaze se u prilogu (**prilog 10.** i **11.**).

Sa najvećim udjelom u ukupnoj masi identificiranih spojeva u metanolnom ekstraktu biljke *T. montanum* najzastupljenije su hidroksicimetne kiseline 80,26% (33,18 mg/g ekstrakta), hidroksibenzojeve kiseline 17,59% (7,27 mg/g ekstrakta), flavanoni 1,84% (0,76 mg/g ekstrakta), flavoni 0,24% (0,1 mg/g ekstrakta) i flavonoli 0,05% (0,02 mg/g ekstrakta). Najzastupljeniji spoj je *p*-kumarinska kiselina (21,98±0,23 mg/g ekstrakta), slijede kafeinska kiselina (10,73±0,09 mg/g ekstrakta) i elaginska kiselina (7,25±0,42 mg/g ekstrakta). Kromatogrami metanolnog ekstrakta biljke *T. montanum* dobiveni HPLC/DAD analizom nalaze se u prilogu (**prilog 12.** i **13.**). Na **slici 4.5.** je prikazan sadržaj pojedinih fenolnih spojeva u vodenom i metanolnom ekstraktu biljke *T. montanum*.

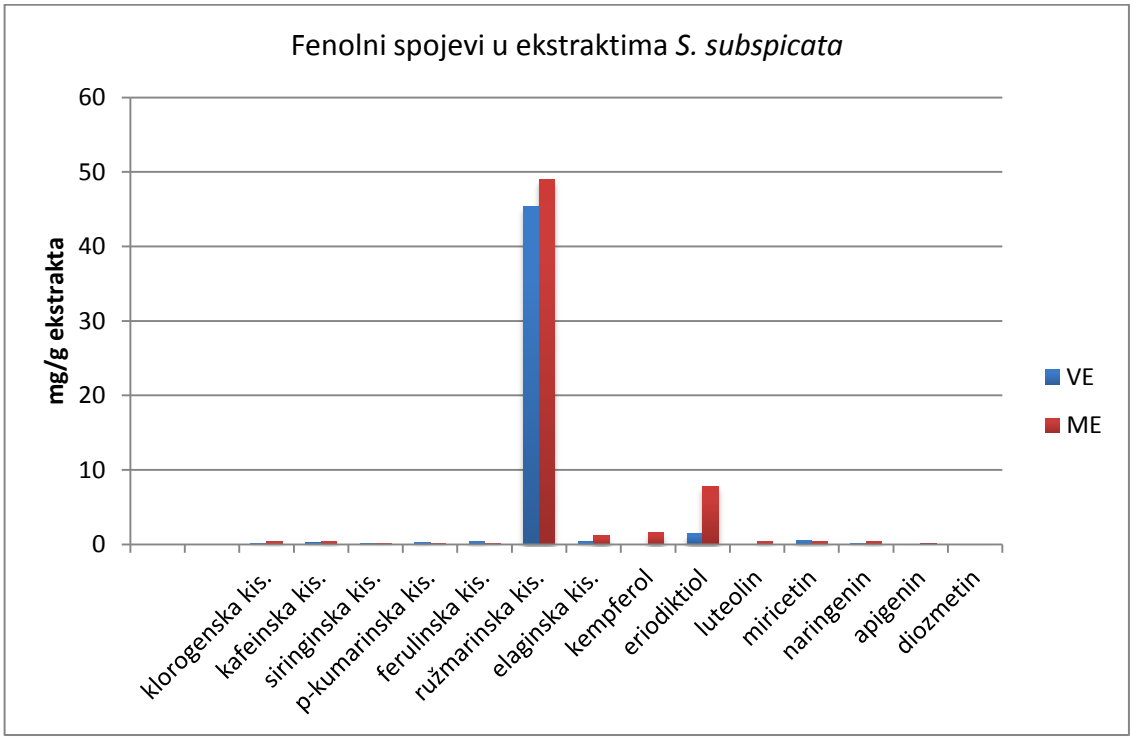


Slika 4.5. Fenolni spojevi u ekstraktima biljke *T. montanum*

Od identificiranih spojeva u vodenom ekstraktu *S. subspicata* hidroksicimetne kiseline su zastupljene s 94,2% (46,1 mg/g ekstrakta), slijede flavonoli 1,08% (0,53 mg/g ekstrakta), hidroksibenzojeve kiseline 0,94% (0,46 mg/g ekstrakta), flavanoni 0,69% (0,34 mg/g ekstrakta) i flavoni 0,69% (0,34 mg/g ekstrakta). Najzastupljenija je ružmarinska kiselina (45,11±0,84 mg/g ekstrakta), slijedi flavonol miricetin (0,47±0,01 mg/g ekstrakta) te ferulinska kiselina (0,38±0,00 mg/g ekstrakta). Kromatogrami vodenog ekstrakta biljke *S. subspicata* dobiveni HPLC/DAD analizom nalaze se u prilogu (**prilog 14.** i **15.**).

U ukupnoj masi identificiranih spojeva u metanolnom ekstraktu *S. subspicata* najveći je udio hidroksicimetnih kiselina 80,93% (50,15 mg/g ekstrakta). Slijede flavanoni s 13,17% (8,16 mg/g ekstrakta), flavonoli 3,16% (1,96 mg/g ekstrakta), hidroksibenzojeve kiseline 1,95% (1,21 mg/g ekstrakta) i flavoni 0,8% (0,5 mg/g ekstrakta). Najzastupljeniji spoj je ružmarinska kiselina (49,13±1,07 mg/g ekstrakta), slijede eriodiktiol (7,73±0,79 mg/g ekstrakta) i kempferol (1,53±0,01 mg/g ekstrakta). Kromatogrami metanolnog ekstrakta biljke *S. subspicata* dobiveni HPLC/DAD analizom nalaze se u prilogu (**prilog 16.** i **17.**).

Na **slici 4.6.** je prikazan sadržaj pojedinih fenolnih spojeva u vodenom i metanolnom ekstraktu biljke *S. subspicata*.

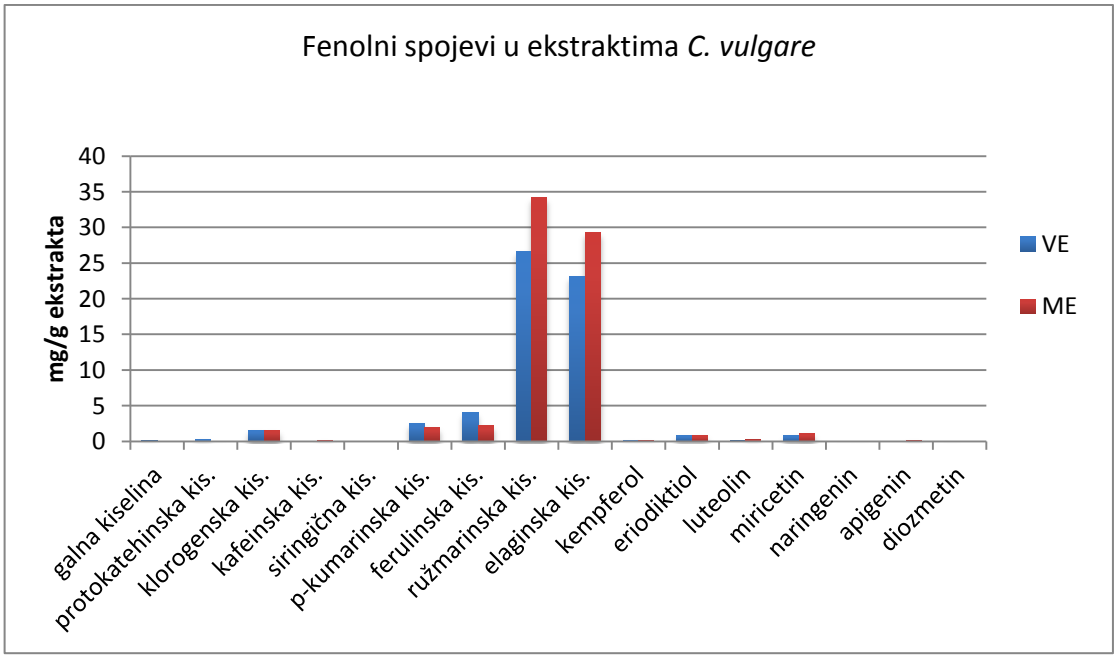


Slika 4.6. Fenolni spojevi u ekstraktima biljke *S. subspicata*

U ukupnoj masi identificiranih spojeva u vodenom ekstraktu *C. vulgare* najveći je udio hidroksicimetnih kiselina 58,2% (35,05 mg/g ekstrakta), slijede hidroksibenzojeve kiseline s 38,54% (23,21 mg/g ekstrakta), flavonoli 1,68% (1,01 mg/g ekstrakta), flavanoni 0,14% (0,085 mg/g ekstrakta) i flavoni 0,14% (0,084 mg/g ekstrakta). Od spojeva su najzastupljeniji ružmarinska kiselina (26,63±0,57 mg/g ekstrakta), elaginska kiselina (23,11±4,41 mg/g ekstrakta) te ferulinska (3,99±0,07 mg/g ekstrakta) i *p*-kumarinska kiselina (2,53±0,01 mg/g ekstrakta). Kromatogrami vodenog ekstrakta biljke *C. vulgare* dobiveni HPLC/DAD analizom nalaze se u prilogu (**prilog 18.** i **19.**).

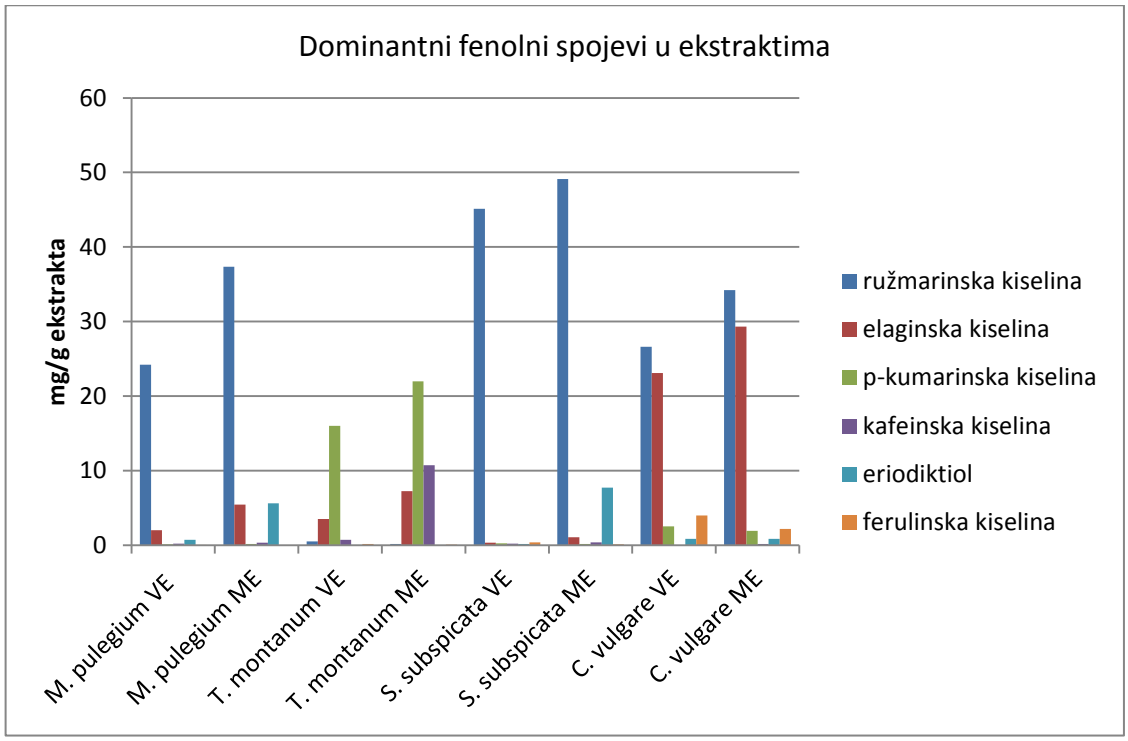
Među identificiranim spojevima u metanolnom ekstraktu *C. vulgare* najzastupljenije su sljedeće grupe spojeva: hidroksicimetne kiseline 55,78% (40,03 mg/g ekstrakta), hidroksibenzojeve kiseline 40,84% (29,31 mg/g ekstrakta), flavonoli 1,73% (1,24 mg/g ekstrakta), flavanoni 1,17% (0,84 mg/g ekstrakta) te flavoni 0,5% (0,36 mg/g ekstrakta). Najzastupljenija je ružmarinska kiselina (34,21±1,49), potom elaginska (29,31±4,79) i ferulinska kiselina (2,19±0,135). Kromatogrami metanolnog ekstrakta biljke *C. vulgare* dobiveni HPLC/DAD analizom nalaze se u prilogu (**prilog 20.** i **21.**).

Na **slici 4.7.** je prikazan sadržaj pojedinih fenolnih spojeva u vodenom i metanolnom ekstraktu biljke *C. vulgare*.

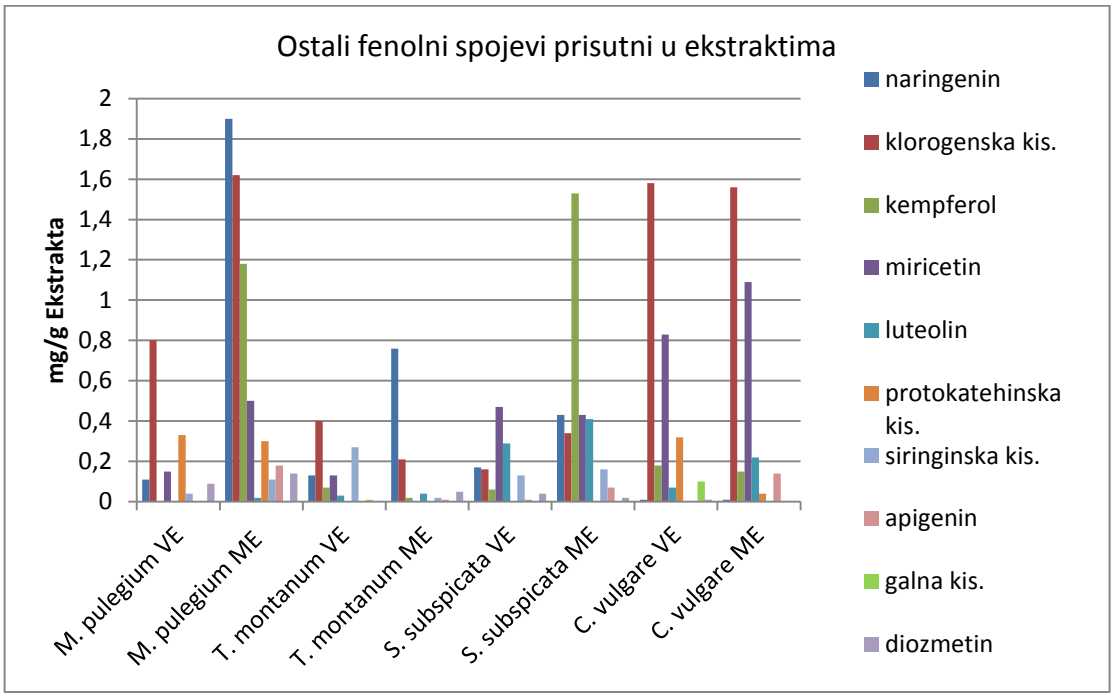


Slika 4.7. Fenolni spojevi u ekstraktima biljke *C. vulgare*

Na **slici 4.8.** je prikaz dominantnih fenolnih spojeva, dok je na **slici 4.9.** prikaz fenolnih spojeva s manjim udjelom u ispitivanim ekstraktima.



Slika 4.8. Dominantni fenolni spojevi u ispitivanim vodenim i metanolnim ekstraktima



Slika 4.9. Ostali fenolni spojevi u ekstraktima

Pregled literaturnih podataka za rezultate u pogledu sadržaja fenolnih komponenti određenih HPLC tehnikom za četiri ispitivane biljke

Sadržaj hidroksicimetnih kiselina u etanolnom ekstraktu *M. pulegium* s područja Hrvatske bio je: ružmarinska kiselina 12,72 (mg/g ekstrakta), klorogenska kiselina 1,64 i kafeinska kiselina 0,72.[66]

Sadržaj fenolnih komponenti u etanolnom ekstraktu *M. pulegium* sa područja Alžira određen HPLC/DAD tehnikom bio je: diozmin 4,5±0,90 (% w/w), ružmarinska kiselina 4,0±0,70, klorogenska kiselina 2,88±0,04, 4-hidroksibenzojeva kiselina 0,2±0,00, luteolin 0,1±0,00, kafeinska kiselina 0,09±0,00, *p*-kumarinska kiselina 0,06±0,00, apigenin 0,04±0,01 i kempferol 0,02±0,02. Diozmetin, rutin i naringenin nisu detektirani.[22]

U metanolnim ekstraku *M. pulegium* sa područja Grčke HPLC/DAD analizom određeni su: ferulinska kiselina 280±0,08, kafeinska kiselina 60±0,08, vanilinska kiselina 0,8±0,02, apigenin 110±0,07, naringenin 42±0,06, (+)-katehin 26±0,05, luteolin 15 mg/100 g suhog uzorka. Kvercetin, rutin i galna kiselina nisu detektirani.[108]

Sadržaj ružmarinske kiseline određen HPLC/DAD analizom u ekstraktu (voda: metanol:2-propanol, omjera 80:10:10) *M. pulegium* s područja Irana je bio 23,4±0,3 mg/g suhog biljnog materijala.[23]

U vodenom i metanolnom ekstraktu u ovom radu za *M. pulegium* dominantni spojevi su bili: ružmarinska kiselina (24,19±0,36 i 37,33±0,47), elaginska kiselina (2,02±0,04 i 5,44±1,52), eriodiktiol (0,73±0,15 i 5,56±0,05) i klorogenska kiselina (0,79±0,02 i 1,61±0,01 mg/g ekstrakta).

Sadržaj ružmarinske kiseline bio je viši u odnosu na njen sadržaj u etanolnim ekstraktima iste biljke s područja Hrvatske i Irana, dok je za metanolni ekstrakt sadržaj bio veoma sličan onome određenom za *M. pulegium* na području Alžira. Za sadržaj elaginske kiseline i eriodiktiola nisu pronađeni literaturni podatci, dok je sadržaj klorogenske kiseline za metanolni ekstrakt jednak onome u etanolnim ekstraktima za područje Hrvatske.

U vodenom i metanolnom ekstraktu *T. montanum* s područja Srbije (Zlatibor) galna kiselina nije bila prisutna, dok su protokatehinska i ferulinska kiselina bile prisutne u metanolnom ekstraktu sa sadržajem 0,09 mg/g i 0,05 mg/g. Klorogenska

kiselina je bila prisutna u vodenom ekstraktu sa sadržajem 0,15 mg/g ekstrakta. Kafeinska, siringinska i kumarinska kiselina su bile prisutne u metanolnom i vodenom ekstraktu s sadržajem 0,13 i 0,06; 0,15 i 0,05; 0,02 i 0,01 mg/g ekstrakta.[116]

U etanolnom ekstraktu *T. montanum* s područja Hrvatske sadržaj hidroksicimetnih kiselina je bio: klorogenska kiselina 2,25, kafeinska kiselina 2,36 i ferulinska kiselina 1,70 mg/g ekstrakta.[66] Najzastupljeniji flavonoidi u nadzemnim dijelovima *T. montanum* sa područja Bugarske su bili luteolin i diozmetin.[121]

U vodenom i metanolnom ekstraktu biljke *T. montanum* najzastupljeniji su: *p*-kumarinska kiselina (15,95±0,11 i 21,98±0,23), elaginska kiselina (3,51±0,99 i 7,25±0,42) i kafeinska kiselina (0,71±0,01 i 10,73±0,09 mg/g ekstrakta).

Sadržaj kafeinske kiseline je za metanolni ekstrakt veći od njenog sadržaja u etanolnim ekstraktima sa područja Hrvatske te vodenom i metanolnom ekstraktu sa područja Srbije. Sadržaj klorogenske i ferulinske kiseline je bio veći od njihovog sadržaja u metanolnom ekstraktu s područja Srbije i manji od njihovog sadržaja u etanolnom ekstraktu s područja Hrvatske. Najzastupljeniji flavonoidi u metanolnom ekstraktu bili su naringenin, diozmetin i luteolin.

U metanolnom ekstraktu *S. subspicata* sa područja Hrvatske HPLC/DAD tehnikom određeni su: rutin sa sadržajem od 0,07 do 1,14%, kafeinska kiselina 0,03%, elaginska kiselina od 0,07 do 1,14%, ružmarinska kiselina 1,32 do 2,61%, siringinska kiselina 0,02% te protokatehinska kiselina u tragovima. Nisu detektirani kvercetin, naringenin, *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, sinapinska kiselina.[26] Najzastupljenije hidroksicimetne kiseline u etanolnom ekstraktu *S. subspicata* bile su: ružmarinska kiselina 46,11 (mg/g ekstrakta), klorogenska kiselina 1,62 i kafeinska kiselina 1,78.[66]

U ovom radu u vodenom ekstraktu biljke *S. subspicata* najzastupljeniji su bili: ružmarinska kiselina (45,11±0,84), miricetin (0,47±0,01), ferulinska kiselina (0,38±0,00) i elaginska kiselina (0,33±0,02), dok su u metanolnom ekstraktu najzastupljeniji bili: ružmarinska kiselina (49,13±1,07), eriodiktiol (7,73±0,79), kempferol (1,53±0,01) i elaginska kiselina (1,05±0,17 mg/g ekstrakta).

Sadržaj ružmarinske kiseline bio je jednak ili neznatno viši od njenog sadržaja određenog u etanolnom ekstraktu, dok je njen sadržaj bio znatno viši od onog u metanolnom ekstraktu za istu biljku na području Hrvatske. Visok sadržaj ružmarinske

kiseline ukazuje na to da *S. subspicata* s područja BiH može biti važan izvor ružmarinske kiseline. Sadržaj klorogenske i kafeinske kiseline je bio manji, dok je u metanolnom ekstraktu bio sličan sadržaj za elaginsku i siringinsku kiselinu, u odnosu na spomenute ekstrakte sa području Hrvatske.

Sadržaj hidroksicimetnih kiselina u etanolnom ekstraktu određenih HPLC/DAD tehnikom za *C. vulgare* bio je: ružmarinska kiselina 12,27 (mg/g ekstrakta), klorogenska kiselina 2,25 i kafeinska kiselina 0,56.[66] Ferulinska, *cis*-cimetna i *p*-kumarinska kiselina su među dominantnim fenilkarboksilnim kiselinama u vodenim ekstraktima biljke *C. vulgare*.[23]

Dominantni spojevi u vodenim i metanolnim ekstraktima *C. vulgare* u ovom radu su bili: ružmarinska kiselina (26,63±0,57 i 34,21±1,49), elaginska kiselina (23,11±4,41 i 29,31±4,79), ferulinska kiselina (3,99±0,07 i 2,19±0,14) i *p*-kumarinska kiselina (2,53±0,01 i 1,94±0,11 mg/g ekstrakta). Sadržaj ružmarinske kiseline bio je značajno veći od njenog sadržaja u etanolnom ekstraktu iste biljke s područja Hrvatske, dok je sadržaj klorogenske i kafeinske kiseline manji.

4.2. Biološki potencijal eteričnih ulja te vodenih i metanolnih ekstrakata ispitivanih biljnih vrsta

4.2.1. Antioksidacijski potencijal eteričnih ulja te vodenih i metanolnih ekstrakata

Različiti metodološki pristupi pri određivanju antioksidacijskog potencijala biljnih ekstrakata dovode do različitih rezultata koje je teško usporediti, a često su i u suprotnosti. Budući da rezultati ovise o različitim mehanizmima, odosno modelima oksidans/antioksidans te lipofilnoj/hidrofilnoj ravnoteži, potrebno je koristiti komplementarne modele, primjerice DPPH test i test *β*-karoten/linolna kiselina.[123]

Antioksidacijski potencijal ispitivanih eteričnih ulja i ekstrakata testiran je FRAP metodom i DPPH metodom. Vodeni i metanolni ekstrakti, koji su pokazali bolji antioksidacijski potencijal u odnosu na eterična ulja, dodatno su testirani u smislu zaštitne uloge od oksidacijskih oštećenja na razini makromolekula; lipida i proteina.

Rezultati testiranja antioksidacijskog potencijala FRAP i DPPH metodom su prikazani **tablicom 4.11.**, antioksidacijski indeksi su prikazani u **tablici 4.12.** Rezultati testiranja sposobnosti ekstrakata da zaštite lipide i proteine od oksidacijskih oštećenja prikazani **slikama 4.10.**, **4.11. i 4.12.** te **tablicom 4.13.**

Tablica 4.11. Antioksidacijski potencijal eteričnih ulja i ekstrakata testiran DPPH i FRAP metodom

Uzorak		**DPPH** IC_{50} (μg mL^{-1})	**FRAP** Fe^{2+} μmol/g uzorka[a]
M. pulegium	Eterično ulje	94,29	6,71±4,55 [b]
	Vodeni ekstrakt	35,71	894,67±38,05
	Metanolni ekstrakt	38,09	1584,19±85,87
T. montanum	Eterično ulje	201,91	13,02±4,31
	Vodeni ekstrakt	38,09	761,33±11,89
	Metanolni ekstrakt	21,43	1548,00±16,16
S. subspicata	Eterično ulje	157,14	73,89±3,25
	Vodeni ekstrakt	21,91	1664,19±23,09
	Metanolni ekstrakt	21,43	1879,43±44,63
C. vulgare	Eterično ulje	1293,81	17,43±1,52
	Vodeni ekstrakt	32,38	976,57±17,14
	Metanolni ekstrakt	25,71	2115,62±99,36
BHA		17,62	5586,29±174,76
Vitamin C		16,67	5568,43±125,26

[a] Uzorak: ekstrakt ili eterično ulje. [b]Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SD (n=3).

Najveći potencijal u hvatanju DPPH radikala pokazali su metanolni ekstrakt *S. subspicata* i *T. montanum*. Slijede metanolni i vodeni ekstrakt *C. vulgare*, vodeni ekstrakt *M. pulegium* te vodeni i metanolni ekstrakt *T. montanum* i *M. pulegium*. Potencijal u hvatanju DPPH radikala za eterična ulja, bio je kako slijedi: *M. pulegium*, *S. subspicata*, *T. montanum* i *C. vulgare*.

U FRAP testu rezultati prema uspješnosti za ispitivane uzorke su bili kako slijedi: metanolni ekstrakt *C. vulgare*, metanolni i vodeni ekstrakt *S. subspicata*, metanolni ekstrakt *T. montanum* i *M. pulegium*, vodeni ekstrakt *C. vulgare*, *M. pulegium* i *T. montanum*. Rezultati za eterična ulja su bili značajno niži, kako slijedi: *S. subspicata*, *C. vulgare*, *T. montanum* i *M. pulegium*.

U DPPH testu eterično ulje, vodeni i metanolni ekstrakti *M. pulegium* su pokazali sljedeće IC_{50} vrijednosti: 94,29; 35,71 i 38,09 μg mL^{-1}. U odnosu na IC_{50} vrijednosti dobivene za poznato dobre antioksidanse BHA (17,62 μg/mL) i askorbinsku kiselinu (16,67 μg/mL), ispitivani vodeni i metanolni ekstrakti pokazali su dobru antioksidacijsku aktivnost.

U FRAP testu metanolni ekstrakt je, u polaznoj koncentraciji od 1 mg/mL, sa 1584,19±85,87 μmol Fe^{2+}/g ekstrakta pokazao najvišu vijednost u odnosu na vodeni ekstrakt 894,67±38,05 i eterično ulje 6,71±4.55 μmol Fe^{2+}/g uzorka. Pri istim ispitivanim koncentracijama BHA i askorbinska kiselina su pokazali sljedeće vrijednosti: 5586,29±174,76 i 5568,43±125,26 Eq Fe^{2+} μmol/g uzorka.

Dobivene vrijednosti u DPPH testu za eterično ulje *M. pulegium* (94,29 μg/mL) pokazale su bolju antioksidacijsku aktivnost u odnosu na eterično ulje s područja Maroka (IC_{50} = 321,41±2,53 μg/mL, u istoj studiji askorbinska kiselina IC_{50} = 27,20±0,17 μg/mL),[92] Portugala (6200±200 μg/mL),[102] Irana (IC_{50} = 14736±156 μg/mL)[97] i Egipta, gdje je eterično ulje u koncentraciji od 500 μg/mL inhibiralo 37±0,2% DPPH radikala.[90] U istom testu eterično ulje s područja Portugala nije bilo aktivno.[100]

Budući da su pulegon i menton poznati po antioksidacijskim svojstvima[102] dobivene rezultate je moguće objasniti višim sadržajem pulegona (54,4%) te značajnim sadržajem *p*-mentona (14,0%) u odnosu na ostala ispitivana ulja. Dobru antioksidacijsku aktivnost pokazuje i 1,8-cineol,[100] koji je također određen kao jedna od komponenti ispitivanog ulja sa udjelom od 0,2%.

Za eterično ulje s područja Maroka, sa dominantnim sastavnicama pulegonom (40,98%) i mentonom (21,16%) navodi se da je u FRAP testu IC_{50} vrijednost za eterično ulje i askorbinsku kiselinu iznosila 58,27±2,72 i 47,63±0,58 μg/mL, respektivno.[92]

Usporedbom dobivenih rezultata DPPH testa za vodeni ekstrakt *M. pulegium* (IC_{50} 35,71 μg/mL) s rezultatima za vodene ekstrakte iste biljke s drugih područja, može se uočiti da isti pokazuje manju sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala. Tako je IC_{50} vrijednost za Iran bila 5,5±0,3 μg/mL (BHT 4,9±0,2 μg/mL),[97] Portugal 8,9±0,2 μg/mL (BHT 15,7±0,2 μg/mL)[100] i 16,3±0,4 μg/mL (BHT 20,2± 2,6μg/mL).[102] Slabiju antioksidacijsku aktivnost pokazao je jedino vodeni ekstrakt *M. pulegium* s područja Maroka sa IC_{50} = 610 μg/mL (BHA 130 μg/mL).[104] Interesantno je uočiti da su oba uzorka sa područja Portugala pokazala bolju sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala u usporedbi s BHT standardom.

IC_{50} vrijednost dobivena u DPPH testu za metanolni ekstrakt *M. pulegium* (38,09 μg/mL) bila je veća od IC_{50} vrijednosti za metanolni ekstrakt iste biljke s područja Irana (6,1±0,1 μg/mL)[97] i manja od IC_{50} vrijednosti za metanolni ekstrakt iste biljke s područja Maroka (490 μg/mL).[104] Dobiveni rezultati su u pogledu inhibicije DPPH radikala bili bolji i od rezultata za metanolni ekstrakt *M. pulegium* s područja Egipta, koji je u koncentraciji od 500 μg/mL, pokazao inhibiciju od 79,3±3%.[90]

U DPPH testu etanolni ekstrakt *M. pulegium* sa područja Irana imao je IC_{50} vrijednost od 17,9 μg/mL,[107] s područja Portugala 24,9±0,2 μg/mL,[100] s područja Hrvatske 24,27 μg/mL,[66] te s područja Alžira 42,7±2.3 μg/mL.[22] Dobiveni rezultati za vodeni i metanolni ekstrakt su u skladu sa navedenim literaturnim podatcima.

Rezultati FRAP testa za *M. pulegium* s područja Portugala pokazuju najviši antioksidacijski kapacitet za ekstrakt dobiven ekstrakcijom kipućom vodom, potom eterično ulje, etanolni ekstrakt te ekstrakt dobiven ekstrakcijom hladnom vodom; od 4,7 do 10,3 μmol Fe^{2+} po g uzorka.[102] Navedeni podatci su značajno niži od rezultata dobivenih u ovom radu.

Istraživanja su pokazala da *M. pulegium* sadrži brojne komponente s antioksidacijskim potencijalom, među kojima i apigenin, luteolin i krizoeriol.[136] Razlike u dobivenim rezultatima ovise o kemijskom sastavu ispitivanih uzoraka, koji varira ovisno o području uzorkovanja, korištenom dijelu biljke i metodi ekstrakcije. Značajna razlika dobrog antioksidacijskog kapaciteta vodenih i metanolnih ekstrakata u usporedbi sa slabijim antioksidacijskim kapacitetom eteričnih ulja je uzrokovana prisustvom fenolnih i flavonoidnih komponenti u ekstraktima.[100] Pronađena je visoka korelacija između sadržaja ukupnih fenola i rezultata DPPH testa.[104,107]

Kao što je navedeno u tablici vodeni i metanolni ekstrakt *S. subspicata* pokazuju obećavajući antioksidacijski potencijal u usporedbi sa standardima askorbinskom kiselinom (IC_{50} = 16,67 μg/mL) i BHA (IC_{50} = 17,62 μg/mL), s IC_{50} vrijednostima od 21,91 i 21,43 μg/mL. Eterično ulje iste biljke je pokazalo slabiji antioksidacijski potencijal s IC_{50} = 157,14 μg/mL.

Etanolni ekstrakt *S. subspicata* iz Hrvatske je imao viši antioksidacijski potencijal u odnosu na ispitivane ekstrakte i eterično ulje s IC_{50} = 3,08 μg/mL[66], dok su rezultati za eterično ulje s jedne lokacije u BiH, za biljku u dvije različite faze razvoja, s IC_{50} = 15,6 mg/mL (ljetni period) i IC_{50} = 21,0 mg/mL (jesenji period)[7] bili značajno niži.

Rezultati eteričnog ulja i ekstrakata *S. subspicata*, u polaznoj koncentraciji od 1 mg/mL, u FRAP testu su bili sljedeći: za eterično ulje 73,89 (μmol Fe^{2+}/g eteričnog ulja), za vodeni ekstrakt 1664,19 (μmol Fe^{2+}/g ekstrakta) i metanolni ekstrakt 1879,43 (μmol Fe^{2+}/g ekstrakta). Antioksidacijski potencijal askorbinske kiseline i BHA su bili 5568,43 i 5586,27 (μmol Fe^{2+}/g uzorka), za istu ispitivanu koncentraciju.

Rezultati dobiveni u oba testa pokazuju slabiju antioksidacijsku aktivnost *S. subspicata* eteričnog ulja. To može biti posljedica manjeg sadržaja fenolnih komponenti ili monoterpena karvakrola i timola, koji pokazuju dobra antioksidacijska svojstva.[31] Značajnu antioksidacijsku aktivnost su pokazali vodeni i metanolni ekstrakt, što je najvjerojatnije uzrokovano visokim sadržajem fenolnih spojeva, budući da je poznato da dobro antioksidacijsko djelovanje pokazuju komponente, kao što su flavonoidi i fenolne kiseline.[121]

U DPPH testu IC_{50} vrijednosti za eterično ulje, vodeni i metanolni ekstrakt *C. vulgare* bile su kako slijedi: 1293,81; 32,38 i 25,71 μg/mL. Usporedbom s IC_{50} vrijednostima askorbinske kiseline (16,67 μg/mL) i BHA (17,62 μg/mL) eterično ulje je pokazalo slabu sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala, za razliku od vodenog i metanolnog ekstrakta, koji su se pokazali kao dobri hvatači slobodnih radikala.

Eterično ulje *C. vulgare* s područja Turske u DPPH testu je imalo IC_{50} vrijednost 63,0±2,71 μg/mL, dok su u istom testu IC_{50} vrijednosti za BHT i askorbinsku kiselinu bile 18,0±0,4 i 3,8±0,17 μg/mL. Njegove glavne komponente timol (IC_{50} = 162±1,3 μg/mL) i γ-terpinen (IC_{50} = 122±2,5 μg/mL), pokazale su dobru aktivnost, dok *p*-cimen

nije bio aktivan. Bolja antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja u odnosu na aktivnost timola i γ-terpinena objašnjava se prisustvom drugih komponenti, tj. elektron donora u ulju. Odabrane komponente ovog eteričnog ulja mogu biti alternativa sintetskim antioksidansima, kao aditivi u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.[123]

Razlika u sposobnosti hvatanja slobodnih radikala ispitivanog eteričnog ulja i eteričnog ulja *C. vulgare* s područja Turske, posljedica je razlike u njihovom kemijskom sastavu. Glavna komponenta timol nije identificiran, dok je sadržaj γ-terpinena u ispitivanom ulju bio znatno niži.

U dvije odvojene studije vodeni ekstrakti *C. vulgare* s područja Bugarske u DPPH testu su imali nešto nižu (IC_{50} = 25 μg/mL),[23] odnosno značajno višu IC_{50} vijednost (IC_{50} = 244,52±11,13 μg/mL),[125] u odnosu na rezultate dobivene za vodeni ekstrakt.

Rezultati za metanolni ekstrakt *C. vulgare*, također s podučja Bugarske, su bili vrlo slični dobivenim rezultatima za metanolni ekstrakt (IC_{50} = 22,33 μg/mL).[126] IC_{50} vrijednost za etanolni ekstrakt *C. vulgare* s područja Hrvatske u istom testu je iznosila 17,39±0,13 μg/mL.[66]

U FRAP testu eterično ulje *C. vulgare* pokazalo je također slabu antioksidacijsku aktivnost (17,43± 1,52 μmol Fe^{2+}/g uzorka), dok su dobru aktivnost pokazali vodeni (976,57±17,14 μmol Fe^{2+}/g ekstrakta) i metanolni ekstrakt (2115,62±99,36 μmol Fe^{2+}/g ekstrakta). U postojećim literaturnim izvorima nema podataka za rezultate FRAP testa za eterično ulje i ekstrakte *C. vulgare*.

U DPPH testu IC_{50} vrijednosti za vodeni i metanolne ekstrakate *T. montanum* s područja Srbije bile su 0,240 mg/mL[120] i od 47,99 do 61,69 μg/mL.[118] IC_{50} vrijednost za etanolni ekstrakt *T. montanum* s područja Hrvatske bio je 7,78±0,13 μg/mL.[66] Usporedbom s rezultatima dobivenim u ovom radu sposobnost hvatanja DPPH radikala za vodeni ekstrakt bila je znatno viša, dok je za metanolni ekstrakt bila nešto viša u odnosu na iste ekstrakte s područja Srbije i niža u odnosu na etanolni ekstrakt s područja Hrvatske.

4.2.1.1. Ukupni antioksidacijski indeks

Antioksidacijski indeks (ACI) izračunat je na osnovu mjerenja antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakata pomoću FRAP i DPPH metode. Ukupni antioksidacijski indeks pojedinih uzoraka izražen je kao srednja vrijednost ACI-a uzoraka za obje metode. Dobiveni rezultati su prikazani u **tablici 4.12.**

Tablica 4.12. Antioksidacijski indeks za ispitivane uzorke

Uzorak		**DPPH**	**FRAP**	**ACI**
M. pulegium	Eterično ulje	23	0,3	12
	Vodeni ekstrakt	60	42	51
	Metanolni ekstrakt	56	75	66
T. montanum	Eterično ulje	11	0,6	6
	Vodeni ekstrakt	56	36	46
	Metanolni ekstrakt	100	73	87
S. subspicata	Eterično ulje	14	4	9
	Vodeni ekstrakt	98	79	89
	Metanolni ekstrakt	100	89	95
C. vulgare	Eterično ulje	2	1	2
	Vodeni ekstrakt	66	46	56
	Metanolni ekstrakt	83	100	92

Najviši antioksidacijski indeks imao je metanolni ekstrakt biljke *S. subspicata* (ACI = 95), potom metanolni ekstrakt *C. vulgare* (ACI = 92), vodeni estrakt *S. subspicata* (ACI = 89) i metanolni ekstrakt *T. montanum* (ACI = 87). U odnosu na ekstrakte, najmanji antioksidacijski indeks je imao vodeni ekstrakt *T. montanum* (ACI = 46). Vrijednosti antioksidacijskih indeksa eteričnih ulja kretale su se od 2 za *C. vulgare*, do 12 za *M. pulegium*.

4.2.2. Antioksidacijski potencijal vodenih i metanolnih ekstrakata u pogledu zaštite lipida i proteina od oksidacije

Peroksidacija lipida, kao rezultat djelovanja slobodnih radikala, je proces koji vodi gubitku membranskog integriteta, te time dolazi do narušavanja brojnih staničnih funkcija. Reaktivne vrste također oštećuju proteine, ali zbog brže obnove proteina, smatra se da manje utječu na oštećenje stanica. Zbog povezanosti oštećenja proteina i drugih makromolekula slobodnim radikalima i procesa starenja, postoji značajan interes za istraživanja na ovom polju. Dokazana je kumulacija oksidativno modificiranih proteina tijekom starenja te pri nekim patološkim stanjima.[12]

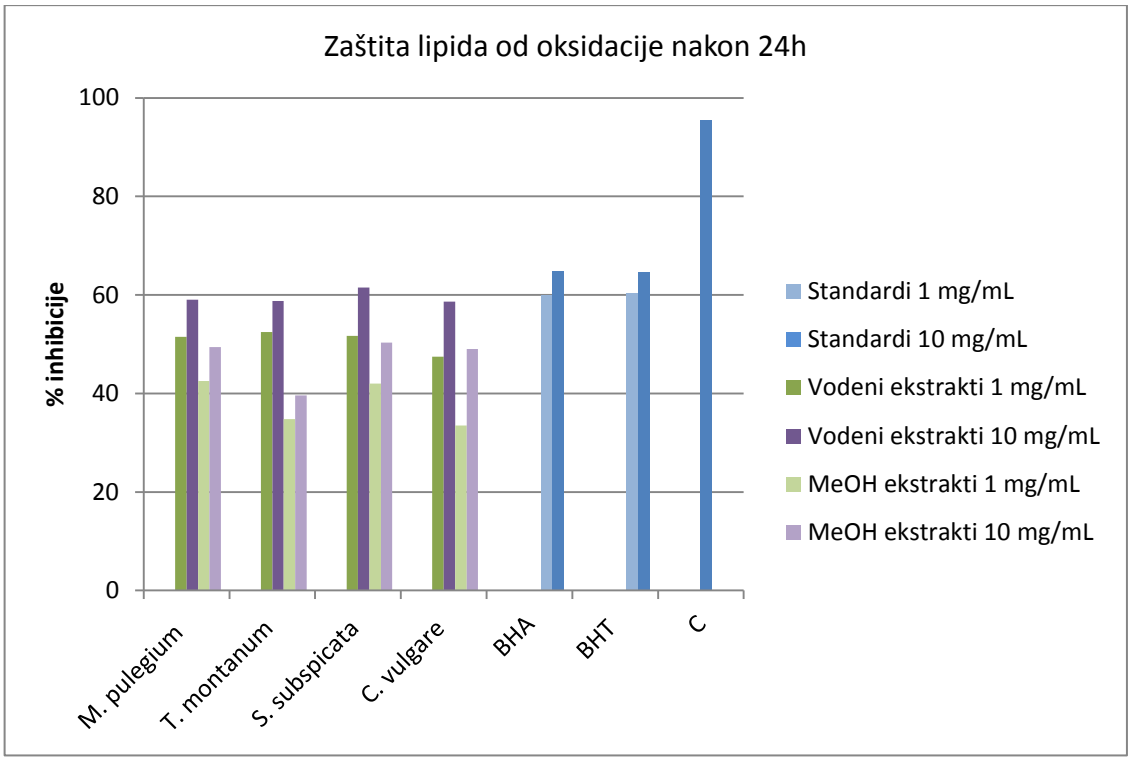
4.2.2.1. Zaštita lipida od oksidacije

Uloga ekstrakata u pogledu zaštite lipida od peroksidacije ispitana je na modelu linolne kiseline. Rezultati su prikazani **tablicom 4.13.** i **slikom 4.10.**

Tablica 4.13. Antioksidacijska aktivnost vodenih i metanolnih ekstrakata odabranih biljnih vrsta u emulziji s linolnom kiselinom nakon inkubacije tijekom 24 h

Uzorak		**Inhibicija %*** 1 g/L[a] (100 μg/mL)[b]	10 g/L[a] (1000 μg/mL)[b]
M. pulegium	Vodeni ekstrakt	51,51±4,25[b]	59,03±6,38
	Metanolni ekstrakt	42,51±0,77	49,41±3,68
T. montanum	Vodeni ekstrakt	52,47±2,73	58,79±6,60
	Metanolni ekstrakt	34,82±0,17	39,58±3,11
S. subspicata	Vodeni ekstrakt	51,72±2,60	61,48±2,66
	Metanolni ekstrakt	42,03±1,17	50,30±5,64
C. vulgare	Vodeni ekstrakt	47,48±7,41	58,65±2,68
	Metanolni ekstrakt	33,49±0,10	49,03±4,05
BHA		59,90±2,29	64,78±0,38
BHT		60,36±1,25	64,58±0,36
Vitamin C		prooksidacijska aktivnost	95,52±1,92

[a]Početne koncentracije antioksidansa („stock solution“). [b]Koncentracija ekstrakta u reakcijskoj smjesi. *Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SD (n = 3).



Slika 4.10. Postotak inhibicije oksidacije lipida nakon inkubacije tijekom 24 h

Pri ispitivanju ekstrakata u pogledu zaštite lipida od peroksidacije, pri koncentracijama od 100 i 1000 µg/mL u reakcijskoj smjesi, rezultati su bili kako slijedi: vodeni ekstrakti: *S. subspicata* 51,72±2,60 i 61,48±2,66%; *T. montanum* 52,47±2,73 i 58,79±6,60%; *M. pulegium* 51,51±4,25 i 59,03±6,38% i *C. vulgare* 47,48±7,41 i 58,65±2,68%. Slijede metanolni ekstrakti: *S. subspicata* 42,03±1,17 i 50,30±5,64%; *M. pulegium* 42,51±0,77 i 49,41±3,68%; *C. vulgare* 33,49±0,10 i 49,03±4,05% i *T. montanum* 34,82±0,17 i 39,58±3,11% inhibicije peroksidacije lipida.

Usporedbom s rezultatima za standarde, testirane pri istim koncentracijama, BHA (59,90 i 64,78%) i BHT (60,36 i 64,58%) može se zaključiti da vodeni ekstrakti sve četiri biljke pokazuju vrlo dobre rezultate u zaštiti lipida od oksidacije, dok metanolni ekstrakti pokazuju dobre rezultate. S povećanjem koncentracije nije bilo značajnijeg povećanja inhibicije.

Askorbinska kiselina (vitamin C) je u početnoj koncentraciji od 1 mg/mL (100 µg/mL u reakcijskoj smjesi) pokazala prooksidacijsko djelovanje, dok je u početnoj koncentraciji od 10 mg/mL (1000 µg/mL u reakcijskoj smjesi) s 95,5% - tnim učinkom inhibirala peroksidaciju linolne kiseline. Dobiveni rezultati za askorbinsku kiselinu su bili u skladu s ranije poznatom činjenicom da askorbinska kiselina kao prooksidans

može sudjelovati u reakciji Haber-Weiss tipa. Pri višim koncentracijama dominira njena antioksidacijska sposobnost nad sposobnošću ubrzavanja oksidacije, što rezultira ukupnim antioksidacijskim efektom.[3]

Dobiveni rezultati pokazuju obećavajući potencijal ispitivanih *S. subspicata* ekstrakata u zaštiti lipida od oksidacije. Oni koreliraju sa visokim sadržajem ružmarinske kiseline u vodenom i metanolnom ekstraktu, što je u skladu sa prethodno objavljenim studijama o efikasnosti ružmarinske kiseline u inhibiciji oksidacije lipida male gustoće.[137,138] Također je utvrđeno da ružmarinska kiselina značajno doprinosi biološkoj aktivnosti vrsta roda *Mentha*.[105] Dobiveni rezultati, kao i činjenica da se ružmarinska kiselina istražuje u pogledu tretmana bolesti srca i raka,[105] jednim dijelom objašnjavaju opravdanost uporabe ovih biljaka u tradicionalnoj medicini BiH.

Za kafeinsku, klorogensku, ferulinsku i kumarinsku kiselinu, koje se također javljaju kao komponente ispitivanih ekstrakata, poznato da svoju biološku aktivnost ispoljavaju kroz inhibiciju lipidne peroksidacije[138]. Kafeinska i klorogenska kiselina inhibiraju formiranje konjugiranih diena u ranoj fazi peroksidacije linolne kiseline.[139] Flavonoidi mogu prevenirati oksidaciju lipida male gustoće, što može reducirati rizik od nastajanja ateroskleroze.[140]

Dobiveni rezultati ukazuju da ispitivani ekstrakti mogu biti korisni u inhibiranju peroksidacije membranskih lipida, u preveniranju bolesti uzrokovanih djelovanjem slobodnih radikala te kao antioksidansi u hrani, kozmetici ili farmaceutskim proizvodima.

Postoje literaturni podatci za sličan test, β-karoten/linolna kiselina test, kojim su ispitani uzorci *M. pulegium* s različitih područja. Tako su vodeni i metanolni ekstrakt *M. pulegium* s područja Irana, u početnoj koncentraciji od 2 mg/mL (250 µg po mL reakcijske smjese) nakon 48h pokazali inhibicijsko djelovanje 91,67% i 60,38%. U istom testu BHT je imao inhibiciju od 89,35%.[97] Vodeni i etanolni ekstrakt *M. pulegium* sa područja Portugala, pri inkubaciji u trajanju 120 minuta, su imali IC_{50} = 167±0.2 i 165±7 µg/mL, dok je IC_{50} za BHT iznosio 12,0±0,7 µg/mL reakcijske smjese.[100] Pri jednakom vremenu inkubacije vodeni i metanolni ekstrakti *M. pulegium* s područja Maroka su pri koncentraciji od 1 mg/mL u reakcijskoj smjesi imali inhibiciju 6,35% i 34,8%, dok je BHT pokazao inhibiciju od 75,94% (IC_{50} = 310 µg/mL). Nije nađena korelacija u sadržaju fenolnih komponenti i rezultata ovog testa.[104]

Etanolni ekstrakt *M. pulegium* sa područja Alžira je kod inhibicije lipidne peroksidacije ispitivane kolorimetrijskom metodom, pokazao vrijednost IC_{50} = 10±0,5 μg/mL, a Troloks IC_{50} = 3,8±0,3 μg/mL.[105]

Ranije objavljena studija pokazuje da *S. subspicata* metanolni i etanolni ekstrakti djeluju na povećanje inhibicije peroksidacije lipida u β-karoten testu.[26]

U testu β-karoten/linolna kiselina, pri koncentraciji od 0,4 mg/mL u reakcijskoj smjesi ekstrakati *T. montanum* s područja Makedonije, nakon inkubacije u trajanju od 120 minuta, pokazali su sljedeću inhibiciju oksidacije: dietil eter ekstrakt (39%), etil-acetat ekstrakt (39%), *n*-butanol ekstrakt (40%).[121]

4.2.2.2. Zaštita proteina od oksidacije

Izloženost proteina $OH^{\bullet}$ i/ili $O_2^{\bullet-}$ vodi njihovim strukturnim modifikacijama. Modificirani proteini mogu dalje proći spontanu fragmentaciju i unakrsno povezivanje ili pokazati značajno povećanje proteolize. Ovim promjenama su najpodložnije aminokiseline triptofan, histidin i cistein. Pored fragmentacije, oksidacija lizina, arginina, prolina i treonina može povećati koncentraciju karbonila. Tako se prisutnost karbonilnih skupina proteina može koristiti kao pokazatelj oksidacije proteina uzrokovane reaktivnim kisikovim vrstama.[12,141]

Ekstrakti četiri ispitivane biljke su ispitani u pogledu zaštite proteina od oksidacije spektrofotometrijskim mjerenjem količine nastalih karbonila. Oksidacija albumina goveđeg seruma (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA) je potaknuta zagrijavanjem proteina u prisutnosti Fe^{3+}, askorbinske kiseline i vodikovog peroksida.

Inhibicija karbonilacije BSA (izražena kao % inhibicije), u prisutnosti ispitivanih ekstrakta i komercijalnih antioksidanasa, prikazana je **tablicom 4.14.** Period inkubacije, na 37 ºC uz oksidaciju potaknutu metalom, iznosio je 1 i 24 h.

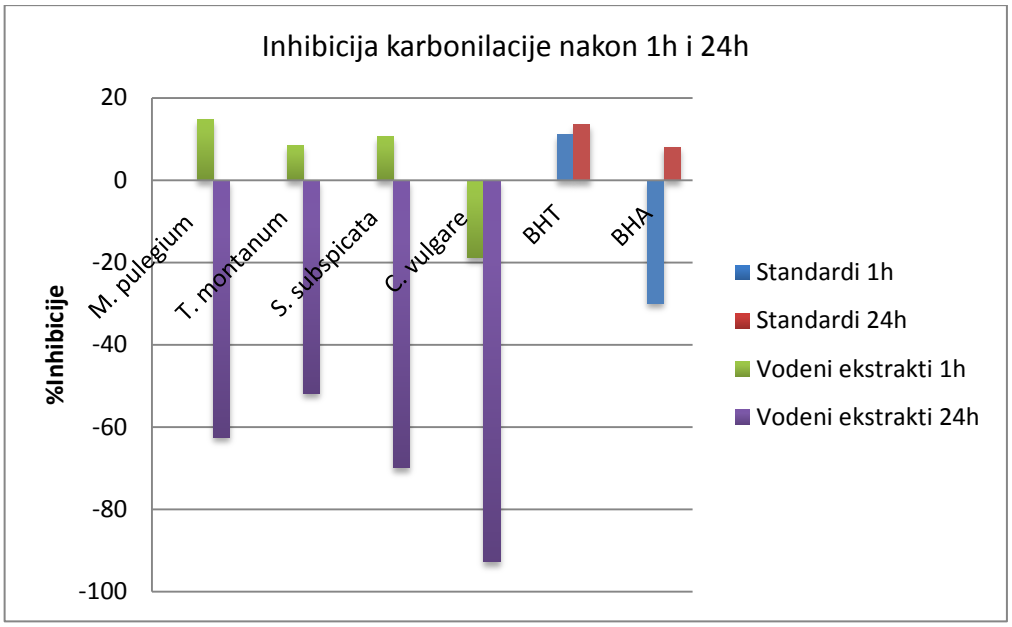
Tablica 4.14. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata u pogledu zaštite proteina od karbonilacije

Uzorak		Inhibicija %	
		1 h[a]	24 h
M. pulegium	Vodeni ekstrakt	14,62 ± 2,36[b]	- 62,42 ± 3,84
	Metanolni ekstrakt	5,56 ± 1,52	- 92,69 ± 3,35
T. montanum	Vodeni ekstrakt	8,49 ± 0,94	- 51,77 ± 3,16
	Metanolni ekstrakt	11,11 ± 5,05	- 83,49 ± 2,39
S. subspicata	Vodeni ekstrakt	10,61 ± 3,67	- 69,81 ± 4,18
	Metanolni ekstrakt	- 6,06 ± 2,02	- 79,05 ± 3,43
C. vulgare	Vodeni ekstrakt	- 18,87 ± 0,00	- 92,59 ± 1,92
	Metanolni ekstrakt	- 13,13 ± 1,01	- 81,59 ± 1,46
BHT		11,12 ± 4,29	13,54 ± 3,45
BHA		-29,91 ± 6,27	8,04 ± 3,63

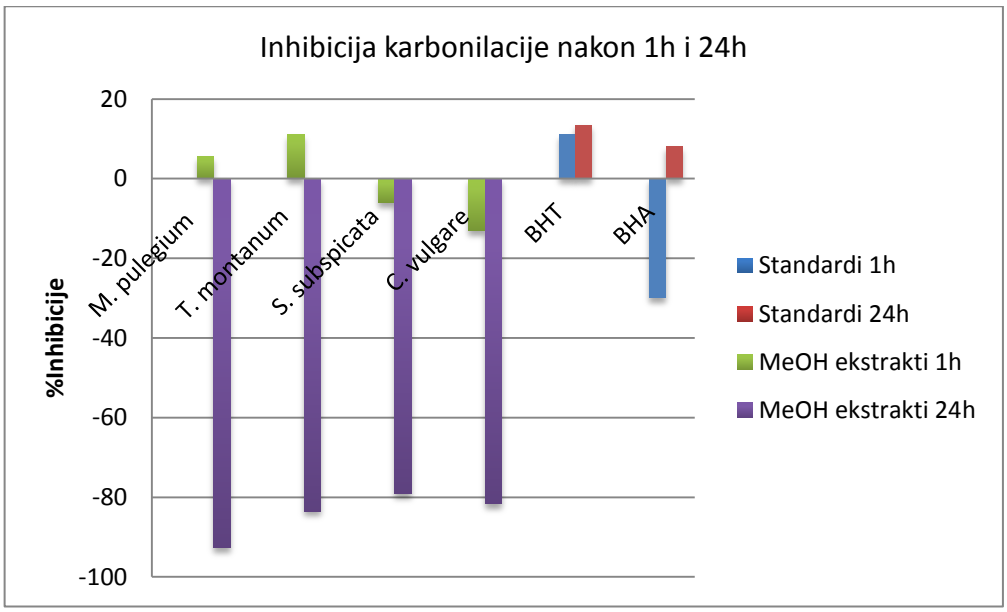
[a]Koncentracija početnih otopina ekstrakata i standarda je bila 1 g/L, dok je koncentracija u reakcijskoj smjesi iznosila 167 μg/mL [b]Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SD (n = 3)

Dobiveni rezultati, nakon inkubacije u trajanju od 1 h, pokazuju vrlo dobro zaštitno djelovanje vodenih ekstrakata *M. pulegium* (14,62%), *S. subspicata* (10,61%), metanolnog (11,11%) i vodenog (8,49%) ekstrakta *T. montanum* te metanolnog ekstrakta *M. pulegium* (5,56%), u usporedbi sa standardnim antioksidansom BHT, koji je pokazao inhibiciju karbonilacije od 11,12%. Metanolni ekstrakt *S. subspicata* te vodeni i metanolni ekstrakt *C. vulgare* pokazali su prooksidcijsku aktivnost, kao i BHA.

Nakon inkubacije u trajanju od 24 h, svi ekstrakti su pokazali prooksidacijsku aktivnost, dok su BHT i BHA inhibirali karbonilaciju BSA s 13,54% i 8,04% (**slike 4.11.** i **4.12.**).



Slika 4.11. Inhibicija karbonilacije BSA vodenim ekstrakatima testiranih biljnih vrsta



Slika 4.12. Inhibicija karbonilacije BSA metanolnim ekstrakatima testiranih biljaka

U pogledu ispitivanja zaštitne uloge za ekstrakte četiri ispitivane biljke, u smislu zaštite proteina od oksidacije, nema dostupnih literaturnih podataka. Prooksidacijska aktivnost ekstrakata se može objasniti i u suglasju je sa sljedećim literaturnim podatcima.

Polifenoli iz hrane djeluju kao prooksidansi katalizirajući oksidacijska oštećenja DNA, proteina i ugljikohidrata, unatoč njihove uloge u zaštiti lipida od oksidacije. Istraživanje Dormana i Hiltunena (2011)[2] pokazuje kompleksnost, odnosno paradoks pojedinih fitokemikalija s antioksidacijskom aktivnošću, koje mogu pokazati zaštitnu ulogu štiteći od oksidativnih oštećenja neke biološki važne molekule npr. lipide, ali i pokazujući prooksidacijsku aktivnost prema drugim biološki važnim molekulama, npr. proteinima. U spomenutom istraživanju galna kiselina je pokazala prooksidacijsko djelovanje, kao i ekstrakti borovice (*Juniperus communis* L.), bosiljka (*Ocimum basilicum* L.), kima (*Carum carvi* L.) i lovora (*Laurus nobilis* L.).

U istraživanju Mayo i suradnika (2003)[12] u pogledu zaštite proteina od oksidativnih oštećenja, troloks i askorbinska kiselina su pokazali prooksidacijsku aktivnost. Za askorbinsku kiselinu je poznato da je jak reducirajući agens, te se koristi za reduciranje prijelaznih metala, kao što su Fe^{3+} ili Cu^{2+} te za generiranje $^{\bullet}OH$ radikala. Kombinacija vitamina C i Cu^{2+} uzrokuje značajno oštećenje proteina. U istoj studiji rezveratrol nije pokazao zaštitno djelovanje.[12]

Dobivene rezultate za četiri ispitivane biljne vrste u ovom radu, u pogledu zaštite proteina od oksidacije, moguće je objasniti mehanizmom reakcije. Naime, oksidacija proteina katalizirana metalima je proces koji se uglavnom odvija na specifičnim mjestima vezivanja metala na proteinu, na kojima se oksidira jedna ili nekoliko aminokiselina. U tom pogledu oksidaciji najviše podliježu aminokiselinski ostatci histidina, prolina, arginina i lizina. Reakcija se odvija kao „zatvoreni“ proces u kojem željezo prolazi redoks ciklus od Fe^{2+} do Fe^{3+} u reakciji s H_2O_2 i ponovnom protein ovisnom redukcijom u Fe^{2+}. Pri tom radikal kisika, koji se javlja kao međuprodukt, ne difundira u okolni medij, jer reagira sa spomenutim aminokiselinskim ostatcima proteina.[141]

Budući da potencijalni antioksidansi ne mogu doći u kontakt sa slobodnim radikalima, isti nisu u mogućnosti da se natječu s aminokiselinama za iste, te time izostaje njihova zaštitna aktivnost.

4.3. Inhibicija enzima kolinesteraza eteričnim uljima i ekstraktima odabranih biljnih vrsta

Ključni enzim u hidrolizi acetilkolina je acetilkolinesteraza (AChE), pa je njegova inhibicija jedna od strategija u tretmanu Alzheimerove bolesti i drugih sličnih poremećaja. Potencijalnim izvorima inhibitora smatraju se biljke, pa su brojne od njih, kao i različite fitokemikalije, predmet velikog broja istraživanja.[4]

Sposobnost inhibicije enzima kolinesteraza (ChE), acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze (AChE i BChE), eteričnim uljima i ekstraktima odabranih biljnih vrsta, testirana je Ellmanovom metodom.

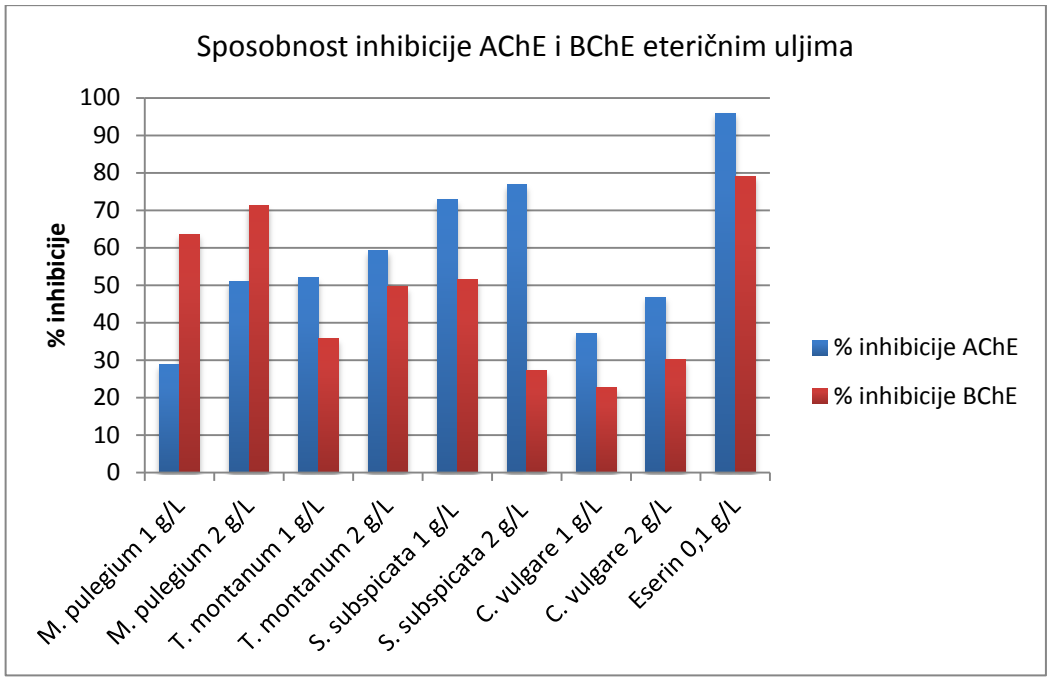
Početna koncentracija ekstrakata je iznosila 1 mg/mL, dok su eterična ulja ispitana u početnim koncentracijama od 1 i 2 mg/mL. Dobiveni rezultati su uspoređeni s rezultatima za poznati inhibitor eserin, koji je ispitan u deset, odnosno dvadeset puta nižoj koncentraciji (0,1 mg/mL).

Rezultati testiranja sposobnosti eteričnih ulja da inhibiraju enzime AChE i BChE su prikazani **tablicom 4.15.** i **slikom 4.13.**

Tablica 4.15. Sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE eteričnim uljima

Uzorak Eterično ulje		**Inhibicija %** AChE	BChE
M. pulegium	1 mg/mL[a]	28,77±12,25	63,65±2,78
	2 mg/mL	50,63±18,47	71,23±4,27
T. montanum	1 mg/mL	51,92±3,39	35,65±5,69
	2 mg/mL	59,32±11,12	49,54±3,12
S. subspicata	1 mg/mL	72,82±20,71	51,51±11,71
	2 mg/mL	76,89±13,36	27,15±9,84
C. vulgare	1 mg/mL	40,16±11,23	22,66±8,04
	2 mg/mL	46,84±1,99	30,16±0,01
eserin	0,1 mg/mL	95,92±1,47	79,12±0,0

[a]Koncentracija početnih otopina eteričnih ulja je bila 1 i 2 mg/mL, dok je koncentracija u reakcijskoj smjesi iznosila 45 i 90 μg/mL.



Slika 4.13. Sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE eteričnim uljima odabranih biljnih vrsta

Eterična ulja četiri ispitivane biljke u koncentraciji od 1 i 2 mg/mL (45 i 90 µg/mL u reakcijskom sistemu) pokazala su inhibiciju AChE kako slijedi: *S. subspicata* (72,82% i 76,89%), *T. montanum* (51,92% i 59,32%), *C. vulgare* (40,16% i 46,84%) i *M. pulegium* (28,77% i 50,63%).

Dobro poznati ChE inhibitor eserin, u početnoj koncentraciji od 0,1 mg/mL pokazao je inhibiciju od 95,92%, tako da su u usporedbi s njim eterična ulja pokazala umjerenu inhibicijsku aktivnost.

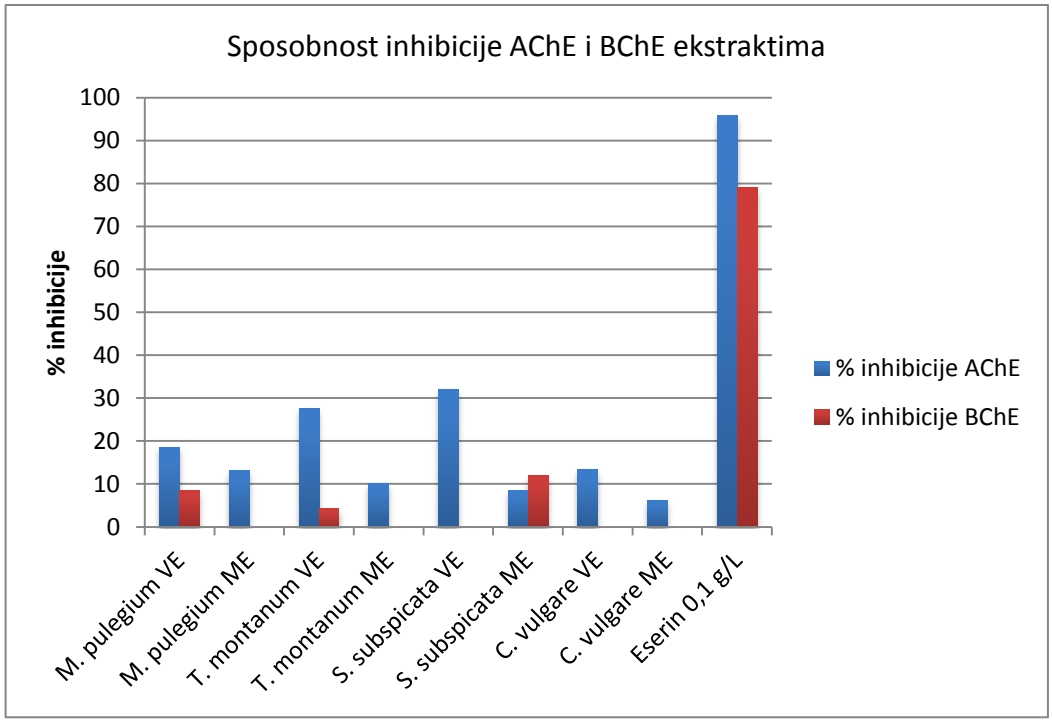
Kod inhibicije enzima BChE eterična ulja u koncentraciji od 1 i 2 mg/mL (45 i 90 µg/mL u reakcijskom sustavu) su pokazala sljedeću inhibiciju: *M. pulegium* (63,65% i 71,23%), *S. subspicata* (51,51% i 27,15%), *T. montanum* (35,65% i 49,54%) i *C. vulgare* (22,66% i 30,16%). U usporedbi sa eserinom, koji u početnoj koncentraciji od 0,1 mg/mL inhibira BChE s 79,12%, eterična ulja sve četiri biljke su pokazala umjerenu inhibicijsku aktivnost.

Rezultati testiranja sposobnosti vodenih i metanolnih ekstrakata da inhibiraju enzime AChE i BChE su prikazani **tablicom 4.16.** i **slikom 4.14.**

Tablica 4.16. Sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE vodenim i metanolnim ekstraktima

Uzorak 1 mg/mL[a]		Inhibicija % AChE	Inhibicija % BChE
M. pulegium	Vodeni ekstrakt	18,73±1,43	8,5±4,77
	Metanolni ekstrakt	13,65±2,60	0,0
T. montanum	Vodeni ekstrakt	27,77±3,71	4,3±2,71
	Metanolni ekstrakt	10,05±1,39	0,0
S. subspicata	Vodeni ekstrakt	32,09±3,66	0,0
	Metanolni ekstrakt	8,59±1,15	11,9±0,71
C. vulgare	Vodeni ekstrakt	14,62±2,11	0,0
	Metanolni ekstrakt	6,26±1,09	0,0
eserin	0,1	95,92±1,47	79,12±0,0

[a]Koncentracija početnih otopina ekstrakata je bila 1 mg/mL, dok je koncentracija u reakcijskoj smjesi iznosila 45 µg/mL.



Slika 4.14. Sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE vodenim i metanolnim ekstraktima odabranih biljnih vrsta

Uspješnost inhibicije enzima AChE za vodene i metanolne ekstrakte, bila je kako slijedi: vodeni ekstrakti *S. subspicata* (32,09%) i *T. montanum* (27,77%), vodeni i metanolni i ekstrakt *M. pulegium* (18,73% i 13,65%), vodeni ekstrakt *C. vulgare* (14,62%), metanolni ekstrakti *T. montanum* (10,05%), *S. subspicata* (8,59%) i *C. vulgare* (6,26%). U usporedbi s prethodno navedenim rezultatima za eserin, ekstrakti su pokazali slabu inhibiciju enzima acetilkolinesteraze.

Kod inhibicije enzima BChE, slabu sposobnost inhibicije su pokazali metanolni ekstrakt *S. subspicata* (11,9%) te vodeni ekstrakti *M. pulegium* (8,5%) i *T. montanum* (4,3%). Ostali ekstrakti nisu pokazali aktivnost u pogledu inhibicije enzima butirilkolinesteraze.

Bioaktivne supstance iz voća, povrća i ljekovitih biljaka igraju glavnu ulogu u usporavanju mnogih patogeneza i neurodegenerativnih poremećaja, kao što je i Alzheimerova bolest. Hrana bogata fitokemikalijama pored alkaloida, sadrži terpene i polifenole, koji mogu biti dobri inhibitori kolinesteraza, sami ili u sinergizmu jedni s drugima.[74]

Do sada su brojne fitokemikalije ispitane u pogledu inhibicije ChE. Postoje izviješća o više od 35 alkaloida koji pokazuju AChE inhibicijsku aktivnost.[37] Među prirodnim alkaloidima s ChE inhibicijskom aktivnošću su i eserin ili fizostigmin, koji je izoliran iz sjemenki biljke *Physostigmina venenosum* L. te galantamin, koji je izoliran iz biljke *Galanthus nivalis* L..

Eserin ili fizostigmin je prvi ispitivani inhibitor ChE u tretmanu Alzheimerove bolesti. On je ireverzibilni inhibitor, koji reagira s hidroksilnom skupinom serina, u katalitičkoj trijadi aktivnog mjesta, pri čemu nastaju stabilni esteri. Pored pozitivnih učinaka na poboljšanje pamćenja kod oboljelih od AD, isključen je iz daljnje primjene zbog negativnih nuspojava. Međutim, poslužio je kao prototip za sintezu novih inhibitora; epakstigmina, fenserina i tolserina.[142]

Trenutno se u tretmanu simptoma AD, kao što su kognitivna disfunkcija i slabljenje pamćenja, koriste donepezil, rivastigmin i galantamin.[4] Ranije spomenuti galantamin je reverzibilni inhibitor AChE, koji se od 2007. godine koristi u tertmanu blage do srednje izražene AD. Pokazuje dobra farmakološka i farmakokinetička svojstva te manji broj nuspojava.[142] Primjena većine do sad ispitivanih inhibitora ChE bila je praćena nuspojavama, kao što su umor, poremećaji spavanja, kardiorespiratorni, gastrointestinalni poremećaji te mala biološka dostupnost. To je bio poticaj za daljnja

istraživanja s ciljem pronalaska novih ChE inhibitora prirodnog podrijetla, s većom efikasnošću i biološkom dostupnošću te s manje nuspojava.[143]

Eterična ulja sadrže brojne bioaktivne komponente; terpene, terpenoide, fenilpropanske i druge spojeve, pa je veliki broj njih ispitan u smislu sposobnosti inhibicije ChE. Rezultati su pokazali da neka od testiranih ulja imaju dobru sposobnost inhibicije ChE. Usporedbom rezultata različitih istraživanja uočeno je da neka eterična ulja sličnog sastava imaju različitu sposobnost inhibicije ChE. Razlike u spomenutim rezultatima se mogu pripisati sinergističkom ili antagonističkom efektu između pojedinih sastavnica eteričnog ulja. Kako bi se ispitali ovi efekti provedena su brojna istraživanja s ciljem identificiranja i izoliranja pojedinih sastavnica eteričnih ulja sa značajnom sposobnošću inhibicije ChE.[144]

Veći broj dobivenih podataka, u do sad provedenim istraživanjima, se odnosi na ispitivanje sposobnosti pojedinih komponenti eteričnih ulja da inhibiraju AChE, dok je manji broj onih koji se odnose na ispitivanje inhibicije BChE. Međutim, zbog značaja inhibicije BChE u tretmanu AD, u kasnijim fazama bolesti, porastao je interes i za ispitivanje inhibicije BChE. [144]

U pogledu ispitivanja sposobnosti inhibicije ChE najveći broj istih se odnosi na istraživanje monoterpena.[144] Među monoterpenima 1,8-cineol i α-pinen su najefikasniji u pogledu inhibicije AChE. Pored njih sposobnost u pogledu inhibicije AChE pokazuju δ-2-karen (2-karen), δ-3-karen (3-karen) i mirtenal,[68,144] te geraniol, 3-karen, α-kariofilen i limonen.[4] Karvon je također pokazao dobru AChE inhibicijsku aktivnost.[70]

Monoterpeni karvakrol i njegov izomer timol su pokazali značajnu AChE inhibicijsku aktivnost, pri čemu je aktivnost karvakrola bila deset puta viša, što ukazuje na značaj položaja hidroksilne skupine za AChE inhibicijsku aktivnost.[145]

Pulegon je među monoterpenima s *p*-mentanskim skeletom bio najuspješniji u pogledu AChE inhibicije.[70] Slabiju sposobnost inhibicije AChE pokazuju monoterpeni kamfor, bornil acetat, karvon, β-pinen, fenhol i fenhon.[70]

Neke studije pokazuju postojanje sinergističkog efekta kod monoterpena, posebno između 1,8-cineola i α-pinena.[70] Sinergistički efekat je prisutan i između enantiomera α-pinena i β-pinena (α-*S*-pinen:β-*S*-pinen i α-*R*-pinen:β-*S*-pinen) u smjesi, pri omjeru 3:2.[146]

Jedan od načina na koji terpeni inhibiraju AChE je preko hidrofobnog liganda. Hidrofobno aktivno mjesto AChE je mjesto u kojem se ostvaruju hidrofobne interakcije, a terpenski spojevi, građeni od skeleta ugljikovih i vodikovih atoma, na taj način doprinose inhibiciji kolinesteraza.[4]

Zbog razlika u strukturi terpenskih spojeva, teško je odrediti odnos između njihove strukture i aktivnosti. Za monoterpene s *p*-mentanskim skeletom je utvrđeno da su ketonski monoterpeni bolji AChE inhibitori, u odnosu na odgovarajuće ugljikovodike i alkohole.[70] U slučaju bicikličkih monoterpena, biciklički ugljikovodici imaju veću sposobnost inhibicije u odnosu na bicikličkie alkohole i ketone. Pozicija dvostruke veze utječe na povećanje sposobnosti inhibicije, pa 3-karen ima veću sposobnost inhibicije u odnosu na 2-karen.[147]

Monoterpeni su puno bolji inhibitori AChE nego BChE. Zbog male molekulske mase monoterpeni najvjerojatnije ChE inhibiraju preko steričkih ili alosteričkih efekata, pri čemu kod BChE ne utječu na pristup supstrata aktivnom mjestu enzima.[68]

U istraživanju u kojem je ispitan 21 monoterpen u pogledu sposobnosti inhibicije BChE, jedino je 3-karen pokazao sposobnost inhibicije BChE (IC_{50} = 2000 μM).[148] U različitim studijama dobar do umjeren BChE inhibicijski potencijal (IC_{50} = 0,1 – 1,0 mM) pokazali su monoterpeni α-pinen, 1,8-cineol, linalool, terpinen-4-ol, linalil acetat, timol, γ-terpinen i fenilpropanoid eugenol.[144]

Najčešće istraživani seskviterpeni u pogledu inhibicije AChE su β-kariofilen i α-humulen. Pri tom je β-kariofilen imao dobru sposobnost inhibicije, za razliku od α-humulena (α-kariofilena), koji je pokazao slabu sposobnost inhibicije AChE.[144] U više studija β-kariofilen je također pokazao dobar do umjeren BChE inhibicijski potencijal (IC_{50} = 0,1 – 1,0 mM).[144]

Diterpeni inhibiraju ChE u nižim koncentracijama od monoterpena, što ukazuje na važnost veličine molekule. Dihidrotanshinon i kriptotanshinon su nekompetitivni inhibitori ChE. Među triterpenima i steroidima ChE inhibicijsku aktivnost pokazuju ursolinska kiselina, tarakserol, lucisterol i oleanolinska kiselina.[68]

Kako su terpeni i terpenoidi u dosad objavljenim studijama pokazali relativno slabu inhibicijsku sposobnost, potrebno je razviti analoge s poboljšanom efikasnošću.[4]

Pored eteričnih ulja i njihovih sastavnica, brojni derivati šikiminske kiseline su također testirani u smislu inhibicije kolinesteraza.[70] Među flavonoidima najvišu AChE inhibicijsku aktivnost pokazuju flavoni i izoflavoni (npr. izoflavon pomiferin), što ukazuje na značaj karbonilne skupine na C-4. Aktivnosti doprinose i metoksi skupine na C-6 i C-7.

Flavanoni su manje aktivni u odnosu na flavone, što ukazuje na važnost dvostruke veze između C-2 i C-3. Flavoni koji nemaju supstituciju na C-3 su mješoviti inhibitori, dok su flavoni sa C-3 prenil supstitucijom nekompetitivni inhibitori, što upućuje na to da prenil skupina na C-3 utječe na interakciju s enzimom.

Flavanon naringenin pokazuje AChE inhibicijsku aktivnost *in vitro*, ali pri višim koncentracijama. Flavonol galangin je uspješniji u pogledu inhibicije BChE od kempferola, kvercetina, miricetina, apigenina, luteolina i rutina. Galangin je dvanaest puta bolji BChE inhibitor, u odnosu na inhibiciju AChE. Razlog tome je povećanje broja hidroksilnih skupina na B prstenu, što doprinosi inhibiciji BChE.

Studije ukazuju na to da se flavonoidi vežu na aktivno mjesto BChE preko većeg broja vodikovih veza i π-π interakcija. Flavonol kvercetin inhibira podjednako i AChE (IC_{50} = 353,9 μM) i BChE (IC_{50} = 420,8 μM), kompetitivnom inhibicijom.[68]

Prehrana bogata kvercetinom može prevenirati demenciju povezanu sa vaskularnim i neurodegenerativnim poremećajima, kao što je Alzheimerova bolest.

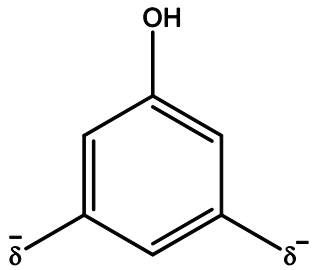
Nekoliko *in vivo* studija je provedeno u ispitivanju efekta ekstrakata bogatih polifenolima na aktivnost AChE, koje su pokazale inhibiciju aktivnosti AChE hipokampusa i veću kognitivnu sposobnost, što može biti rezultat prisutnosti apigenina, kempferola i luteolina.[74]

Prirodne fenolne komponente koje su AChE inhibitori su također i klorogenska kiselina, rutin i ružmarinska kiselina. Rezultati pokazuju da ružmarinska kiselina lako prolazi krvno-moždanu barijeru te djeluje kao AChE inhibitor u mozgu.[74]

Galna i elaginska kiselina inhibiraju djelovanje AChE. Galna kiselina se ponaša kao kompetitivni inhibitor, što znači da se veže za aktivno mjesto enzima, dok se elaginska kiselina ponaša kao mješoviti inhibitor, što znači da se spoj nužno ne natječe za aktivno mjesto enzima. Pretpostavlja se da grupa aromatskih aminokiselina perifernog anionskog mjesta reagira kroz hidrofobne ili aromatske interakcije s nepolarnim aromatskim dijelovima elaginske kiseline.

Analizom strukture galne kiseline utvrđeno je da 1,3,5-trisupstituirani fenolni prsteni djeluju inhibicijski na AChE, te predstavljaju model za dizajn inhibitora AChE.

Osnovni strukturni zahtjevi potrebni za inhibiciju su tri polarna supstituenta, uključujući bar dvije negativno nabijene funkcionalne skupine ili dva elektronegativna atoma s parcijalno negativnim nabojem, bar jedan donor vodika, sposoban za formiranje vodikove veze. Tri supstituenta moraju biti na pozicijama 1, 3 i 5 benzenskog prstena (**slika 4.15.**). Slične strukture bez ovakve polarnosti i orijentacije nisu inhibirale AChE. Međutim, zbog postojanja naboja ovakve molekule će teško prolaziti barijeru između krvi i mozga.[149]



Slika 4.15. Strukturni model AChE inhibitora[149]

S obzirom na postojeće literaturne podatke, ispitivanje metanolnih ekstrakata sve četiri biljke te vodenih ekstrakata i eteričnih ulja za *S. subspicata*, *T. montanum* i *C. vulgare*, u pogledu inhibicije AChE prva su takve vrste, kao i ispitivanje inhibicije BChE za sva eterična ulja i ekstrakte testirane u ovom radu.

Postoje literaturni podatci za eterično ulje, vodeni i etanolni ekstrakt *M. pulegium* s područja Portugala, koji su ispitani u pogledu inhibicije AChE. Najbolju inhibiciju pokazalo je eterično ulje (IC_{50} = 324±0,1 μg/mL), slijede etanolni (IC_{50} = 534±0,1 μg/mL) i vodeni ekstrakt (IC_{50} = 1581±53,6 μg/mL); pri tom je koncentracija u reakcijskoj smjesi bila deset puta manja. U istoj studiji IC_{50} vrijednost za verbenon i karvakrol je iznosila 163±0,2 i 115±0,1 μg/mL. Umjerena inhibicijska aktivnost eteričnog ulja je uzrokovana prisustvom glavnih komponenti ulja; pulegona i karvona, koji su umjereni AChE inhibitori. Spojevi 1,8-cineol, kamfor i 4-terpineol također inhibiraju AChE, pri čemu je 1,8-cineol vema dobar inhibitor.[100]

Usporedbom rezultata dobivenih u ovim radom s rezultatima za *M. pulegium* s područja Portugala, može se zaključiti da je eterično ulje iste biljke ispitivano u ovom radu pokazalo nešto slabije rezultate u pogledu inhibicije AChE (IC_{50} = 90 μg/mL), kao

i njen vodeni i metanolni ekstrakt. Za više biljnih vrsta ispitanih u spomenutoj studiji najveću vrijednost inhibicije pokazala su eterična ulja, potom etanolni i vodeni ekstrakti, što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom radu.

U studiji Vladimir-Knežević i suradnici (2014)[66] ispitana je sposobnost inhibicije AChE etanolnim ekstraktima, početne koncentracije 0,25; 0,5 i 1 mg/mL. Koncentracije u reakcijskoj smjesi su bile 2,5; 5 i 10 μg/mL. Vrijednosti inhibicije su bile kako slijedi: *T. montanum* 33, 46 i 84%, *S. subspicata* 16, 28 i 52%, *M. pulegium* 10, 19 i 48% i *C. vulgare* 0%, 0% i 37%.

U istoj studiji testirane su hidroksicimetne kiseline (kafeinska, klorogenska, ružmarinska, ferulinska kiselina), koje su u koncentraciji od 0,25 i 0,50 mg/mL inhibirale aktivnost AChE u vrijednostima od 30,0% do 48,9%, odnosno od 73,6% do 86,6%. Pri tom je njihova uspješnost u inhibiciji bila kako slijedi: kafeinska kiselina > ferulinska kiselina > ružmarinska kiselina > klorogenska kiselina. Galantamin je u koncentracijama 1; 0,5 i 0,25 mg/mL pokazao 100% inhibiciju. Njegova IC_{50} vrijednost je iznosila 0,122±0,004 μg/mL.[66]

Obje prethodno navedene studije ukazuju na utjecaj ružmarinske kiseline na aktivnost ekstrakata u pogledu inhibicije AChE; kod etanolnih ekstrakata za biljne vrste iz porodice Lamiaceae, osim za *Teucrium* vrste,[66] te kod vodenih ekstrakata biljaka roda *Mentha*.[101] Biološka aktivnost ekstrakata biljaka roda *Mentha* koji se konzumiraju u uobičajenim dozama ostaje sačuvana nakon digestije u probavnom sustavu. Naime, nakon *in vitro* simulacije gastrointestinalne digestije, ekstrakti zadržavaju sposobnost inhibicije enzima AChE.[101,150]

U odnosu na studiju Vladimir-Knežević i suradnici (2014),[66] dobiveni rezultati za vodene i metanolne ekstrakte istih biljnih vrsta, bili su značajno slabiji, mada je redoslijed uspješnosti biljnih vrsta bio sličan: *S. subspicata*, *T. montanum*, *M. pulegium* i *C. vulgare*. Interesantno je uočiti da su rezultati za etanolni ekstrakt *M. pulegium* prethodno spomenute studije (1 mg/mL, odnosno 10 μg/mL u reakcijskoj smjesi, koji su izazvali 48% inhibiciju AChE) viši od rezultata Mata i suradnici (2007)[100] za etanolni ekstrakt iste biljke s područja Portugala (IC_{50} 53,5 μg/mL u reakcijskoj smjesi). Rezultati za ružmarinsku kiselinu, koja je u koncentraciji od 2,5 μg/mL u reakcijskoj smjesi inhibirala AChE s vrijednošću od 47%, su viši od rezultata za ružmarinsku

kiselinu Dinis i suradnika (2013),[101] gdje je IC_{50} iznosila 45,1 μg/mL u reakcijskoj smjesi.

Na slabije rezultate dobivene ovom disertacijom, u odnosu na dvije ranije spomenute studije, je najvjerojatnije utjecala sama metoda testiranja sposobnosti inhibicije AChE. U ovoj disertaciji, prema Ellmanovoj metodi, enzimu su dodavani inhibitor i supstrat neposredno jedan za drugim, a mjerenja su provedena u vremenu od šest minuta. U studiji Mata i suradnici (2007)[100] enzim i inhibitor su inkubirani 15 minuta, a po dodatku supstrata inkubacija je trajala još 30 minuta na sobnoj temperaturi. U studiji Vladimir Knežević i suradnici (2014)[66] enzim i inhibitor su inkubirani tijekom 30 minuta pri 4ºC i po dodatku supstrata još 10 minuta.

Na IC_{50} vrijednosti u smislu inhibicije ChE utječu koncentracija enzima, inhibitora i supstrata, kao i ostali eksperimentalni uvjeti, što otežava usporedbu rezultata dobivenih rezličitim istraživanjima. Da bi bilo moguće identificirati inhibitore AChE i BChE potrebno je standardizirati protokole koji se koriste pri njihovom testiranju.[144]

Kao što je bilo i očekivano, općenito su rezultati za sposobnost inhibicije eteričnih ulja te vodenih i metanolnih ekstrakata bili slabiji u odnosu na manje specifičnu BChE. Uvidom u postojeće literaturne podatke do sad nema objavljenih studija u smislu inhibicije BChE od strane ekstrakata četiriju ispitivanih biljaka.

Općenito se može reći da su sva ispitana eterična ulja odabranih biljnih vrsta pokazala umjeren inhibicijski potencijal na AChE te slabiji inhibicijski potencijal na BChE. Ovakvi rezultati mogu biti posljedica činjenice da se među glavnim sastavnicama ispitivanih eteričnih ulja nalaze, od dosad objavljenih poznatih inhibitora kolinesteraza, samo α-pinen (*S. subspicata* 10,2%, *T. montanum* 6,4%), pulegon (*M. pulegium*, 54,4%, *T. montanum* 2,3%) i β-kariofilen (*S. subspicata* 14%), dok ostali izostaju ili se nalaze u niskim koncentracijama.

Testirani vodeni i metanolni ekstrakti odabranih biljnih vrsta su pokazali slabu inhibiciju enzima AChE. Kod inhibicije enzima BChE, slabu sposobnost inhibicije su pokazali metanolni ekstrakt *S. subspicata* te vodeni ekstrakti *M. pulegium* i *T. montanum*. Ostali ekstrakti nisu pokazali aktivnost u pogledu inhibicije enzima BChE. U navedenim ekstrakatima, s većim ili manjim udjelom su bili prisutni inhibitori ChE, kao što su naringenin, eriodiktiol, elaginska i ružmarinska kiselina, dok su inhibitori

apigenin, diozmetin, luteolin, kempferol i galna kiselina bili prisutni samo u nekima od njih. Kvercetin, kompetitivni inhibitor AChE i BChE, nije bio prisutan u ispitivanim ekstraktima.

Kako su biljni ekstrakti i eterična ulja kompleksne smjese različitih spojeva, moguće je donijeti vrlo malo općenitih zaključaka o sposobnosti inhibicije kolinesteraza ekstraktima i eteričnim uljima. Iz istog je razloga teško izdvojiti potencijalne inhibitore koji se nalaze u njihovom sastavu, jer je moguće je da je za inhibicijsku aktivnost zaslužan spoj koji u sastavu ulja dolazi tek s manjim udjelom. Također je moguć utjecaj efekata sinergizma i antagonizma, koji još uvijek nisu dovoljno istraženi.

Dobiveni rezultati pokazuju da eterična ulja i ekstrakti četiri ispitivane biljne vrste sadrže aktivne fenolne i terpenske spojeve, koji pored antioksidacijske aktivnosti pokazuju i aktivnost u pogledu inhibicije kolinesteraza. Stoga isti mogu biti od značaja u prevenciji i terapiji Alzheimerove bolesti i drugih neurodegenerativnih poremećaja, kao i u uvjetima narušene homeostaze uzrokovane oksidacijskim stresom.

4.3. Rezultati analize glavnih komponenti za testirane kemijske i biološke profile

Dobiveni rezultati za testiranja kemijskog i biološkog profila eteričnih ulja i ekstrakata četiri ispitivane biljne vrste analizirani su PCA analizom - analizom glavnih komponenti (PCA, engl. *Principal Component Analisys*), primjenom statističkog programa XLStat 2018, Addinosoft.

4.3.1. Rezultati analize glavnih komponenti za eterična ulja

Analizirani su rezultati za testirana eterična ulja. Za svaku testiranu biljnu vrstu izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije za 23 varijable: sadržaj dominantnih spojeva (1 - pulegon, 2 - *p*-menton, 3 - piperitenon, 4 - piperiton, 5 - izopulegon, 6 - α-kadinol, 7 - ß-selinen, 8 - T-kadinol, 9 - δ-kadinen, 10 - germakren D-4-ol, 11 - α-pinen, 12 - ß-kariofilen, 13 - *cis*-ß-ocimen, 14 - *trans*-ß-ocimen, 15 - germakren D, 16 - kariofilen oksid, 17 - *epi*-bicikloseskvifelendren, 18 - α-gurjunen, 19 - heksadekanska kiselina, 20 - *alo*-ocimen), rezultati FRAP analize, rezultati testiranja inhibicije AChE (IAChE) i rezultati testiranja inhibicije BChE (IBChE).

PCA analiza za eterična ulja četiri testirane biljke uzima u obzir 72,74% varijabilnosti podataka (**tablica 4.17.**). Varijable s najvećim vrijednostima svojstvenih vektora, tj. s najvećim doprinosom u varijabilnosti pokusa su date u **tablici 4.18.**

Tablica 4.17. Standardna devijacija, udio varijance i kumulativna varijanca povezana s prve tri glavne komponente (PC), procijenje iz korelacijske matrice s 23 varijable za četiri testirana eterična ulja

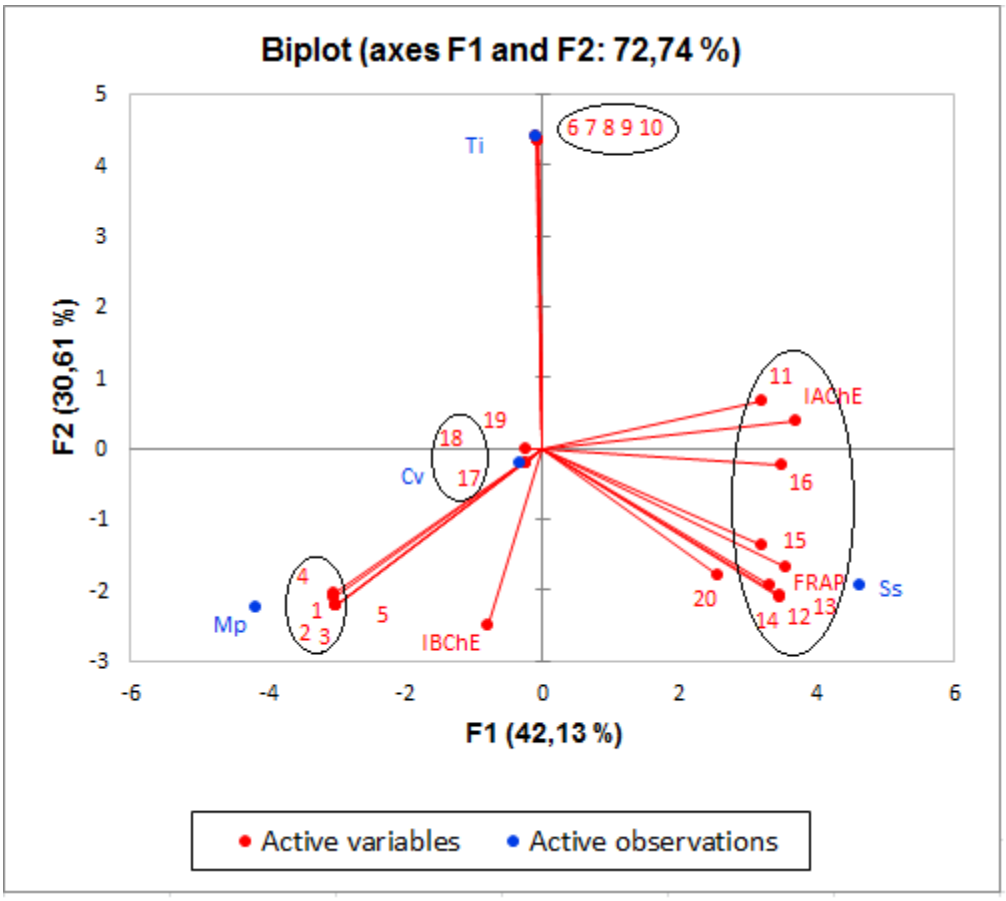
Varijable	PC1	PC2	PC3
Standardna devijacija	9,689	7,041	6,270
Udio varijance (%)	42,128	30,613	27,260
Kumulativna varijanca (%)	42,128	72,740	100,000

Tablica 4.18. Doprinos svakog od 23 analizirana svojstva u ukupnoj varijabilnosti pokusa (boldirani su značajni izvori varijabilnosti)

Varijable	PC1	PC2	PC3
pulegon	**-0,785**	-0,453	-0,423
p-menton	**-0,781**	-0,464	-0,417
piperitenon	**-0,773**	-0,487	-0,405
piperiton	**-0,773**	-0,487	-0,405
izopulegon	**-0,773**	-0,487	-0,405
α-kadinol	-0,023	**0,966**	-0,259
ß-selinen	-0,020	**0,957**	-0,290
T-kadinol	-0,020	**0,957**	-0,290
δ-kadinen	-0,019	**0,953**	-0,303
germakren D-4-ol	-0,020	**0,957**	-0,290
α-pinen	**0,822**	0,144	-0,552
ß-kariofilen	**0,851**	-0,426	-0,306
cis-ß-ocimen	**0,887**	-0,461	-0,023
trans-ß-ocimen	**0,887**	-0,458	-0,056
germakren D	**0,820**	-0,301	-0,488
kariofilen oksid	**0,897**	-0,054	-0,439
epi-biciklosekvifelandren	-0,061	-0,048	**0,997**
α-gurjunen	-0,063	-0,004	**0,998**
heksadekanska kiselina	-0,061	-0,048	**0,997**
alo-ocimen	0,655	-0,393	**0,646**
FRAP	**0,912**	-0,367	-0,184
IAChE	**0,950**	0,082	-0,300
IBChE	-0,203	-0,549	**-0,811**

Prva glavna komponenta (PC1) sadržavala je 42,13% ukupne varijance istraživanja. Najveće vrijednosti svojstvenih vektora imali su inhibicija AChE (IChE) i rezultati testiranja FRAP metodom (0,950 i 0,912). Doprinos druge glavne komponente (PC2) u ukupnoj varijabnilnosti iznosi 30,61%. Svojstvo s najvećom vrijednošću pripadajućeg vektora je sadržaj α-kadinola (0,966).

Uporabom glavnih komponenti (PC1 i PC2) kao prostornih dimenzija (osi x i y) bilo je moguće konstruirati set dvodimenzionalnih grafikona na kojima su predstavljeni međusobni odnosi svih analiziranih svojstava (**slika 4.16.**), kao i prostorna distribucija sva četiri analizirana eterična ulja. Dobiveni dijagram rasipanja pokazuje jasno odvajanje testiranih uzoraka. Sličnost pokazuju eterična ulja *M. pulegium* i *C. vulgare*.



Slika 4.16. Dijagram rasipanja analize glavnih komponenti za eterična ulja testiranih biljnih vrsta s obzirom na međusobni odnos varijabli

Dobiveni dijagram rasipanja pokazuje grupiranje sličnih varijabli. Varijable s visokom korelacijom su u krugovima (Pearsonov koeficijent korelacije, r > 0,8).

Duljina vektora analiziranih varijabli odražava ukupnu varijabilnost svojstva koju dati vektor predstavlja, tj. veća duljina vektora ukazuje na veću razinu varijabilnosti. Udaljenost pojedinih vektora odražava razinu njihove međusobne korelacije. Ukoliko su vektori svojstava bliže, ista su u većoj korelaciji. Vektori suprotnog smjera predstavljaju svojstva koja se nalaze u negativnoj korelaciji.

4.3.2. Rezultati analize glavnih komponenti za vodene i metanolne ekstrakte

Rezultati dobiveni za vodene i metanolne ekstrakte četiri testirane biljke analizirani su PCA analizom.

Za svaku testiranu biljnu vrstu izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije za 23 varijable: sadržaj ukupnih fenola (TPH), sadržaj flavonoida (TF), sadržaj šesnaest fenolnih spojeva (1 - protokatehinska kis., 2 - klorogenska kis., 3 - kafeinska kis., 4 - siringinska kis., 5 - *p*-kumarinska kis., 6 - ferulinska kis., 7 - ružmarinska kis., 8 - elaginska kis., 9 - miricetin, 10 - eriodiktiol, 11 - naringenin, 12 - diozmetin, 13 - kempferol, 14 - luteolin, 15 - apigenin, 16 - galna kis.), rezultati FRAP analize, rezultati testiranja zaštite lipida od oksidacije (ZL), rezultati testiranja zaštite proteina od oksidacije (ZP), rezultati testiranja inhibicije AChE i rezultati testiranja inhibicije BChE.

PCA analiza za vodene i metanolne ekstrakte četiri testirane biljke uzima u obzir 56,02% varijabilnosti podataka (**tablica 4.19.**). Varijable s najvećim vrijednostima svojstvenih vektora, tj. s najvećim doprinosom u varijabilnosti pokusa su date u **tablici 4.20.**

Tablica 4.19. Standardna devijacija, udio varijance i kumulativna varijanca povezana s prve tri glavne komponente (PC), procijenje iz korelacijske matrice s 23 varijable za vodene i metanolne ekstrakte četiri ispitivane biljne vrste

Varijable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7
Standardna devijacija	6,642	6,243	3,116	2,847	1,772	1,457	0,924
Udio varijance (%)	28,878	27,144	13,546	12,379	7,703	6,333	4,017
Kumulativna varijanca (%)	28,878	56,022	69,568	81,947	89,650	95,983	100,000

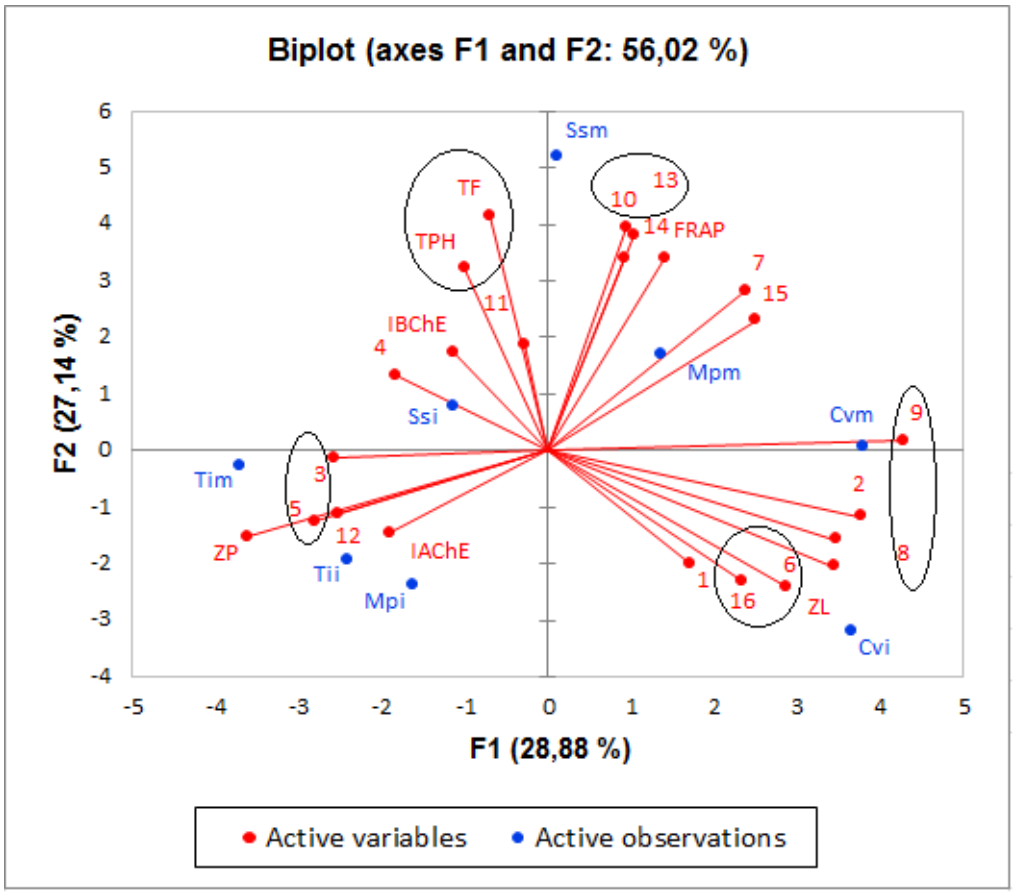
Tablica 4.20. Doprinos svakog od 23 analizirana svojstva u ukupnoj varijabilnosti pokusa (boldirani su značajni izvori varijabilnosti)

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7
TPH	-0,224	**0,697**	0,555	-0,202	0,117	-0,064	0,312
TF	-0,158	**0,899**	0,274	-0,206	0,081	0,199	0,058
1*	0,379	-0,433	**-0,503**	0,503	0,350	0,119	0,161
2	**0,843**	-0,253	-0,103	0,458	-0,034	-0,029	-0,055
3	-0,573	-0,029	**0,724**	0,330	0,118	0,135	0,067
4	-0,410	0,290	-0,473	-0,251	-0,672	0,087	-0,039
5	**-0,626**	-0,269	0,567	0,137	-0,358	0,239	-0,099
6	**0,771**	-0,444	0,269	-0,213	0,043	0,248	0,166
7	0,530	**0,614**	-0,326	-0,212	0,294	-0,238	0,220
8	**0,774**	-0,342	0,492	-0,001	-0,022	0,006	-0,201
9	**0,953**	0,039	0,156	-0,185	-0,024	-0,177	-0,012
10	0,212	**0,857**	-0,346	0,192	0,024	0,239	0,075
11	-0,064	0,405	-0,102	**0,844**	-0,189	-0,107	0,250
12	-0,565	-0,242	-0,091	0,025	**0,776**	-0,095	-0,038
13	0,231	**0,824**	-0,295	0,274	-0,076	0,313	0,041
14	0,205	**0,738**	0,103	-0,622	0,117	-0,013	0,042
15	**0,554**	0,497	-0,027	0,502	-0,200	-0,338	-0,197
16	0,519	-0,501	0,048	-0,108	0,033	0,522	0,438
FRAP	0,314	**0,736**	0,455	-0,011	0,119	-0,363	-0,075
ZL	**0,637**	-0,524	-0,168	-0,486	-0,077	-0,171	-0,144
ZP	**-0,807**	-0,332	-0,201	0,123	0,221	-0,363	0,054
IAChE	-0,426	-0,313	-0,431	**-0,445**	-0,297	-0,325	0,378
IBChE	-0,253	0,378	**-0,503**	-0,249	0,296	0,453	-0,431

*Legenda: Objašnjenje za oznake dato je u prethodnom tekstu

Prva glavna komponenta (PC1) sadržavala je 28,88% ukupne varijance istraživanja. Najveće vrijednosti svojstvenih vektora imali su sadržaj miricetina i sadržaj klorogenske kiseline (0,953 i 0,843). Doprinos druge glavne komponente (PC2) u ukupnoj varijabnilnosti iznosi 27,14%. Svojstva s najvećim vrijednostima pripadajućeg vektora su sadržaj ukupnih flavonoida i sadržaj eriodiktiola (0,899 i 0,857).

Dobiveni dijagram rasipanja (**slika 4.17.)** pokazuje grupiranje sličnih ekstrakata i varijabli te varijabli s visokom korelacijom (u krugovima): ukupni fenoli i flavonoidi (r = 0,870), kafeinska i *p*-kumarinska kiselina (r = 0,806), kempferol i eriodiktiol (r = 0,986), miricetin i elaginska kiselina (r = 0,803) te ferulinska i galna kiselina (r = 0,862).



Slika 4.17. Dijagram rasipanja analize glavnih komponenti za vodene i metanolne ekstrakte testiranih biljnih vrsta s obzirom na međusobni odnos varijabli

Dijagram pokazuje sličnost za vodeni i metanolni ekstrakt biljke *T. montanum* i vodeni ekstrakt biljke *M. pulegium* te metanolne ekstrakte biljke *M. pulegium* i *C. vulgare*.

5. ZAKLJUČAK

U ovom doktorskom radu određeni su kemijski i biološki profili biljnih vrsta korištenih u tradicionalnoj medicini Bosne i Hercegovine; *Mentha pulegium* L., *Teucrium montanum* L., *Satureja subspicata* L. i *Clinopodium vulgare* L.

Eterična ulja izolirana su iz svježe ubranog biljnog materijala te analizirana veznim sustavom plinska kromatografija - spektrometrija masa (GC/MS).

Ispitivanje kemijskog sastava te biološkog potencijala eteričnih ulja biljaka *M. pulegium, T. montanum* i *C. vulgare* prvo je takve vrste za navedene biljke s područja BiH. Za eterično ulje endemske *S. subspicata* s područja BiH, postojala je jedna prethodno objavljena studija.

Analize eteričnog ulja biljke *M. pulegium* pokazuju da je isto bogato monoterpenoidima. Dominantne komponente ulja su: pulegon, *p*-menton i piperitenon. Od monoterpena i seskviterpena najzastupljeniji su limonen i germakren D, a od neterpenskih spojeva 3-oktanol. Ispitivano ulje je pulegon tipa, kao i većina do sad ispitivanih eteričnih ulja *M. pulegium*.

Analize eteričnog ulja biljke *T. montanum* pokazuju da je isto bogato seskviterpenoidima i seskviterpenima, dok je udio monoterpenoida i monoterpena znatno manji. Dominacija seskviterpena je karakteristika eteričnih ulja biljaka roda *Teucrium*. Glavne komponente ovog ulja su: α-kadinol, ß-selinen, T-kadinol, δ-kadinen, germakren D-4-ol i α–pinen. U usporedbi s uljima drugih područja, ovo ulje je sličnog sastava s razlikom u udjelu dominantnih komponenti.

Analize eteričnog ulja biljke *S. subspicata* pokazuju da je ulje bogato monoterpenima i seskviterpenima. Glavne sastavnice ulja su: ß-kariofilen, *cis*-ß-ocimen i α-pinen. U usporedbi s uljima drugih područja ispitivano ulje pokazuje veću varijabilnost, što je jedna od karakteristika biljaka roda *Satureja*.

Analize eteričnog ulja biljke *C. vulgare* pokazuju da je isto bogato seskviterpenima. Najzastupljeniji spojevi su *epi*-biciklosesquifelandren, α-gurjunen i heksadekanska kiselina. U usporedbi s uljima drugih područja postoji sličnost u smislu zastupljenosti seskviterpena, ali s razlikom u sastavu i sadržaju pojedinih komponenti.

Ispitivanje kemijskog sastava i biološkog potencijala ekstrakata biljaka *M. pulegium*, *T. montanum*, *S. subspicata* i *C. vulgare* prva su takva ispitivanja za navedene biljne vrste s područja Bosne i Hercegovine.

Udio vodenih ekstrakata u početnom, svježem, biljnom materijalu je veći u odnosu na udio kod metanolnih ekstrakata.

Sadržaj ukupnih fenolnih komponenti, testiran Folin-Ciocalteu metodom, je najveći u metanolnim ekstraktima biljaka *T. montanum* i *S. subspicata*. Slijede vodeni ekstrakt *S. subspicata*, metanolni ekstrakti *C. vulgare* i *M. pulegium* te vodeni ekstrakat *C. vulgare*, *T. montanum* i *M. pulegium*.

Sadržaj ukupnih flavonoida, jednako kao i sadržaj ukupnih fenola, najviši je za metanolne ekstrakte biljaka *S. subspicata* i *T. montanum*. Slijede vodeni ekstrakt *S. subspicata*, metanolni ekstrakti *C. vulgare* i *M. pulegium* te vodeni ekstrakati *T. montanum*, *C. vulgare* i *M. pulegium*.

Vodeni i metanolni ekstrakti odabranih biljnih vrsta analizirani su visokoučinskom tekućinskom kromatografijom uz detektor s nizom dioda (HPLC/DAD). Kvalitativno i kvantitativno su određene sljedeće fenolne komponente: kempferol, miricetin, apigenin, diozmetin, luteolin, naringenin, eriodiktiol, galna, siringinska, elaginska, ferulinska, kafeinska, klorogenska, *p*-kumarinska, ružmarinska i protokatehinska kiselina. Među komponentama testiranih ekstrakata nisu identificirani rutin, kvercetin, diozmin i krizoeriol.

Analizom kemijskog sastava vodenih i metanolnih ekstraktata biljke *M. pulegium* kao dominantne komponente identificirane su: ružmarinska i elaginska kiselina te eriodiktiol.

Analizom kemijskog sastava vodenih i metanolnih ekstrakata biljke *T. montanum* kao dominantne komponente identificirane su: *p*-kumarinska, elaginska i kafeinska kiselina.

Analizom kemijskog sastava vodenog ekstrakta biljke *S. subspicata* kao dominantne komponente identificirane su: ružmarinska kiselina, miricetin i ferulinska kiselina, dok su kao dominantne komponente metanolnog ekstrakta identificirane: ružmarinska kiselina, eriodiktiol i kempferol. Visok sadržaj ružmarinske kiseline ukazuje na to da *S. subspicata* s područja BiH može biti važan izvor ružmarinske kiseline.

Analizom kemijskog sastava vodenih i metanolnih ekstrakata biljke *C. vulgare* kao dominantne komponente identificirane su: ružmarinska, elaginska i ferulinska kiselina.

Eterična ulja te vodeni i metanolni ekstrakti odabranih biljnih vrsta testirani su u smislu antioksidacijskog potencijala te sposobnosti inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE). Antioksidacijski potencijal testiran je metodom hvatanja slobodnog DPPH radikala (DPPH metoda), metodom testiranja redukcijskog potencijala (FRAP metoda) i dodatno za vodene i metanolne ekstrakte metodama zaštite lipida i proteina od oksidacije.

Najbolji antioksidacijski potencijal, testiran DPPH metodom, pokazali su metanolni ekstrakt *S. subspicata* i *T. montanum*. Njihov antioksidacijski potencijal je usporediv s onim za poznato dobre komercijalno dostupne antioksidanse vitamin C i BHA.

Nešto slabiji antioksidacijski potencijal pokazali su metanolni i vodeni ekstrakt *C. vulgare*, vodeni ekstrakt *M. pulegium* te vodeni i metanolni ekstrakt *T. montanum* i *M. pulegium*.

Antioksidacijski potencijal eteričnih ulja, testiran ovom metodom, bio je zamjetno lošiji u odnosu na onaj za ekstrakte. Među njima, najbolji potencijal je pokazalo eterično ulje *M. pulegium*; slijede ulja *S. subspicata* i *T. montanum*, dok je eterično ulje *C. vulgare* pokazalo najslabiji antioksidacijski potencijal. Dobar antioksidacijski potencijal ulja *M. pulegium* može se pripisati visokom sadržaju pulegona i *p*-mentona, koji su poznati po antioksidacijskom djelovanju.

Redukcijski potencijal ekstrakata, testiran FRAP metodom, bio je kako slijedi: metanolni ekstrakt *C. vulgare* > metanolni i vodeni ekstrakt *S. subspicata* > metanolni ekstrakt *T. montanum* i *M. pulegium* > vodeni ekstrakt *C. vulgare*, *M. pulegium* i *T. montanum*.

Redukcijski potencijal eteričnih ulja značajno je slabiji od onog za testirane ekstrakte. Među njima najbolji potencijal pokazalo je ulje biljke *S. subspicata*, dok su potencijali ostalih ulja bili kako slijedi: *C. vulgare* > *T. montanum* > *M. pulegium*.

U usporedbi s poznato dobrim antioksidansima, vitaminom C i BHA, testirani ekstrakti su pokazali dobar redukcijski potencijal, testiran FRAP metodom, dok su testirana eterična ulja pokazala znatno lošiji redukcijski potencijal.

Rezultati testiranja antioksidacijskog potencijala eteričnih ulja i ekstrakata DPPH i FRAP metodom svedene su na međusobno usporedive vrijednosti, na način da je izračunat ukupni antioksidacijski indeks (ACI).

Najviši ACI imao je metanolni ekstrakt biljke *S. subspicata*, slijede metanolni ekstrakt *C. vulgare*, vodeni estrakt *S. subspicata* i metanolni ekstrakt *T. montanum*. Ostali ekstrakti imali su niži ACI.

ACI za eterična ulja bili su zamjetno niži, u odnosu na testirane ekstrakte, s najvišom vrijednošću ACI za eterično ulje biljke *M. pulegium*.

Rezultati testiranja zaštite lipida od oksidacije eteričnim uljima i ekstraktima odabranih biljaka pokazali su da vodeni ekstrakti sve četiri biljne vrste pokazuju vrlo dobre rezultate, a metanolni ekstrakti tek nešto lošije rezultate, u usporedbi s poznato dobrim antioksidansima, vitaminom C, BHT i BHA. Hidroksicimetnim kiselinama može se pripisati ova vrsta aktivnosti.

Rezultati testiranja zaštite proteina od oksidacije, nakon inkubacije od 1 h, u usporedbi sa standardnim antioksidansima BHT i BHA, pokazuju odlično i vrlo dobro zaštitno djelovanje svih ekstrakata, izuzev metanolnog ekstrakta *S. subspicata* te vodenog i metanolnog ekstrakta *C. vulgare*, koji pokazuju prooksidacijsku aktivnost. Nakon inkubacije u trajanju od 24 h svi ekstrakti pokazuju prooksidacijsku aktivnost.

Općenito, antioksidacijski potencijal ekstrakata testiranih biljaka bolji je od onog za eterična ulja, što se može pripisati fenolnim komponentama ekstrakata koje su poznate po svom antioksidacijskom djelovanju.

Izolirana eterična ulja pokazuju umjerenu sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE, u usporedbi s poznatim inhibitorom eserinom. Sva ulja su uspješnija u inhibiciji AChE, s izuzetkom eteričnog ulja *M. pulegium* koje uspješnije inhibira BChE. Među uljima najbolju aktivnost pokazuje ulje *S. subspicata*. Za ovu vrstu aktivnosti vjerojatno su odgovorne komponente ulja poznate po svom antikolinesteraznom djelovanju: α-pinen, ß-kariofilen i pulegon.

Svi ispitivani ekstrakti pokazuju slabu sposobnost inhibicije enzima AChE. Slabu sposobnost inhibicije BChE pokazuju metanolni ekstrakt *S. subspicata* te vodeni ekstrakti *M. pulegium* i *T. montanum*. Ostali testirani ekstrakti ne inhibiraju BChE.

Analiza glavnih komponenti (PCA analiza) za ispitivana eterična ulja pokazuje jasno odvajanje testiranih uzoraka i najveću sličnost za eterična ulja biljaka *M. pulegium* i *C. vulgare*.

Analiza glavnih komponenti za ispitivane ekstrakte pokazuje sličnost za oba ekstrakta *T. montanum* i vodeni ekstrakt *M. pulegium* te metanolne ekstrakte *M. pulegium* i *C. vulgare*.

6. LITERATURA

[1] A. L. Demain, L. Zhang in *Natural Products Drug Discovery and Therapeutic Medicine* (Eds.: L. Zhang i A. L. Demain), Humana Press, New Jersey, **2005**, pp. 3-33.

[2] H. J. Dorman, R. Hiltunen, *Food Chem.* **2011**, *129*, 1612.

[3] D. J. McClements, E. A. Decker in *Fennema's Food Chemistry* (Eds.: S. Damodaran, K. L. Parkin, O. R. Fennema O. R.), CRC Press, Boca Raton, **2008**, pp. 155-217.

[4] P. K. Mukherjeea, V. Kumarb, M. Malb, P. J. Houghtona, *Phytomedicine*, **2007**, *14*, 289.

[5] B. Šarić-Kundalić, C. Dobeš, V. Klatte-Asselmeyer, J. Saukel, *J. Ethnopharmacol*. **2010**, *131*, 33.

[6] S. Redžić, *J. Med. Plants Res*. **2010**, *4*, 1003.

[7] S. Ćavar, M. Maksimović, M. E. Šolić, A. Jerković-Mujkić, R. Bešta, *Food Chem.* **2008**, *111*, 648.

[8] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, *Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25.

[9] I. Benzie, J. Strain, *Anal. Biochem*. **1996**, *239*, 70.

[10] G. C. Yen, C. L. Hsieh, *J. Agric. Food Chem*. **1998**, *46*, 3952.

[11] R. L. Levine, D. Garland, C. N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A. Lenz, B. Ahn, S. Shaltiel, E. R. Stadtman, *Methods Enzymol*. **1990**, *186*, 464.

[12] J. C. Mayo, D. X. Tan, R. M. Sainz, M. Natarajan, S. Lopez-Burillo, R. J. Reiter, *Biochim. Biophys. Acta,* **2003**, *1620*, 139.

[13] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres Jr., R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol*. **1961**, *7*, 88.

[14] R. R. Raja, *Res. J. Med. Plant,* **2012,** *6*, 203.

[15] K. Mägdefrau, F. Ehrendorfer, *Botanika; sistematika, evolucija i geobotanika,* (Ur.: J. Matekalo Draganović), Školska knjiga, Zagreb, **1997**.

[16] G. Burnie, S. Forrester, D. Greig, S. Guest, *Botanica*, Neografia, München, **2003**.

[17] D. Šoljan, E. Muratović, S. Abadžić, *Biljke planina BiH*, Šahinpašić, Sarajevo, **2009**.

[18] Č. Šilić, *Endemične biljke*, Svjetlost, Sarajevo, **1990**.

[19] G. Topcu, T. Kusman, *Bezmialem Sci.* **2014**, *1*, 1.

[20] M. C. Diaz-Maroto, N. Castillo, L. Castro-Vázquez, M. A. Gonzalez-Vinas, M.

S. Perez-Coello, *Flavour Fragrance J.* **2007**, *22*, 114.

[21] F. H. Shirazi, N. Ahmadi, M. Kamalinejad, *Daru*, **2004**, *12*, 106.

[22] F. Brahmi, D. Hauchard, N. Guendouze, K. Madani, M. Kiendrebeogo, L. Kamagaju, C. Stevigny, M. Chibane, P. Duez, Phenolic composition, *Ind. Crops Prod.* **2015**, *74*, 722.

[23] D. R. Shekarchi Burk, P. Senechal-Willisa, L. C. Lopez, B. G. Hogue, S. M. Daskalova, *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *126*, 397.

[24] N. Vuković, T. Milošević, S. Sukdolak, S. Solujić, *J. Evidence-based Complementary Altern. Med.* **2007**, *4*, 17.

[25] R. Jurišić-Grubešić, D. Kremer, S. Vladimir-Knežević, J. Vuković-Rodríguez, *Cent. Eur. J. Biol*. **2012**, *7*, 542.

[26] D. Kremer, I. J. Košir, M. Zovko-Končić, A. Čerenak, T. Potočnik, S. Srečec, M. Randić, I. Kosalec, *Curr. Drug Targets*, **2015**, *16*, 1.

[27] L. Georgieva, D. Mihaylova, *Int. Food Res. J.* **2015**, *22*, 240.

[28] A. Crozier, M. N. Clifford, H. Ashihara, *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, **2006**.

[29] P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3rd edition, JohnWiley and Sons, Chichester, **2009**.

[30] R. H. Liu, Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action *International Research Conference on Food, Nutrition, and Cancer,* American Society for Nutritional Sciences, **2004**.

[31] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 446.

[32] C. Sell in *Handbook of essential oils* (Eds.: K. H. Can Baser, G. Buchbauer), CRC Press, Boca Raton, **2010**, pp.121-151.

[33] H. L. Brielmann, W. N. Setzer, P. B. Kaufman, A. Kirakosyan, L. J. Cseke in *Natural Products From Plants,* (Eds.: L. J. Cseke, A. Kirakosyan, P. B. Kaufman, S. L. Warber, J. A. Duke, H. L. Brielmann), CRC Press, New York, **2006**, pp. 10-20.

[34] S. R. Arsenijević, *Organska hemija*, Partenon, Beograd, **2001**, str. 788-802.

[35] R. Croteau, T. M. Kutchan, N. G. Lewis in *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, (Eds.: B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones), American Society of

Plant Physiologists, **2000**, pp. 1250-1268.

[36] J. N. Kabera, E. Semanal, A. R. Mussa, X. He, *J. Pharm. Pharmacol.* **2014**, *2*, 377.

[37] S. Vladimir-Knežević, B. Blažeković, M. Bival Štefan, M. Babac in *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*, (Ed. V. Rao), InTech, Rijeka, **2012**, pp. 155-190.

[38] B. J. M. Janses, A. de Groot, *Nat. Prod. Rep*. **2004**, *21*, 449.

[39] L. Taiz, E. Zeiger, *Plant physiology*, 3rd edition, Sinauer Associates, Sunderland, **2002**.

[40] K. M. Davies, K. E. Schwinn in *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications* (Eds.: Q. M. Andersen, K. R. Markham), Taylor & Francis Group, Boca Raton, **2006**, pp. 143-219.

[41] J. M. C. Gutteridge, *Clin. Chem.* **1995**, *41/12*, 1819.

[42] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Free radical in biology and medicine,* 3rd Edition, Oxford University Press, 2001.

[43] http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/R/ROS.html

[44] H. J. H. Fenton, *J. Chem. Soc.* **1894**, *65*, 899.

[45] E. Milardi, *Flavour Fragr. J.* **1999**, *14*, 379.

[46] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, *Int. J. Biochem. Cell Biol*. **2007**, *39*, 44.

[47] P. J. Teisseire, *Chemistry of fragrant substances*, VCH Publishers Inc., New York-Weinheim-Cambridge, **1994**.

[48] J. Vaya, M. Aviram, *Curr. Med. Chem.: Immunol., Endocr. Metab. Agents*, **2001**, *1*, 99.

[49] C. F. Bourgeois, *Antioxidant Vitamins and Health*: *Cardiovascular Disease, Cancer, Cataracts, and Aging*, HNB Publishing, New York, **2003**.

[50] G. C. Yen, P. D. Duh, *J. Agric. Food Chem*. **1994**, *42*, 629.

[51] V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, N. Chandra, *Phcog. Rev*. **2010**, *4*, 118.

[52] E. Birben, U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, O. Kalayci, *World Allergy Organ. J.* **2012**, *5*, 9.

[53] M. Carocho, I. C. F. R. Ferreira, *Food Chem.Toxicol*. **2013**, *51*, 15.

[54] H. D. Belitz, W. Grosch, *Food Chemistry,* Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, **1987**, pp. 129-200.

[55] N. B. Wehr, R. L. Levine in *Cell Senescence: Methods and Protocols,* (Eds.: L. Galluzzi, I. Vitale, O. Kepp, G. Kroemer), Springer Science Business Media, **2013**, pp. 265-281.

[56] C. H. Lea, *Symposium on Foods: Lipid and Their Oxidation*, The AVI Publishing Company Inc., Westport-Connecticut, **1962**, pp. 3-150.

[57] D. J. McClements, E. A. Decker in *Fennema's Food Chemistry* (Eds.: S. Damodaran, K. L. Parkin, O. R. Fennema O. R.), CRC Press, Boca Raton, **2008**, pp. 155-217.

[58] F. Shahidi, Y. Zhong in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, (Ed. F. Shahidi), John Wiley & Sons, Inc. **2005**, pp. 357-384.

[59] M. Martinez-Tome, A. M. Jimenez, S. Ruggieri, N. Frega, R. Strabbioli, M. A. Murcia, *J. Food Protect.* **2001**, *64***,** 1412.

[60] A. E. Abdalla, J. P. Roozen, *Food Chem.* **1999**, *64*, 323.

[61] M. Namiki, *Crit. Rev. Food Sci.* **1990**, *29*, 273.

[62] J. Pokorny, *Trends Food Sci. Tech.* **1991**, *2*, 223.

[63] G. Ruberto, M. T. Baratta, *Food Chem.* **2000**, *69*, 167.

[64] N. Balasundram, K. Sundram, S. Samman, *Food Chem.* **2006**, *99*, 191.

[65] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Paganga, *Free Radical Biol. Med.* **1996**, *20*, 933.

[66] S. Vladimir-Knežević, B. Blažeković, M. Kindl, J. Vladić, A. D. Lower-Nedza, A. H. Brantner, *Molecules*, **2014**, *19*, 767.

[67] N. Alam, N. J. Bristi, M. Rafiquzzaman, *Saudi Pharm. J.* **2012**, *21*, 143-152.

[68] B. R. Pinho, F. Ferreres, P. Valentao, P. B. Andrade, *J. Pharm. Pharmacol.* **2013**, *65*, 1681.

[69] B. G. Katzung, S. B. Masters, A. J. Trevor, *Basic & Clinical Pharmacology,* McGraw-Hill Companies, New York, **2012**, p. 83.

[70] P. J. Houghton, Y. Ren, M. J. Howes, *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 181.

[71] A. Bosak, M. Katalinić, Z. Kovarik, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **2011**, *62*, 175.

[72] RCS PDB 4PQE https://www.rcsb.org/3d-view/4PQE/1

[73] RCS PDB 101 https://pdb101.rcsb.org/motm/54

[74] L. B. Roseiro, A. P. Rauter, M. L. Mourato Serralheiro, *Nutr. Aging*, **2012**, *1*, 99.

[75] RCS PDB 4BDS https://www.rcsb.org/structure/4BDS

[76] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, **1999**.

[77] B. d'Acampora Zellner, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello in *Handbook of essential oils* (Eds.: K. H. Can Baser, G. Buchbauer), CRC Press, Boca Raton, **2010**, pp.151-177.

[78] L. G. Wade ml., *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, **2017**, str. 539-550.

[79] A. Marston, K. Hostettmann in *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications* (Eds.: Q. M. Andersen, K. R. Markham), Taylor & Francis Group, Boca Raton, **2006**, pp. 1-32.

[80] H. Sakakibara, Y. Honda, S. Nakagawa, H. Ashida, K. Kanazawa, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 571.

[81] N. Kobilarov u *Analitika*, Vol. 2, (Ur. N. Radošević), Rad, Beograd, **1986**, str. 477-527.

[82] V. L. Singleton, J. A. Rossi, *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144.

[83] C. C. Chang, M. H. Yang, H. M. Wen, J. C. Chern, *J. Food Drug Anal*. **2002**, *10*, 178.

[84] M. Serafini, *J. Sci. Food Agric.* **2006**, *86*, 1989.

[85] A. V. Badarinath, K. M. Rao, C. M. S. Chetty, S. Ramkanth, T. V. S. Rajan, K. Gnanaprakash, *Int. J. PharmTech Res.* **2010**, *2*, 1276.

[86] A. R. Andro, M. M. Zamfirache, I. Boz, C. Padurariu, I. Burzo, M. L. Badea, C. Toma, R. C. Gales, Z. Olteanu, E. Truta, I. Gostin, *Buletinul ASM,* **2010**, *2*, 161.

[87] A. Stoyanova, V. Georgie, J. Kula, T. Majda, *J. Essent. Oil Res.* **2005**, *17*, 475.

[88] D. Lorenzo, D. Paz, E. Dellacassa, P. Davies, R. Vila, *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2002**, *45*, 519.

[89] J. C. Chalchat, M. S. Gorunović, A. Maksimović, S. D. Petrović, *J. Essent. Oil Res*. **2000**, *12*, 598.

[90] H. El-Ghorab, *J. Essent. Oil-Bear. Plants*, **2006**, *9*, 183.

[91] A. Ait-Ouazzou, S. Loran, A. Arakrak, A. Laglaoui, C. Rota, A. Herrera, *Food Res. Int.* **2012**, *45*, 313.

[92] A. Bouyahya, A. Et-Touys, Y. Bakri, T. Ahmed, H. Fellah, J. Abrini, N. Dakka, *Microb. Pathog.* **2017**, *111*, 41.

[93] C. Bouchra, M. Achouri, L. M. Hassani, M. Hmamouchia, *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *89*, 165.

[94] N. Zekri, S. Amalich, A. Boughdad, M. A. El Belghiti, T. Zair, *Mediterr. J. Chem.* **2013**, *2*, 607.

[95] M. Mahboubi, G. Haghi, *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *119*, 325.

[96] M. A. Khosravi Zanjani, N. Mohammadi, M. Zojaji, H. Bakhoda, *J. Food Biosci. Technol.* **2015**, *5*, 31.

[97] A. Kamkar, A. Jebelli Javan, F. Asadi, M. Kamalinejad, *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 1796.

[98] B. Marzouk, M. B. Hadj Fredj, I. Chraief, M. Mastouri, K. Boukef, Z. Marzouk, *J. Food, Agric. Environ.* **2008**, *6*, 78.

[99] M. Mkaddem, M. Bousaid, N. Ben Fadhel, *J. Essent. Oil Res.* **2007**, *19*, 211.

[100] A. T. Mata, C. Proenc, A. R. Ferreira, M. L. Serralheiro, J. M. Nogueira, M. E. Araujo, *Food Chem.* **2007**, *103*, 778.

[101] P. C. Dinis, P. L. Fale, P. J. A. Madeira, M. H. Florencio, M. L. Serralheiro, *Eur. J. Med. Plants*, **2013**, *3*, 381.

[102] B. Teixeira, A. Marquesa, C. Ramos, I. Batista, C. Serrano, O. Matos, N. R. Neng, J. M. Nogueira, J. A. Saraiva, M. L. Nunes, *Ind. Crops Prod.* **2012**, *36*, 81.

[103] L. Alpsoy, H. Sahin, S. Karaman, *Toxicol. Ind. Health*, **2011**, *27*, 647.

[104] A. Barchan, M. Bakkali, A. Arakrak, R. Pagan, A. Laglaoui, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. **2014**, *3*, 399.

[105] F. Brahmi, K. Madani, C. Stevigny, M. Chibane, P. Duez, *J. Coastal Life Med.* **2014**, *2*, 986.

[106] S. Khennouf, D. Benchiekh, S. Djidel, S. Dahamna, S. Amira, N. Charef, A. Baghiani, D. Harzallah, L. Arrar, *Pharmacogn. Commun.* **2013**, *3*, 35.

[107] A. Nickavar, A. Alinaghi, M. Kamalinejad, *Iran. J. Pharm. Res.* **2008**, *7*, 203.

[108] C. Proestos, N. Chorianopoulos, G. Nychas, M. Komaitis, *J. Agric. Food Chem*. **2005**, *53*, 1190.

[109] N. Bezić, I. Šamanić, V. Dunkić, V. Besendorfer, J. Puizina, *Molecules*, **2009**, *14*, 925.

[110] M. Skočibušić, N. Bezić, V. Dunkić, *Food Chem.* **2006**, *96*, 20.

[111] V. Dunkić, N. Bezić, N. Ljubešić, I. Bočina, *Acta Biol. Cracov., Ser. Bot.* **2007**, *49*, 45.

[112] V. Dunkić, D. Kremer, I. Dragojević Müller, E. Stabentheiner, S. Kuzmić, R.

Jurišić Grubešić, *Chem. Biodiversity*, **2012**, *9*, 2825.

[113] K. H. Baser, B. Demircakmak, H. Duman, *J. Essent. Oil Res.* **1997**, *9*, 545.

[114] N. N. Kovačević, B. S. Lakušić, M. S. Ristić, *J. Essent. Oil Res.* **2001**, *13*, 163.

[115] N. Radulović, M. Dekić, M. Joksović, R. Vukićević, *Chem. Biodiversity*, **2012**, *9*, 106.

[116] V. T. Tumbas, A. I. Mandić, G. S. Ćetković, S. M. Đilas, J. M. Čanadanović-Brunet, *Acta Period. Technol.* **2004**, *35*, 265.

[117] M. S. Stanković, M. G. Curcić, J. B. Zizić, M. D. Topuzović, S. R. Solujić, S. D. Marković, *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 4190-4205.

[118] N. M. Zlatić, S. Stanković, Z. S. Simić, *Environ. Monit. Assess*. **2017**, *189*, 110.

[119] M. S. Stanković, T. Lj. Mitrović, I. Z. Matić, M. D. Topuzović, S. M. Stamenković, *Not. Bot. Horti Agrobo*. **2015**, *43*, 41.

[120] S. M. Djilas, S. L. Markov, D. D. Cvetković, J. M. Čanadanović-Brunet, G. S. Ćetković, V. T. Tumbas, *Fitoterapia*, **2006**, *77*, 401.

[121] T. Kadifkova Panovska, S. Kulevanova, M. Stefova, *Acta Pharm.* **2005**, *55*, 207.

[122] G. Kokdil, *Flavour Fragrance J.* **1998**, *13*, 170.

[123] B. Tepe, A. Sihoglu-Tepe, D. Daferera, M. Polissiou, A. Sokmen, *Food Chem.* **2007**, *103*, 766.

[124] N. Bezić, E. Vuko, V. Dunkić, M. Ruščić, I. Blažević, F. Burčul, *Molecules*, **2011**, *16*, 8119.

[125] T. Todorova, K. Bardarov, D. Miteva, V. Bardarov, A. Atanassov, S. Chankova, *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* **2016**, *69*, 1019.

[126] M. Nikolova, *Pharmacognosy Res.*, **2011**, *3*, 256.

[127] K. Bardarov, V. Mihaylova, R. Djingova, *Bulgarian J. Agric. Sci.* **2015**, *21*, 145.

[128] B. Džhambazov, S. Daskalova, A. Monteva, N. Popov, *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 499.

[129] G. Opalchenova, D. Obreshkova, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1999**, *25*, 323.

[130] O. Stefanovic, M. S. Stanković, Lj. Comić, *J. Med. Plants Res.* **2011**, *5*, 4074.

[131] T. Miyase, Y. Matsushima, *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*, 1493.

[132] M. Bektašević, I. Carev, M. Roje, M. Jurin, O. Politeo, *Chem. Biodiversity*, **2017**, *14*, e1700239.

[133] M. Miloš, A. Radonić, N. Bezić, V. Dunkić, *Flavour Fragrance J.* **2001**, *16*,

157.

[134] V. Slavkovska, R. Jancić, S. Bojović, S. Milosavljević, D. Djoković, *Phytochemistry*, **2001**, *57*, 71.

[135] H. J. Dorman, M. Kosar, K. Kahlos, Y. Holm, R. Hiltunen, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4563.

[136] F. Zaidi, B. Voirin, M. Jay, M. R. Viricel, *Phytochemistry*, **1998**, *48*, 991.

[137] O. Fadel, K. El Kirat, S. Morandat, *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, *1808*, 2973.

[138] M. A. Soobrattee, V. S. Neergheen, A. Luximon-Ramma, O. I. Aruoma, T. Bahorun, *Mutat. Res*. **2005**, *579*, 200.

[139] M. Ohnishi, H. Morishita, H. Iwahashi, S. Toda, Y. Shirataki, M. Kimura, R. Kido, *Phytochemistry*, **1994**, *36*, 579.

[140] J. N. Kabera, E. Semanal, A. R. Mussa, X. He, *J. Pharm. Pharmacol.* **2014**, *2*, 377.

[141] E. R. Stadtman, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 797.

[142] M. Alcolea-Palafox, P. Posada-Moreno, I. Ortuno-Soriano, J. L. Pacheco-del-Cerro, C. Martinez-Rincon, D. Rodriguez-Martinez, L. Pacheco-Cuevas in *Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease, Vol. 6* (Eds.: Atta-ur-Rahman, M. I. Choudhary), Bentham Science Publishers, Sharjah, **2014**, pp. 426-477.

[143] P. S. Dhivya, M. Sobiya, P. Selvamani, S. Latha, *Int. J. PharmTech Res.* **2014**, *6*, 1450.

[144] F. Burčul, I. Blažević, M. Radan, O. Politeo, *Curr. Med. Chem.* (u tisku)

[145] M. Jukić, O. Politeo, M. Maksimović, M. Miloš, *Phytother. Res.* **2007**, *21*, 259.

[146] O. Politeo, I. Botica, T. Bilušić, M. Jukić, I. Carev, F. Burčul, M. Miloš, *J. Med. Plants Res.* **2011**, *5*, 6590.

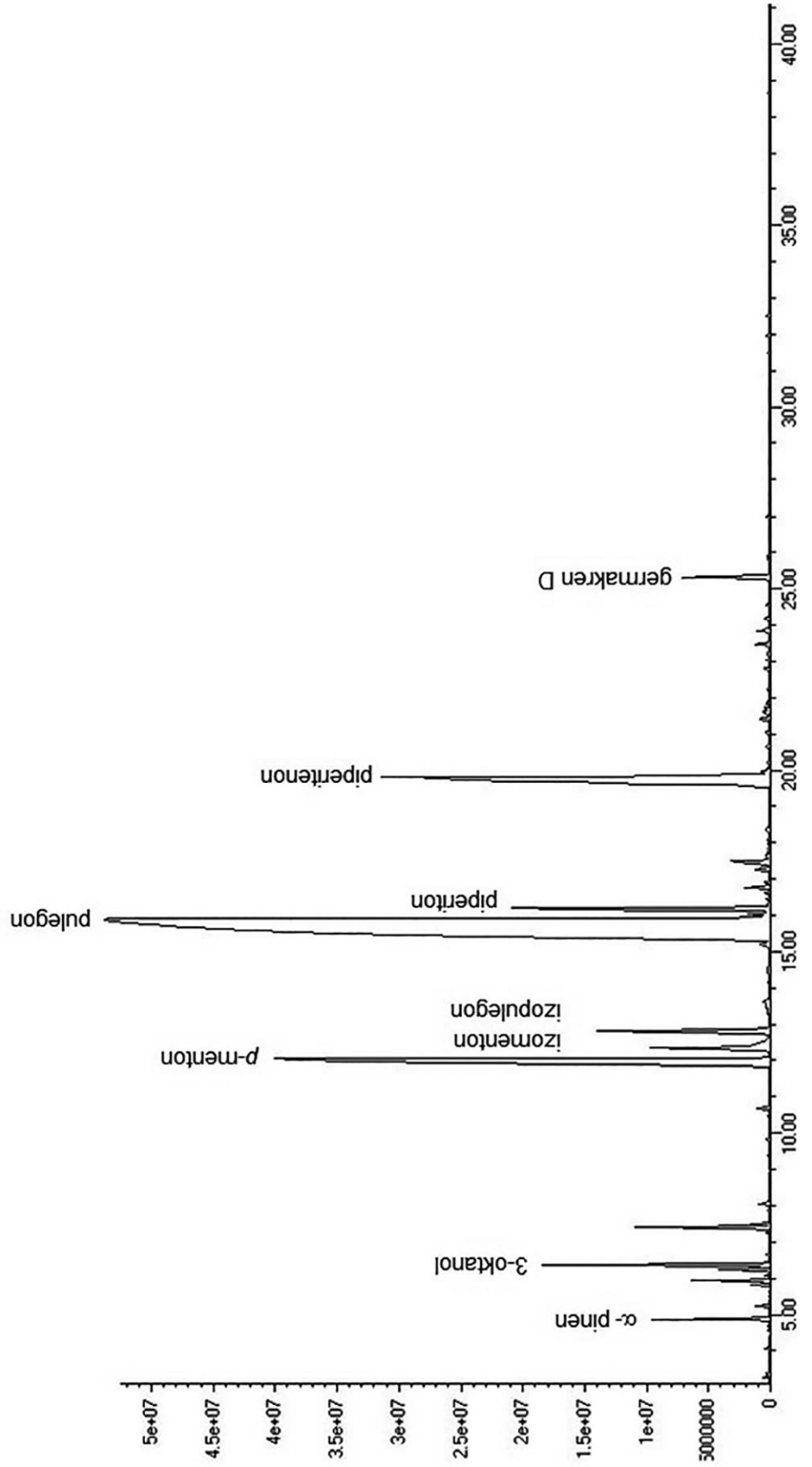
[147] M. Miyazawa, C. Yamafuji, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1765.

[148] S. U. Savelev, E. J. Okello, E. K. Perry, *Phytother. Res.* **2004**, *18*, 315.

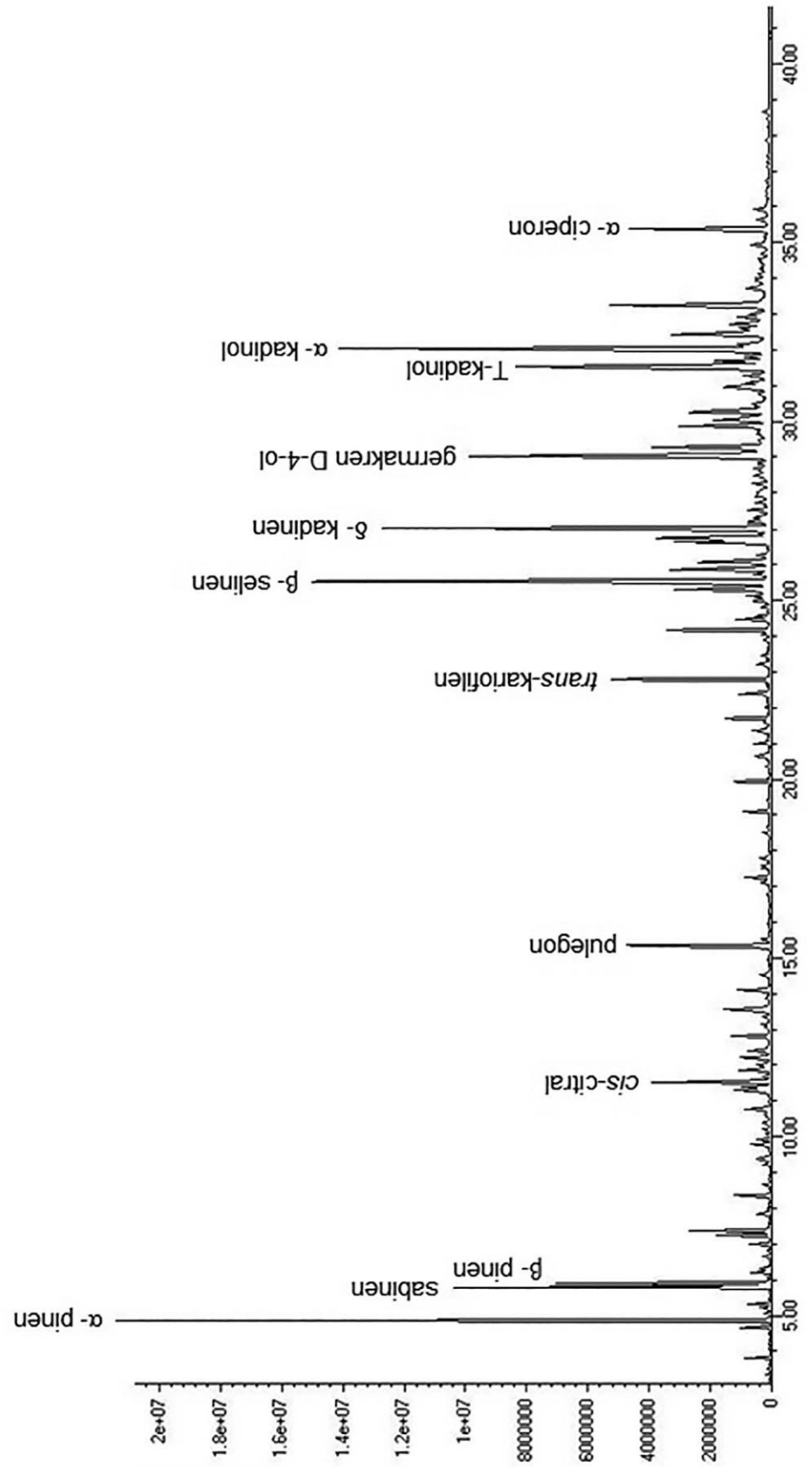
[149] C. M. Peckels, N. S. Alexander, G. N. Wilson, J. M. Karty, K. M. Matera, *Curr. Enzyme Inhib.* **2013**, *9*, 67.

[150] P. L. Fale, C. Ferreira, A. M. Rodrigues, P. Cleto, P. J. Amorim Madeira, M. H. Florencio, F. N. Frazao, M. L. Serralheiro, *J. Med. Plants Res.* **2013**, *7*, 1370.

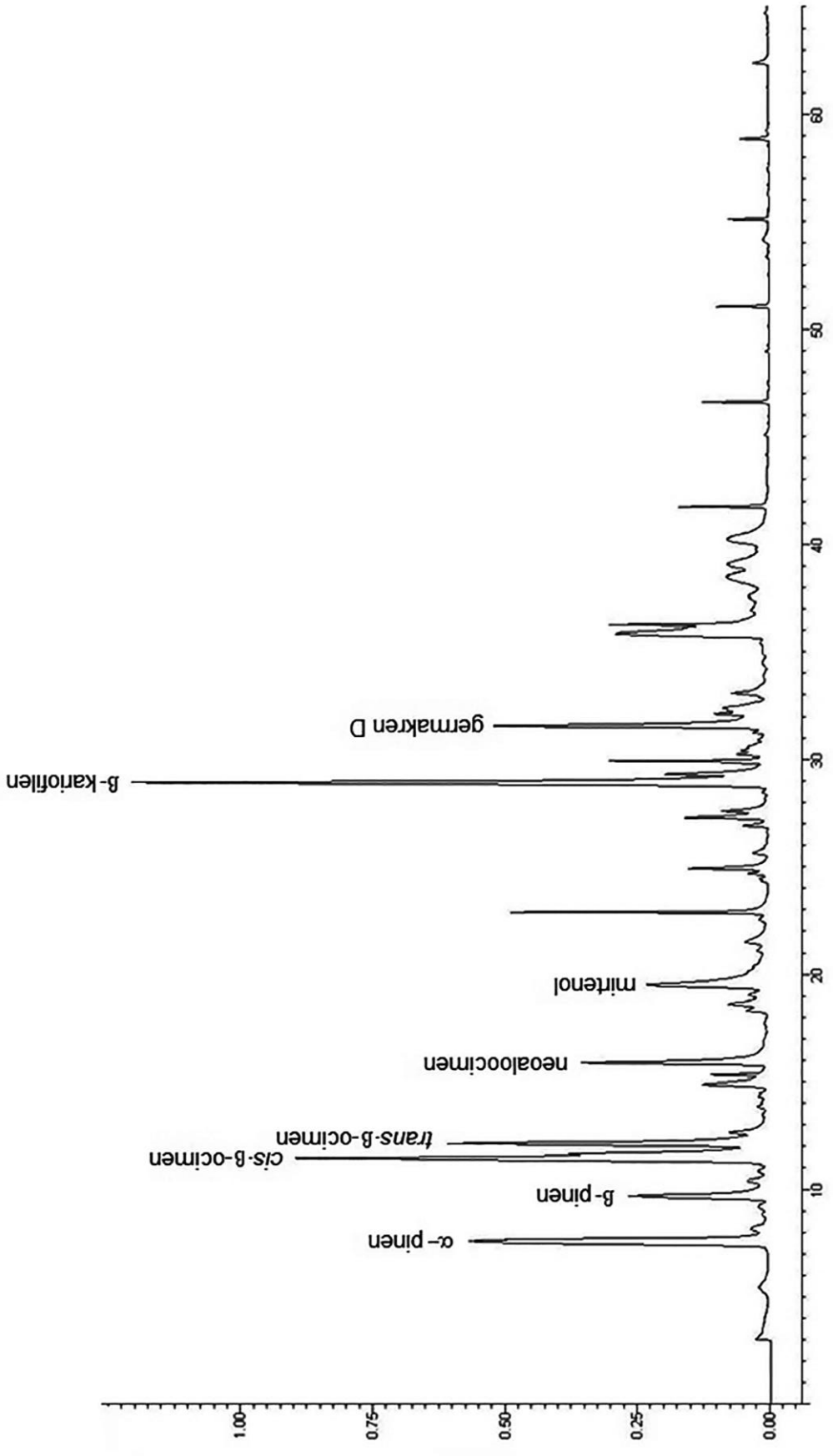
7. PRILOG



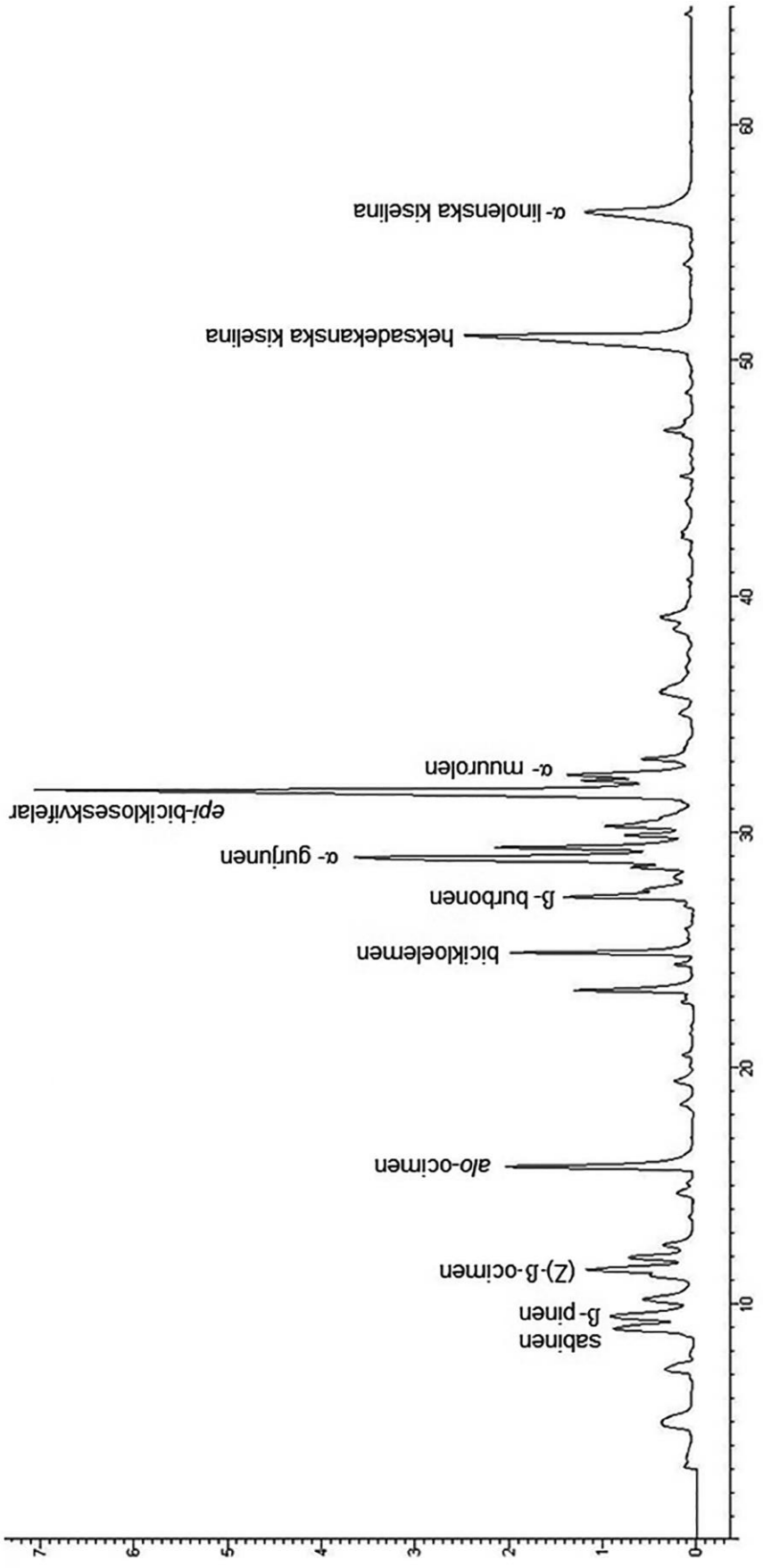
PRILOG 1. Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja biljke *M. pulegium* L. (označene su samo glavne sastavnice)



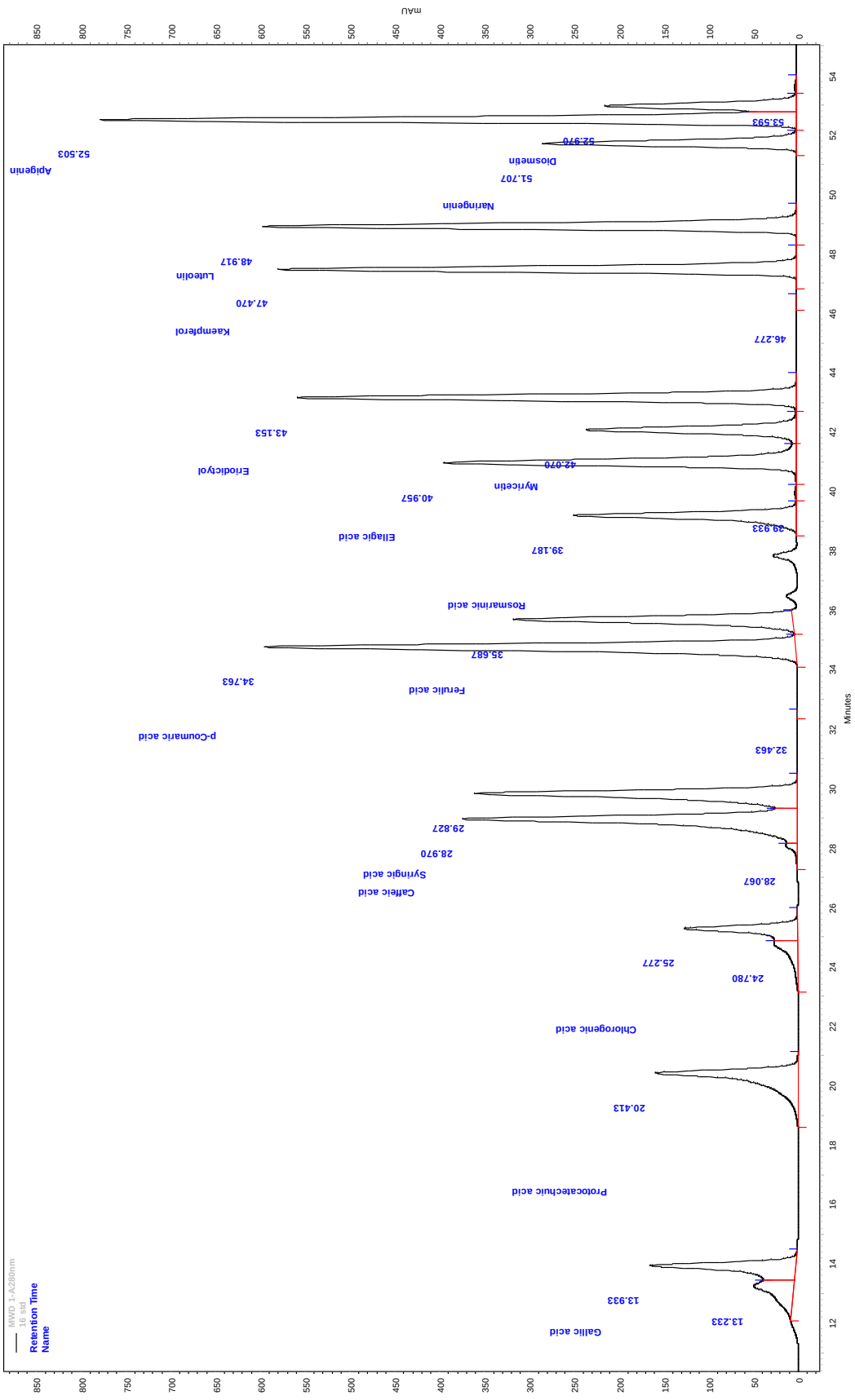
PRILOG 2. Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja biljke *T. montanum* L. (označene su samo glavne sastavnice)



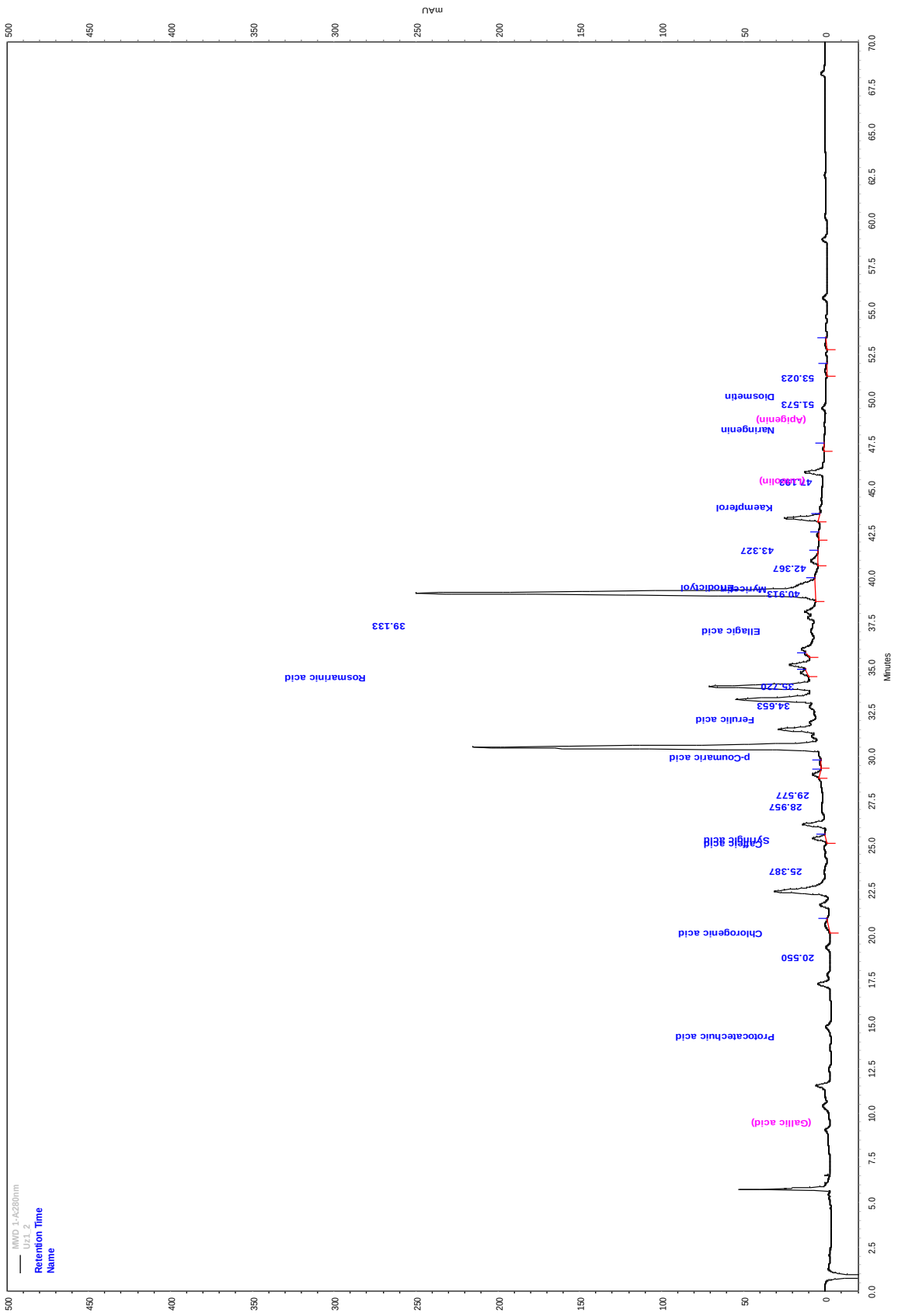
PRILOG 3. Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja izoliranog iz biljke *S. subspicata* L. (označene su samo glavne sastavnice)



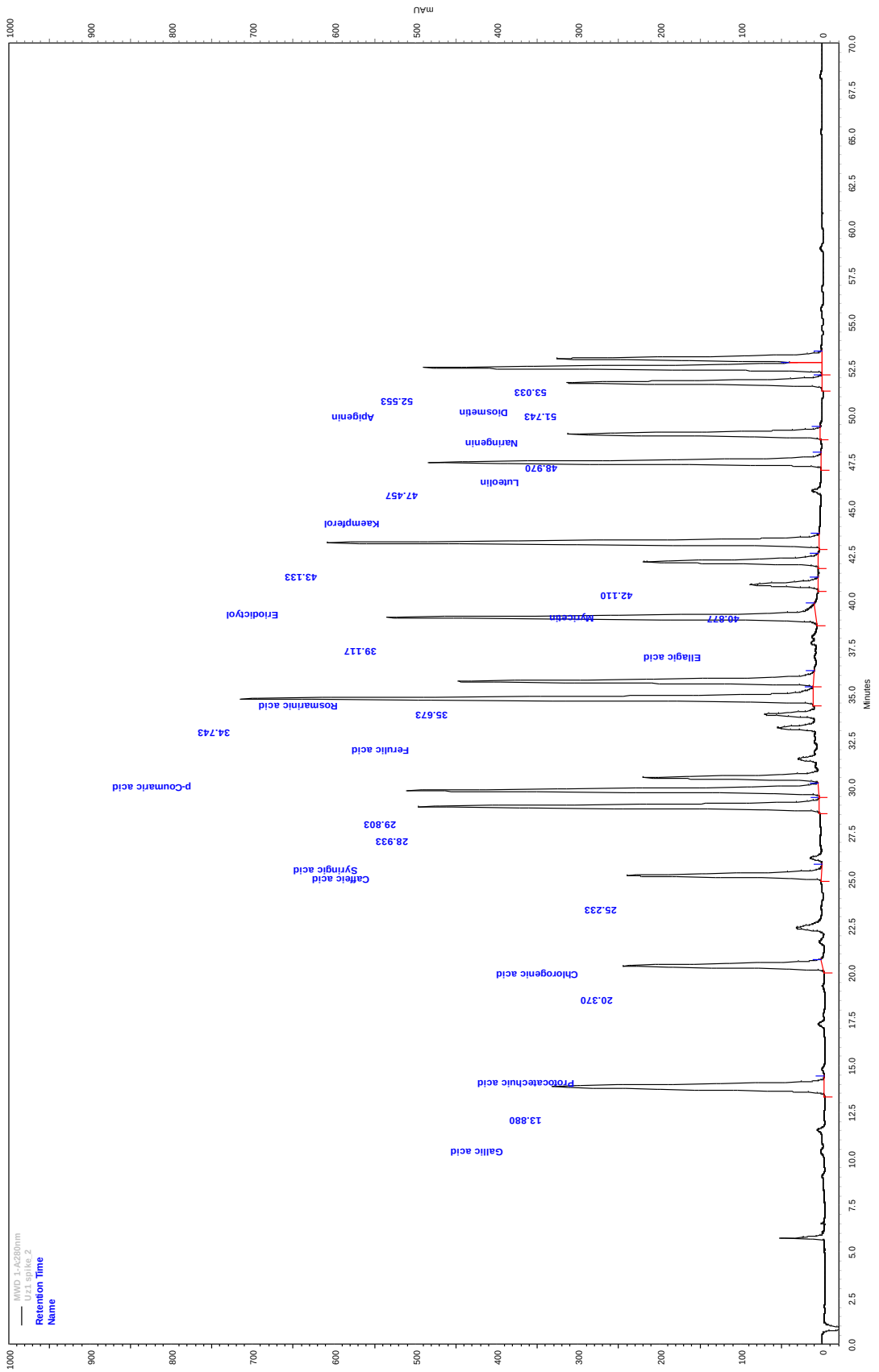
PRILOG 4. Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja izoliranog iz biljke *C. vulgare* L. (označene su samo glavne sastavnice)



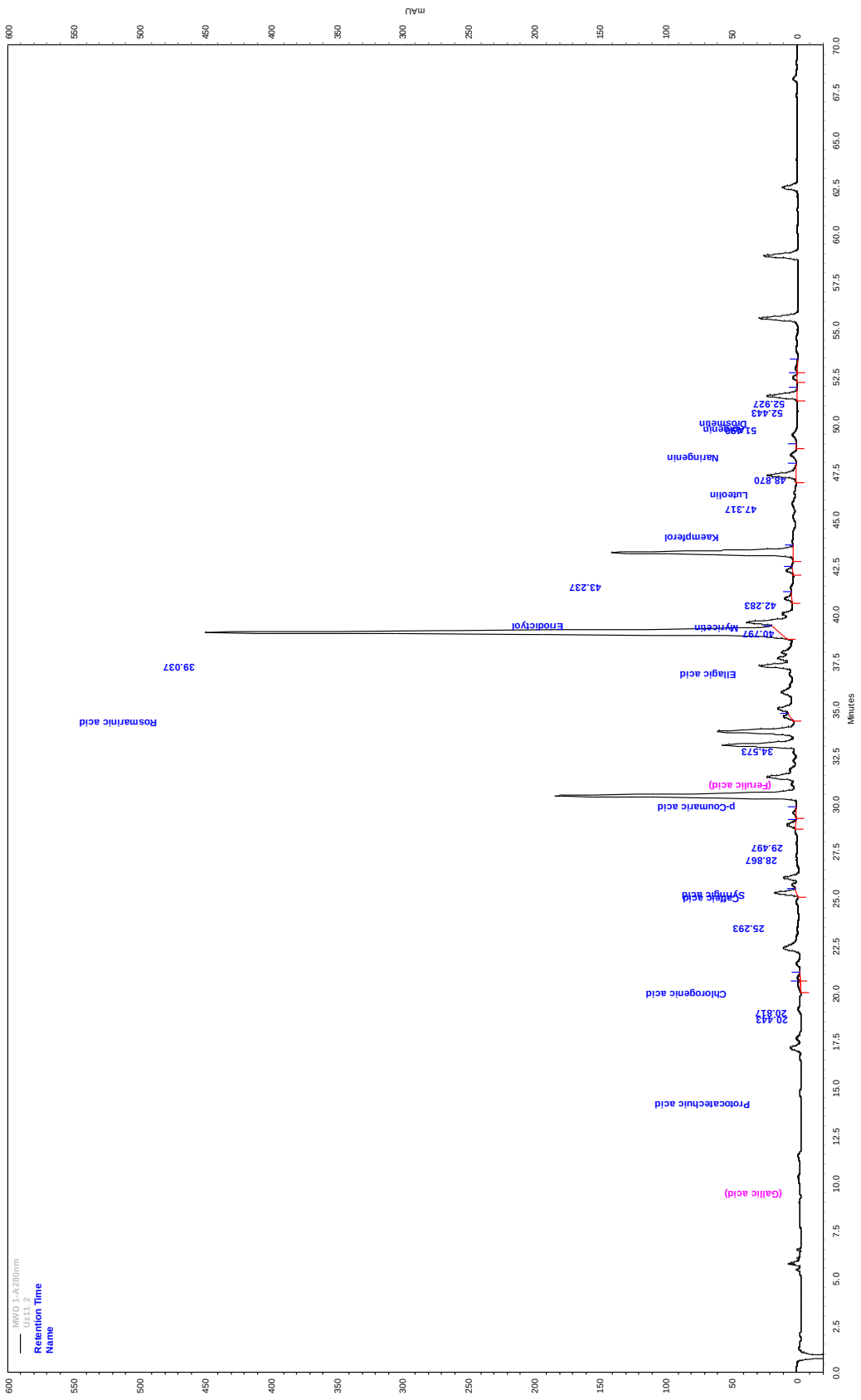
PRILOG 5. Kromatogram šesnaest različitih standarda korištenih kod HPLC/DAD analiza



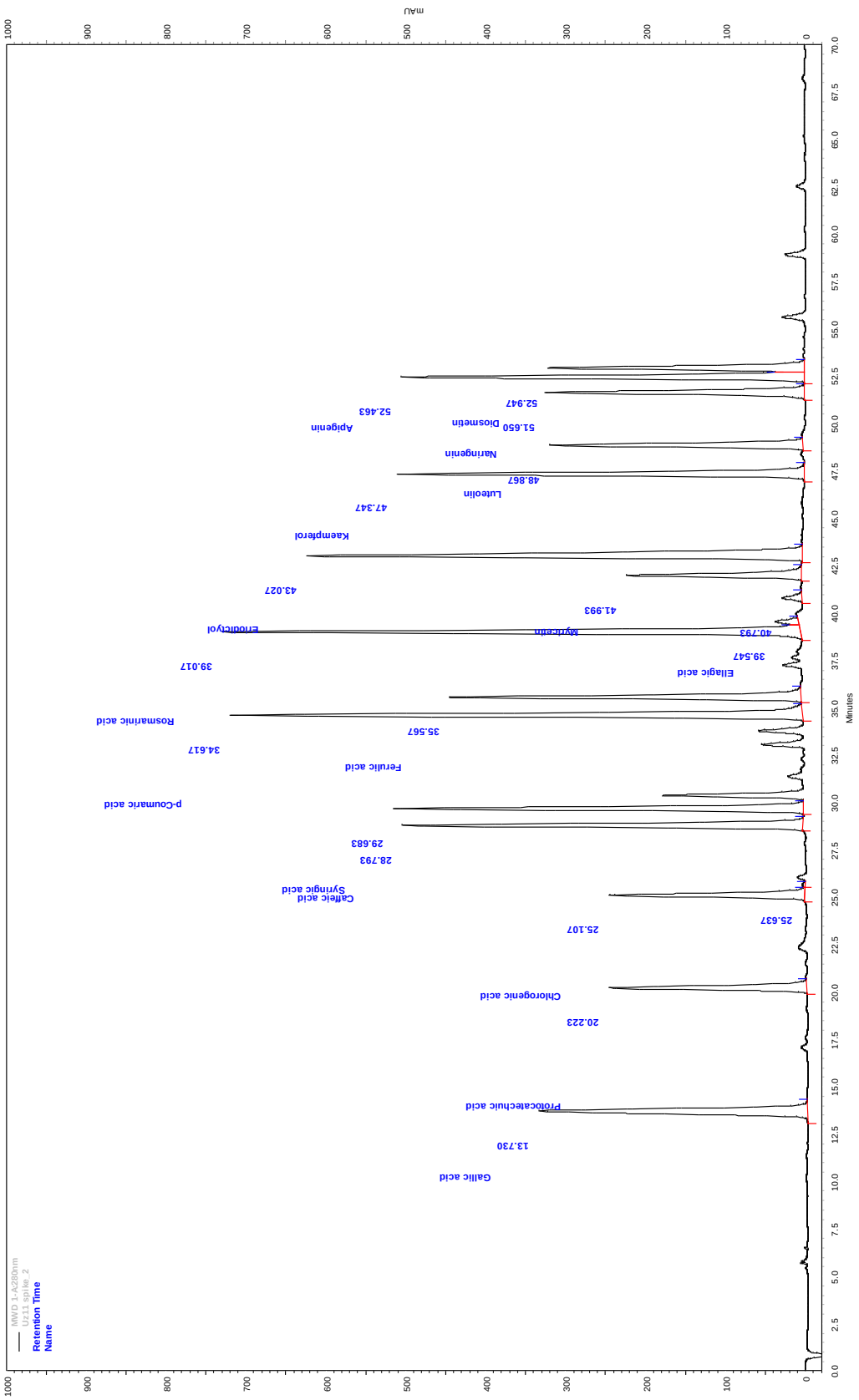
PRILOG 6. Kromatogram vodenog ekstrakta biljke *M. pulegium* L. dobiven HPLC/DAD analizom



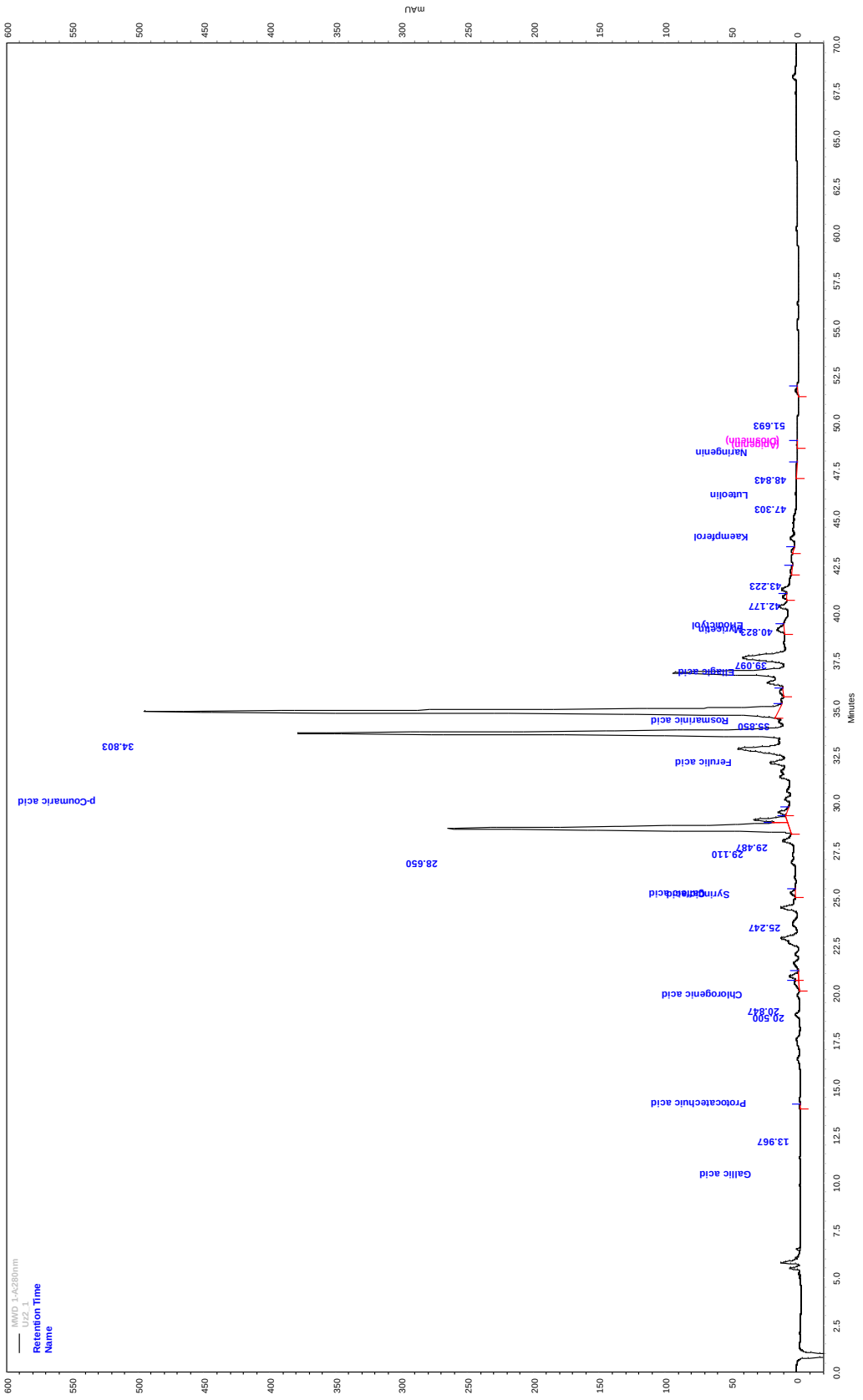
PRILOG 7. Kromatogram vodenog ekstrakta biljke *M. pulegium* L. sa standardnim dodatkom dobiven HPLC/DAD analizom



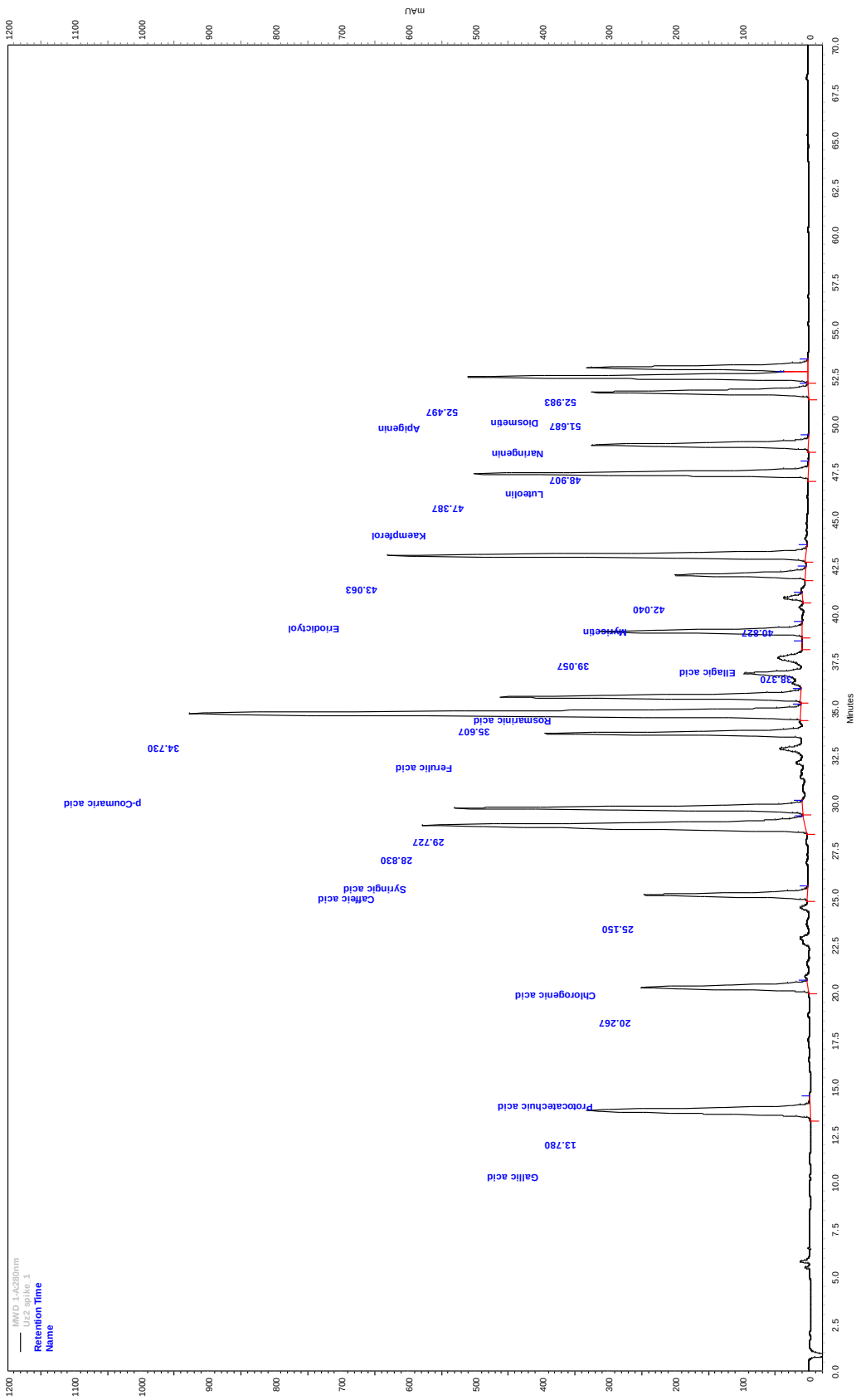
PRILOG 8. Kromatogram metanolnog ekstrakta biljke *M. pulegium* L. dobiven HPLC/DAD analizom



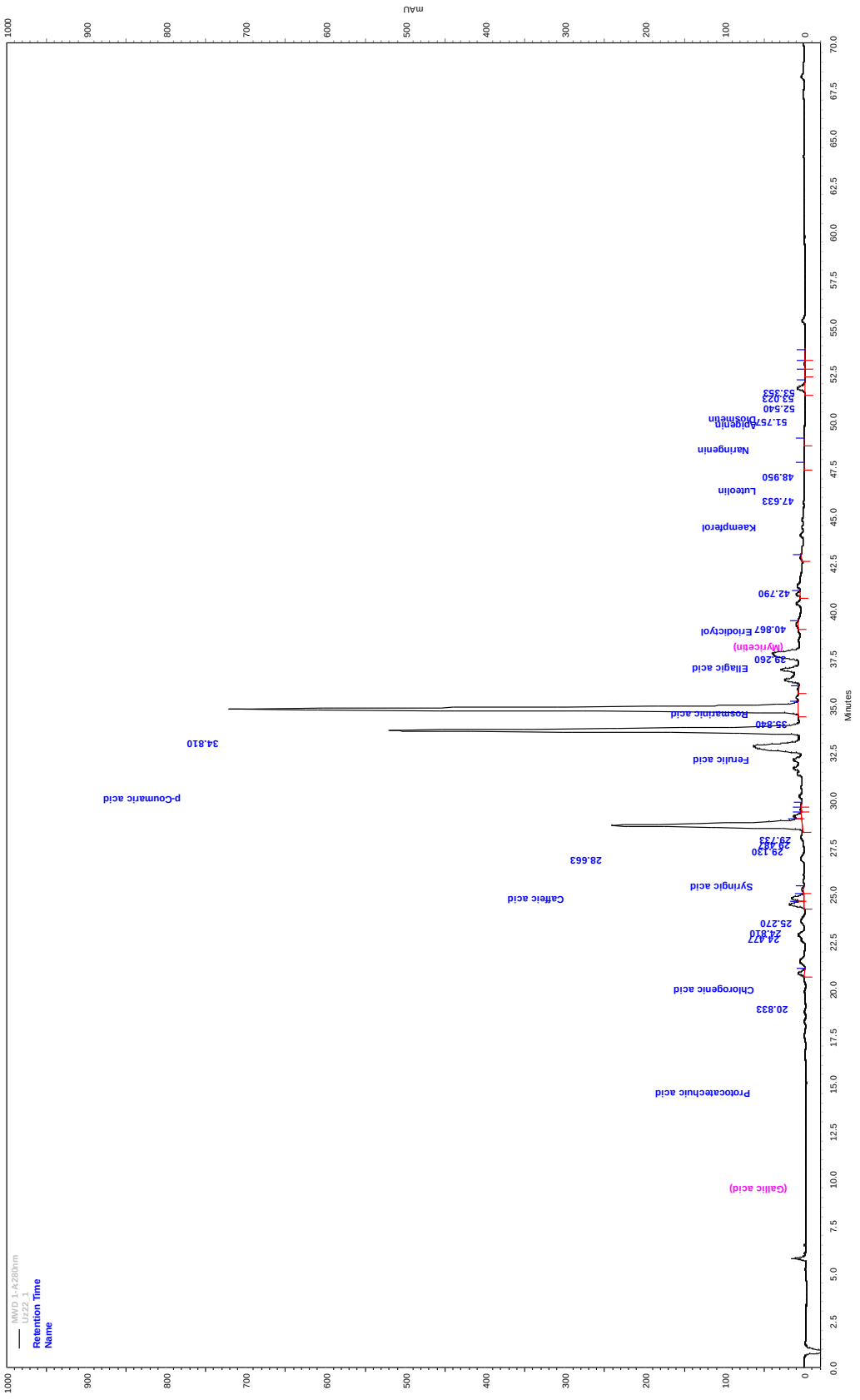
PRILOG 9. Kromatogram metanolnog ekstrakta biljke *M. pulegium* L. sa standardnim dodatkom dobiven HPLC/DAD analizom



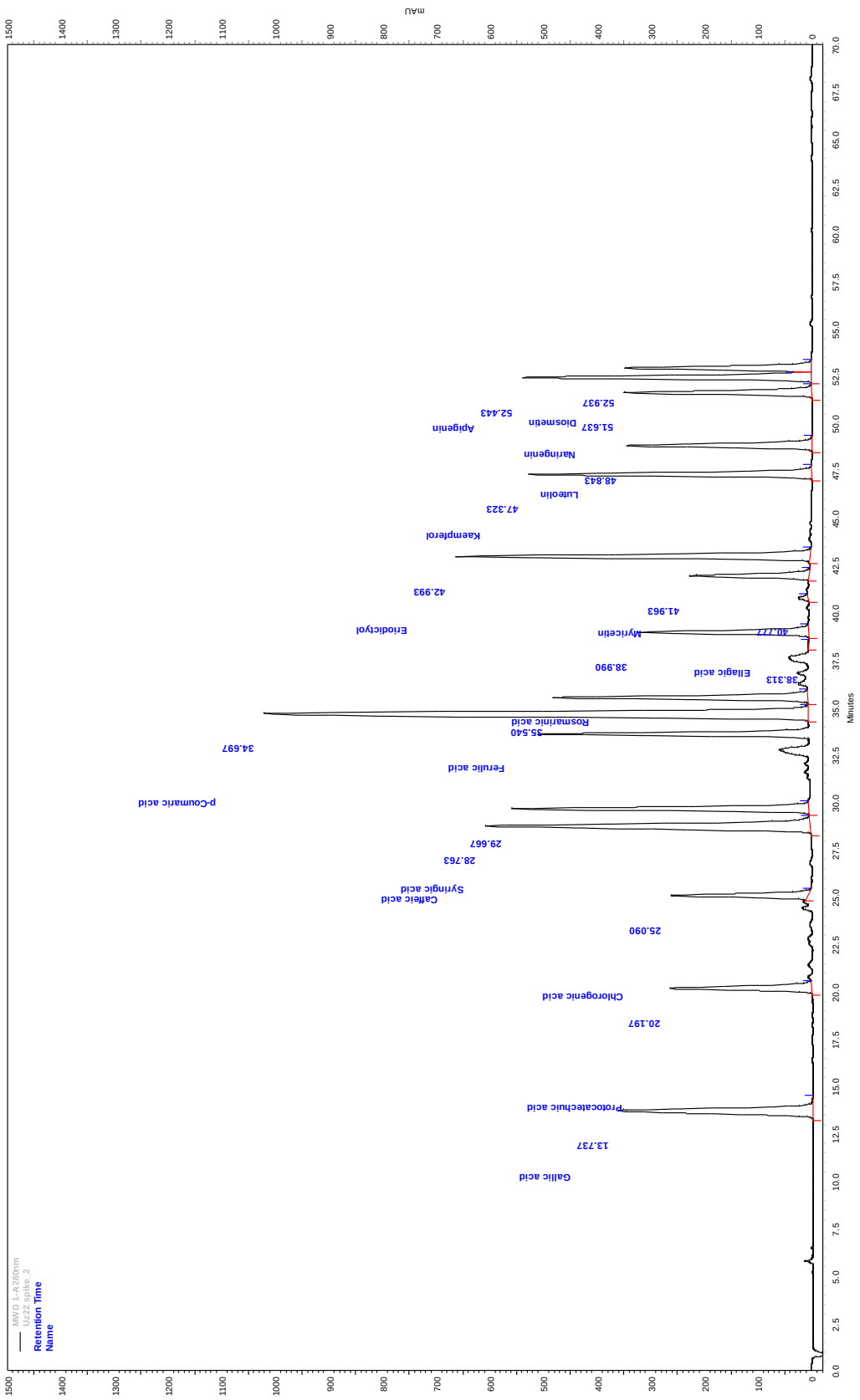
PRILOG 10. Kromatogram vodenog ekstrakta biljke *T. montanum* L. dobiven HPLC/DAD analizom



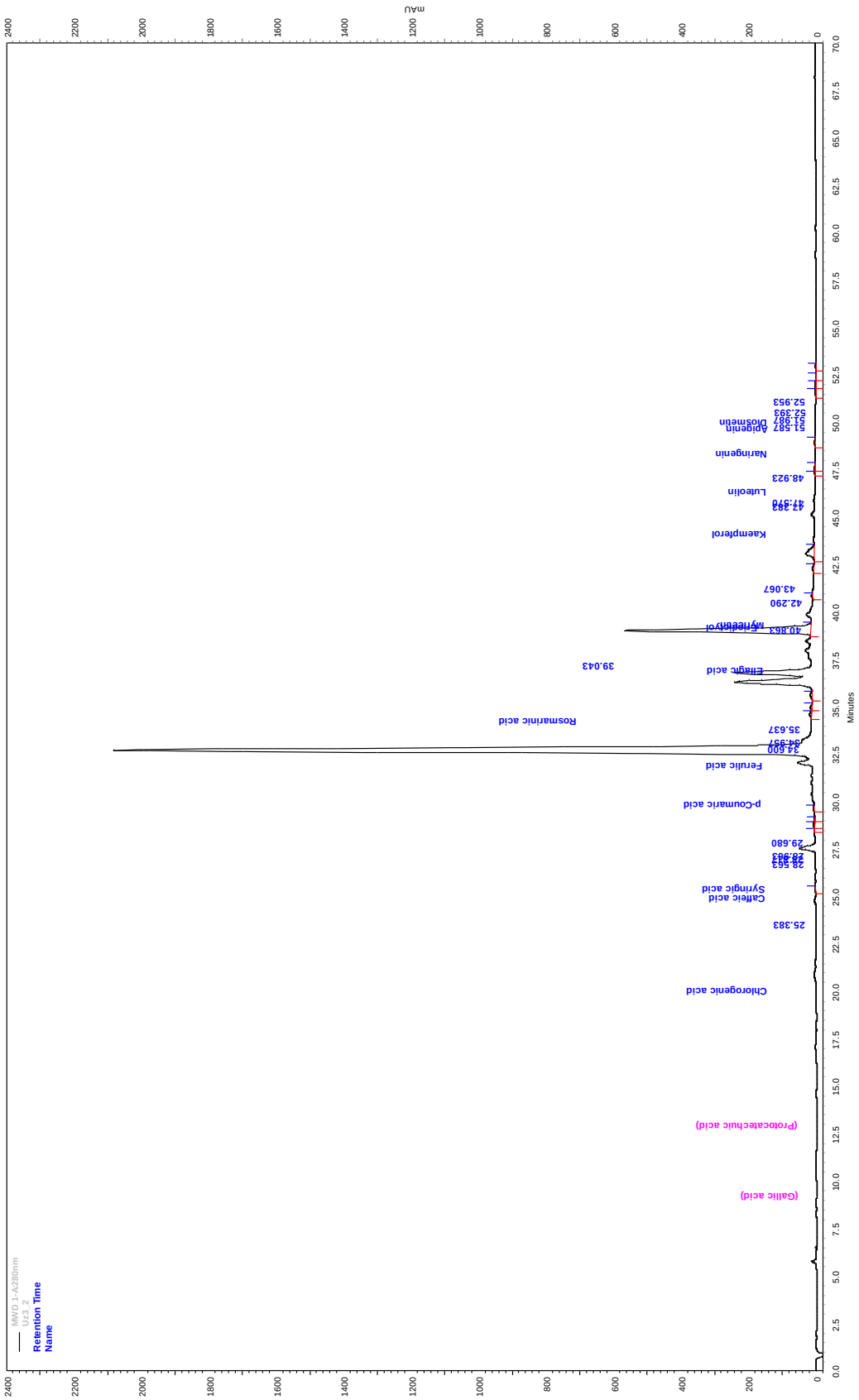
PRILOG 11. Kromatogram vodenog ekstrakta biljke *T. montanum* L. sa standardnim dodatkom dobiven HPLC/DAD analizo



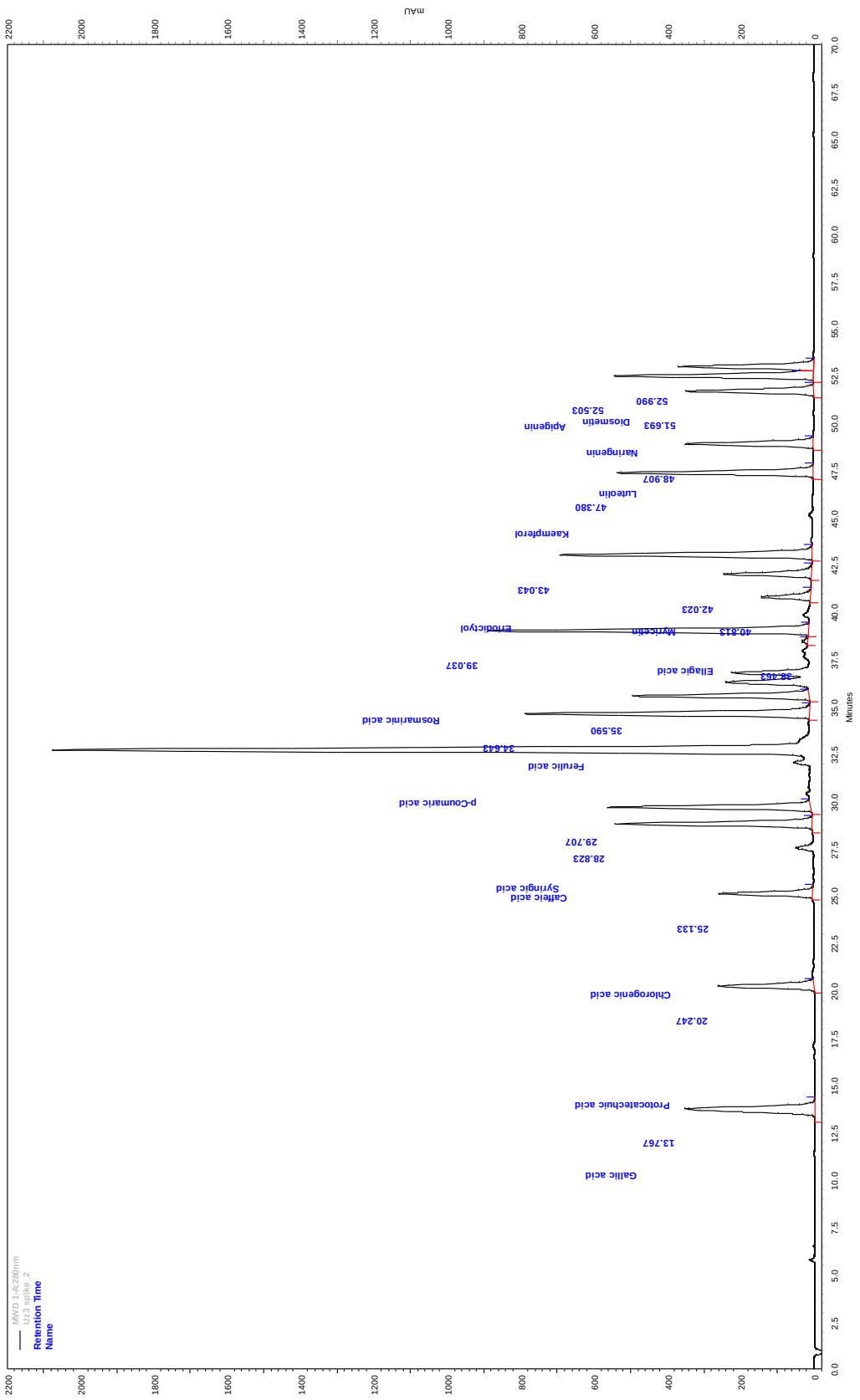
PRILOG 12. Kromatogram metanolnog ekstrakta biljke *T. montanum* L. dobiven HPLC/DAD analizom



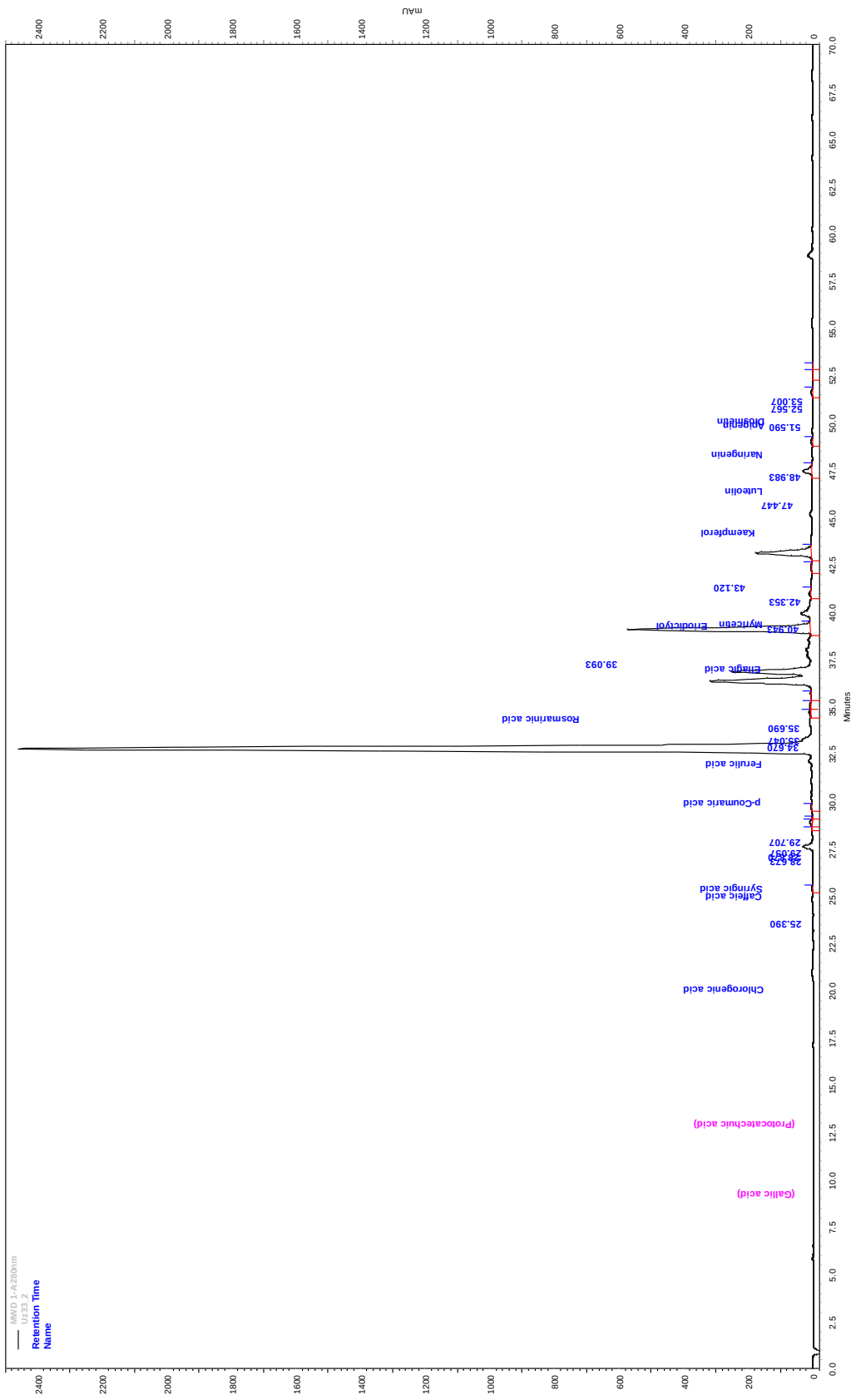
PRILOG 13. Kromatogram metanolnog ekstrakta biljke *T. montanum* L. sa standardnim dodatkom dobiven HPLC/DAD analizom



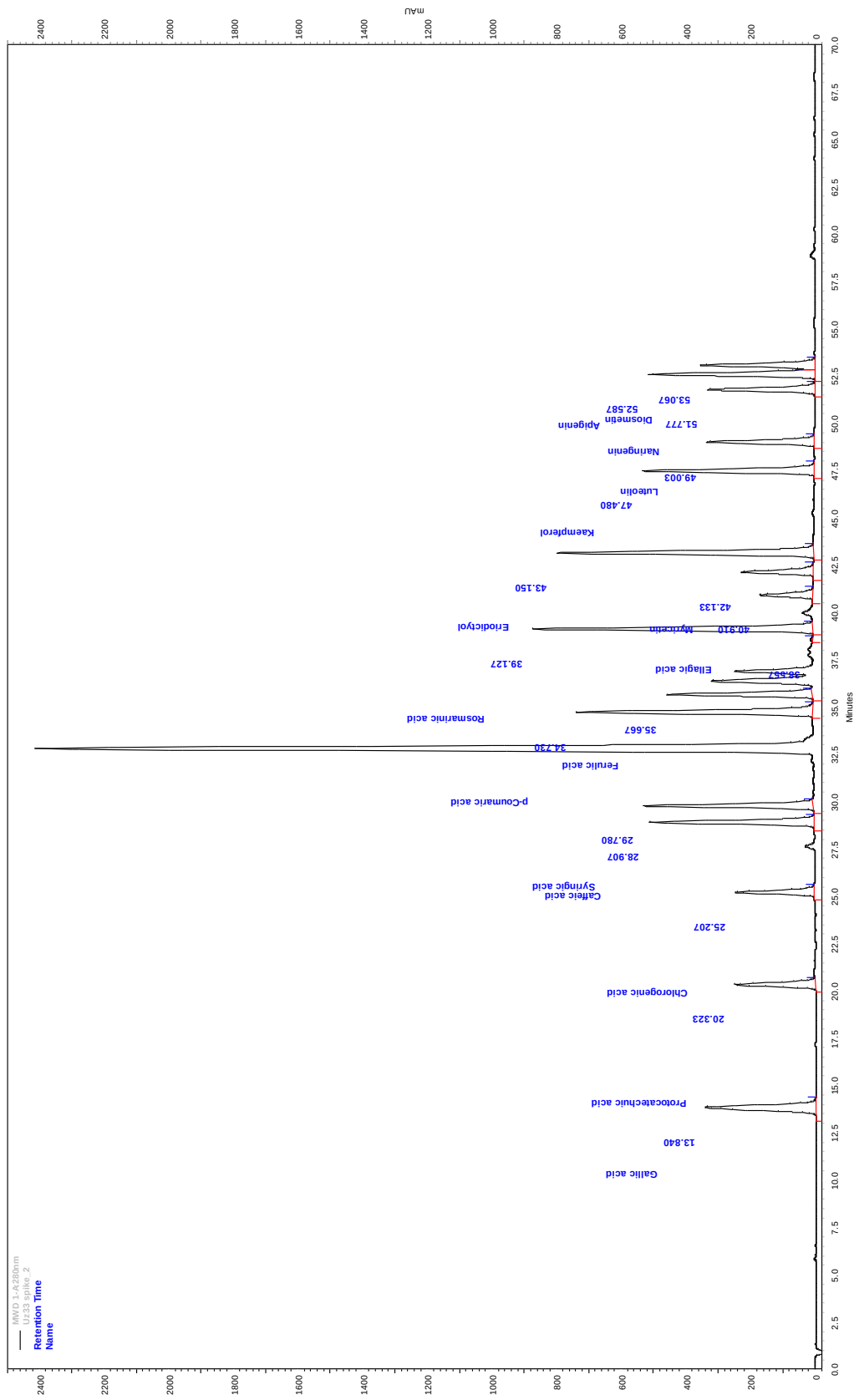
PRILOG 14. Kromatogram vodenog ekstrakta biljke *S. subspicata* L. dobiven HPLC/DAD analizom



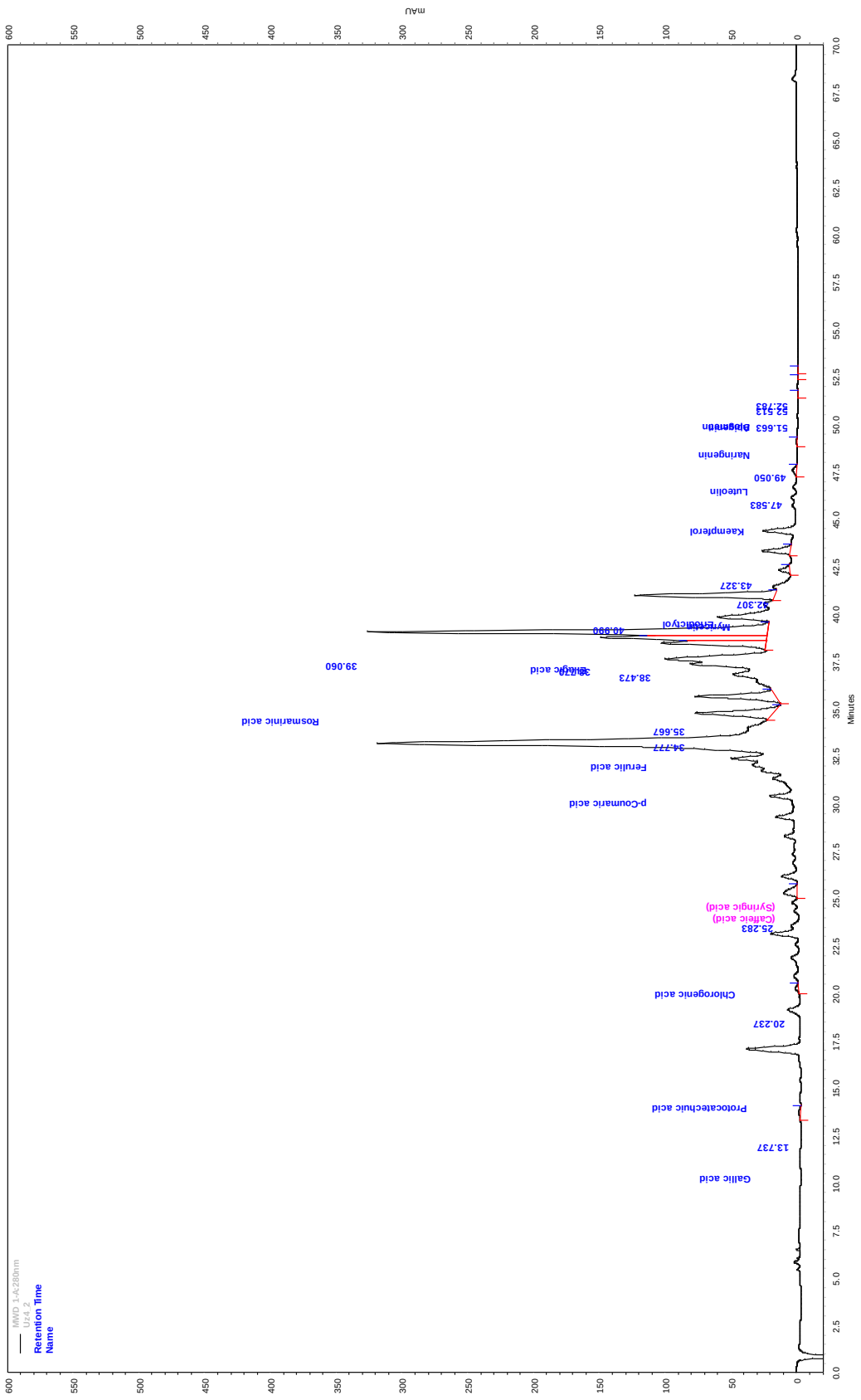
PRILOG 15. Kromatogram vodenog ekstrakta biljke *S. subspicata* L. sa standardnim dodatkom dobiven HPLC/DAD analizom



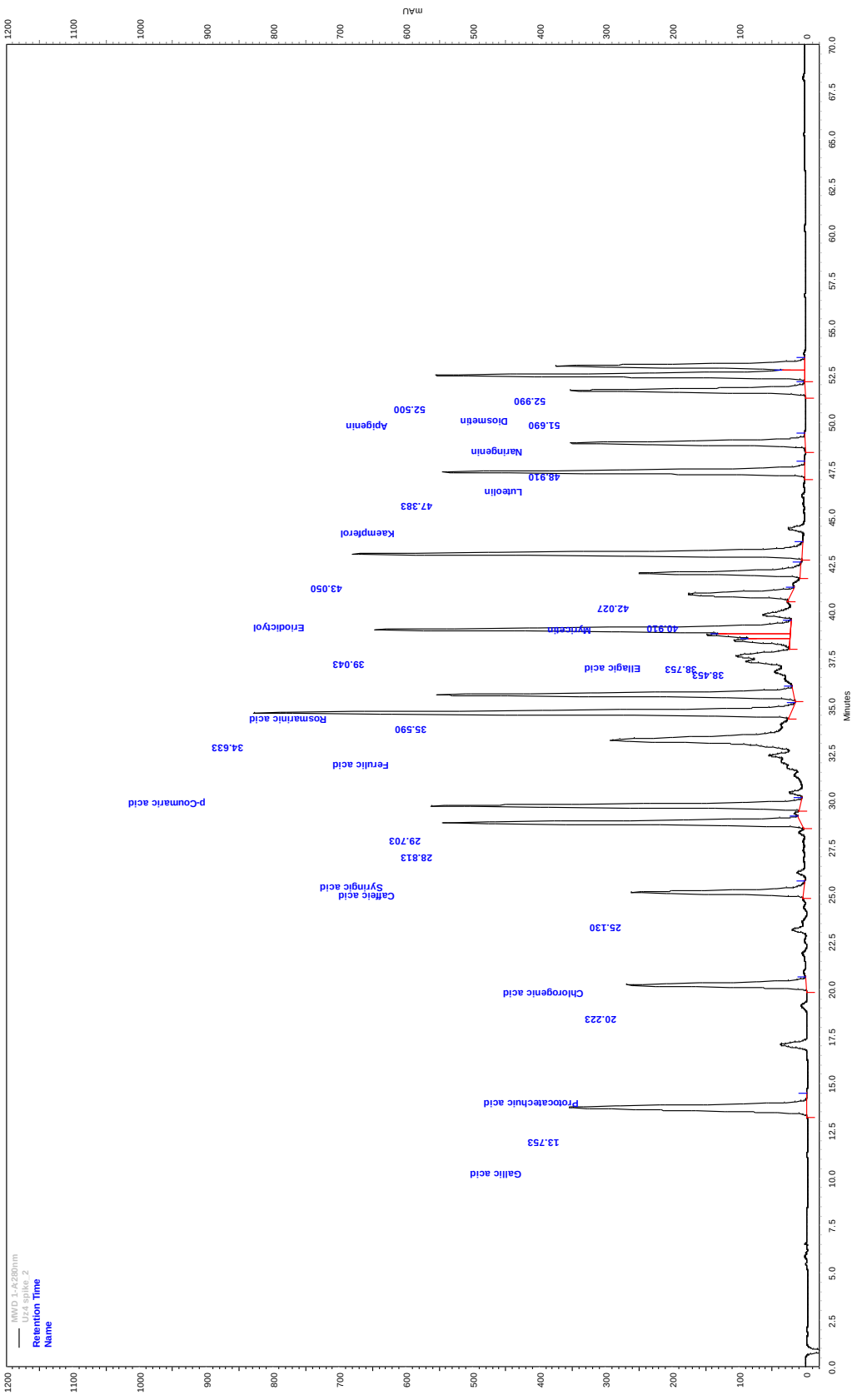
PRILOG 16. Kromatogram metanolnog ekstrakta biljke *S. subspicata* L. dobiven HPLC/DAD analizom



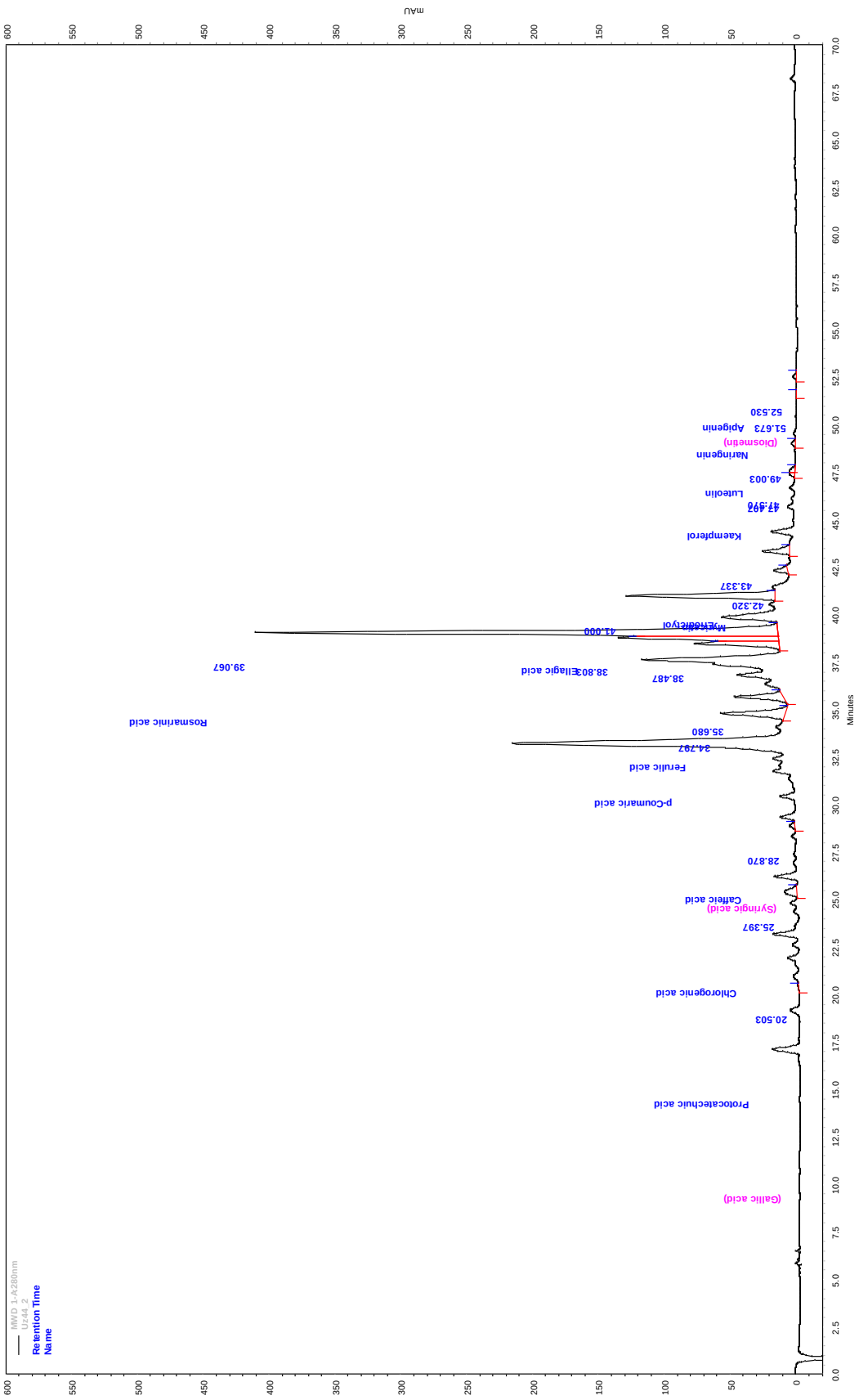
PRILOG 17. Kromatogram metanolnog ekstrakta biljke *S. subspicata* L. sa standardnim dodatkom dobiven HPLC/DAD analizom



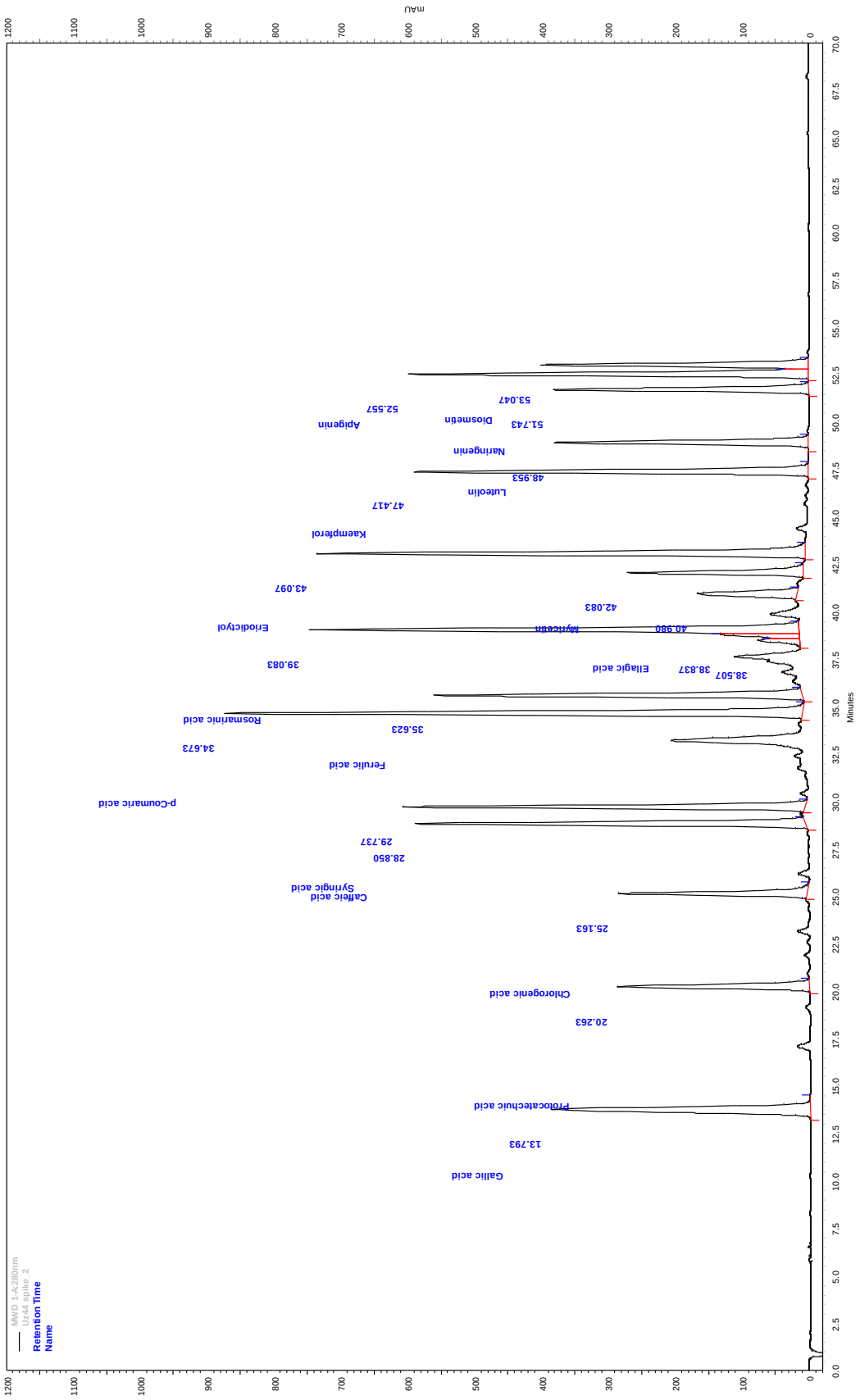
PRILOG 18. Kromatogram vodenog ekstrakta biljke *C. vulgare* L. dobiven HPLC/DAD analizom



PRILOG 19. Kromatogram vodenog ekstrakta biljke *C. vulgare* L. sa standardnim dodatkom dobiven HPLC/DAD analizom



PRILOG 20. Kromatogram metanolnog ekstrakta biljke *C. vulgare* L. dobiven HPLC/DAD analizom



PRILOG 21. Kromatogram metanolnog ekstrakta biljke *C. vulgare* L. sa standardnim dodatkom dobiven HPLC/DAD analizom

8. KRATICE

A	apsorbancija
ACC	acetil-CoA karboksilaza
acetil CoA	acetil-koenzim A
ACh	acetilkolin
AChE	enzim acetilkolinesteraza
ACI	ukupni antioksidacijski indeks
AD	Alzheimerova bolest
ANS	antocijanidin 4-reduktaza
ATCh	acetiltiokolin
ATChI	acetiltiokolin-jodid
ATP	adenozin trifosfat
AUS	aureunidin sintaza
BCh	butirilkolin
BChE	butirilkolinesteraza
BHA	butiril-hidroksianizol
BHT	butiril-hidroksitoluen
BiH	Bosna i Hercegovina
BROR	inhibicija Briggs-Rauscher oscilirajućih reakcija
BSA	goveđi serumski albumin
BTChI	butiriltiokolin-jodid
C5	hemiterpeni
C10	monoterpeni
C15	seskviterpeni
C20	diterpeni
C25	sesterpeni
C30	triterpeni
C4H	cinamat-4-hidroksilaza
ChAT	kolinacetiltransferaza
ChE	kolinesteraza
CHI	halkon izomeraza
CHS	halkon sintaza
4CL	*p*-kumarat-CoA ligaza
DAD	detektor s nizom fotodioda
DFR	dihidroflavonol 4-reduktaza
DMAPP	dimetilalil-pirofosfat
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DNPH	2,4-dinitrofenil hidrazin
DOX	1-deoksi-D-ksiluloza
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DTNB	5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojeva) kiselina
E.C. 3.1.1.7	numerička klasifikacija za acetilkolinesterazu
E.C. 3.1.1.8	numerička klasifikacija za butirilkolinesterazu
F3GT	flavonoid 3-*O*-glikozil-transferaza
F3H	flavanon-3-hidroksilaza
FAAS	plamena atomska apsorpcijska spektroskopija
FAD	flavin adenin dinukleotid
FID	plameno-ionizacijski detektor
FLS	flavonol sintaza
FMN	flavin mononukleotid
FNR	flavanon 4-reduktaza
FNS	flavon sintaza
FPP	2E, 6E farnezil-pirofosfat
FRAP	redukcijski potencijal antioksidansa
GAE	ekvivalent galne kiseline

GC/MS	plinska kromatografija-masena spektrometrija
GFPP	2E, 6E, 10E, 14E geranilfarnezil-pirofosfat
GGPP	2E, 6E, 10E geranilgeranil-pirofosfat
Glu	glutaminska kiselina
GPP	geranil-pirofosfat
GPX	glutation-peroksidaza
GSH	glutation
GSSG	glutation disulfid
His	histidin
HNE	4-hidroksi-2-nonenal
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
HSPs	proteini toplinskog šoka
HSR	hvatači slobodnih radikala
IC_{50}	50% inhibicijska koncentracija
ICP-MS	spektrometar masa induktivno spregnute plazme
IFS	izoflavon sintaza
IPP	izopentenil-pirofosfat
kcat	okretni broj enzima
m/z	omjer masa kroz naboj
$[M^+]$	molekulski ion
MDA	malondialdehid
MeOH	metanol
MEP	metileritritol-fosfat
MPO	mijeloperoksidaza
MS	spektrometar masa
MVA	mevalonska kiselina
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH-oksidaza	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaza
NMR	nuklearna magnetska rezonanca
ORAC	kapacitet za apsorpciju kisikovih radikala
PAL	fenilalanin-amonij liaza
PCA	analiza glavnih komponenti
PCs	glavne komponente
PG	propil-galat
PKR	poliketid reduktaza
PKS	poliketid sintaza
PTFE	politetrafluoretilen
QE	kvercetin ekvivalent
RE	rutin ekvivalent
ROS	reaktivni kisikovi spojevi
RNS	reaktivni dušikovi spojevi
RPM	obrtaji u minuti
Rt	retencijsko vrijeme
Ser	serin
SOD	superoksid-dismutaza
STS	stilben sintaza
TBHQ	tert-butilhidrokinon
TCD	detektor toplinske vodljivosti
TCh	tiokolin
TNB	2-nitro-5-merkaptobenzojeva kiselina
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazin
UV/VIS	ultra-ljubičasto/vidljivo

ŽIVOTOPIS

Mejra (rođ. Čustović) Bektašević je rođena 7. 1. 1975. godine u Bihaću, Republika Bosna i Hercegovina.

- 2013-2018. Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, poslijediplomski doktorski studij „Kemija mediteranskog okoliša“, grana medicinska kemija i biokemija
- 2007-2012. Sveučilište u Sarajevu, Prirodoslovno-matematički fakultet, poslijediplomski magistarski studij kemije, smjer analitička kemija
- 2001-2006. Sveučilište u Bihaću, Biotehnički fakultet, diplomski studij, smjer prehrambena tehnologija
- 1993-1995. Sveučilište u Sarajevu, Pedagoška akademija, Bihać, diplomski studij, smjer razredna nastava
- 1989-1993. Gimnazija Bihać, smjer prosvjetnokulturološko-prevodilački

Od 2007. asistent, a od 2012. viši asistent na kolegijima Biokemija, Kemija i biokemija hrane, Instrumentalne metode analize, Sveučilište u Bihaću, Biotehnički fakultet. Od 1996. do 2001. godine nastavnik razredne nastave. Voditelj jednog stručnog i učesnik pet znanstveno-istraživačkih projekata. Koautor sveučilišnog udžbenika „Eksperimentalna biokemija“ ISBN 978-9958-888-02-1 COBISS.BH-ID 18283782. Dobitnik Zlatne plaketa Sveučilišta u Bihaću 2007. i Zahvalnice najuspješnijem diplomantu Biotehničkog fakulteta 2008. godine. Dobitnik stipendije Fondacije Heinrich Böll 2003. i CEEPUS stipendije 2016. godine.

Radovi u časopisima zastupljenim u **CC** ili **JCR**:

M. Bektašević, I. Carev, M. Roje, M. Jurin, O. Politeo, Phytochemical Composition and Antioxidant Activities of the Essential Oil and Extracts of *Satureja subspicata* VIS. Growing in Bosnia and Herzegovina, *Chemistry and Biodiversity*, **2017**, *14*, e1700239.

I. Carev, A. Maravić, **M. Bektašević**, M. Ruščić, S. Siljak-Yakovlev, O. Politeo, Centaurea rupestris L.; cytogenetics, essential oil chemistry and biological activity, *Croatica chemica acta*, **2018**, *91*, 1-8.

E. Kahrović, **M. Bektašević**, E. Turkušić, Ruthenium(III) chloride complex with salicylaldehyde: synthesis, characterization and interaction with albumin and DNA, *Technics Technologies Education Management*, **2011**, *6*, 692-697.