

Artemisia absinthium L.: Kemijski sastav i biološka aktivnost

Šimić, Anja

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:167:258347>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

***Artemisia absinthium* L.: Kemijski sastav i biološka aktivnost**

DIPLOMSKI RAD

ANJA ŠIMIĆ

Matični broj: 125

Split, listopad 2021.

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE
SMJER: ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

***Artemisia absinthium* L.: Kemijski sastav i biološka aktivnost**

DIPLOMSKI RAD

ANJA ŠIMIĆ

Matični broj : 125

Split, listopad 2021.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY
COURSE: ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

***Artemisia absinthium* L.: Chemical composition and biological activity**

MASTER'S THESIS

ANJA ŠIMIĆ

Parent number: 125

Split, october 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Diplomski studij Kemija; Smjer: Organska kemija i biokemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada: je prihvaćena na 6. elektroničkoj sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu

Mentor: prof. dr. sc. Olivera Politeo

Artemisia absinthium L.: Kemijski sastav i biološka aktivnost

Anja Šimić, 125

Sažetak:

Cilj ovog rada bio je izolirati i odrediti kemijski sastav eteričnih ulja pelina (*Artemisia absinthium* L.) sakupljenih na različitim lokalitetima te u različitim sezonama, ispitati sposobnost inhibicije eteričnih ulja na djelovanje enzima acetilkolinesteraze, butirilkolinesteraze i α -glukozidaze te istražiti antioksidacijsku aktivnost. Predominantni spojevi eteričnog ulja pelina iz Sinja su *cis*-sabinil-acetat i *cis*-epoksi-ocimen, eteričnog ulja pelina iz Mostara su *cis*-epoksi-ocimen i *cis*-krizantemil-acetat, eteričnog ulja pelina iz Zaboka su *trans*-tujon i *cis*-epoksi-ocimen te ulja pelina iz Obrovca je *cis*-epoksi-ocimen. Kod svih analiziranih uzoraka ulja ove biljke sabrane na različitim lokacijama i u različitim sezonama branja kao dominantne komponente ulja javljaju se oksidirani monoterpenski spojevi-monoterpenoidi. Eterična ulja biljke *A. absinthium* L. pokazuju umjerenu ili slabu sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE, ne inhibiraju ili umjereno inhibiraju enzim α -glukozidazu, pokazuju slab redukcijski potencijal i ne pokazuju sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala.

Ključne riječi: *Artemisia absinthium* L., eterična ulja, AChE, BChE, α -glukozidaza, DPPH, FRAP.

Rad sadrži: 50 stranica, 38 slika, 9 tablica, 52 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Prof. dr. sc. Olivera Politeo – mentor
2. Doc. dr. sc. Mario Nikola Mužek – predsjednik
3. Doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun – član

Datum obrane: (19. listopada 2021.)

Rad je u tiskano i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko- tehnološkog fakulteta Split, Rudera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

MASTER'S THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Graduate study of Chemistry; Course: Organic chemistry and biochemistry

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject: was approved by Faculty Council of Faculty of Chemical and Technology in Split, electronic session no. 6.

Mentor: PhD Olivera Politeo, full professor

***Artemisia absinthium* L.: Chemical composition and biological activity**

Anja Šimić, 125

Abstract:

The aim of this study was to isolate and determine the chemical composition of essential oils of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) collected at different sites and in different seasons, to examine the ability to inhibit essential oils on the enzymes acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and α -glucosidase and to investigate antioxidant activity. The predominant compounds of wormwood essential oil from Sinj are *cis*-sabinyl-acetate and *cis*-epoxy-ocimen, wormwood essential oil from Mostar are *cis*-epoxy-ocimen and *cis*-chrysanthemum-acetate, wormwood essential oil from Zabok are *trans*-thujone and *cis*-epoxy-ocimen and oils wormwood from Obrovac is *cis*-epoxy-ocimen. In all analyzed oil samples of this plant collected at different locations and in different harvesting seasons, oxidized monoterpene compounds-monoterpenoids appear as the dominant oil components. The essential oils of *A. absinthium* L. show moderate or weak ability to inhibit the enzymes AChE and BChE, do not inhibit or moderately inhibit the enzyme α -glucosidase, show weak reduction potential and do not show the ability to capture free DPPH radicals.

Keywords: *Artemisia absinthium* L., essential oils, AChE, BChE, α -glucosidase, DPPH, FRAP.

Thesis contains: 50 pages, 38 figures, 9 tables, 52 references

Orginal in: Croatian

Defence committee:

1. PhD Olivera Politeo, full prof. – supervisor
2. PhD Mario Nikola Mužek, assistant prof. – chair person
3. PhD Lea Kukoč Modun, assistant prof. – member

Defence date: (October 19, 2021.)

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Olivera Politeo, u razdoblju od lipnja do rujna 2021. godine.

ZAHVALA

Zahvaljujem ponajprije svojoj mentorici, prof. dr. sc. Oliveri Politeo, na strpljenju, pomoći te usmjeravanju pri pisanju ovog rada.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Mirku Ruščiću (PMF, Split) na sakupljanju i identificiranju biljnog materijala te doc. dr. sc. Franku Burčulu i laborantu Vladimiru Jelaski Relji na pomoći u laboratoriju za biokemiju. Dio istraživanja proveden je na opremi financiranoj EU projektom "Functional integration of the University of Split, PMF-ST, PFST and KTFST through the development of the scientific and research infrastructure" (KK.01.1.1.02.0018).

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima, bratu i dečku na bezuvjetnoj podršci i razumijevanju tokom cijelog školovanja.

Ovaj diplomski rad posvećujem svojim bakama Ivi i Mariji te djedovima Dragi i Milanu koji više nisu s nama, ali sam sigurna da bi bili ponosni.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1. Izolacija eteričnog ulja *Artemisia absinthium* L. (gorskog pelina) vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru.
2. Određivanje kemijskog sastava eteričnih ulja vezanim sustavom GC-MS.
3. Ispitivanje sposobnosti inhibicije enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze eteričnim uljima, metodom po Ellmanu.
4. Odrediti inhibicijski učinak eteričnih ulja na enzim α -glukozidazu, metodom opisanom u radu Brueggemana i Hollingswortha (2001).
5. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti eteričnih ulja pomoću DPPH i FRAP metoda.

SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je izolirati i odrediti kemijski sastav eteričnih ulja pelina (*Artemisia absinthium* L.) sakupljenih na različitim lokalitetima te u različitim sezonama, ispitati sposobnost inhibicije eteričnih ulja na djelovanje enzima acetilkolinesteraze, butirilkolinesteraze i α -glukozidaze te istražiti antioksidacijsku aktivnost. Predominantni spojevi eteričnog ulja pelina iz Sinja su *cis*-sabinil-acetat i *cis*-epoksi-ocimen, eteričnog ulja pelina iz Mostara su *cis*-epoksi-ocimen i *cis*-krizantemil-acetat, eteričnog ulja pelina iz Zaboka su *trans*-tujon i *cis*-epoksi-ocimen te ulja pelina iz Obrovca je *cis*-epoksi-ocimen. Kod svih analiziranih uzoraka ulja ove biljke sabrane na različitim lokacijama i u različitim sezonama branja kao dominantne komponente ulja javljaju se oksidirani monoterpenski spojevi-monoterpenoidi. Eterična ulja biljke *A. absinthium* L. pokazuju umjerenu ili slabu sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE, ne inhibiraju ili umjereno inhibiraju enzim α -glukozidazu, pokazuju slab redukcijski potencijal i ne pokazuju sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala.

Ključne riječi: *Artemisia absinthium* L., eterična ulja, AChE, BChE, α -glukozidaza, DPPH, FRAP.

SUMMARY

The aim of this study was to isolate and determine the chemical composition of essential oils of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) collected at different sites and in different seasons, to examine the ability to inhibit essential oils on the enzymes acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and α -glucosidase and to investigate antioxidant activity. The predominant compounds of wormwood essential oil from Sinj are *cis*-sabinyl-acetate and *cis*-epoxy-ocimen, wormwood essential oil from Mostar are *cis*-epoxy-ocimen and *cis*-chrysanthemum-acetate, wormwood essential oil from Zabok are *trans*-thujone and *cis*-epoxy-ocimen and oils wormwood from Obrovac is *cis*-epoxy-ocimen. In all analyzed oil samples of this plant collected at different locations and in different harvesting seasons, oxidized monoterpene compounds-monoterpenoids appear as the dominant oil components. The essential oils of *A. absinthium* L. show moderate or weak ability to inhibit the enzymes AChE and BChE, do not inhibit or moderately inhibit the enzyme α -glucosidase, show weak reduction potential and do not show the ability to capture free DPPH radicals.

Keywords: *Artemisia absinthium* L., essential oils, AChE, BChE, α -glucosidase, DPPH, FRAP.

Sadržaj

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Pelin (<i>Artemisia absinthium</i> L.)	2
1.2. Eterična ulja.....	4
1.2.1. Kemijski sastav eteričnih ulja	5
1.2.2. Izolacija eteričnih ulja vodenom destilacijom.....	7
1.2.3. Analiza eteričnih ulja	8
1.3. Slobodni radikali	9
1.3.1. Antioksidansi	10
1.3.2. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti	11
1.4. Kolinesteraze.....	12
1.4.1. Uloga kolinesteraza	13
1.4.2. Inhibitori kolinesteraza.....	14
1.4.3. Alzheimerova bolest	14
1.5. α -glukozidaza	16
1.5.1. Mehanizam α -glukozidaza.....	17
1.5.2. Dijabetes.....	18
1.5.3. Inhibitori alfa-glukozidaze	19
1.6. Metode određivanja inhibicijske sposobnosti	19
1.6.1. Spektrofotometrija	19
1.6.2. Metoda po Ellmanu	21
1.6.3. Metoda testiranja aktivnosti inhibitora α -glukozidaza.....	22
2. EKSPERIMENTALNI DIO	23
2.1. Biljni materijal.....	23
2.2. Izolacija eteričnih ulja vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru	24
2.3. Kemijska analiza eteričnih ulja pomoću GC-MS.....	25
2.4. Određivanje sposobnosti inhibicije enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze..	26
2.5. Ispitivanje sposobnost inhibicije enzima α -glukozidaze	28
2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	29
2.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom.....	30
3. REZULTATI I RASPRAVA	32
3.1. Kemijski sastav eteričnih ulja	32
3.2. Inhibicija acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze.....	39
3.3. Inhibicija α -glukozidaze.....	41

3.4. Antioksidacijska aktivnost.....	43
4. ZAKLJUČAK.....	45
LITERATURA	47

UVOD

Enzimi acetilkolinesteraza (AChE; E.C. 3.1.1.7) i butirilkolinesteraza (BChE; E.C. 3.1.1.8) se ubrajaju u skupinu hidrolaza, a zbog svoje rasprostranjenosti u cjelokupnome životinjskom, ali i biljnom svijetu te svoje važne uloge u organizmu, oba se enzima od samog svog otkrića pa do danas intenzivno istražuju i unutar područja biokemije i unutar područja toksikologije. Iako strukturno homologni, ovi enzimi razlikuju se prema katalitičkoj aktivnosti, odnosno specifičnosti prema supstratima koje mogu hidrolizirati te selektivnosti za vezanje mnogih liganada. AChE i BChE važne su ciljane mete kod tretmana neurodegenerativnih bolesti.¹ Alzheimerova bolest je kronična neurodegenerativna bolest čija učestalost raste starenjem populacije te se najčešće pojavljuje sporadično, najčešće nakon 65. godine života, dok je u 5% slučajeva nasljedna. Zasada u kliničkoj upotrebi najbolja skupina lijekova su inhibitori kolinesteraza.²

Oksidacijski stres posljedica je prekomjerne produkcije reaktivnih spojeva kisika uslijed poremećaja u ravnoteži oksidacijsko-redukcijskih procesa u biološkim sustavima. Uzrok je i karakteristika brojnih bolesti i zdravstvenih poremećaja kao što su neurodegenerativne bolesti. Ljudski organizam posjeduje endogene antioksidacijske sustave koji ga štite od štetnog utjecaja slobodnih radikala.³ Antioksidansi su prirodne ili sintetske tvari koje uspješno blokiraju slobodne radikale u njihovom razornom pohodu na organizam.⁴

Šećerna bolest je metabolička bolest kronične naravi, karakterizirana perzistentnom hiperglikemijom te poremećajima u metabolizmu ugljikohidrata, masti i proteina. Zbog velikog rasta incidencije i prevalencije bolesti, riječ je o značajnom javno-zdravstvenom problemu te jednom od deset vodećih uzroka smrtnosti u svijetu, a veliku ulogu u liječenju imaju inhibitori probavnih enzima, kao α -glukozidaze.⁵ Danas se teži otkriću i proizvodnji prirodnih proizvoda izoliranih iz različitih biljaka radi dobivanja novih prirodnih biljnih antidijabetičkih lijekova koji bi koristili kao zamjena za sintetske oralne hipoglikemijske lijekove s manje ili čak bez izraženih nuspojava.⁶

Artemisia absinthium L. važna je višegodišnja grmolika biljka koja se naširoko koristi za liječenje nekoliko bolesti. Također se upotrebljava u obliku čajeva, tinktura i ekstrakata, a koristi se u industriji likera.⁷ Cilj ovog rada bio je izolirati i odrediti kemijski sastav eteričnih ulja pelina (*Artemisia absinthium* L.) sakupljenih na različitim lokalitetima te u različitim sezonama, ispitati sposobnost inhibicije eteričnih ulja na djelovanje enzima acetilkolinesteraze, butirilkolinesteraze i α -glukozidaze te istražiti antioksidacijsku aktivnost.

1. OPĆI DIO

1.1. Pelin (*Artemisia absinthium* L.)

Latinsko ime roda *Artemisia* dano je prema grčkoj božici Artemidi, zaštitnici žena, zbog ljekovitosti za ženske bolesti (grč. *artenes*= *zdrav, svjež*). U hrvatskom narodu poznat je pod nazivima: pelin, gorski pelin, pravi pelin, osenač, pelinček i vakčenac. Rod *Artemisia* su jednogodišnje ili višegodišnje biljke, polugrmovi ili grmovi, aromatičnog mirisa, pripadaju porodici Asteraceae. Cvjetovi su sitni, žućkasti, sastavljeni u glavice koje su metličasto raspoređene po biljci. Plod im je roška.⁷ U okviru roda nalazi se 480 vrsta, u Europi ih je 57 vrsta, a u Hrvatskoj živi 16 vrsta.⁸⁻¹¹ Pelin može imati gorak okus i karakterističan miris. Ljekovitost pelina poznata je još od starih Asiraca, Egipćana, Grka i Rimljana i koristio se kao sredstvo za izazivanje apetita i poboljšanje probave.¹²



Slika 1. Artemis, Paris, Louvre ¹³



Slika 2. *Artemisia absinthium* L. ¹⁴

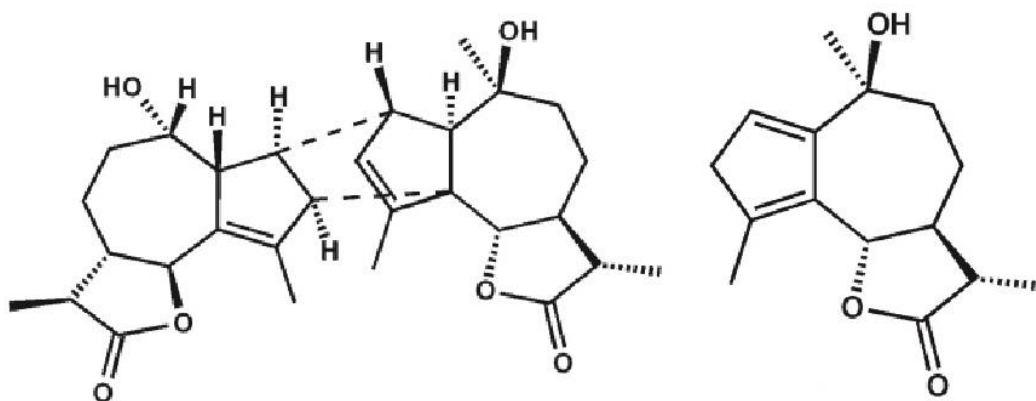


Slika 3. Gorski pelin (*Artemisia absinthium* L.)¹⁵

***Artemisia absinthium* L. pravi pelin**, trajnica, polugrm, prekriven bijelim pustenastim dlakama, naraste 60-120 cm u visinu. Stabljika je uspravna, pri dnu drvenasta, razgranata, obrasla nasuprotnim dvostruko perasto sastavljenim listovima, koji su dlakavi s obje strane, sjedeći ili su na kratkim peteljka. Na vrhu stabljike i ogranaka javlja se žućkasti glavičasti cvat širine 3-5 mm, složeni u obliku metlice. Biljka cvjeta od 7-9 mjeseca. Pravi pelin raste na sunčanim zapuštenim ruderalnim površinama ili na poljoprivrednim površinama, raširen je uzduž primorskog pojasa. Ljudi ga uzgajaju i u vrtovima oko kuća. Ljekovito djelovanje pravog pelina opisali su i antički pisci Hipokrat, Dioskorid i Plinije. Cvjetni pupoljci služe kao aromatičan začim, mogu se sušiti i samljeti u prah.¹²

Pravi pelin sadrži eterična ulja u kojima se nalazi kamazulen, tujon, tujol. Važne su gorke tvari kao što su seskviterpenski lakton absintin te njegov izomer anabsintin. U zeljastom dijelu nalaze se brojni flavonoidi, osobito glikozidi kemferola i kvercetina, smole, tanini i mnogo kalija.¹⁶

Upotrebljava se u obliku čajeva, tinktura i ekstrakata, a koristi se u humanoj i veterinarskoj medicini, te u industriji likera (pelinkovac, vermut). Za čajeve se koristi sam ili u kombinaciji s drugim biljkama. Koristi se za reguliranje probave, poticanje apetita, reguliranje rada bubrega i protiv groznice. U narodnoj medicini preporučuju ga za liječenje virusne i obične žutice, gihta, bijelog pranja kod žena, neuroze, nadima, iscrpljenosti, kožne i crijevne bolesti, uboda kukaca (pčela i stršljena) i dr. Pelin regulira rad nadbubrežne žlijezde čime potiče krvotok i bolji rad krvožilnog sustava.⁷



Slika 4. Struktura absintina i artabsina ¹⁷

1.2. Eterična ulja

Eterična ulja (engl. *essential oils*) su više ili manje složene smjese isparljivih spojeva koje se odlikuju intenzivnim karakterističnim mirisima. Većinom su bezbojna, žućkasta ili tamnosmeđa, ali određena ulja mogu imati karakteristične boje. Teško su topljiva u vodi, a kod sobne temperature u pravilu su tekuća i lakša od vode (uz iznimke). Dobivaju se fizikalnim postupcima izolacije: destilacijom iz aromatičnog bilja i tiještenjem iz agruma. Naziv eterična ulja se temelji na destilaciji kao postupku odvajanja eteričnog i esencijalnog (ulje) od čvrstog i neesencijalnog (biljni materijal). Eterična ulja su, sa stajališta biljne fiziologije, sekundarni metaboliti, a stvaraju se u biljnoj protoplazmi kao produkt disimilacijske izmjene tvari. Maseni udio ulja u aromatičnim biljkama iznosi najmanje 0,1%, najčešće između 1-2%, u iznimnim slučajevima može biti čak i iznad 20%. Eterična ulja su smještena u različitim biljnim organima: cvjetovima i usplođu, listovima i stabljici, plodovima, kori, podanku i sjemenju. Eterično ulje može biti pohranjeno u sljedećim biljnim tvorevinama (nikada u samoj protoplazmi već izvan stanice):

- u endogenim spremnicima koji mogu nastati
 - shizogeno (razmicanjem žljezdanih stanica čijim daljnjim proširivanjem nastaju kanali: uljni kanali - uljenice, smolni kanali - smolenice te gumeni i sluzni kanali), lizigeno (razgradnjom (otapanjem) staničnih membrana i protoplasta sekrecijskih stanica), shizolizigeno (kombinacijom shizogenog i lizigenog procesa tj. stvaranjem kanala i razgradnjom staničnih membrana),

- u egzogenim spremnicima između kutikule i staničnih membrana koje su raznovrsne tvorevine epiderme (npr. žlijezde ili žljezdane dlake) u nadzemnim organima biljke.

Promjene sastava i svojstava eteričnih ulja zbivaju se pod utjecajem raznih vanjskih i unutarnjih čimbenika: klimatski, edafski čimbenici, razvojni stadij biljke načini sušenja i skladištenja biljnih dijelova, metode izolacije eteričnog ulja. Eterična ulja različitih organa iste biljke često pokazuju različit kemijski sastav i maseni udio, a poznate su i njihove sezonske kvalitativne i kvantitativne promjene (u različitim godišnjim dobima).

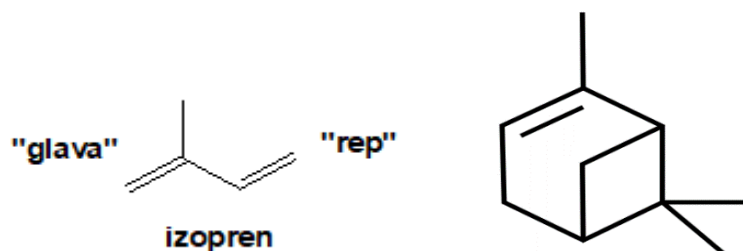
Fiziološka uloga eteričnih ulja u biljkama i dalje je nejasna. Pripisuje im se tzv. "ekološka uloga" u biljnim interakcijama (npr. inhibicija pupanja), kao i biljka-životinja interakcijama (npr. zaštita od predatora (insekata ili gljivica) i privlačenje oprašujućih vrsta). Također se smatra da eterično ulje smanjuje transpiraciju biljaka bogatih uljima, a koje se nalaze u tropskom ili sušnom području.¹⁸

1.2.1. Kemijski sastav eteričnih ulja

Komponente eteričnih ulja se mogu podijeliti prema građi ugljikovog kostura u tri glavne skupine:

- terpeni (izoprenoidi),
- fenilpropanski derivati,
- ostali spojevi.

Terpeni (engl. *terpenes*) su glavni sastojci tipičnih eteričnih ulja, a naziv potječe od terpentina koji se dobiva destilacijom smole bora (tzv. terpentinsko ulje). Wallach je 1881. god. utvrdio izopren (2-metilbuta-1,3-dien) kao strukturnu jedinicu zajedničku svim terpenima, a koji se kraće označava C₅-jedinicom. Predložio je građu pravilnih terpena (izoprensko pravilo) od izoprenskih jedinica povezanih "glava na rep" (engl. *head to tail*), odnosno razgranati završetak jedne C₅-jedinice (glava) povezan je na nerazgranati završetak druge C₅-jedinice (rep).



Slika 5. povezivanja C₅-jedinica "glava na rep"¹⁸ Slika 6. α – pinen (borova smola)¹⁸

Osim pravilnih terpena postoje i nepravilni terpeni koji su građeni od izoprenskih jedinica povezanih na drugi način, npr. "glava na glavu" ili "rep na rep". Terpeni se ponekad nazivaju i izoprenoidi, kako bi se naglasila međusobna izoprenska povezanost. Biljke ne sintetiziraju *in vivo* terpene iz izoprena, već iz njegovog biosintetskog ishodnog spoja izopentenil-pirofosfata u biosintetskom putu preko mevalonske kiseline ili deoksiksiluloza-5-fosfata.

Tablica 1. Podjela terpena prema broju izoprenskih jedinica¹⁸

Vrsta	Broj C-atoma	Broj izoprenskih jedinica
Semiterpeni	5	1
Monoterpeni	10	2
Seskviterpeni	15	3
Diterpeni	20	4
Triterpeni	30	6
Tetraterpeni	40	8
Politerpeni	5n	n

U ovisnosti o broju izoprenskih jedinica prirodni terpeni se mogu podijeliti kao u Tablici 1. Semiterpeni, monoterpeni i seskviterpeni su isparljivi ($t_v < 250\text{ °C}$) te ulaze u sastav eteričnih ulja. Eterično ulje se može sastojati od velikog broja terpeničkih spojeva (preko 100). Ipak, kod mnogih ulja jedan ili više terpena prevladava tako da su opći karakter ulja, mirisna svojstva i fizikalno-kemijske karakteristike uvjetovane glavnim komponentama.

Moguća je daljnja podjela terpena na cikličke i acikličke, a prema funkcijskim skupinama mogu biti terpenički ugljikovodici, alkoholi, fenoli, kiseline, esteri, aldehidi, ketoni i dr., uključujući i organske polifunkcijske spojeve.

Fenilpropanski derivati (engl. *phenylpropane derivatives*) su prirodni organski spojevi koji sadrže fenilni prsten s jednim bočnim propanskim lancem. Mogu biti aldehidi, fenoli, fenileteri koji se izode iz cimetine kiseline. Posebnu grupu fenilpropanskih komponenti čine spojevi sa skraćenim ili eliminiranim bočnim lancem. Tu spadaju fenilkarboksilne kiseline ili jednostavni fenoli kao i kumarini.

Pod ostalim spojevima koji ulaze u sastav eteričnih ulja najčešće se podrazumijevaju lančasti ugljikovodici (*n*-heptan) i njihovi derivati s kisikom, spojevi s dušikom i sumporom i

sl., a među gorušičinim uljima se nalaze izotiocijanati, nitrili, tiocijanati, epitionitrili i vinil-oksazolidintioni.¹⁸

1.2.2. Izolacija eteričnih ulja vodenom destilacijom

Glavna svojstva eteričnih ulja na kojima se temelji njihova izolacija su isparljivost i mala polarnost (slaba topljivost u vodi, a dobra u nepolarnim otapalima). Kod odabira metode izolacije, treba obratiti pozornost na mogućnost nastanka artefakata.

Destilacija (engl. *distillation*) je postupak kod kojeg se tekućina zagrijava i prevodi u paru, a nastala para odvodi i hlađenjem kondenzira (ukapljuje). Kondenzat (destilat) sakuplja se u drugoj posudi. Svrha destilacije je čišćenje tekućih tvari, razdvajanje smjese tekućina različitog vrelišta, otparavanje organskih otapala, identifikacija tekućih tvari (određivanje vrelišta).¹⁹ Ima niz prednosti u odnosu na ostale metode izolacije isparljivih spojeva, budući destilat ne sadrži neisparljive tvari koje mogu interferirati.

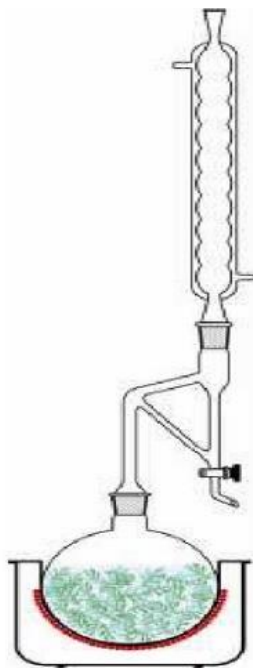
Destilacije se mogu podijeliti na:

- vodene destilacije (hidrodestilacije),
- vodeno-parne destilacije,
- destilacije vodenom parom.

Sve tri metode se zasnivaju na istim principima destilacije, a razlika je u primarnom kontaktu biljnog materijala i vode, odnosno vodene pare.

Hidrodestilacija (engl. *hydrodistillation*; HD) se najčešće koristi za izolaciju eteričnih ulja. Usitnjeni biljni materijal se postavlja u tikvicu s vodom koja se zagrijava do vrenja, najčešće na atmosferskom tlaku. Pare eteričnog ulja i vode se kondenziraju u hladilu i sakupljaju u središnjem dijelu aparature. Postoje različite izvedbe aparatura, a među ostalim se mogu razlikovati ovisno da li se koriste za izolaciju eteričnih ulja lakših ili težih od vode.

Standardne laboratorijske aparature za izolaciju eteričnih ulja vodenom destilacijom su: aparatura prema Ungeru, aparatura prema Europskoj farmakopeji (engl. *European pharmacopoeia*), aparatura prema Clevengeru i razne modifikacije navedenih aparatura.¹⁸



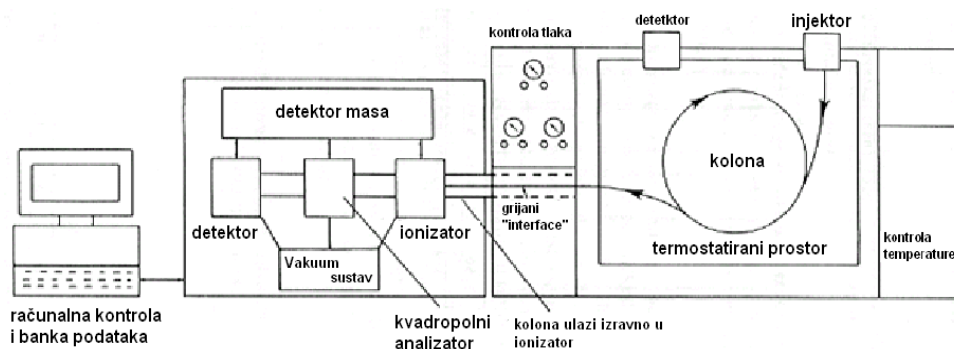
Slika 7. Aparatura prema Clevengeru ²⁰

1.2.3. Analiza eteričnih ulja

Organska analiza eteričnih ulja započinje određivanjem osnovnih fizikalnih i kemijskih vrijednosti ulja, što daje djelomičan uvid u osnovni sastav ulja. Na osnovu dobivenih podataka može se zaključiti da li u ulju ima alkohola, estera, karbonilnih spojeva, organskih kiselina i dr. Može se odrediti i topljivost ulja u raznim organskim otapalima. Daljnja analiza uključuje instrumentalne tehnike, od kojih svakako treba izdvojiti vezani sustav plinska kromatografija - spektrometrija mase, engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS. ¹⁸

1.2.3.1. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija mase (GC-MS)

Velike mogućnosti u plinsko-kromatografskoj analizi eteričnih ulja stvorene su povezivanjem plinskog kromatografa sa spektrometrom masa kao detektorom. ¹⁸ Plinska kromatografija je vrlo uspješna metoda za odijeljivanje, ali je nepouzdana za kvalitativno i kvantitativno određivanje, dok je spektrometrija masa pogodna za kvalitativnu i kvantitativnu analizu pa služi kao vrlo osjetljiv detektor za plinski kromatograf. Spregnutom tehnikom plinske kromatografije i spektrometrije se može postići osjetljivost u redu pikogramskih i femtogramskih količina tvari. Tako velika osjetljivost se danas ne može postići niti jednom poznatom tehnikom pa ova kombinacija zauzima posebno mjesto među analitičkim tehnikama koje se koriste za istraživanje hlapljivih spojeva. ¹⁹

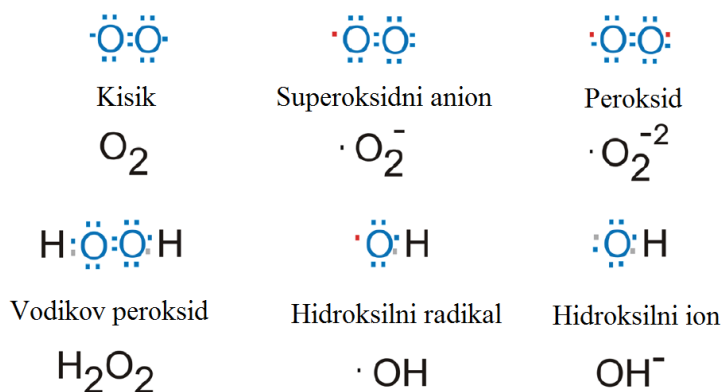


Slika 8. Shematski prikaz vezanog sustava GC-MS ¹⁸

1.3. Slobodni radikali

Slobodni se radikali u fiziološkim uvjetima neprekidno stvaraju u tijelu. Oni su uzrok oštećenja nukleinskih kiselina, proteina i lipida u staničnim membranama i lipoproteina plazme. Time pak uzrokuju karcinom, aterosklerozu i koronarne bolesti, te autoimune bolesti.

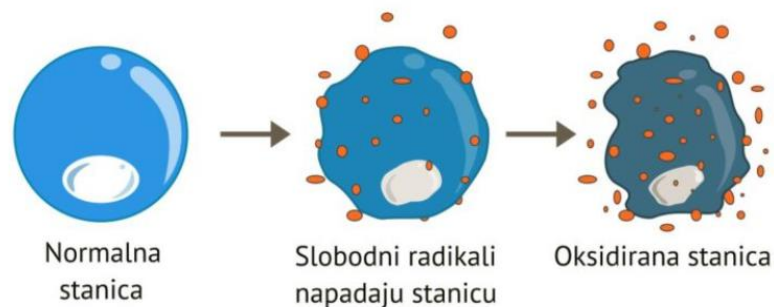
Slobodni su radikali iznimno reaktivne kemijske vrste s nesparenim elektronom i kratkotrajnim vremenom poluživota (reda 10^{-9} - 10^{-12} s) koje teže brzoj stabilizaciji pa trenutačno reagiraju s drugim atomima ili molekulama iz neposredne okoline. Jedini način na koji se slobodni radikal može neutralizirati i tako završiti spomenutu lančanu reakciju jest da dva radikala reagiraju međusobno, dajući neradikal. Takva reakcija se rijetko događa zbog vrlo kratkog vremena poluživota pojedinačnog radikala te vrlo niske koncentracije u tkivima, pa je tako veća vjerojatnost reakcije radikala sa susjednom molekulom i stvaranje novog radikala, nego reakcija radikala s drugim radikalom.²¹



Slika 9. Radikali kisika²²

U organizmu radikali kisika mogu potjecati iz različitih izvora kao što su: ionizirajuće zračenje, neenzimske reakcije iona prijelaznih metala, respiracijski prasak aktiviranih makrofaga, te fiziološke oksidacije reduciranih flavinskih koenzima.²¹

Oksidacijski stres posljedica je prekomjerne proizvodnje reaktivnih spojeva kisika (oksidansi, radikali) uslijed poremećaja u ravnoteži oksidacijsko-redukcijskih procesa u biološkim sustavima. Jednostavnije rečeno, oksidansi u biokemijskim sustavima imaju sposobnost predavanja elektrona, dok antioksidansi (reducenci) imaju sposobnost primanja elektrona. Uslijed prekomjernog stvaranja slobodnih radikala nastaje oksidacijski stres koji je uzrok i karakteristika brojnih bolesti i zdravstvenih poremećaja kao što su kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativne bolesti, karcinomi, dijabetes, autoimune bolesti. Posljedice oksidacijskog stresa posebno su izražene u starijoj životnoj dobi, za koju je i karakteristična povećana pojavnost većine od navedenih bolesti.³



Slika 10. Oksidacijsko oštećenje stanice²³

1.3.1. Antioksidansi

Antioksidansi su prirodne ili sintetske tvari koje uspješno blokiraju slobodne radikale u njihovom razornom pohodu na organizam. Oni se moraju stalno regenerirati u tijelu, kako bi se uspostavila ravnoteža između njih i slobodnih radikala u tijelu.⁴

Ljudski organizam posjeduje endogene antioksidacijske sustave koji ga štite od štetnog utjecaja slobodnih radikala. Pritom su posebno važni antioksidacijski sustavi poput enzima superoksid-dismutaze, glutation-peroksidaze, katalaze, te antioksidansi topljivi u mastima i vodi poput glutationa, vitamina E i C, karotenoida i vitamina A te koenzima Q10. Antioksidansi se mogu podijeliti u tri osnovne skupine. Jedna skupina antioksidansa onemogućuje samo nastajanje slobodnih radikala. To su primarni antioksidansi. Sekundarni antioksidansi su oni

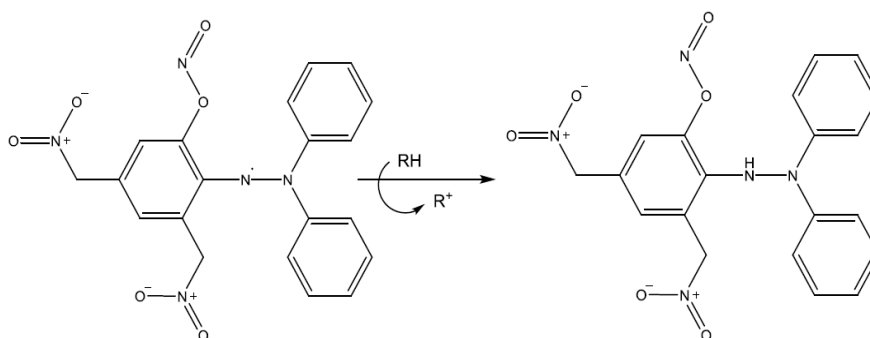
koji uništavaju već stvorene slobodne radikale, dok tercijarni ispravljaju već nastala oštećenja stanica. Bitno je naglasiti da određeni slobodni radikali, kao enzimi, nastaju u organizmu (endogeni), dok se druge unosi u organizam prehranom, odnosno dodacima u prehrani. Drugu skupinu čine pojedini vitamini i minerali.³

1.3.2. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti

1.3.2.1. Metoda određivanja sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala, DPPH metoda

Metoda DPPH (eng. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) je jedna od najpoznatijih i najčešće korištenih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti različitih biljnih ekstrakata, eteričnih ulja i njihovih sastojaka, a uveo ju je Blois (1958.)²⁴. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH[•]) je jedan od nekoliko stabilnih komercijalno dostupnih organskih dušikovih radikala koji sadrži jedan nespareni valentni elektron na jednom atomu dušikova mosta.^{25,26}

DPPH metoda se zasniva na „gašenju“ slobodnih DPPH radikala antioksidansom. Antioksidans donira atom vodika ili elektron radikal, pri čemu se isti reducira, a boja otopine slobodnih radikala prelazi iz izrazito ljubičaste u žutu. Promjena boje detektira se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 517 nm.²⁷



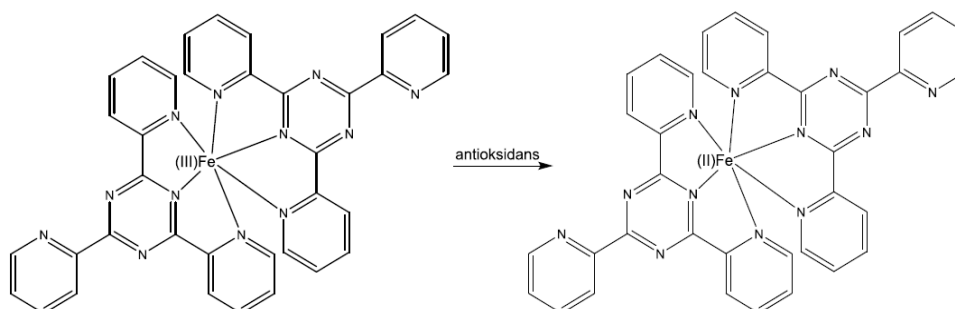
Slika 11. Mehanizam reakcije DPPH radikala s antioksidansom²⁶

Prednosti DPPH metode su jednostavnost izvedbe, dobra ponovljivost rezultata i mogućnost rada s malim količinama uzorka.²⁶

1.3.2.2. Metoda određivanja redukcijskog potencijala, FRAP metoda

FRAP metodom se testira ukupni redukcijski potencijal neke otopine.²⁷ Metodu su inicijalno razvili Benzie i Strain (1996.)²⁸, kako bi odredili redukcijsku sposobnost plazme, pa je i njen prvobitni naziv bio *Ferric Reducing Ability of Plasma*. Zbog daljnjeg razvoja i primjenu za određivanje antioksidacijske snage čajeva i vina naziv je korigiran u *Ferric Reducing/Antioxidant Power*.²⁵

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. Redukcijom žuto obojenog Fe(III)-TPTZ kompleksa u Fe(II)-TPTZ 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 $\lambda=593$ nm, sa onom za otopine fero iona poznate koncentracije, iz krivulje umjeravanja se očitava ukupna redukcijska sposobnost antioksidansa u reakcijskoj otopini.^{26,27}

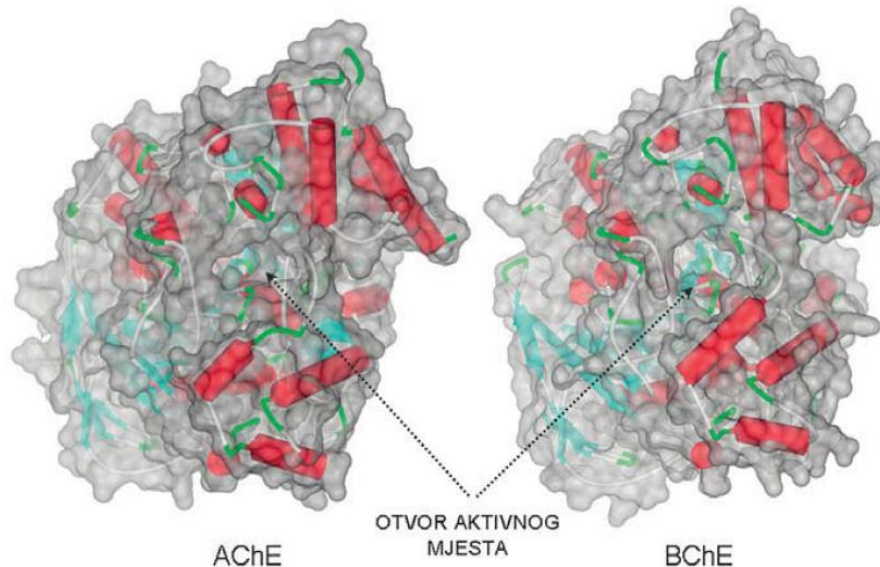


Slika 12. Mehanizam FRAP reakcije²⁵

1.4. Kolinesteraze

Kolinesteraze su enzimi koji se prema enzimskoj nomenklaturi ubrajaju u skupinu hidrolaza, podskupinu esteraza i potpodskupinu hidrolaza estera karboksilnih kiselina. Na sastanku Biokemijskog društva Velike Britanije održanom 1948. godine kolinesteraze su dobile imena koja su i danas u upotrebi: prava kolinesteraza nazvana je acetilkolinesterazom (AChE; E.C. 3.1.1.7), dok je pseudokolinesteraza nazvana butirilkolinesterazom (BChE; E.C. 3.1.1.8).

Strukturno su homologni, dijele 65% aminokiselinskog slijeda i strukturu aktivnog centra, ali nisu lokalizirani na istom kromosomu u ljudskom genomu; AChE je na kromosomu 7 (točnije 7q22), a BChE na kromosomu 3 (3q26). Razlikuju se po katalitičkoj aktivnosti, specifičnosti vezanja supstrata, ligandima i inhibitorima. Zbog svoje rasprostranjenosti u cjelokupnome životinjskom, ali i biljnom svijetu te svoje važne uloge u organizmu, oba se enzima od samog svog otkrića pa do danas intenzivno istražuju i unutar područja biokemije i unutar područja toksikologije.¹



Slika 13. Kristalna struktura ljudske acetilkolinesteraze (AChE) i ljudske butirilkolinesteraze (BChE). Crvenom bojom označene su α -uzvojnice, plavom β -nabrane ploče, zelenom bojom petlje, a sivom površina enzima dostupna vodi. Na slici je strelicom naznačen otvor aktivnog mjesta svake od kolinesteraza.¹

1.4.1. Uloga kolinesteraza

AChE je od iznimne važnosti za očuvanje homeostaze organizma budući da je njezin fiziološki supstrat, acetilkolin, jedan od prijenosnika živčanih impulsa. Kako se acetilkolin uklanja razgradnjom, a ne difuzijom iz sinaptičke pukotine, njegovom hidrolizom AChE kontrolira prijenos živčanih impulsa u kolinergičnoj sinapsi centralnog i perifernog živčanog sustava.

AChE se sintetizira u koštanoj srži, mozgu i mišićima, a osim u živčanim stanicama, mišićima i mozgu AChE se nalazi i u krvi gdje je vezana na eritrocite. Uloga AChE u

eritrocitima za sada nije poznata. BChE je u višoj koncentraciji prisutna u centralnom i perifernom živčanom sustavu, cerebrospinalnoj tekućini te crijevima, plućima, gušterači i jetri. Za BChE je poznato da sudjeluje u metabolizmu lipida i lipoproteina, u diferencijaciji i rastu živčanog tkiva.

AChE i BChE važne su ciljane mete kod tretmana neurodegenerativnih bolesti miastenije gravis, Alzheimerove i Parkinsonove bolesti. Nadalje, oba enzima osim ključne esterazne aktivnosti posjeduju i peptidaznu aktivnost koja se povezuje s razvojem i napredovanjem Alzheimerove bolesti te arilacilamidaznu aktivnost čija fiziološka uloga za sada nije razjašnjena.¹

1.4.2. Inhibitori kolinesteraza

Inhibitori se mogu podijeliti u dvije skupine: inhibitori koji se vežu na dnu ždrijela (reverzibilni) i inhibitori koji se vežu na periferno alosteričko mjesto (ireverzibilni). Reverzibilni inhibitori su uglavnom prirodnog podrijetla, izolirani iz biljaka poput alkaloida (huperzin A, solanidin, solanin) i flavonoida (galangin). Ireverzibilni inhibitori u aktivnom mjestu enzima formiraju Michaelisov tip kompleksa s katalitičkim serinom (kovalentna veza). Ovu skupinu spojeva čine karbamati i organofosforni spojevi.¹

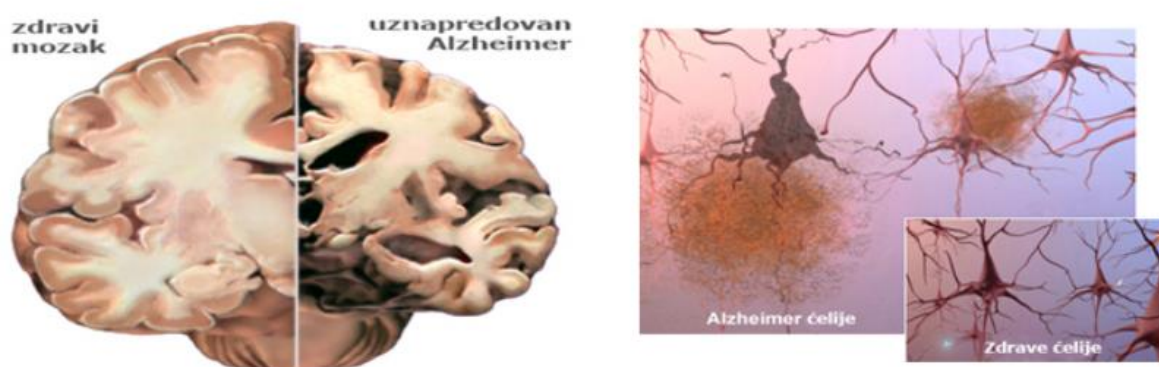
1.4.3. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (Alzheimerova demencija, DA) je kronična neurodegenerativna bolest čija učestalost raste starenjem populacije te se najčešće pojavljuje sporadično, najčešće nakon 65. godine života, dok je u 5% slučajeva nasljedna. Tri su uzročna gena povezana s nasljednim ili obiteljskim oblikom bolesti (APP, PSEN1, PSEN2), a jedan je rizični gen (ApoE4) razlog genske predispozicije za ovaj oblik bolesti koji se nasljeđuje autosomno dominantno. Bolest je prvi opisao liječnik Alois Alzheimer, njemački psihijatar i neurolog.



Slika 14. Alois Alzheimer²⁹

Trenutno najprihvaćenija teorija o patofiziologiji neurodegenerativnih promjena karakterističnih za Alzheimerovu demenciju govori o intracelularnom i ekstracelularnom nastajanju i nakupljanju proteinskih agregata: P-amiloidnih plakova izvan neurona - nakupine proteina AP-amiloida i neurofibrilarnih snopića unutar aksona – hiperfosforilirani Tau proteini. Te toksične proteinske nakupine ometaju prenošenje signala u sinapsama, toksično djeluju na živčane stanice i uzrokuju njihovo propadanje. To u konačnici vodi do propadanja mozga, što se očituje postepenim propadanjem kognitivnih funkcija do potpunog gubitka pamćenja i drugih kognitivnih sposobnosti, promjenama u ponašanju i teškoćama u izvršavanju svakodnevnih aktivnosti.²

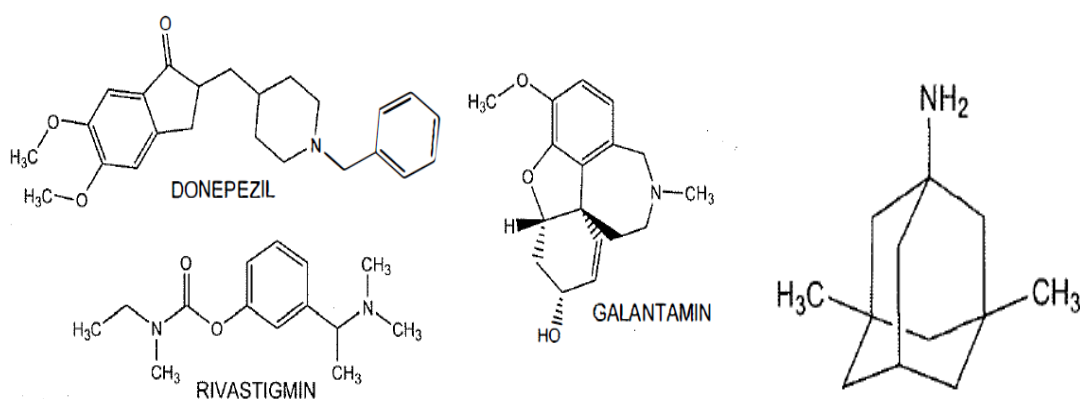


Slika 15. Usporedni prikaz mozga zdrave osobe i mozga osobe oboljele od Alzheimerove bolesti³⁰

Terapija Alzheimerove bolesti: sadašnjost

Terapija Alzheimerove bolesti nije zadovoljavajuća te trenutno ne postoji lijek koji može zaustaviti progresiju bolesti. U kliničkoj upotrebi su dvije skupine lijekova:

1. Inhibitori acetilkolinesteraze (donepezil, rivastigmin i galantamin)
2. Antagonisti NMDA receptora (memantin).



Slika 16. Inhibitori acetilkolinesteraze²

Slika 17. Memantin²

1.5. α -glukozidaza

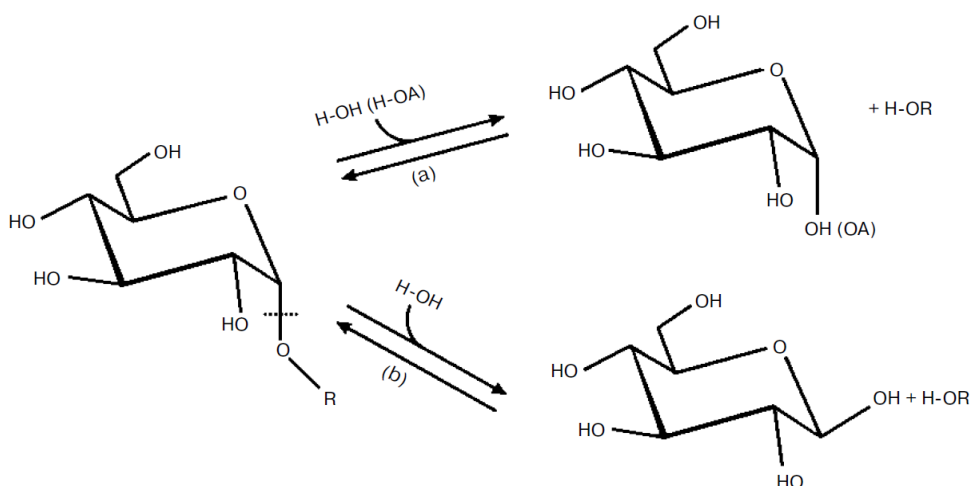
α -Glukozidaze (EC 3.2.1.20) su egzoenzimi koji hidroliziraju terminalne glikozidne veze i oslobađaju α -glukozu s nereducirajućeg kraja lanca supstrata. Ovi enzimi su široko rasprostranjeni u mikroorganizmima, biljnom i životinjskom tkivu. Mnoge α -glukozidaze mogu hidrolizirati ne samo oligosaharide i sintetske α -glikozide koji sadrže α -glikozidne veze, već i α -glukane, poput hidrosolubilnog škroba i glikogena. α -Glukozidaze se često nazivaju transglukozidazama jer neke α -glukozidaze mogu katalizirati i reakcije transglukozilacije.³¹

1.5.1. Mehanizam α -glukozidaza

α -Glukozidaze kataliziraju dvije vrste reakcija: prijenos glukoznog ostatka nereducirajućeg kraja oligosaharida na vodu (hidroliza) ili prijenos istog ostatka na akceptorsku molekulu (transglukozilacija). Ove reakcije se mogu smatrati nukleofilnom supstitucijom na asimetričnom C₁ atomu anomernog centra; mogu se odvijati ili zadržavanjem ili inverzijom anomerne konfiguracije produkta reakcije. Samo enzimi koji sudjeluju u reakcijama u kojima se zadržava konfiguracija mogu katalizirati reakcije transglukozilacije.

Nakon početnog vezivanja supstrata na aktivnom mjestu, nukleofilna skupina enzima (ionizirana karboksi skupina aspartata, glutamata ili histidin imidazola) napada asimetrični ugljikov atom C₁. To rezultira stvaranjem kovalentno vezanim glukozil-enzim intermedijerom s anomernom inverzijom na C₁ atomu. Ovu fazu karakterizira prijenos protona s donora na aktivnom mjestu (s karboksi grupe) na glikozidni kisik (hidroliza uz kiselinu).

U drugoj fazi, hidroksilna grupa (kod hidrolize) ili ostatak šećera (kod transglukozilacije) napada formiranu etersku vezu; ovo je popraćeno ponovnom inverzijom konfiguracije na C₁ pa produkt ima istu anomernu konfiguraciju kao i početni supstrat. U ovoj fazi važnu ulogu ima lužina, koja privlači proton s vode (ili šećernog ostatka tijekom transglukozilacije). Ovo povećava nukleofilna svojstva napadajućeg kisika (hidroliza uz lužinu). Karboksilat aspartata ili glutamata može imati ulogu takve baze. U ovoj fazi enzim se vraća se u početno protonirano stanje.³¹



Slika 18. Sheme reakcija hidrolize i transglukozilacije katalizirane α -glukozidazom (a) i glukoamilazom (b).³¹

1.5.2. Dijabetes

Šećerna bolest ili dijabetes (lat. *diabetes mellitus*) metabolička je bolest kronične naravi, karakterizirana perzistentnom hiperglikemijom te poremećajima u metabolizmu ugljikohidrata, masti i proteina. Osnovni tipovi šećerne bolesti su tip 1 (predstavlja 7-10% svih slučajeva dijabetesa) te tip 2, od kojeg boluje više od 85% pacijenata s dijabetesom. Osim toga, razlikuje se i gestacijski dijabetes koji se javlja u trudnoći te može, ali i ne mora, potrajati nakon poroda te ostale, manje zastupljene vrste dijabetesa. Zbog velikog rasta incidencije i prevalencije bolesti, riječ je o značajnom javno-zdravstvenom problemu te jednom od deset vodećih uzroka smrtnosti u svijetu.

Šećerna bolest tipa 1 (dijabetes ovisan o inzulinu ili juvenilni dijabetes) rezultat je stanično posredovanog autoimunog uništavanja β -stanica gušterače. Autoimuno uništavanje β -stanica ima višestruke genetske predispozicije, a povezano je i s čimbenicima okoliša koji su još uvijek slabo definirani. Šećerna bolest tipa 2 koji se ranije nazivao dijabetesom neovisnim o inzulinu ili adultnim dijabetesom, obuhvaća osobe koje imaju otpornost na inzulin i obično imaju relativni (a ne apsolutni) nedostatak inzulina.

U liječenju šećerne bolesti tipa 2 uglavnom se primjenjuju oralni hipoglikemici, dok se nadomjesna terapija inzulinom primjenjuje u dijabetesu tipa 1.

Terapija šećerne bolesti

U liječenju šećerne bolesti najviše se koriste

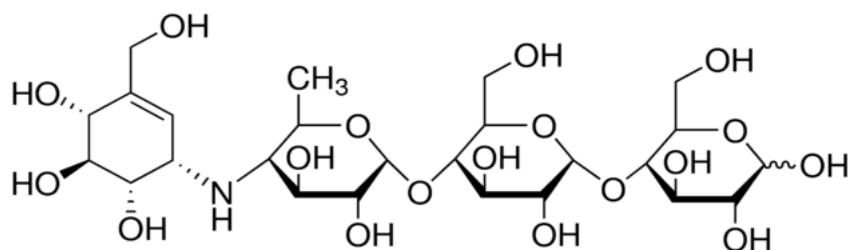
- beta-citotropni lijekovi,
- ne-beta-citotropni lijekovi te
- pripravci inzulina.

Beta-citotropni lijekovi stimuliraju beta-stanice gušterače na lučenje inzulina. Ne-beta-citotropni lijekovi su tiazolidindioni, bigvanidi, inhibitori alfa-glukozidaze, inhibitori suprijenosnika natrija-glukoze 2 (SGLT2; engl. *sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors*). U skupinu lijekova u kojoj stimuliranje beta-stanica gušterače može biti neovisno o glikemiji ubrajaju se derivati sulfonilureje i glinidi. Novija skupina antihiperglikemijskih terapeutika su i inhibitori dipeptidil-peptidaze IV odnosno molekule CD26 (DPP IV/CD26)^{47.5}

1.5.3. Inhibitori alfa-glukozidaze

Lijekovi ove skupine smanjuju apsorpciju glukoze iz tankoga crijeva tako da inhibicijom enzima alfa-glukozidaze usporavaju razgradnju složenih šećera i posljedično usporavaju apsorpciju monosaharida iz tankog crijeva.⁵ Predstavnici su akarboza, miglitol i voglibos.³²

Mnogo ekstrakata biljaka i spojeva izoliranih iz prirodnih izvora poput polifenola, alkaloida, triterpena, kinina, flavonoida, antocijanina i antrakinona je pokazalo *in vitro* inhibiciju α -glukozidazne aktivnosti.³³ S trendom porasta dijabetičke populacije u cijelom svijetu, istraživanje aktivnih spojeva s inhibitornim djelovanjem na α -glukozidazu iz ljekovitih biljaka postala je vrlo značajan zadatak. Nadalje, ti spojevi mogu se ocijeniti na potencijalnu farmakološku aktivnost u odnosu na druge metaboličke bolesti. Ukratko, treba uložiti napore u optimiziranje postupka provjere prirodnih proizvoda izoliranih iz različitih biljaka radi otkrivanja novih prirodnih biljnih antidijabetičkih lijekova. Ovi prirodni proizvodi mogu se koristiti kao zamjena za sintetičke oralne hipoglikemijske lijekove s manje ili čak bez izraženih nuspojava.⁶



Slika 19. Inhibitor alfa-glukozidaze: Akarboza³⁴

1.6. Metode određivanja inhibicijske sposobnosti

1.6.1. Spektrofotometrija

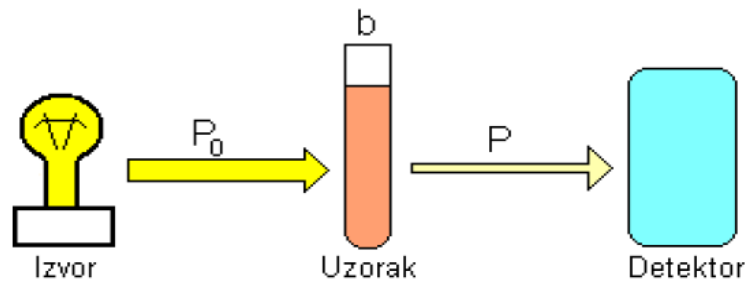
Spektrofotometrija je tehnika kojom se mjeri apsorpcija emitiranog elektromagnetskog zračenja do koje dolazi kada se određeni uzorak podvrgne samom zračenju.

Najvažniji pojmovi u spektrofotometriji su transmitacija i apsorbancija.

Transmitacija T otopine definira se kao dio upadnog zračenja koji je prošao kroz otopinu:

$$T = \frac{P}{P_0}$$

gdje je P_0 ulazna snaga snopa svjetlosti, a P snaga snopa svjetlosti nakon apsorpcije. Transmitacija se često izražava u postocima.



Slika 20. Prigušivanje snopa zračenja kao rezultat apsorpcije u otopini³⁵

Na slici 20 prikazan je snop paralelnog zračenja prije i nakon prolaza kroz sloj otopine debljine b (cm) i koncentracije c vrste koja apsorbira. Posljedica međudjelovanja fotona i čestica koje apsorbiraju jest smanjenje snage snopa s P_0 na P .

Apsorbancija A se definira jednadžbom:

$$A = -\log_{10} T = -\log \frac{P}{P_0} = \log \frac{P_0}{P}$$

Nasuprot transmitaciji, apsorbancija otopine se povećava s prigušenjem osnovnog snopa. Ova jednadžba zahtjeva logaritamsku apsorbancijsku ljestvicu.

Funkcijski odnos između veličine mjerene apsorpcijskom metodom i one koja se određuje (koncentracija c) poznat je kao Beerov zakon:

$$A = \log (P_0 / P) = a \cdot b \cdot c$$

gdje je a konstanta proporcionalnosti, *apsorptivnost (apsorpcijski koeficijent)*, b duljina puta zračenja kroz uzorak, a c je koncentracija apsorbirajuće vrste. Budući da je apsorbancija veličina bez dimenzija, jedinice za apsorpcijski koeficijent određuju se uz pretpostavku da je lijeva strana jednadžbe bezdimenzijska. Kada se koncentracija u prethodnoj jednadžbi izražava

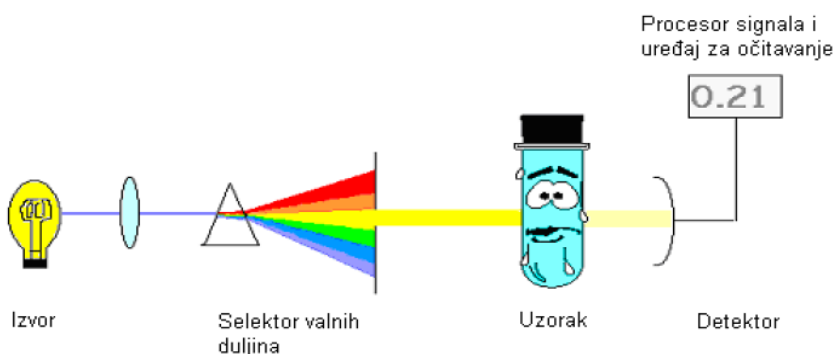
u molovima po litri, a b u centimetrima, konstanta proporcionalnosti naziva se molarnom apsorptivnošću (*molarnim apsorpcijskim koeficijentom*) s uobičajenim simbolom ϵ . Tada je

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

gdje se ϵ izražava u $L \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$.

Većina je spektroskopskih uređaja sastavljena je od pet osnovnih dijelova:

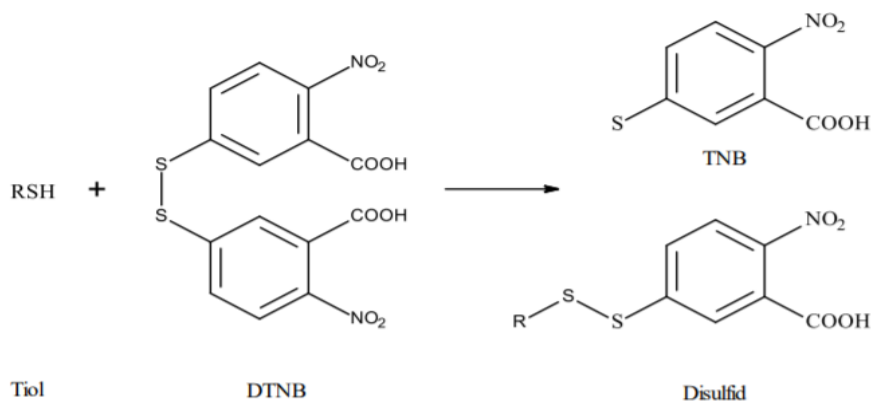
1. stabilnog izvora zračenja,
2. selektora valnih duljina koji omogućuje izdvajanje određenog valnog područja,
3. jednog ili više spremnika za uzorke,
4. detektora zračenja ili pretvornik energije zračenja u mjerljiv signal,
5. procesora signala i uređaj za njegovo očitavanje.³⁵



Slika 21. Dijelovi instrumenta za optičku spektroskopiju³⁵

1.6.2. Metoda po Ellmanu

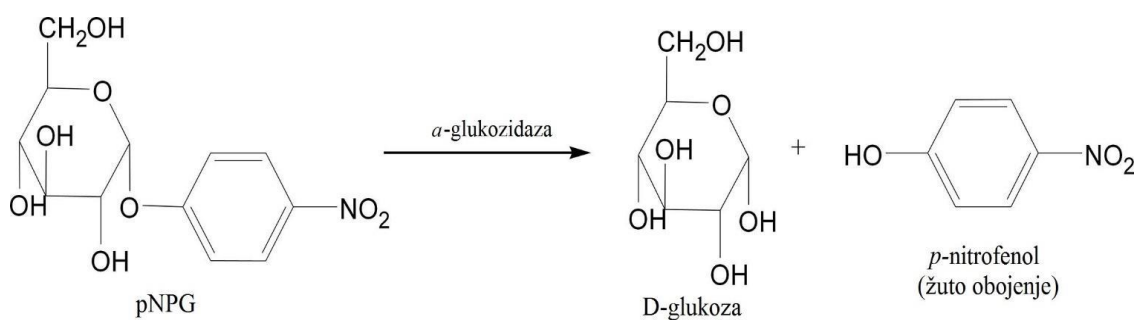
Sposobnost neke čiste tvari ili smjese da inhibira kolinesteraze, acetilkolinesterazu (AChE) i butirilkolinesterazu (BChE), najčešće se ispituje spektrofotometrijski, metodom po Ellmanu. Enzimsku aktivnost mjeri se prateći povećanje koncentracije žutog obojenja nastalog tiokolina koji stupa u reakciju s tionitrobenzoat ionom (DTNB). Ellmanov reagens 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina (DTNB) se koristi za određivanje broja ili koncentracije tiolnih skupina u uzorku. Tioli reagiraju s DTNB-om i nastaje 2-nitro-5 merkaptobenzojeva kiselina (TNB), koja zatim u vodi ionizira u TNB^- ion kod neutralnog ili alkalnog pH. Oslobođeni TNB^- ion je intenzivno žute boje. Količina oslobođenog TNB^- se mjeri pri $\lambda = 412 \text{ nm}$.³⁶



Slika 22. Mehanizam reakcije Ellmanovog reagensa (DTNB) s tiolnom skupinom (-SH).³⁷

1.6.3. Metoda testiranja aktivnosti inhibitora α -glukozidaza

Najčešće korištena metoda testiranja aktivnosti inhibitora je spektrofotometrijska metoda koja se temelji na mjerenju promjene apsorbancije otopine do koje dolazi uslijed reakcije enzima α -glukozidaze i supstrata *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranozida (*p*NPG). Produkti reakcije su D-glukoza i *p*-nitrofenol koji u lužnatom mediju prelazi u žuto obojenje s maksimumom apsorpcije kod valne duljine od 405 nm.³⁸



Slika 23. Mehanizam hidrolize *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranozida (pNPG) pomoću α -glukozidaze.³⁸

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal

U ovom radu korištena su 4 uzorka iste vrste gorskog pelina (*Artemisia absinthium* L.) prikupljena s različitih lokacija, Tablica 2:

Tablica 2. Prikaz istraženih vrsta pelina, lokaliteta, datuma i koordinata na kojima su sakupljeni

Vrsta pelina	Lokalitet	Datum	Koordinate
			Geogr.dužina (N) Geogr.širina (E)
<i>Artemisia absinthium</i> L.	Južnije od Mostara	16.8.2020.	43°19'36.17" 17°47'52.35"
	Poljakova greda, Gornje Glavice (Sinj)	8.10.2020.	43°43'27.29" 16°40'28.29"
	Zabok	15.9.2020.	46°1'45.83" 15°54'31.81"
	Kaštel Žegarski, Obrovac	16.4.2021.	44°9'17.55" 15°51'18.95"

Sušenje biljnog materijala je obavljeno na sobnoj temperaturi u laboratoriju Odjela za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu. Nakon sušenja uzorci su grubo usitnjeni i skladišteni u papirnate vrećice. Sakupljanje i identifikaciju biljaka izvršio je botaničar izv.prof.dr.sc. Mirko Ruščić, Prirodoslovno-matematički fakultet, Split.

2.2. Izolacija eteričnih ulja vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru

Vodena destilacija pelina provedena je u modificiranoj aparaturi po Clevengeru. Grubo usitnjeni materijal stavljen je u tikvicu s okruglim dnom i destiliranom vodom. Destilacija je trajala 3 sata. Hlapljive komponente eteričnog ulja isparavale su zajedno s vodenom parom do hladila gdje su se kondenzirale, a eterično ulje se hvatalo u tzv. "trap" ili klopku koja se sastoji od pentan i dietileter (1:1). Smjesa organskih otapala smanjuje mogućnost gubitka hlapljivih spojeva. Nakon završetka destilacije, trap sa eteričnim uljem pipetom je prenesen u suhu čistu bočicu. Zaostali tragovi vode u uzorku uklonjeni su dodatkom bezvodnog natrijevog sulfata. Dobiveno eterično ulje pelina pohranjeno je u hermetički zatvorene bočice i čuvano u zamrzivaču na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljnjih analiza.



Slika 24. Izolacija eteričnog ulja vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru



Slika 25. Eterično ulje uzorka pelina nakon destilacije

2.3. Kemijska analiza eteričnih ulja pomoću GC-MS

Analiza uzoraka provedena je pomoću plinskog kromatografa (model 8890; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) opremljenog s masenim spektrometrom (model 7000 D) i automatski uzorkivačem za tekuće uzorke (model 7693 A) na nepolarnoj koloni (HP-5MS, Agilent J&W GC) dužine 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 i debljine stacionarne faze 0,25 μ m. Temperatura kolone je programirana na način da je početna temperatura bila 60 °C tijekom 2 minute, a zatim povećana na 246 °C brzinom 3 °C/min i zadržana izotermalno 25 min. Nositelj plina bio je helij pri brzini protoka 1 ml/min; injekcijski blok je zagrijan na 250 °C; volumen analiziranog uzorka bio je 1 μ l, a omjer raspodjele 50:1. MS uvjeti bili su: ionizacijski potencijal 70 eV; temperatura ionskog izvora 230 °C; raspon masa za pretraživanje bio je 40- 450 masenih jedinica. Temperatura premosnice je bila 280 °C. Pojedinačni pikovi identificirani su usporedbom njihovih indeksa zadržavanja (u odnosu na standardnu seriju *n*-alkana C₉-C₂₀) s podacima iz literature (Adams 2017). Identifikacija je provedena i usporedbom njihovih masenih spektara s masenim spektrima iz biblioteka masenih spektara Wiley 9N08 (Wiley, New York) i NIST17 (Nacionalni institut za standarde i tehnologiju, Gaithersburg).



Slika 26. Vezani sustav GC-MS

2.4. Određivanje sposobnosti inhibicije enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze

Za testiranje sposobnosti inhibicije enzima AChE i BChE korištena je modificirana spektrofotometrijska metoda po Ellmanu koristeći DTNB kao tiolni reagens (Ellmanov reagens).³⁹

Kao izvor enzima korištena je AChE iz elektrofora električne jegulje (Tip V-S), a kao supstrat korišten je acetiltiokolin jodid, (ATChI). Za ispitivanje sposobnosti enzima BChE korišten je enzim izoliran iz seruma konja, a kao supstrat butiriltiokolin jodid (BTChI).

Tablica 3. Priprema potrebnih reagensa kod određivanja sposobnosti inhibicije AChE i BChE:

Otopina	AChE	BChE	Konačna koncentracija
DTNB	13,079 mg u 5 mL pufera (pH=7)	11,89 mg u 5 mL pufera (pH=7)	0,3 mM
ATChI / BTChI	15,9 mg u 5 mL pufera (pH= 8)	17,45 mg u 5 mL pufera (pH=8)	0,5 mM
AChE / BChE	6,6 µL u 5 mL pufera (pH=8)	14 µL u 5 mL pufera (pH=8)	0,03 U/mL

Tablica 4. Protokol kod testiranja sposobnosti inhibicije AChE / BChE, metodom po Ellmanu dodavanja u jažice za ispitivanje inhibicije acetilkolinesteraze

	Kontrola	Kontrola EtOH	BL1	BL2	Uzorak M	Uzorak BL
Pufer (μL)	190	180	200	190	180	190
DTNB (μL)	10	10	10	10	10	10
Uzorak (μL)	/	/	/	/	10	10
EtOH (μL)	/	10	/	/	/	/
AChE / BChE(μL)	10	10	/	10	10	/
ATChI / BTChI (μL)	10	10	10	10	10	10

Sposobnost inhibicije enzima AChE / BChE računa se prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije } = [(A_K - A_A / A_K)] \times 100$$

A_K -apsorbancija test otopine,

A_A - apsorbcija kontrolnog uzorka.



Slika 27. Multikanalna pločica s uzorcima za testiranje sposobnosti inhibicije AChE i BChE te višekanalni čitač mikrotitarskih pločica "Sunrise" (Tecan GmbH, Austria).

2.5. Ispitivanje sposobnost inhibicije enzima α -glukozidaze

Za ispitivanje sposobnosti inhibicije enzima α -glukozidaze korištena je metoda opisana u radu Brueggemana i Hollingswortha (2001).^{40,41}

Priprema reagensa:

1. Fosfatni pufer; pH=7,0 (0,1 i 0,01M)
2. Enzim α -glukozidaza; 0,1 U/mL – pripremljena je otopina koncentracije 1 mg/mL u fosfatnom puferu (0,1 M), te razrijeđena u istom puferu na 0,1 U /mL (uz dodatak BSA koncentracije 1mg/mL)
3. 4-nitrofenil- α -D-glukopiranozid (pNPG); 0,5 mM- otopljeno je 7,5 mg u 5 mL 0,1 M fosfatnog pufera
4. Natrijev karbonat; 0,2 M- otopljeno je 2,12 g bezvodnog natrijevog karbonata u 100 mL destilirane vode
5. 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glukoza; 0,5 mg/mL- otopljeno je 0,5 mg krutine u 1 mL 0,1 M fosfatnog pufera
6. Etanol 85%

Postupak:

Reakcijska smjesa se sastoji od 50 μ L fosfatnog pufera (0,1 M), 25 μ L 0,5 mM pNPG, 25 μ L otopina α -glukozidaze (0,1 U/mL) i 10 μ L uzorka. Reakcijska smjesa je inkubirana 30 min na 37 °C. Enzimska reakcija je zaustavljena dodavanjem 100 μ L 0,2 M Na₂CO₃. Promjena apsorbancije praćena je pri valnoj duljini od 412 nm na višekanalnom čitaču mikrotitarskih pločica.

Tablica 5. Protokol testiranja sposobnosti inhibicije enzima α -glukozidaze

	Kontrola	BL	Uzorak	Uzorak BL
Pufer (μL)	50	75	50	75
Uzorak (μL)	/	/	10	25
EtOH (μL)	10	10	/	/
α -glikozidaza (μL)	25	/	25	/
<i>p</i> NPG (μL)	25	25	25	10
Na_2CO_3 (μL)	100	100	100	100

Kontrola = umjesto uzorka dodan je EtOH u istom volumenu; BL= slijepa proba s obzirom na kontrolu; uzorak BL= slijepa proba s obzirom na uzorak

2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Za određivanje antioksidacijskog potencijala uzoraka ulja korištena je DPPH metoda.^{25,26}

Priprema reagensa :

- 0,004 g DPPH radikala otopi se u 96%- tnom etanolu u odmjernoj tikvici od 100 mL

Postupak :

U jažice mikrotitarske pločice otpipetira se 200 μL pripremljenog DPPH reagensa i 10 μL uzorka te se nakon 60 minuta izmjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 517 nm. Za slijepu probu izmjeri se apsorbancija same otopine DPPH.

Postotak inhibicije DPPH radikala računa se prema formuli :

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

- A_0 – početna apsorbancija otopine DPPH radikala ($t = 0$ minuta)
- A_{uz} – apsorbancija reakcijske smjese nakon $t = 60$ minuta

2.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

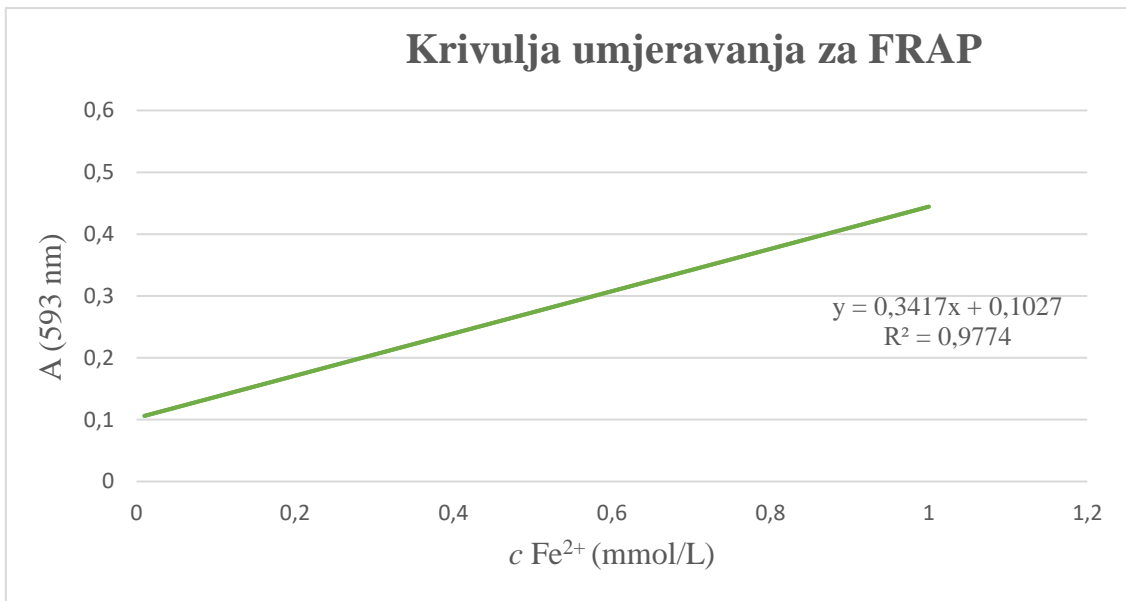
Za određivanje redukcijske sposobnosti uzoraka otopina eteričnih ulja korištena je metoda opisana od Benzie i Strain (1996).²⁸

Priprema reagensa :

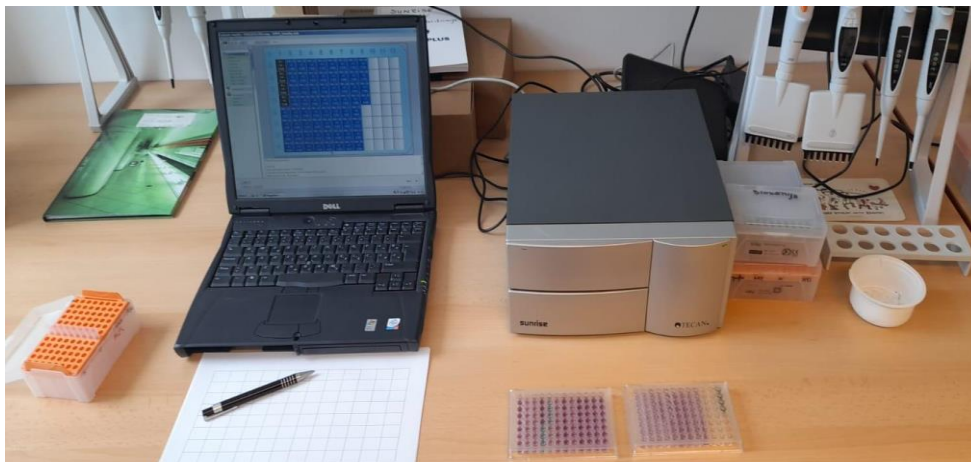
1. Acetatni pufer; 0,3M, pH=3,6 - pomiješano je 3,1 g natrij -acetata trihidrata ($C_2H_3NaO_2 \times 3H_2O$) i 16 mL glacijalne octene kiseline ($C_2H_4O_2$) te nadopunjeno destiliranom vodom do volumena od 1L
2. Otopina TPTZ - pripremljena je 10 mM otopina 2,4,6,tripiridil-s-triazina u 40 mM HCl-u: otopljeno je 0,031 g TPTZ-a u 10 mL 40 mM otopine HCl-a
3. Otopina ($FeCl_3 \times 6H_2O$) - otopljeno je 0,054 g željezovog(III) klorida u destiliranoj vodi i nadopunjeno do 10 mL
4. FRAP reagens - pomiješano je 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL otopine TPTZ-a i 2,5 mL otopine željezovog(III) klorida heksahidrata
5. Standard - otopina je pripremljena otapanjem 0,0056 g ($FeCl_3 \times 6H_2O$) u 10 mL destilirane vode

Postupak :

Kao standard korištena je otopina željezovog(II) sulfata heptahidrata u koncentracijama 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,75 i 1 mM. U jažice je otpipetirano 50 μ L destilirane vode, 5 μ L uzorka i 150 μ L svježe pripravljenog FRAP reagensa. Praćena je promjena apsorbancije nakon 8 minuta pri valnoj duljini od 593 nm. Rezultati su iskazani u ekvivalentima signala kojeg daje Fe^{2+} (mmol/L).



Slika 28. Krivulja umjeravanja odnosa otopine poznate koncentracije Fe^{2+} i apsorbancije



Slika 29. Mikrotitarska pločica s uzorcima za testiranje FRAP metodom

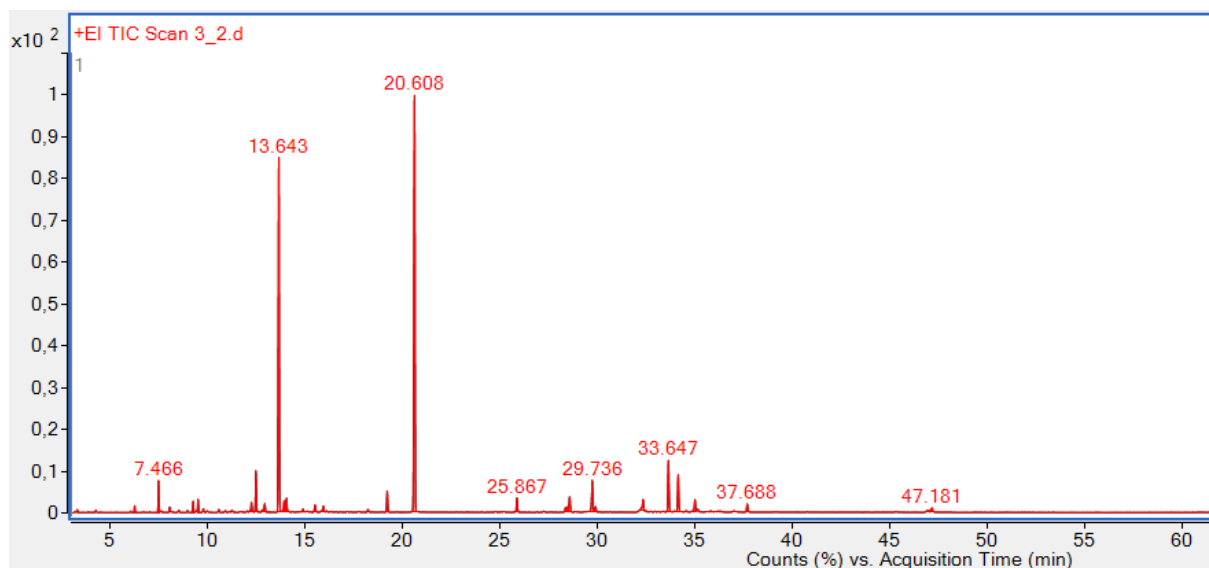
3. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je izolirati i odrediti kemijski sastav eteričnih ulja pelina (*Artemisia absinthium* L.) sakupljenih na različitim lokalitetima te u različitim sezonama, ispitati sposobnost inhibicije eteričnih ulja na djelovanje enzima acetilkolinesteraze, butirilkolinesteraze i α -glukozidaze te istražiti antioksidacijsku aktivnost.

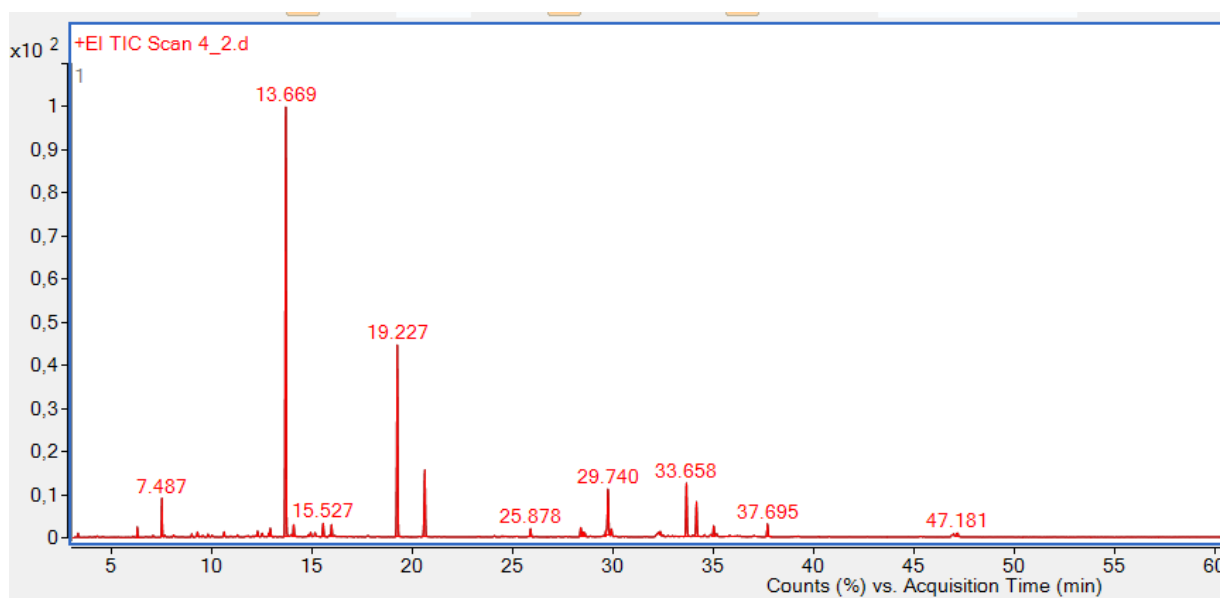
3.1. Kemijski sastav eteričnih ulja

Izolacija eteričnih ulja iz nadzemnog suhog biljnog materijala pelina, sakupljenog s različitih lokacija (Sinj, Mostar-BiH, Zabok i Obrovac) te u različitim fazama razvoja biljke (2 uzorka u vrijeme pune cvatnje-Mostar i Zabok; jedan uzorak neposredno nakon pune cvatnje-Sinj; jedan uzorak u vegetativnoj fazi-Obrovac) provedena je metodom hidrodestilacije u modificiranoj aparaturi po Clevengeru te su ista analizirana vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) na nepolarnoj koloni HP-5MS.

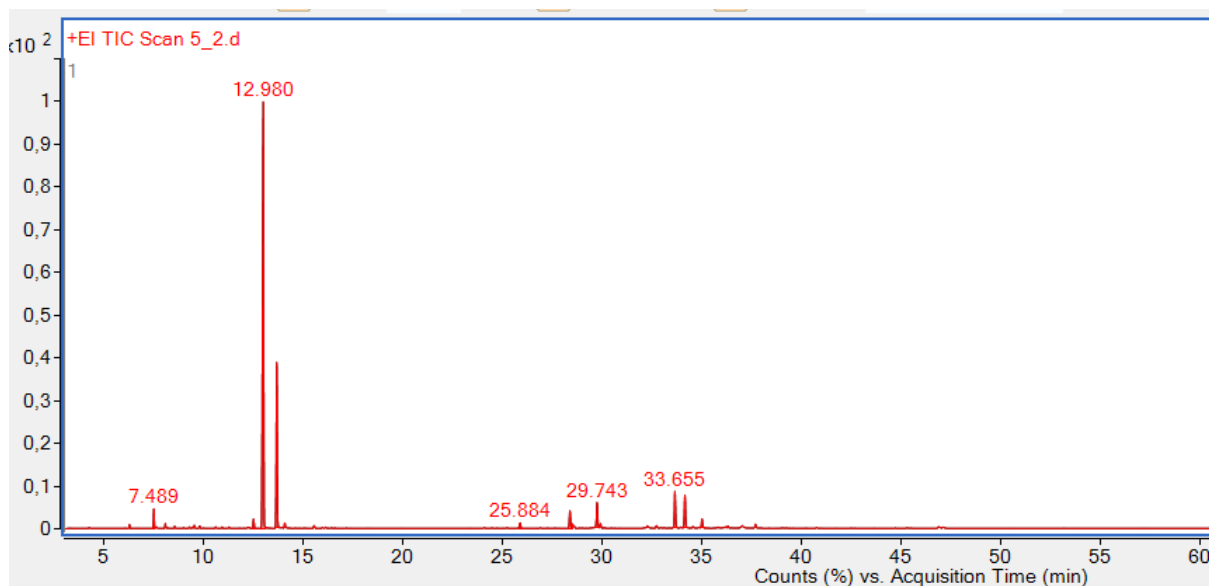
Spojevi su u tablici 6. grupirani prema klasi kojoj pripadaju te poredani prema rastućem Kovačevom indeksu (KI) dok su kromatogrami prikazani slikama 30, 31, 32 i 33.



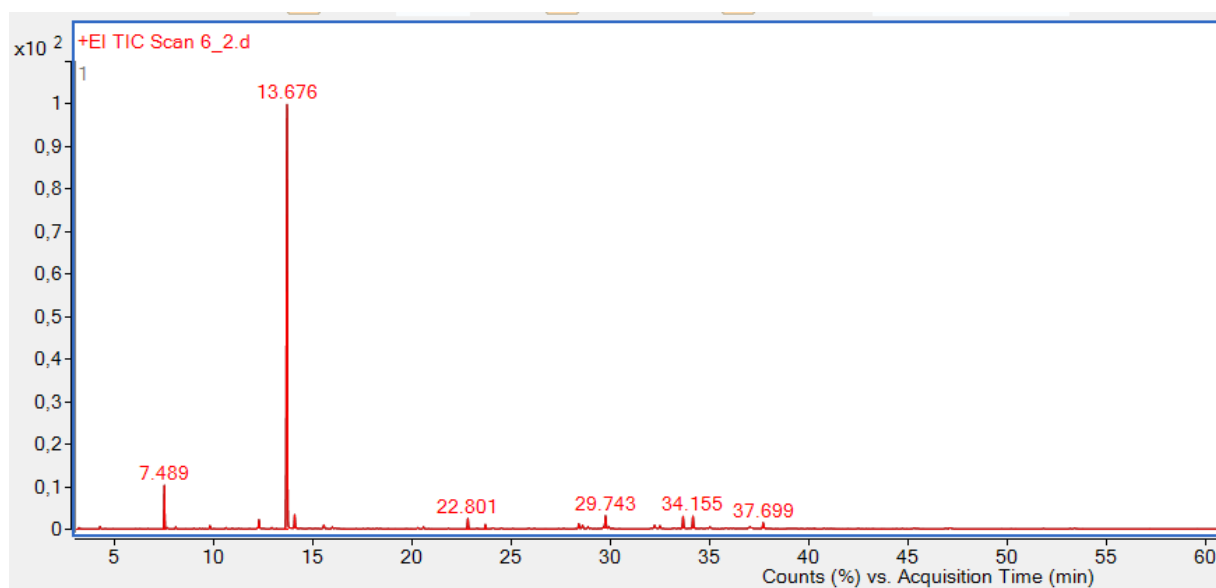
Slika 30. Kromatogram ukupne ionske struje za eterično ulje *A. absinthium*, Sinj



Slika 31. Kromatogram ukupne ionske struje za eterično ulje *A. absinthium*, Mostar



Slika 32. Kromatogram ukupne ionske struje za eterično ulje *A. absinthium*, Zabok



Slika 33. Kromatogram ukupne ionske struje za eterično ulje *A. absinthium*, Obrovac

Tablica 6. Kemijski sastav i sadržaj pojedinih sastojaka eteričnih ulja biljke *A. absinthium* L. s različitim lokacija

<i>A. Absinthium</i>		3_Sinj	4_Mostar	5_Zabok	6_Obrovac
datum branja		08.10.2020.	16.8.2020.	15.9.2020.	18.4.2021.
boja ulja		crveno-smeđe	crveno-smeđe	crveno-smeđe	crveno-smeđe
% ulja (w/w)		0,49	3,1	1,29	0,94
Klase spojeva	Naziv spoja	KI	%	%	%
	α -pinen	937	0,4	0,71	-
	β -tujen	976	1,94	-	-
	sabinen	977	-	2,75	1,76
	<i>p</i> -cimen	1027	0,83	0,48	-
	γ -terpinene	1062	-	0,47	-
Monoterpeni			3,17	4,41	1,76
	1,8-cineol	1034	0,97	-	-
	linalol	1102	0,78	0,43	-
	<i>cis</i> -tujon	1107	3,14	-	1,09
	<i>trans</i> -tujon	1118	0,92	0,87	60,1
	<i>cis</i> -epoksi-ocimen	1136	28,77	41,92	19,09
	<i>cis</i> -sabinol	1142	0,81	-	-
	<i>trans</i> -epoksi-ocimen	1145	1,14	1,18	-
	terpinen-4-ol	1178	0,77	1,5	-
	<i>trans-p</i> -menth-1(7),8-dien-2-ol	1188	0,49	1,13	-
	<i>cis</i> -krizantemil-acetat	1261	1,78	18,98	-
	<i>cis</i> -sabinil-acetat	1294	38,52	7,25	-
	neril-acetat	1368	-	-	-
	geranil-izobutirat	1512	-	0,49	-
Monoterpenoidi			78,9	73,75	80,28
	kariofilen	1419	1,32	0,91	0,79
	γ -himahalen	1480	0,44	-	-
	germakren D	1481	-	1,1	2,45
	α -kurkumen	1484	0,53	0,56	0,63
	β -selinen	1486	1,5	0,44	-
	δ -kadinen	1519	0,44	0,57	-
	kamazulen*	1728	0,8	1,51	-
Seskviterpeni			5,03	5,09	3,87
	kariofilen oksid	1582	1,34	0,46	-
Seskviterpenoidi			1,34	0,46	-
	(E)-2-etil-4-metil-1,3-pentadienil benzen ^{&} -1H-Indene, 3-etil-1-(1-metiletil)-	1515	2,91	5,56	3,7
	(Z)-2-etil-4-metil-1,3-pentadienil benzen ^{&}	1616	4,51	5,46	4,51
		1630	3,28	3,47	4,52
Ostali spojevi			10,7	14,49	12,73
UKUPNO			99,14	98,2	98,64

[&]točan izomer nije identificiran; *nastao iz seskviterpena matricina tijekom izolacije ulja

Prinos izoliranih ulja najveći je kod uzoraka sakupljenih u vrijeme pune cvatnje (Mostar: 3,1% i Zabok: 1,29%); manji je kod onog sakupljenog u vegetativnoj fazi (0,94%) te najmanji kod onih sakupljenih nakon pune cvatnje (0,49%). Sva izolirana ulja karakteristično su crveno-smeđe obojana.

Ukupno je identificirano 29 komponenti. U eteričnom ulju pelina ubranog u Sinju identificirane su 24 komponente (99,14% od ukupno ulja), u eteričnom ulju pelina ubranog u Mostaru identificirane su 23 komponente (98,2% od ukupnog ulja), u eteričnim uljima pelina sabranih u Zaboku ili Obrovcu identificirano je 10 komponenti (98,64% i 98,14% od ukupnog ulja).

Predominantni spojevi eteričnog ulja pelina iz Sinja su oksidirani monoterpeni spojevi (monoterpenoidi) *cis*-sabinil-acetat (38,52%) i *cis*-epoksi-ocimen (28,77%). Ova klasa spojeva je u ovom ulju zastupljena s visokim udjelom od 78,9% (*w/w*). Sve ostale komponente ovog ulja dolaze u udjelu manjem od 5%. To su komponente ulja koje pripadaju monoterpenima (3,17%), seskviterpenima (5,03%), seskviterpenoidima (1,34%) te ostalim komponentama ulja (10,7%).

Predominantni spojevi eteričnog ulja pelina iz Mostara su monoterpenoidi *cis*-epoksi-ocimen (41,92%) i *cis*-krizantemil-acetat (18,98%). Ova klasa spojeva je u ovom ulju zastupljena s visokim udjelom od 73,75% (*w/w*). Sve ostale komponente ovog ulja dolaze u udjelu manjem od 5,50%. To su komponente ulja koje pripadaju monoterpenima (4,41%), seskviterpenima (5,09%), seskviterpenoidima (0,46%) te ostalim komponentama ulja (14,49%).

Predominantni spojevi eteričnog ulja pelina iz Zaboka su monoterpenoidi *trans*-tujon (60,10%) i *cis*-epoksi-ocimen (19,09%). Ova klasa spojeva je u ovom ulju zastupljena s visokim udjelom od 80,28% (*w/w*). Sve ostale komponente ovog ulja dolaze u udjelu manjem od 5%. To su komponente ulja koje pripadaju monoterpenima (1,76%), seskviterpenima (3,87%) te ostalim komponentama ulja (12,73%).

Predominantna komponenta eteričnog ulja pelina iz Obrovca je monoterpenoid *cis*-epoksi-ocimen (78,17%). Ova klasa spojeva je u ovom ulju zastupljena s visokim udjelom od 82,78 % (*w/w*). Sve ostale komponente ovog ulja dolaze u udjelu manjem od 5,6%. To su komponente ulja koje pripadaju monoterpenima (5,58%), seskviterpenima (2,2%) te ostalim komponentama ulja (7,58%).

Kod svih analiziranih uzoraka ulja ove biljke sabrane na različitim lokacijama i u različitim sezonama branja kao dominantne komponente ulja javljaju se oksidirani monoterpenski spojevi-monoterpenoidi (73,75 do 82,78%). Kod svih se uzoraka kao dominantne komponente javljaju *trans*-tujon i *cis*-epoksi-ocimen. Koncentracija *cis*-epoksi-ocimena je dominantna u svim uzorcima ulja osim u onom iz sjevernijih područja (Zabok), kod kojeg nad *cis*-epoksi-ocimenom dominira *trans*-tujon. Koncentracija *cis*-epoksi-ocimena je najveća u uzorku ulja iz biljnog materijala sakupljenog u vegetativnoj fazi razvoja biljke (78,17%).

U uzorcima ulja dobivenim iz biljaka sakupljenih u južnijim, toplijim područjima u visokim udjelima dolaze i *cis*-krizantemil-acetat (1,78 i 38,52%) te *cis*-sabinil-acetat (18,98 i 7,25%). Prvog je više u vrijeme pune cvatnje, drugog u vrijeme nakon pune cvatnje biljke.

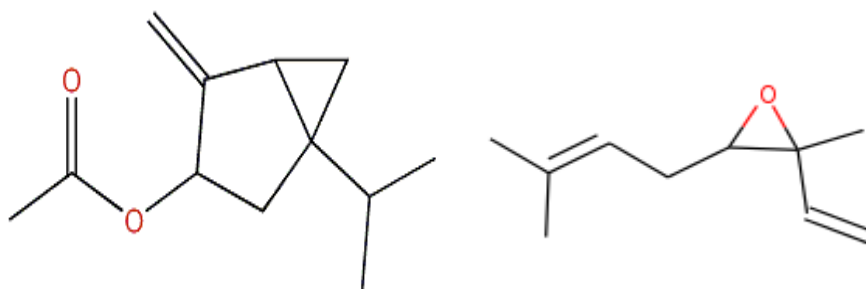
U svijetu je načinjen veći broj analiza kemijskog sastava eteričnog ulja ove biljne vrste. Eterično ulje ove biljne vrste sabrane u Hrvatskoj (u vrijeme nakon pune cvatnje, kad cvijet postupno prelazi u plod) prethodno je analizirano od strane Juteau i suradnika.⁴² Analizom tog ulja kao glavne komponente identificirani su β -tujon (27,8%), sabinil-acetat (13,5%), (*Z*)-6,7-epoksi-ocimen (9,0%), linalol (5,2%) i kalaren (5,2%). Sve ostale komponente tog ulja dolaze s udjelom manjim od 3,5 %.

Analizama eteričnog ulja ove biljke sakupljene u okružju naše države uglavnom su se bavili istraživači iz Srbije. Analiza eteričnog ulja ove biljke sabrane na južnom dijelu susjedne Srbije (nadzemni i prethodno osušeni) pokazala je da su glavne komponente β -tujon (19,8%), *cis*- β -epoksi-ocimen (10,7%), *trans*-sabinil-acetat (8,8%), sabinen (8,1%) i linalil 3-metil butanoat (7,5%).⁴³ Analiza pak ulja prethodno osušene biljke sakupljene također u okolini Niša, Srbija, pokazala je da su najzastupljenije komponente ulja bile sabinen (24,49%), sabinil acetat (13,64%) i α -felandren (10,29%).⁴⁴ Analiza eteričnog ulja ove biljke (izoliranog iz suhog biljnog materijala, nakon 10 dana i nakon godinu dana sušenja) sakupljene u okolini Niša, Srbija, pokazala je da su dominantni sastojci ulja β -tujon (21 i 21%), *trans*-sabinil acetat (9,1 i 16,8%) i linalil-3-metil butanoat (7,4 i 12,9%).⁴⁵ Eterično ulje nadzemnih dijelova *A. absinthium* sakupljene u Srbiji (Đerdap) sadrži tuja-2,4(10)-dien (15,89%), kariofilen-oksid (14,89%), α -tujon (12,83%) i neril-izovalerat (12,16%).⁴⁶ Eterično ulje izolirano iz nadzemnih dijelova (cvijetovi, listovi, stabljika) ove biljke sakupljene u okolini Niša, Srbija, kao dominantne komponente sadrži neril-2-metil-butanoat (5,5%), neril-3-metil-butanoat (5,2%) i *p*-cimen (4,9%).⁴⁷ Ulje izolirano iz nadzemnih suhih dijelova biljke sakupljene kod

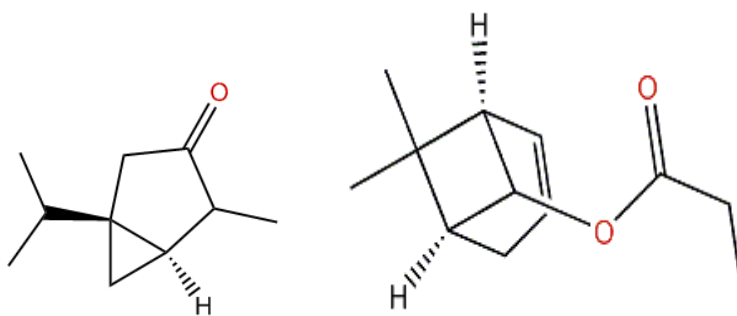
Niške Banje, Srbija, kao dominantne komponente sadrži kamfor (51,4%) i *trans*-krizantenil-acetat (22,7%).⁴⁸

Istraživanje sastava i sadržaja eteričnog ulja izoliranog iz više uzoraka listova i korijena (sabrani u vegetativnom stanju i prethodno osušeni) *A. absinthium* iz Mađarske pokazalo je da ulje listova pripada dvama kemotipovima: sabinen/mircen i β -tujon kemotipu. Uljem izolirano iz korijena ovih uzoraka dominira α -fenhen i mircen.⁴⁹

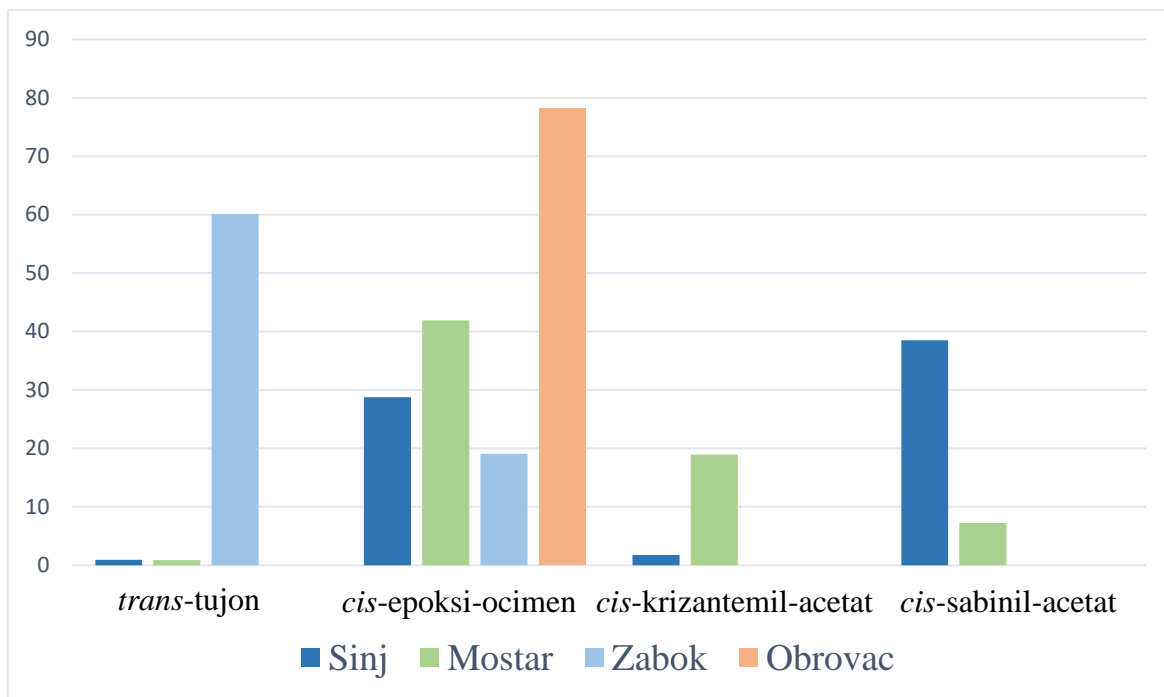
Strukture najzastupljenijih spojeva eteričnog ulja biljke *A. absinthium* prikazane su slikama 34 i 35.



Slika 34. *cis*-sabinil-acetat i *cis*-epoksi-ocimen⁵⁰



Slika 35. *trans*-tujon i *cis*-krizantemil-acetat⁵⁰



Slika 36. Histogramski prikaz prisutnosti dominantnih komponenti

3.2. Inhibicija acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze

Sposobnost eteričnih ulja pelina (*Artemisia absinthium* L.) da inhibiraju enzime acetilkolinesterazu (AChE) i butirilkolinesterazu (BChE) ispitana je metodom po Ellmanu.³⁹ Koncentracija ispitanih osnovnih otopina eteričnih ulja iznosila je 1 mg/mL, dok je koncentracija ulja u reakcijskim sustavima iznosila 45,45 µg/mL. Rezultati mjerenja prikazani su u tablici 7.

Tablica 7. Sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE eteričnim uljima pelina

Vrsta	% AChE	% BChE
<i>Artemisia absinthium</i> Sinj	29,67	33,84
<i>Artemisia absinthium</i> Mostar	32,41	31,81
<i>Artemisia absinthium</i> Zabok	25,09	30,90
<i>Artemisia absinthium</i> Obrovac	26,97	2,18
Huperzin A*	90,72	58,79
Galantamin#	78,6	40,9

Analizirana koncentracija osnovne otopine uzoraka eteričnih ulja koncentracije 1 mg/mL;

* analizirana koncentracija 0,1 mg/mL; # analizirana koncentracija 5 µg/mL.

Prema podacima iz tablice je vidljivo da eterična ulja biljke *Artemisia absinthium* sabrane na različitim lokacijama i u različitim sezonama branja pokazuju umjerenu sposobnost inhibicije enzima AChE (25,09-32,41%) i BChE (30,90-33,84 %) u usporedbi s poznato dobrim inhibitorima ovih enzima huperzinom A i galantaminom. Jedino ulje od biljke sabrane u Obrovcu pokazuje vrlo slabu sposobnost inhibicije BChE (2,18%).

Kao dobri inhibitori ovih enzima koji dolaze u sastavu eteričnih ulja poznati su α -pinen, δ -3-karen, 1,8-cineol, karvakrol, timohidrokinon, α - i β -asaron.⁵¹ Među testiranim spojevima uglavnom dolaze monoterpeni i monoterpenoidi, dok su ostali spojevi manje zastupljeni, pa se u slučaju u ovom radu izoliranih i testiranih ulja ne može tvrditi kojim spojevima se može pripisati ova vrsta aktivnosti.

Pregledom literature uočeno je da je tek jedina analiza sposobnosti inhibicije enzima AChE u svijetu načinjena na eteričnom ulju ove biljke sakupljene u Alžiru. U koncentraciji 0,1 mg/mL ovo ulje je inhibiralo AChE s $18,02 \pm 1,26\%$, dok je ulje iste koncentracije s $12,76 \pm 0,95\%$ inhibiralo BChE. Dominantne komponente ovog ulja bile su kamazulen ($31,27 \pm 0,29\%$) i kamfor ($16,54 \pm 0,05\%$).⁵²

3.3. Inhibicija α -glukozidaze

Rezultati inhibicijskog djelovanja eteričnog ulja biljke *Artemisia absinthium* sabrane na različitim lokacijama i u različitim sezonama branja na enzim α -glukozidaza prikazani su u tablici 8. Testirane su koncentracije osnovnih otopina ulja 1 mg/mL, odnosno koncentracije u reakcijskom sustavu od 47,62 μ g/mL. Za analizu je korištena metoda opisana od Brueggemana i Hollingswortha.^{40,41}

Tablica 8. Prikaz inhibicijskog djelovanja eteričnih ulja četiri biljke na enzim α -glukozidazu

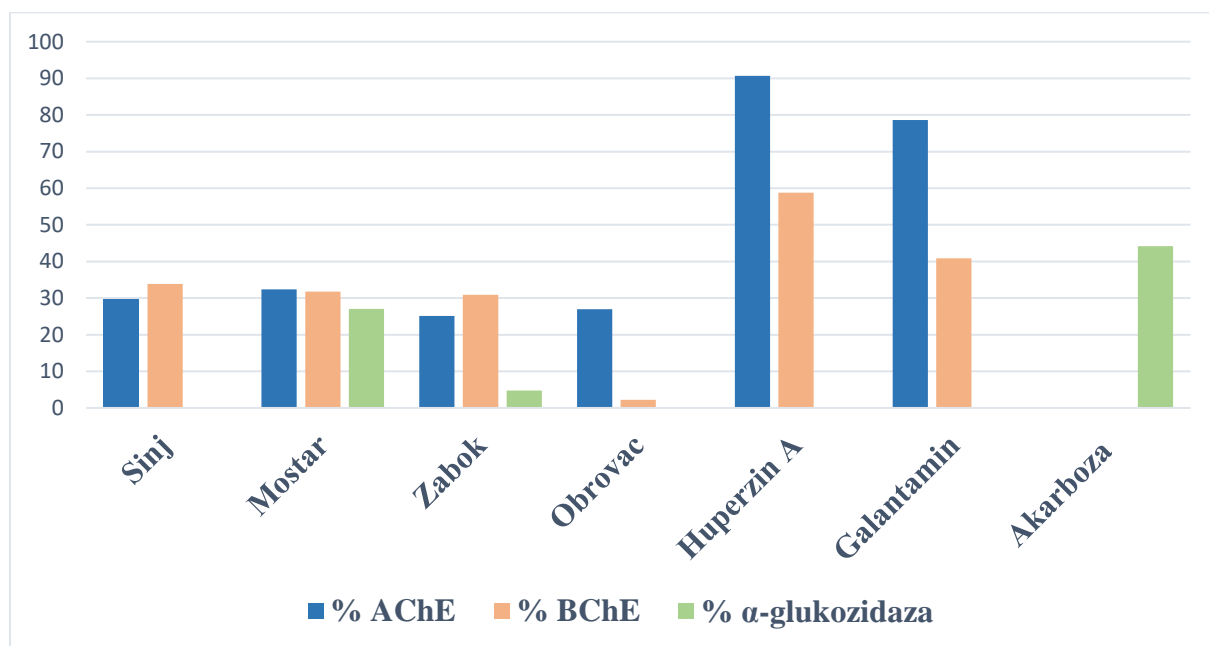
Vrsta	% α -glukozidaza
<i>A. absinthium</i> / Sinj	na
<i>A. absinthium</i> / Mostar	27,08
<i>A. absinthium</i> / Zabok	4,73
<i>A. absinthium</i> / Obrovac	na
<i>akarboza</i>	44,20

Analizirani su uzorci koncentracije 1 mg/mL; na= nema aktivnosti

Uzorci eteričnih ulja biljke *A. absinthium* iz Sinja i Obrovca ne inhibiraju enzim α -glukozidazu, ulje iz Zaboka pokazuju veoma slabu sposobnost inhibicije ovog enzima (4,73%), dok uzorak ulja izoliranog iz biljke sabrane u Mostaru u vrijeme pune cvatnje biljke umjerenom sposobnosti inhibira ovaj enzim (27,08%). Uzorak poznato dobrog inhibitora ovog enzima, akarboze, u istoj analiziranoj koncentraciji, inhibira enzim s 44,20%.

Jako malo čistih spojeva, sastavnica eteričnih ulja, ispitano je na sposobnost inhibicije ovog enzima, zbog čega je teško odrediti kojoj od komponenti se može pripisati inhibicijski potencijal koji posjeduje testirano ulje.

Pregledom literature utvrđeno je da do danas nije načinjena niti jedna analiza sposobnosti eteričnog ulja ove biljne vrste da inhibira enzim α -glukozidazu.



Slika 37. Histogramski prikaz rezultata ispitivanja inhibicijskog djelovanja eteričnih ulja na enzime acetilkolinesterazu (AChE), butirilkolinesterazu (BChE) i α -glukozidazu

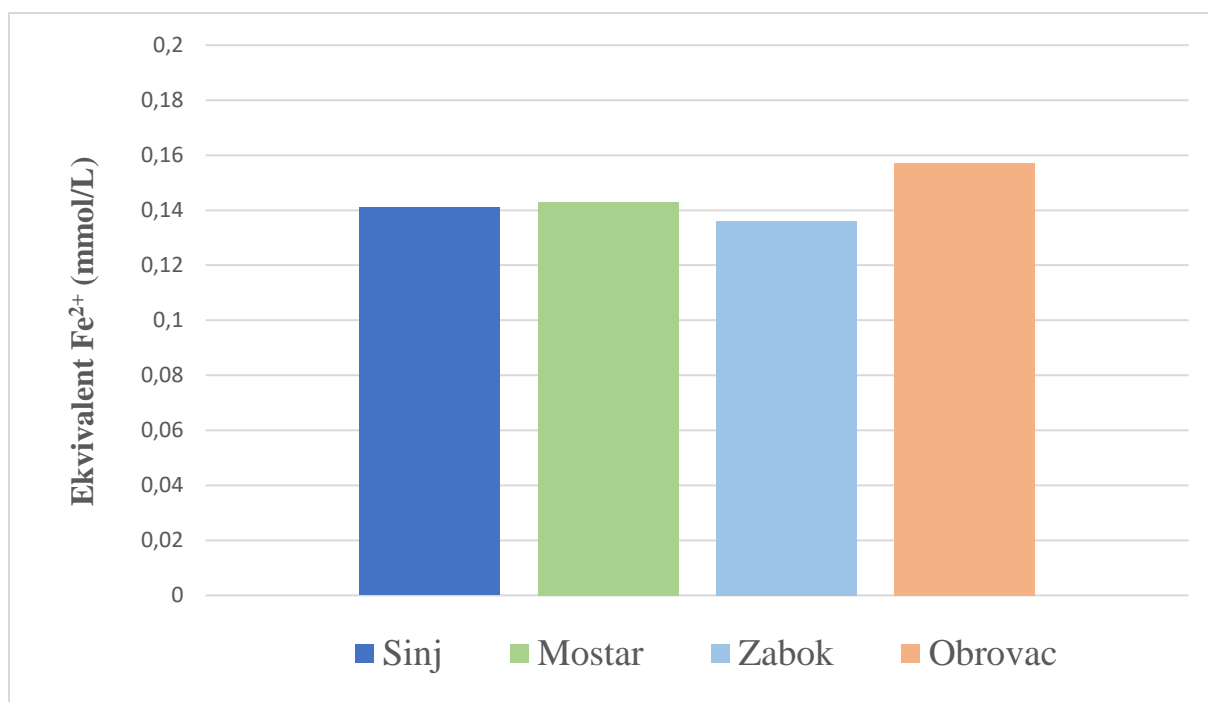
3.4. Antioksidacijska aktivnost

Za ispitivanje antioksidacijske aktivnosti istraživanih eteričnih ulja korištene su dvije metode: metoda hvatanja slobodnih DPPH radikala (DPPH metoda) i metoda ispitivanja redukcijskog potencijala (FRAP metoda). Za ispitivanje antioksidacijskog potencijala izolirana eterična ulja su otopljena u etanolu te su dobivene otopine ulja u etanolu. Kod ispitivanja ove vrste aktivnosti korištene su otopine početnih koncentracija 1 mg/mL. Rezultati su iskazani kao % hvatanja slobodnih DPPH radikala te kao mmol/L ekvivalent Fe^{2+} iona (korištenih kao standard).

Tablica 9. Antioksidacijski potencijal aktivnost eteričnih ulja *A. absinthium* analizirani DPPH i FRAP metodom

Vrsta	% DPPH	FRAP ekvivalent Fe^{2+} (mmol/L))
<i>A. absinthium</i> / Sinj	na	0,141
<i>A. absinthium</i> / Mostar	na	0,143
<i>A. absinthium</i> / Zabok	na	0,136
<i>A. absinthiu</i> / Obrovac	na	0,157
BHA	95,1	4864,600

Analizirani su uzorci koncentracije 1 mg/mL; na= nema aktivnosti



Slika 38. Histogramski prikaz rezultata testiranja redukcijskog potencijala eteričnih ulja pelina FRAP metodom

Rezultati ispitivanja antioksidacijskog potencijala eteričnih ulja biljke pelin sabrane na različitim lokacijama te u različitim sezonama razvoja biljke pokazali su da ulja ne pokazuju sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala (DPPH metoda) ili pak pokazuju neznatan redukcijski potencijal (0,141-0,157 mmol Fe²⁺/g uzorka ulja) (FRAP metoda), u odnosu na testiran redukcijski potencijal poznato dobrog antioksidansa BHA (beta hidroksi anisol).

Poznato je naime da su za antioksidacijski potencijal odgovorni uglavnom fenolni spojevi. Nedostatak ovih spojeva u sastavu ovih eteričnih ulja objašnjava dobivene rezultate.

I do danas nije istražen antioksidacijski potencijal eteričnog ulja ove biljke sakupljene na području Hrvatske. Dvije analize su pak provedene na uljima dobivenim od biljnog materijala sakupljenog na jugu Srbije. Eterično ulje prethodno osušene biljke sakupljene u okolini Niša, Srbija ispitano je na sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala. Rezultati su pokazali da ulja posjeduju slabu sposobnost hvatanja DPPH radikala ($IC_{50} = 29,72 \text{ mg/mL}$).⁴⁴ Ulje izolirano iz nadzemnih suhih dijelova biljke sakupljene kod Niške Banje, Srbija, ispitano je na antioksidacijski potencijal DPPH metodom. Rezultati su pokazali slab antioksidacijski potencijal $IC_{50} = 63,615 \pm 0,010 \text{ mg/mL}$.⁴⁸

4. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je izolirati i odrediti kemijski sastav eteričnih ulja pelina (*Artemisia absinthium* L.) sakupljenih na različitim lokalitetima te u različitim sezonama, ispitati sposobnost inhibicije eteričnih ulja na djelovanje enzima acetilkolinesteraze, butirilkolinesteraze i α -glukozidaze te istražiti antioksidacijsku aktivnost.

Do danas je načinjeno dosta analiza kemijskog sastava eteričnog ulja ove biljke, no tek jedna od ulja biljke sakupljene u Hrvatskoj. Niti jedna analiza ulja biljke sakupljene u BiH do danas nije načinjena. Jednako, do danas je načinjena tek jedno ispitivanje inhibicijskog potencijala na enzime AChE i BChE uljem ove biljke, no niti jedna uljem biljke iz Hrvatske ili BiH. Niti jedna analiza inhibicijske sposobnosti ovog ulja na enzim α -glukozidazu, kao ni analiza antioksidacijskog potencijala nije načinjena.

Prinos izoliranih eteričnih ulja iznosio je od 0,49% (vrijeme nakon pune cvatnje, Sinj) do 3,1% (vrijeme pune cvatnje biljke, Mostar).

GC-MS analizama kemijskih sastava eteričnih ulja pelina *A. absinthium* L., ukupno je identificirano 29 komponenti. U eteričnom ulju pelina ubranog u Sinju identificirane su 24 komponente (99,14% od ukupno ulja), u eteričnom ulju pelina ubranog u Mostaru identificirane su 23 komponente (98,2% od ukupnog ulja), u eteričnim uljima pelina sabranih u Zaboku ili Obrovcu identificirano je 10 komponenti (98,64% i 98,14% od ukupnog ulja).

Predominantni spojevi eteričnog ulja pelina iz Sinja su oksidirani monoterpeni spojevi (monoterpenoidi) *cis*-sabinil-acetat (38,52%) i *cis*-epoksi-ocimen (28,77%), eteričnog ulja pelina iz Mostara su monoterpenoidi *cis*-epoksi ocimen (41,92%) i *cis*-krizantemil-acetat (18,98%), eteričnog ulja pelina iz Zaboka su monoterpenoidi *trans*-tujon (60,10%) i *cis*-epoksi-ocimen (19,09%) te ulja pelina iz Obrovca je monoterpenoid *cis*-epoksi-ocimen (78,17%).

Kod svih analiziranih uzoraka ulja ove biljke sabrane na različitim lokacijama i u različitim sezonama branja kao dominantne komponente ulja javljaju se oksidirani monoterpeni spojevi-monoterpenoidi (73,75 do 82,78%). Kod svih se uzoraka kao dominantne komponente javljaju *trans*-tujon i *cis*-epoksiocimen. Koncentracija *cis*-epoksi-ocimena je dominantna u svih uzoraka ulja osim u onog iz sjevernijih područja (Zabok), kod kojeg nad *cis*-epoksi-ocimenom dominira *trans*-tujon. Koncentracija *cis*-epoksi-ocimena je najveća u uzorku ulja iz biljnog materijala sakupljenog u vegetativnoj fazi razvoja biljke (78,17%).

U uzorcima ulja dobivenim iz biljaka sakupljenih u južnijim, toplijim područjima u visokim udjelima dolaze i *cis*-krizantemil-acetat (1,78 i 38,52%) te *cis*-sabinil-acetat (18,98 i 7,25%). Prvog je više u vrijeme pune cvatnje, drugog u vrijeme nakon pune cvatnje biljke.

Eterična ulja biljke *A. absinthium* sabrane na različitim lokacijama i u različitim sezonama branja pokazuju umjerenu sposobnost inhibicije enzima AChE (25,09-32,41%) i BChE (30,90-33,84%) u usporedbi s poznato dobrim inhibitorima ovih enzima huperzinom A i galantaminom. Jedino ulje od biljke sabrane u Obrovcu pokazuje vrlo slabu sposobnost inhibicije BChE (2,18%).

Uzorci eteričnih ulja biljke *A. absinthium* iz Sinja i Obrovca ne inhibiraju enzim α -glukozidazu, ulje iz Zaboka pokazuju veoma slabu sposobnost inhibicije ovog enzima (4,73%), dok uzorak ulja izoliranog iz biljke sabrane u Mostaru u vrijeme pune cvatnje biljke umjerenom sposobnosti inhibira ovaj enzim (27,08%).

Rezultati testiranja antioksidacijskog potencijala eteričnih ulja biljke pelin sabrane na različitim lokacijama te u različitim sezonama razvoja biljke pokazali su da ulja ne pokazuju sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala (DPPH metoda) ili pak pokazuju neznatan redukcijski potencijal (0,141-0,157 mmol Fe²⁺/g uzorka ulja) (FRAP metoda).

LITERATURA

1. A. Bosak, M. Katalinić and Z. Kovarik, Cholinesterases: Structure, Role and Inhibition, Arh. Hig. Rada. Toksikol., vol.62, no.2 (2011), 175-190
2. S. Šipicki i Z. R. Džolić,(2017). Terapija Alzheimerove bolesti: sadašnjost i budućnost. Farm. glasnik, 73. (9), 603-612.
3. A. Puljak, G. Perko, D. Mihok, H. Radašević Antioksidansi i oligoelementi u starijih ljudi, Medix, Vol. 10 No. 52, (2004) 98-102
4. C. Reuben, Antioksidansi, Izvori doo, Zagreb, 1998
5. L. Batičić, L. Ivanović, A. Grčić, E. Pernjak Pugel, J. Varljen, i D. Detel, Šećerna bolest i inhibitori DPP IV/CD26. Med. Flum., 55 (3), 2019, 200-214.
6. Z. Yin, Z. Wei , F. Fajin, Z. Yong, K. Wenyi, α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants, Food Sci. Hum. Wellness, Vol. 3, 3–4, 2014, 136-174
7. I. Kolak, K. Carović, Z. Šatović, I. Rozić, Gorski pelin (*Artemisia absinthium* L.). Sjemenarstvo, 2004, 21(5-6): 275 – 282
8. T. G. Tutin, , N. A. Burges, A. O. Chater, J. R. Edmondson, V. H. Heywood, D. M., Moore, D. H. Valentine, , S. M. Walters, D. A. Webb, ur. Flora Europaea 1. 2nd edn. University Press, Cambridge, 1993
9. Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S. M., Webb D. A., ur., Flora Europaea 1-5. University Press, Cambridge, 1968-1980
10. S. Pignatti, Flora d'Italia 1–3. Edagricole, Bologna, 1982
11. T. Nikolić (ur.), Flora Croatica Database. On-Line. 2021
12. Lj. Grlić, Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. AC. Zagreb, 1991
13. https://en.wikipedia.org/wiki/Diana_of_Versailles (12.7.2021.)
14. <http://www.botanical.com/botanical/mgmh/w/wormwo37.html> (12.7.2021.)
15. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Artemisia_absinthium_L._\(absintalsem\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Artemisia_absinthium_L._(absintalsem).jpg) (12.7.2021.)
16. G. K. Toplak, Hrvatsko ljekovito bilje, Mozaik knjiga, Zagreb , 2001, 60-61
17. V. Petrović, Određivanje sastava eteričnog ulja nekih vrsta roda *Artemisia* L. plinskom kromatografijom , Završni rad, 2015
18. I. Jerković, Kemija i tehnologija aromatičnog bilja, nerencenzirani nastavni materijal, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split

19. *A. Radonić*, Izolacija i identifikacija slobodnih i glikozidno vezanih hlapljivih spojeva iz smrike (*Juniperus oxycedrus* L.), Magistarski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2000.
20. *N. D. Thanh Thi , T. Huu Anh and Le Ngoc Thach*, The Essential Oil Composition of *Eryngium foetidum* L. in South Vietnam Extracted by Hydrodistillation under Conventional Heating and Microwave Irradiation, *J. Essent. Oil-Bear. Plants*, 11:2, 154-161, 2008
21. *R.K.Murray, D.A.Bender, K.M.Botham, P.J.Kennelly, V.W.Rodwell, P.A.Weil*, Harperova ilustrirana biokemija, Medicinska naklada, Zagreb, 2011 482-486
22. URL:https://www.biotek.com/assets/tech_resources/ROS%20White%20Paper.pdf (12.7.2021.)
23. URL:<http://kuczdravlja.hr/novosti/antioksidanti-zasto-su-toliko-neophodni-za-zdravlje-i-usporavanje-starenja/>(8.9.2021.)
24. *M. Blois*, Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* 181, 1958, 1199–1200
25. *P. Molyneux*, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakarin J. Sci. Technol., 2004, 26(2) : 211-219
26. *F. Burčul*, Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice Ranunculaceae , doktorski rad, 2014
27. *M. Bektašević*, Kemijski i biološki profil odabranih biljnih vrsta korištenih u tradicionalnoj medicini BiH, doktorski rad, 2018
28. *I.F Benzie and J.J. Strain*, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.*, 1996, 239: 70–76.
29. <https://edu.glogster.com/glog/alois-alzheimer/1sgx1u7mu7n> (14.7.2021.) (13.7.2021.)
30. <http://uddk.hr/u-zdravom-tijelu-zdrav-duh/alzheimerova-bolest> (15.7.2021.)
31. *V.V Krasikov, D.V. Karelov and L.M.Firsov*, α -Glucosidases. *Biochemistry (Moscow)* 66, 267–281, 2001
32. *T. Kljakić*, Ispitivanje inhibicije alfa-glukozidaze ekstraktima komine masline, Diplomski rad, 2019
33. *T. Matsui, I.A. Ogunwande, K.J.M. Abesundara and K. Matsumoto*, Antihyperglycemic Potential of Natural Products *Mini Rev Med Chem.* 2006 ;6(3):349-56.
34. URL:
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Kinetics/02%3A](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/02%3A)

[Reaction Rates/2.01%3A Experimental Determination of Kinetics/2.1.05%3A Spectro photometry](#) (25.9.2021.)

35. L. Kukoč Modun, Interna skripta za pripremu vježbe: Molekulska apsorpcijska spektrometrija. Split, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2003
36. K. Kardum, Kemijski i biološki profil odabranih biljaka roda *Centaurea*, Diplomski rad, 2018
37. A. Radanović, Kinetičke značajke beta-elemana kao inhibitora acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze, Diplomski rad, 2017
38. Qurrat-Ul-Ain, U. Ashiq, R. A. Jamal, M. Saleem, and M. Mahroof-Tahir, Alpha-glucosidase and carbonic anhydrase inhibition studies of Pd(II)-hydrazide complexes, Arabian J. Chem., vol. 10, no. 4, 2015
39. G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres Jr., R.M. Faetherston, A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Jul 1961, 7(2), 88-90.
40. G. Pistia-Brueggeman, R. Hollingsworth, A preparation and screening strategy for glycosidase inhibitors. Tetrahedron. 2001, 57(42), 8773 – 8.
41. A. Bhatia, B. Singh, R. Arora, S. Arora, In vitro evaluation of the α -glucosidase inhibitory potential of methanolic extracts of traditionally used antidiabetic plants. BMC Complement Altern Med. 2019, 19 (74), 1-9.
42. F. Juteau, I. Jerkovic, V. Masotti, M. Milos, J. Mastelic, J.-M. Besseire, J. Viano, Planta Med., 2003, 69 (2), 158
43. O. Blagojević, N. Radulović, R. Palić, G. Stojanović, J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 4780
44. T. Mihajilov-Krstev, B. Jovanović, J. Jović, B. Ilić, D. Miladinović, J. Matejić, J. Rajković, Lj. Đorđević, V. Cvetković, B. Zlatković, Planta Med., 2014, 80 (18), 1698.
45. P. D. Blagojevic, N. S. Radulovic, D. Skropeta, Chem Biodivers., 2015, 12, 1237.
46. P. Janačković, N. Rajčević, M. Gavrilović, J. Novaković, A. Giwelib, D. Stešević, P. D. Marin, Biochem. Syst. Ecol., 2019, 87, 103960.
47. N. S. Radulović, M. S. Genčić, N. M. Stojanović, P. J. Randjelović, Z. Stojanović-Radić, N. I. Stojiljković, Food Chem Toxicol., 2017, 105, 355
48. N. Stanković, T. Mihajilov-Krstev, B. Zlatković, J. Matejić, V. Stankov Jovanović, B. Kocić, Lj. Čomić, Planta Med., 2016, 82, 650
49. J. A. Llorens-Molina, S. Vacas, V. Castell, E. Nemeth-Zamborine, J. Essent. Oil. Res., 2017, 29 (1), 11.
50. URL: <https://www.pherobase.com/> (20.9.2021.)
51. F. Burčul, I. Blažević, M. Radan, O. Politeo, Curr. Med. Chem., 2020, 27 (26), 4297.

52. *I. E. Orhan, R. Belhattab, F.S. Senol, A. R. Gülpinar, S. Hosbas, M. Kartal*, Ind. Crops Prod., 2010, 32, 566.