

Centaurea jacera, Centaurea alba i Centaurea scabiosa: kemijski sastav, antioksidacijski te antikolinesterazni potencijal eteričnih ulja

Veljača, Anita

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:167:860574>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET

***CENTAUREA JACEA, CENTAUREA ALBA I CENTAUREA
SCABIOSA: KEMIJSKI SASTAV, ANTIOKSIDACIJSKI TE
ANTI-KOLINESTERAZNI POTENCIJAL ETERIČNIH ULJA***

DIPLOMSKI RAD

ANITA VELJAČA

Matični broj: 54

Split, listopad 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

***CENTAUREA JACEA, CENTAUREA ALBA I CENTAUREA
SCABIOSA: KEMIJSKI SASTAV, ANTIOKSIDACIJSKI TE
ANTI-KOLINESTERAZNI POTENCIJAL ETERIČNIH ULJA***

DIPLOMSKI RAD

ANITA VELJAČA

Matični broj: 54

Split, listopad 2017.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

CENTAUREA JACEA, CENTAUREA ALBA I CENTAUREA
SCABIOSA: CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT AND
ANTICHOLINEESTERASE POTENTIAL OF ESSENTIAL OILS

DIPLOMA THESIS

ANITA VELJAČA

Parent number: 54

Split, october 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta

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

Pomoć pri izradi: dr. sc. Ivana Carev

CENTAUREA JACEA, CENTAUREA ALBA I CENTAUREA SCABIOSA: KEMIJSKI SASTAV, ANTIOKSIDACIJSKI TE ANTIKOLINESTERAZNI POTENCIJAL ETERIČNIH ULJA

Anita Veljača, 54

Sažetak: Eterična ulja, smjese aromatičnih spojeva, imaju široku primjenu u raznim granama industrije, pa i u farmaceutskoj industriji, gdje je posebno značajan njihov antioksidacijski potencijal. Antioksidansi su tvari koje štite organizam od oksidacijskog stresa izazvanog djelovanjem reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva. Oksidacijski stres dovodi do oštećenja biomolekula (DNA, proteini, itd.) i može izazvati ozbiljna oboljenja. Alzheimerova demencija je jedna od najtežih bolesti današnjice. Uzrok joj je nepoznat, neizlječiva je i u stalnom je porastu. Sumnja se da je oksidacijski stres jedan od faktora koji mogu dovesti do bolesti ili potaknuti njen razvoj. Osnovni rizični faktor za nastanak bolesti je životna dob, pa se može očekivati dalji rast broja oboljelih. Jedna od karakteristika te bolesti je nedostatak acetilkolina, važnog prijenosnika živčanih impulsa. Terapija Alzheimerove demencije svodi se na usporavanje napredovanja bolesti i ublažavanje tegoba, u čemu značajnu ulogu imaju inhibitori kolinesteraza i antioksidansi.

Cilj ovog rada bio je ispitati kemijski sastav te antioksidacijski i antikolinesterazni potencijal eteričnih ulja izoliranih iz prethodno osušenog biljnog materijala, sabranog tijekom pune cvatnje biljke, triju biljnih vrsta porodice Asteracea, roda *Centaurea*: *C. jacea* L., *C. alba* L. i *C. scabiosa* L. Eterično ulje biljke *Centaurea jacea* kao dominantne komponente sadrži epibiciklofelandren i aromadendren. Eterično ulje biljke *Centaurea alba* kao dominantne komponente sadrži heksadekansku kiselinu i germakren D. Eterično ulje biljke *Centaurea scabiosa* kao dominantne komponente sadrži linalool i metil-benzoat. Rezultati istraživanja su pokazali slab antioksidacijski te slab antikolinesterazni potencijal eteričnih ulja istraživanih biljnih vrsta.

Ključne riječi: *Centaurea jacea*, *Centaurea alba*, *Centaurea scabiosa*, eterična ulja, GC-MS, biološki potencijal

Rad sadrži: 47 stranica, 21 sliku, 11 tablica, 43 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. doc. dr. sc. Franko Burčul - predsjednik
2. doc. dr. sc. Mila Radan - član
3. izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo - član-mentor

Datum obrane: 17. listopada 2017.

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. 21.

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

Technical assistance: dr. sc. Ivana Carev

CENTAUREA JACEA, CENTAUREA ALBA AND CENTAUREA SCABIOSA: CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT AND ANTICHOLINEESTERASE POTENTIAL OF ESSENTIAL OILS

Anita Veljača, 54

Abstract: Essential oils, mixtures of aromatic compounds, are widely used in various industries, as well as in the pharmaceutical industry where their antioxidant potential is especially important. Antioxidants are substances that protect the body against oxidative stress caused by the reactive oxygen and nitrogen compounds. Oxidative stress leads to damage of biomolecules (DNA, proteins, etc.) and can cause serious diseases. Alzheimer's dementia is one of the major diseases of today. Its cause is still unknown, it is incurable and the number of patients is steadily increasing. It is suspected that oxidative stress is one of the factors that can lead to illness or induce its development. The main risk factor for the disease is age, so we can expect further growth in the number of patients. One feature of the disease is a deficiency of acetylcholine, an important neurotransmitter. Alzheimer's therapy is reduced to slowing of disease progression and symptoms relief, where cholinesterase inhibitors and antioxidants play a significant role. The aim of this study was to investigate the chemical composition and antioxidant and anticholinesterase potential of the essential oils isolated from previously dried plant material, collected during the flowering period of the three Asteraceae family plants, genus *Centaurea*: *C. jacea* L., *C. alba* L. and *C. scabiosa* L. As the dominant components from *C. jacea* essential oil were *epi*-bicyclosesquiphellandrene and aromadendrene. Essential oil from *C. alba* contained hexadecanoic acid and germacrene D as predominant component. *C. scabiosa* essential oil contained linalool and methyl benzoate as a predominant component. The results showed low antioxidant as well as anticholinesterase inhibitory potential of the essential oils isolated from studied plants.

Keywords: *Centaurea jacea*, *Centaurea alba*, *Centaurea scabiosa*, essential oils, GC-MS, biological potential

Thesis contains: 47 pages, 21 figures, 11 tables, 43 references

Original in : Croatian

Defence committee:

1. Franko Burčul, PhD, assistant prof. - chair person
2. Mila Radan, PhD, assistant prof. - member
3. Olivera Politeo, PhD, associate prof. - supervisor

Defence date: October 17 2017.

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

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Olivere Politeo, u razoblju od lipnja do rujna 2017.godine.

Iskreno se zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Oliveri Politeo na svesrdnoj pomoći, uputama i savjetima koji su mi pomogli tijekom izrade diplomskog rada.

Također se zahvaljujem dr. sc. Ivani Carev i Vladimiru Jelaska-Relja, ing. na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela rada.

Na kraju, ali ne manje važno, zahvaljujem se svojoj obitelji, posebno mami, koja mi je omogućila postizanje ovog uspjeha. Hvala za ljubav, razumijevanje i bezuvjetnu podršku svih ovih godina.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Izolacija eteričnih ulja iz prethodno osušenog biljnog materijala biljaka iz porodice Asteraceae, rod *Centaurea*: *C. jacea* L., *C. alba* L. i *C. scabiosa* L.
- Priprema otopina eteričnih ulja koncentracije 10 mg/mL.
- Ispitivanje kemijskog sastava otopina izoliranih ulja vezanim sustavom plinske kromatografije i masene spektrometrije (GC-MS).
- Ispitivanje antioksidacijskog potencijala otopina izoliranih ulja DPPH metodom.
- Ispitivanje sposobnosti inhibicije enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze otopinama izoliranih ulja metodom po Ellmanu.

SAŽETAK

Eterična ulja, smjese aromatičnih spojeva, imaju široku primjenu u raznim granama industrije, pa i u farmaceutskoj industriji, gdje je posebno značajan njihov antioksidacijski potencijal.

Antioksidansi su tvari koje štite organizam od oksidacijskog stresa izazvanog djelovanjem reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva. Oksidacijski stres dovodi do oštećenja biomolekula (DNA, proteini, itd.) i može izazvati ozbiljna oboljenja.

Alzheimerova demencija je jedna od najtežih bolesti današnjice. Uzrok joj je nepoznat, neizlječiva je i u stalnom je porastu. Sumnja se da je oksidacijski stres jedan od faktora koji mogu dovesti do bolesti ili potaknuti njen razvoj. Osnovni rizični faktor za nastanak bolesti je životna dob, pa se može očekivati dalji rast broja oboljelih. Jedna od karakteristika te bolesti je nedostatak acetilkolina, važnog prijenosnika živčanih impulsa. Terapija Alzheimerove demencije svodi se na usporavanje napredovanja bolesti i ublažavanje tegoba, u čemu značajnu ulogu imaju inhibitori kolinesteraza i antioksidansi.

Cilj ovog rada bio je ispitati kemijski sastav te antioksidacijski i antikolinesterazni potencijal eteričnih ulja izoliranih iz prethodno osušenog biljnog materijala, sabranog tijekom pune cvatnje biljke, triju biljnih vrsta porodice Asteracea, roda *Centaurea*: *C. jacea* L., *C. alba* L. i *C. scabiosa* L. Eterično ulje biljke *C. jacea* kao dominantne komponente sadrži epibiciklofelandren i aromadendren. Eterično ulje biljke *C. alba* kao dominantne komponente sadrži heksadekansku kiselinu i germakren D. Eterično ulje biljke *C. scabiosa* kao dominantne komponente sadrži linalool i metilbenzoat. Rezultati istraživanja su pokazali slab antioksidacijski te slab antikolinesterazni potencijal eteričnih ulja istraživanih biljnih vrsta.

Ključne riječi: *Centaurea jacea*, *Centaurea alba*, *Centaurea scabiosa*, eterična ulja, GC-MS, biološki potencijal

SUMMARY

Essential oils, mixtures of aromatic compounds, are widely used in various industries, as well as in the pharmaceutical industry where their antioxidant potential is especially important. Antioxidants are substances that protect the body against oxidative stress caused by the reactive oxygen and nitrogen compounds. Oxidative stress leads to damage of biomolecules (DNA, proteins, etc.) and can cause serious diseases.

Alzheimer's dementia is one of the major diseases of today. Its cause is still unknown, it is incurable and the number of patients is steadily increasing. It is suspected that oxidative stress is one of the factors that can lead to illness or induce its development. The main risk factor for the disease is age, so we can expect further growth in the number of patients. One feature of the disease is a deficiency of acetylcholine, an important neurotransmitter. Alzheimer's therapy is reduced to slowing of disease progression and symptoms relief, where cholinesterase inhibitors and antioxidants play a significant role.

The aim of this study was to investigate the chemical composition and antioxidant and anticholinesterase potential of the essential oils isolated from previously dried plant material, collected during the flowering period of the three Asteraceae family plants, genus *Centaurea*: *C. jacea* L., *C. alba* L. and *C. scabiosa* L. As the dominant components from *C. jacea* essential oil were *epi-bicyclosesquiphellandrene* and *aromadendrene*. Essential oil from *C. alba* contained *hexadecanoic acid* and *germacrene D* as predominant component. *C. scabiosa* essential oil contained *linalool* and *methyl benzoate* as a predominant component. The results showed low antioxidant as well as anticholinesterase inhibitory potential of the essential oils isolated from studied plants

Keywords: *Centaurea jacea*, *Centaurea alba*, *Centaurea scabiosa*, essential oils, GC-MS, biological potential

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	3
1.1. Eterična ulja	4
1.1.1. Kemijski sastav eteričnih ulja	4
1.2. Oksidacijski stres	6
1.2.1. Slobodni radikali	6
1.3. Antioksidansi	7
1.3.1. Endogeni antioksidansi	7
1.3.2. Egzogeni antioksidansi	9
1.4. Kolinesteraze	13
1.4.1. Acetilkolinesteraza	14
1.4.2. Butirilkolinesteraza	14
1.5. Alzheimerova demencija	15
2. EKSPERIMENTALNI DIO	18
2.1. Biljke roda <i>Centaurea</i>	19
2.1.1. <i>Centaurea jacea</i>	20
2.1.2. <i>Centaurea alba</i>	21
2.1.3. <i>Centaurea scabiosa</i>	22
2.2. Izolacija eteričnih ulja vodenom destilacijom po Clevengeru	23
2.3. Ispitivanje kemijskog sastava eteričnih ulja vezanim sustavom plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS)	24
2.4. Ispitivanje antioksidacijskog potencijala DPPH metodom	24
2.5. Ispitivanje sposobnosti inhibicije enzima kolinesteraza Ellmanovom metodom	25
2.5.1. Sposobnost inhibicije acetilkolinesteraze (AChE)	25
2.5.2. Sposobnost inhibicije butirilkolinesteraze (BChE)	26
3. REZULTATI	27
3.1. Ispitivanje kemijskog sastava	28
3.1.1. Kemijski sastav eteričnog ulja <i>C. jacea</i>	29
3.1.2. Kemijski sastav eteričnog ulja <i>C. alba</i>	31
3.1.3. Kemijski sastav eteričnog ulja <i>C. scabiosa</i>	32
3.2. Ispitivanje antioksidacijskog potencijala	34
3.2.1. DPPH metoda	34
3.3. Ispitivanje sposobnosti inhibicije enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze Ellmanovom metodom	35
3.3.1. Sposobnost inhibicije enzima AChE	35
3.3.2. Sposobnost inhibicije enzima BChE	36
4. RASPRAVA	37
5. ZAKLJUČAK	41
6. LITERATURA	44

UVOD

Biljke su, od postanka života na Zemlji, izvor kisika, hrana i lijek, i to ne samo ljudima. Biljke ne samo da pomažu, one su osnovni izvor zdravlja, a njihovo djelovanje nije samo organsko. Ljekovito djelovanje biljaka koriste i tradicionalna i suvremena medicina. Tradicionalna medicina temelji se na iskustvima i zapažanjima koja su nekad više, a nekad manje sistematična. Poznavanje ljekovitog bilja i načini pripremanja „lijekova“ bila je cijenjena, mada ponekad i opasna vještina.

Suvremena medicina i farmakologija, uz poštivanje tradicije, oslanja se na sustavna laboratorijska istraživanja. Takav pristup potiče istraživanja i onih biljnih vrsta koje nisu naročito zastupljene u tradicionalnoj fitoterapiji, kao što su biljke roda *Centaurea*. Rod *Centaurea* je jedan od najbrojnijih i najraširenijih biljnih rodova na planeti, o čemu slikovito govori i njegov pučki naziv razlićak. Porodicu Astaraceae (glavočike), kojoj i pripada rod *Centaurea*, sadrži neke od vrsta koje su najljekovitije (kamilica, stolisnik), najaromatičnije (smilje, pelin), omiljene ukrasne (krizantema, kadifica), jestive (salata, maslačak), ali i vrste koje su jaki alergeni (ambrozija).

Ovaj rad daje rezultate ispitivanja kemijskog sastava i biološkog potencijala tri biljke iz roda *Centaurea*: *C. jacea* L. (livadna zečina), *C. alba* L. (bijela zečina) i *C. scabiosa* L. (velika zečina). Cilj ispitivanja bio je utvrditi kemijski sastav eteričnih ulja tih biljaka, njihovo potencijalno antioksidacijsko djelovanje i njihovu inhibicijsku sposobnost enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze.

Eterična ulja su smjese lako hlapljivih spojeva, obično intenzivnog mirisa, dobivene fizikalnim postupcima iz biljnog materijala. Koriste se najviše u kozmetičkoj, ali i u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Za farmakologiju je posebno značajno ispitivanje antioksidacijskog potencijala eteričnih ulja. Djelovanjem endogenih i egzogenih antioksidansa umanjuju se štetne posljedice djelovanja slobodnih radikala na organizam. Slobodni radikali su vrlo reaktivni spojevi nastali tijekom metaboličkih procesa. Njihova reaktivnost je rezultat postojanja jednog ili više nesparenih elektrona. Slobodni radikali mogu uzrokovati oštećenja tkiva na staničnom nivou, ubrzano starenje i propadanje stanica, te niz degenerativnih bolesti.

1. OPĆI DIO

1.1. Eterična ulja

Eterična ulja su uljevite smjese različitih kemijskih spojeva, više ili manje složenih. Lako su isparljiva, imaju intenzivan karakterističan miris, u vodi se teško otapaju. Dobivaju se različitim postupcima izolacije mirisnih komponenti iz svježeg ili prethodno osušenog biljnog materijala. Eterična ulja su osjetljiva na povišenu temperaturu, djelovanje vode, zraka i svjetlosti. Djelovanje tih faktora mijenja sastav eteričnih ulja tijekom proizvodnog procesa ili skladištenja. Zbog toga se miris eteričnog ulja razlikuje od mirisa biljke iz koje se dobiva.

Eterična ulja imaju široku upotrebu. Kozmetička industrija je najveći potrošač eteričnih ulja za proizvodnju parfema i parfimiranje kozmetičkih i higijenskih proizvoda, sredstava za čišćenje, insekticida. Prehrambena industrija koristi ih kao arome i začinska ulja, a farmaceutska kao preparate ili sirovine za proizvodnju preparata. Farmaceutski pripravci na bazi eteričnih ulja upotrebljavaju se kao antiseptici, sedativi, inhalatori, sredstva za masažu i aromaterapiju. Organska kemija i biokemija koristi eterična ulja kao materijal za proučavanje, za dobivanje izolata koji služe kao sirovina za proizvodnju umjetnih eteričnih ulja, te kao otapala za smole i voskove. Industrija boja i lakova upotrebljava pigmente proizvedene na bazi eteričnih ulja.^{1,2}

Eterična ulja, prema načinu dobivanja, mogu biti:

- Prirodni spojevi – dobiveni direktno iz biljnog materijala, poznatim fizikalnim postupcima;
- Prirodno-identični spojevi – dobiveni postupkom sinteze, ali po svojim fizikalnim, kemijskim i drugim svojstvima jednaki „originalu“;
- Umjetni spojevi – pripremljeni postupkom sinteze i ne postoje u prirodi.³

1.1.1. Kemijski sastav eteričnih ulja

Eterična ulja su složene smjese, koje mogu sadržavati i do 150 različitih kemijskih spojeva, koji su redom derivati benzena. Prema građi ugljikovog kostura,

komponente eteričnog ulja dijele se u tri osnovne skupine: terpeni, fenilpropanski derivati i ostali.⁴

Terpeni su lako hlapljivi nezasićeni ugljikovodici. Naziv su dobili prema terpentinu – destilatu smole bora. Osnovni su sastojci tipičnih eteričnih ulja. Nazivaju se još i izoprenoidima zbog svoje osnovne strukturne jedinice koja sadrži pet ugljikovih atoma. Veza među izoprenima, prema utvrđenom izoprenskom pravilu, može biti pravilna („glava na rep“) ili nepravilna („glava na glavu“ ili „rep na rep“).⁴

Podjela terpena vrši se prema broju izoprenskih jedinica, kako je prikazano u tablici 1.

Tablica 1. Podjela terpena prema broju izoprenskih jedinica, odnosno prema broju ugljikovih atoma.

Vrsta	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	N	5n

U sastav eteričnih ulja uglavnom ulaze isparljive komponente: semiterpeni, monoterpeni i seskviterpeni, te manje isparljive diterpenske komponente.

Fenilpropanski derivati su prirodni organski spojevi u čijoj strukturi se nalazi fenilni prsten s jednim bočnim propanskim lancem. Pojavljuju se u oblicima fenola, etera, aldehida i kiselina.

Ostale spojeve čine uglavnom lančani ugljikovodici i njihovi derivati koji u svom sastavu sadrže kisik, rjeđe dušik i sumpor. Eterična ulja nekih biljaka porodice Astaraceae mogu sadržavati i acetilenske derivate.

1.2. Oksidacijski stres

Aerobni organizmi u svojim metaboličkim procesima proizvode slobodne radikale. Slobodni radikali su vrlo reaktivni kisikovi ili dušikovi spojevi koji mogu dovesti do nekontroliranih lančanih reakcija u stanicama. Prekomjerno stvaranje slobodnih radikala, uz nemogućnost organizma da endogenim zaštitnim sustavom kontrolira njihovu koncentraciju, stvara neravnotežu u organizmu koju nazivamo oksidacijski stres. Osim slobodnih radikala, oksidacijski stres može biti uzrokovan i drugim reaktivnim spojevima. Slobodni radikali i drugi reaktivni spojevi mogu dovesti do oštećenja biomolekula, pa se smatra da je oksidacijski stres jedan od uzroka velikog broja bolesti današnjice, kao što su: dijabetes, autoimune bolesti, kardiovaskularne bolesti, različite vrste alergija, neurodegenerativne bolesti, bolesti bubrega i probavnog sustava, infektivne bolesti i druge.^{5,6}

1.2.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali su vrste koje mogu postojati samostalno, imaju jedan ili više nesparenih elektrona, što ih čini vrlo reaktivnima,^{7,8} a većim dijelom nastaju u metaboličkim procesima samog organizma. Njihovo prekomjerno stvaranje može biti posljedica pojačanih tjelesnih aktivnosti, konzumiranja hrane, alkohola i cigareta, ali i vanjskih utjecaja kao što su: stres, infekcije, trovanja, fizičke povrede, različita zračenja. Samo manja količina slobodnih radikala dolazi iz okoliša u obliku zagađivača zraka, hrane, vode ili tla.

Reaktivnost slobodnih radikala posljedica je prisustva jednog ili više nesparenih elektrona, koji su zbog toga nestabilni i lako reagiraju sa drugim molekulama, pri čemu se mogu stvarati novi slobodni radikali. Tako nastaje lančana reakcija koja uzrokuje oštećenja molekula proteina, šećera, lipida i DNA.

Slobodni radikali dijele se na reaktivne kisikove spojeve i reaktivne dušikove spojeve. Reaktivni kisikovi i dušikovi radikali, kao i druge reaktivne vrste koje uzrokuju oksidacijski stres,⁹ prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Prikaz reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta

Slobodni radikali		Druge reaktivne vrste	
Kisikovi	Dušikovi	Kisikove	Dušikove
Superoksidni $O_2^{\cdot-}$	Dušikov monoksid $NO^{\cdot}$	Vodikov peroksid H_2O_2	Nitrozil NO^+
Hidroksilni $OH^{\cdot}$	Dušikov dioksid $NO_2^{\cdot}$	Ozon O_3	Peroksinitrit $ONOO^{\cdot-}$
Alkoksilni $RO^{\cdot}$		Singlet kisik 1O_2	Nitritna kiselina HNO_2
Peroksilni $ROO^{\cdot}$		Hipokloritna kiselina $HClO$	Dušikov (III) oksid N_2O_3
Hidroperoksilni $HO_2^{\cdot}$			

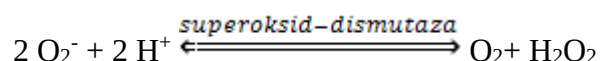
1.3. Antioksidansi

Antioksidansi su molekule koje sprječavaju oksidaciju drugih tvari. Imaju sposobnost vezivanja nesparenih elektrona slobodnih radikala, čime vrše njihovu stabilizaciju. Pri tome sami ne postaju nestabilni. Osnovna podjela antioksidanasa je na endogene i egzogene. Endogene antioksidanse proizvodi sam organizam, dok se egzogeni unose izvana.

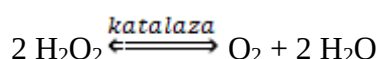
1.3.1. Endogeni antioksidansi

Slobodni radikali nastaju kao posljedica metaboličkih procesa svakog živog organizma. Organizam, kao odgovor na njihovo štetno djelovanje, ima vrlo djelotvornu antioksidacijsku obranu. U normalnim uvjetima, endogeni antioksidansi sposobni su neutralizirati sav višak slobodnih radikala. Najznačajniji endogeni antioksidansi su:

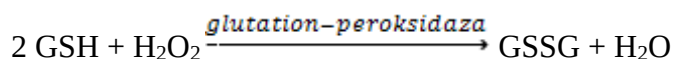
- Superoksid-dismutaza - enzim prisutan u svim aerobnim stanicama. Njegov glavni zadatak je kataliziranje dismutacije superoksidnog radikala pri čemu kao produkt nastaju vodikov peroksid i kisik. Djeluje kao zaštita od oštećenja DNA, lipida i bjelančevina, kao i zaštita od oštećenja izazvanih ionizirajućim zračenjem. Za djelovanje superoksid-dismutaze potreban je, kao kofaktor, metalni ion, i to mangan, bakar ili cink, ovisno o tome da li se nalazi u citoplazmi ili mitohondrijima.¹⁰ Razina superoksid-dismutaze u organizmu opada s godinama, što je, opet, posljedica oksidacijskog stresa.



- Katalaza - enzim prisutan u gotovo svim živim organizmima, uključivo i anaerobne mikroorganizme. U ljudskom organizmu, najviše je zastupljena u stanicama jetre i crvenim krvnim zrnima. Sastavljena je od četiri polipeptidna lanca, a svaki sadrži preko 500 aminokiselina. Zadatak katalaze u organizmu je kataliziranje raspada vodikovog peroksida na neškodljive sastojke – vodu i kisik. Mala količina katalaze može katalizirati raspad velike količine vodikovog peroksida. Pomoću peroksida može katalizirati oksidaciju i drugih štetnih tvari, metabolita i toksina. Ioni teških metala i cijanida djeluju inhibicijski na katalazu.^{10,11}

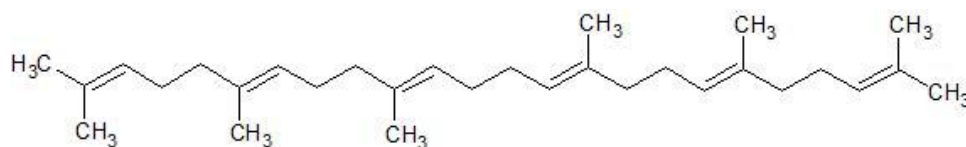


- Glutation-peroksidaza - enzimski sustav za uklanjanje vodikovog peroksida pomoću reduciranog oblika glutathiona.¹⁰ Poznato je sedam glutathion-peroksidaza, te njihov točan položaj u tkivima. Imaju značajnu antioksidacijsku i antimutagenu ulogu u organizmu.¹²



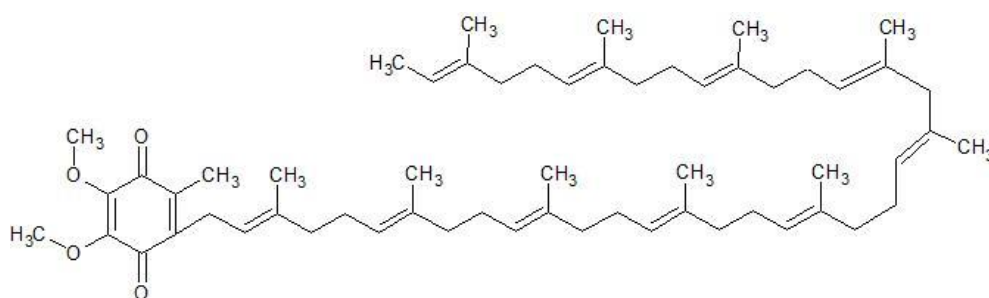
- Skvalen - polinezasićeni tekući ugljikovodik, po strukturi izoprenoid (sl.1.). Prisutan je u životinjskim i biljnim organizmima, te nekim živežnim namirnicama (npr. maslinovo i riblje ulje). U ljudskom organizmu postoji značajna koncentracija ovog antioksidansa u koži. Značajna je prirodna zaštita od slobodnih radikala uzrokovanih ultraljubičastim i ionizirajućim zračenjem,

toksinima i drugim zagađivačima iz okoline. Razina skvalena u organizmu s godinama opada.¹³



Slika 1. Strukturna formula skvalena

- Koenzim Q₁₀ je, kao i skvalen, po strukturi izoprenoid (sl.2.). Sveprisutan je u biljnim i životinjskim organizmima, kao i u ljudskom organizmu, osobito u mišićnim stanicama srca. Postoji u tri oksidacijska stanja: potpuno reduciran (ubikvinol), djelomično reduciran (semikinon) i potpuno oksidiran (ubikinon). Ima veći antioksidacijski učinak od vitamina E, reducira α -tokoferoksil radikal u α -tokoferol, čime regenerira aktivni oblik vitamina E.⁹



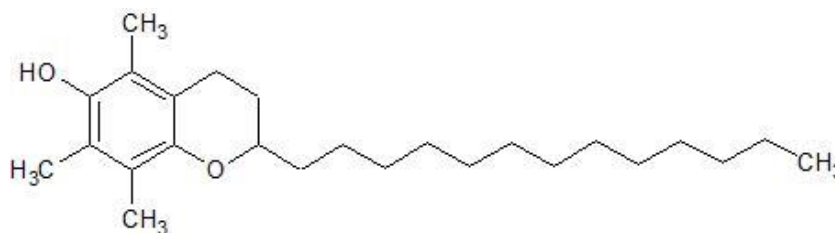
Slika 2. Strukturna formula koenzima Q₁₀

1.3.2. Egzogeni antioksidansi

Endogeni antioksidansi predstavljaju obrambeni sustav organizma, dovoljan da se suprotstavi djelovanju slobodnih radikala u uvjetima stabilne oksidacijsko-antioksidacijske ravnoteže. Intenzivan oksidacijski stres, međutim, zahtijeva unos tvari, u obliku hrane, dodataka prehrani ili lijekova, koji djeluju antioksidacijski. Takve tvari nazivaju se egzogeni antioksidansi. Dije se na prirodne i sintetske.⁶

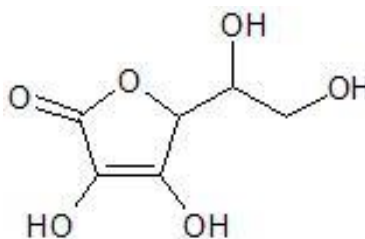
Prirodni antioksidansi, u pravilu su biljnog porijekla. Biljke sintetiziraju znatno više antioksidirajućih spojeva nego životinjski organizmi (uključivo i ljudski). Najpoznatiji i najučinkovitiji prirodni antioksidansi su:

- Tokoferoli - sastavni su dio biljnih ulja. Topljivi su u lipidima, a nisu topljiv u vodi. Postoje četiri varijacije tokoferola (α -, β -, γ -, δ -) koje se međusobno razlikuju po broju i rasporedu metilnih skupina. Tokoferoli, skupa sa tokotrienolima (također, četiri varijacije: α -, β -, γ -, δ -) grade vitamin E.¹⁴ Najaktivniji oblik tokoferola u vitaminu E je α -tokoferol (sl.3.). Djeluje kao jak antioksidans, prvenstveno na lipidne komponente stanice. U prirodnom obliku α -tokoferol je izrazito aktivan, dok je sintetski neaktivan zbog izomernih varijacija. Izvori vitamina E su biljna ulja i orašasti plodovi, a manji dio se sintetizira u samom organizmu (jetri).



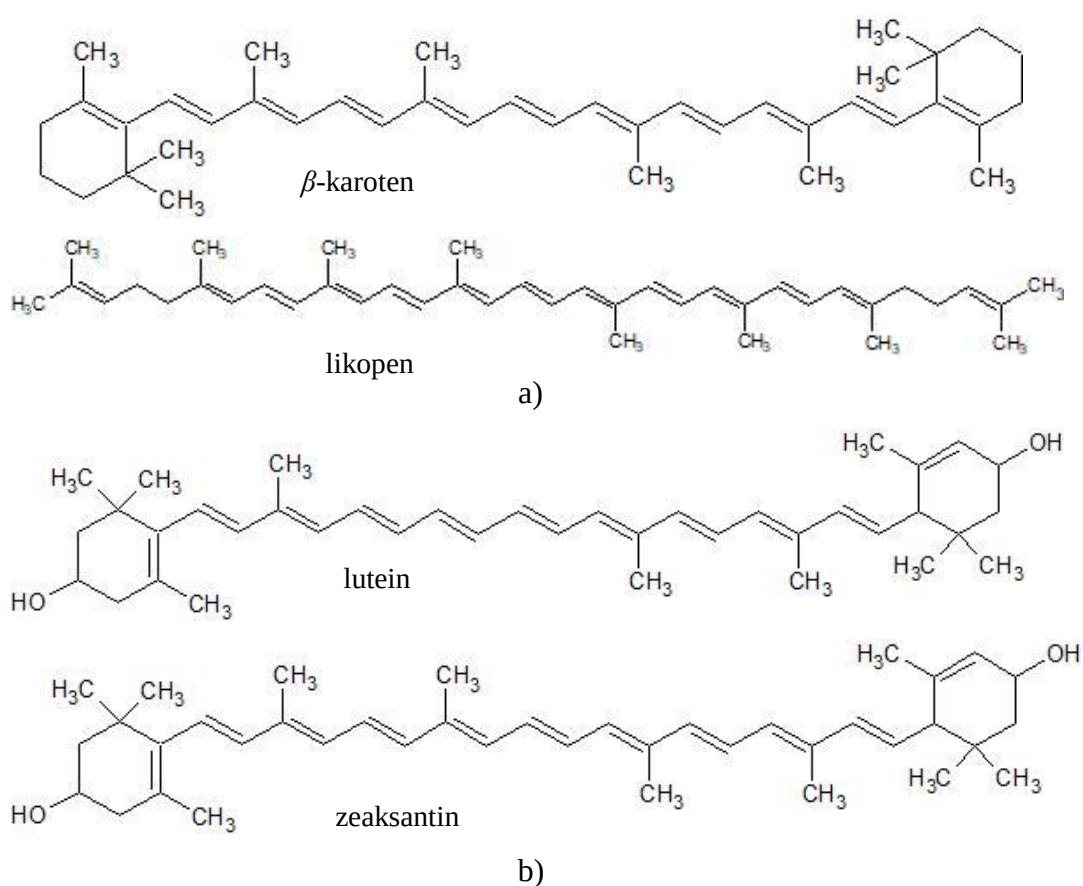
Slika 3. Strukturna formula vitamina E

- Askorbinska kiselina (vitamin C, sl.4.) je najvažniji u vodi topljiv antioksidans. Djeluje izrazito aktivno u zaštiti lipoproteina od oksidacije. Iako je prvi sintetski proizveden vitamin, upitno je blagotvorno djelovanje njegovih sintetskih oblika. Većina biljnih i životinjskih vrsta sintetizira vitamin C, osim nekih vrsta kralježnjaka. Primati, uključujući ljude, moraju ovaj vitamin unositi prehranom. Nedostatak ovog vitamina očituje se pojavom bolesti (skorbuta), slabljenjem imunološkog sustava i općom slabošću. Iz organizma se lako izlučuje. Osjetljiv je na povišenu temperaturu, svjetlost, a iz namirnica se gubi dugim stajanjem.^{2,9}



Slika 4. Strukturna formula vitamina C

- Karotenoidi su izoprenoidni spojevi, prisutni u biljnim stanicama, prepoznajemo ih kao biljne pigmente karakteristične žute, narančaste i crvene boje. Ljudski organizam ih ne može sintetizirati. Poznato je više od 600 karotenoida, podijeljenih u dvije skupine: karoteni i ksantofili. Karoteni su čisti ugljikovodici, najčešći su α -karoten. β -karoten (sl.5.a) poznati i kao provitamin A, te likopen (sl.5.a). Djeluju antioksidacijski i antikancerogeno, te protiv kardiovaskularnih bolesti i poremećaja vezanih za starenje. Ksantofili su spojevi koji se od karotena razlikuju po prisutnosti OH skupine. Najznačajniji ksantofili su lutein i zeaksantin (sl.5.b).^{2,9}



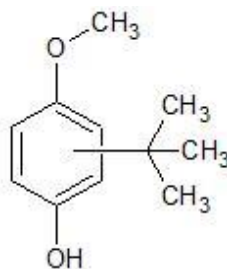
Slika 5. Strukturne formule najznačajnijih karotenoida. a) karoteni i b) ksantofili

- Fenoli su organski spojevi sa jednom ili više fenolnih skupina. Nastaju kao sekundarni metaboliti viših biljaka. Dijelev se na: monofenole, polifenole i aromatske kiseline. Najznačajniji antioksidacijski utjecaj imaju polifenoli poznati pod nazivom flavonoidi. Identificirano je više od 4000 flavonoida, a osim kao antioksidansi djeluju i kao antialergeni i antiinflamatorno. U

flavonoide spadaju: flavonoli, flavanoni, flavoni, flavanoli, antocijanidini. Aromatske kiseline su u prirodi manje zastupljene od polifenola, a također imaju značajna antioksidacijska svojstva. Skupine aromatskih kiselina su: fenolne (galna, salicilna...), hidroksicimetne (kofeinska, cimetna...) i feniletanoidi.⁹

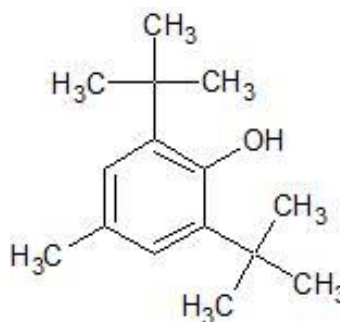
Sintetski antioksidansi proizvedeni su, prvenstveno, za prehrambenu industriju, u cilju usporavanja kvarenja prehrambenih namirnica (konzervansi). Osnovna svojstva koja sintetski antioksidansi moraju imati jesu topljivost u lipidima, netoksičnost i djelotvornost u malim koncentracijama. Međutim, njihova sigurnost po ljudsko zdravlje bila je upitna od samih početaka. Po kemijskom sastavu, to su uglavnom aromatski spojevi sa fenolnom strukturom:

- Butilhidroksianisol (BHA – E320, sl.6.) – mješavina izomera 3-tert-butil-4-hidroksianisola i 2-tert-butil-4-hidroksianisola. Vrlo lipofilan, netopljiv u vodi, značajno produžuje trajnost namirnicama na bazi lipida, termolabilan. Po nekim istraživanjima je kancerogen.^{6,15}



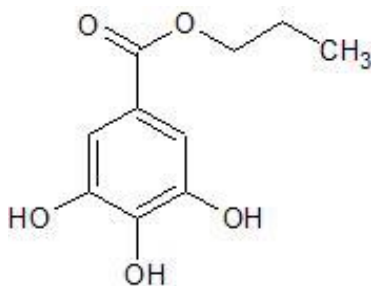
Slika 6. Strukturna formula BHA

- Butilhidroksitoluen (BHT – E321) – bijeli kristalični prah, IUPAC ime: 2,6-di-tert-butil-4-hidroksitoluen (sl.7.). Manje aktivan od BHA, ali također termolabilan i vjerovatno štetan za zdravlje.^{6,15}



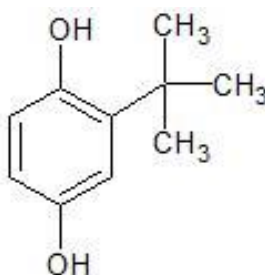
Slika 7. Strukturna formula BHT

- Propil galat (PG – E310) – IUPAC ime: propil-3,4,5-trihidroksibenzoat (sl.8.). Bijeli kristalični prah, dobro stabilizira lipide, ali na višim temperaturama veže ione željeza, pa se izbjegava.^{6,15}



Slika 8. Strukturna formula PG

- Tercijarni butilhidrokinon (TBHQ) – smeđi prah, IUPAC ime: 2-tert-butilbenzen-1,4-diol (sl.9.). Najdjelotvorniji antioksidans za većinu masti i ulja, za stabilizaciju visokozasićenih biljnih ulja.^{6,15}



Slika 9. Strukturna formula TBHQ

1.4. Kolinesteraze

Kolinesteraze su enzimi, koji prema nomenklaturi spadaju u skupinu hidrolaza. Obje kolinesteraze – acetilkolinesteraza (AChE) i butirilkolinesteraza (BChE) – imaju istu osnovnu strukturu, koju čini 12 β -nabranih ploča okruženih s 14 α -uzvojnica, prema kojoj spadaju u grupu hidrolaza α/β -strukture. Razlikuju se po katalitičkoj aktivnosti, specifičnosti vezanja supstrata, liganadima i inhibitorima.¹⁶

1.4.1. Acetilkinesteraza

Acetilkinesteraza (AChE) nazvana još i prava kinesteraza, važna je za održavanje homeostaze organizma. Ljudska AChE sastoji se od oko 550 aminokiselina, a nastaje kao produkt ekspresije gena na kromosomskoj poziciji 7q22.¹⁶

Acetilkin je jedan od prijenosnika živčanih impulsa. Kada se acetilkin veže za kinergičke receptore ili mišićne stanice, dolazi do depolarizacije sinaptičke membrane, što omogućuje prijenos impulsa. Acetilkinesteraza hidrolizira acetilkin, što dovodi do ponovne polarizacije membrane, i prekida prijenosa impulsa. Smanjena aktivnost AChE dovodi do nakupljanja acetilkolina, a time i do poremećaja u prijenosu živčanih impulsa. Takvo stanje naziva se kinergička kriza, koja može uzrokovati smrt organizma. Acetilkinesteraza se sintetizira u koštanoj srži, mozgu i mišićima, a prisutna je i u krvi, vezana na eritrocite.¹⁶

1.4.2. Butirkinesteraza

Butirkinesteraza (BChE) se naziva i pseudokinesteraza. U organizmu djeluje kao zaštita AChE od inhibicijskih utjecaja. Ljudska BChE sastoji se od oko 570 aminokiselina i nastaje kao produkt ekspresije gena na kromosomskoj poziciji 3q26.¹⁶

Butirkinesteraza može hidrolizirati acetilkin u sinapsi, a osim toga ima ulogu u metabolizmu lipida i lipoproteina, te u diferencijaciji i rastu živčanog tkiva. U većim količinama prisutna je u centralnom i perifernom živčanom sustavu, cerebralnoj tekućini, crijevima, plućima, gušterači i jetri.¹⁶

Kod oboljelih od nekih neurodegenerativnih bolesti, poput Alzheimerove, primjećuje se pojačana ekspresija butirkinesteraze.¹⁶

1.5. Alzheimerova demencija

Alzheimerova demencija je progresivna neurodegenerativna bolest, karakterizirana propadanjem moždanih stanica, što dovodi do gubitka pamćenja, smanjene sposobnosti rasuđivanja te promjene osobnosti.¹⁷ Prvi put je dijagnosticirana 1906. godine i opisana kao „jedinstvena bolest mozga“ od strane dr. Aloisa Alzheimerera. Alzheimerova demencija, u današnje vrijeme, čini više od 60% svih demencija.¹⁸

Simptomi bolesti javljaju se postupno, obično nakon 65 godine. Bolest može trajati godinama, a razvija se u tri stadija:

- Rani stadij (blagi) – gubitak epizodičnog deklarativnog pamćenja, vremensko-prostorna dezorijentacija, poteškoće u govoru, čitanju i pisanju, kao i u izvršavanju svakodnevnih aktivnosti, izražene promjene raspoloženja, pretjerana sumnjičavost, gubitak koncentracije. Ovaj stadij može proći nezapaženo, jer se često pripisuje staračkoj zaboravljivosti ili nepažnji.
- Umjereni stadij – izražene smetnje u pamćenju, gubitak motoričkih sposobnosti, neprepoznavanje bližnjih, jača dezorijentiranost u vremenu i prostoru, izražena psihotična stanja, paranoidne reakcije, propadanje društvenih vještina.
- Uznapredovali stadij – veći dio moždanog tkiva je propao, pacijent se ne može kretati, gutati, ni kontrolirati fiziološke funkcije, postaje potpuno ovisan o tuđoj njezi. Konačni ishod je smrt.¹⁸

Na slici 10. je prikazan je izgled zdravog mozga, te izgled mozga sa blagim i uznapredovalim stadijem Alzheimerove bolesti.



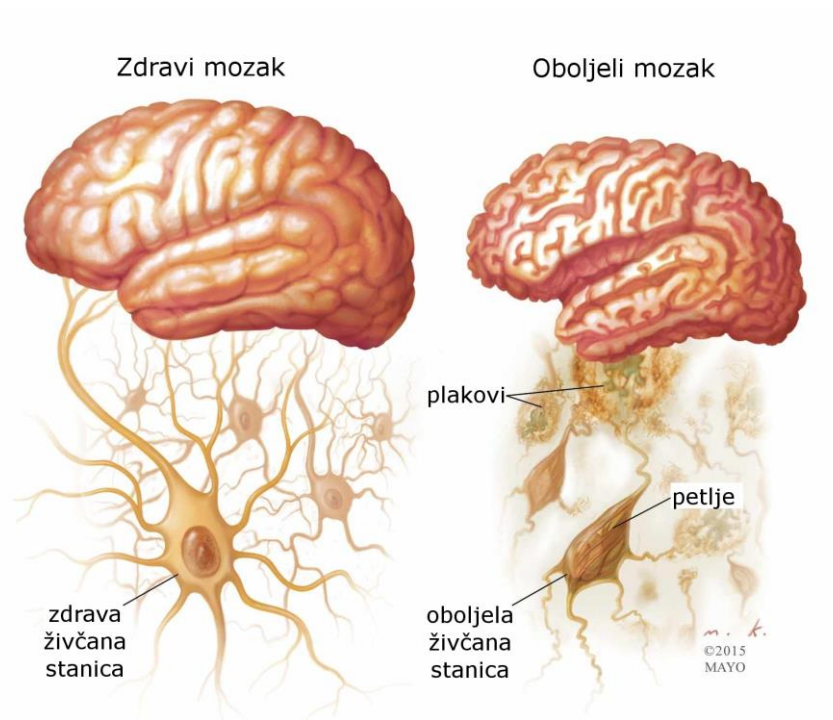
Slika 10. Prikaz zdravog mozga, te blagog i uznapredovalog stadija Alzheimerove bolesti.¹⁹

Točan uzrok bolesti još uvijek nije poznat, ali određenu ulogu u njenom nastajanju igra i genetski faktor, jer se bolest može pojavljivati i kroz nekoliko generacija. Kod sporadičnog oblika bolesti uzrok može biti kombinacija više faktora. Postoji niz općeprihvaćenih faktora rizika za nastajanje Alzheimerove demencije. Najznačajniji i najbolje istražen je životna dob. Bolest se javlja rijetko prije 65 godina, a nakon toga vjerojatnoća oboljevanja progresivno raste. Ostali faktori su: spol (više oboljevaju žene nego muškarci), prethodne bolesti (dijabetes, hipertenzija, kardiovaskularne bolesti, pretilost), životne navike (pušenje, konzumiranje alkohola, hrana), traume glave, stupanj obrazovanja.¹⁸

Patološke promjene mozga kod Alzheimerove demencije su: propadanje moždane kore, gubitak neurona, proliferacija glija stanica, formiranje neurofibrilarnih čvorova, nakupljanje neuralnih plakova, te značajno smanjenje koncentracije acetilkolina.

Neuralni ili senilni plakovi su izvanstanične naslage netopljivog proteinskog materijala. Glavni sastojak ovih nakupina je amiloid- β peptid, koji dovodi do pojačanog stvaranja slobodnih radikala, što uzrokuje oksidacijski stres.^{10,18}

Neurofibrilarni čvorovi su nakupine u neuronima koji su u fazi odumiranja ili su već odumrli. Glavni sastojak neurofibrilarnih čvorova je hiperfosforilirani oblik proteina *tau*. U zdravim stanicama τ protein ima pravilne duge niti, a njegova uloga je stabilizacija mikrotubula. Hiperfosforilirani τ protein ima zamršene niti koje formiraju čvorove.



Slika 11. Usporedba zdravog i oboljelog mozga²⁰

Liječenje Alzheimerove demencije svodi se na usporavanje tijeka bolesti i ublažavanje simptoma. Lijekovi koji se primjenjuju su inhibitori acetilkolinesteraze. Primjenom ovih inhibitora postiže se povećanje koncentracije acetilkolina koji je, kako je već rečeno, jedan od glavnih prijenosnika živčanih impulsa. Nije dokazano da je njegov nedostatak uzrok bolesti, ali izvjesno jeste u njezinoj osnovi, jer se upotrebom inhibitora AChE popravlja klinička slika bolesti. Osim prirodnih inhibitora, proizvedeni su i sintetski koji se danas primjenjuju u kliničkoj praksi, i to reverzibilni (donepezil, tarkin) i ireverzibilni (rivastigmin).¹⁶ Uz terapiju inhibitorima, koristi se i terapija antioksidansima, s ciljem smanjenja oksidacijskog stresa. Najčešće se koristi vitamin E.¹⁸

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljke roda *Centaurea*

Biljke roda *Centaurea* pripadaju porodici Asteraceae (glavočike). Glavočike su jedina porodica reda Astralis i najrazgranatija su porodica biljaka. Porodici Asteraceae pripada više od 1000 rodova sa preko 20000 vrsta rasprostranjenih širom svijeta. Glavočike su zeljaste biljke, sa izrazito sitnim cvjetovima koji oblikuju glavičasti cvat. Cvatovi su cvjetoliki, pa se greškom smatraju cvjetovima. Cvjetovi glavočika mogu biti cjevasti i jezičasti. Cvat može imati samo jezičaste (npr. vodopija), samo cjevaste (npr. zečina) ili i jezičaste i cjevaste cvjetove (npr. suncokret). Mnoge glavočike su ljekovite (neven, kamilica, stolisnik, maslačak, ambrozija- ljekovita i istovremeno agresivan alergen). Veliki cvatovi raznovrsnih boja su i omiljene ukrasne biljke (krizanteme, dalije, neveni, tratinčice, cinije, kadifice).^{21,22}

Najbrojniji rod porodice Asteraceae, upravo su *Centaureae* (zečine). Uglavnom su samonikle, višegodišnje i medonosne biljke. Postoji preko 2000 vrsta (samo u Hrvatskoj oko 50 vrsta), neke su vrlo raširene (*C. jacea* L.), dok su druge izraziti endemi (*C. ragusina* L.). U Hrvatskoj raste više endems biljaka roda *Centaurea*, i to uglavnom u mediteranskom i submediteranskom području. Zbog dugotrajne cvatnje (obično 2 – 3 mjeseca) i raznovrsnih i lijepih boja, često se uzgajaju kao ukrasne.²³

Za ovaj rad odabrane su tri biljke roda *Centaurea*: *Centaurea jacea* L. (livadna zečina), *Centaurea alba* L. (bijela zečina) i *Centaurea scabiosa* L. (velika zečina).

2.1.1. *Centaurea jacea*

Centaurea jacea L. (livadna zečina) je medonosna, višegodišnja zeljasta biljka, uspravne stabljike koja može biti gola ili prekrivena tankim dlačicama, jednostavna ili razgranata, a raste u visinu od 40 do 80 cm (slika 12.). Listovi su zeleni, a izgledom se razlikuju pri vrhu i dnu stabljike. Prizemni listovi imaju dužu peteljku, lancetasti su i dlakavi, dok su oni na sredini i na vrhu stabljike sjedeći, cjelovitog ruba, a mogu biti duguljasti ili lancetasti. Ljubičasti cvjetovi, jajastog oblika, veličine 1-2 cm, skupljeni su u pojedinačne glavice koje se nalaze na vrhu stabljike. Cvate od lipnja do listopada. Plod je ahenij dug oko 3 mm, gol ili prekriven finim dlačicama, sjajan, blijedosiv do svijetlosmeđi. Razmnožava se sjemenom.

Livadna zečina, kako joj samo ime kaže, raste na livadama, šumskim čistinama, uz puteve nizinskih i brdskih područja. Rasprostranjena je u Europi i Aziji.²⁴



Slika 12. *Centaurea jacea*²⁵

2.1.2. *Centaurea alba*

Centaurea alba L. (bijela zečina) je dvogodišnja zeljasta biljka, a raste u visinu do 60 cm (slika 13.). Stabljika je od sredine metličasto razgranata. Listovi su zeleni, slabo dlakavi, perasto podijeljeni na lancetaste režnjeve. Cvjetovi su cjevasti, bijeli ili rozi, središnji dvospolni, a rubni sterilni. Cvat je jajastog oblika, promjera 11-12 mm. Cvate od lipnja do kolovoza. Plod je ahenij dug oko 3 mm, a papus kao trećina ahenija.

Raste na livadama, sušnim i kamenjarskim područjima, uz ceste, a rasprostranjena je u Europi.²⁶



Slika 13. *Centaurea alba*²⁷

2.1.3. *Centaurea scabiosa*

Centaurea scabiosa L. (velika zečina) je trajna zeljasta biljka, uspravne hrapave stabljike i raste u visinu od 50 do 130 cm (slika 14.). Stabljika je pri vrhu veoma razgranata. Listovi su zeleni, hrapavi s obje strane, perasto podijeljeni na lancetaste režnjeve. Kao i kod *C. jacea* prizemni listovi imaju peteljke, dok su ostali listovi duž stabljike sjedeći. Purpurni cvjetovi, veličine 3 do 5 cm, skupljeni su u pojedinačne glavice na vrhovima stabljike. Cvate u srpnju i kolovozu. Plod je spljoštena ruška duga oko 5 mm.

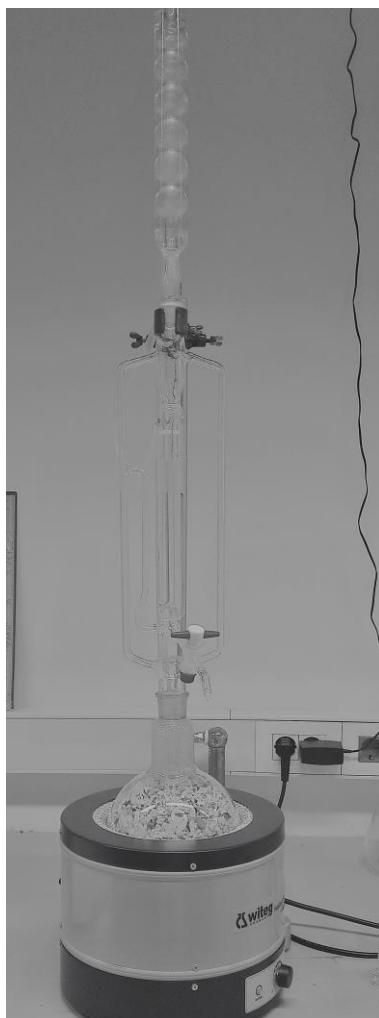
Raste na suhim livadama i pašnjacima, a rasprostranjena je u Europi. Medonosna je biljka, a mladi listovi su jestivi.²⁸



Slika 14. *Centaurea scabiosa*²⁹

2.2. Izolacija eteričnih ulja vodenom destilacijom po Clevengeru

100 g prosušenog biljnog materijala je grubo usitnjeno i stavljeno u tikvicu, zatim je dodano 1000 mL destilirane vode te je destilirano 3 sata. Isparljive komponente eteričnog ulja se u obliku pare zajedno s vodenom parom dižu kroz postranične cijevi aparature po Clevengeru do hladila gdje se kondenziraju i skupljaju u središnjoj cijevi aparature u koju je dodano po 2 mL pentana i dietiletera. Nakon završenog postupka destilacije ulje otopljeno u smjesi pentana i dietiletera otpipetirano je i preneseno u čistu, suhu bočicu, a otapalo je uklonjeno otparavanjem na zraku. Eventualno zaostali tragovi vode u uzorku eteričnog ulja su uklonjeni dodatkom male količine bezvodnog natrijevog sulfata (Na_2SO_4) koji se poslije odstranio dekantiranjem. Do daljnjih analiza eterično ulje je čuvano u hermetički zatvorenim bočicama u hladnjaku na temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.



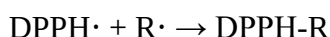
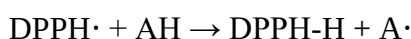
Slika 15. Aparatura za vodenu destilaciju po Clevengeru

2.3. Ispitivanje kemijskog sastava eteričnih ulja vezanim sustavom plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS)

Vezani sustav plinske kromatografije i spektrometrije mase (engl. *gas chromatography – mass spectrometry*, GC-MS) je moćna instrumentna tehnika za analizu kemijskog sastava i sadržaja sastojaka eteričnih ulja.³⁰ Uzorak je injektiran u injektor plinskog kromatografa gdje se komponente odvajaju i jedna za drugom dolaze na detektor masa. Kvadropolni analizator u detektoru masa omogućava snimanje spektra u nekoliko milisekundi. Igla je ispirana pentanom prije svakog injektiranja uzorka. Identifikacija komponenti izvršena je preko Kovačevih indeksa (KI) te usporedbom masenih spektara s onim iz komercijalno dostupnih baza podataka, Wiley i NIST.³¹

2.4. Ispitivanje antioksidacijskog potencijala DPPH metodom

DPPH metoda se koristi za određivanje sposobnosti antioksidacijskog djelovanja ispitivanog uzorka. Temelji se na mogućnosti uzorka da hvata slobodni radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, označen kao DPPH·. Redukcija slobodnog radikala praćena je smanjenjem apsorbanције pri valnoj duljini $\lambda=517\text{ nm}$ ³², a može se prikazati sljedećom reakcijom:



Izvagano je 0,0044 g DPPH reagensa i otopljeno u 100 mL etanola. Nula spektrofotometra podešena je etanolom i apsorbanција otopine reagensa je očitana prije mjerenja. Nakon toga mjerene su apsorbancije pojedinih uzoraka.

Postotak neutralizacije radikala izračunat je prema formuli Yen & Duh³³:

$$\% = \frac{(A_{\text{DPPH}} - A_u)}{A_{\text{DPPH}}} \times 100 ,$$

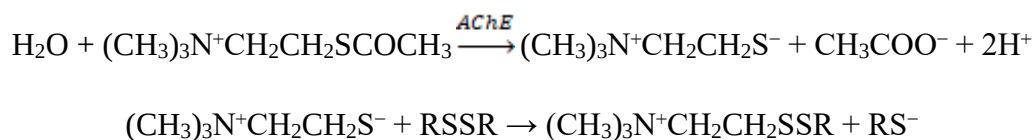
gdje je A_{DPPH} - apsorbanција čiste otopine DPPH;

A_u - apsorbancija ispitivanog uzorka sa DPPH.

Na osnovu dobivenog postotka procjenjuje se antioksidacijski potencijal uzorka.

2.5. Ispitivanje sposobnosti inhibicije enzima kolinesteraza Ellmanovom metodom

Metoda po Ellmanu je kolorimetrijska metoda određivanja inhibicije enzima, kao što su - acetilkolinesteraza (AChE) i butirilkolinesteraza (BChE) enzimi - važni u patogenezi Alzheimerove bolesti. Ellmanovom metodom aktivnost enzima mjeri se porastom oslobođenog žutog aniona 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline nastalog reakcijom DTNB-a (Ellmanovog reagensa) s tiolnim skupinama acetiltiokolina:^{34,35}



Porast apsorbancije praćena je pri valnoj duljini $\lambda = 412 \text{ nm}$.

Sposobnost inhibicije prikazana je postotkom:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{(A_k - A_u)}{A_k} \times 100 ,$$

gdje je A_k - apsorbancija kontrolnog uzorka;

A_u - apsorbancija ispitivanog uzorka.

2.5.1. Sposobnost inhibicije acetilkolinesteraze (AChE)

Za mjerenje sposobnosti inhibicije AChE pripremljene su sljedeće otopine:

- DTNB konačne koncentracije 0,3 mM otapanjem 13,079 mg reagensa u 5 mL pufera, pH=7 s 0,12 M NaHCO_3 .
- ATChI konačne koncentracije 0,5 mM otapanjem 15,9 mg reagensa (acetilkolin jodida) u 5 mL pufera, pH=8.

- AChE konačne koncentracije 0,03 U/mL 6,6 μ L reagensa (500 U/mL AChE u puferu pH=8) u 5 mL pufera, pH=8.

Tablica 3. Shema otopina u eksperimentu

EtOH	kontrola	BL1	BL2	Uzorak M	Uzorak BL
Pufer	190	200	200	180	190
DTNB	10	10	10	10	10
Uzorak	10 EtOH	10 EtOH	10 EtOH	10	10
AChE	10	/	10	10	/
ATChI	10	10	/	10	10

U tablici 3. dani su podaci o volumenima otopina potrebnim za eksperiment. Kontrolni uzorak je rađen na način da se umjesto uzorka stavila ista količina etanola.

2.5.2. Sposobnost inhibicije butirilkolinesteraze (BChE)

Za mjerenje sposobnosti inhibicije BChE pripremljene su sljedeće otopine:

- DTNB konačne koncentracije 0,3 mM otapanjem 13,079 mg reagensa u 5 mL pufera, pH=7 s 0,12 M NaHCO₃.
- S-BTChI konačne koncentracije 0,5 mM otapanjem 17,45 mg reagensa (butirilkolin jodida) u 5 mL pufera, pH=8.
- BChE konačne koncentracije 0,03 U/mL 14 μ L reagensa (240 U/mL BChE u puferu pH=8) u 5 mL pufera, pH=8.

Tablica 4. Shema otopina u eksperimentu

EtOH	kontrola	BL1	BL2	Uzorak M	Uzorak BL
Pufer	190	200	200	180	190
DTNB	10	10	10	10	10
Uzorak	10 EtOH	10 EtOH	10 EtOH	10	10
BChE	10	/	10	10	/
BTChI	10	10	/	10	10

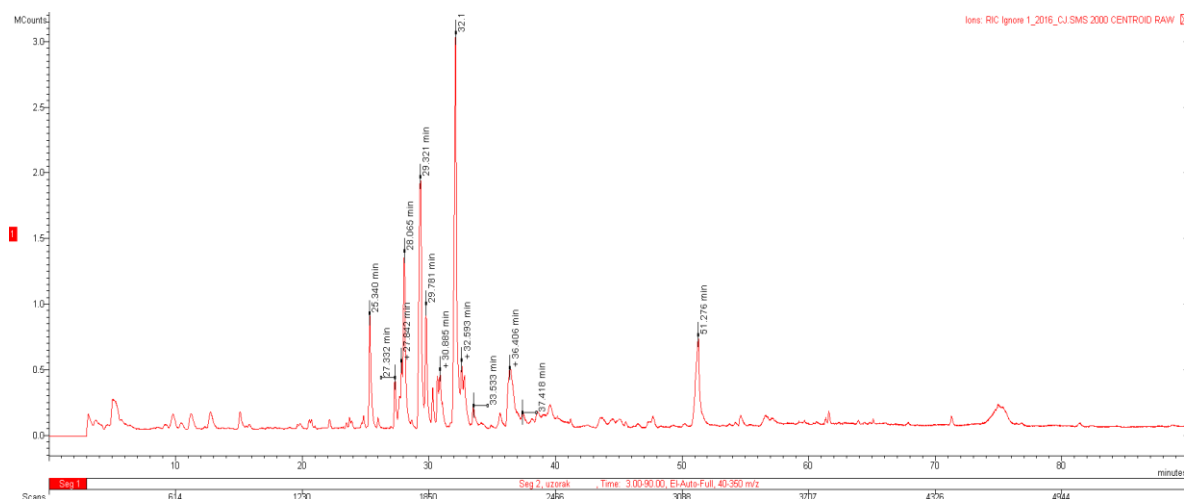
U tablici 4. dani su podaci o volumenima otopina potrebnim za eksperiment. Kontrolni uzorak je rađen na način da se umjesto uzorka stavila ista količina etanola.

3. REZULTATI

3.1. Ispitivanje kemijskog sastava

Eterično ulje iz prethodno osušenog biljnog materijala biljaka iz porodice Asteraceae, *Centaurea jacea* L., *Centaurea alba* L. i *Centaurea scabiosa* L., analizirano je vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) uz korištenje VF-5MS kromatografske kolone. Identifikacija pojedinih sastojaka ulja izvršena je na osnovi vremena zadržavanja pojedinih spojeva na koloni (retencijska vremena-Rt i iz njih izračunatih kovačevih indeksa-KI), njihovom usporedbom s poznatim literaturnim vrijednostima za svaku pojedinu komponentu te usporedbom spektara masa dobivenih spojeva sa spektrima masa spojeva Wiley-eve i NIST baze podataka. Kemijski sastav i sadržaj pojedinih komponenti eteričnih ulja *C. jacea*, *C. alba* i *C. scabiosa*, prikazan je tablicama 5, 6, 7 i 8, dok su kromatogrami prikazani slikama 16, 17 i 18.

3.1.1. Kemijski sastav eteričnog ulja *C. jacea*



Slika 16. Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja biljke *Centaurea jacea*.

Tablica 5. Kemijski sastav i sadržaj pojedinih sastojaka eteričnog ulja biljke *C. jacea*.

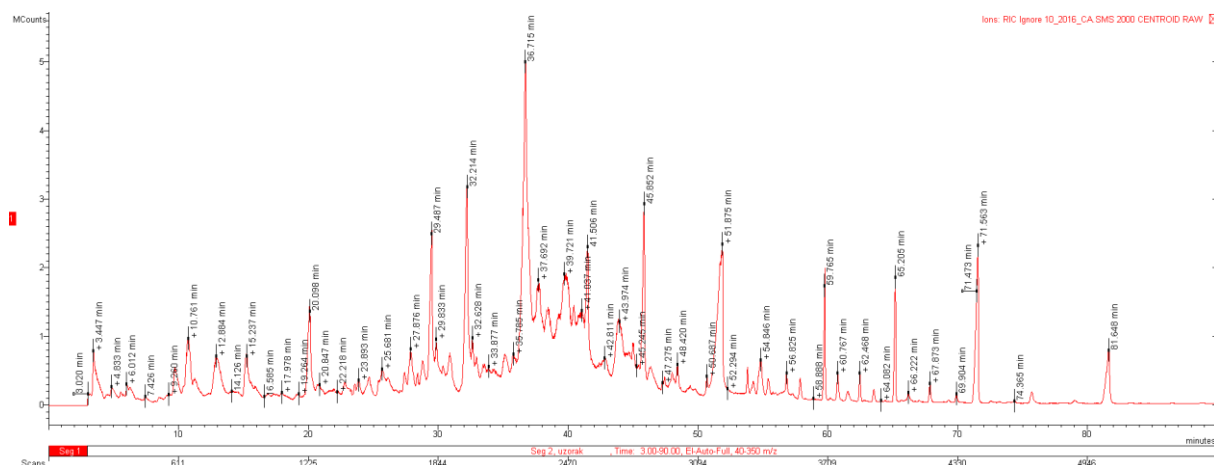
Komponenta	KI	Maseni udio %
<i>Oksidirani monoterpeni</i>		
β -ciklocitral	1214	0,3
pulegon	1244	0,3
<i>Seskviterpenski ugljikovodici</i>		
bicikloelemen	1366	4,4
δ -elemen	1340	0,4
α -kopaen	1376	1,7
β -pačulen	1381	1,0
β -kubeben	1390	1,9
β -elemen	1392	8,0
α -kalaren	1428	4,8
aromadendren	1427	12,5
<i>cis</i> - β -farnesen	1442	1,4
Kalaren	1445	1,6
alloaromadendren	1458	2,1
germakren D	1480	1,0
γ -pačulen	1467	2,3
<i>epi</i> -bicikloeskvifelandren	1488	18,7
valencen	1491	2,9
γ -kadinen	1519	1,2
<i>Oksidirani seskviterpeni</i>		
spatulanol	1564	1,0

kariofilen oksid	1580	6,6
humulen epoksid II	1608	1,2
α -kadinol	1653	2,1
<i>Fenil propanski derivati</i>		
Anetol	1283	0,2
<i>Neterpenski spojevi</i>		
heksanal	805	0,8
oktanal		0,4
2,4-heptadienal	1013	1,2
benzen acetaldehid	1049	1,4
nonanal	1102	0,9
heksadekanska kiselina	1977	8,8
		Ukupno: 91,1 %

KI = Kovačev indeks

% = w/w

3.1.2. Kemijski sastav eteričnog ulja *C. alba*



Slika 17. Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja biljke *Centaurea alba*.

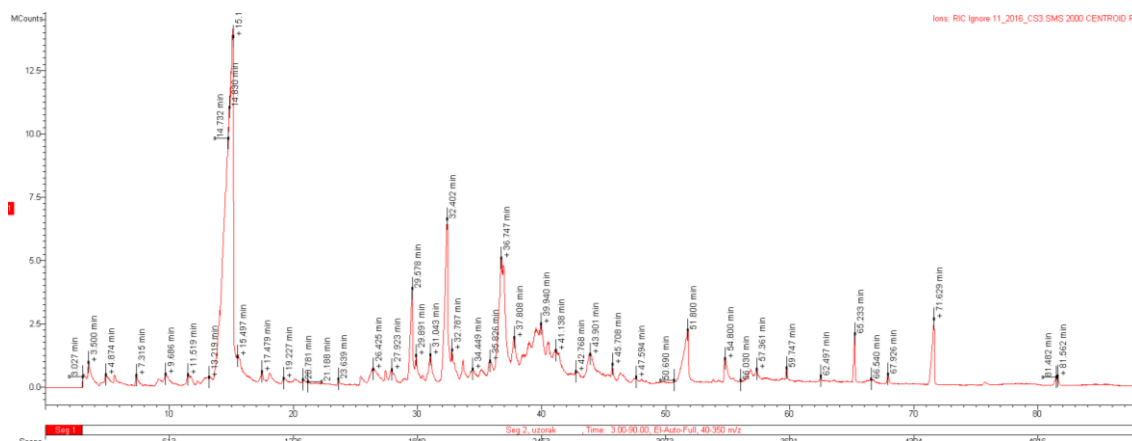
Tablica 6. Kemijski sastav i sadržaj pojedinih sastojaka eteričnog ulja biljke *Centaurea alba*.

Komponenta	KI	Maseni udio %
Seskviterpenski ugljikovodici		
α -kopaen	1376	3,5
pačulen	1467	3,0
germakren D	1480	14,3
α -selinen	1498	3,0
γ -kadinen	1519	1,5
Oksidirani seskviterpeni		
ledol=globulol	1561	5,8
kariofilen oksid	1580	1,9
α -ciperon	1750	3,8
heksahidrofarnezil aceton	1845	9,3
Neterpenski spojevi		
heneikosan	2100	1,1
dokosan	2200	1,3
trikosan	2300	2,9
heptakosan	2700	5,5
heksanal	805	0,3
pentadekanal	1712	9,6
tetradekanska kiselina	1787	11,7
pentadekanska kiselina	1882	0,9
heksadekanska kiselina	1977	19,1
		Ukupno: 98,5 %

KI = Kovačev indeks

% = w/w

3.1.3. Kemijski sastav eteričnog ulja *C. scabiosa*



Slika 18. Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja biljke *Centaurea scabiosa*.

Tablica 7. Kemijski sastav i sadržaj pojedinih sastojaka eteričnog ulja biljke *Centaurea scabiosa*.

Komponenta	KI	Maseni udio %
Monoterpenski ugljikovodici		
α -pinen	930	0,5
sabinen	975	0,5
β -mircen	988	0,8
<i>p</i> -menten	1026	0,4
Oksidirani monoterpeni		
1,8-cineol	1035	0,4
linalool	1104	20,7
β -damascenon	1359	0,4
Seskviterpenski ugljikovodici		
bicikloelemen	1336	0,4
α -kopaen	1376	0,4
longifolen	1409	0,6
β -kariofilen	1419	3,8
β -kopaen	1432	1,1
aromadendren	1427	0,3
alloaromadendren	1458	1,6
β -selinen	1490	8,1
α -selinen	1498	1,2
δ -kadinen	1541	1,2
Oksidirani seskviterpeni		
spatulanol	1564	7,6
kariofilen oksid	1580	5,2
aromadendren oksid	1626	4,0

α -bisabolol	1685	2,4
farnesil aceton	1915	0,3
Diterpeni		
fitol	2119	0,6
Neterpenski spojevi		
trikosan	2300	0,3
tetrakosan	2400	1,1
pentakosan	2500	1,8
heksakosan	2600	0,4
heptakosan	2700	2,4
nonakosan	2900	0,5
benzen acetaldehid	1049	1,1
metil benzoat	1091	19,6
pentadekanska kiselina	1882	0,3
heksadekanska kiselina	1977	3,9
oktadekanska kiselina	2180	0,3
		Ukupno: 92,4 %

KI = Kovačev indeks

% = w/w

Tablica 8. Sadržaj pojedinih vrsta komponenti eteričnih ulja *C. jacea*, *C. alba* i *C. scabiosa*.

	<i>C. jacea</i>	<i>C. alba</i>	<i>C. scabiosa</i>
TERPENSKI SPOJEVI	77,4	36,8	62,5
<i>Monoterpeni</i>	-	-	2,2
<i>Monoterpenoidi</i>	0,6	-	21,1
<i>Seskviterpeni</i>	65,9	25,3	19,1
<i>Seskviterpenoidi</i>	10,9	20,8	19,5
<i>Diterpeni</i>	-	-	0,6
FENIL-PROPANSKI DERIVATI	0,2	-	-
NETERPENSKI SPOJEVI	13,5	61,7	31,7
<i>Aldehidi</i>	4,7	9,9	1,1
<i>Kiseline</i>	8,8	31,7	4,5
<i>Esteri</i>			19,6
<i>Ugljikovodici</i>	-	10,8	6,5
TOTAL	91,1	98,5	94,2

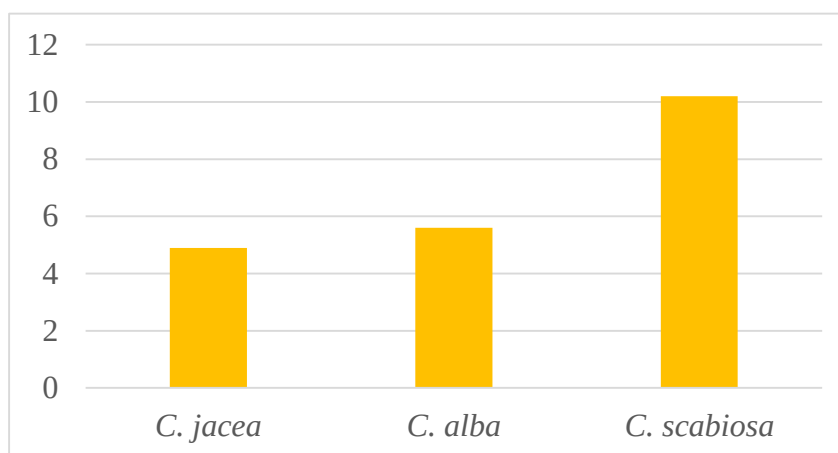
3.2. Ispitivanje antioksidacijskog potencijala

Antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja biljaka *C. jacea*, *C. alba* i *C. scabiosa*, početne koncentracije 10 mg/mL (konačne koncentracije 0,48 mg/mL) ispitana je DPPH metodom. Svaki uzorak testiran je dva puta.

3.2.1. DPPH metoda

Tablica 9. Rezultati mjerenja antioksidacijskog potencijala eteričnih ulja biljaka *C. jacea*, *C. alba* i *C. scabiosa*.

Uzorak	ABS	% inhibicije DPPH
<i>C. jacea</i>	1,0675	4,9
<i>C. alba</i>	1,059	5,6
<i>C. scabiosa</i>	1,0075	10,2



Slika 19. Histogramski prikaz antioksidacijskog potencijala eteričnih ulja biljaka *C. jacea*, *C. alba* i *C. scabiosa* DPPH metodom.

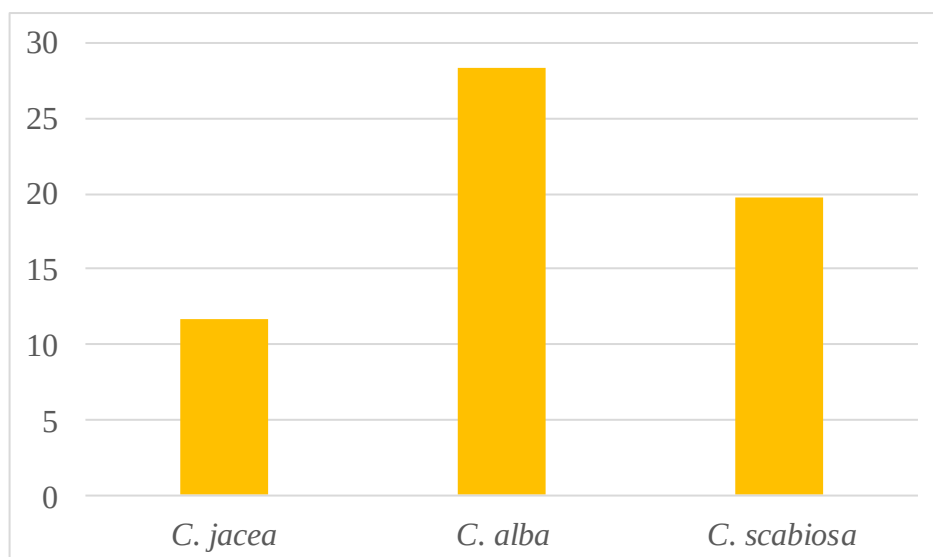
3.3. Ispitivanje sposobnosti inhibicije enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze Ellmanovom metodom

Sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE ispitana je Ellmanovom metodom. Pripavljeni uzorci početne koncentracije 10 mg/mL (konačne koncentracije 0,45 mg/mL) testirani su po dva puta.

3.3.1. Sposobnost inhibicije enzima AChE

Tablica 10. Sposobnost inhibicije enzima AChE otopinama eteričnih ulja biljaka *C. jacea*, *C. alba* i *C. scabiosa*.

Uzorak	% inhibicije AChE
<i>C. jacea</i>	11,7
<i>C. alba</i>	28,3
<i>C. scabiosa</i>	19,8



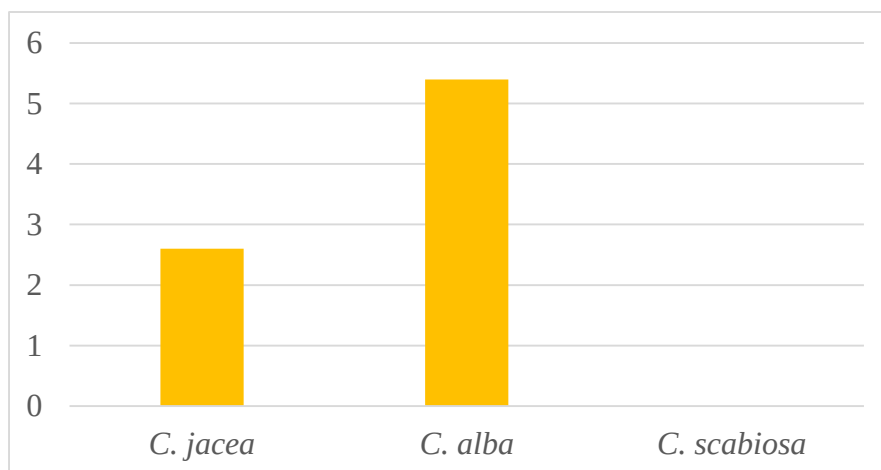
Slika 20. Histogramski prikaz sposobnosti inhibicije enzima AChE otopinama eteričnih ulja biljaka *C. jacea*, *C. alba* i *C. scabiosa*.

3.3.2. Sposobnost inhibicije enzima BChE

Tablica 11. Sposobnost inhibicije enzima BChE otopinama eteričnih ulja biljaka *C. jacea*, *C. alba* i *C. scabiosa*.

Uzorak	% inhibicije BChE
<i>C. jacea</i>	2,6
<i>C. alba</i>	5,4
<i>C. scabiosa</i>	–

– = ne pokazuje inhibicijska svojstva



Slika 21. Histogramski prikaz sposobnosti inhibicije enzima BChE otopinama eteričnih ulja biljaka *C. jacea*, *C. alba* i *C. scabiosa*.

4. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je ispitati kemijski sastav te antioksidacijski i antikolinesterazni potencijal eteričnih ulja izoliranih iz prethodno osušenog biljnog materijala, sabranog tijekom pune cvatnje biljke, triju biljnih vrsta porodice Asteraceae, roda *Centaurea*: *C. jacea* L., *C. alba* L. i *C. scabiosa* L.

Za izolaciju hlapljivih spojeva iz biljnog materijala korištena je metoda izolacije u aparaturi po Clevenger-u. Kemijski sastav navedenih biljnih vrsta ispitan je vezanim sustavom plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS). Identificirane komponente eteričnih ulja podijeljene su u tri skupine spojeva: terpeniski spojevi, fenil-propanski derivati i neterpeniski spojevi.

Analizom kemijskog sastava eteričnog ulja biljke *C. jacea* identificirano je ukupno 29 komponenti (Tablica 5.). U sastav ulja ulaze terpeniski i neterpeniski spojevi te jedan fenil-propanski derivat. Od terpeniskih spojeva u uljima dolaze monoterpenoidi, seskviterpeni, te seskviterpenoidi; dok od neterpeniskih spojeva u ulju dolaze neterpenske aldehidi i kiseline. U kvantitativnom smislu, najdominantnija komponenta ove biljke je seskviterpeniski spoj *epi*-biciklozeskvifelandren (18,7 %). Od ostalih, kvantitativno značajnih komponenti ulja ističu se aromadendren (12,5 %), heksadekanska kiselina (8,8 %), β -elemen (8,0 %) i kariofilen-oksidi (6,6 %).

Analizom kemijskog sastava eteričnog ulja biljke *C. alba* identificirano je ukupno 17 komponenti (Tablica 6.). U sastav ulja ulaze terpeniski i neterpeniski spojevi. Od terpeniskih spojeva u uljima dolaze seskviterpeni i seskviterpenoidi; dok od neterpeniskih spojeva u ulju dolaze neterpeniski aldehidi, kiseline te ugljikovodici. U kvantitativnom smislu, dominantne komponente ove biljke su neterpenska kiselina, heksadekanska kiselina (19,1 %) te seskviterpen germakren D (14,3 %). Od ostalih komponenti ulja ističu se pentadekanal (9,6 %) i heksahidrofarnezil acetoni (9,3 %).

Analizom kemijskog sastava eteričnog ulja biljke *C. scabiosa* identificirano je ukupno 34 komponenti (Tablica 7.). U sastav ulja ulaze terpeniski i neterpeniski spojevi. Od terpeniskih spojeva u uljima dolaze monoterpeni, monoterpenoidi, seskviterpeni i seskviterpenoidi; dok od neterpeniskih spojeva u ulju dolaze neterpeniski aldehidi, kiseline, esteri te ugljikovodici. U kvantitativnom smislu, dominantne komponente ulja su monoterpenoid linalool (20,7 %) i neterpeniski ester metil-benzoat (19,6 %). Ostale

značajne komponente ove biljke su β -selinen (8,1 %), spatulenol (7,6 %) i kariofilen-oksidi (5,2 %).

Od istraženih vrsta, do danas je objavljen, jedino, kemijski sastav eteričnog ulja *C. jacea*. Eterično ulje ove biljne vrste sakupljene na području Divostina, Republika Srbija, kao dominantne sadrži seskviterpenoidne komponente: kariofilen-oksidi (23,5 %) i spatulenol (8,9 %). Ostale važne komponente tog ulja su i 9-oktadekanska kiselina (8,9 %), (*E*)- β -damascenon (7,3 %) i heksadekanska kiselina (6,6 %).³⁶

U ovom je radu ispitan i biološki potencijal hlapljivih spojeva triju vrsta roda *Centaurea*: *C. jacea*, *C. alba* i *C. scabiosa*. Preciznije, ispitan je antioksidacijski potencijal te antikolinesterazni potencijal izoliranih eteričnih ulja ovih biljnih vrsta. Antioksidacijski potencijal je testiran metodom hvatanja slobodnih DPPH radikala (DPPH metoda), dok je antikolinesterazni potencijal testiran Ellmanovom metodom na dva enzima važna u tretmanu Alzheimerove demencije, acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraza (BChE). Dosadašnja testiranja antiokolinesterazne aktivnosti eteričnim uljima uglavnom su se odnosila na ispitivanje inhibicije enzima AChE. U posljednje vrijeme se, pored inhibicije AChE, na antikolinesteraznu aktivnost testira i BChE, enzim važan u tretmanu kasnije faze Alzheimerove demencije. Za ispitivanje bioloških potencijala prethodno su pripremljene otopine eteričnih ulja početne koncentracije 10 mg/mL.

Rezultati testiranja sposobnosti hvatanja slobodnog DPPH radikala uzorcima eteričnih ulja pokazali su slab antioksidacijski potencijal ovih uzoraka. Najbolju inhibiciju DPPH radikala pokazalo je ulje *C. scabiosa* (10,2 %); slijede eterična ulja *C. alba* (5,6 %) i *C. jacea* (4,9 %).

Ispitivanje sposobnosti inhibicije enzima AChE i BChE eteričnim uljima triju *Centaurea*, metodom po Ellmanu, pokazalo je relativno slabu inhibiciju ovih enzima. Najbolju sposobnost inhibicije AChE pokazalo je eterično ulje *C. alba* (28,3 %); slijede ulja *C. scabiosa* (19,8 %) te ulje *C. jacea* (11,7 %). Sva tri ispitana ulja veoma slabo inhibiraju enzim BChE. Tako ulja *C. alba* i *C. jacea* tek neznatno inhibiraju enzim BChE (5,4 % i 2,6 %), dok ulje *C. scabiosa* ne inhibira ovaj enzim.

Slab biološki potencijal eteričnih ulja testiranih *Centaurea* vrsta vjerojatno je posljedica nedostataka spojeva, sastavnica ulja, koji bi bili odgovorni za ispitivanu aktivnost. Kad je riječ o antioksidaciji, to su uglavnom fenolne monoterpenoidne sastavnice, kao timol i karvakrol.³⁷ Kad je, pak, riječ o inhibiciji acetilkolinesteraze, to su sastavnice kao monoterpenoidi 1,8-cineol³⁷, timol i timohidrokinon³⁸; seskviterpen β -kariofilen³⁹ i seskviterpenoid (+)-(S)-dihidro-*ar*-tumeron⁴⁰ te fenilpropanski derivati α - i β -asaron.^{41,42} Kao dobri inhibitori butirilkolinesteraze pokazali su se terpinolen, (+)-sabinen, (+)-limonen i anetol.⁴³

5. ZAKLJUČAK

- Cilj ovog rada bio je ispitati kemijski sastav i biološku aktivnost eteričnih ulja izoliranih iz prethodno osušenog biljnog materijala, sabranog tijekom pune cvatnje biljaka *Centaurea jacea* L., *Centaurea alba* L. i *Centaurea scabiosa* L.
- Analizom kemijskog sastava eteričnog ulja biljke *C. jacea* identificirano je ukupno 29 komponenti. Kvantitativno, najdominantnija komponenta ove biljke je seskviterpenski spoj *epi-biciklokseskvifelandren* (18,7 %). Od ostalih komponenti ulja ističu se aromadendren (12,5 %), heksadekanska kiselina (8,8 %), β -elemen (8,0 %) i kariofilen-oksidi (6,6 %).
- Analizom kemijskog sastava eteričnog ulja biljke *C. alba* identificirano je ukupno 17 komponenti. Kvantitativno, dominantne komponente ovog eteričnog ulja su neterpenska kiselina heksadekanska kiselina te seskviterpen germakren D (14,3 %). Od ostalih komponenti ulja ističu se pentadekanal (9,6 %) i heksahidrofarnezil acetoni (9,3 %).
- Analizom kemijskog sastava eteričnog ulja biljke *C. scabiosa* identificirano je ukupno 34 komponenti. Kvantitativno, dominantne komponente ulja su monoterpenoid linalool (20,7 %) i neterpenski ester metil-benzoat (19,6 %). Ostale značajne komponente ove biljke su β -selinen (8,1 %), spatulenol (7,6 %) i kariofilen-oksidi (5,2 %).
- Od istraženih vrsta, do danas je objavljen, jedino, kemijski sastav eteričnog ulja *C. jacea*, kemijski sastav *C. alba* i *C. scabiosa* do danas nije objavljen, koliko autorica zna.

- U ovom je radu ispitan i antioksidacijski i antikolinesterazni potencijal eteričnih ulja *C. jacea*, *C. alba* i *C. scabiosa*. Antioksidacijski potencijal je testiran DPPH metodom, dok je sposobnost inhibicije acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze testirana Ellman metodom. Rezultati su pokazali slab antioksidacijski te slab antikolinesterazni potencijal eteričnih ulja istraživanih biljnih vrsta.
- DPPH metodom najbolju aktivnost pokazalo je eterično ulje *C. scabiosa*.
- Najbolju inhibicijsku aktivnost prema AChE pokazalo je ulje *C. alba*, dok nijedno odabrano ulje nije pokazalo značajniju aktivnost prema BChE.

6. LITERATURA

1. *Tehnička enciklopedija*, svezak 5, R. Podhorsky (urednik), Jugoslavenski leksikografski zavod, Zagreb, 1976.
2. A. Veljača, *Antioksidacijski i antikolinesterazni potencijal osam biljnih vrsta roda Centaurea*, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Splitu, 2015.
3. I. Jerković, *Kemija i tehnologija aromatičnog bilja*, Interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2012.
4. E. Guenther, *The Essential Oils*, Vol. 1, D. van Nostrand Company, New York, 1948.
5. N. Maršić, *Vaše zdravlje* **42** (2005) 1-1.
6. T. Kulišić, M. Miloš, A. Radonić, *Vaše zdravlje* **26** (2002) 1-2.
7. B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Free Radical In Biology and Medicine*, Third Edition, Oxford University Press, 2001.
8. O. Politeo, *Antioksidacijska svojstva isparljivih spojeva odabranog začinskog bilja*, Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2007.
9. P. Vehtersbah-Stojan, *Antioksidansi u aterosklerozi*, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2015.
10. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
11. http://newton.pmf.unsa.ba/hemija/kohbh/predmeti/1-IV/bioanaliticka_hemija/Katalaza.pdf (17.09.2017.)
12. S. Jurković, J. Osredkar, J. Marc, *Biochem medica* **18** (2008) 162-174.
13. N. Maršić, *Vaše zdravlje* **70** (2010) 1-1.
14. R. Brigelius-Flohé, F. J. Kelly, J. T. Salonen, J. Neuzil, J. M. Zingg, A. Azzi, *Am J Clin Nutr* **76** (2002) 703-716.
15. L. Ferhatović, *Biološka aktivnost neisparljivih spojeva biljaka porodice Asteracea*, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2009.
16. Bosak, A., Katalinić, M., Kovarik, Z. (2011). Kolinesteraze: struktura, uloga, inhibicija. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 62(2).
17. D. Poredoš, *Alzheimerova bolest i obitelj*, Hrvatska udruga za Alzheimerovu bolest, Zagreb, 2003.
18. D. Štrbenac, *Uloga medicinske sestre u zbrinjavanju bolesnika oboljelih od Alzheimerove bolesti*, Završni rad, Visoka tehnička škola, Bjelovar, 2016.
19. <https://columbiasciencereview.com/2015/04/18/a-promising-cure-for-alzheimers-disease/> (20.09.2017.)

20. <http://www.healthy-holistic-living.com/alzheimers-diet-and-lifestyle.html> (20.09.2017.)
21. R. Matić, *Morfološke karakteristike jednogodišnjih cvjetnih vrsta porodice Asteraceae*, Završni rad, Poljoprivredni fakultet, Osijek, 2017.
22. <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=22240> (08.09.2017.)
23. S. Kovačević, T. Nikolić, M. Ruščić, M. Milović, V. Stamenković, D. Mihelj, N. Jasprica, S. Bogdanović i J. Topić, *Flora Jadranske obale i otoka 250 najčešćih vrsta*, Školska knjiga, Zagreb, 2008.
24. <http://www.plantea.com.hr/livadna-zecina/> (8.09.2017.)
25. https://bs.wikipedia.org/wiki/Centaurea_jacea#/media/File:Bombus_lapidarius_-_Centaurea_jacea_-_Keila.jpg (15.09.2017.)
26. <https://www.pijanitvor.com/threads/bijela-zecina-centaurea-deusta-subsp-concolor.28043/> (20.09.2017.)
27. https://en.wikipedia.org/wiki/Centaurea_alba#/media/File:Centaurea_alba.jpg (15.09.2017.)
28. <http://www.plantea.com.hr/velika-zecina/> (8.09.2017.)
29. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/41/Centaurea_scabiosa_flower.jpg (15.09.2017.)
30. P. J. Marriott, R. Shellie, C. Cornwell, *J Chromatogr* **936** (2001) 1-22.
31. R. P. Adams, *Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry*, Allured Publishing Corporation, USA, 2007.
32. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier i C. Berset, *LWT* **28** (1995) 25-30.
33. W. J. Yen, L. W. Chang, P. D. Duh, *Food Sci Tech* **38** (2005) 193-200.
34. G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, Jr. i R. M. Featherstone, *Biochem Pharmacol* **7** (1961) 88-95.
35. F. Burčul, *Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice Ranunculaceae*, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2014.
36. T. Milosević, C. Argyropoulou, S. Solujić, D. Murat-Spahić, H. Skaltsa, *Nat Prod Commun* **5** (2010) 1663-8.
37. S. Aazza, B. Lyoussi, M. G. Miguel, *Molecules* **16** (2011) 7672-7690.
38. M. Jukić, O. Politeo, M. Maksimović, M. Miloš, *Phytother Res* **21** (2007) 259-261.
39. S. U. Sevelev, E. J. Okello, E. K. Perry, *Phytother Res* **18** (2004) 315-324.

40. M. Fujiwara, N. Yagi, M. Miyazawa, J Agr Food Chem **58** (2010) 2824-2829.
41. P. K. Mukherjee, V. Kumar, M. Mal, P. J. Houghton, Planta Medica **73** (2007) 283-285.
42. F. Burčul, M. Radan, O. Politeo, I. Blažević, *Cholinesterase-inhibitory activity of essential oils*, in: J. C. Taylor (Eds.) *Advances in Chemistry Reserch*, Vol. 37, Nova Science Publishing, New York, 2017, pp. 15-86.
43. F. Menichini, R. Tundis, M. R. Loizzo, M. Bonesi, M. Marrelli, G. A. Statti, F. Conforti, Fitoterapia **80** (2009) 297-300.