Određivanje sposobnosti hvatanja superoksid anion radikala hidrolata odabranih biljaka pomoću ksantin/ksantin-oksidaza metode

Parčina, Antonija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:167:125132

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**

Repository / Repozitorij:

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

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ODREĐIVANJE SPOSOBNOSTI HVATANJA SUPEROKSID ANION RADIKALA HIDROLATA ODABRANIH BILJAKA POMOĆU KSANTIN / KSANTIN-OKSIDAZA METODE

DIPLOMSKI RAD

ANTONIJA PARČINA

Matični broj: 95

Split, listopad 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

ODREĐIVANJE SPOSOBNOSTI HVATANJA SUPEROKSID ANION RADIKALA HIDROLATA ODABRANIH BILJAKA POMOĆU KSANTIN / KSANTIN-OKSIDAZA METODE

DIPLOMSKI RAD

ANTONIJA PARČINA

Matični broj: 95

Split, listopad 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

MEASURMENT OF SCAVENGING ABILITY OF SUPEROXIDE ANION RADICALS WITH HYDROLATES OF SELECTED PLANTS USING XANTHINE / XANTHINE OXIDASE METHOD

DIPLOMA THESIS

ANTONIJA PARČINA

Parent number: 95

Split, October 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet
Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na 19. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta
Mentor: izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo

Određivanje sposobnosti hvatanja superoksid anion radikala hidrolata odabranih biljaka pomoću ksantin/ksantin-oksidaza metode

Antonija Parčina, 95

Sažetak:

Slobodni radikal je bilo koja vrsta koja može samostalno postojati, a sadrži jedan ili više nesparenih elektrona. Reaktivne kisikove vrste nastaju iz molekulskog kisika kao rezultat normalnog staničnog metabolizma. Superoksidni anion radikal, hidroksil radikal i vodikov peroksid su vrste od fiziološkog značaja. Superoksidni anion se formira adicijom jednog elektrona molekulskom kisiku, a proces može biti popraćen ksantin-oksidazom. Antioksidans je tvar koja odlaže, sprječava ili uklanja oksidativna oštećenja ciljne molekule. Ljudski organizam endogeno posjeduje različite antioksidanse kako bi stvorili protutežu efektu oksidansa. U ovom radu testirani su hidrolati odabranih biljaka metodama ksantin/ksantin-oksidaza, DPPH, FRAP i Folin-Ciocalteu Najbolji antioksidacijski potencijal testiran DPPH i FRAP metodom pokazuju hidrolati biljaka *Juniperus communis* ssp. *nana*, *Moltkia petraea* i *Mantisalca salmantica*. Rezultati su u skladu sa sadržajem ukupnih fenola testiranih hidrolata. Ksantin/ksantin-oksidaza metodom u testiranoj koncentraciji od 1 g/L gotovo svi hidrolati pokazuju dobru sposobnost hvatanja superoksid anion radikala. Uzorci pokazuju dobru i o koncentraciji neovisnu sposobnost inhibicije superoksid anion radikala. Rezultati dobiveni testiranjem sposobnosti hvatanja superoksid anion radikala ksantin/ksantin-oksidaza metodom nisu u korelaciji s rezultatima dobivenim metodama DPPH, FRAP i Folin-Ciocalteu. Za dobivanje mjerodavnih rezultata metodom ksantin/ksantin-oksidaza potrebno je testirati sposobnost hidrolata da inhibiraju enzim ksantin-oksidazu te testirati uzorke i neenzimatskom metodom hvatanja superoksid anion radikala.

Ključne riječi: hidrolati, superoksid anion radikal, ksantin/ksantin-oksidaza, DPPH, FRAP, Folin-Ciocalteu

Rad sadrži: 49 stranica, 37 slika, 5 tablica, 46 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. doc. dr. sc. Mila Radan – predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Josipa Giljanović – član
3. izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo – član-mentor

Datum obrane: 17. listopada 2019.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology
Graduate study of chemistry

Scientific area: Natural Sciences
Scientific field: Chemistry
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 19
Mentor: Olivera Politeo – PhD, associate prof.

Measurment of scavenging ability of superoxide anion radicals with hydrolates of selected plants using xanthine/xanthine oxidase method

Antonija Parčina, 95

Abstract:

A free radical is any species that can exist independently and contains one or more unpaired electrons. Reactive oxygen species are produced from molecular oxygen as a result of normal cellular metabolism. Superoxide anion radical, hydroxyl radical and hydrogen peroxide are species of physiological importance. The superoxide anion is formed by the addition of one electron to molecular oxygen, and the process can be catalised by xanthine oxidase. An antioxidant is a substance that delays, prevents or eliminates oxidative damage to the target molecule. The human body endogenously possesses various antioxidants to counterbalance proxidant processes. In this paper the hydrolates of selected plants were tested using xanthine/xanthine oxidase, DPPH, FRAP and Folin-Ciocalteu methods. The best antioxidant potential tested by the DPPH and FRAP method is shown by the hydrolates of plants of *Juniperus communis* ssp. Nana, *Moltkia petraea* and *Mantisalca salmantica*. The results are consistent with the total phenol content of the tested hydrolates. Xanthine/xanthine oxidase method at a tested concentration of 1 g/L, almost all the hydrolates show good ability to capture the superoxide anion radical. The samples show good and concentration independent ability to inhibit superoxide anion radicals. The results obtained by testing the superoxide anion trapping capability of the xanthine/xanthine oxidase method did not correlate with the results obtained by the DPPh, FRAP and Folin-Ciocalteu methods. In order to obtain relevant results by the xanthine/xanthine oxidase, it is necessary to test the ability of the hydrolates to inhibit the enzyme xanthine oxidase and to test the samples with a non-enzymatic method of trapping the superoxide anion radical.

Key words: hydrolates, superoxide anion radical, xanthine/xanthine oxidase, DPPH, FRAP, Folin-Ciocalteu

Thesis contains: 49 pages, 37 figures, 5 tables, 46 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Mila Radan – PhD, assistant prof.	chain person
2. Josipa Giljanović – PhD, associate prof.	member
3. Olivera Politeo – PhD, associate prof.	supervisor

Defence date: October 17, 2019.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed 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 izv. prof. dr. sc. Olivere Politeo, u razdoblju od svibnja do srpnja 2019. godine.

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Oliveri Politeo na stručnim savjetima i velikoj pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem svom dečku na pruženoj podršci, ljubavi i razumijevanju.

Veliko hvala mojoj dragoj sestri i roditeljima koji su mi uvijek bili oslonac i podrška.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Testirati sposobnost hvatanja superoksid anion radikala odabranih biljnih hidrolata novopostavljenom metodom koja se koristi enzimatskim sustavom ksantin/ksantin-oksidaza
- Odrediti sadržaj ukupnih fenola u hidrolatima odabranih biljnih vrsta
- Testirati sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala hidrolata odabranih biljnih vrsta DPPH metodom
- Testirati redukcijski potencijal hidrolata odabranih biljnih vrsta FRAP metodom
- Usporediti rezultate dobivene testiranjem antioksidacijskih potencijala hidrolata odabranih biljnih vrsta dobivene korištenjem navedenim metodama

SAŽETAK

Slobodni radikal je bilo koja vrsta koja može samostalno postojati, a sadrži jedan ili više nesparenih elektrona. Reaktivne kisikove vrste se proizvode iz molekulskog kisika kao rezultat normalnog staničnog metabolizma. Superoksidni anion radikal, hidroksil radikal i vodikov peroksid su vrste od fiziološkog značaja. Superoksidni anion se formira adicijom jednog elektrona molekulskom kisiku, a proces može biti popraćen ksantin-oksidazom. Antioksidans je tvar koja odlaže, sprječava ili uklanja oksidativna oštećenja ciljne molekule. Ljudski organizam endogeno posjeduje različite antioksidanse kako bi napravili protutežu efektu oksidansa. U ovom radu testirani su hidrolati odabranih biljaka metodama ksantin/ksantin-oksidaza, DPPH, FRAP i Folin-Ciocalteu. Najbolji antioksidacijski potencijal testiran DPPH i FRAP metodom pokazuju hidrolati biljaka *Juniperus communis* ssp. *nana*, *Moltkia petraea* i *Mantisalca salmantica*. Rezultati su u skladu sa sadržajem ukupnih fenola testiranih hidrolata. Ksantin/ksantin-oksidaza metodom u testiranoj koncentraciji od 1 g/L gotovo svi hidrolati pokazuju dobru sposobnost hvatanja superoksid anion radikala. Uzorci pokazuju dobru i o koncentraciji neovisnu sposobnost inhibicije superoksid anion radikala. Rezultati dobiveni testiranjem sposobnosti hvatanja superoksid anion radikala ksantin/ksantin-oksidaza metodom nisu u korelaciji s rezultatima dobivenim metodama DPPH, FRAP i Folin-Ciocalteu. Za dobivanje mjerodavnih rezultata metodom ksantin/ksantin-oksidaza potrebno je testirati sposobnost hidrolata da inhibiraju enzim ksantin-oksidazu te testirati uzorke i neenzimatskom metodom hvatanja superoksid anion radikala.

Ključne riječi: hidrolati, superoksid anion radikal, ksantin/ksantin-oksidaza, DPPH, FRAP, Folin-Ciocalteu

SUMMARY

A free radical is any species that can exist independently and contains one or more unpaired electrons. Reactive oxygen species are produced from molecular oxygen as a result of normal cellular metabolism. Superoxide anion radical, hydroxyl radical and hydrogen peroxide are species of physiological importance. The superoxide anion is formed by the addition of one electron to molecular oxygen, and the process can be catalised by xanthine oxidase. An antioxidant is a substance that delays, prevents or eliminates oxidative damage to the target molecule. The human body endogenously possesses various antioxidants to counterbalance the oxidant effect. In this paper the hydrolates of selected plants were tested using xanthine/xanthine oxidase, DPPH, FRAP and Folin-Ciocalteu methods. The best antioxidant potential tested by the DPPH and FRAP method is shown by the hydrolates of plants of *Juniperus communis* ssp. *nana*, *Moltkia petraea* and *Mantisalca salmantica*. The results are consistent with the total phenol content of the tested hydrolates. Xanthine/xanthine oxidase method at a tested concentration of 1 g/L, almost all the hydrolates show good ability to capture the superoxide anion radical. The samples show good and concentration independent ability to inhibit superoxide anion radicals. The results obtained by testing the superoxide anion trapping capability of the xanthine/xanthine oxidase method did not correlate with the results obtained by the DPPH, FRAP and Folin-Ciocalteu methods. In order to obtain relevant results by the xanthine/xanthine oxidase method, it is necessary to test the ability of the hydrolates to inhibit the enzyme xanthine oxidase and to test the samples with a non-enzymatic method of trapping the superoxide anion radical.

Key words: hydrolates, superoxide anion radical xanthine/xanthine oxidase, DPPH, FRAP, Folin-Ciocalteu

SADRŽAJ

UVOD....1
1. OPĆI DIO....2
1.1. Ispitivane biljke....2
1.1.1. ***Centaurea scabiosa*** **L.**....2
1.1.2. ***Centaurea glaberrima*** **Tausch**....2
1.1.3. ***Centaurea alba*** **L.**....3
1.1.4. ***Mantisalca salmantica*** **L. Briq. et Cavill.**....4
1.1.5. ***Chaerophyllum coloratum*** **L.**....5
1.1.6. ***Genista radiata*** **L. Scop**....6
1.1.7. ***Hymenocarpos circinnatus*** **(L.) Savi**....7
1.1.8. ***Juniperus communis*** **L. ssp.** ***nana*** **Syme**....8
1.1.9. ***Moltkia petraea*** **(Tratt.) Griseb.**....9
1.1.10. ***Edraianthus pumilio*** **(Schult.) A. DC.**....9
1.1.11. ***Campanula rapunculus*** **L.**....10
1.1.12. ***Hieracium waldsteinii*** **subsp.** ***biokovense*** **Deg. & Zahn.**....11
1.2. Antioksidacija....12
1.2.1. Slobodni radikali....12
1.2.2. Antioksidacijska obrana....13
1.3. Metode određivanja antioksidacijskog potencijala....15
1.3.1. Enzimatska metoda ksantin/ksantin-oksidaza hvatanja slobodnih superoksid anion radikala (X/XO)....16
1.3.2. Metoda hvatanja slobodnih DPPH radikala (DPPH metoda)....17
1.3.3. Metoda testiranja redukcijskog potencijala (FRAP metoda)....17
1.4. Ksantin-oksidoreduktaza....18
1.4.1. Giht....19
1.5. Hidrolati....20
1.6. Fenolni spojevi....20
1.6.1. Metoda određivanja ukupnih fenolnih spojeva, Folin-Ciocalteu metoda....22
1.7. Spektroskopija....23
2. EKSPERIMENTALNI DIO....25
2.1. Biljni materijal....25
2.2. Kemikalije....25
2.3. Priprema biljnih hidrolata....26

2.4. Određivanje antioksidacijskog potencijala hidrolata odabranih biljaka 27

2.4.1. Sposobnosti hvatanja superoksida anion radikala, enzimatskom ksantin / ksantin-oksidaza metodom, X/XO metoda 28

2.4.2. Metoda hvatanja slobodnih DPPH radikala, DPPH metoda 29

2.4.3. Medoda testiranja redukcijske sposobnosti hidrolata, FRAP metoda 30

2.5. Određivanje sadržaja ukupnih fenola u uzorcima hidrolata 31

3. REZULTATI I RASPRAVA 33

3.1.1. Sposobnost hvatanja superoksida anion radikala hidrolatima odabranih biljnih vrsta, enzimatska ksantin/ksantin-oksidaza metoda 33

3.1.2. Metoda hvatanja slobodnih DPPH radikala, DPPH metoda 38

3.1.3. Metoda testiranja redukcijske sposobnosti hidrolata odabranih biljaka, FRAP metodom 40

3.2. Sadržaj ukupnih fenola u hidrolatima odabranih biljnih vrsta 42

4. ZAKLJUČCI 45

5. LITERATURA 47

UVOD

Biljni lijekovi su od davnina pa sve do danas važni u profilaksi i fitoterapiji. Postoje razlike između samoniklog i uzgojenog ljekovitog bilja, a one utječu na terapijski učinak. Razlike proizlaze iz njihovog kemijskog sastava koji je određen ekološkim čimbenicima, klimom i sastavom tla. Mnoge ljekovite tvari prirodnog podrijetla danas se proizvode sintetskim putem u farmaceutskoj industriji jer je sintetska proizvodnja ekonomičnija od ekstrakcije iz prirodnih izvora.[1]

Prirodni proizvodi su vrijedne biološki aktivne tvari. Više od 60 % odobrenih lijekova je prirodno ili je vezano za prirodne proizvode.[2]

Antioksidacijska svojstva su ključna za stabilnost hrane i za antioksidacijsku obranu biološkog sustava.[3] Slobodne radikale u tijelu stvaraju alkohol, proizvodi naftne industrije, dimovi, herbicidi, smog, azbest, emocionalni stres i drugo.[4] Lijekovi bazirani na antioksidansima za sprječavanje i tretiranje bolesti poput ateroskleroze, dijabetesa, moždanog udara, Alzheimerove bolesti i raka, pojavili su se u posljednja četiri desetljeća. Ovo je privuklo mnoga istraživanja za prirodne antioksidanse. Flavonoidi i fenolni spojevi su široko rasprostranjeni kod biljaka, a zabilježeno je da imaju mnoge biološke efekte, uključujući antioksidacijska, antiupalna i antikancerogena svojstva te sposobnost hvatanja slobodnih radikala.[5]

1. OPĆI DIO

1.1. Ispitivane biljke

1.1.1. *Centaurea scabiosa* L.

Velika zečina je trajna zeljasta biljka iz porodice Asteraceae (glavočike cjevnjače). Stabljika je uspravna i uglasta, u gornjem dijelu jako razgranata, visine 50-130 cm. Listovi su perasto razdijeljeni na lancaste režnjeve i cjeloviti, donji listovi imaju peteljke, a gornji su sjedeći. Cvjetovi su purpurni i skupljeni u glavice promjera 3-5 cm. Plod je spljoštena roška duga oko 5 mm, papus je ljubičast te iste dužine kao roška. Involukrum je jajast s dlakavim smeđe-zelenim listićima. Velika zečina cvate u srpnju i kolovozu. Rasprostranjena je po Europi, a staništa su joj suhe livade i pašnjaci.[6]

Slika 1.1. *Centaurea scabiosa* L.[6]

1.1.2. *Centaurea glaberrima* Tausch

Gola zečina je dvogodišnja ili biljka trajnica iz porodice Asteraceae. Stabljike su joj uspravne, bridaste i metličasto razgranjene, a mogu narasti i do 80 cm u visinu. Listovi su zeleni i goli sa ušiljenim segmentima širokim oko 1 mm. Bazalni listovi imaju peteljke te su dvostruko perasto razdijeljeni na 12-15 pari režnjeva. Donji listovi su slični bazalnima, ali su manji, sjedeći i razdijeljeni na 8-12 pari režnjeva. Obodni

cvjetovi imaju zrakasto stršeće režnjeve vjenčića. Unutarnji su cvjetovi cjevasti i ružičasti. Ovojni listovi su glatki i sjajni. Involukrum je 1 cm dug i 5-6 mm širok. Plod je sivkasto crna roška duga 3 mm. Gola zečina cvjeta od svibnja do rujna. Raste na submediteranskim i epimediteranskim suhim travnjacima, na kamenitim staništima i klifovima. Rasprostranjena je na području Hrvatske, Bosne i Hercegovine i Crne Gore. U Hrvatskoj uglavnom raste uz obalu i na otocima srednje i južne Dalmacije, a česta je i u široj okolici Dubrovnika. Gola zečina je zakonom strogo zaštićena i gotovo ugrožena vrsta.[7,8]

Slika 1.2. *Centaurea glaberrima* Tausch[9]

1.1.3. *Centaurea alba* L.

Bijela zečina je biljka trajnica koja pripada porodici Asteraceae. Stabljike su duge do 60 cm, uspravne i vrlo razgranate u gornjoj polovici. Bazalni listovi su linearni, a ostali listići su sjedeći. Srednji listovi su linearno lancetasti. Cvjetovi su cjevasti, bijeli ili roza. Cvat je jajastog oblika i promjera 11-12 mm. Plod je bijeli ahenij dug oko 3 mm. Bijela zečina cvate od lipnja do kolovoza. Staništa su joj livade, sušna i kamenjarska područja.[10,11]

Slika 1.3. *Centaurea alba* L.[9]

1.1.4. *Mantisalca salmantica* L. Briq. et Cavill.

Dugopetiljna zečina dolazi sa Mediterana te također pripada porodici Asteraceae. Višegodišnja je biljka, stabljika joj je ravna ili izbočena s granama, visoka do 150 cm, na dnu dlakava, a na vrhu gola. Glavice rastu pojedinačno na stabljici duljine 15 cm, listići su u 5-7 redova, vanjski ovalni koji se sužavaju prema središtu, zelene boje s tamnim rubom. Listići su kao rozete s 2-10 trokutastih do ovalnih režnjeva. Srednji listovi na stabljici su manji i jednostavniji, a viši su linearni. Involukrum je ovalan (1-) 1,2-2,2 cm dug i 0,7-1,3 (-1,7) cm širok. Rubni dijelovi cvjetova su sterilni, a iznutra bipolarni, svi su ljevkastog oblika, dugi 1,7-2,8 cm, ružičaste do ljubičaste boje. Zakrilca su duguljasta, dužine 3,2-4,7 mm s 10-15 rebara. Raste u Italiji, Hrvatskoj, Grčkoj, Makedoniji, na zapadu Francuske, kao i na mnogim otocima. Izvan Europe raste na sjeveru Afrike, od Maroka do Tunisa i Egipta, kao i u Turskoj, na Cipru i u Izraelu. Raste na rubovima ceste, nije joj važna zemlja. Raste i na visinama od 2000 m.[12]

Slika 1.4. *Mantisalca salmantica* L. Briq. et Cavill.

1.1.5. *Chaerophyllum coloratum* L.

Šarena krabljica je jednogodišnja ili dvogodišnja biljka (hemikriptofit) s vretenastim korijenom iz porodice Apiaceae (štitarke). Stabljika je 70-80 (-100) cm visoka, uspravna, u gornjem dijelu razgranata. Cvjetovi su dvospolni i muški, složeni u široke štitce. Latice su obrnuto srcaste, pri vrhu uvijene i žuto obojene. Tučak ima nitaste vratove. Plod je linearan ili duguljast, smeđe boje i dužine 10-12 mm. Listići ovojčića (invocelum) su lancetasti i opnasti. Šarena krabljica cvjeta od svibnja do srpnja. Rasprostranjena je u Hrvatskoj, Bosni i Hercegovini, Crnoj Gori, na Kosovu i u Albaniji. U Hrvatskoj se može naći u priobalju i na otocima, od južnog Velebita (Nacionalni park Paklenica) na sjeveru pa sve do poluotoka Prevlaka na jugu. Raste na kamenitim, skeletnim, ekstremno degradiranim staništima s oskudnim tlom, među grubim vapnenačkim stijenama, ali i na flišu, u zapuštenim vinogradima, vrtovima i maslinicima. Šarena krabljica gotovo je ugrožena i strogo zaštićena vrsta.[7]

Slika 1.5. *Chaerophyllum coloratum* L.[9]

1.1.6. *Genista radiata* L. Scop.

Zrakasta žutilovka je listopadni grm iz porodice Fabaceae (mahunarke). Grane su guste, razgranate, uspravne i zrakasto raširene, a dužine su do 100 cm. Pupovi su sitni, zelenkasti, prekriveni s dvije ljuske koje su na rubovima trepavičavo dlakave. Listovi su nasuprotni, imaju kratku peteljku i trodijelni su. Cvjetovi su dvospolni, sjedeći, na dlakavim stapkama, skupljeni su po 2-7 u glavičaste cvatove u pazušcima gornjih listova. Ocvijeće im je dvostruko, čaška je zvonasta, dvousnata, žućkastozelena i dlakava, dužine 4-6 mm, vjenčić je leptirast i žuto obojen. Plodovi su uspravne, svilenasto dlakave mahune dužine 5 mm. Zrakasta žutilovka cvate u svibnju i lipnju. Rasprostranjena je u južnoj i srednjoj Europi. Staništa su joj livade i travnjaci gorskih i pretplaninskih krajeva.[13]

Slika 1.6. *Genista radiata* L. Scop.[13]

1.1.7. *Hymenocarpos circinnatus* (L.) Savi

Zavojita bubreška također pripada porodici Fabaceae. Nisko je ispružena, jednogodišnja biljka. Stabljika je visoka do 30 cm sa gustim dlakama. Donji listovi su pojedinačni, a gornji sa 5-7 listića, terminalni list je najveći. Cvjetovi su žuti ili narančasti, dugački 5-7 mm. Na dugoj stabljici nalazi se 2-5 glava. Plod je spljoštena mahuna zavijena u oblik nalik bubregu i disku, 10-15 mm, vanjski rub je membranski i obično sitno nazubljen. Staništa su otvoreni travnjaci i napuštene terase. Raste do 200 m nadmorske visine. Široko je rasprostranjena na Mediteranskom području, česta je u Grčkoj i na Kreti. Cvjeta od travnja do svibnja.[14]

Slika 1.7. *Hymenocarpos circinnatus* (L.) Savi[14]

1.1.8. *Juniperus communis* L. ssp. *nana* Syme

Klečica je veoma polegla biljka iz porodice Cupressaceae (čempresi). Visoka je 20-50 cm. Grane su gusto smještene, a grančice su kratke, debele i trobridne. Iglice su okrenute prema gore, ali uz izbojak usmjerene, duge su 4-8 mm, a široke 1-2 mm. Plod je plavocrne boje s peteljkom, jajolik do okrugao, a debljine 7-10 mm. Klečica je rasprostranjena u Europi u alpskom i subalpskom području, često se pronalazi na tresetištima, u sjevernoj Aziji i u Sjevernoj Americi. Raste i u visokoplaninskim predjelima na Alpama i Dinaridima.[15]

Slika 1.8. *Juniperus communis* L. ssp. *nana* Syme[9]

1.1.9. *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb.

Modro lasinje je veoma gust poluzimzeleni grm ili polugrm iz porodice Boroginaceae (oštrolisti). Visine je 20-40 (-50) cm. Stabljike su uspravne i sivo-dlakave. Listovi su naizmjenični, jednostavni i sjedeći, dužine 10-50 mm, a širine 1-6 mm. Cvjetovi su dvospolni, sitni i peteročlani, u početku su ružičastocrveni, a kasnije ljubičastoplavi (rijetko bijeli). Plod je bjeličasti, sjajni i glatki oraščić, dužine 2,5-3 mm. Krunica je cjevasto ljevkasta, duga 6-10 mm. Modro lasinje cvate u svibnju i lipnju. Staništa su joj pukotine vapnenačkih stijena koje su izložene suncu kao i osunčana vapnenačka točila. Rasprostranjena je u submediteranskom, mediteranskom i mediteransko-montanskom području. Endem je Balkanskog poluotoka.[8,16]

Slika 1.9. *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb.[9]

1.1.10. *Edraianthus pumilio* (Schult.) A. DC.

Biokovsko zvonce je jastučasta, polukuglasta, kuglasta i zbijena biljka trajnica iz porodice Campanulaceae (zvončanice). Sastavljena je od niskih jednocvjetnih (hamefit) stabljika koje su duge 1-3 cm. Stabljika joj je duga 1-3 (-4) cm. Listovi su linearni, dužine (0,5-) 5-20 (-25) mm, a širine 1 (-2) mm. Pricvjetni listovi su pri osnovi lancetasti, a pri vrhu ušiljeni jednako kao i listovi stabljike i rozete. Listovi stabljike i pricvjetni listovi su s donje strane goli, a s gornje su gusto prileglodlakavi. Rubovi listova su savijeni prema unutra. Cijev čaške je gola, a čašica je duga 6-8 mm. Vjenčić

je zvonolikog oblika, dužine 14-25 mm, plavoljubičaste boje, a rijetko može biti i bijele boje. Plod je tobolac s više svijetlosmeđih sjemenki. Sjemenke su plosnate i jajolike, duge 1,2-1,5 mm, a široke 1 mm. Biokovsko zvonce cvate između lipnja i srpnja. Staništa su joj krečnjački sirozemi ili crnice u pukotinama stijena. Rasprostranjena je samo na planini Biokovo . Biokovsko zvonce je stereoendem.[7,8]

Slika 1.10. *Edraianthus pumilio* (Schult.) A. DC.[9]

1.1.11. *Campanula rapunculus* L.

Repasti zvončić je dvogodišnja biljka koja također pripada porodici Campanulaceae. Visine je do 90 cm, stabljika u gornjem dijelu razgranata. Prizemni listovi su lancetasti, kod baze suženi u peteljku, nazubljenog i valovitog ruba. Gornji listovi su duguljasti i sjedeći. Ima blijedoljubičaste cvjetove, dužine 2 cm. Staništa su joj šume, uz grmlje, po krčevinama do pretplaninskog područja. Repasti zvončić cvjeta od svibnja do kolovoza.[17]

Slika 1.11. *Campanula rapunculus* L.[9]

1.1.12. *Hieracium waldsteinii* subsp. *biokovense* Deg. & Zahn.

Biokovska runjika je dalmatinski endem iz porodice Cichoriaceae (glavočike jezičnjače). Listovi su joj sivozeleni do plavozeleni, gusto prekriveni bjelkastim i valovitim dlakama. Raste u visinu do 30 cm s 1-3 žutih cvjetova. Biokovska runjika cvjeta od svibnja do lipnja, a otoporna je na sušu i vjetar. Raste na olujnim buništima po submediteranskim stijenama obalnih Dinarida od južnog Velebita do Biokova.[18,19]

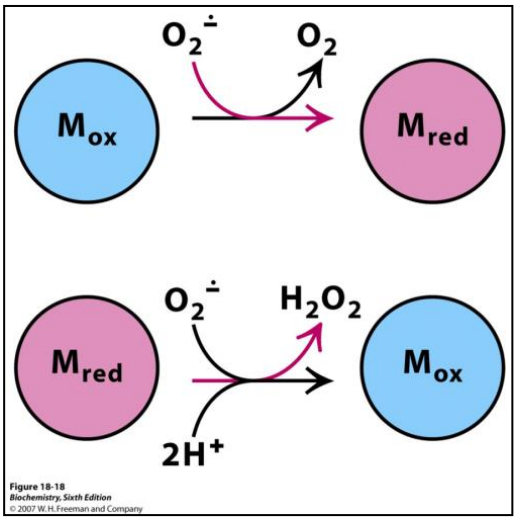
Slika 1.12. *Hieracium walsteinii* subsp. *biokovense* Deg. & Zahn.[9]

1.2. Antioksidacija

1.2.1. Slobodni radikali

Slobodni radikal je bilo koja vrsta koja može samostalno postojati, a sadrži jedan ili više nesparenih elektrona. Prisutnost jednog ili više nesparenih elektrona uzrokuje paramagnetična svojstva slobodnih radikala te ih ponekad čini visoko reaktivnim vrstama. Mnogi slobodni radikali postoje u živim organizmima, iako većina molekula *in vivo* su ne-radikalne vrste.[20]

Reaktivne kisikove vrste (ROS, engl. *Reactive oxygen species*) se proizvode iz molekulskog kisika kao rezultat normalnog staničnog metabolizma. Kada dva slobodna radikala dijele nespareni elektron, formira se ne-radikalna vrsta. Tri su važne reaktivne kisikove vrste koje su od fiziološkog značaja: superoksidni anion radikal ($O_2^{\cdot -}$), hidroksil radikal ($OH^{\cdot}$) i vodikov peroksid (H_2O_2). Superoksidni anion se formira adicijom jednog elektrona molekulskom kisiku. Ovaj proces je popraćen nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (NAD(P)H)-oksidazom, ksantin-oksidazom ili preko mitohondrijskog transporta elektrona. Glavno mjesto proizvodnje superoksidnog aniona je u mitohondriju. Elektroni se prenose preko mitohondrijskog transporta elektrona za redukciju kisika do vode, ali otprilike 1-3 % svih elektrona „iscuri“ iz sustava i proizvede superoksid. Superoksid se prevodi u vodikov peroksid reakcijom superoksid-dismutaze (SOD).[21]



Slika 1.13.: Mehanizam SOD: Oksidirani oblik SOD (M_{ox}) reagira s jednim ionom superoksida → nastaju O_2 i reducirani oblik enzima (M_{red}). M_{red} dalje reagira s drugim

ionom superoksida i s dva protona te nastaju H_2O_2 i regenerirani oksidirani oblik enzima.[22]

Hidroksil radikal je najreaktivnija ROS vrsta koja može oštetiti proteine, lipide, ugljikohidrate i DNA. Također, može započeti peroksidaciju lipida uzimanjem elektrona od polinezasićenih masnih kiselina. U prisutnosti kloridnog iona vodikov peroksid prelazi u hipokloridnu kiselinu. HOCl je jako oksidirajuća i ima važnu ulogu u ubijanju patogena u dušnim putovima. Međutim, HOCl može reagirati i s DNA te inducirati interakcije DNA-protein i proizvesti produkte oksidacijom pirimidina te nadodati klorid bazi DNA.[21]

Reaktivne kisikove vrste mogu izazvati modifikacije DNA na nekoliko načina, što uključuje degradaciju baza, pucanje jednolančane ili dvolančane DNA, modifikacije purinske, pirimidinske ili šećerne okosnice, mutacije, ukrižene veze (engl. *cross-linking*) s proteinima. Većina ovih DNA modifikacija je jako bitna za starenje, karcinogenezu, te neuredegenerativne, kardiovaskularne i autoimune bolesti. Duhanski dim, redoks metali i neredoks metali, poput željeza, kadmija, kroma i arsena, također su uključeni u karcinogenezu i starenje tako što generiraju slobodne radikale ili se vezuju s tiolnom skupinom. Regulacija redoks stanja je kritična za staničnu sposobnost tj. život stanice, aktivaciju, proliferaciju i funkciju organa.[21]

1.2.2. Antioksidacijska obrana

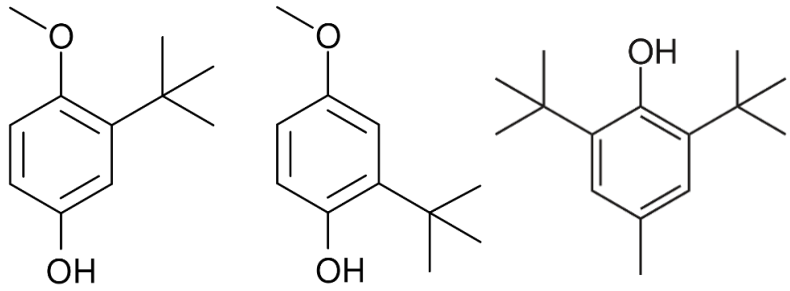
Antioksidans je svaka tvar koja, kada je prisutna u niskim koncentracijama u usporedbi s onima koje oksidiraju supstrat, značajno odlaže ili sprječava oksidaciju tog supstrata. Antioksidans je dakle svaka tvar koja odlaže, sprječava ili uklanja oksidativna oštećenja ciljne molekule.[20]

Ljudski organizam endogeno posjeduje različite antioksidanse kako bi napravili protutežu efektu oksidansa. Mogu se podijeliti u dvije kategorije: enzimatski i neenzimatski. Enzimatski antioksidansi su superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation-peroksidaza (GTP_x), glutation-transferaza (GST), peroksiredoksin (PRX), tioredoksin (TRX).[21]

U neenzimatske endogene ili egzogene antioksidanse ubrajaju se vitamin C (askorbinska kiselina), vitamin E (α-tokoferol), vitamin A (svi *trans*-retinoli), glutation, β-karoten.[21]

Oksidativni stres se pojavljuje kada je poremećena ravnoteža između antioksidansa i ROS-a, zbog trošenja antioksidansa ili akumulacije ROS-a. Kada se pojavi oksidacijski stres, stanica se odupire i nastoji vratiti redoks ravnotežu aktiviranjem ili prigušivanjem gena koji kodiraju obrambene enzime, transkripcijske faktore i strukturne proteine.[21]

Fenoli sa steričkim smetnjama, BHT (butilirani hidroksitoluen) i BHA (butilirani hidroksianisol) su česti antioksidansi koji se upotrebljavaju za očuvanje živežnih namirnica (slika 1.14.). Alkilperoksil-radikali ($RO_2\cdot$) odcjepljuju vodikove atome sa hidroksilne skupine fenola pri čemu nastaje razmjerno stabilni fenoksil-radikal. Steričke smetnje i delokalizacija elektrona pridonose postojanosti fenoksil-radikala. Ti antioksidansi djeluju tako što uništavaju peroksil-radikale i prekidaju lančanu reakciju oksidacije, koja uzrokuje različita kvarenja hrane. Spojevi koji imaju takvo djelovanje nazivaju se hvatači radikala.[23]



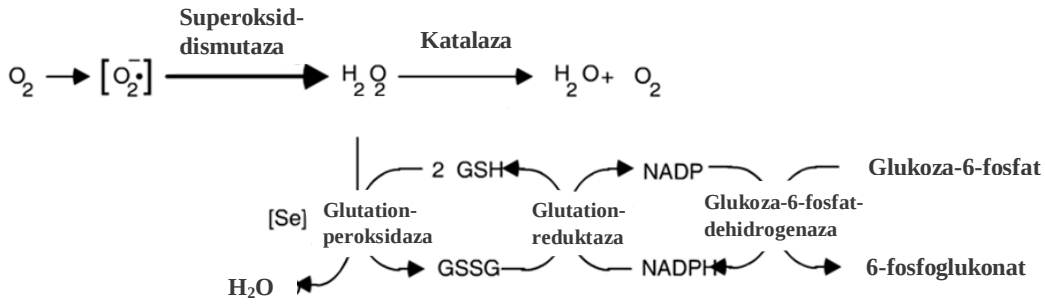
Slika 1.14. Sintetski antioksidansi (2-BHA, 3-BHA, BHT)[24,25]

Jedan od glavnih endogeno sintetiziranih antioksidacijskih enzima je enzim superoksid-dismutaza (SOD). SOD odstranjuje superoksidne radikale katalizirajući pretvaranje dvaju radikala u vodikov peroksid i molekulski kisik.[22]

Katalaza je sveprisutni hemoprotein koji katalizira dismutaciju vodikova peroksida u vodu i molekulski kisik.

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

Glutation-peroksidaza također ima ulogu pri odstranjivanju vodikovog peroksida.



Slika 1.15. GSSG se reducira u GSH pomoću glutation-reduktaze. Enzim glutation-reduktaza koristi NADPH kao izvor elektrona. NADPH nastaje pomoću glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze na putu pentoza-fosfata. Put pentoza-fosfata je važan za smanjenje oksidacijskog stresa.[22]

Dugoročnom tjelovježbom povećava se količina SOD-a u stanicama. Povećanim aerobnim metabolizmom pri vježbanju dolazi do stvaranja više reaktivnih kisikovih vrsta. Stanica onda sintetizira više zaštitnih enzima što dovodi do pojačane zaštite organizma jer nakupljena superoksid-dismutaza djeluje i za vrijeme odmora.[22]

Stanice tkiva, odnosno njihove makromolekule, izložene su oksidativnom stresu zbog slobodnih radikala, reaktivnih kisikovih vrsta i prooksidanata koji se generiraju endogeno (vodikov peroksid i prijelazni metali) i egzogeno (toplina i svjetlost). Iz tog razloga, mnoga tkiva su razvila antioksidacijske sustave za kontrolu slobodnih radikala, katalizatore oksidacije lipida, oksidacijske međuprodukte i sekundarne proizvode.[26]

1.3. Metode određivanja antioksidacijskog potencijala

Za testiranje antioksidacijskog potencijala ekstrakata i za dobivanje pouzdanih rezultata koristi se više metoda[27], a one se mogu podijeliti na razne načine. Primjerice:

- Metode pomoću kojih se mjeri sposobnost inhibicije procesa oksidacije
- Metode pomoću kojih se mjeri sposobnost hvatanja slobodnih radikala

ili

Metode koje se temelje na prijenosu elektrona[28]:

- DPPH (engl.*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical*)

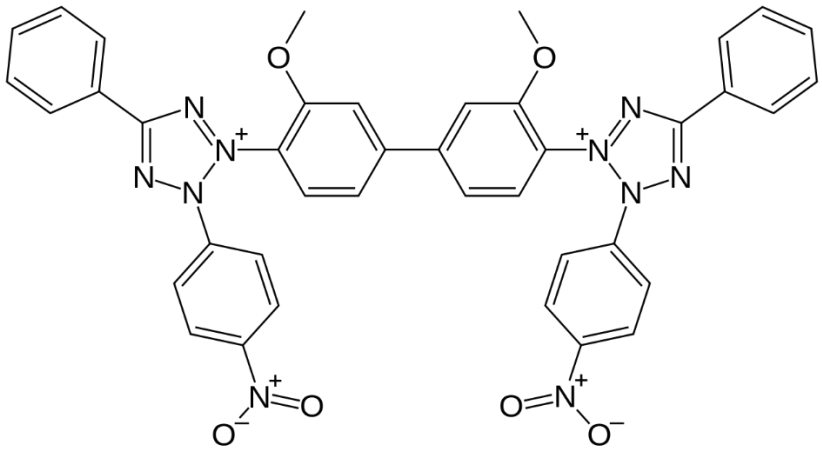
- FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*)
- TEAC (engl. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)
- CUPRAC (engl. *Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*)

Metode temeljene na prijenosu vodika su[28]:

- TRAP (engl. *Total Reactive Antioxidant Potential*)
- ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbing Capacity*)
- TOSC (engl. *Total Oxidant Scavenging Capacity*)
- LDL (engl. *Low-Density Lipopotein Oxidation*)

1.3.1. Enzimatska metoda ksantin/ksantin-oksidaza hvatanja slobodnih superoksid anion radikala (X/XO)

Utjecaj ekstrakata ili čistih supstanci na proizvodnju superoksidnih radikala mjeri se spektrofotometrijski na način da se detektira produkt redukcije soli NBT-a (engl. *nitro blue tetrazolium*)[29] (Robak & Gryglewski, 1988). NBT je reagens koji se često koristi za detekciju prisutnosti radikala superoksidnog aniona ($O_2^{\bullet -}$) kod enzimatskih reakcija[30,31] (Auclair et al.,1978; Kirby & Fridovich, 1982), kakva je ksantin / ksantin-oksidaza sustav (X/XO sustav), na način da reagiraju s žuto obojenim NBT-om i prevode se u ljubičasto-plavi diformazan koji je netopljiv u vodi.



Slika 1.16. Strukturna formula NBT-a[32]

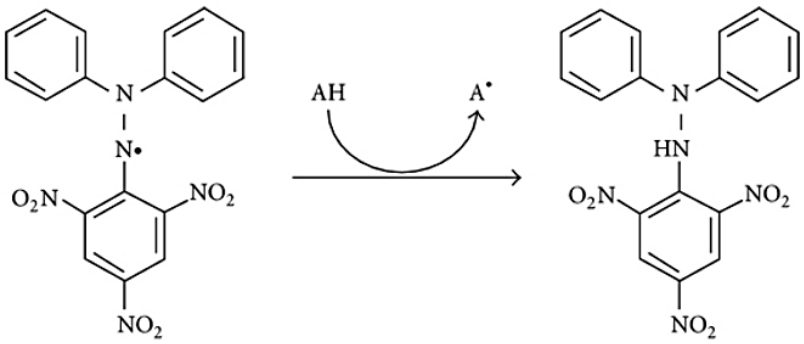
Naime, ksantin, kataliziran enzimom ksantin-oksidaza, oksidira i prevodi se u mokraćnu kiselinu i superoksidni anion radikal. Nastali radikali nadalje reagiraju s NBT-om i prevode se u diformazan, pri čemu dolazi do smanjenja apsorbancije kod λ=560 nm. Ukoliko su u otopini prisutne komponente s antioksidacijskom aktivnosti one će priječiti formiranje diformazana i formiranje ljubičasto-plavog obojenja.[33]

$$\text{ksantin} + O_2 \rightarrow \text{mokraćna kiselina} + O_2^{\bullet -}$$

$$\text{NBT (žuto obojenje)} + O_2^{\bullet -} \rightarrow \text{diformazan (ljubičasto-plavo obojenje)}$$

1.3.2. Metoda hvatanja slobodnih DPPH radikala (DPPH metoda)

Radikal DPPH· (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) je jedan od rijetkih stabilnih organskih dušikovih radikala koji ima tamno ljubičasto obojenje. Metoda se temelji na "gašenju" slobodnih DPPH radikala pri čemu dolazi do promjene boje iz ljubičaste u žutu (slika 1.17.). Ta promjena boje se detektira spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 517 nm.[27,28]

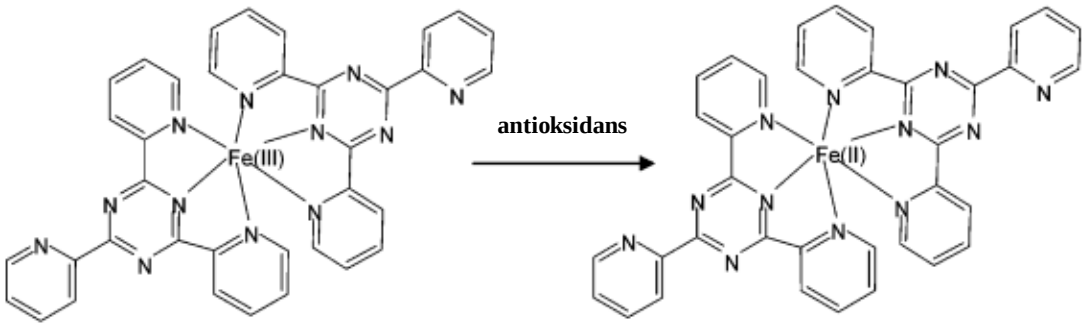


Slika 1.17. Mehanizam DPPH reakcije[34]

1.3.3. Metoda testiranja redukcijskog potencijala (FRAP metoda)

FRAP metodu su razvili Benzie i Strain kako bi mjerili redukcijsku moć plazme, ali metoda je prilagođena i korištena za testiranje redukcijskog potencijala biljnih ekstrakata. U reakciji se kao oksidans koristi kompleks željeza s 2,4,6-tris(2-piridil)-s-tirazinom (TPTZ). Žuto obojeni kompleks Fe(III)-TPTZ se reducira do plavo obojenog

kompleksa Fe(II)-TPTZ u prisutnosti antioksidansa (slika 1.18.). Metoda se provodi pri pH=3,6 kako bi se održala topljivost željeza. Maksimum apsorbancije je pri valnoj duljini od 593 nm. Iz kalibracijske krivulje se očita ukupna redukcijska moć ekstrakata tako što se usporedi promjena apsorbancije reakcijske smjese pri valnoj duljini od 593 nm sa promjenom apsorbancije za otopine fero (Fe^{2+}) iona poznate koncentracije.[27,28]



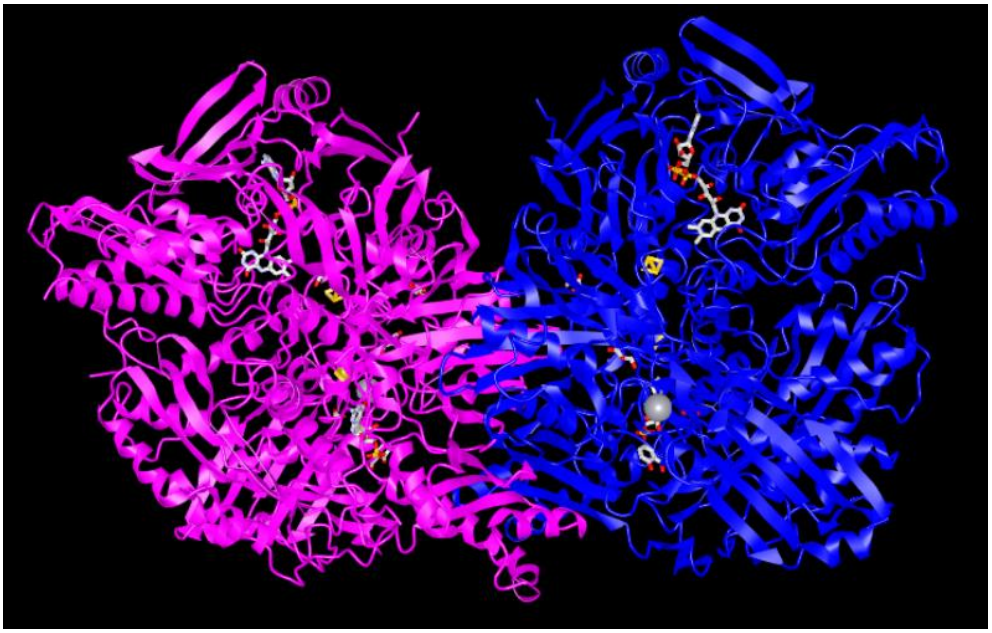
Slika 1.18. FRAP reakcija[28]

1.4. Ksantin-oksidoreduktaza

Ksantin-oksidoreduktaza (XOR) je jedan iz skupine enzima koji su poznati kao molibden željezo-sumpor flavanske hidroksilaze. Otkriven je u mlijeku (Schardinger) 1902. i smatra se da je uključen u reakcije proizvodnje ROS-a poput nitrita. XOR je široko rasprostranjen u organima uključujući jetra, crijeva, pluća, bubrege, srce, mozak i plazmu, a najviše je pronađen u crijevima i jetri. Postoji u dvije forme poznate kao ksantin-oksidaza (EC 1.17.3.2) i ksantin-dehidrogenaza (XDH) (EC 1.17.1.4). Oba enzima se sastoje od dvije podjedinice veličine 145 kDa. Kod sisavaca XOR je prisutan *in vivo* kao dehidrogenaza koja se lako prevodi u XO oksidacijom sulfhidril rezidua (ostataka) ili proteolizom. Oba enzima mogu oksidirati NADH što uzorkuje formiranje ROS-a.[35]

Ksantin-oksidaza (slika 1.19.) je željezo-molibden flavoprotein koji sadrži 2Fe-2S centra. Oksidira hipoksantin, purine, aldehide i pterine. Enzim ksantin-oksidaza katalizira reakciju oksidacije hipoksantina u ksantin te ksantina do mokraćne kiseline.

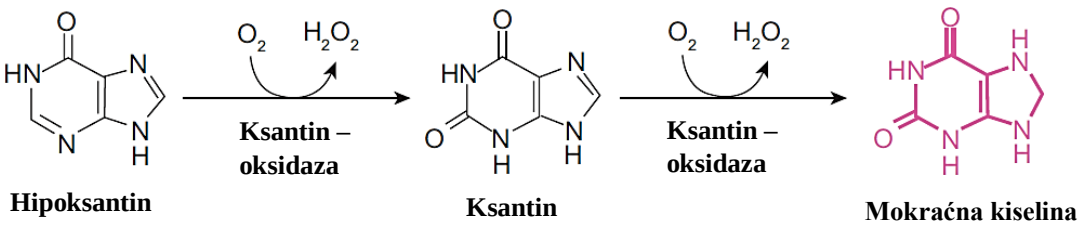
Ovaj enzim ima vrlo nisku specifičnost prema supstratu tako da može katalizirati i oksidaciju formaldehida do mravlje kiseline.[36,37]



Slika 1.19. Struktura ksantin-oksidaze[38]

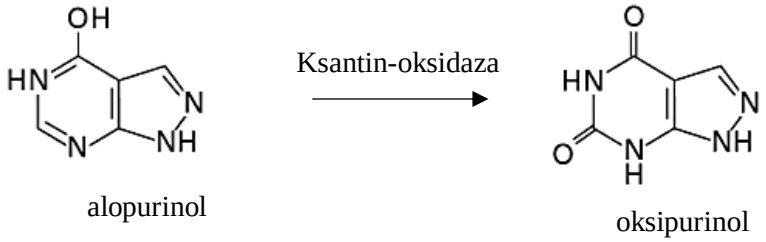
1.4.1. Giht

Ksantin-oksidaza katalizira reakciju oksidacije hipoksantina u ksantin i željezo te ksantina u mokraćnu kiselinu (slika 1.20.). U obe reakcije oksidans je molekulski kisik koji se reducira u vodikov peroksid. Djelovanjem enzima katalaze vodikov peroksid se raspada na vodu i kisik. Pri fiziološkom pH mokraćna kiselina gubi proton i daje produkt urat.[22]



Slika 1.20. Oksidacija hipoksantina u ksantin te ksantina u mokraćnu kiselinu[35]

Kod ljudi mokraćna kiselina je krajnji produkt oksidacije purina. Hiperuricemija je povećana koncentracija urata u serumu, a ona dovodi do bolesti zglobova, gihta. Bolest nastaje taloženjem kristala urata u zglobnim tekućinama. Kada stanice imunološkog sustava okruže kristale natrijeva urata, dolazi do bolnih upala. Ovom bolešću se mogu oštetiti i bubrezi, ako se kristali urata odlažu u njima. Bolest se liječi alopurinolom koji je analog hipoksantina. Alopurinol prvo djeluje kao supstrat, potom kao inhibitor enzima. Ksantin-oksidaza oksidira alopurinol do oksipurinola koji ostaje čvrsto vezan u aktivnom mjestu enzima što dovodi do inhibicije (slika 1.21.). Kod ljudi oksipurinol je glavni metabolit alopurinola. Stoga se alopurinol naziva „samoubojstvenim supstratom" ksantin-oksidaze. Nakon uzimanja alopurinola smanjuje se sinteza urata iz hipoksantina i ksantina.[20,22]



alopurinol oksipurinol

Slika 1.21. Ksantin – oksidaza oksidira alopurinol do oksipurinola[20]

1.5. Hidrolati

Hidrolati ili cvjetne vodice su nusprodukti destilacije biljnog materijala kod proizvodnje eteričnog ulja. Hidrolat u svom kemijskom sastavu sadrži spojeve koji su topljivi u vodi. U najvećem udjelu se pronalaze kiseline, alkoholi i aldehidi. Hidrolati se koriste u kozmetičke svrhe kao prirodni tonici, a mogu se koristiti i kao vodena faza pri izradi krema, gelova, maski i emulzija. Također, hidrolati se mogu koristiti u terapeutske svrhe kao kapi za nos, oči i uši, a nalaze primjenu i u kulinarstvu.[39,40]

1.6. Fenolni spojevi

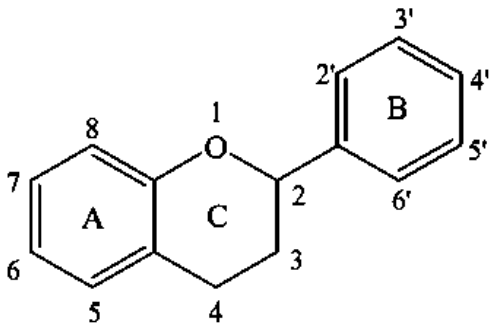
Fenolni spojevi mogu nastati iz dvaju biosintetskih puteva, šikiminskog biosintetskog puta ili iz acetatnog biosintetskog puta. Kod šikiminskog biosintetskog puta prekursor je D-glukoza, a središnji međuprodukt je šikiminska kiselina. Produkti

ovog biosintetskog puta su aromatske kiseline, primjerice L-fenilalanin i L-tirozin. Kod acetatnog biosintetskog puta prekursor je acetil-koenzim A. Također, fenolni spojevi mogu nastati kao produkti dvojnog ili miješanog biosintetskog puta što daje veliki broj te strukturnu raznolikost fenolnih spojeva. Fenolni spojevi se dijele prema broju ugljikovih atoma u osnovnoj strukturi.[41]

Tako se mogu podijeliti na[41]:

- jednostavne fenole, C_6 spojevi, pr. fenol i katehol,
- fenolne kiseline, C_6-C_1 spojevi, pr. salicilna kiselina i *p*-hidroksibenzojeva kiselina,
- feniloctene kiseline, C_6-C_2 spojevi, pr. *p*-hidroksifeniloctena kiselina,
- fenilpropanoide, C_6-C_3 spojevi, pr. kafeinska i ferulinska kiselina,
- flavonoide, C_6-C_3-C_6 spojevi, pr. kvercetin,
- lignini, $(C_6$-$C_3)_n$ spojevi, pr. *p*-kumaril-alkohol i sinapil-alkohol.

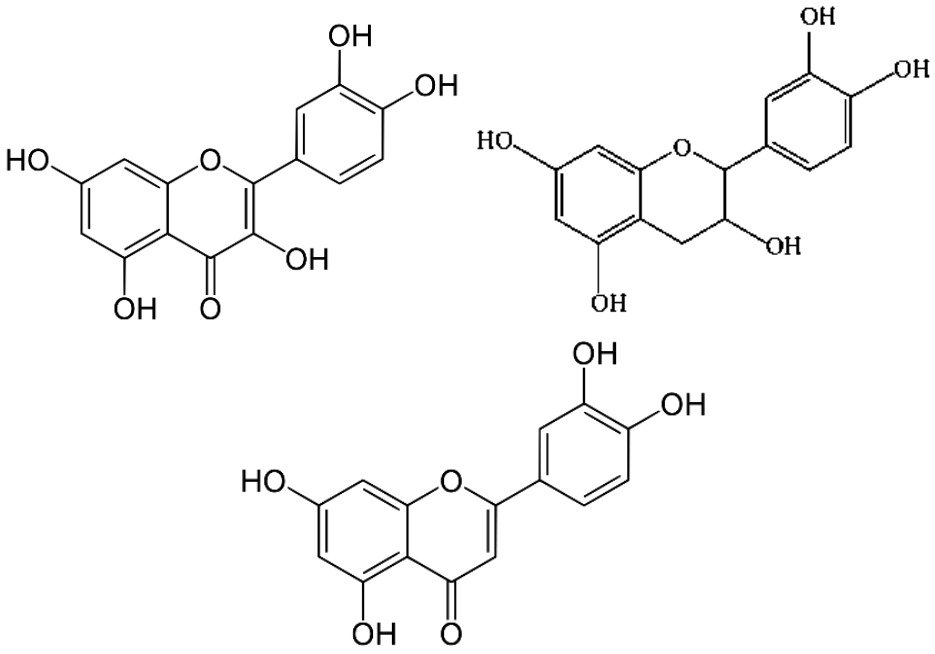
Flavonoidi su najbrojnija grupa fenolnih spojeva. Mogu se naći u svim dijelovima biljke, slobodni ili glikozidno vezani. Biološki su aktivni spojevi, a najvažnije svojstvo im je antioksidacijska sposobnost. Fenolne kiseline općenito djeluju tako što hvataju slobodne radikale, flavonoidi također hvataju slobodne radikale, ali i kelatiraju metale. Zajednička karakteristika flavonoida je flavanska struktura sastavljena od 15 ugljikovih atoma. Ovi ugljikovi atomi su smješteni u tri prstena (slika 1.22.), dva benzenska (A i B) te centralni piranski prsten (C).[26,41]



Slika 1.22. Zajednički strukturni element flavonoida, 2-fenilkroman[41]

Grupe flavonoida se razlikuju prema suspstituciji prstena C. Mogu se podijeliti na flavanone, flavone, flavanole, dihidroflavanole, flavan-3-ole, flavan-3,4-diole,

izoflavone te antocijanidine. Spojevi unutar iste grupe se razlikuju prema supstituciji prstenova A i B što utječe na antioksidativna svojstva spoja. Flavoni i flavonoli su u prirodi najrasprostranjeniji flavonoidi. Sposobnost hvatanja slobodnih radikala prirodnih polifenolnih spojeva ovisi o broju i mjestu slobodnih hidroksilnih skupina na skeletu flavonoida. Flavonoidi sa više hidroksilnih skupina su učinkovitiji antioksidansi od onih koji imaju samo jednu takvu skupinu. Najpoznatiji flavonoidi su kvercetin, katehin i luteolin (slika 1.23.).[26,41]



Slika 1.23. Flavonoidi kvercetin, katehin i luteolin[41]

1.6.1. Metoda određivanja ukupnih fenolnih spojeva, Folin-Ciocalteu metoda

Za određivanje ukupnih fenola najčešće se koristi metoda po Folin-Ciocalteu. Metoda se zasniva na prijenosu elektrona sa fenolne komponente na heksavalentni fosfomolibdo/fosfovolframov kiseli kompleks u bazičnoj sredini. Zbog nastanka kompleksa dolazi do promjene boje iz žute u plavu. Maksimum apsorbancije je na valnoj duljini od 765 nm.[27]

1.7. Spektroskopija

Spektroskopija je snažno sredstvo u kvalitativnoj i kvantitativnoj analitičkoj kemiji. Prednosti apsorpcijskih mjerenja su ta što se energija promatranog sustava minimalno remeti. Kada polikromatsko ultraljubičasto ili vidljivo zračenje prolazi sredinom u kojoj je plinoviti uzorak, samo nekoliko frekvencija se oslabi apsorpcijom. Pobuđivanje molekule ultraljubičastim i vidljivim zračenjem dovodi do prijelaza elektrona iz orbitale niske energije, molekulske ili atomske orbitle, u orbitalu više energije. Taj prijelaz elektrona između dviju orbitala naziva se elektronski prijelaz. U molekuli se pojavljuju još vibracijski i rotacijski prijelazi.[42]

Apsorbancija otopine definira se jednadžbom:

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

Transmitancija (T) je mjera količine neapsorbiranog zračenja, definira se kao dio upadnog zračenja koji je prošao kroz otopinu. Apsorbancija otopine povećava se s prigušenjem osnovnog snopa.

Beerov zakon je funkcijski odnos između veličine mjerene apsorbancijskom metodom i one koja se određuje (koncentracija, c), a glasi:

$$A = \log\frac{P_0}{P} = abc$$

Gdje je a – konstanta proporcionalnosti tj. apsorptivnost, b – duljina puta zračenja kroz uzorak.

Kako bi se nadomjestili gubitci refleksijom te raspršenjem, najčešće se uspoređuje snaga zračenja snopa propuštenog kroz mjernu posudicu s otopinom, sa snagom snopa koji prolazi jednakom posudicom punjenom samim otapalom. Eksperimentalna apsorbancija se tako definira:

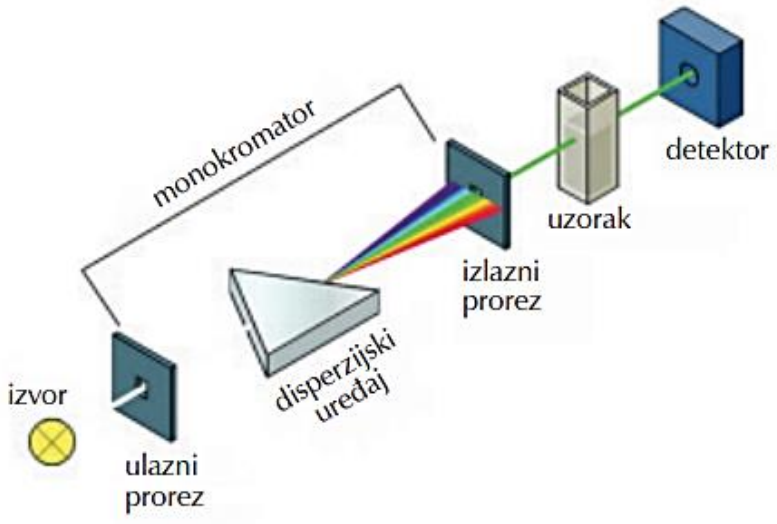
$$A = \log\frac{P_{otapalo}}{P_{otopina}} = \log\frac{P_0}{P}$$

Gdje je P_0 – snaga zračenja nakon prolaska kroz posudicu s otapalom, P – snaga zračenja nakon prolaska kroz jednaku posudicu s otopinom analita.

Većina spektroskopskih uređaja sastavljena je od pet osnovnih dijelova:

- Stabilan izvor energije zračenja,
- Selektor valnih duljina koji omogućuje izdvajanje određenog valnog područja,
- Jedan ili više spremnika za uzorke,
- Detektor zračenja ili pretvornik energije zračenja u mjerljiv signal,
- Procesor signala i uređaj za njegovo očitanje.

Prednosti spektrofotometara su lako održavanje, jednostavnost, niska cijena te robusnost.[42]



Slika 1.24. Shematski prikaz UV-Vis spektrofotometra[43]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal

Biljka ubrana na Marjanu, Split u svibnju 2019:

- *Mantisalca salmantica* L. Briq. et Cavill.

Biljka ubrana na otoku Drvenik Mali u lipnju 2018:

- *Hymenocarpos circinnatus* (L.) Savi

Biljka ubrana na Tiajrici, predio Doci i Brig, u srpnju 2018:

- *Centaurea glaberrima* Tausch

Biljke ubrane na planini Biokovo u srpnju 2017:

- *Hieracium waldsteinii subsp. biokovense* Deg. & Zahn.
- *Edraianthus pumilio* (Schult.) A. DC.
- *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb.
- *Genista radiata* L. Scop.
- *Centaurea scabiosa* L.
- *Juniperus communis* L. ssp. nana Syme
- *Chaerophyllum coloratum* L.
- *Campanula rapunculus* L.

Biljka ubrana na Klisu u srpnju 2016:

- *Centaurea alba* L.

Biljni materijal svake od biljaka prvo je prosušen na suhom i tamnom mjestu te nadalje podvrgnut izolaciji eteričnih ulja i dobivanju hidrolata.

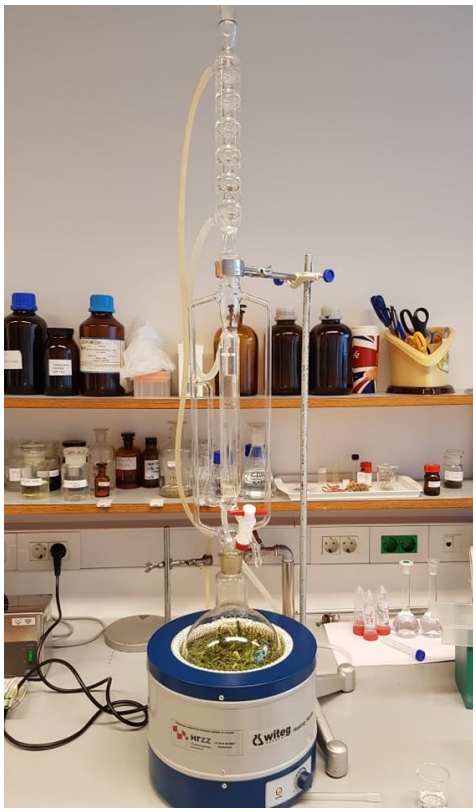
2.2. Kemikalije

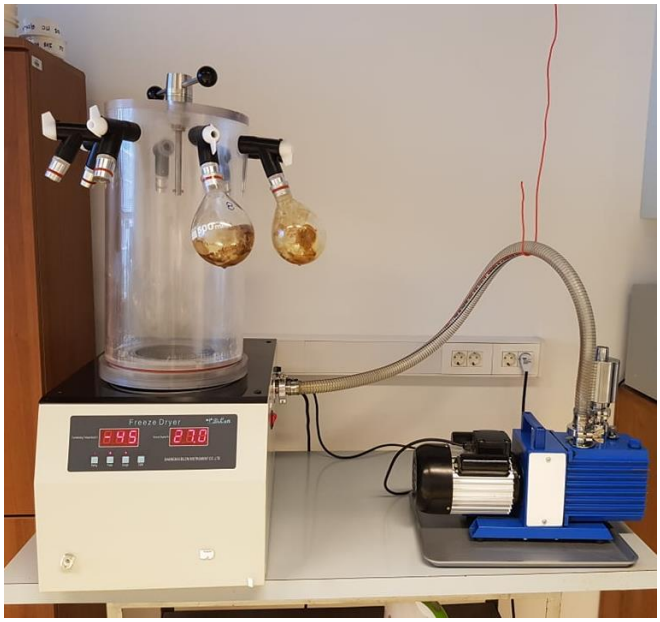
- Natrijev karbonat,bezvodni, p.a., Na_2CO_3 (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidrogenfosfat dihidrat pss, $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ (T.T.T.d.o.o., Sveta Nedelja, Hrvatska)
- Natrijev dihidrogenfosfat monohidrat p.a., $NaH_2PO_4 \times H_2O$ (T.T.T.d.o.o., Sveta Nedelja, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

- Galna kiselina, 3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina monohidrat, 99%, $C_7H_6O_5 \times H_2O$ (ThermoFisher, Kandel, Njemačka)
- Ksantin, bioultra ≥ 99% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Ksantin-oksidaza (iz goveđeg mlijeka), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Željezov(III) klorid heksahidrat, $FeCl_3 \times 6H_2O$, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Željezov(II) sulfat heptahidrat, krist. p.a., $FeSO_4 \times 7H_2O$ (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 2,4,6-tris(2-piridil)-s-tirazin (TPTZ), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Natrijev hidroksid, zrnca 1-2,5 mm, p.a. NaOH (T.T.T.d.o.o., Sveta Nedelja, Hrvatska)
- NBT (nitro tetrazol modri klorid), 98% (Alfa Aesar, Haverhill, SAD)
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)

2.3. Priprema biljnih hidrolata

Svježi biljni materijal podvrgnut je hidrodestilaciji u aparaturi po Clevengeru (slika 2.1.). Ono što je ostalo u okrugloj tikvici (voda i biljni materijal) nakon destilacije ulja je profiltrirano i ohlađeno te liofilizirano (slika 2.2.). Liofilizirani uzorci hidrolata čuvani su u staklenim bočicama na suhom i tamnom mjestu te na sobnoj temperaturi. Za potrebe istraživanja liofilizirani uzorci su otopljeni u vodi te su pripravljene otopine željenih koncentracija.





Slika 2.1. Aparatura po Clevengeru **Slika 2.2.** Liofilizator

2.4. Određivanje antioksidacijskog potencijala hidrolata odabranih biljaka

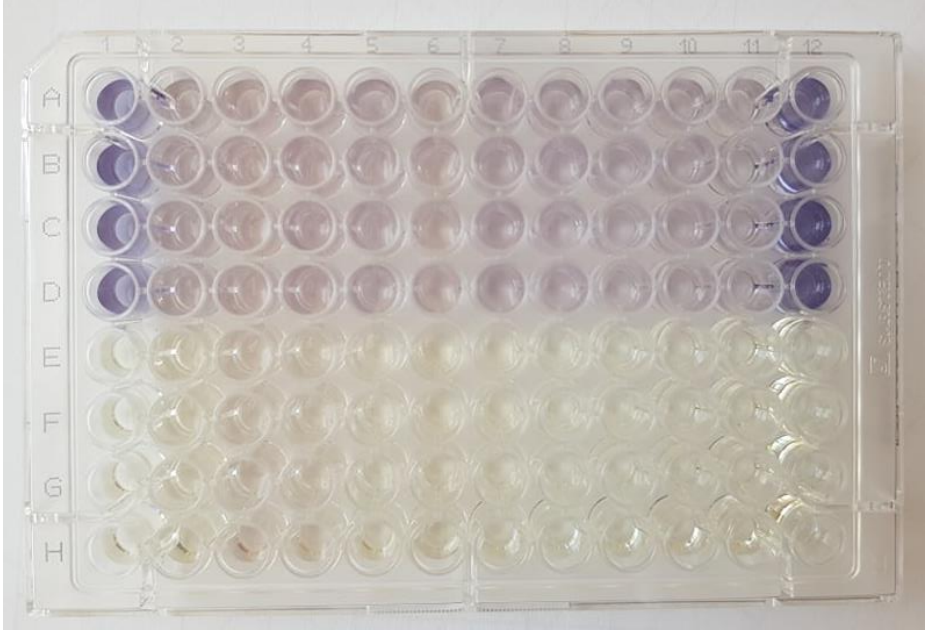
Za testiranje sposobnosti hvatanja superoksid anion radikala, enzimatskom ksantin/ksantin-oksidaza metodom, kao i sposobnosti hvatanja DPPH radikala (DPPH metoda) te redukcijske sposobnosti hidrolata odabranih biljnih vrsta korišten je BioTek Synergy HTX multi-mode čitač (slika 2.3.).

Slika 2.3. BioTek Synergy HTX multi-mode čitač

2.4.1. Sposobnosti hvatanja superoksida anion radikala, enzimatskom ksantin / ksantin-oksidaza metodom, X/XO metoda

Eksperiment se izvodio prema protokolu Nessa i sur. (2010.). Za pripremu otopina NBT i ksantin-oksidaze korišten je fosfatni pufer (0,1 M, pH=7,5). Otopljeno je 2,5 mg enzima u 10 mL fosfatnog pufera. Za pripremu otopine NBT-a, u 10 mL fosfatnog pufera otopljeno je 4,9 mg NBT-a. Kao supstrat korišten je ksantin (0,6 mg otopljeno u 10 mL 0,1 M NaOH). Kao standard u ovoj metodi korišteni su vitamin C i galna kiselina. Eksperiment se izvodio prema sljedećoj shemi:

	Kontrola µL	Uzorak µL
Pufer	50	0
NBT	50	50
Ksantin-oksidaza	50	50
Uzorak	0	50
Ksantin	50	50
	Slijepa proba u odnosu na kontrolu µL	Slijepa proba u odnosu na uzorak µL
Pufer	100	50
NBT	50	50
Ksantin-oksidaza	0	0
Uzorak	0	50
Ksantin	50	50



Slika 2.4. Mikrotitarska pločica s uzorcima tijekom testiranja sposobnosti hvatanja superoksida anion radikala hidrolatima biljaka enzimatskom ksantin/ksantin-oksidaza metodom

2.4.2. Metoda hvatanja slobodnih DPPH radikala, DPPH metoda

U jažice mikrotitarskih pločica je otpipetirano 200 µL etanolne otopine DPPH (0,04 g/L) i 10 µL uzorka. Za slijepu probu izmjerena je apsorbancija otopine DPPH bez uzorka. Apsorbancija je mjerena nakon 60 min pri valnoj duljini od 517 nm.

Sposobnost inhibicije DPPH radikala, izražen kao % inhibicije DPPH radikala, računa se prema formuli:

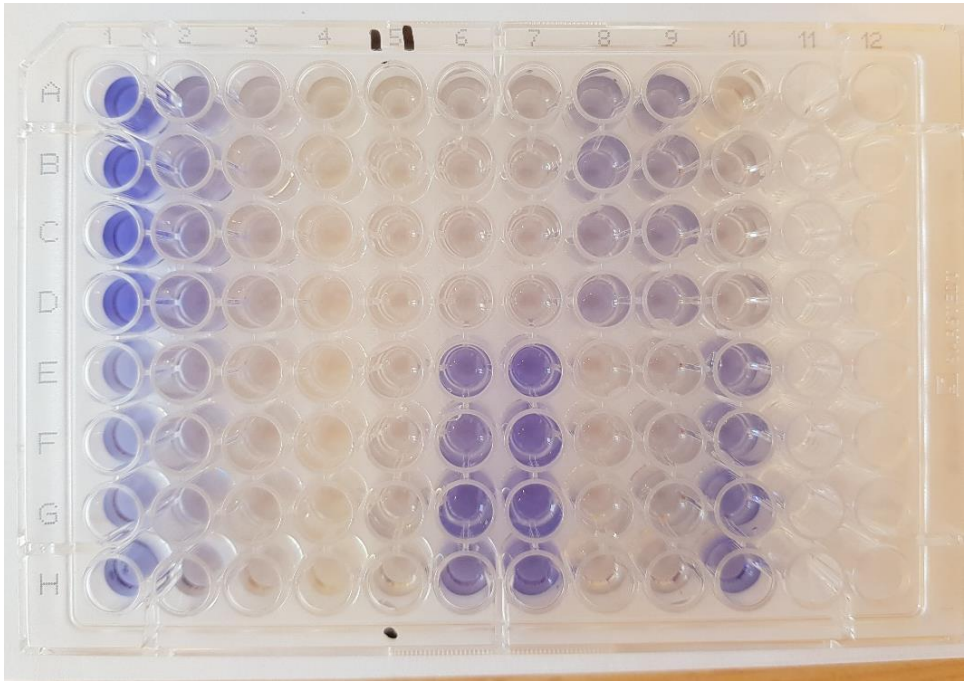
$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_{uzorka}}{A_0} * 100$$

Gdje je A_0 – apsorbancija otopine DPPH bez uzorka na početku mjerenja, A_{uzorka} – apsorbancija uzorka nakon 60 min.

Slika 2.5. Mikrotitarska pločica s uzorcima za testiranje sposobnosti hvatanja DPPH radikala uzorcima hidrolata biljaka

2.4.3. Medoda testiranja redukcijske sposobnosti hidrolata, FRAP metoda

Za FRAP metodu u jažice mikrotitarske pločice je otpipetirano 15 µL vode, 5 µL uzorka i 150 µL svježe pripremljenog FRAP reagensa. Reagens se priprema svjež i to miješanjem 25 mL 0,3 M acetatnog pufera pH=3,6; 2,5 mL otopine TPTZ (10 mM u 40 mM HCl) i 2,5 mL svježe otopine željezovog(III) klorida heksahidrata, $FeCl_3 \times 6H_2O$ (0,02 M). Nakon 8 minuta izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 593 nm. Kao standard korištena je otopina željezovog(II) sulfata heptahidrata, $FeSO_4 \times 7H_2O$ u koncentracijama 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 1, 2 mM. Rezultati su izraženi u milimolima Fe^{2+} po gramu suhe tvari uzorka (mmol Fe^{2+}/g).

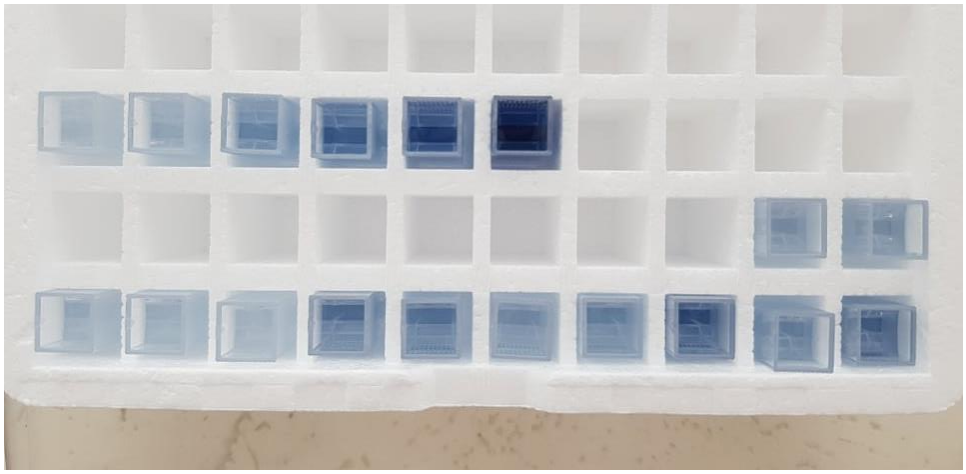


Slika 2.6. Mikrotitarska pločica s uzorcima za testiranje reduktivne sposobnosti hidrolata biljaka FRAP metodom

2.5. Određivanje sadržaja ukupnih fenola u uzorcima hidrolata

Sadržaj ukupnih fenola u biljnim hidrolatima određen je metodom po Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965)[44]. Folin-Ciocalteu reagens je pripremljen tako što je razrijeđen s vodom u omjeru 1:2. U odmjerne tikvice od 25 mL otpipetirano je 0,25 mL vodenog ekstrakta, 15 mL destilirane vode i 1,25 mL svježe pripremljenog Folin-Ciocalteu reagensa. Otopine su dobro promiješane te je dodano 3,75 mL 20% otopine Na_2CO_3 u vremenskom intervalu od 3-8 min. Tikvice su dopunjene do oznake destiliranom vodom te su ostavljene na sobnoj temperaturi 2 h. Za izradu baždarnog pravca pripremljene su otopine galne kiseline (GA) kao standarda na isti način. Galna kiselina je pripremljena u koncentracijama 25, 50, 100, 175, 250 i 500 mg/L. Apsorbancija je mjerena na valnoj duljini od 765 nm. Izrađen je baždarni pravac odnosa koncentracija pojedinih otopina galne kiseline i pripadajućih očitanih apsorbancija. Sadržaj ukupnih fenolnih komponenti uzoraka hidrolata izražen je mg ekvivalenata galne kiseline (GAE) po 1g vodenog ekstrakta.

Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih spojeva uzoraka hidrolata biljaka rađeno je na uređaju PerkinElmer, Lambda EZ 201 UV/VIS.



Slika 2.7. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih spojeva uzoraka hidrolata biljaka. Otopine galne kiseline (gornji red) poznatih koncentracija i uzorci (donji red).

3. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je testirati antioksidacijski potencijal hidrolata odabranih biljnih vrsta novopostavljenom metodom hvatanja superoksid anion radikala enzimatskom ksantin / ksantin-oksidaza metodom (X/XO metoda). Iz razloga dobivanja mjerodavnih rezultata u smislu antioksidacijskog potencijala uzorci su testirani i dodatnim dvjema metodama, metodom hvatanja DPPH radikala (DPPH metodom) i metodom testiranja redukcijskog potencijala (FRAP metoda). Obzirom da su fenolni spojevi kao sastavnice ekstrakata najučinkovitiji u smislu antioksidacijskog potencijala hidrolati su ispitani i Folin-Ciocalteu metodom s ciljem dobivanja sadržaja ukupnih fenolnih komponenti hidrolata odabranih biljnih vrsta.

3.1.1. Sposobnost hvatanja superoksid anion radikala hidrolatima odabranih biljnih vrsta, enzimatska ksantin / ksantin-oksidaza metoda

Sposobnost hvatanja superoksida anion radikala hidrolatima odabranih biljnih vrsta testirana je enzimatskom metodom ksantin / ksantin-oksidaza.[33] Naime, oksidacijom ksantina nastaju superoksid anion radikali koji nadalje reagiraju s žuto obojenim NBT-om i tvore modro-ljubičasto obojeni diformazan s maksimumom apsorpcije kod λ = 560 nm. U prisutnosti spojeva ili smjesa spojeva, kakvi su hidrolati, dolazi do inhibicije formiranja diformazana kao produkta, a time i do pada apsobrancije kod navedene valne dužine.

Kao početna koncentracija hidolata odabranih biljnih vrsta pripremljena je koncentracija 1 g/L. Za potrebe analiza načinjene su i niže koncentracije uzoraka. Kao referentni spojevi (poznato dobri antioksidansi), u ovoj metodi korišteni su galna kiselina (GA) i vitamin C (askorbinska kiselina) (tablica 3.1.).

Tablica 3.1. Sposobnost hvatanja superoksid anion radikala referentim spojevima, galnom kiselinom i vitaminom C, enzimatskom Ksantin / ksantin-oksidaza metodom.

	ɣ (g/L)	% inhibicije $O_2^{\bullet-}$
Galna kiselina	1	79,01
	0,5	80,41
	0,1	80,41
Vitamin C	1	31,46
	0,05	55,95

Galna kiselina (GA) pokazuje nešto bolju sposobnost inhibicije slobodnih superoksid anion radikala $O_2^{\bullet-}$ u odnosu na vitamin C. Tako GA kod koncentracije 1 g/L s 79,01 % gasi slobodne $O_2^{\bullet-}$ radikale, dok vitamin C iste koncentracije sa svega 31,46 % gasi slobodne $O_2^{\bullet-}$ radikale. Ono što je zanimljivo i već uočeno kod ove metode, je da oba referentna spoja pokazuju bolju sposobnost gašenja $O_2^{\bullet-}$ radikala kod nižih testiranih koncentracija. Vjerojatni razlog tome je inhibicija samog enzima ksantin-oksidaze referentnim spojevima uslijed čega se producira manje $O_2^{\bullet-}$ radikala i u konačnosti se dobivaju nemjerodavni rezultati.

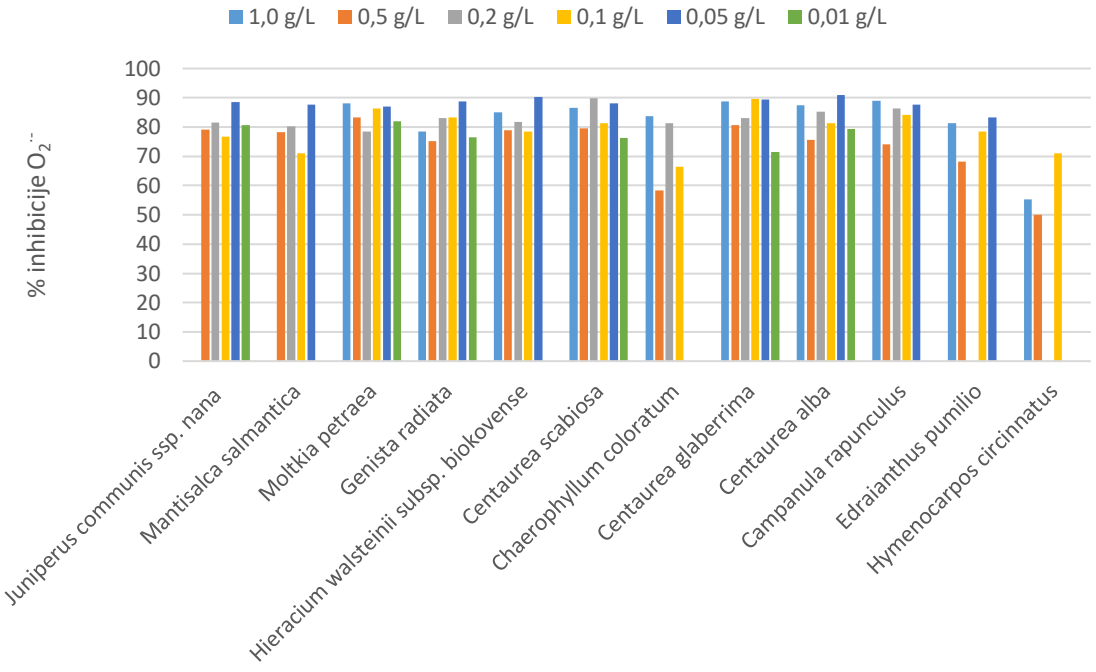
Tablica 3.2. Sposobnost hvatanja superoksid anion radikala hidrolatima odabranih biljnih vrsta, enzimatskom ksantin / ksantin-oksidaza metodom.

Biljna vrsta	ɣ (g/L)	% inhibicije $O_2^{\bullet-}$
Juniperus communis ssp. *nana*	1,0	-
	0,5	79,10
	0,2	81,42
	0,1	76,64
	0,05	88,49
	0,01	80,69
Mantisalca salmantica	1,0	-
	0,5	78,19
	0,2	80,14

	0,1	71,03
	0,05	87,73
Moltkia petraea	1,0	88,02
	0,5	83,33
	0,1	78,50
	0,2	86,44
	0,05	87,01
	0,01	82,07
Genista radiata	1,0	78,44
	0,5	75,22
	0,2	83,05
	0,1	83,18
	0,05	88,76
	0,01	76,55
Hieracium walsteinii subsp. *biokovense*	1,0	85,00
	0,5	78,97
	0,2	81,84
	0,1	78,50
	0,05	90,37
Centaurea scabiosa	1,0	86,60
	0,5	79,61
	0,2	89,83
	0,1	81,31
	0,05	88,17
	0,01	76,21
Chaerophyllum coloratum	1,0	83,78
	0,5	58,41
	0,2	81,36
	0,1	66,36
Centaurea glaberrima	1,0	88,75
	0,5	80,64

	0,2	82,98
	0,1	89,58
	0,05	89,31
	0,01	71,38
Centaurea alba	1,0	87,50
	0,5	75,69
	0,2	85,30
	0,1	81,31
	0,05	90,83
	0,01	79,31
Campanula rapunculus	1,0	88,91
	0,5	73,98
	0,2	86,44
	0,1	84,20
	0,05	87,58
Edraianthus pumilio	1,0	81,33
	0,5	68,25
	0,1	78,50
	0,05	83,18
Hymenocarpos circinnatus	1,0	55,34
	0,5	50,00
	0,1	71,03

– hidrolati stvaraju talog zbog čega nije moguće mjeriti



Slika 3.1. Histogram rezultata dobivenih enzimatskom metodom X/XO

U testiranoj koncentraciji od 1 g/L gotovo svi testirani hidrolati pokazuju dobru sposobnost hvatanja superoksid anion radikala $O_2^{\bullet-}$. Među njima najlošiju sposobnost hvatanja slobodnih $O_2^{\bullet-}$ pokazuje hidrolat biljke *Hymenocarpos circinnatus* koji s 55,34 % inhibira slobodne $O_2^{\bullet-}$, dok ostali hidrolati u rasponu 78,44 do 87,75 % inhibiraju $O_2^{\bullet-}$. Dva hidrolata (*J. communis* ssp. *nana* i *Mantisalca salmantica*) tijekom mjerenja stvaraju taloge zbog čega nije moguće mjeriti njihovu sposobnost inhibicije $O_2^{\bullet-}$. Hidrolati su također testirani na niže koncentracije u odnosu na onu od 1 g/L. Ono što se uočava kod svih uzoraka hidrolata je da uzorci pokazuju dobru i o koncentraciji neovisnu sposobnost inhibicije $O_2^{\bullet-}$. Razlog tome je vjerojatno isto kao kod referentnih spojeva, inhibicija samog enzima ksantin-oksidaza spojevima sastavnicama hidrolata uslijed čega se djelovanjem samog enzima producira manje samog superoksid anion radikala, a samim tim i dobiveni rezultati postaju nemjerodavni. Kako bi dobivene rezultate testiranja antioksidacijskog potencijala navedenom metodom mogli uzeti za mjerodavne paralelno je potrebno testirati sposobnost ovih smjesa tvari da inhibiraju sam enzim ksantin-oksidaza. Jednako, sposobnost hvatanja superoksid anion radikala trebalo bi testirati i neenzimatskom metodom.

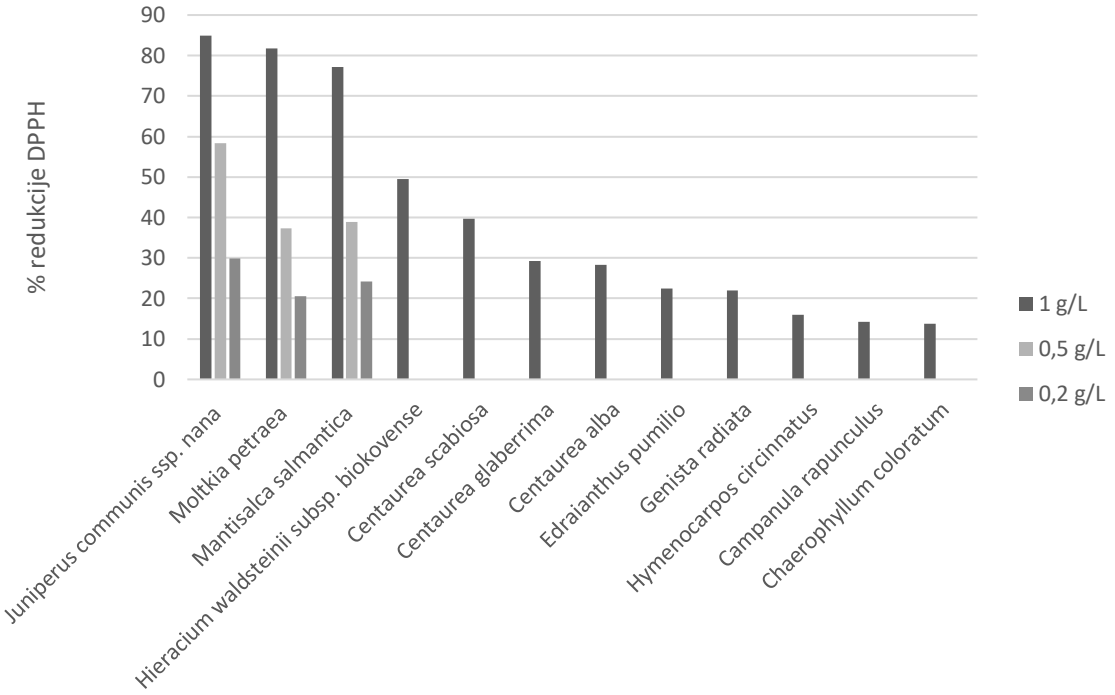
3.1.2. Metoda hvatanja slobodnih DPPH radikala, DPPH metoda

Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala hidrolatima odabranih biljaka testirana je DPPH metodom.[45]

Antioksidacijska sposobnost hidrolata dobivena metodom DPPH prikazana je u tablici 3.3. Početne koncentracije hidrolata bile su 1 g/L, a za hidrolate čiji je antioksidacijski potencijala ovom metodom kod navedene koncentracije bio veći od 50 % načinjene su, a nadalje i testirane otopine nižih koncentracija te je određena koncentracija hidrolata koja s 50 %-tnim učinkom inhibira DPPH radikale, IC_{50} vrijednost.

Tablica 3.3. Sposobnost redukcije DPPH radikala hidrolatima odabranih biljaka, DPPH metodom

Biljna vrsta	ɣ (g/L)	% redukcije DPPH
Juniperus communis ssp. *nana*	1,0	84,97
	0,5	58,36
	0,2	29,91
Moltkia petraea	1,0	81,68
	0,5	37,33
	0,2	20,61
Mantisalca salmantica	1,0	77,21
	0,5	38,95
	0,2	24,12
Hieracium waldsteinii subsp. *biokovense*	1,0	49,41
Centaurea scabiosa	1,0	39,62
Centaurea glaberrima	1,0	29,28
Centaurea alba	1,0	28,32
Edraianthus pumilio	1,0	22,38
Genista radiata	1,0	21,97
Hymenocarpos circinnatus	1,0	15,91
Campanula rapunculus	1,0	14,22
Chaerophyllum coloratum	1,0	13,81



Slika 3.2. Histogramski prikaz rezultata dobivenih DPPH metodom

Vitamin C kao poznati antioksidans pri koncentraciji 1 g/L inhibira DPPH radikale s 95,30 %. Rezultati standarda su usporedivi sa rezultatima koje daju hidrolati. Najbolju sposobnost hvatanja DPPH radikala kod koncentracije 1 g/L pokazao je hidrolat biljke *Juniperus communis* ssp. *nana* (84,97 %). Slijede *Moltkia petraea* (81,68 %) i *Mantisalca salmantica* (77,21 %). *Chaerophyllum coloratum* (13,81 %), *Campanula rapunculus* (14,22 %) i *Hymenocarpos circinnatus* (15,91 %) pokazuju najslabiju sposobnost redukcije DPPH radikala. Ostali hidrolati koncentracije 1 g/L s postotkom nižim od 50% inhibiraju DPPH radikale. Uzorci hidrolata koji u koncentraciji od 1 g/L dobro (više od 50 %) inhibiraju DPPH radikale testirani su i u nižim koncentracijama kako bi se odredila koncentracija hidrolata koja s 50%-tnim učinkom inhibira DPPH radikale (IC_{50}).

Hidrolat biljke	IC_{50} (g/L)
Mantisalca salmantica	0,8
Juniperus communis ssp. *nana*	0,4
Moltkia petraea	0,7

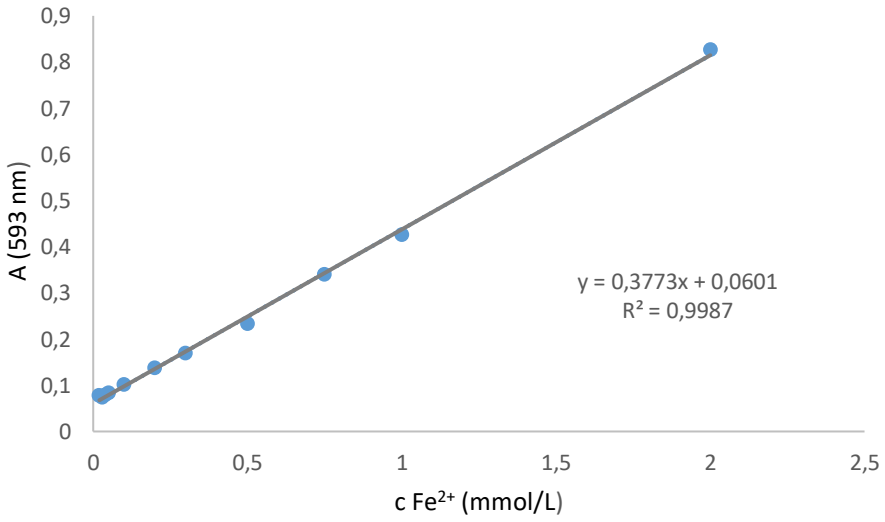
IC_{50} za hvatanje DPPH radikala hidrolatima biljaka iznosi: *Mantisalca salmantica* IC_{50} = 0,8 g/L, *Juniperus communis* ssp. *nana* IC_{50} = 0,4 g/L i *Moltkia petraea* IC_{50} = 0,7 g/L. Iz ovog se može izvesti zaključak da je hidrolat biljke *Juniperus communis* ssp. *nana* najučinkovitiji hvatač slobodnih DPPH radikala.

3.1.3. Metoda testiranja redukcijske sposobnosti hidrolata odabranih biljaka, FRAP metodom

Redukcijska sposobnost hidrolata odabranih biljnih vrsta testirana je FRAP metodom (Benzie & Strain, 1996.).[46]

Da bi odredili redukcijsku sposobnost hidrolata prvo je bilo potrebno pripremiti otopine poznatih koncentracija željezovog(II) sulfata heptahidrata i pripadajuću apsorbanciju pripravljenih otopina kod valne dužine λ = 593 nm. Na osnovu toga načini se baždarni pravac odnosa apsorbancije o koncentraciji iz kojeg se za nepoznate uzorke odredi reduktivna sposobnost, izražena kao ekvivalenti Fe^{2+} (mmol/g uzorka).

Na slici 3.3. prikazan je baždarni pravac za otopinu željezovog(II) sulfata heptahidrata i pripadajućim apsorbancijama.

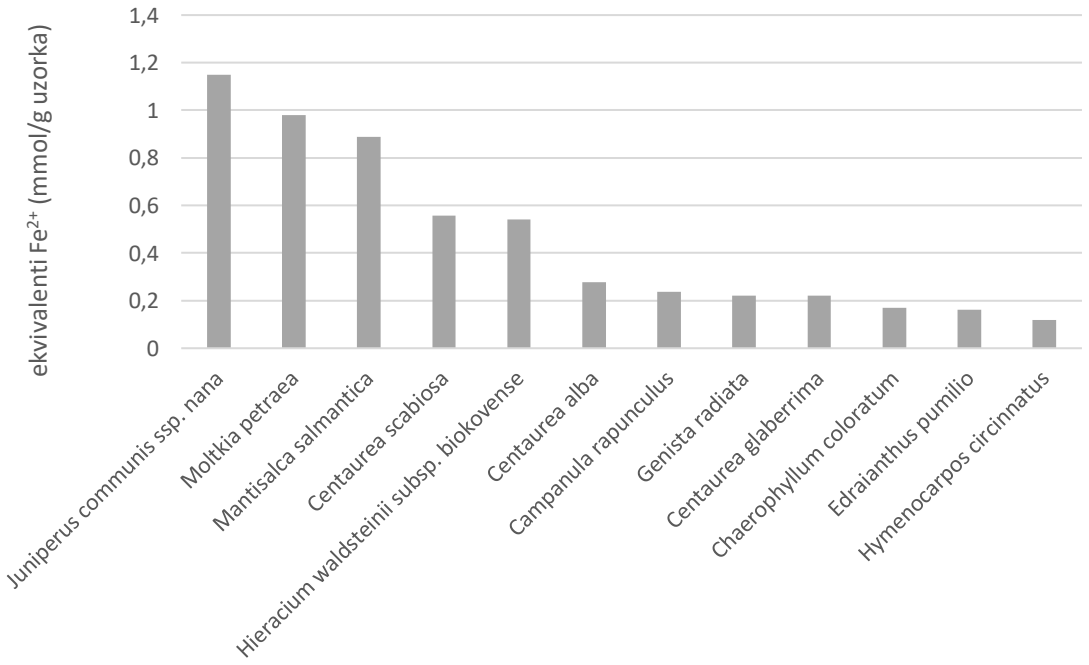


Slika 3.3. Baždarni pravac odnosa otopine poznate koncentracije Fe^{2+} iona i pripadajuće apsorbancije.

Rezultati testiranja redukcijskog potencijala hidrolata odabranih biljaka (koncentracije 1 g/L) FRAP metodom prikazani su u tablici 3.4.

Tablica 3.4. Redukcijski potencijal hidrolata odabranih biljaka testiran FRAP metodom

Biljna vrsta	Ekvivalenti Fe^{2+} (mmol/g uzorka)
Juniperus communis ssp. *nana*	1,150
Moltkia petraea	0,980
Mantisalca salmantica	0,888
Centaurea scabiosa	0,556
Hieracium waldsteinii subsp. *biokovense*	0,540
Centaurea alba	0,278
Campanula rapunculus	0,236
Genista radiata	0,222
Centaurea glaberrima	0,220
Chaerophyllum coloratum	0,169
Edraianthus pumilio	0,161
Hymenocarpos circinnatus	0,119



Slika 3.4. Prikaz rezultata dobivenih metodom FRAP

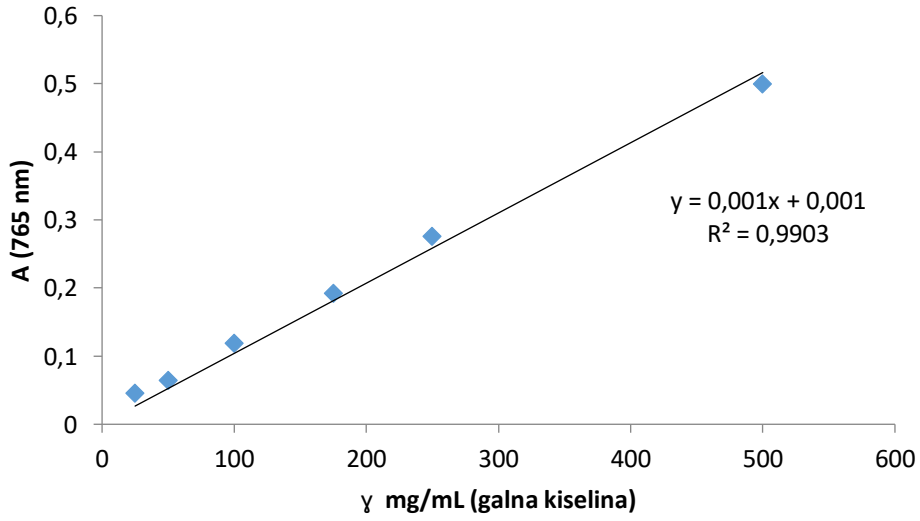
Vitamin C ima redukcijski potencijal 10 mmol Fe^{2+}/g pri koncentraciji 1 g/L što je mnogo veća vrijednost od one koju daju testirani hidrolati. Najveći redukcijski potencijal pokazao je hidrolat biljke *Juniperus communis* ssp. *nana* (1,150 mmol Fe^{2+}/g hidrolata). Slijede *Moltkia petraea* 0,980 mmol Fe^{2+}/g uzorka i *Mantisalca salmantica* 0,888 mmol Fe^{2+}/g uzorka. Najniži redukcijski potencijal pokazali su hidrolati biljaka *Edraianthus pumilio* 0,161 mmol Fe^{2+}/g uzorka i *Hymenocarpos circinnatus* 0,119 mmol Fe^{2+}/ g uzorka.

3.2. Sadržaj ukupnih fenola u hidrolatima odabranih biljnih vrsta

Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u hidrolatima odabranih biljnih vrsta određen je metodom po Folin-Ciocalteu.[44]

Da bi odredili sadržaj ukupnih fenolnih komponenti nepoznatog uzorka prvo je potrebno pripremiti otopine poznatih koncentracija fenolnog spoja, galne kiseline GA i odrediti pripadajuću apsorbanciju kod valne dužine λ = 765 nm.

Na slici 3.5. prikazan je baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji otopine galne kiseline.

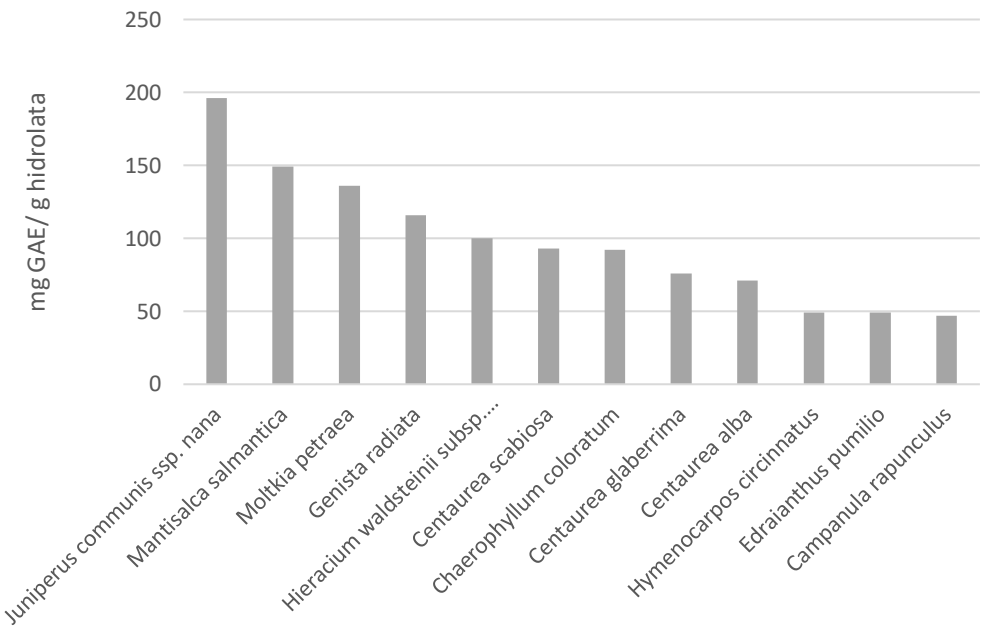


Slika 3.5. Baždarna krivulja za određivanje ukupnih fenola

Iz pravca se za nepoznate uzorke putem očitane apsorbancije odredi koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u uzorku, izražene kao mg ekvivalenata galne kiseline (GAE) po 1 g ekstrakta (mg GAE / g hidrolata), kako je prikazano u tablici 3.5.

Tablica 3.5. Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u hidrolatima odabranih biljaka

Biljna vrsta	Sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/g hidrolata)
Juniperus communis ssp. *nana*	196
Mantisalca salmantica	149
Moltkia petraea	136
Genista radiata	116
Hieracium walsteinii subsp. *biokovense*	100
Centaurea scabiosa	93
Chaerophyllum coloratum	92
Centaurea glaberrima	76
Centaurea alba	71
Hymenocarpos circinnatus	49
Edraianthus pumilio	49
Campanula rapunculus	47



Slika 3.6. Histogram rezultata ukupnih fenola

Najviši sadržaj ukupnih fenola pokazao je hidrolat biljke *Juniperus communis* ssp. *nana* (196 mg GAE/g ekstrakta). Slijede hidrolat *Mantisalca salmantica* (149 mg GAE/g ekstrakta), *Moltkia petraea* (136 mg GAE/g ekstrakta), *Genista radiata* (116 mg GAE/g ekstrakta) i *Hieracium waldsteinii* subsp. *biokovense* (100 mg GAE/g ekstrakta). Vrijednosti ispod 100 mg GAE/ g ekstrakta pokazali su hidrolati biljaka *Centaurea scabiosa* (93 mg GAE/ g ekstrakta), *Chaerophyllum coloratum* (92 mg GAE/g ekstrakta), *Centaurea glaberrima* (76 mg GAE/g ekstrakta) i *Centaurea alba* (71 mg GAE/g ekstrakta). Najniži udio fenolnih spojeva pokazali su hidrolati vrsta *Campanula rapunculus* (47 mg GAE/g ekstrakta), *Edrainathus pumilio* i *Hymenocarpos circinnatus* (obje s 49 mg GAE/g ekstrakta).

4. ZAKLJUČCI

Cilj ovog rada bio je testirati antioksidacijski potencijal hidrolata odabranih biljnih vrsta novopostavljenom metodom hvatanja superoksid anion radikala enzimatskom ksantin / ksantin-oksidaza metodom (X/XO). U svrhu usporedbe rezultata antioksidacijskog potencijala uzorci su dodatno testirani metodom hvatanja DPPH radikala (DPPH metodom) te metodom testiranja redukcijskog potencijala (FRAP metoda). Uzorci su također testirani na sadržaj ukupnih fenolnih spojeva Folin-Ciocalteu metodom.

U testiranoj koncentraciji od 1 g/L gotovo svi testirani hidrolati pokazuju dobru sposobnost hvatanja superoksid anion radikala $O_2^{\bullet-}$. Hidrolati su razrijeđeni na niže koncentracije, potom su testirani metodom ksantin / ksantin-oksidaza. Iz rezultata se može zaključiti da uzorci pokazuju dobru i o koncentraciji neovisnu sposobnost inhibicije $O_2^{\bullet-}$. Rezultati mjerenja su usporedivi s onima za referentne spojeve galnu kiselinu i vitamin C.

Najbolju sposobnost hvatanja DPPH radikala pokazao je hidrolat biljke *Juniperus communis* ssp. *nana* (IC_{50} = 0,4 g/L). Slijede *Moltkia petraea* (IC_{50} = 0,7 g/L) i *Mantisalca salmantica* (IC_{50} = 0,8 g/L).

Najbolji redukcijski potencijal korištenjem FRAP metode pokazao je hidrolat biljke *Juniperus communis* ssp. *nana* (1,150 mmol Fe^{2+}/g hidrolata). Slijede *Moltkia petraea* 0,980 mmol Fe^{2+}/g uzorka i *Mantisalca salmantica* 0,888 mmol Fe^{2+}/g uzorka.

Najviši sadržaj ukupnih fenola pokazao je hidrolat biljke *Juniperus communis* ssp. *nana* (196 mg GAE/g ekstrakta). Slijede hidrolat *Mantisalca salmantica* (149 mg GAE/g ekstrakta), *Moltkia petraea* (136 mg GAE/g ekstrakta), *Genista radiata* (116 mg GAE/g ekstrakta) i *Hieracium waldsteinii* subsp. *biokovense* (100 mg GAE/g ekstrakta). Najniži udio fenolnih spojeva pokazali su hidrolati vrsta *Campanula rapunculus* (47 mg GAE/g ekstrakta), *Edrainathus pumilio* i *Hymenocarpos circinnatus* (obje s 49 mg GAE/g ekstrakta).

Sadržaj ukupnih fenola hidrolata testiranih biljaka je u korelaciji s antioksidacijskim potencijalom testiranim DPPH i FRAP metodom.

Rezultati testiranja antioksidacijskog potencijala metodom hvatanja superoksid anion radikala enzimatskom ksantin / ksantin-oksidaza metodom nisu u korelaciji sa sadržajem ukupnih fenolnih spojeva i nisu u skladu s rezultatima dobivenim DPPH i FRAP metodom. Pretpostavka je da sami uzorci hidrolata inhibiraju enzim ksantin-oksidazu uslijed čega ne nastaje dovoljno samog superoksid anion radikala. Kako bi dobivene rezultate testiranja antioksidacijskog potencijala navedenom metodom mogli smatrati valjanim potrebno bi bilo testirati mogući inhibicijski učinak korištenih uzoraka na sam enzim ksantin-oksidazu. Ujedno bi bilo korisno ispitati sposobnost hvatanja superoksid anion radikala i nekom neenzimatskom metodom.

5. LITERATURA

1. D. Kuštrak, *Farmakognozija: fitofarmacija*, Golden marketing – Tehnička knjiga, Zagreb, **2005.**
2. L. Zhang, A. L. Demain, *Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine* (Eds.: L. Zhang, A. L. Demain), Humana Press, New Jersey, **2005.**
3. C. A. Rice-Evans, L. Pacher, *Flavonoids in Helath and Disease* (Eds.: C.A. Rice-Evans, L. Pacher), Second edition, CRC Press, New York, **2003.**
4. C. Reuben, *Antioksidansi: cjeloviti vodič*, Izvori, Zagreb, **1998.**
5. S. Kumar, D. Kumar, Manjusha, K. Saroha, N. Singh, B. Vashishta, *Acta pharm.*, **2008**, *58*, 215-220
6. https://www.plantea.com.hr/velika-zecina/ (pristupljeno 31.07.2019.)
7. T. Nikolić, M. Milović, S. Bogdanović, N. Jasprica; *Endemi u hrvatskoj flori*, Alfa, Zagreb, **2015.**
8. Č. Šilić, *Endemične biljke*, Svjetlost, Sarajevo, **1984.**
9. Flora Croatica Database: https://hirc.botanic.hr/fcd/ (pristupljeno 21.08.2019.)
10. A. Veljača, *Centaurea jacea*, *Centaurea alba* i *Centaurea scabiosa: Kemijski sastav, antioksidacijski te antikolinesterazni potencijal eteričnih ulja*, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, **2017.**
11. https://www.floravascular.com/index.php?spp=Centaurea%20alba (pristupljeno 21.08.2019.)
12. https://botany.cz/cs/mantisalca-salmantica/ (pristupljeno 14.08.2019.)
13. https://www.plantea.com.hr/zrakasta-zutilovka/ (pristupljeno 07.08.2019.)
14. http://www.cretanflora.com/hymenocarpos_circinnatus.html (pristupljeno 20.08.2019.)
15. M. Vidaković, *Četinjače: morfologija i varijabilnost*, SNL, Zagreb, **1982.**
16. H. Zrnčić, V. Zrnčić, *Bilje hrvatskih gora i planina*, Hinus, Zagreb, **2017.**
17. D. Savković, *Enciklopedija ljekovitog, korisnog i medonosnog bilja: više od 1100 domaćih i egzotičnih biljnih vrsta, voća, povrća i šumskih plodina*, Begen, Zagreb, **2017.**
18. https://hr.metapedia.org/wiki/Hrvatsko-dinarski_Hieracium#H._waldsteinii_.28H._lanifolium.29 (pristupljeno 03.09.2019.)

19. https://translate.google.com/translate?hl=sk&sl=sk&tl=en&u=https%3A%2F%2Fwww.nahuby.sk%2Fatlas-rastlin%2FHieracium-waldsteinii-subsp--biokovense%2Fjastrabnik%2Fjestrabnik-Waldsteinuv-biokovsky%2FID15680 (pristupljeno 03.09.2019.)
20. B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Fifth edition, Oxford University Press, **2015.**
21. E. Birben, U. M. Sahiner, C. Sackensen, S. Erzurum, O. Kalayci, *World Allergy Organ. J*., **2012**, *5*, 9-19
22. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, **2013.**
23. S. H. Pine, *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, **1994.**
24. https://en.wikipedia.org/wiki/Butylated_hydroxyanisole (pristupljeno 27.08.2019.)
25. https://en.wikipedia.org/wiki/Butylated_hydroxytoluene (pristupljeno 27.08.2019.)
26. M. S. Brewer, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **2011**, *10*, 221-247
27. M. Bektašević, *Kemijski i biološki profil odabranih biljnih vrsta korištenih u tradicionalnoj medicini BiH*, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, Doktorski rad, **2018.**
28. R. L. Prior, X. Wu, K. Schaich, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 4290-4302
29. J. Robak, R. J. Gryglewski, *Biochem. Pharmacol.*, **1988**, *36*, 837-841
30. C. Auclair, M. Torres, J. Hakim, *FEBS Lett.*, **1978**, *89*, 26-28
31. T. W. Kirby, I. Fridovich, *Anal. Biochem.*, **1982**, *127*, 435-440
32. https://en.wikipedia.org/wiki/Nitro_blue_tetrazolium_chloride (pristupljeno 09.10.2019.)
33. F. Nessa, Z. Ismail, N. Mohamed; *Pharm. Biol*., **2010**, *48 (12)*, 1405-1412
34. J. Teixeira, A. Gaspar, E. M. Garrido, J. Garrido, F. Borges, *BioMed Res. Int*., **2013**, *3*, 1-11
35. J. George, A. D. Struthers, *Vasc. Health Risk Manag*., **2009**, *5*, 265-272
36. P. Karlson, *Biokemija za studente kemije i medicine*, Školska knjiga, Zagreb, **1993.**
37. https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC1/17/3/2.html (pristupljeno 28.08.2019.)
38. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/3AX9 (pristupljeno 28.08.2019.)

39. http://www.aromaterra.hr/aromaterapija/aromakozmetika/hidrolati.htm (pristupljeno 30.09.2019.)
40. D. Ferenčić, D. Gluhić, S. Dudaš, *Glasnik zaštite bilja*, **2016**, *39(5)*, 44-49
41. A. Radonić, *Predavanja iz Prirodnih organskih spojeva*, Interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, **2016.**
42. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, **1999.**
43. M. Mihoci, *Kem. Ind*., **2015**, *64(11-12)*, 683-685
44. V. L. Singleton, J. A. Rossi, *Am. J. Enol. Vitic*., **1965**, *16*, 144-158
45. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, *Food Sci. Technol.*, **1995**, *28*, 25-30
46. I. Benzie, J. Strain, *Anal. Biochem*., **1996**, *239*, 70-76