

Kemijski sastav i biološka aktivnost hlapljivih ekstrakata biljaka: puzava dobričica i vazdazelena krkavina

Alerić, Anđelo

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:167:798314>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-25**

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET

KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST HLAPLJIVIH EKSTRAKATA
BILJAKA: PUZAVA DOBRIČICA I VAZDAZELENA KRKAVINA

DIPLOMSKI RAD

ANDELO ALERIĆ

Matični broj: 129

Split, listopad 2021.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE
ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

**KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST HLAPLJIVIH EKSTRAKATA
BILJAKA: PUZAVA DOBRIČICA I VAZDAZELENA KRKAVINA**

DIPLOMSKI RAD

ANDELO ALERIĆ

Matični broj: 129

Split, listopad 2021.

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

**CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF VOLATILE
EXTRACTS FROM PLANTS: GROUND IVY AND MEDITERRANEAN BUCKTHORN**

DIPLOMA THESIS

ANDELO ALERIĆ

Parent number: 129

Split, october 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet
Diplomski studij Kemija, smijer Organska kemija i biokemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada: je prihvaćena na VI. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: prof. dr. sc. Olivera Politeo
Pomoć pri izradi: prof. dr. sc. Olivera Politeo

KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST Hlapljivih Ekstrakata iz Biljaka: Puzave Dobričice i Vazdazelene Krkavine

Anđelo Alerić, 129

Sažetak:

Cilj ovog rada bio je odrediti kemijski sastav i biološki učinak hlapljivih ekstrakata biljaka puzava dobričica (*Glechoma hederacea* L.) i vazdazelena krkavina (*Rhamnus alaternus* L.). Među spojevima koji ulaze u sastav hlapljivog ekstrakta biljke puzava dobričica dominira germakren D, dok među hlapljivim spojevima biljke vazdazelena krkavina dominiraju α -pinen i linalool. Testiranje antioksidacijskog potencijala hlapljivih ekstrakata ovih biljaka provedeno je DPPH i FRAP metodom. Rezultati su pokazali da testirani ekstrakti koncentracije 1 g/L pokazuju veoma slabu ili nikakvu antioksidacijsku aktivnost testiranu DPPH i FRAP metodom. Testiranje inhibicijskog potencijala hlapljivim ekstraktima ovih biljaka koncentracije 1 g/L provedeno je na enzime AChE i BChE metodom po Ellmanu te na enzim α -glukozidazu metodom po Brueggemanu i Hollingsworthu. Uzorak hlapljivog ekstrakta biljke puzava dobričica pokazuje dobru sposobnost inhibicije AChE, dok ekstrakt vazdazelene krkavine slabije inhibira AChE. Ekstrakt biljke puzava dobričica slabo inhibira enzim BChE, dok ekstrakt biljke vazdazelena krkavina ne inhibira BChE. Hlapljivi ekstrakt biljke puzava dobričica pokazuje dobru sposobnost inhibicije enzima α -glukozidaza, dok ekstrakt biljke vazdazelena krkavina nije pokazao inhibiciju ovog enzima.

Ključne riječi: *Glechoma hederacea*, *Rhamnus alaternus*, GC-MS, DPPH, FRAP, ChE, α -glukozidaza.

Rad sadrži: 68 stranica, 16 tablica, 29 slika, 1 dijagram itd.

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. doc. dr. sc. Lea Kukoč-Modun – predsjednik
2. doc. dr. sc. Franko Burčul – član
3. prof. dr. sc. Olivera Politeo – mentor

Datum obrane: 29. listopada, 2021.

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 Split
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. 6.
Mentor: Full professor Olivera Politeo, PhD
Technical assistance: Full professor Olivera Politeo, PhD

CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF VOLATILE EXTRACTS FROM PLANTS: GROUND IVY AND MEDITERRANEAN BUCKTHORN

Anđelo Alerić, 129

Abstract:

Aim in the thesis was to determine chemical composition and biological effect of the volatile extracts from plants such as ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) and mediterranean buckthorn (*Rhamnus alaternus* L.). Of all the chemical compounds that constitute volatile extract from ground ivy, germacrene D is the most abundant. While chemical compounds like α -pinene and linalool represent two most abundant constituents in the volatile extract of mediterranean buckthorn. Antioxidant potential tests of these volatile extracts were conducted using the DPPH and FRAP assays. Results have shown that extracts with concentration of exactly 1 g/L, tested using DPPH and FRAP assays, display either very small or no antioxidant activity. Testing of the inhibition potential of those volatile extracts with same concentration (1 g/L), was conducted by the Ellman's method for enzymes AChE and BChE, and the Brueggan-Hollingsworth method for α -glucosidase. Sample of a volatile extract from ground ivy exhibits very good ability to inhibit AChE, while the extract from mediterranean buckthorn shows weaker ability to inhibit said enzyme. Extract from ground ivy inhibits BChE poorly, while extract from mediterranean buckthorn has no ability to inhibit BChE. Volatile extract from ground ivy inhibits α -glucosidase well, but the extract from mediterranean buckthorn doesn't inhibit this enzyme.

Keywords: *Glechoma hedracea*, *Rhamnus alaternus*, GC-MS, DPPH, FRAP, ChE, α -glucosidase.

Thesis contains: 68 pages, 16 tables, 29 pictures, 1 diagram etc.

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|---|----------------|
| 1. Assistant professor Lea Kukoč-Modun, PhD | – chair person |
| 2. Assistant professor Franko Burčul, PhD | – member |
| 3. Full professor Olivera Politeo, PhD | – supervisor |

Defence date: 29th October 2021.

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

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za Biokemiju, Kemijsko – tehnočoškog fakulteta u Splitu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Olivera Politeo, u razdoblju od svibnja do srpnja 2021. godine.

Rad je napravljen zahvaljujući opremi financiranoj EU projektom pod nazivom “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).

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Oliveri Politeo na na pruženoj prilici, te na pomoći, savjetima i strpljenju pri izvedbi eksperimentalnog dijela, te pri samoj izradi ovoga rada.

Također se zahvaljujem svim prijateljima i kolegama koji su bili uz mene.

Posebno se zahvaljujem mojim roditeljima što su uvijek vjerovali u mene i podržavali me tijekom cijelog studija.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Zadatak ovog rada je odrediti kemijski sastav i biološki učinak hlapljivih ekstrakata biljaka Puzava dobričica (*Glechoma hederacea* L.) i Vazdazelena krkavina (*Rhamnus alaternus* L.),
- Izolacija hlapljivih ekstrakata rađena je iz prethodno osušenog biljnog materijala biljaka sakupljenih u vrijeme cvatnje biljke, hidrodestilacijom u aparaturi po Clevenger-u.
- Analiza kemijskog sastava i sadržaja pojedinih komponenti hlapljivih ekstrakata provedena je uz pomoć spregnutog sustava plinska kromatografija sa masenom spektrometrijom (GC-MS).
- Antioksidacijska sposobnost hlapljivih ekstrakata biljaka testirana je spektrofotometrijski dvijema metodama: DPPH i FRAP. Inhibicijski učinak ekstrakata na enzime AChE i BChE testiran spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu, dok je učinak na enzim α -glukozidazu testiran spektrofotometrijskom metodom po Brueggeman – Hollingsworth-u.

SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je odrediti kemijski sastav i biološki učinak hlapljivih ekstrakata biljaka puzava dobričica (*Glechoma hederacea* L.) i vazdazelena krkavina (*Rhamnus alaternus* L.). Među spojevima koji ulaze u sastav hlapljivog ekstrakta biljke puzava dobričica dominira germakren D, dok među hlapljivim spojevima biljke vazdazelena krkavina dominiraju α -pinen i linalool. Testiranje antioksidacijskog potencijala hlapljivih ekstrakata ovih biljaka provedeno je DPPH i FRAP metodom. Rezultati su pokazali da testirani ekstrakti koncentracije 1 g/L pokazuju veoma slabu ili nikakvu antioksidacijsku aktivnost testiranu DPPH i FRAP metodom. Testiranje inhibicijskog potencijala hlapljivim ekstraktima ovih biljaka koncentracije 1 g/L provedeno je na enzime AChE i BChE metodom po Ellmanu te na enzim α -glukozidazu metodom po Brueggemanu i Hollingsworthu. Uzorak hlapljivog ekstrakta biljke puzava dobričica pokazuje dobru sposobnost inhibicije AChE, dok ekstrakt vazdazelene krkavine slabije inhibira AChE. Ekstrakt biljke puzava dobričica slabo inhibira enzim BChE, dok ekstrakt biljke vazdazelena krkavina ne inhibira BChE. Hlapljivi ekstrakt biljke puzava dobričica pokazuje dobru sposobnost inhibicije enzima α -glukozidaza, dok ekstrakt biljke vazdazelena krkavina nije pokazao inhibiciju ovog enzima.

Ključne riječi: *Glechoma hederacea*, *Rhamnus alaternus*, GC-MS, DPPH, FRAP, ChE, α -glukozidaza.

SUMMARY

Aim in the thesis was to determine chemical composition and biological effect of the volatile extracts from plants such as ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) and mediterranean buckthorn (*Rhamnus alaternus* L.). Of all the chemical compounds that constitute volatile extract from ground ivy, germacrene D is the most abundant. While chemical compounds like α -pinene and linalool represent two most abundant constituents in the volatile extract of mediterranean buckthorn. Antioxidant potential tests of these volatile extracts were conducted using the DPPH and FRAP assays. Results have shown that extracts with concentration of exactly 1 g/L, tested using DPPH and FRAP assays, display either very small or no antioxidant activity. Testing of the inhibition potential of those volatile extracts with same concentration (1 g/L), was conducted by the Ellman's method for enzymes AChE and BChE, and the Brueggan-Hollingsworth method for α -glucosidase. Sample of a volatile extract from ground ivy exhibits very good ability to inhibit AChE, while the extract from mediterranean buckthorn shows weaker ability to inhibit said enzyme. Extract from ground ivy inhibits BChE poorly, while extract from mediterranean buckthorn has no ability to inhibit BChE. Volatile extract from ground ivy inhibits α -glucosidase well, but the extract from mediterranean buckthorn doesn't inhibit this enzyme.

Keywords: *Glechoma hederacea*, *Rhamnus alaternus*, GC-MS, DPPH, FRAP, ChE, α -glucosidase.

SADRŽAJ

UVOD.....	1
1 OPĆI DIO	3
1.1 Aromatično bilje i eterična ulja.....	4
1.1.1 Kemijski sastav eteričnih ulja	5
1.1.2 Metode izolacije.....	6
1.1.3 Metode analize	9
1.2 Oksidacijski stres	14
1.2.1 Slobodni radikali	15
1.2.2 Antioksidansi	17
1.3 Općenito o enzimima	19
1.3.1 Acetilkinesteraza.....	19
1.3.2 Butirilkinesteraza	22
1.3.3 Alzheimerova bolest	23
1.3.4 α -glukozidaza.....	24
2 EKSPERIMENTALNI DIO	25
2.1 Biljni materijal	26
2.1.1 Puzava dobričica (<i>Glechoma hederacea</i> L.)	26
2.1.2 Vazdazelene krkavine (<i>Rhamnus alaternus</i> L.)	28
2.2 Izolacija eteričnog ulja iz biljnog materijala hidrodestilacijom	30
2.3 Određivanje kemijskog sastava eteričnih ulja – GC-MS	31
2.4 Određivanje antioksidacijske aktivnosti – DPPH metodom	33
2.5 Određivanje antioksidacijske aktivnosti – FRAP metodom	36
2.6 Ellman-ova metoda	39
2.6.1 Ispitivanje sposobnosti inhibicije acetilkolinesterze (AChE)	40
2.6.2 Ispitivanje sposobnosti inhibicije butirilkolinesterze (BChE)	41
2.7 Ispitivanje inhibicije α -glukozidaze	43
3 REZULTATI I RASPRAVA	45
3.1 Kemijski sastav eteričnih ulja	46
3.1.1 Kemijski sastav eteričnog ulja puzave dobričice	47
3.1.2 Kemijski sastav hlapljivog ekstrakta vazdazelene krkavine	50
3.2 Antioksidacijska aktivnost hlapljivih ekstrakata.....	53
3.3 Inhibicijski potencijal hlapljivih ekstrakata na AChE i BChE.....	55
3.4 Inhibicijski potencijal hlapljivih ekstrakata na enzim α -glukozidazu.....	57
4 ZAKLJUČAK	59
5 LITERATURA	62

UVOD

Puzava dobričica pripada porodici usnača (*Lamiaceae*). Zeljasta je trajnica s puzavom stabljikom i uspravnim cvjetnim ograncima. Naraste do 50 cm. Vazdazelena krkavina je grm ili niže stablo iz porodice krkavina *Rhamnaceae*. Naraste od 1 m do 5 m tvoreći gustu i okruglu krošnju. U RH dobričica raste u unurašnjiosti s kontinentalnom klimom, dok vazdazelena krkavina nastanjuje jadransku obalu i otoke.

Eterična ulja su hlapljivi biljni ekstrakti, sekundarni metaboliti, u čiji sastav najčešće ulaze terpeni, fenilpropanski derivati i ostali spojevi. Terpeni se inače mogu podjeliti prema broju izoprenskih jedinica u njihovoj strukturi od kojih u sastav ulja najčešće ulaze monoterpeni i seskviterpeni. Eterična ulja se danas koriste u kozmetičkoj industriji u proizvodnji parfema, u prehrambenoj industriji kao konzervansi zbog njihovih antioksidacijskih svojstava. Također se koriste u farmaceutskoj industriji, te aromaterapiji.

Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti određenih tvari vrlo je važna, jer se tako dobivaju nove informacije o novim potencijalnim egzogenim antioksidansima. Antioksidansi su kemijski spojevi koji reduciraju slobodne radikale u stanicama nekog organizma. Slobodnim radikalima smatramo svaku tvar koja ima jedan ili više slobodnih, nesparenih i delokaliziranih elektrona u vanjskoj ljusci. Zbog njihove reaktivnosti, ako ih nastaje mnogo i nastaju nekontrolirano, mogu dovesti do oštećenja bilo koje od važnih biomolekula u stanici što rezultira razvojem malignih i patogenih stanja. Reaktivne kisikove i dušikove vrste najbolji su primjer slobodnih radikala. Veoma često se antioksidacijska oštećenja biomolekula dovode u korelaciju s pojavom patoloških stanja, kakva su Alzheimerova demencija i dijabetes.

Od velike je važnosti ispitivanje sposobnosti inhibicije enzima kolinesteraza, jer se inhibitori ovih enzima često koriste kao lijekovi za tretiranje simptoma Alzheimerove bolesti. U ovom se radu promatrala sposobnost hlapljivih ekstrakata biljaka puzava dobričica i vazdazelena krkavina da inhibiraju enzime acetilkolinesterazu (AChE) i butirilkolinesterazu (BChE). α -Glukozidaza je enzim koji hidrolizira više šećere, polisaharide do jednostavnog monomera glukoze kidanjem α -glukozidne veze. Na takav se način omogućuje apsorpcija glukoze kroz enterocite u krv i dolazi do rasta glukoze u krvi. Ispitivanje inhibicije ovog enzima je od velikog značaja jer se potencijalno baš taj proces inhibicije može koristiti u tretiranju bolesti dijabetesa tipa II.

1 OPĆI DIO

1.1 Aromatično bilje i eterična ulja

Kada govorimo o eteričnim uljima (engl. *essential oils*) mislimo na različite složene smjese hlapljivih kemijskih spojeva koje karakterizira specifičan i intenzivan miris. Uglavnom su bezbojna, žuta ili rjeđe tamnosmeđa, a neka specifična i rjeđa ulja mogu biti neke druge zanimljive boje, kao što je npr. modro ulje kamilice. Eterična ulja se uglavnom dobivaju različitim fizikalnim postupcima izolacije ili ekstrakcije. Dosta aromatičnih biljaka također imaju ljekovita svojstva, te su uglavnom korisne biljke. Većinom se koriste kao začini, u tradicionalnoj medicini, aromaterapiji, u kozmetičkoj industriji itd. Iako je dokazano ljekovito djelovanje određenih eteričnih ulja npr. u aromaterapiji, danas imaju važnu ulogu kao korigensi (1).

Iz perspektive biljne fiziologije, eterična ulja smatramo sekundarnim metabolitima biljaka. Nastaju primarno u plastidima, ali i u protoplazmi biljnih stanica u različitim metaboličkim putevima prilikom disimilacijske izmjene tvari. Neke od najvažnijih porodica aromatičnih biljaka su Umbelliferae, Myrtaceae, Rutaceae, Lamiaceae, Pinaceae, Compositae i dr. Eterična ulja se mogu naći u gotovo svim organima biljke: cvjetovima, listovima i stabljici, plodovima, kori, podanku i sjemenju. Eterično ulje se nikada ne nalazi u samoj protoplazmi biljne stanice, već je pohranjeno u različitim biljnim tvorevinama koje mogu spadati u dvije kategorije tzv. spremnice: endogene i egzogene spremnice (2).

Uloga samih eteričnih ulja još nije u potpunosti jasna. Neke od potencijalno važnih su uloga u biljnim interakcijama, zaštita od predatora kao što su insekti ili gljivica, te privlačenje oprašivača. Isto tako smatra se da eterično ulje smanjuje transpiraciju kada se biljka nalazi u sušnim uvjetima (3).

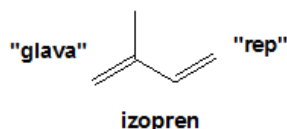
Prema načinu dobivanja eterična se ulja dijele na:

- Prirodna – dobivena su direktno iz biljnog materijala, raznim postupcima;
- Prirodno-identična – komponente su proizvedene sintezom, a svojim fizikalnim, kemijskim i drugim svojstvima jednaki su prirodnim uljima;
- Umjetna – proizvedena sintezom i nema ih u prirodi.

1.1.1 Kemijski sastav eteričnih ulja

Eterična ulja kao složene smjese različitih kemijskih spojeva mogu sadržavati čak i do 150 različitih komponenata. Ako se promatra građa njihova ugljikovog kostura, može se uvidjeti da se te komponente dijele se u tri osnovne skupine: terpeni, fenilpropanski derivati i ostali (1).

Terpeni su po svojoj strukturi nezasićeni ugljikovodici. Uglavnom se radi o lako hlapljivim kemijskim spojevima koji su svoj naziv dobili prema terpentinu koji je dobiven destilacijom smole bora, a osnovne su komponente kod većine eteričnih ulja. Zovu se i izoprenoidi zbog njihove zajedničke strukturne jedinice izoprena (2-metil-buta-1,3-diena) koji u svome sastavu ima 5 ugljikovih atoma. To je primjetio Wallach 1881. godine, pa je predložio građu terpena, takvu da slijede tzv. "izoprensko pravilo". Prema tom pravilu, terpeni mogu biti pravilni („glava na rep“) ili nepravilni („glava na glavu“ ili „rep na rep“) (1)(3).



Slika 1.1. Struktura izoprena

Terpeni se dijele u različite grupe s obzirom na broj izoprenskih jedinica povezanih u strukturi molekule, a sastav eteričnih ulja uglavnom čine hlapljive komponente ($t_v < 250^\circ\text{C}$): semiterpeni, monoterpeni i seskviterpeni, ali ponekad i slabije hlapljive diterpenske komponente.

Tablica 1.1. Podijela terpena prema broju izoprenskih jedinica u njihovoj strukturi (3).

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

Fenilpropanski derivati (engl. *phenylpropane derivatives*) su organski spojevi koji u svojoj strukturi sadrže benzenski prsten na koji je spojen bočni propanski lanac. Prema funkcijskim skupinama pojavljuju se kao aldehidi, kiseline, fenoli, fenileteri koji se izvode iz cimetine kiseline. U relativno visokim koncentracijama pronalazimo ih u eteričnim uljima biljaka kao što su neke iz porodice Apiaceae, u muškatnom oraščiću, itd. Fenilpropanske komponente koje imaju skraćene bočne lance čine posebnu, odvojenu skupinu. U nju ulaze različite fenilkarboksilne kiseline, fenoli i kumarini (3).

Ostali spojevi koji mogu tvoriti eterična ulja uglavnom su alifatski ugljikovodici, te mnogi njihovi derivati koji u svom sastavu mogu sadržavati kisik, a rjeđe dušik i sumpor. Eterična ulja izolirana biljaka koje pripadaju porodici Asteraceae često sadržavaju acetilenske derivate, dok se uljima gorušice mogu pronaći izotiocijanati, nitrili, tiocijanati, epitionitrili i vinil-oksazolidintioni (3).

1.1.2 Metode izolacije

Sirovine za izolaciju eteričnog ulja i hlapljive kemijske mogu biti različiti dijelovi biljaka: korijen, stabljika, list, cvijet, sjeme i dr. Da bi se ustanovili kemijska priroda i sastav, koriste se različite metode izolacije i koncentracije eteričnih ulja. U industrijskoj proizvodnji tih ulja, te u različitim organskim laboratorijima uglavnom su korištene destilacija i ekstrakcija s organskim otapalima, kao metode izolacije.

Eterična ulja procesom hidrodifuzije izlaze do površine bilnog materijala, a taj se proces je vrlo spor i može vrlo lako ubrzati rezanjem tj. usitnjavanjem biljnog materijala. Apsolutno je od velike važnosti i sam način na koji se biljni materijal skladišti prije usitnjavanja. Neadekvatno skladištenje često može rezultirati značajnim gubicima s obzirom na prinos, ali i do samih kemijskih promjena komponenata u sastavu eteričnih ulja. Ako se skladištenje provodi dugo vremena različiti dijelovi biljaka mogu različitom brzinom gubiti eterična ulja. Tako nadzemni i zeljasti dijelovi mogu izgubiti više eteričnog ulja od sjemenki, korijenja i drvenastih dijelova kroz određeno vrijeme (3).

1.1.2.1 Destilacija

Jedna od metoda koja se koristi za izolaciju eteričnih ulja iz biljnog materijala je destilacija. Sam proces destilacije temelji se na Daltonovom zakonu parcijalnih tlakova. Pa tako organski kemijski spojevi koji su komponente eteričnih ulja, a inače ne miješaju s vodom (netopljivi u vodi), isparavati će zajedno s vodenom parom i to na temperaturi nižoj od one njihovog vrećišta tj. nižoj od 100 °C (4).

Naspram ostalih metoda izolacije destilacija ima niz prednosti, kao na primjer to što nehlapljivi spojevi ne mogu raditi nikakve interferencije kod analiza, jer takvi spojevi ne mogu biti izolirani samom destilacijom. Destilacije se mogu podijeliti s obzirom na kontakt između biljnog materijala / vode / vodene pare na tri vrste:

- vodena destilacija (hidrodestilacija),
- vodeno-parna destilacija, i
- parna destilacija.

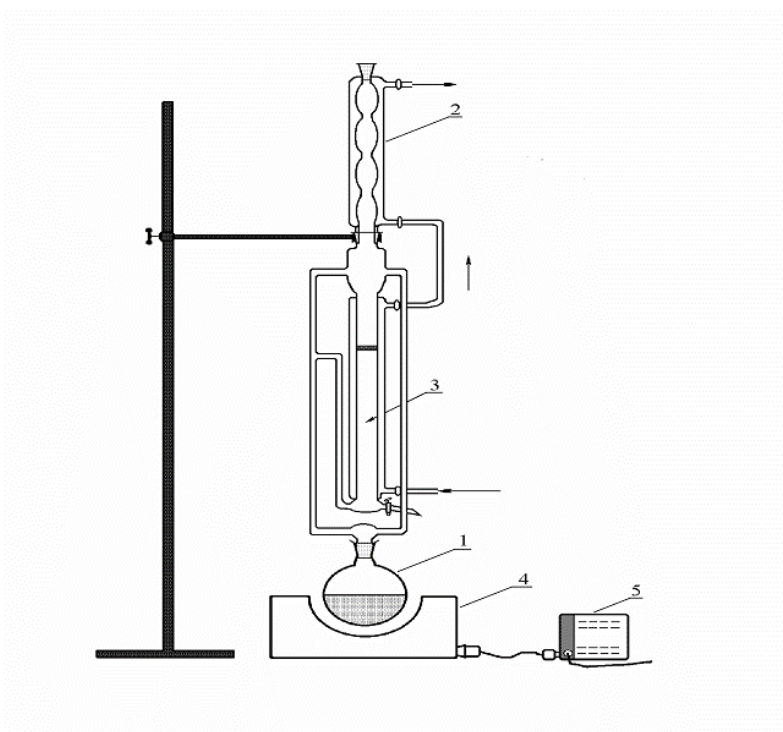
Hidrodifuzija i hidroliza su procesi koji imaju veliku važnost za vrijeme provođenja destilacije. Za vrijeme destilacije hidrodifuzija se smatra glavnim procesom. Sirovina tj. biljni materijal prije destilacije mora biti usitnjen, te tada dolazi do pojave da se eterično ulje s površine odmah destilira, dok dio tek počinje destilirati kada kada procesom hidrodifuzije dođe do površine biljnog materijala. Često na visokim temperaturama može doći do hidrolize nestabilnih komponenti eteričnih ulja u tzv. procesu nastajanja artefakata (4) (5).

1.1.2.1.1 Vodena destilacija (Hidrodestilacija)

Hidrodestilacija se smatra jednom od najstarijih metoda za izolaciju eteričnih ulja. To je ujedno i najčešće korištena metoda izolacije eteričnih ulja (4). Na početku procesa hidrodestilacije sirovina tj. biljni materijal miješa se s vodom, te se potom smjesa zagrijava do vrenja, a izvodi se uglavnom pri normalnom atmosferskom tlaku. U dijelu koji se zagrijava (npr. tikvica s okruglim dnom) nastaju pare te one odlaze u hladilo, koje može biti različitih izvedbi, gdje se one kondenziraju, te se na taj način destilat sakuplja. Tada, nakon sakupljanja, eterično ulje se odvaja od vode na temelju razlika u gustoći.

Pri usitnjavanju biljnog materijala treba se paziti na veličinu tj. granulaciju, što znači da materijal nebi trebao biti ni premalo, ali ni previše usitnjen. Premalo usitnjen materijal može dovesti do dužeg vremena destilacije, većih troškova i veće potrošnje energije, dok previše usitnjen materijal tijekom destilacije može rezultirati nastajanjem artefakata.

Danas se koriste mnoge različite izvedbe aparatura za destilaciju. One se uglavnom razlikuju na mnogo načina, ali najbitnija razlika je u tome da li se planira koristiti za izolaciju eteričnih ulja koja su lakša ili pak teža od vode. Za izolaciju eteričnih ulja hidrodestilacijom mogu se koristiti neke od standardnih laboratorijskih aparatura kao što su: aparatura po Ungeru, aparatura prema europskoj farmakopeji, aparatura po Clevenger-u, te razne modifikacije ovih aparatura. Pri izolaciji eteričnih ulja u ovom radu koristila se modificirana aparatura po Clevenger-u (3).



Slika 1.2. Aparatura po Clevengeru.

(1. tikvica s okruglim dnom; 2. povratno hladilo; 3. prostor za prihvat destilata; 4. kalota za zagrijavanje, 5. reostat)

1.1.3 Metode analize

Danas se za određivanje sastava eteričnih ulja koriste različite analitičke tehnike među kojima su kromatografija, masena spektrometrija, ali i spektroskopske tehnike: IR-spektroskopija, UV/VIS spektrofotometrija i NMR. Od svih ovih navedenih metoda, najčešće se koristi plinska kromatografija s različitim detektorima, kao spregnuti sustav plinske kromatografije i spektrometra masa (GC-MS) (5).

1.1.3.1 Kromatografija

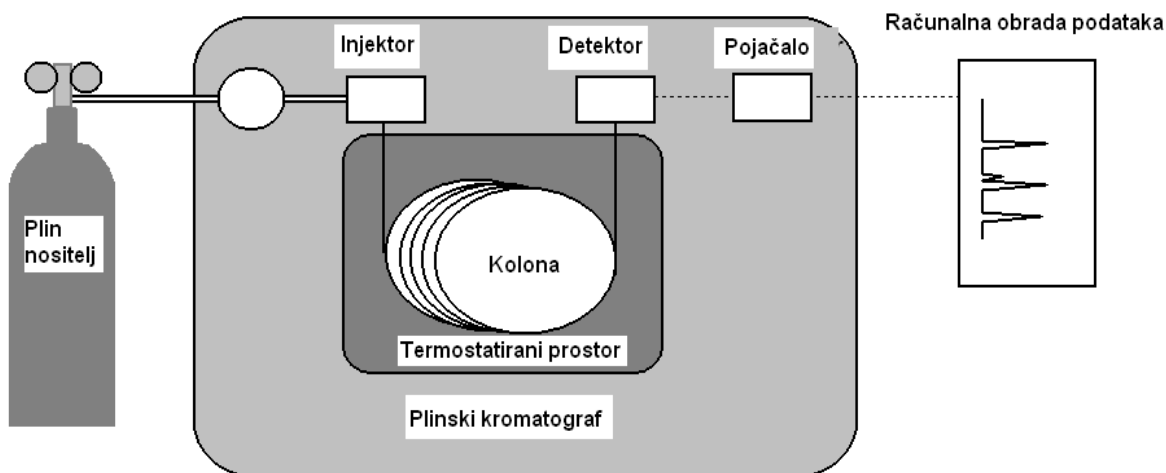
Kromatografijom nazivamo analitičku tehniku kojom se vrši odvajanje komponenti neke smijese, a nakon toga provodi se njihova identifikacija tj. kvalitativno i kvantitativno određivanje (5). Ruski kemičar Mihail Semjonovič Cveta uveo je taj naziv 1906. godine. Te ju je koristio za odjeljivanje biljnih pigmenta (4). Zbog brže i efikasnije analize kromatografija ima prednost nad ostalim analitičkim tehnikama. Separacija komponenata kod kromatografskih tehnika zasniva se na raspodjeli tih istih komponenata iz smijese između mobilne i stacionarne faze.(3) Kromatografija se zapravo provodi tako da se smjesa otapa u mobilnoj fazi i prevodi preko stacionarne faze.

Stacionarna faza je nepokretna i najčešće se radi o krutini ili o kapljevini nanesej na kruti nosač, mobilna faza je pokretna i uglavnom se radi o fluidu (kapljevina ili plin nosioc). Mobilna faza ide preko stacionarne faze pod utjecajem nekih sila kao što su npr. kapilarne sile, sila teža, razlike tlakova itd. Cijeli se proces temelji na ravnoteži nekog spoja između dviju faza, ali dolazi do narušavanja te ravnoteže zbog gibanja spoja u smjeru mobilne faze. Tako svaka komponenta smjese, odnosno kemijski spoj ima specifičnu interakciju sa stacionarnom fazom, što kao posljedicu ima različite brzine prolaska za različite komponente koje se zbog toga odjeljuju. Separacija se također temelji se na mnoštvo načela, kao što su: adsorpcija, razdjeljenje, difuzija, ionskoj izmjena, kiralnosti i dr. (4)(5).

1.1.3.1.1 Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) je separacijska metoda koja se danas najučestalije koristi. Ona je izvrsna separacijska ali i analitička tehnika, jer nisu potrebni nikakvi preparacijski koraci i prethodne operacije. Vrlo je učinkovita kada su dostupne vrlo male količine uzoraka.

Komponente većine plinskih kromatografa su boca i ventili za uvođenje plina nosioca, injekcijski blok, kromatografske kolone sa određenom stacionarnom fazom koja se nalazi u termostatiranom prostoru, različiti detektori, pojačala signala, te računala s odgovarajućim programom. Uzorci (smijese, eterična ulja itd.) moraju biti lako isparljivi, kako bi trenutno isparili u injektoru, ali naravno i dovoljno stabilni na radnoj temperaturi kolone. Injekcijskom špricom uzorak se unosi vrlo brzo u injekcijsku kolonu. Plin nositelj tj. mobilna faza koji je inertan plin (H_2 , N_2 , He, Ne, Ar) eluira komponente do kromatografske kolone, gdje dolazi do separacije i odlaska prema detektoru. U kapilarnoj koloni nalazi se stacionarna faza koje je nehlapljiva kapljevina nanescena u tankom mikrometarskom filmu na kruti nosač koje je vezan na unutarnju stranu kapilarne kolone (3)(4)(5).



Slika 1.3. Shema plinske kromatografije (3).

Mobilna faza ili plin nositelj ima funkciju da provodi kromatografsku separaciju hlapljivih spojeva, te njihovu detekciju na detektoru. Protok plina nositelja kroz kolonu održava se konstantnim, a radna temperatura kolone pomno se odabire i programira. Kromatografske kolone mogu se izrađivati od različitih materijala kao što su staklo, metal, polimeri, a imaju oblik cijevi i pune se stacionarnom fazom. Stacionarna faza kod kapilarnih kolona veže se u film na unutarnju stjenku kolone.

Velika osjetljivost i mogućnost da se koristi pri separaciji velikog broja kemijskih spojeva, od plinova do organskih spojeva s visokim vrelištem, sve su prednosti plinske kromatografije. Ova tehnika ima i dosta nedostataka kao što su npr.; nepotpuna separacija komponenata (preklapanje pikova), maskiranje detekcije komponenti s jako niskom koncentracijom, komponentama jako visoke koncentracije tj. udjela u smijesi. Također proces analize može biti vremenski jako dugačak ukoliko je cilj detekcija svih komponenata. Ukoliko komponente unutar smjese imaju visoko vrelište, zahtjeva se dugi rad na visokim temperaturama da bi sve te komponente izašle do detektora, a takav rad može oštetiti samu kolonu.

Uređaj koji radi na osnovi fizikalne ili kemijske promjene da bi detektirao prisutnost dovedene komponente, može se koristiti kao detektor. Detekciju komponenti provodimo mjerenjima koja se zasnivaju na toplinskoj vodljivosti, plamenoj ionizaciji, elektronskoj vodljivosti, radioaktivnosti, fotoionizaciji, spektrometriji masa itd. (3)

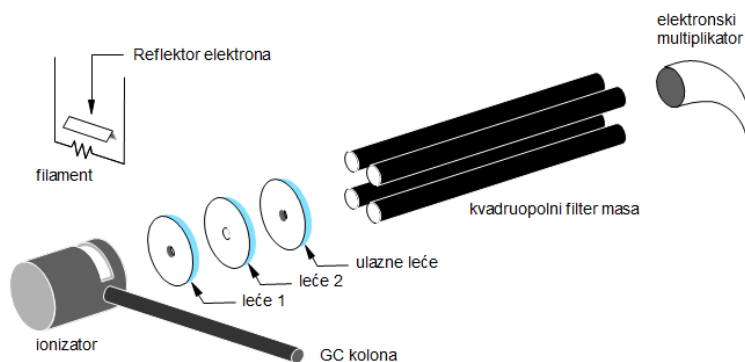
Detektore koji se mogu koristiti kod plinske kromatografije dijelimo na:

- Destruktivne:
 - ✓ Plamenoionizacijski detektor (FID),
 - ✓ Plamenofotometrijski (FPD),
 - ✓ Dušik – fosfor detektor (NPD),
 - ✓ Maseni spektrometar (MS) itd.
- Ne-destruktivni
 - ✓ Fotoionizacijski detektor (PID),
 - ✓ Detektor toplinske vodljivosti (TCD),
 - ✓ Olfaktometrijski detektor (OD)

1.1.3.2 Masena spektrometrija

Masena spektrometrija analitička je tehnika koja ima vrlo važnu ulogu u određivanju kemijskih vrsta. Ona se radi tako da se uzorak prevodi u plinovito stanje, zatim se ionizira i fragmentira na manje molekulske ione. Na kraju razdvaja sve dobivene ione prema omjeru njihove mase i naboja (m/z) prolaskom kroz magnetno polje, a na kraju se pojedine ionske vrste detektiraju i daju nam spektar masa (3)(5).

Maseni spektrometar je uređaj koji se sastoji od tzv. komore za bombardiranje. U toj je komori prisutan visoki vakuum (10^{-7} do 10^{-8} tora), što omogućava ionskim vrstama da se nesmetano kreću od izvora od senzora. Komora za bombardiranje sastoji se volframovog filameta koji se užari te proizvodi elektrone koji sudjeluju u ionizaciji uzorka bombardiranjem, nju smatramo anodom; elektroni koji nastaju na katodi usmjereni su prema anodi gdje dolazi do ionizacije uzorka. Uglavnom se radi o elektronima visoke energije (50-70 eV) pri čemu mala količina uvedenog uzorka ionizira, te iz molekula nastaju tzv. molekulski ion (M^+) koji se također dalje fragmentira. Koje će ionske vrste nastati ovisi o energiji elektrona i strukturi molekula koje se ioniziraju i fragmentiraju. Ioni koji nastanu, razvrstavaju se u analizatoru pod utjecajem promjenjivog magnetskog ili električnog polja i to na temelju omjera m/z (3). Na kraju se dobije spektar masa na kojem se vidi da je veličina signala proporcionalna broju iona koji dođu do detektora. Spektar masa je linijski dijagram koji prikazuje ovisnost intenziteta o omjeru mase i naboja. Oni se uspoređuju sa spektrima unutar različitih baza podataka, a računalom se određuje postotak slaganja dvaju spektara, i tako dolazi do identifikacije kemijskih spojeva (6).

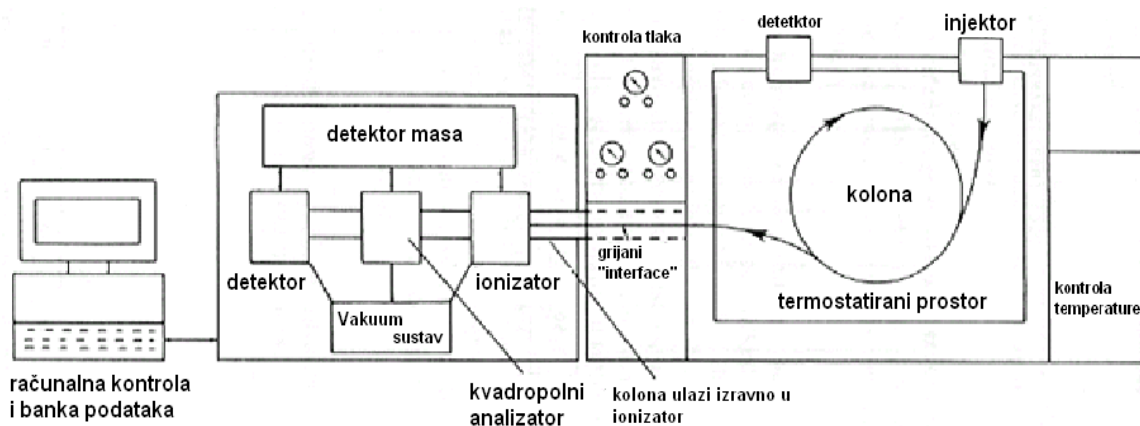


Slika 1.4. Shema masenog spektrometra s kvadruopolnim filterom (3).

1.1.3.2.1 Spregnuti sustav plinska kromatografija – masena spektrometrija (GC-MS)

Spregnuti sustav plinske kromatografije i masene spektrometrije kao analitička tehnika omogućava efikasno i brzo dobivanje mnoštva podataka, pa čak i kada radimo s vrlo malim količinama uzoraka. Za proces separacije i kvantizacije komponenti u nekoj smijesi plinska kromatografija je odličan odabir, ali zbog nepouzdanosti prilikom kvalitativnog određivanja komponenata koristi se masena spektrometrija. Obje tehnike rade s uzorcima u plinovitom agregatnom stanju. Specifični podatci koje dobivamo plinskom kromatografijom su retencijska vremena i površine ispod pikova. Što se tiče identifikacije određenog spoja važnost ima maseni spektar (5)(6).

Najviše korišteni tip masene spektrometrije je onaj s kvadropolnim filterom ili kvadropolnim analizatorom masa, koji vrlo brzo snima spektre uglavnom u milisekundama. Tijekom cijelog kromatografskog procesa, za svaku komponentu u uzorku, koja prođe kroz maseni spektrometar u kolektoru nastane elektronski signal koji se pojačava i na računalu dobiju se maseni spektri. Na računalu klikanjem na kromatografske pikove pokazuje se spektar masa. Prilikom identifikacije kemijskog spoja njegov se spektar masa uspoređuje sa spektrima tog spoja u Wiley-ovoj ili nekoj drugoj bazi masenih spektara. Ovakvim spregnutim sustavom postiže se velika osjetljivost, u redu pikogramskih ili fentogramskih količinama tvari (10^{-12} do 10^{-15} g) (3).

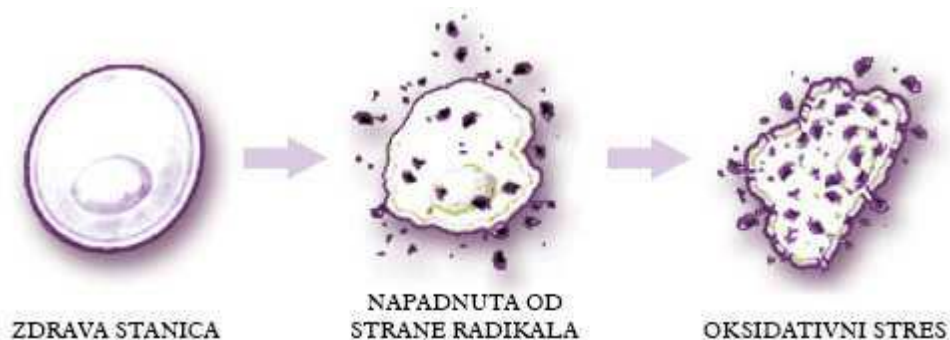


Slika 1.5. Shema spregnutog sustava GC-MS (3).

1.2 Oksidacijski stres

Oksidacijski stres je pomak ravnoteže među reakcijama oksidacije i redukcije i to prema oksidaciji unutar stanice. Drugim riječima oksidacijski stres označava narušavanje ravnoteže među stvaranjem slobodnih radikala tj. reaktivnih vrsta i sposobnosti obrambenih sustava u stanici da ih eliminiraju. Zapravo to je, prekomjerno stvaranje ili mala efikasnost uklanjanja reaktivnih kisikovih i reaktivnih dušikovih vrsta. Zbog nastajanja takvih reaktivnih vrsta dolazi do neuravnoteženog i nekontroliranog stvaranja novih slobodnih radikala, a oni oštećuju i narušavaju integritet stanice. Takva oštećenja stanica mogu rezultirati ozbiljnim posljedicama, kao što su preuranjeno starenje organizma, pojave raznih kroničnih/malignih bolesti, pa čak i smrt stanice (apoptoza) (7).

Oksidacijski stres često se povezuje sa starenjem i sa raznim bolestima kao što su rak, autoimune bolesti, Parkinson-ova, Alzheimer-ova bolest, razne kardiovaskularne bolesti itd. Oštećenja koja nastaju kao rezultat oksidacijskog stresa mogu utjecati na funkciju brojnih važnih biomolekula kao što su: polinezasićeni lipidi, ugljikohidrati, proteini, pa čak i nukleinske kiseline. Takve promjene mogu narušiti sve funkcije u stanici npr. prijenos signala, transkripciju, translaciju, prijenos iona kroz staničnu membranu itd.



Slika 1.6. Slobodnim radikalima prouzrokovan oksidativni stres

1.2.1 Slobodni radikali

Slobodni radikali mogu biti atomi, ioni ili molekule s jednim ili više nesparenih elektrona u vanjskim ljuskama, a dovoljno su stabilni da postoje samostalno. Ove vrste najčešće nastaju homolitičkim cijepanjem kovalentnih veza. Zbog jednog slobodnog elektrona u vanjskoj ljusci, reaktivnost slobodnih radikala prilično je velika, reakcija brza, a oni nisu selektivni ni specifični na kemijske spojeve u stanici. Kada se slobodni radikali povežu na neku organsku molekulu u stanici, dolazi do reakcije u kojoj nastaju novi radikali koji posjeduju mogućnost pokretanja dalje niza neenzimaskih lančanih reakcija. (8) (9).

Biološki najvažniji slobodni radikali pripadaju skupini tzv. reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS), a oni imaju atom kisika u strukturi koji tvori radikal, tu spadaju i njegove reaktivne neradikalne derivate. Reaktivne kisikove vrste mogu oksidirati skoro svaku molekulu organskih spojeva, a time uzrokuju peroksidaciju lipida, oštećenje DNA i proteina.

Tablica 1.2. Reaktivne kisikove vrste (ROS).

Slobodni radikali	Druge vrste
Superoksidni, $O_2^{\cdot -}$	Vodikov peroksid, H_2O_2
Hidroksilni, HO^{\cdot}	Ozon, O_3
Alkoksilni, RO^{\cdot}	Singlet kisik, 1O_2
Peroksilni, ROO^{\cdot}	Hipokloritna kiselina, $HOCl$
Hidroperoksilni HO_2^{\cdot}	

Kao i reaktivne kisikove vrste, reaktivne dušikove vrste (engl. *Reactive nitrogen species*; RNS), mogu oksidirati biomolekule u stanici, te tako uzrokovati oštećenja. To mogu biti slobodni radikali s atomom dušika i neki njegovi neradikalni derivati.

Tablica 1.3. Reaktivne dušikove vrste (RNS)

Slobodni radikali	Druge vrste
Dušikov monoksid, $\cdot\text{NO}$	Nitrozil, NO^+
Dušikov dioksid, $\cdot\text{NO}_2$	Peroksinitrit, OONO^-
	Nitritna kiselina, HNO_2
	Dušikov (III) oksid, N_2O_3

Slobodni radikali mogu doći iz endogenih ili egzogenih izvora. Endogeni radikali u stanicama nastaju tijekom procesa kao što su oksidacijski metabolizam, fagocitoza, kemotaksija, apoptoza, koagulacija, hipoksija ili hiperoksija. Egzogeni izvori slobodnih radikala u stanicama su oni koji unose u organizam a ne nastaju u procesima unutar stanica, a to mogu biti radikali iz dima cigareta, lijekova, prehrane, pesticida, te UV-zračenje ili pak neko drugo ionizacijsko zračenje. (10) (11).

1.2.2 Antioksidansi

Antioksidansi su prirodni ili umjetni organski spojevi i enzimi koji stanici služe za obranu od slobodnih radikala i zaustavljanju oksidacijskog stresa. Neki se od njih svakodnevno spominju kao sastojci prehrane, ali vrlo rijetko i njihovo vrlo važno djelovanje u stanici. Antioksidansi su zapravo molekule koje imaju mogućnost da inhibiraju, te zaustavljaju reakcije oksidacije drugih molekula kojima nastaju radikali. Oni u reakcijama sudjeluju na dva načina, a to su direktna enzimski kataliza ili pak reakcija sa slobodnim radikalima, gdje oni doniraju elektron i neutraliziraju radikal (12).

Antioksidansi, prema tome da li nastaju u metaboličkim procesima ili se unose putem prehrane dijele se na:

1) *Endogene*

- a) Enzimski antioksidansi: citokrom oksidaza, superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GSH), katalaza
- b) Neenzimski antioksidansi: glutation, transferin, koenzim Q, skvalen.

Metabolički procesi u stanici svakog organizma rezultiraju nastajanjem slobodnih radikala. Zbog činjenice da to uzrokuje štetno djelovanje na stanicu, svaka zdrava stanica ima odličnu antioksidacijsku obranu. Endogeni antioksidansi imaju mogućnost da neutraliziraju sav višak slobodnih radikala kada je stanica zdrava i u homeostazi.

2) *Egzogene*

- a) Vodotopljivi: vitamin C, selen, cink
- b) Topljivi u lipidima: α -tokoferol, flavonoidi, karotenoidi

Iako su endogeni antioksidansi dovoljni za neutralizaciju svih slobodnih radikala u uvjetima oksido-redukcijske ravnoteže, ponekad se stanica može naći u intenzivnom oksidacijskom stresu. Kada se to dogodi potreban je unos tvari u organizam kao hrana, dodaci prehrani, lijekovi koji imaju nekakvu antioksidacijsku aktivnost. Takve antioksidanse nazivamo egzogenim, a oni se prema podrijetlu dijele na prirodne i umjetne (sintetske).

Antioksidansi se također mogu podijeliti i po vrsti mehanizma koji opisuje njihovo djelovanje unutar stanice i to na

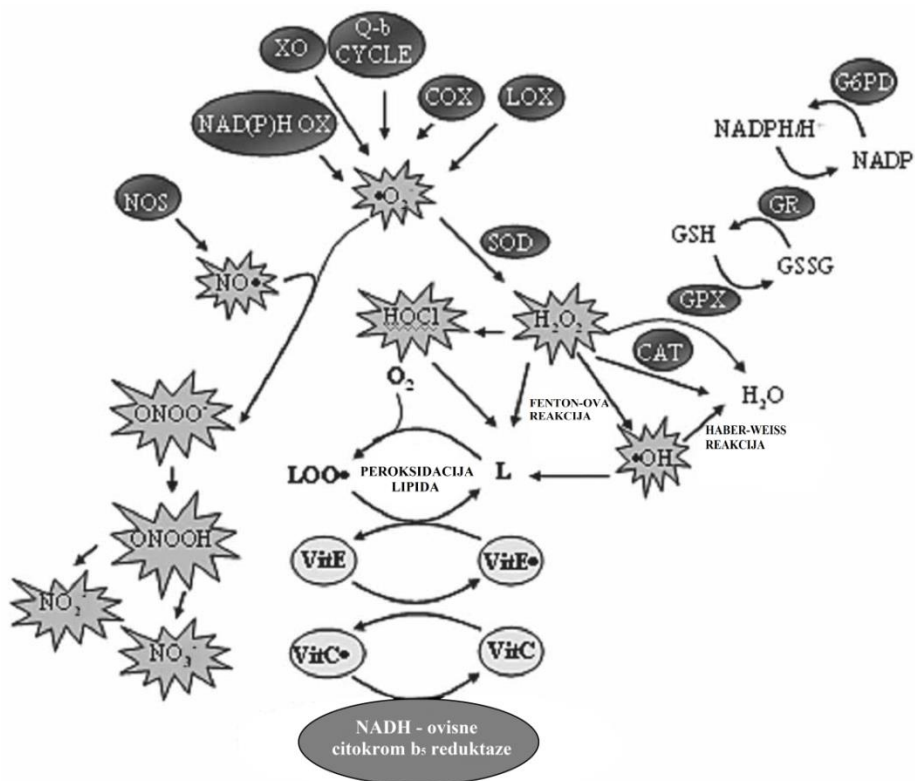
1) Prvog reda

- Zovemo ih još hvatačima slobodnih radikala. Antioksidansi prvog reda imaju mehanizam takav da predaju radikal vodika ($H\bullet$) na peroksil i alkoksil radikale koji nastaju u fazi propagacije lančane reakcije autooksidacije lipida.

2) Drugog reda

- Zovemo ih još preventivnim antioksidansima. Mehanizam kojim se opisuje djelovanje antioksidanasa drugog ide tako da se oni vezuju na slobodne radikale koji su inicijatori lančanih reakcija.

Antioksidansi se koriste najviše u prehrambenoj industriji u hrani, te kao konzervansi. Također se koriste u kozmetičkoj industriji, ali i u farmaceutskoj industriji, te medicini (13).



Slika 1.7. Shematski prikaz metabolizma slobodnih radikala (13).

1.3 Općenito o enzimima

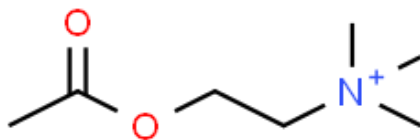
U ovome radu ispitivala se inhibicijska sposobnost izoliranih hlapljivih ekstrakata biljaka na tri različita enzima od kojih su: dvije kolinesteraze tj. acetilkolinesterazu (engl. *acetylcholinesterase*; AChE), butirilkolinesterazu (engl. *butyrylcholinesterase*; BChE), te enzim α -glukozidazu (engl. *α -glucosidase*).

1.3.1 Acetilkolinesteraza

Acetilkolinesteraza (engl. *acetylcholinesterase*, AChE) je pripada porodici enzima koje nazivamo, serinske esteraze. Glavna uloga ovoga enzima je hidroliza jednog od najvažnijih neurotransmitera tzv. acetilkolin (ACh) tijekom samog prijenosa živčanog impulsa. Najčešće se nalazi u sinapsama, te u neuronima i glijima unutar ljudskog mozga. Acetilkolinesteraza se uglavnom sintetizira u mozgu, mišićima, te u koštanoj srži. Ona se također može pronaći i u krvi, gdje se veže na eritrocite (14).

Acetilkolin (engl. *acetylcholine*, ACh), je jedan od neurotransmitera, koji je prvi otkriven još 1867. godine. On se sintetizira iz kolina i acetil koenzima A (acetil-CoA) pomoću enzima zvanog kolin-acetil-transferaza. Acetilkolin se izlučuje u sinapsama centralnog živčanog sustava, te na neuromišićnoj spojnici, gdje se veže za određene receptore.

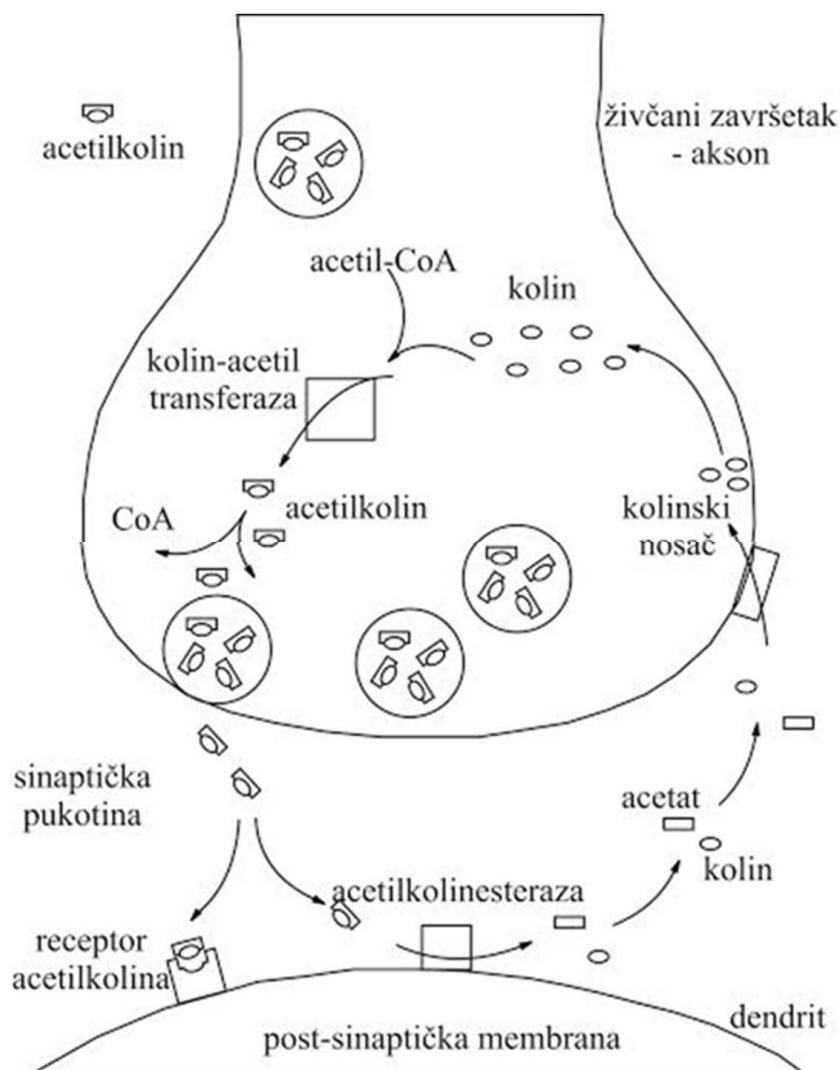
Postoje dva tipa tzv. kolinergičnih receptora za acetilkolin, a to su muskarinski, te nikotinski receptori. On se iz sinaptičkih pukotina ne može ukloniti difuzijom, nego se mora razgraditi. Na taj način acetilkolinesteraza upravlja prijenosom živčanog impulsa.



Slika 1.8. Struktura neurotransmitera acetilkolina (ACh) (15).

Nadolazeći živčani impuls dopušta ispuštanje acetilkolina iz sinaptičkog mjehurića, u sinaptičku pukotinu gdje se povezuje na spomenute receptore, koji se nalaze na postsinaptičkoj membrani.

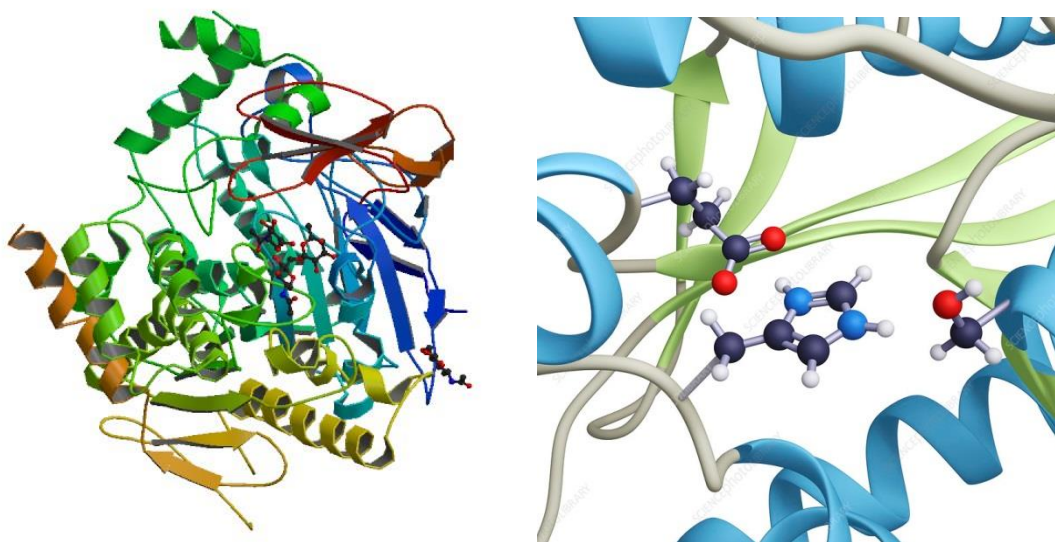
Povezivanjem acetilkolina na kolinergične receptore, pokreću se kaskadni procesi koji uzrokuju depolarizaciju membrane, otvaranje ionskih kanala i daljni prijenos živčanog impulsa. Hidrolizom acetilkolina pomoću AChE, postsinaptička membrana ponovo se polarizira i živčani impuls se zaustavlja (16).



Slika 1.9. Shematski prikaz sinapse i acetilkolinškog ciklusa (16).

1.3.1.1 Struktura acetilkolinesteraze

Acetilkolinesteraza još se naziva "prava kolinesteraza". U osnovnu strukturu obje kolinesteraze ulaze 12 β -nabranih ploča, a njih okružuje 14 α -uzvojnica. AChE je vezana na membrane stanice kolagenskim uzvojnica, a sastavljena je od globularnih podjedinica od koje svaka ima masu od 70 kDa do 80 kDa. Kada se ove podjedinice grupiraju one mogu tvoriti dvije klase oligomernih struktura. Prva takva klasa su globularne strukture koje su sastavljene od monomera, dimera ili tetramera. Dok je druga klasa tzv. antisimetrične strukture, a koje se mogu dalje podijeliti u tri grupe: kolagenske, nekolagenske i katalitičke (17).



Slika 1.10. Struktura AChE (lijevo) i prikaz aktivnog mjesta (desno) (18) (19).

1.3.1.2 Inhibicija acetilkolinesteraze

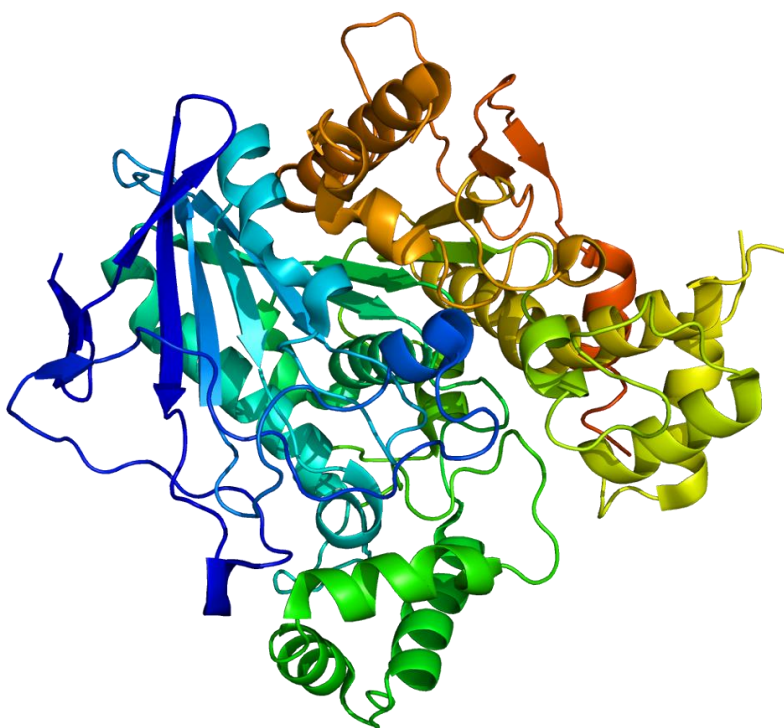
Inhibitori acetilkolinesteraze mogu se koristiti kao lijekovi ili kao insekticidi. Česti inhibitori općenito kolinesteraza mogu biti neki opasni i neurotoksični bojni otrovi, a tu se uglavnom radi o organofosfatnim spojevima kao što su sarin, VX, tabun, soman, Novichok agensi itd. Svi ovi otrovi su ireverzibilni inhibitori AChE. Smanjena aktivnost AChE dovodi do nakupljanja acetilkolina, a time i do poremećaja u prijenosu živčanih impulsa. Ovakvo stanje je tzv. kolinergička kriza, od koje može nastupiti i smrt (20).

1.3.2 Butirilkolinesteraza

Butirilkolinesteraza (engl. *butyrylcholinesterase*; BChE) sintetizira se u jetri, a potom se izlučuje u krv. Ona također pripada skupini enzima koje zovemo kolinesterazama. Aktivnost ovog enzima, primijećena je i u drugim tkivima kao što su masna tkiva, pluća, tanko crijevo i moždano tkivo.

BChE najvjerojatnije sudjeluje u različitim metabolizmima kao što su metabolizam lipida i lipoproteina, te u metabolizmu molekule butirilkolina. Butirilkolin je intermedijerni kemijski spoj koji nastaje u metabolizmu neesterificiranih masnih kiselina u tkivu jetre. Sudjeluje također u prijenosu sporijih živčanih impulsa, a znamo da u sinapsama tu ulogu ima acetilkolin.

Kod oboljelih od nekih neurodegenerativnih bolesti, poput Alzheimerove, primjećuje se pojačana ekspresija butirilkolinesteraze (17).



Slika 1.11. Struktura butirilkolinesteraze (BChE) (21).

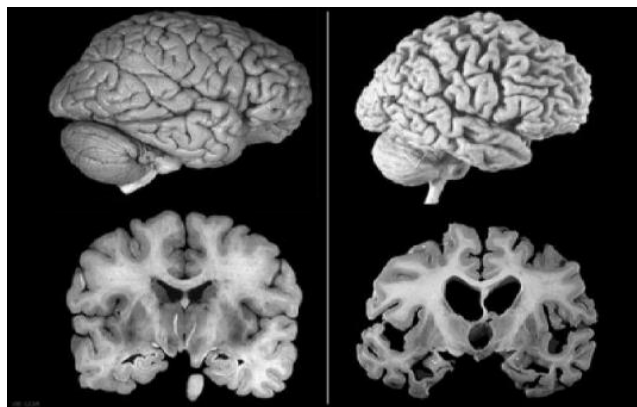
1.3.3 Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest je neurodegenerativna bolest koja je postupna i progresivna, odnosno postaje gora s vremenom. Obilježena je propadanjem neurona, što kao posljedicu ima gubitak pamćenja, smanjene sposobnosti prosuđivanja i promjena osobnosti. Po prvi put ju je dijagnosticirao kao „specifična bolest mozga“ dr. Alois Alzheimer 1906. godine. Alzheimerova bolest danas predstavlja oko 60% svih demencija. Zbog toga što je ova bolest progresivna, simptomi se mogu javiti vrlo kasno i to uobičajeno nakon 65-70 godina života. Također se razvija u tri stadija, a to su: rani stadij, umjereni stadij te uznapredovali stadij (22).

Točan uzrok bolesti još nije poznat, ali postoje dvije hipoteze:

Kolinergička hipoteza utemeljena je na sa stajališta da je Alzheimerova bolest najvjerojatnije uzrokovana defektom u normalnom metabolizmu acetilkolina (ACh), koji ima vrlo važnu ulogu u procesu pamćenja. Pretpostavka govori da najvjerojatnije dolazi do deficita kolin-acetiltransferaze, važnog enzima za sintezu ACh. Smatra se da se povećanjem koncentracije acetilkolina ublažavaju simptomi ove bolesti. Zbog toga većina današnjih lijekova rade upravo na principu inhibicije acetilkolinesteraze tj. većina tih odobrenih lijekova su zapravo inhibitori AChE. Rivastigmin, takrin, galantamin, donepezil, samo su neki od takvih lijekova.

Amiloidna hipoteza utemeljena je 1920-ih godina, s pretpostavkom da je tzv. β -amiloid (β A) glavni uzročnik Alzheimerove bolesti. Prema ovoj hipotezi beta-amiloid je peptid koji nastaje kao zbog patološke degradacije tj. razgradnje amiloidnog prekursorog peptida (APP) (23).



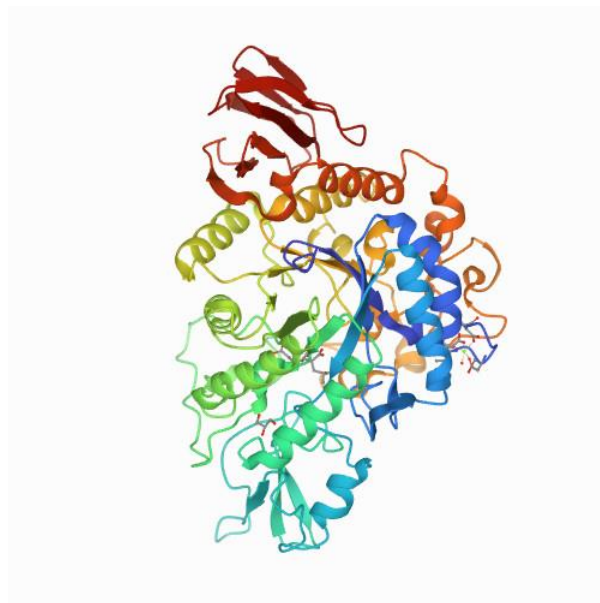
Slika 1.12. Zdravi mozak (lijevo), uznapredovali stadij AB (desno) (24).

1.3.4 α -glukozidaza

Povećanje glukoze u krvi je posljedica hidrolize ugljikohidrata. Stanice tankog crijeva zvane enterociti, imaju mogućnost apsorbiranja monosaharida, ali ne i većih molekula ugljikohidrata. Zbog toga primjerice polisaharidi ulaze u reakcije hidrolize da bi se razgradili do monosaharida, koje potom enterociti apsorbiraju s lakoćom (25).

α -amilaza je enzim koji katalizira reakciju hidrolize α -1,4-glikozidne veze različitih polisaharida kao što su: škrob, glikogen i mnogi oligosaharidi. α -glukozidaza zatim dalje obavlja hidrolizu npr. disaharida u jednostavne monomernu ugljikohidrate. Točnije rečeno α -glukozidaza sudjeluje u reakciji hidrolize, gdje se glikozidna veza razara, te istovremeno otkida glukoza sa lanca oligosaharida.

Razgradnja ugljikohidrata u tankom crijevu može se zaustaviti inhibicijom α -glukozidaze, a to kao posljedicu ima da se razina glukoze u krvi relativno smanji (25). Takva inhibicija je zapravo među najboljim strategijama za kontrolu porasta glukoze u krvi nakon obroka, te za eliminiranje bilo kakvih dijabetičkih komplikacija (26). U liječenju dijabetesa, često se koriste inhibitori α -glukozidaze kao npr. akrboza, vogliboza, miglitol itd.(25).



Slika 1.13. Struktura α -glukozidaze (27).

2 EKSPERIMENTALNI DIO

2.1 Biljni materijal

Biljni materijal koji je korišten u ovom radu je suhi biljni materijal biljaka puzava dobričica (*Glechoma hederacea* L.) ubrana na Samoborskom gorju 10. travnja, 2021. godine i vazdazelene krkavina (*Rhamnus alaternus* L.) ubrana na Marjanu, Split 17. ožujka, 2021. godine. Branje i identifikaciju biljnog materijala obavio je botaničar, izv. prof. dr. sc. Mirko Ruščić s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu (PMF-ST). U vrijeme kad su biljke ubrane, obje su biljke bile u fazi pune cvatnje. Proces sušenja biljaka obavljen je na suhom i hladnom mjestu, u hladu. Uzorci biljnih materijala biljaka sačuvani su u prostorijama Odjela za biologiju, PMF-ST.

2.1.1 Puzava dobričica (*Glechoma hederacea* L.)

Tablica 2.1. Taksonomska klasifikacija puzave dobričice (28)

SISTEMATIKA	
Carstvo	<i>Plantae</i>
Divizija	<i>Angiospermae</i>
Razred	<i>Magnoliopsida</i>
Red	<i>Lamiales</i>
Porodica	<i>Lamiaceae</i>
Rod	<i>Glechoma</i>
Vrsta	<i>G. hederacea</i>



Slika 2.1. Prikaz izgleda biljke *G. Hederacea*.

Puzava dobričica ili često samo dobričica (engl. *Ground Ivy*) višegodišnja je i zeljasta biljka, a pripada porodici tzv. usnača (lat. *Lamiaceae*). Ta je porodica jedna od najrasprostranjenijih porodica biljaka na području Republike Hrvatske, a u nju ulazi većina aromatičnog i ljekovitog

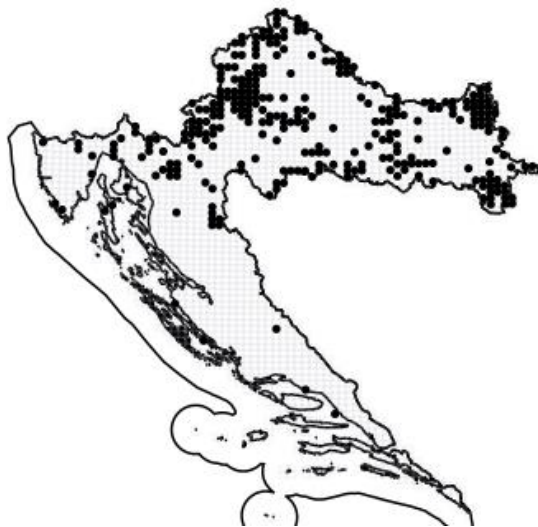
bilja na tom području (29). Poznati botaničar Carl Linnaeus imenovao je Puzavu dobričicu još 1753. godine u svojoj knjizi naslova „*Species Plantarum*“. Ime roda ove biljke dolazi od riječi (grč. „*glechon*“) što prevedeno znači menta. Naziv vrste (lat. „*hederacea*“) preveden znači „*sličan bršljanu*“ (engl. *ivy* = *bršljan*) zbog specifičnog oblika listova i puzavosti (30).

Puzava dobričica je veoma rasprostranjena po Europi, također je prisutna u jugozapadnoj Aziji, ali i većim dijelovima Sjedinjenih Američkih Država (31). U Republici Hrvatskoj visoko je rasprostranjena, a uglavnom se nalazi na gotovo potpunom teritoriju Hrvatske, a iznimka je primorski krajolik. (29). Dobričica može nastanjivati mjesta kao što su livade, travnjaci listopadne šume umjerenog klimatskog pojasa. Ona također ima najbolju šansu za rast na vlažnim, plodnim i karbonatnim tlima čiji pH može biti u rasponu od 5,5 do 7,5. Moguć je njen rast i na tlu čiji pH ide ispod 4 (pH<4). Karakterizira je horizontalan rast, tj. rast u širinu, zbog duge puzajuće stabljike. Može narasti i do pola metra (0,5 m). Listovi su okruglog bubrežastog oblika, ali imaju srcolike rubove (Slika 2.1.). Duljina lista je oko 0,5-3 cm, dok je širina oko 0,5-4 cm. Cvjetovi su usnati, uglavnom ljubičasti ili pak plavi, a duljine im iznosi oko 1 cm. Dobričica može cvati od travnja, pa sve do kolovoza najčešće i vrlo rijetko kroz jesen (32).

Nadzemni dio posjeduje različita ljekovita svojstva diuretička, kardiotonična i simulirajuća svojstva (33). Mnoga su provedena istraživanja istraživanja demonstrirala pozitivan utjecaj eteričnog ulje biljke na fiziološke probleme kao što su respiratorne tegobe, glavobolja i hiperpigmentacija (30)(31) (34).

U narodnoj tj. tradicionalnoj medicini, Puzava dobričica se koristila u liječenju različitih zdravstvenih problema, i to u pripravcima kao što su čaj i svježi sok. Također je vrlo zanimljiva činjenica da se ta biljka često koristila kod proizvodnje piva, sve dok se nije počeo popularizirati hmelj (30) (35).

Ova biljka sadrži eterično ulje (do 0,6 %), tanine (do 7,5 %), saponine, smolu, askorbinsku kiselinu (do 32 mg), kolin (8,2 mg), karotin. Biljka se koristi za aromatiziranje i pripremanje toničkih napitaka. Stariji listovi nisu sasvim neotrovni (32). Sušenjem biljke otrovnost se smanjuje, pa su biljke stare nekoliko mjeseci potpuno neotrovne (36).



Slika 2.2. Prikaz geografske rasprostranjenosti Puzave dobričice na prostorima RH (37).

2.1.2 Vazdazelene krkavine (*Rhamnus alaternus* L.)

Tablica 2.2. Taksonomska klasifikacija

SISTEMATIKA	
Carstvo	<i>Plantae</i>
Divizija	<i>Tracheophyta</i>
Razred	<i>Magnoliopsida</i>
Red	<i>Rosales</i>
Porodica	<i>Rhamnaceae</i>
Rod	<i>Rhamnus</i>
Vrsta	<i>R. Alaternus</i>



Slika 2.3. Prikaz izgleda biljke *R. alaternus*.

Ime roda ove biljke (lat. *Rhamnus*) proizlazi od iz grčkog jezika (grč. *Rhamno*), a označava naziv za biljku čije grane na krajevima imaju trn. Iz latinskog jezika za ime ove vrste (lat. *alaternus*) ideju je je dao Carl Linnaeus jer su listovi ove biljke naizmjenični (38).

Vazdazelena krkavina (engl. *Mediterranean buckthorn*) je dvodomni vazdazeleni grm ili manje stablo iz porodice krkavina (lat. *Rhamnaceae*). Može narasti pa čak od 2 m do 6 m, a tvori okruglu i gustu krošnju (39). Biljka ima naizmjenične, gotovo nasuprotne listove, a oni su ovalni i dugi između 2 i 7 cm, te su široki oko 3 cm. Listovi su također kožasti, a spojeni su na grane peteljka dugima do oko 1 cm. Cvjetovi su uglavnom žutozelene boje. Mogu biti jednospolni, rijetko dvospolni (38). Vazdazelena krkavina cvjeta između veljače i travnja, a bobičasti plodovi sazrijevaju uglavnom između svibnja i rujna (34). Cvjetovi su medonosni, a već spomenuti plod je mesnata koštunica veličine od 3 mm do 4 mm. Prije sazrijevanja plod je crvene, a nakon postaje crne boje (38).

Uglavnom je rasprostranjena na području Mediterana, ali može se pronaći u Australiji i Novom Zelandu, gdje je naturalizirana (40). Na području Republike Hrvatske vazdazelena krkavina je rasprostranjena uzduž cijele jadranske obale, ali i na otocima (Slika 2.4.). Ova biljka raste na krškim i toplim staništima na kojima su tla osiromašena. To su najčešće različiti sustavi makija i šume hrasta crnike (lat. *Quercus ilex*) (38). Fitokemijski, rod (lat. *Rhamnus*) okarakteriziran je sa mnoštvom fenolnih spojeva, uglavnom se radi o različitim antrakinonima, ali prisutni su tanini i flavonoidi (40). Sadi se kao ukrasna biljka, a njeno drvo koristi se za izradu namještaja.



Slika 2.4. Prikaz geografske rasprostranjenosti Vazdazelene krkavine na prostorima RH (41).

2.2 Izolacija eteričnog ulja iz biljnog materijala hidrodestilacijom

Kemikalije:

- Biljni materijal:
 - puzava dobričica (lat. *Glechoma hederacea* L.); (81,81 g),
 - vazdazelena krkavina (lat. *Rhamnus alaternus* L.); (87,82 g).
- Destilirana voda
- Pentan
- Dietileter

Pribor (Uredaji):

- Aparatura po Clevenger-u
- Kalota za zagrijavanje
- Analitička vaga
- Bočice

Postupak izolacije eteričnih ulja hidrodestilacijom:

Biljni materijal sakupljen je u vrijeme cvjetanja, te potom osušen. Iz obje biljke izolirani su hlaoljivi ekstrakti u modificiranoj aparaturi po Clevenger-u, metodom hidrodestilacije. U prvu tikvicu s okruglim dnom stavilo se 81,81 g grubo usitnjenog biljnog materijala od puzave dobričice, a u drugu tikvicu stavilo se 87,82 g grubo usitnjenog biljnog materijala vazdazelene krkavine. Dodala se destilirana voda, te se spojila aparatura. Proces hidrodestilacije je trajao 150 min. Tijekom hidrodestilacije u cijevi aparature dodana je smjesa pentana i dietiletera (1:1) koja ima ulogu „trap-a“, tj. hvata najhlapljivije komponente eteričnog ulja kako bi bilo što manje gubitaka. Kad su obje vodene destilacije završene, dobiveni hlapljivi ekstraktisu iz graduirane cijevi ispušteni u bočice u koje je dodano nešto bezvodnog natrijevog sulfata, da bi se uklonili bilo kakvi ostatci vode. Ekstrakti su čuvanina -18 °C do analiza.

2.3 Određivanje kemijskog sastava eteričnih ulja – GC-MS

GC-MS sustav (Agilent Technologies, Paolo Alto, CA, USA) se sastoji od:

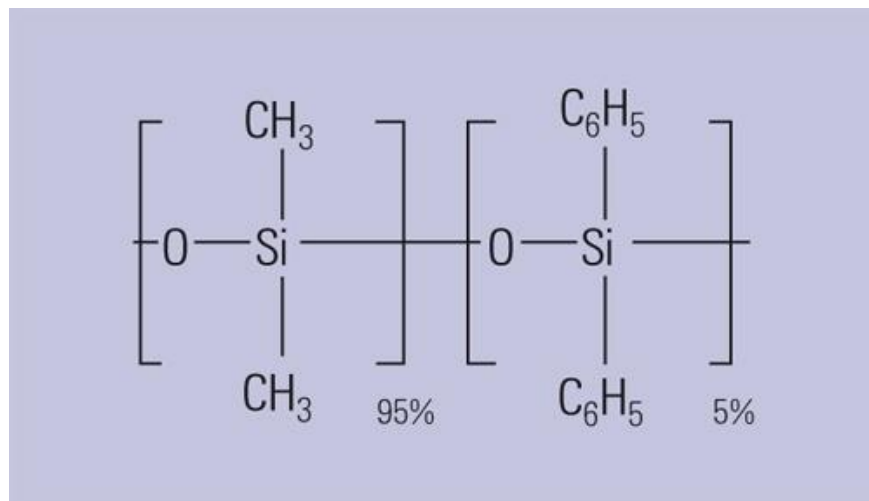
- Plinski kromatograf; model 8890
- Selektivni detektor masa; model 7000D
- Autosampler model 7693A
- HP-5MS kolona (Agilent J&W GC kolona 19091S-433)

Procedura rada GC-MS spregnutog sustava:

Identifikacija eteričnih ulja postignuta je korištenjem spregnutog sustava plinske kromatografije i masene spektrometrije. U ovom radu za analizu korišten je plinski kromatograf spregnut sa selektivnim masenim detektorom, koji ima kvadropolni analizator (GC-MS). Ovaj sustav je opremljen i automatskim samouzorkivačem i kolonom HP-5MS. Korištena HP-5MS kapilarna kolona je duljine 30 m i promjera 0,25 mm, a debljina filma na unutarnjoj stjenici iznosi 0,25 μm .

Kao stacionarnu fazu koristi (5%-fenil)-metilpolisiloksan. Ukupno vrijeme GC-MS analize je 89 min. Radna temperatura kolone je programirana tako da se 3 min drži konstantnom na 60°C. Zatim kreće zagrijavanje brzinom (3 °C min⁻¹), sve do 246 °C, te se održavalo na toj temperaturi 25 min. Mobilna faza odnosno plin nositelj je helij, a programirana brzina protoka iznosi (1 mL min⁻¹). Temperatura injektora je stalna i iznosi 250 °C, injektirani volumen iznosi 1 μL , dok je omjer raspodjele 1:50. Uvjeti masenog spektrometra su napon ionizacije tj. energija elektrona koja iznosi 70 eV, a temperatura izvora iona je 230 °C. Raspon koji mjeri spektrometar masa je od 40 m/z do 450 m/z. Vrijeme mjerenja u masenom spektrometru je 200 ms.

Pikovi sa dobivenog kromatograma identificirani su usporedbom retencijskih indeksa relativno seriji alkana (C₈-C₃₁) s literaturnim podacima (Adams, 2017.), kao i uspoređivanjem njihovih masenih spektara sa bazama masenih spektara kao što su Wiley 9N08 i NIST 02.



Slika 2.5. Struktura polimera, stacionarne faze u HP-5MS koloni (42).

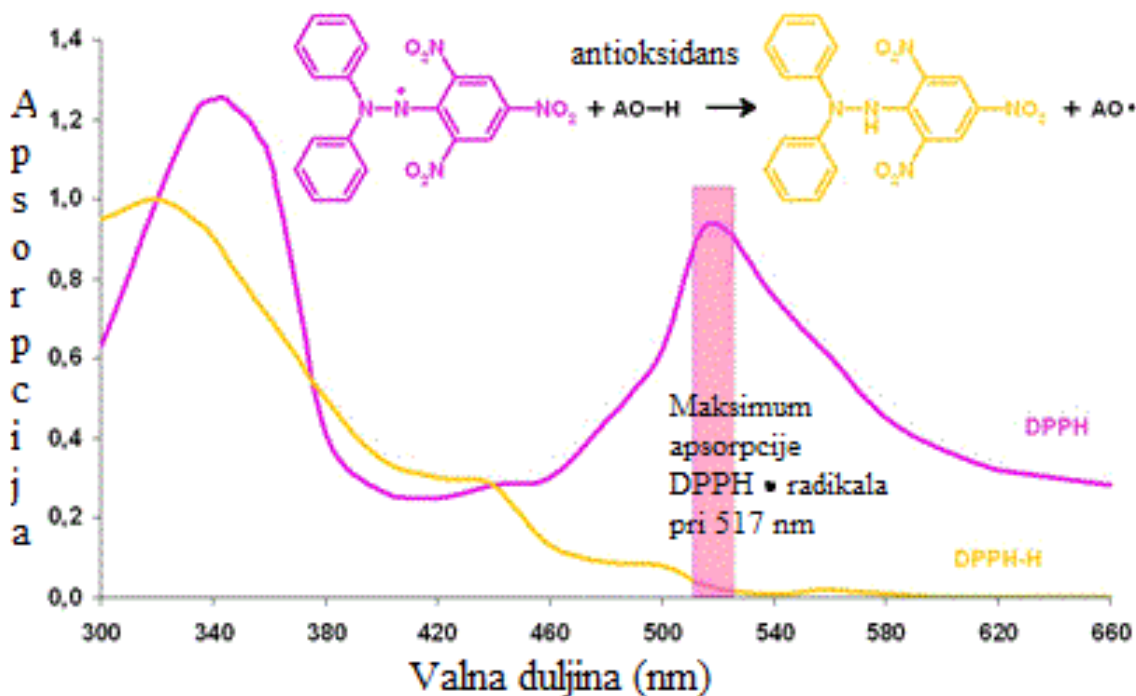


Slika 2.6. Fotografija korištenog GC-MS spregnutog sustava.

2.4 Određivanje antioksidacijske aktivnosti – DPPH metodom

DPPH metoda ili DPPH test (engl. *DPPH assay*) jedan je od najviše korištenih tzv. „*in vitro*“ testova za određivanje antioksidacijske aktivnosti. Temelji se na sposobnosti neke tvari ili smjese da vrši redukciju DPPH• radikala (IUPAC: *1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*) u alkoholnoj otopini. DPPH• sadrži jedan delokalizirani i slobodni elektron što ga čini slobodnim radikalom. Spomenuti delokalizirani elektron upravo je razlog što se ova metoda može koristiti.

Ova metoda oslanja se na UV/VIS spektrofotometriju kao analitičku tehniku, upravo zbog tog delokaliziranog elektrona koji apsorbira vidljivi dio spektra i to maksimum na (517 nm), što vidimo kao ljubičastu boju. Tijekom reakcije DPPH• slobodnog radikala i određenog antioksidansa dolazi do njegove redukcije u DPPH. Kao takav on više nema nesparenih delokaliziranih elektrona pa nema mogućnost apsorpcije vidljivog dijela elektromagnetskog spektra, obojenje onda ide do žutog ili se pak boja potpuno gubi (43).



Slika 2.7. Prikaz reakcije redukcije DPPH• s antioksidansom, te UV/VIS spektar (44).

Kemikalije:

- Otopina DPPH• u 86%-om etanolu, koncentracije 0,04 g/L
- 86%-ni etanol
- Etanolne otopine hlapljivih ekstrakata biljaka, koncentracije 1 g/L.
- Otopina BHA (butil-hidroanisol) - pozitivna kontrola

Pribor:

- Pločica s jažicama (8x12)
- Automatske multikanalne mikropipete
- Čitač mikrotitarskih pločica Sunrise (Tecan Group Ltd., Austria)

Postupak:

Izvagano je 0,004 g DPPH reagensa i otopljeno u 100 ml 86%-nog etanola da bi se dobila željena koncentracija. Zatim je na računalu podešena metoda, tako da se programiralo mjerenje apsorpcije u vidljivom dijelu spektra i to na 517 nm. Prvo se vršilo mjerenje slijepa probe, a zatim i uzoraka (otopine dvaju odabranih hlapljivih ekstrakata, koncentracije 1 g/L). U četiri jažice na multikanalnoj pločici stavljena je slijepa proba (200 μ L DPPH otopine i 10 μ L etanola). U sljedeće četiri jažice stavljeno je 200 μ L DPPH otopine i 10 μ L uzorka.

Tablica 2.3. Prikaz načina na koji se provodi mjerenje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Otopine u jažicama	
Slijepa proba	200 μ L DPPH + 10 μ L EtOH (86%)
Uzorak	200 μ L DPPH + 10 μ L otopine hlapljivog ekstrakta

Sposobnost redukcije DPPH• radikala predstavlja antioksidacijsku aktivnost odabranih eteričnih ulja (izražava se u %), a računa se:

$$\%redukcije = \frac{A_0 - A_{uz.}}{A_0} * 100$$

A_0 – apsorbancija slijepe probe

$A_{uz.}$ – apsorbancija otopine DPPH radikala s uzorkom.

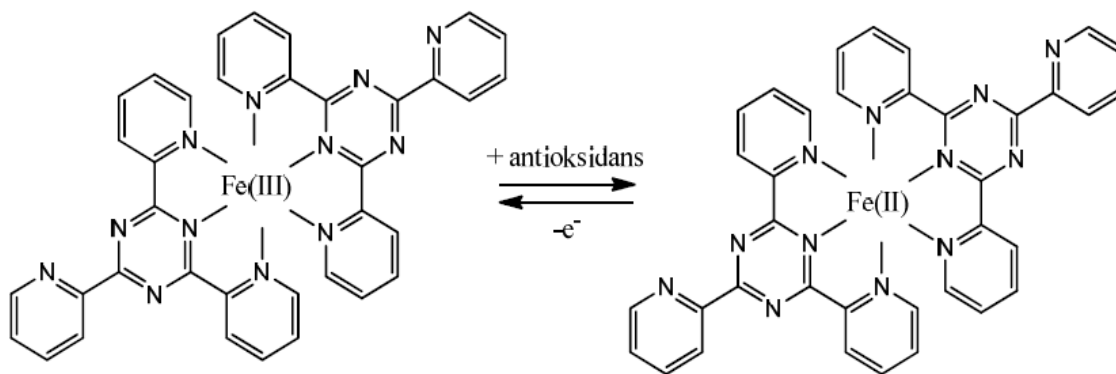
2.5 Određivanje antioksidacijske aktivnosti – FRAP metodom

FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power* – antioksidativna snaga redukcije željeza) je vrlo brza, indirektna metoda kojom se mjeri ukupni redukcijski potencijal nekog uzorka koji pokazuje antioksidacijsku aktivnost. Temelji se na redukciji željezovog Fe^{3+} iona u Fe^{2+} primanjem elektrona od antioksidansa.

FRAP metoda se temelji na mjerenju apsorbancije u vidljivom dijelu elektromagnetskog zračenja. Kod ove metode dolazi do redoks reakcije između manjih neenzimskih sustava, a to su bilo kakvi antioksidansi kao npr. askorbinska kiselina, i tzv. FRAP reagensa.

FRAP reagens je smjesa otopine Fe^{3+} iona, otopine TPTZ reagensa (IUPAC: *2,4,6-tripiridil-s-triazina*), koji s ionima željeza tvori kompleksne spojeve, te uglavnom nekog pufera koji će održavati kiseli medij potreban za reakciju s antioksidansom (pH = 3,6).

Reakcijom dolazi do nastajanja Fe^{2+} koji sa TPTZ-om tvore vrlo stabilan kompleks Fe(II)-TPTZ_2 koji je plave boje i apsorbira pri 593 nm. Zbog toga tijekom reakcije boja se mijenja iz žute koja dolazi od Fe(III)-TPTZ_2 kompleksa u plavu (43) (45).



Slika 2.8. Reakcija antioksidansa sa Fe(III)-TPTZ_2 kompleksom (žuti) i nastanak Fe(II)-TPTZ_2 kompleksa (plavi) (46).

Priprava radnih otopina:

1. Acetatni pufer (0,3 M; pH =3,6)
 - Pomiješa se 3,1 g natrijeva acetata trihidrata sa 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni se destiliranom vodom do 1 L.
2. Otopina $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (0,02 M)
 - Otopi se 0,054 g željezovog (III) klorida heksahidrata u 10 mL vode.
3. 40 mM HCl:
 - Dodati 33 μL HCl (37%) u 10 mL destilirane vode
4. Otopina TPTZ-a (10mM otopina u 40mM HCl):
 - Otopi se 0,031 g 2,4,6-tripiridil-s-trizina u 10 mL HCL.
5. Standardna otopina (otopina $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$):
 - Otopi se 0,056 g željezovog (II) sulfata heptahidrata u 10 mL vode

Postupak:

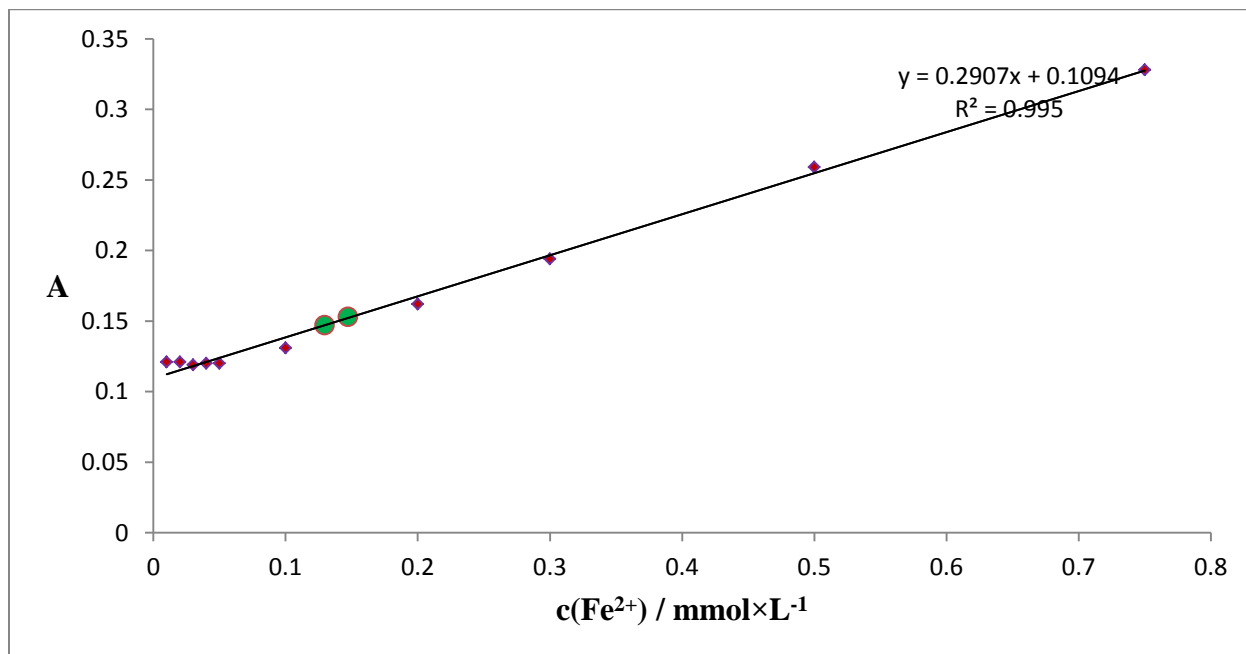
Na početku se iz standardne otopine priprave standardne otopine za dobivanje standardne krivulje iz koje će se kod mjerenja redukcijskog potencijala uzorka ovom metodom odrediti sam potencijal. Nakon toga pripravi se FRAP reagens miješanjem 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL otopine TPTZ-a, i 2,5 otopine željezovog (III) klorida heksahidrata. U jažice se stavlja 150 μL FRAP reagensa, 15 μL destilirane vode, te po 5 μL svake od prethodno pripremljenih otopina poznatih koncentracija Fe(II) iona, Tablica 2.5. Nadalje se mjerio redukcijski potencijal uzoraka hlapljivih ekstrakata koncentracije 1 g/L. Mjerenje je izvršeno nakon vremena od 8 minuta. Iz standardne krivulje je očitana koncentracija nastalih Fe(II) iona, odnosno redukcijski potencijal testiranih ekstrakata. Rezultati su iskazani u milimolima Fe^{2+} po gramu uzorka ($\text{mmol Fe}^{2+}/\text{g}$).

Tablica 2.4. Prikaz načina na koji se provodi mjerenje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Otopine u jažicama	
Uzorak otopine poznate koncentracije (standard)	150 μL FRAP-a, 15 μL H_2O , 5 μL otopine poznate koncentracije Fe^{2+}
Uzorak	150 μL FRAP-a, 15 μL H_2O , 5 μL otopine uzorka

Tablica 2.5. Prikaz koncentracija pripremljenih standardnih otopina $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, i apsorbancija dobivenih njihovim mjerenjem FRAP metodom.

Standardi	$c(\text{Fe}^{2+}) / \text{mM}$	Apsorbancija A
1	0,75	0,328
2	0,5	0,259
3	0,3	0,194
4	0,2	0,162
5	0,1	0,131
6	0,05	0,12
7	0,04	0,12
8	0,03	0,119
9	0,02	0,121
10	0,01	0,121



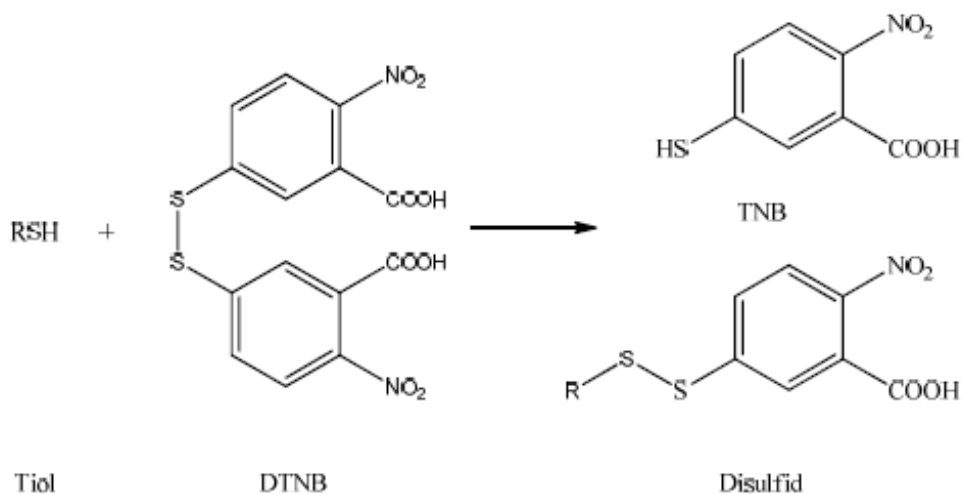
Slika 2.9. Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o poznatim koncentracijama Fe^{2+} .

2.6 Ellman-ova metoda

Ellmanovom metodom spektrofotometrijski se mjeri sposobnost neke tvari da inhibira enzime kolinesteraze, acetilkolinesterazu (AChE) i butirilkolinesterazu (BChE). U reakcijama ove metode kao supstrati korišteni su tiokolinski derivati acetilkolina (ATChI) i derivat butirilkolina (BTChI).

Koristi se tzv. Ellmanov reagens (IUPAC: 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina; DTNB) čija je najvažnija uloga da određuje količinu tj. koncentraciju tiolnih skupina (-SH) u uzorku. Kada tioli stupe u reakciju s DTNB-om dolazi do nastajanja TNB-a (2-nitro-5-merkaptobenzojeva kiselina), koji potom ionizira u TNB anion unutar vodene otopine (pH >7). Anion TNB⁻, otopini nakon oslobađanja daje jarko žutu boju.

DNTB ima apsorpcijski maksimum na 320 nm, što upada u UV-A područje spektra, a kada se oslobodi TNB⁻ otopina postaje žute boje, pa se apsorpcijski maksimum pomiče na 412 nm (20) (47).



Slika 2.10. Mehanizam Ellman-ove metode, RSH je tiokolin (20).

2.6.1 Ispitivanje sposobnosti inhibicije acetilkolinesterze (AChE)

Kemikalije:

- Enzim acetilkolinesteraze (AChE)
- Acetiltiokolin jodid (ATChI)
- 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina) – DTNB
- Uzorci (otopine hlapljivih ekstrakata konc. 1 g/L)

Priprema otopina:

- Otopina DTNB (0,3 mM): dobije se otapanjem 13,079 mg reagensa u 5 mL pufera (pH = 7) s 0,12 M NaHCO₃.
- Otopina ATChI (0,5 mM): dobije se otapanjem 15,9 mg ATChI u 5 mL pufera kojem je pH = 8.
- Otopina AChE (0,03 U/mL): 6,6 μL reagensa (500 U/mL u puferu pH = 8) u 5 mL pufera, pH = 8.

Postupak:

Za ova se mjerenja koristio čitač mikrotitarski pločica i mjerila se apsorbancija na 412 nm. Iz apsorbancije se računa postotak inhibicije enzima. Na pločice se pipetiraju otopine tako da u prvi kanal u gornje četiri jažice ide kontrola, pa uzorke punimo u gornje četiri jažice sljedeća dva kanala. U donje četiri jažice svakog od 12 kanala ide slijepa proba tzv. „blank“. Reakcija se odvija na 37 °C.

Tablica 2.6. Prikaz punjenja svake jažice prilikom ispitivanja inhibicije AChE.

	Blank	Kontrola	Uzorak
Pufer	190 μL	180 μL	180 μL
DTNB	10 μL	10 μL	10 μL
Uzorak	10 μL	10 μL EtOH (86%)	10 μL
AChE	/	10 μL	10 μL
ATChI	10 μL	10 μL	10 μL

2.6.2 Ispitivanje sposobnosti inhibicije butirilkolinesterze (BChE)

Kemikalije:

- Enzim butirilkolinesteraze (BChE)
- S-butililtiokolin jodid (BTChI)
- 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina) – DTNB
- Uzorci (otopine eteričnih ulja konc. 1 g/L)

Priprema otopina:

- Otopina DTNB (0,3 mM): dobije se otapanjem 13,079 mg reagensa u 5 mL pufera (pH = 7) s 0,12 M NaHCO₃.
- Otopina BTChI (0,5 mM): dobije se otapanjem 17,45 mg BTChI u 5 mL pufera kojem je pH = 8.
- Otopina BChE (0,03 U/mL): 14 μL reagensa (240 U/mL u puferu pH = 8) u 5 mL pufera, pH = 8.

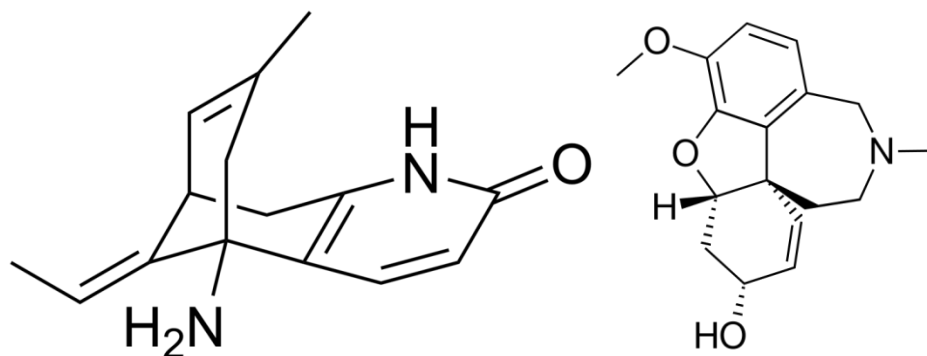
Postupak:

Postupak je isti, a također se mjeri apsorbancija u svrhu izračuna postotka inhibicije butirilkolinesteraze uzorcima (otopine hlapljivih ekstrakata; 1 g/L). Punjenje jažica na pločicama slijedi isti princip, te se mjerenja odvijaju u istom uređaju. Reakcija se odvija na 37 °C.

Tablica 2.7. Prikaz punjenja svake jažice prilikom ispitivanja inhibicije BChE

	Blank	Kontrola	Uzorak
Pufer	190 μL	180 μL	180 μL
DTNB	10 μL	10 μL	10 μL
Uzorak	10 μL	10 μL EtOH (86%)	10 μL
BuChE	/	10 μL	10 μL
BTChI	10 μL	10 μL	10 μL

NAPOMENA ZA OBA ISPITIVANJA: kao pozitivne kontrole mjerila se i sposobnost inhibicije AChE i BChE Huperzinom A (0,1 g/L u 86%-nom etanolu) te galantaminom (5 µg/mL).. Ovi su spojevi poznati inhibitori kolinesteraza.



Slika 2.11. Struktura Huperzina A (lijevo) i galantamina (desno) (48) (49).

Sposobnost neke tvari da inhibira kolinesteraze, računa se na način:

$$\%inhibicije = \frac{A_k - A_{uz.}}{A_k} * 100$$

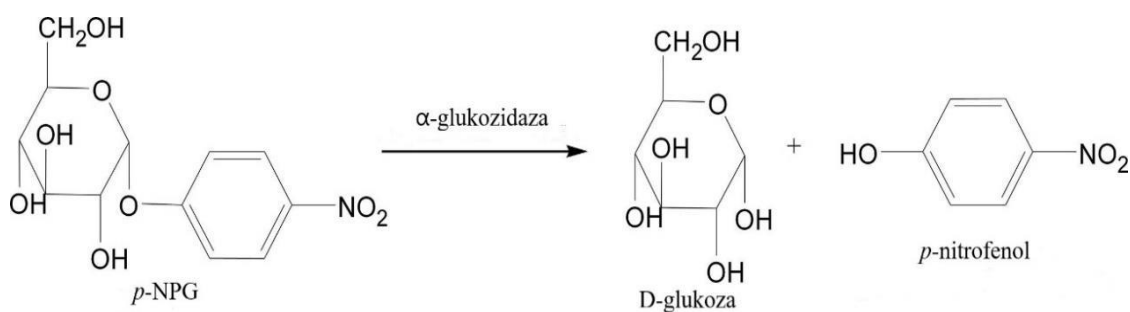
A_k – apsorbancija kontrole; $A_{uz.}$ – apsorbancija uzorka.



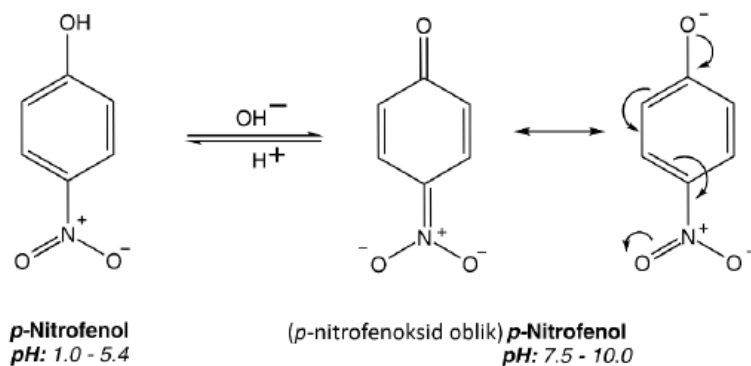
Slika 2.12. Provođenje Ellman-ovog testa pomoću čitača mikrotitarskih pločica.

2.7 Ispitivanje inhibicije α -glukozidaze

Određivanje inhibicijskog učinka eteričnih ulja dvaju biljaka na enzim α -glukozidazu radi se modificiranim metodom po Brueggemana i Hollingswortha (50) (51). Ova metoda je također kolorimetrijska metoda u kojoj se mjeri apsorbancija, a ona se zasniva na reakciji *p*-nitrofenol u bazičnom mediju kada nastane tzv. *p*-nitrofenoksid (žuto obojena otopina). Kemijski spoj *p*-nitrofenol oslobađa u reakciji kada enzim α -glukozidaze djeluje na 4-nitrofenil- α -D-glukopiranozid (*p*-NGP), koji se raspada sljedeći reakciju (52):



Slika 2.13. Mehanizam hidrolize *p*-NGP-a na D-glukozi i *p*-nitrofenol (53).



Slika 2.14. Reakcija *p*-nitrofenola u lužnatom mediju (žuto) (54).

Spektrofotometrijski se mjeri apsorbancija kada dođe do otpuštanje *p*-nitrofenola na valnoj duljini od 405 nm..

Priprema radnih otopina:

1. Fosfatni pufer, pH = 7 (0,1 i 0,01 M)
2. Enzim α -glukozidaza (0,1 U/mL); priprema se otopina koncentracije 1 mg/mL (10 U/mL) u fosfatnom puferu (0,01 M), te se u istom puferu razrijeđuje na 0,1 U/mL (uz dodavanje BSA koncentracije 1 mg/L)
3. 4-nitrofenil- α -D-glukopiranozid (*p*-NGP: 0,5 mM); otapa se 0,1506 g u 100 mL 0,1 M fosfatnog pufera
4. Natrijev karbonat (0,2 M); otapa se 2,12 g natrijevog karbonata u 100 mL destilirane vode.

Postupak rada:

Ovo se ispitivanje najefikasnije provede na način da se sve otopine gore navedene prvo naprave, a zatim kreće mjerenje na multikanalnom čitaču mikrotitarskih pločica (8x12). Da bi mjerili apsorbanciju na 405 nm treba sve potrebne jažice na pločici napuniti otopinama u različitom omjeru. Pune se na isti način kao i kod Ellmanove metode. Gornje četiri (A-D) jažice pune se redom od 1 do 12, prvo kontrolom, a zatim uzorcima po redu. Donje četiri (E-H) pune se sa „blank“-ovima (nema enzima). Uzorci su otopine hlapljivih ekstrakata, enzim α -glukozidaza, a supstrat je *p*-NGP. U tablici su prikazani volumeni za punjenje svake od jažica. Reakcija u jažicama se provodi 30 min na temperaturi od 37 °C, po isteku se doda 100 μ L otopine natrijeva karbonata i potom se mjerila psorbancija. Kao pozitivna kontrola koristila se otopina akarboze.

Tablica 2.8. Prikaz punjenja svake jažice prilikom ispitivanja inhibicije α -glukozidaze.

	Blank	Kontrola	Uzorak
Pufer	75 μ L	50 μ L	50 μ L
Supstrat	25 μ L	25 μ L	25 μ L
Uzorak	10 μ L	10 μ L EtOH (86%)	10 μ L
Enzim	-	25 μ L	25 μ L

*Nakon 30 min dodaje se 100 μ L otopine Na₂CO₃, te se izmjeri apsorbancija.

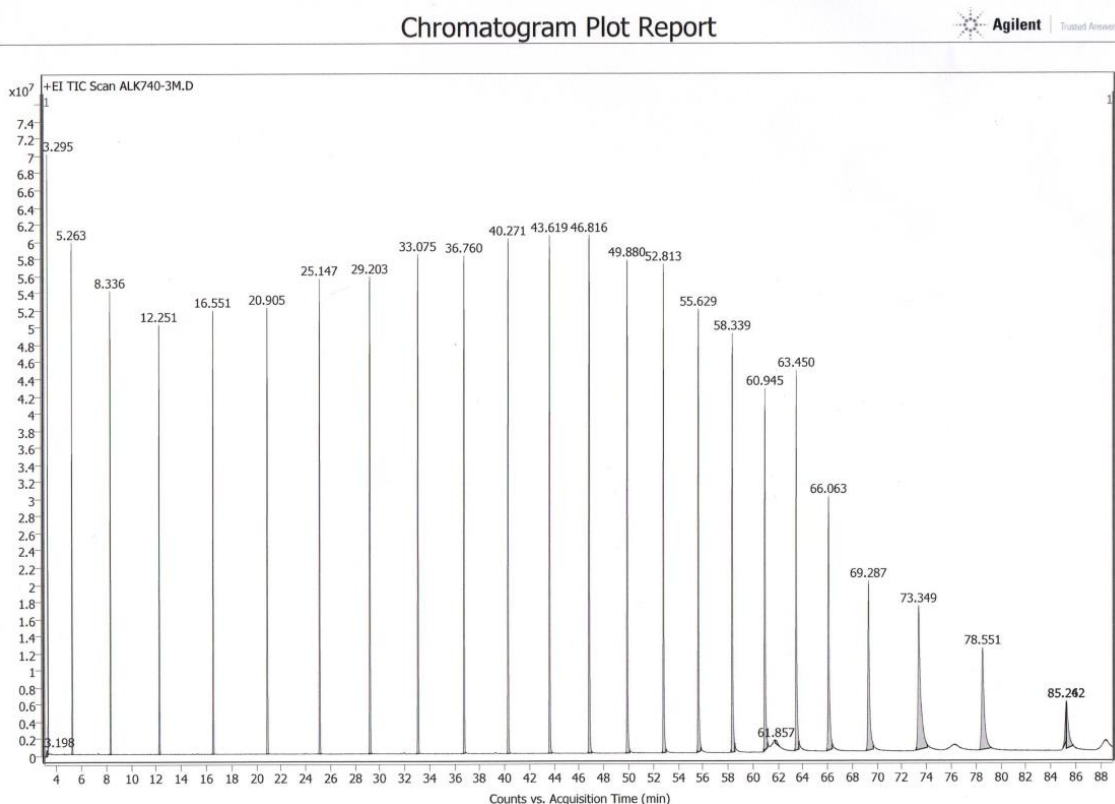
Sposobnost neke tvari da inhibira α -glukozidazu, računa se na način:

$$\%inhibicije = \frac{A_k - A_{uz.}}{A_k} * 100 \quad (A_k - \text{apsorbancija kontrole}; A_{uz.} - \text{apsorbancija uzorka.})$$

3 REZULTATI I RASPRAVA

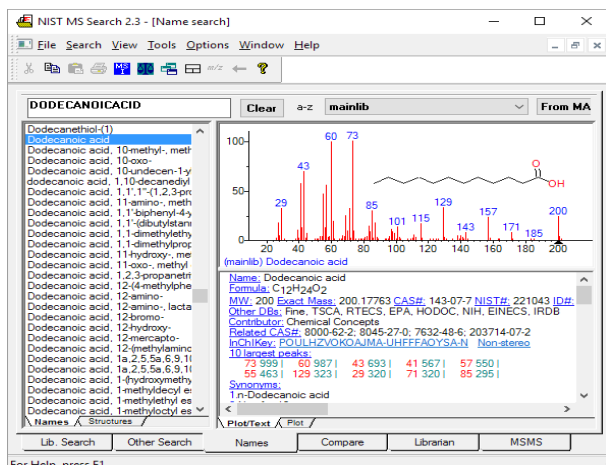
3.1 Kemijski sastav eteričnih ulja

Hlapljivi ekstrakti biljnih vrsta *Rhamnus alaternus* i *Gleochoma hederacea* izolirani su iz prethodno osušenih nadzemnih dijelova biljaka (list + cvijet + stabljika) sakupljenih u vrijeme cvatnje. Ta izolaciju hlapljivih ekstrakata korištena je modificirana metoda po Clavenger-u. Iscrpak eteričnog ulja iz biljnog materijala je 0,083% za vazdazelenu krkavinu, te 0,202% za puzavu dobričicu. Kemijska analiza sastava te sadržaja pojedinih komponenti ekstrakata ovih biljaka napravljena je uz pomoć vezanog sustava GC-MS. Identifikacija kemijskih spojeva izvršena je na temelju retencijskih vremena pojedinih komponenti ekstrakata te iz njih izračunatih Kovačevih indeksa (KI). KI su izračunati na osnovu retencijskih vremena serije alkana C₈-C₃₁. Slika 3.1. pokazuje kromatogram ukupne ionske struje serije alkana. Uspoređujući KI sa literaturnim, već poznatim vrijednostima, te usporedbom spektara masa dobivenih spojeva sa spektrima masa u Wiley 9N08 (Wiley, New York, NY, USA) i NIST 02 bazama podataka identificirani su kemijski spojevi u eteričnim uljima.



Slika 3.1. Kromatogram ukupne ionske struje serije alkana C₈-C₃₁

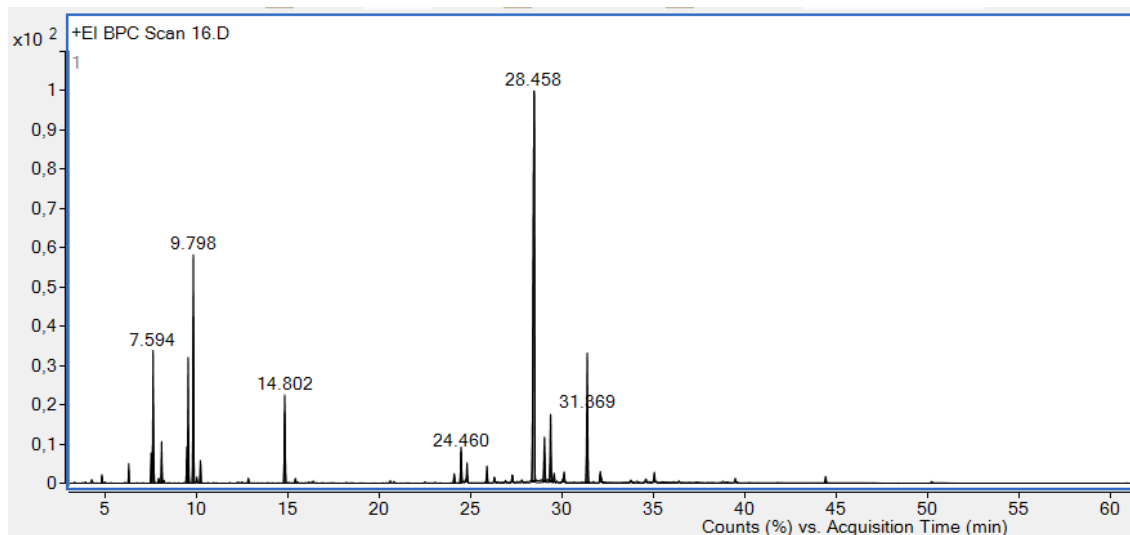
Kemijski sastavi hlapljivih ekstrakata prikazani su tablicama 3.1. i 3.2., dok su kromatogrami ukupne ionske struje izoliranih ekstrakata, dobiveni GC-MS analizom, prikazani slikama 3.3. i 3.4. Spojevi u tablicama poredani su prema rastućima Kovačevim indeksima (KI).



Slika 3.2. Prikaz NIST02 baze podataka (64)

3.1.1 Kemijski sastav eteričnog ulja puzave dobričice

Kemijski sastav hlapljivog ekstrakta puzave dobričice (lat. *Glechoma hederacea* L.) izoliranog iz suhog biljnog materijala (cvijet + list + stabljika) sakupljenog na lokalitetu Samoborsko gorje (vinograd), Velika Jazbina, u travnju 2021. godine prikazan je tablicom 3.1. Kromatogram ukupne ionske struje ovog ulja prikazan je slikom 3.3.



Slika 3.3. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivog izolata puzave dobričice

Tablica 3.1. Kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva ekstrakta puzave dobričice

<i>Glechoma hederacea</i>	KI	% (w/w)	Način identifikacij e	Klasa spojeva
(<i>E,Z</i>)-1,3,5-Oktatrien*	880	0.36	KI, MS	OS
α -pinen	937	0.61	KI, MS	MT
sabinen	969	0.89	KI, MS	MT
β -pinen	979	4.64	KI, MS	MT
3-oktanon	988	0.21	KI, MS	OS
β -mircene	992	1.21	KI, MS	MT
β -fenandren	1032	1.29	KI, MS	MT
1,8-cineol	1034	7.26	KI, MS	MTO
(<i>Z</i>)- β -ocimen	1042	9.45	KI, MS	MT
(<i>E</i>)- β -ocimen	1052	1.02	KI, MS	MT
Okten-3-il acetat	1114	0.29	KI, MS	OS
(<i>E</i>)-pinokamfon	1163	4.71	KI, MS	MTO
(<i>Z</i>)-pinokamfon	1176	0.32	KI, MS	MTO
α -kopaen	1377	0.69	KI, MS	ST
β -burbonen	1385	2.69	KI, MS	ST
β -elemen	1392	1.37	KI, MS	ST
kariofilen	1419	1.25	KI, MS	ST
β -kopaen	1429	0.38	KI, MS	ST
α -humulen	1454	0.51	KI, MS	ST
germakren D	1482	37.05	KI, MS	ST
biciklogermakren	1496	3.33	KI, MS	ST
β -bisabolen*	1504	5.02	KI, MS	ST
α -farnezen*	1509	0.57	KI, MS	ST
β -seskvifelandren	1522	0.23	KI, MS	ST
δ -kadinen	1524	0.81	KI, MS	ST
germakren B	1557	9.95	KI, MS	ST
toreiol	1642	0.33	KI, MS	STO
α -kadinol	1653	0.73	KI, MS	STO
fitol	2112	0.19	KI, MS	DT
				MT 19,11
				MTO 12,29
				ST 63,85
UKUPNO		97,36		STO 1,06
				DT 0,19
				OS 0,86

*=točan izomer nije identificiran; MT=monoterpeni;MTO=monoterpenoidi; ST= seskviterpeni; STO=seskviterpenoidi; DT=diterpeni; OS=ostali spojevi

Ukupno 29 spojeva identificirano je u hlapljivom ekstraktu izoliranom iz nadzemnih dijelova prethodno osušene biljke *Glechoma hederacea*, a što čini 97,36 % ukupno identificiranih komponenti. Među identificiranim spojevima kao najzastupljeniji dolazi seskviterpen germakren D (37,05 %). Germakren B (9,95 %), (*Z*)- β -ocimen (9,45 %), 1,8-cineol (7,26 %), β -bisabolen (5,02 %), (*E*)-pinokamfon (4,71 %) i β -pinen (4,64 %) dolaze u maselima udjelima nižim od 3,50 %.

Najzastupljenije klase spojeve ovog hlapljivog ekstrakta su seskviterpeni (63,85 %). Monoterpeni (19,11 %) i monoterpenoidi (12,29%) dolaze u nižim udjelima. Seskviterpenoidi (1,06 %), ostali spojevi (0,86 %) i diterpeni (0,19%) dolaze u veoma malim udjelima.

Analizu eteričnog ulja ove biljke sabrane u Srbiji načinili su Radulovic i suradnici. Analiza je pokazala da su najzastupljenije komponente ulja palmitinska kiselina (13.3%), linolenska kiselina (9.3%) i germakren D (7.3%) (55).

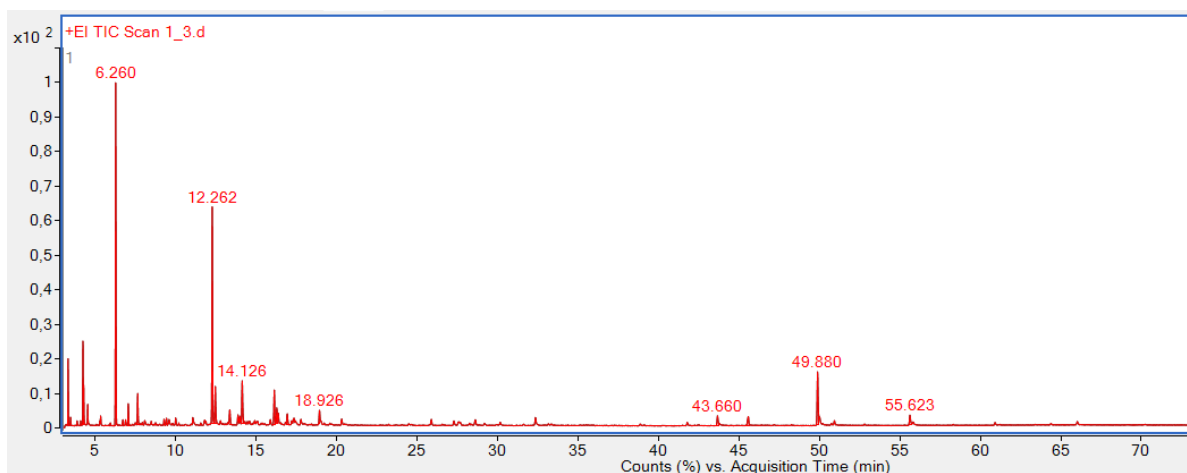
Napravljena je i analiza kemijskog sastava ulja ove biljke sakupljene u vrijeme pune cvatnje u Lituaniji. Ulje je veoma bogato seskviterpenima (56.5-67.9%). Najzastupljenija komponenta ulja bila je germakren D (14.1-20.7%). Od ostalih spojeva zastupljeniji su γ -elemen (9.0-16.0%), β -elemen (8.7-12.9%), fitol (2.8-15.6%), (*Z*)- β -ocimen (2.2-8.5%), 1,8-cineole (92.2-5.4%), β -ilangen (2.7-4.1%) i germakren B (2.2-3.9%) (56).

Druga analiza ovog ulja ove biljke sakupljene na 5 različitih prirodnih lokaliteta Lituanije te transferiranih na uzgojne površine, pokazala je da su najzastupljenije komponente germakren D (5.5-15.5%), sabinen (6.3-12.3%), 1,8-cineol (5.1-41.6%), β -kariofilen i njegov oksid (7.3-19.3%,) te γ -elemen (9.6%) (57).

Analiza eteričnog ulja ove biljke kultivirane na Sveučilištu u Tajvanu pokazala je da je najzastupljenija komponenta ulja trans-3-pinanon (41.4%). Ostale kvantitativno značajne komponente ovog ulja bile su 4,5,6,7-tetrahidro-5-izopropenil-3,6- β -dimetil-6- α -vinil benzofuran (10.8%), β -kariofilen (10.2%) i spatulenol (4.3%) (58).

3.1.2 Kemijski sastav hlapljivog ekstrakta vazdazelene krkavine

Kemijski sastav hlapljivog ekstrakta vazdazelene krkavine (*Rhamnus alaternus* L.) izoliranog iz suhog biljnog materijala (cvijet + list + stabljika) sakupljenog na lokalitetu park šume Marjan u Splitu, u ožujku 2021. godine prikazan je tablicom 3.1. Kromatogram ukupne ionske struje ovog ulja prikazan je slikom 3.4.



Slika 3.4. Kromatogram ukupne ionske struje hlapljivog ekstrakta vazdazelene krkavine

Tablica 3.2. Kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva hlapljivog ekstrakta biljke vazdazelena krkavina

<i>Rhamnus alaternus</i>	KI	% (w/w)	Način identifikacije	Klasa spojeva
heksanal	800	3.01	KI, MS	OS
butil-acetat	810	0.34	KI, MS	OS
furfural	834	0.28	KI, MS	OS
(<i>E</i>)-2-heksen-1-ol	853	4.13	KI, MS	OS
(<i>Z</i>)-3-heksen-1-ol*	855	1.90	KI, MS	OS
heksanol	870	0.98	KI, MS	OS
propil-butanoat	900	0.27	KI, MS	OS
heptanal	902	0.59	KI, MS	OS
α -pinen	937	22.03	KI, MS	MT
kamfen	952	0.40	KI, MS	MT
thuja-2,4(10)-diene	958	0.42	KI, MS	MT
benzaldehyd	963	1.57	KI, MS	OS
sabinen	976	0.24	KI, MS	MT

1-okten-3-ol	980	2.28	KI, MS	OS
<i>m</i> -menta-1(7),8-diene*	993	0.53	KI, MS	MT
oktanal	1004	0.31	KI, MS	OS
<i>p</i> -cimen	1027	0.50	KI, MS	MT
limonen	1031	0.64	KI, MS	MT
benzilni alkohol	1036	0.33	KI, MS	OS
fenil- acetaldehid	1047	0.62	KI, MS	OS
1-oktanol	1073	0.47	KI, MS	OS
<i>cis</i> -dihidrokarveol*	1090	0.53	KI, MS	MTO
<i>trans</i> -sabinen hidrat	1092	0.28	KI, MS	MTO
linalool	1100	17.53	KI, MS	MTO
nonanal	1105	3.45	KI, MS	OS
fenetil alkohol	1114	0.29	KI, MS	OS
fenčil allohol	1128	1.47	KI, MS	MTO
<i>cis</i> -sabinol	1141	0.96	KI, MS	MTO
<i>trans</i> -sabinol	1144	0.70	KI, MS	MTO
mircenon	1147	4.38	KI, MS	MTO
pinokarvon	1165	0.32	KI, MS	MTO
artemisil acetat	1169	0.30	KI, MS	MTO
<i>p</i> -cimen-8-ol	1186	0.60	KI, MS	MTO
α -terpineol	1191	3.26	KI, MS	MTO
metil salicilat	1194	1.43	KI, MS	OS
mirtenol	1196	0.91	KI, MS	MTO
verbenon	1209	1.16	KI, MS	MTO
<i>p</i> -ment-1-en-9-al	1216	0.23	KI, MS	MTO
krisantenil acetate*	1222	0.27	KI, MS	MTO
β -jonon	1486	0.72	KI, MS	STO
α -murolen	1499	0.27	KI, MS	ST
kariofilen oksid	1582	1.00	KI, MS	STO
heksahidrofarnezil aceton	1846	0.42	KI, MS	OS
2-heptadekanon	1900	1.13	KI, MS	OS
palmitinska kiselina	1962	1.23	KI, MS	OS
heneikozan	2100	6.13	KI, MS	OS
2-nonadekanon	2104	0.72	KI, MS	OS
linoleinska kiselina	2136	0.43	KI, MS	OS
trikozaan	2300	1.30	KI, MS	OS
UKUPNO		93,26		MT 24,76
				MTO 32,90
				ST 0,27
				STO 1,72
				OS 33,61

*=točan izomer nije identificiran; MT=monoterpeni;MTO=monoterpenoidi; ST= seskviterpeni; STO=seskviterpenoidi; OS=ostali spojevi

Ukupno 49 spojeva identificirano je u hlapljivom ekstraktu iz nadzemnih dijelova prethodno osušene biljke *Rhamnus alaternus*, a što čini 93,25 % ukupno identificiranih komponenti ovog ekstrakta. Među identificiranim spojevima kao najzastupljeniji dolaze neoksidirani terpen α -pinen (22,03%) i oksidirani terpen (terpenoid) linalool (17,53%). U značajnom udjelu dolaze i heneikozan (6,13%), mircenon (4,38%), (*E*)-2-hexen-1-ol (4,13%), nonanal (3,45%) α -terpineol (3,26%) i heksanal (3,01%). Ostali spojevi dolaze u udjelu manjem od 2,30%. Najzastupljenije klase spojeve ovog hlapljivog ekstrakta su ostali spojevi (33,61%), monoterpenoidi (32,90%) i monoterpeni (24,76%). Seskviterpeni i seskviterpenoidi dolaze u malim udjelima (0,27 i 1,72%).

Do danas je napravljena samo jedna analiza eteričnog ulja ove biljke sabrane u Alžiru. Analiza je pokazala da su najzastupljenije komponente ovog ulja fitol (16.10%), linalool (15.33%) i β -damascenon (5.28%). Kvantitativno, iza kojih slijede β -bisabolen (3.26%), *cis*-geraniol (2.24%) i heksahidrofarnezil acetone (2.03%) (59).

3.2 Antioksidacijska aktivnost hlapljivih ekstrakata

Od izoliranih hlapljivih ekstrakata, dobivnih hidroddestilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevener-u, pripravljene su otopine ekstrakata masenih koncentracija od 1 g/L u 86%-om etanolu. Za testiranje antioksidacijske aktivnosti izoliranih ekstrakata u ovom su radu korištene dvije metode: metoda hvatanja slobodnih DPPH radikala (DPPH metoda) i metoda određivanja redukcijskog potencijala (FRAP metoda) (43)(45).

Obe metode su kolorimetrijske, a to znači da se mjerenja provode korištenjem UV/vis spektrofotometrije kao analitičke tehnike. Mjerenja obaju metoda provode se na određenim valnim duljinama koje ulaze u vidljivo područje elektomagnetskog spektra.

Uređaj koji se koristi za mjerenja je multikanalni čitač mikrotitarski pločica Sunrise (Tecan Group Ltd., Austria). Pločice imaju 96 jažica (8x12) i pune se radnim otopinama i uzorcima. Rezultati koji se dobiju takvim mjerenjima su apsorbancije. Iz tih se apsorbancija mogu dalje računati postotak redukcije kod DPPH metode ili se pak mogu odrediti koncentracije nastalih Fe^{2+} iona redukcijom zbog utjecaja uzoraka kao antioksidanasa.

DPPH metoda temelji se na reakciji u kojoj antioksidans tj. uzorak reagira s DPPH radikalom (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*), te ga reducira. Mjerenje se obavlja na valnoj duljini 517 nm. Tijekom reakcije ljubičasti DPPH• radikal nestaje i tako reakcijska smjesa u jažicama polako postaje bezbojna. Slijepa proba se sastoji od 200 μL otopine DPPH i 10 μL 86 %-nog etanola, a uzorak se mjeri na način da se stavi 200 μL radne otopine DPPH i 10 μL testiranih otopina hlapljivih ekstrakata.

FRAP metoda (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) mjeri se ukupni redukcijski potencijal nekog uzorka. Sama metoda je kolorimetrijska i zasniva se na redukciji Fe^{3+} u Fe^{2+} kation željeza. U metodi se koristi FRAP reagens koji je otopina Fe(III)-TPTZ_2 kompleksa (TPTZ; *2,4,6-tripiridil-s-triazina*) u acetatnom puferu (pH = 3,6). Kod ove metode također se mjeri apsorbancija na 593 nm u multikanalnom čitaču pločica. Za ovu metodu potrebno je praviti standardnu krivulju koju dobijemo mjerenjima apsorbancije standardnih otopina, otopina poznatih koncentracija Fe^{2+} iona. Iz te standardne krivulje očitaju se rezultati koji se iskazuju u mmol Fe^{2+} /g biljnog materijala.

Mjerenja antioksidacijskih potencijala izoliranih hlapljivih ekstrakata biljaka su rađena u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mjerenja te kao % hvatanja slobodnih DPPH radikala (DPPH metoda), te kao mmol/g ekvivalenta Fe^{2+} iona (FRAP metoda). Za pozitivnu kontrolu korištena je otopina BHA (butil hidroanisol) iste testirane koncentracije, kao poznato dobrog antioksidansa. Rezultati su prikazani tablicom 3.3.

Tablica 3.3. Antioksidacijski potencijal aktivnost hlapljivih ekstrakata biljaka puzava dobričica i vazdazelena krkavina

Vrsta	% DPPH	FRAP ekvivalent Fe^{2+} (mmol/g)
<i>Puzava dobričica</i>	4,26	0,147
<i>Vazdazelena krkavina</i>	na	0,130
<i>BHA</i>	95,1	4864

*Testirani su uzorci osnovne koncentracije 1 mg/mL; na= nema aktivnosti

Iz dobivenih rezultata testiranja antioksidacijske aktivnosti hlapljivih ekstrakata izoliranih iz prethodno osušenog biljnog materijala biljaka puzava dobričica i vazdazelena krkavina može se zaključiti da ovi ekstrakti pokazuju veoma slabu ili nikakvu antioksidacijsku aktivnost testiranu i DPPH metodom (4,25% i 0%), kao i FRAP metodom (0,147 i 0,130 mmol/g Fe^{2+}), a sve to u usporedbi s poznato dobrim antioksidansom kao što je testirani BHA (95,1 % kod DPPH metode i 4864 mmol/g Fe^{2+} kod FRAP metode).

Slab antioksidacijska aktivnost testiranih otopina hlapljivih ekstrakata može se pripisati kemijskom sastavu samih hlapljivih ekstrakata tj nedostatku ili manjku kemijskih spojeva odnosno komponenata ekstrakata koji bi bili odgovorni za antioksidacijsku aktivnost. Takvi spojevi su npr. fenolni monoterpenoindi kao što su timol, karvakrol (60).

Do danas je načinjena tek jedna analiza mjerenja antioksidacijskog učinka eteričnog ulja biljke puzava dobričica, metodom izbjeljivanja β -karotena, koja je pokazala da ulje ove biljke ima dobru sposobnost izbjeljivanja β -karotena (58).

3.3 Inhibicijski potencijal hlapljivih ekstrakata na AChE i BChE

Sposobnost hlapljivih ekstrakata biljaka puzava dobričica i vazdazelena krkavina da inhibiraju enzime acetilkolinesterazu (AChE) i butirilkolinesterazu (BChE) testirana je metodom po Ellmanu (17)(20)(47). Koncentracija testiranih osnovnih otopina ekstrakata iznosila je 1 mg/mL, dok je koncentracija ekstrakata u reakcijskim sustavima iznosila 45,45 µg/mL. Rezultati mjerenja prikazani u tablici 3.4.

Ellman-ova metoda je jedna od pouzdanih i najčešće korištenih metoda za ispitivanje sposobnosti inhibicije enzima iz porodice kolinesteraza. U ovoj metodi kao supstrati se koriste tiokolinski derivati acetilkolina i butirilkolin, a to su acetiltiokolin jodid (ATChI) i S-butiriltiokolin jodid (S-BTChI). Ova metoda je kolorimetrijska metoda u kojoj se UV/vis-spektrofotometrijom mjeri apsorbancija na maksimumu od 412 nm. Za mjerenja se koristio multikanalni čitač mikrotitarskih pločica.

Kod mjerenja negativna kontrola je smjesa otopina DTNB-a, supstrata, kolinesteraze, pufera, i 86 %-og etanola u omjerima prije navedenima (Poglavlje 2.6 Ellman-ova metoda).

Sposobnost inhibicije kolinesteraza otopinama hlapljivih ekstrakata koncentracije 1 g/L, se računa na isti način, tako da se apsorbancija uzoraka ili pozitivnih kontrola oduzimaju od apsorbancija negativnih kontrola, a ta se razlika zatim dijeli sa apsorbancijom negativne kontrole. Sve se množi sa 100 da se dobije % inhibicije. Mjerenja inhibicijskih potencijala izoliranih hlapljivih ekstrakata biljaka su rađena u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mjerenja. Rezultati su uspoređeni s onim za poznato dobre inhibitore ovih enzima, huperzinom A i galantaminom, kao pozitivne kontrole.

Tablica 3.4. Sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE hlapljivim ekstraktima biljaka puzava dobričica i vazdazelena krkavina

	AChE	BChE
	% inhibicije	% inhibicije
Puzava dobričica	82,99	22,29
Vazdazelena krkavina	48,14	na
Huperzin A (0,1 g/L)	90,72	58,79
Galantamin (5 mg/L)	78,6	40,9

*Testirani su uzorci osnovne koncentracije 1 mg/mL; na= nema aktivnosti

Testirani uzorak hlapljivog ekstrakta biljke puzava dobričica pokazuje dobru sposobnost inhibicije AChE (82,99%), u odnosu na poznato dobre inhibitore ovog enzima huperzin A i galantamin. Slabiju, ali još uvijek značajnu sposobnost inhibicije AChE pokazuje i ekstrakt vazdazelene krkavine (48,14%). Ekstrakt biljke puzava dobričica slabije inhibira enzim BChE (22,29%), dok ekstrakt biljke vazdazelena krkavina ne inhibira BChE. Rezultati inhibicije hlapljivih ekstrakata testiranih biljaka uspoređeni su s onim za poznato dobre inhibitore ovog enzima huperzin A i galantamin, koji također slabije inhibiraju BChE u odnosu na AChE.

Komponente koje ulaze u sastav hlapljivog ekstrakta biljke puzava dobričica, kao 1,8-cineol, α -pinen, β -pinen, cis-ocimen poznato su dobri inhibitori enzima AChE, te se njima može pripisati snažan inhibicijski potencijal ovog ekstrakta na AChE (61). Kod vazdazelene krkavine u sastavu hlapljivog ekstrakta takođe ulaze spojevi koji su dokazano dobri inhibitori AChE, kao α -pinen ili linalool, no vjerojatno uslijed nekakvog antagonističkog djelovanja komponenti ekstrakta ovaj ekstrakt slabije inhibira AChE.

Testiranja čistih spojeva koji ulaze u sastav hlapljivih biljnih ekstrakata na enzim BuChE dosta su rjeđa i imamo manje saznanja na tu temu. Ono što se pokazalo je da najvećim djelom ove klase spojeva slabije inhibiraju BuChE u odnosu na AChE.

Do danas nisu načinjene analize hlapljivih ekstrakata ovih biljaka na AChE i BChE.

Prema našem saznanju do danas nije načinjena niti jedna analiza inhibicijskog potencijala hlapljivih ekstrakata ovih biljaka na enzime AChE i BChE.

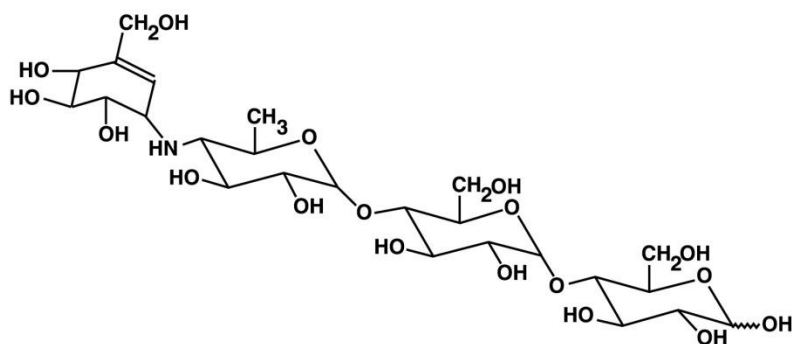
3.4 Inhibicijski potencijal hlapljivih ekstrakata na enzim α -glukozidazu

Rezultati inhibicijskog djelovanja hlapljivih ekstrakata biljaka puzava dobričica i vazdazelena krkavina izoliranih iz prethodno osušenog biljnog materijala biljaka sabranih u vrijeme pune cvatnje na enzim α -glukozidaza prikazani su u tablici 3.5. Testirane su koncentracije osnovnih otopina ekstrakata 1 mg/mL, odnosno koncentracije u reakcijskom sustavu od 47,62 μ g/mL. Za testiranje je korištena metoda opisana od Brueggemana i Hollingsworth-a (51).

Ovakvo ispitivanje je kolorimetrijsko i kod njega se UV/vis spektrofotometrijom mjeri apsorbancija na 405 nm. Cijelo ispitivanje se zasniva na dvije reakcije. Prva je hidroliza *p*-NPG na dekstrozu i *p*-nitrofenol, koji se kasnije u lužnatom mediju disocira i daje *p*-nitrofenoksid koji je jarko žute boje.

Mjerenje se također odvija u multikanalnom čitaču mikrotitarskih pločica (Tecan, Sunrise), te se mjeri direktno nakon trideset minuta kada se doda otopina natrijeva karbonata u jažice na pločici.

Mjerenja inhibicijskih potencijala izoliranih hlapljivih ekstrakata biljaka na enzim α -glukozidazu su rađena u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mjerenja. Rezultati su uspoređeni s onim za poznati inhibitor ovog enzima akarbozu (pozitivna kontrola), te prikazani tablicom 3.5.



Slika 3.5. Prikaz strukture akarboze (62).

Tablica 3.5. Sposobnost inhibicije enzima α -glukozidaza hlapljivim ekstraktima biljaka puzava dobričica i vazdazelena krkavina

α-glukozidaza	
% inhibicije	
puzava dobričica	63,91
vazdazelena krkavina	na
akarboza	44,20

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

Hlapljivi ekstrakt biljke puzava dobričica, u testiranoj koncentraciji od 1 g/L, pokazuje dobru sposobnost inhibicije enzima α -glukozidaza (63,91%), u odnosu na akarbozu iste testirane koncentracije (44,20%). Istodobno hlapljivi ekstrakt biljke vazdazelena krkavina nije pokazao inhibiciju ovog enzima.

Mali broj istraživanja sposobnosti inhibicije ovog enzima spojevima koje dolaze kao sastavnice hlapljivih biljnih ekstrakata je do danas načinjeno zbog čega je teško procijeniti kojim komponentama ovih ekstrakata možemo pripisati ovu vrstu aktivnosti. Pretpostavljamo tek da aktivnosti pridonose spojevi u većim udjelima zastupljeni u ovim ekstraktima, kakvi su germakren D, germagren B ili (*Z*)- β -ocimen, a vjerojatno i nekakav sinergijski učinak pojedinih komponenti ekstrakta.

Pregledom literature utvrđeno je da do danas nije načinjena niti jedna analiza sposobnosti hlapljivih ekstrakata ovih biljaka da inhibiraju enzim α -glukozidazu.

4 ZAKLJUČAK

- Cilj ovog rada bio je odrediti kemijski sastav i biološki učinak hlapljivih ekstrakatabiljaka puzava dobričica (*Glechoma hederacea* L.) i vazdazelena krkavina (*Rhamnus alaternus* L.).
- Ukupno 29 spojeva identificirano je u hlapljivom ekstraktu izoliranom iz nadzemnih dijelova prethodno osušene biljke *Glechoma hederacea*, a što čini 97,36 % ukupno identificiranih komponenti. Među identificiranim spojevima kao najzastupljeniji dolazi seskviterpen germakren D (37,05 %). Germakren B (9,95 %), (*Z*)- β -ocimen (9,45 %), 1,8-cineol (7,26 %), β -bisabolen (5,02 %), (*E*)-pinokamfon (4,71 %) i β -pinen (4,64 %) dolaze u maselim udjelima nižim od 3,50 %. Do danas nije načinjena niti jedna analiza kemijskog sastava ove biljke u Hrvatskoj.
- Ukupno 49 spojeva identificirano je u hlapljivom ekstraktu iz nadzemnih dijelova prethodno osušene biljke *Rhamnus alaternus*, a što čini 93,25 % ukupno identificiranih komponenti ovog ekstrakta. Među identificiranim spojevima kao najzastupljeniji dolaze neoksidirani terpen α -pinen (22,03%) i oksidirani terpen (terpenoid) linalool (17,53%). U značajnom udjelu dolaze i heneikozan (6,13%), mircenon (4,38%), (*E*)-2-hexen-1-ol (4,13%), nonanal (3,45%) α -terpineol (3,26%) i heksanal (3,01%). Ostali spojevi dolaze u udjelu manjem od 2,30%. Do danas nije načinjena niti jedna analiza kemijskog sastava ove biljke u Hrvatskoj.
- Testiranje antioksidacijskog potencijala hlapljivih ekstrakata ovih biljaka provedenom je DPPH i FRAP metodom. Rezultati su pokazali da ovi ekstrakti pokazuju veoma slabu ili nikakvu antioksidacijsku aktivnost testiranu i DPPH metodom (4,25% i 0%) i FRAP metodom (0,147 i 0,130 mmol/g Fe²⁺), a sve to u usporedbi s poznato dobrim antioksidansom kao što je testirani BHA (95,1 % kod DPPH metode i 4864 mmol/g Fe²⁺ kod FRAP metode). Do danas je načinjena tek jedna analiza mjerenja antioksidacijskog učinka eteričnog ulja biljke puzava dobričica, metodom izbjeljivanja β -karotena, ali niti jedna na uzorcima biljke iz Hrvatske.

- Testiranje inhibicijskog potencijala hlapljivim ekstraktima ovih biljaka provedeno je na enzime AChE i BChE metodom po Ellmanu te na enzim α -glukozidazu metodom po Brueggemanu i Hollingsworthu. Uzorak hlapljivog ekstrakta biljke puzava dobričica u koncentraciji 1 g/L pokazuje dobru sposobnost inhibicije AChE (82,99%), u odnosu na poznato dobre inhibitore ovog enzima huperzin A i galantamin. Slabiju, ali još uvijek značajnu sposobnost inhibicije AChE pokazuje i ekstrakt vazdazelene krkavine u koncentraciji 1 g/L (48,14%). Ekstrakt biljke puzava dobričica u koncentraciji 1 g/L slabije inhibira enzim BChE (22,29%), dok ekstrakt biljke vazdazelena krkavina u koncentraciji 1 g/L ne inhibira BChE. Do danas nije načinjena niti jedna analiza sposobnosti hlapljivih ekstrakata ovih biljaka da inhibiraju enzime AChE i BChE.
- Hlapljivi ekstrakt biljke puzava dobričica, u testiranoj koncentraciji od 1 g/L, pokazuje dobru sposobnost inhibicije enzima α -glukozidaza (63,91%), u odnosu na akarbozu iste testirane koncentracije (44,20%). Istodobno hlapljivi ekstrakt biljke vazdazelena krkavina nije pokazao inhibiciju ovog enzima. Do danas nije načinjena niti jedna analiza sposobnosti hlapljivih ekstrakata ovih biljaka da inhibiraju enzim α -glukozidazu.

5 LITERATURA

1. Guenther, E. *The Essential Oils*. New York : D. van Nostrand Company, 1965. Svez. 1.
2. V. Grdinić, D. Kremer. *Ljekovito bilje i ljekovite droge: farmakoterapijski, botanički i farmaceutski podaci*. Zagreb : Denona, 2009.
3. Jerković, I. *Kemija i tehnologija aromatičnog bilja, Interna skripta*. Split : Kemijsko-tehnološki fakultet, 2012.
4. Jerković I., Radonić A. *Praktikum iz organske kemije*. Split : Kemijsko-tehnološki fakulte, 2009.
5. I., Blažević. *Slobodni, glukozinolatno i glikozidno vezani hlapljivi spojevi biljaka porodice Brassicaceae, Doktorski rad*. Zagreb : Prirodoslovno-matematički fakultet, 2009.
6. Brzović, P. *Hlapljivi sumporovi spojevi u biljkama Lepidium spp. (Brassicaceae) i Moringa oleifera (Moringaceae)*. Split : Kemijsko-tehnološki fakultet, 2017.
7. T. Kulišić, M. Miloš, A. Radonić. s.l. : *Vaše zdravlje*, 2002., Svez. 26, str. 1-2.
8. B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge. *Free Radical In Biology and Medicine*. Third edition. s.l. : Oxford University Press, 2001.
9. Politeo, O. *Antioksidacijska svojstva isparljivih spojeva odabranog začinskog bilja, Doktorska disertacija*; Zagreb : Prirodoslovno-matematički fakultet, 2007.
10. Vehtersbah-Stojan, P. *Antioksidansi u aterosklerozi, Diplomski rad*. Zagreb : Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2015.
11. Veljača, A. *Centaurea jacea, Centaurea alba i Centaurea scabiosa: kemijski sastav, antioksidacijski te antikolinesterazni potencijal eteričnih ulja, Diplomski rad*. Split : Kemijsko-tehnološki fakultet, 2017.
12. *Antioksidansi – u središtu zanimanja medicine u 21. Stoljeća*. Šebetić, K. Zagreb : Oktal Pharma, 2007.

13. *Oxidative Stress and Antioxidants: Biological Response Modifiers of Oxidative Homeostasis in Cancer*. A. Gašparović-Čipak., T. Lovaković, N. Žarković. 4, 2010. : Periodicum biologorum, Svez. 112, str. 433-439.
14. Božić, I. *Određivanje antioksidacijske aktivnosti i ispitivanje sposobnosti inhibicije kolinesteraza nehlapljivih izolata korijena gaveza, Diplomski rad*. Split : Kemijsko-tehnološki fakultet, 2018.
15. [Citirano: 15. kolovoza, 2021.] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.182.html>.
16. Đulović, A. *Usporedba dviju metoda za određivanje inhibicijske sposobnosti na kolinesteraze, Diplomski rad*. Split : Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2014.
17. *Kolinesteraze: struktura, uloga, inhibicija*. Bosak, A., Katalinić, M., Kovarik, Z. s.l. : Arh Hig Rada Toksikol, 2011., Svez. 62, str. 175-190.
18. [Citirano: 25. kolovoza, 2021.]
https://en.wikipedia.org/wiki/File:PBB_Protein_ACHE_image.jpg.
19. [Citirano: 25. kolovoza, 2021.]
<https://www.sciencephoto.com/media/948711/view/acetylcholinesterase-enzyme-active-site-structure>.
20. Burčul, F. *Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice Ranunculaceae, Doktorski rad*. Zagreb : an., 2014.
21. [Citirano: 25. kolovoza, 2021.]
https://en.wikipedia.org/wiki/File:Protein_BCHE_PDB_1p0i.png.
22. *Alzheimerova bolest i obitelj*. Poredoš, D. Zagreb : Hrvatska udruga za Alzheimerovu bolest, 2003.
23. *Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future*. R. Anand, Kiran Dip Gill, Abbas Ali Mahdi,. s.l. : Neuropharmacology, 2014, str. 76.
24. [Citirano: 22. rujna, 2021.] https://www.researchgate.net/figure/Brain-Atrophy-in-Advanced-Alzheimers-Disease-41_fig2_273768877.

25. *Enzymes inhibitors from natural sources with antidiabetic activity: A review.* Alam F, Shafiqe Z, Ajmad ST, Bin Asad MHH. s.l. : Phytotherapy Research, 2019., Svez. 33, str. 41-54.
26. *α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes.* Kumar S, Narwal S, Kumar V, Prakash O. 9, s.l. : Pharmacognosy reviews, 2011., Svez. 5, str. 19-29.
27. [Citirano: 11. rujna, 2021.] <https://www.rcsb.org/structure/3WY1>.
28. Puzava dobričica. *Wikipedia*. [Mrežno] [Citirano: 28. srpanj 2021.] https://hr.wikipedia.org/wiki/Puzava_dobri%C4%8Dica#cite_note-1.
29. *Plant uses in Croatia.* Nikolić, T. i Resetnik, I. 2, s.l. : Phytologia Balanica, 2007., Svez. 13, str. 229–238.
30. *Ground ivy.* Mitich, Larry W. 2, s.l. : Weed Technology, 1994, Svez. 8, str. 413-415.
31. '*Glechoma hederacea L.*', *Lipids, Lipophilic Components and Essential Oils from Plant Sources.* Azimova, S. S., Glushenkova, A. I., Vinogradova, V.I. s.l. : Journal of Ecology, 2012, Svez. 87, str. 347-364.
32. Grlić, Lj. *Enciklopedija samoniklog jestivog bilja.* Zagreb : August Cesarec, 1990. 86-393-0172-7.
33. *Biological activity of Glechoma hederacea.* Kumarasamy Y., Cox P.J., Jaspars M., Nahar L., Sarker S.D., s.l.: Fitoterapia, 2002., Svez. 73, str. 721-723.
34. '*Anti-melanogenesis effect of Glechoma hederacea L. extract on B16 murine melanoma cells.* Qiao, Z., Koizumi Y., Zhang M., Natsui M., Flores M.J., Gao L., Yusa K., Sugiyama T. Koyota S. 10, s.l. : Bioscience, 2012., Svez. 76, str. 1877–1883.
35. *Anti-inflammatory activity of constituents from Glechoma hederacea var. longituba.* Kim J.P., Song S.B., Lee I.S., Kim Y.H., Yoo I.D., Ryoo I.J., Bae K.H. s.l. : Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, (2011, Svez. 21, str. 3483-3487.
36. Forenbacher, Sergej. *Otrovne biljke i biljna otrovanja životinja.* Zagreb : Školska knjiga, 1998. 978-953-0-31116-9.

37. Nikolić T. Rasprostranjenost *Glechoma hederacea* L. u Hrvatskoj. *Flora Croatica baza podataka.*; 2005-nadalje. [Citirano: 16. septembar 2021.] <http://hirc.botanic.hr/fcd>.
38. S. Kovačić, T. Nikolić, M. Ruščić, M. Milović, V. Stamenković, D. Mihelj, N. Jasprica, S. Bogdanović, J. Topić. *Flora jadranske obale i otoka - 250 najčešćih vrsta*. Zagreb : Školska knjiga, 2008. 978-953-0-61289-1.
39. *Impact on fruit removal and seed predation of a secondary metabolite, emodin in Rhamnus Alaternus fruit pulp*. Tsahar E, Friedman J, Izhaki I. 2002. *Impact on fruit removal and seed*. 2, s.l. : Oikos, 2002., Svez. 99, str. 290-299.
40. *HPLC Separation and quantitative determination of antheraquinones in the bark of some Rhamnus species*. of, Coskun M. *HPLC Separation and quantitative determination*. s.l. : Pharmacia – JTPA, 1992, Svez. 32, str. 13-21.
41. Nikolić T. Rasprostranjenost *Rhamnus alaternus* L. u Hrvatskoj. *Flora Croatica baza podataka.*; 2005-nadalje. [Citirano: 16. kolovoza, 2021.] <http://hirc.botanic.hr/fcd>.
42. [Citirano: 14. rujna, 2021.] https://www.bgb-info.com/files/master/Agilent/HP_GC/Agilent_HP-5ms.jpg.
43. *Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review*. Pisoschi, A. M. i Negulescu, G. P. s.l. : *Biochem & Anal Biochem.*, 2011.
44. Pravdić, M. *Kemijska i biološka aktivnost meda manuke*. 2017. : Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet; Sveučilište u Splitu, Split.
45. *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measure of „antioxidant power“: The FRAP assay*. I. F. F. Benzie, J. J. Strain., s.l. : *Analytical Biochemistry*, 1996., str. 239.
46. [Citirano: 26. rujna, 2021.] <http://radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Antioxid.html>.
47. *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. G. L. Ellman, D. K. Courtney, V. Andres, R. M. Featherstone. s.l. : *Biochemical Pharmacology*, 1961., Svez. 7.

48. [Citirano: 13. rujna, 2021.]
https://en.wikipedia.org/wiki/Huperzine_A#/media/File:Huperzine_A.png.
49. [Citirano: 13. rujna, 2021.] <https://en.wikipedia.org/wiki/File:Galantamine.svg>.
50. *The peroxidase-glucose oxidase system: A new method of determine glucose liberrated by carbohydrate degrading soil enzymes.* Kapustka L.A., Annala A. E., Swanson W. C. 3, s.l. : Plant Soil., 1981., Svez. 63, str. 487-490.
51. *A preparation and screening strategy for glycosidase inhibitors.* Pistia-Brueggeman G., Hollingsworth R. I. 42, s.l. : Tetrahedron, 2001., Svez. 57, str. 8773.
52. *Optimization and Validation of a Microscale In vitro Method to Assess α -glucosidase Inhibition Activity.* Granados-Guzman G, Castro-Rios R, Waksman de Torres N, Salazar-Aranda R. s.l. : Current Analytical Chemistry, 2018, Svez. 14, str. 458-464.
53. *Alpha-glucosidase and carbonic anhydrase inhibition studies of Pd(II)-hydrazide complexes.* Qurrat-ul-Ain, Ashiq U, Jamal RA, Saleem M, Mahroof-Tahir M. s.l. : Arabian Journal of Chemistry, 2017., Svez. 10, str. 488-499.
54. [Citirano: 22. rujna, 2021.] <https://es.wikipedia.org/wiki/4-nitrofenol>.
55. *Volatile constituents of *Glechoma hirsuta* Waldst. & kit. and *G. hederacea* L.(lamiaceae).* Radulović N., Đorđević N., Marković M., Palić R. 1, s.l. : Bull. Chem. Soc. Ethiop., 2010, Svez. 24, str. 67-76.
56. *Glechoma hederacea* Vol. 19, September/October 2007 *Journal of Essential Oil Research*/449 Received: May 2006 Revised: June 2006 Accepted: July 2006 *The Essential Oil of Ground Ivy (*Glechoma hederacea* L) Growing Wild In Eastern Lithuania.* D. Mockute, G. Bernotiene, A. Judzentiene. 5, s.l. : J. Essent. Oil Res., 2007., Svez. 19, str. 449.
57. A. Judzentiene, A. Stoncius, J. Budiene. 5, s.l. : J. Essent. Oil Res., 2015., Svez. 27, str. 454.
58. *Chemical composition, antioxidant, anti-melanogenic and anti-inflammatory activities of *Glechoma hederacea* (Lamiaceae) essential oil.* S. T. Chou, C. C. Lai, C. P. Lai, W. W. Chao. s.l. : Ind Crops Prod., 2018., Svez. 122, str. 675.

59. B. Berka, A. Hassani, K. Allaf, F. Chemat. 6, s.l. : J. Essent. Oil Bear. Plants, 2008., Svez. 11, str. 563.

60. S. Aazza, B. Lyoussi, M. G. Miguel. s.l. : Molecules, 2011, Svez. 16, str. 7672-7690.

61. *Terpenes, Phenylpropanoids, Sulfur and Other Essential Oil Constituents as Inhibitors of Cholinesterases.* F. Burčul, I. Blažević, M. radan, O. Politeo. 26, s.l. : Current Medicinal Chemistry, 2020., Svez. 27, str. 4297.

62. [Citirano: 25. listopada, 2021.]

<https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/fda/fdaDrugXsl.cfm?setid=e4148493-e3bd-4530-8fb6-cdb5197c010e&type=display>.

63. *Alpha-glucosidase and carbonic anhydrase inhibition studies of Pd(II)-hydrazide complexes.* Qurrat-ul-Ain, Ashiq U, Jamal RA, Saleem M, Mahroof-Tahir M. s.l. : Arabian Journal of Chemistry, 2017., Svez. 10, str. 488-499.

64. [Citirano: 19. rujna, 2021.] <https://www.sisweb.com/software/ms/nist.htm>.