

Biološka aktivnost eteričnih ulja celera i đumbira

Viduka, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:325608>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-30**

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

BIOLOŠKA AKTIVNOST ETERIČNIH ULJA CELERA I
ĐUMBIRA
DIPLOMSKI RAD

KARLA VIDUKA

Matični broj:3

Split, listopad 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

BIOLOŠKA AKTIVNOST ETERIČNIH ULJA CELERA I
ĐUMBIRA

DIPLOMSKI RAD

KARLA VIDUKA

Matični broj: 3

Split, listopad 2020.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY

BIOLOGICAL ACTIVITY OF CELERY AND GINGER
ESSENTIAL OIL

GRADUATE THESIS

KARLA VIDUKA

Parent number: 3

Split, October, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij prehrambene tehnologije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Franko Burčul

Biološka aktivnost eteričnih ulja celera i đumbira

KARLA VIDUKA, 3

Sažetak:

Alzheimerova bolest je jedna od najčešćih degenerativnih bolesti mozga, a karakterizira ju oštećenje živčanih stanica i propadanje kognitivnih funkcija. Pravi lijek nije poznat, ali se najčešće primjenjuju inhibitori acetilkolinesteraze. U ovom radu kao potencijalni inhibitori ispitana su eterična ulja đumbira (*Zingiber officinale* Roscoe) i celera (*Apium graveolens* L.).

Kako bi se utvrdila potencijalna inhibicijska sposobnost ispitivanih ulja korištena je modificirana spektrofotometrijska metoda po Ellmanu. Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da eterično ulje đumbira nema inhibicijskih sposobnosti, dok eterično ulje celera pokazuje inhibicijsku aktivnost ovisno o koncentraciji ispitivane otopine.

Ulja su također ispitivana i na antioksidacijsku aktivnost pomoću DPPH i FRAP metoda te se prema dobivenim rezultatima može zaključiti da ni jedno od ispitivanih ulja nema značajnu antioksidativne sposobnosti.

Sastav eteričnih ulja određen je GC-MS analizom te su se kao najzastupljeniji spojevi u eteričnom ulju celera pokazali limonen, β -selinen, sedanenolid, 3-*n*-butilftalid, α -selinen, dok su kod eteričnog ulja đumbira to α -zingiberen, β -seskvifelandren, β -bisabolen te α -kurkumen.

Ključne riječi: Đumbir, Celer, Alzheimerova bolest, AChE/BChE, DPPH/FRAP, GC-MS

Rad sadrži: 46 stranica, 26 slika, 11 tablica, 47 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Danijela Skroza	predsjednik
2. Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović	član
3. Doc. dr. sc. Franko Burčul	član - mentor

Datum obrane: 20.10.2020.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Graduate study of food technology

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 3.

Mentor: Assistant Professor Franko Burčul, PhD

BIOLOGICAL ACTIVITY OF CELERY AND GINGER ESSENTIAL OIL KARLA VIDUKA, 3

Abstract:

Alzheimer's disease is one of the most common degenerative diseases of the brain, and it is characterized by damage to nerve cells and deterioration of cognitive functions. The exact drug is not known, but acetylcholinesterase inhibitors are most used. In this work, the essential oils of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and celery (*Apium graveolens* L.) are tested as potential inhibitors.

A modified Ellman spectrophotometric method was used to determine the potential inhibitory ability of the tested oils. According to the obtained results, it is evident that ginger essential oil has no inhibitory abilities, while celery essential oil shows inhibitory activity depending on the concentration of the test solution.

The oils were also tested for antioxidant activity using DPPH and FRAP methods, and according to the obtained results, it can be concluded that none of the tested oils has significant antioxidant capacity.

The composition of essential oils was determined by GC-MS analysis, and the most common compounds in celery essential oil were limonene, β -selinene, sedanenolide, 3-*n*-butylphthalide, α -selinene, while in ginger essential oil it was α -zingiberene, β -sesquifelandrene, β -bisabolene and α -curcumene.

Keywords: Ginger, Celery, Alzheimer's disease, AChE/BChE, DPPH/FRAP, GC-MS

Thesis contains 46 pages, 26 figures, 11 tables, 47 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Assistant Professor Danijela Skroza, PhD | chair person |
| 2. Assistant Professor Zvonimir Marijanović, PhD | member |
| 3. Assistant Professor Franko Burčul, PhD | supervisor |

Defence date: 20.10.2020.

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 Analitičku kemiju pod mentorstvom doc. dr. sc.
Franka Burčula u razdoblju od siječnja do srpnja 2020. godine.*

Rad je financiran od Hrvatske zaklade za znanost projektom IP-2014-09-6897.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svom mentoru doc. dr. sc. Franku Burčulu na uloženom trudu, velikoj pomoći i korisnim savjetima prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji, kolegama i prijateljima na razumijevanju, strpljenju i potpori koju su mi pružali tijekom studiranja.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1. Odrediti kemijski sastav kupovnih eteričnih ulja celera i đumbira
2. Odrediti inhibicijsku sposobnost ulja celera i đumbira na enzime acetilkolinesterazu i butirilkolinesterazu
3. Odrediti antioksidacijsku sposobnost ulja celera i đumbira

SAŽETAK

Alzheimerova bolest je jedna od najčešćih degenerativnih bolesti mozga, a karakterizira ju oštećenje živčanih stanica i propadanje kognitivnih funkcija. Pravi lijek nije poznat, ali se najčešće primjenjuju inhibitori acetilkolinesteraze. U ovom radu kao potencijalni inhibitori ispitana su eterična ulja đumbira (*Zingiber officinale* Roscoe) i celera (*Apium graveolens* L.).

Kako bi se utvrdila potencijalna inhibicijska sposobnost ispitivanih ulja korištena je modificirana spektrofotometrijska metoda po Ellmanu. Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da eterično ulje đumbira nema inhibicijskih sposobnosti, dok eterično ulje celera pokazuje inhibicijsku aktivnost ovisno o koncentraciji ispitivane otopine.

Ulja su također ispitivana i na antioksidacijsku aktivnost pomoću DPPH i FRAP metoda te se prema dobivenim rezultatima može zaključiti da ni jedno od ispitivanih ulja nema značajnu antioksidativne sposobnosti.

Sastav eteričnih ulja određen je GC-MS analizom te su se kao najzastupljeniji spojevi u eteričnom ulju celera pokazali limonen, β -selinen, sedanenolid, 3-*n*-butilftalid, α -selinen, dok su kod eteričnog ulja đumbira to α -zingiberen, β -seskvifelandren, β -bisabolen te α -kurkumen.

Ključne riječi: Đumbir, Celer, Alzheimerova bolest, AChE/BChE, DPPH/FRAP, GC-MS

SUMMARY

Alzheimer's disease is one of the most common degenerative diseases of the brain, and it is characterized by damage to nerve cells and deterioration of cognitive functions. The exact drug is not known, but acetylcholinesterase inhibitors are most used. In this work, the essential oils of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and celery (*Apium graveolens* L.) are tested as potential inhibitors.

A modified Ellman spectrophotometric method was used to determine the potential inhibitory ability of the tested oils. According to the obtained results, it is evident that ginger essential oil has no inhibitory abilities, while celery essential oil shows inhibitory activity depending on the concentration of the test solution.

The oils were also tested for antioxidant activity using DPPH and FRAP methods, and according to the obtained results, it can be concluded that none of the tested oils has significant antioxidant capacity.

The composition of essential oils was determined by GC-MS analysis, and the most common compounds in celery essential oil were limonene, β -selinene, sedanenolide, 3-*n*-butylphthalide, α -selinene, while in ginger essential oil it was α -zingiberene, β -sesquifelandrene, β -bisabolene and α -curcumene.

Keywords: Ginger, Celery, Alzheimer's disease, AChE/BChE, DPPH/FRAP, GC-MS

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1 CELER (<i>Apium graveolens</i> L.).....	2
1.1.1 Morfološki opis biljke.....	3
1.1.2 Kemijski i fitokemijski sastav sjemenki celera.....	3
1.1.3 Upotreba celera i njegova farmakološka aktivnost.....	4
1.2 ĐUMBIR (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe)	5
1.2.1 Bioaktivne komponente đumbira	6
1.2.2 Upotreba i djelovanje đumbira.....	7
1.3 ETERIČNA ULJA I NJIHOVO DOBIVANJE.....	8
1.3.1 Vodeno-parna destilacija	9
1.4 ENZIMI.....	10
1.4.1 KOLINESTERAZE	11
1.4.1.1 Acetilkolinesteraza (AChE).....	11
1.4.1.2 Butirilkolinesteraza (BChE)	12
1.4.1.3 Inhibicija kolinesteraza.....	13
1.5 ALZHEIMEROVA BOLEST.....	14
1.5.1 Liječenje Alzheimerove bolesti	14
1.6 PLINSKA KROMATOGRAFIJA / SPEKTROMETRIJA MASA.....	15
2. EKSPERIMENTALNI DIO	17
2.1 KORIŠTENA ULJA	17
2.2 ISPITIVANJE SPOSOBNOSTI INHIBICIJE ENZIMA AChE i BChE METODOM PO ELLMANU	19
2.2.1 Određivanje inhibicijske sposobnosti na enzim AChE.....	21
2.2.2 Određivanje inhibicijske sposobnosti na enzim BChE.....	23
2.3 ODREĐIVANJE KEMIJSKOG SASTAVA ETERIČNIH ULJA POMOĆU PLINSKE KROMATOGRAFIJE-SPEKTROMETRIJE MASA (GC-MS)	24
2.4 ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI VEZIVANJEM SLOBODNOG RADIKALA DPPH METODOM	25
2.5 ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM.....	27
3. REZULTATI	29
3.1 REZULTATI ODREĐIVANJA INHIBICIJSKE SPOSOBNOSTI NA ENZIM AChE.....	29

3.2	REZULTATI ODREĐIVANJA INHIBICIJSKE SPOSOBNOSTI NA ENZIM BChE	30
3.3	REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI ..	31
3.3.1	Rezultati antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	31
3.3.2	Rezultati antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom	32
3.4	REZULTATI GC-MS ANALIZE.....	33
3.4.1	Eterično ulje celera	33
3.4.2	Eterično ulje đumbira.....	37
4.	RASPRAVA	41
5.	ZAKLJUČAK.....	43
6.	LITERATURA	44

UVOD

Enzimi ili biokatalizatori su složene proteinske molekule koje svojom aktivnošću omogućavaju izvedbu kemijskih reakcija u biološkom sustavu koje bez enzima ne bi bile izvedive ili bi se odvijale previše sporo pri normalnim tjelesnim uvjetima. Djeluju po principu "ključ – brava", a razlikujemo 6 glavnih razreda.

U skupinu kolinesteraza pripadaju acetilkolinesteraza (AChE) i butirilkolinesteraza (BChE). AChE predstavlja jedan od najučinkovitijih enzima u prirodi te je njezina najvažnija funkcija kontrola prijenosa živčanih impulsa putem kolinergičkih sinapsa centralnog i perifernog živčanog sustava uslijed hidrolize živčanog prijenosnika acetilkolina (ACh) pri čemu nastaju molekule acetil i kolin. Za razliku od AChE, BChE nema esencijalnu ulogu u organizmu, ali ponekad može zamijeniti AChE jer ima mogućnost razgradnje i acetilkolina i butirilkolina.

Alzheimerova bolest je jedna od najčešćih uzroka demencije u današnje doba, lijek nije poznat, ali kako bi se ublažili simptomi koriste se: prekursori ACh, inhibitori AChE i kolinergički agonisti. Pri čemu su inhibitori AChE najviše korišteni zbog najboljeg djelovanja.

Celer je dvogodišnja biljka iz porodici Apiaceae. Razlikujemo celer korjenaš, rebraš i listaš. Nutritivno je izuzetno bogata namirnica, a zbog svojih ljekovitih svojstava upotrebljava se u narodnoj medicini.

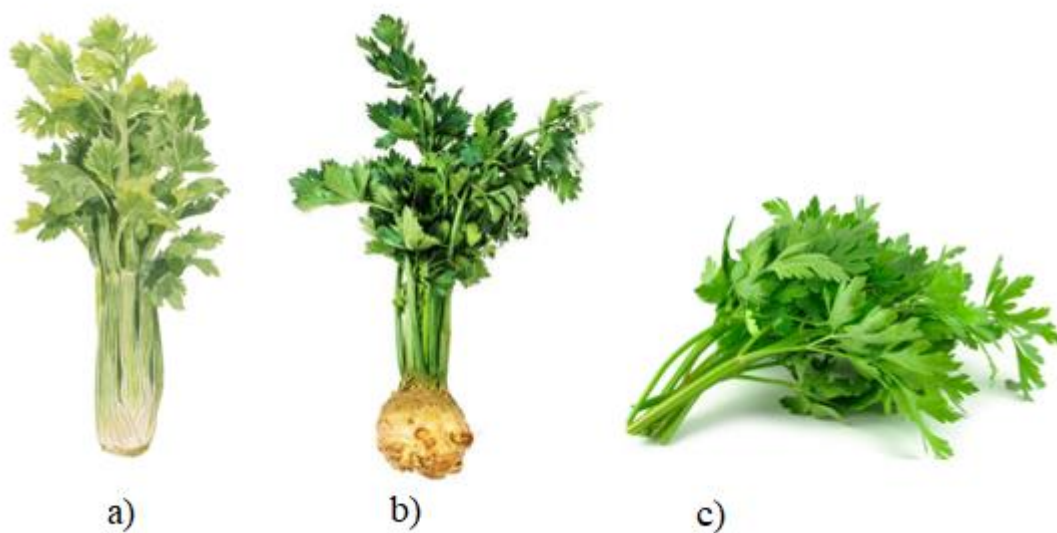
Đumbir je korijen iz porodice Zingiberaceae, a uzgaja se diljem Južne i Jugoistočne Azije, Afrike, Latinske Amerike i Australije. Koristi se kao začín, ali i kao lijek u narodnoj medicini zbog brojnih ljekovitih svojstava. U eteričnom ulje đumbira najzastupljeniji su seskviterpenoidi, od kojih je zingiberen najzastupljeniji.

Za kvantitativno i kvalitativno određivanje sastojaka eteričnih ulja najčešće se koristi plinska kromatografija sa spektrometrijom masa, te kako bi se utvrdila njihova inhibicijska sposobnost na enzima koristi se Ellmanova metoda. S obzirom da se celer i đumbir navode kao potencijalni antioksidansi ispitana je njihova antioksidacijska aktivnost DPPH metodom i FRAP metodom.

1. OPĆI DIO

1.1 CELER (*Apium graveolens* L.)

Celer je dvogodišnja kultivirana aromatična biljka koja pripada porodici Apiaceae.^[1] Danas se diljem svijeta koristi u prehrani ljudi te zbog svojih ljekovitih svojstava ima svoje mjesto u narodnoj medicini. Kultivirana je u Europi, tj. pretežno u Italiji i Francuskoj nakon čega se proširila diljem svijeta.^[2] Razlikujemo celer korjenaš (*A. graveolens* var. *rapaceum*), celer rebraš (*A. graveolens* var. *dulce*) i celer listaš (*A. graveolens* var. *secalinum*).^[3]



Slika 1. a) celer rebraš, b) celer korjenaš, c) celer listaš^[4,5,6]

Njegovo ime *Apium* potječe od latinske riječi "*apis*" što znači "*pčela*", zbog malih bijelih cvjetova koji dosta privlače pčele, dok ime "*graveolens*" na latinskom ima značenje "*težak miris*". Ime "*celer*", također latinskog podrijetla ima značenje "*brz*", jer se smatra brzo djelujućim lijekom.^[7] Zbog svojih ljekovitih svojstava koristi se u narodnoj medicini.^[2]

1.1.1 Morfološki opis biljke

Morfološki se biljka celera sastoji se od korijena, stabljike, lista i ploda (sjemenki).^[2] Korijen je okruglog ili ovalnog oblika, može biti žiličast ili zadebljao. Kora korijena je smeđe boje i dosta gruba dok mu je unutrašnjost bijele boje. Na glavi korijena formirana je lisna rozeta koja se formira u prvoj godini uzgoja biljke te se ona sastoji od izdužene peteljke i krupnih plojki. U drugoj godini biljka celera razvija razgranatu cvjetnu stabljiku visoku do 1 metar i plod koji ujedno predstavlja sjeme. Na vrhovima cvjetne stabljike nalaze se bijeli štitasti cvjetovi. Plod tj. sjeme je smeđe boje, ovalnog oblika, dužine 1,2-2 mm i širine 0,6 mm te je to ujedno i najmanje sjeme u povrtnim kulturama.^[7,8]

1.1.2 Kemijski i fitokemijski sastav sjemenki celera

Celer zbog svog visokog sadržaja masti ima dosta visoku kalorijsku vrijednost, a smatra se jako dobrim izvorom vitamina C (udio 15,87-18,28%), mineralima poput kalcija, kalija, magnezija.^[7,9,10] Ulje celera sadrži isparljiva ulja, proteine, sirova vlakna, škrob, pepeo, vlagu, biljna ulja te ugljikohidrate. Isparljiva ulja sjemenki celera su najznačajnija za mirisne i okusne arome, a spojevi koji doprinose tome su sedanenolid (3-*n*-butil-4, 5-dihidroftalid), sedanolid i 3-*n*-butilftalid. U biljnom ulju celera prisutne su masne kiseline poput oleinske, palmitinske, linolne, linolenske i stearinske kiseline. Eterično ulje sastoji se od seskviterpena, limonena i karakterističnih aroma, a bogato je folnom kiselinom, β -karotenom, natrijem, kalijem, vlaknima i klorofilima.^[7] Najveća koncentracija ulja je prisutna u sjemenkama starosti 5 tjedana.^[2]

Fitokemijski spojevi koje se mogu pronaći u ekstraktu biljke su glikozidi, steroidi, ugljikohidrati i flavonoidi. Glavne komponente pronađene u sjemenkama celera su selinen (10-15%), furokumarin, furokumarin flavonoidi, glikozidi i limonen.^[9]

1.1.3 Upotreba celera i njegova farmakološka aktivnost

Celer je biljka s jako raširenim spektrom djelovanja te mu se pripisuje antitumorsko, antimikrobno, protuupalno, antioksidativno djelovanje. Uz nabrojana pozitivna djelovanja, celer pomaže u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja te kod snižavanja krvnog šećera i serumskih lipida.^[2] U narodnoj medicini celer se primjenjuje kod želučanih problema, koristi se kao laksativ, diuretik i sedativ, za smanjenje krvnog tlaka i kod problema sa zglobovima.^[1] Ujedno se sjemenke celera koriste kod liječenja artritisa, bubrežnih oboljenja, a mogu se koristiti i za poboljšanje sna i opuštanje.^[2,7]

Protuupalne komponente prisutne u ulju celera su apigenin, kafeinska kiselina, kumarin, ferulična kiselina, luteolin, timol, ksantotoksin, α -pinen, askorbinska kiselina, eugenol, linonenska kiselina, magnezij, miristinska kiselina i mnogi drugi. Njegovo protuupalno djelovanje se najčešće koristi kod artritisa i za održavanje zdravih zglobova, tj. za smanjenje oticanja i boli u zglobovima.^[7]

Antitumorsko djelovanje u ulju celera dolazi od komponenti ftalida koje dokazano imaju blagotvorno djelovanje na razinu kolesterola, visoki krvni tlak i na tumor. Sedanolid je najaktivniji spoj ftalida te je upravo on zaslužan za smanjenje tumorskih stanica. Uz sedanolid, 3-*n*-butilftalid predstavlja najaktivnije komponente koje su prisutne u ulju sjemenki celera pri čemu je njihova glavna uloga u poticanju detoksikacije enzima glutation-S-transferaze u ciljanom tumorskom tkivu. Kumarin u celeru omogućava smanjenje mutacije u stanicama zbog uklanjanja slobodnih radikala u štetnim stanicama pri čemu se smanjuje mogućnost modificiranja zdrave stanice u tumorsku stanicu.^[7]

Za antioksidativno djelovanje zaslužne su fenolne komponente koje su u znatno većem udjelu prisutne u metanolnom ekstraktu celera u odnosu na etanolnom ekstraktu. Povećanjem koncentracije biljnog ekstrakta povećava se i redukcijska sposobnost. Pa je tako svako antioksidativno djelovanje bioaktivnih sastojaka povezano s mogućnošću davanja elektrona slobodnim radikalima.^[7]

1.2 ĐUMBIR (*Zingiber officinale* Roscoe)

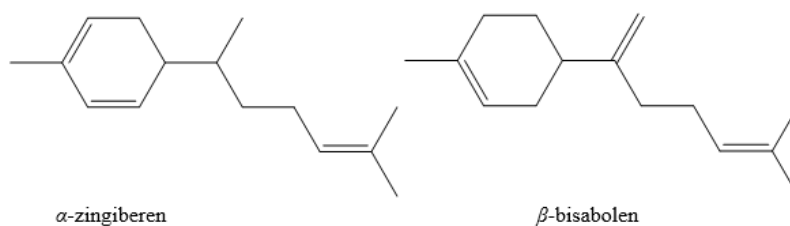
Đumbir predstavlja korijen iz porodice Zingiberaceae. U prirodi ne raste samostalno zbog čega mu je pravo podrijetlo nepoznato, ali se pretpostavlja da su to Indija i Kina.^[11] Kao kultura se uzgaja diljem Južne i Jugoistočne Azije, Afrike, Latinske Amerike i Australije. Stoljećima se koristi kao začin, ali i kao lijek u narodnoj medicini što potvrđuju stari zapisi Iranske tradicionalne medicine.^[12,13,14] Njegovo ime potječe iz jezika Sanskrt, a riječ koju su koristili je "*srngaveram*" čije je doslovno značenje "*korijen rog*" zbog svog izgleda.^[11,15] Stoljećima se koristio u svrhu novca, a u Rimskom carstvu koristili su ga u medicinske svrhe. Tijekom Srednjeg vijeka kraljica Elizabeta I ga je uvozila i koristila kao slatkiš pa je tako nastao božićni kolač od đumbira.^[11,15]



Slika 2. Đumbir (podanak, stapka i cvijet)^[16]

1.2.1 Bioaktivne komponente đumbira

Najmanje 115 različitih spojeva je pronađeno u svježem i osušenom đumbiru. Najzapaženiji i najznačajniji je skupina gingerola u svježem đumbiru, ali sušenjem gingeroli prelaze u šogaole pa je tako njihova koncentracija puno veća u suhom đumbiru.^[11] Uz ove skupine zastupljeni su i zingeroni, a sve ove skupine su zaslužne za karakterističan miris i okus đumbira. Eterično ulje đumbira se može dobiti u udjelu od 3% te su u njemu najzastupljeniji sastojci seskviterpenoidi, a zingiberen kao glavni sastojak istoga. Ostale prisutne komponente su β -bisabolen, α -farnesen, cineol, zingiberenol, limonen i drugi.^[17]



Slika 3. Kemijska struktura spojeva zingiberena i bisabolena^[17]

1.2.2 Upotreba i djelovanje đumbira

Podanak, odnosno horizontalna stabljika iz koje rastu korijenja je glavni dio đumbira za konzumaciju. Može se koristiti svjež ili prerađen. Ovisno o upotrebi različito je vrijeme berbe đumbira jer njegovim starenjem koncentracija eteričnih ulja, koja su zaslužna za istančan miris i okus, raste. Pa se tako đumbir kojem je primarna uloga za dobivanje eteričnog ulja bere najprije s 9 mjeseci starosti podanka, ali bolje je ukoliko se taj period što više produži. Podanak đumbira koji je 9 mjeseci star ima čvrstu koru koja se prije konzumacije mora ukloniti, a najviše će se koristiti za izradu začina. Đumbir koji je star manje od 5 mjeseci ima vrlo tanku koru te je vrlo blagog okusa pa je kao takav pogodan za konzumaciju u svježem stanju.^[11] Osim u jelima đumbir se koristi i u narodnoj medicini pa se tako svježi đumbir može prokuhati u svrhu dobivanja obloga za kronične bolove uzrokovane artritisom.^[13] Osim ublažavanja bolova, đumbir se koristi kod ublažavanja mučnina i vrtoglavica te kao diuretik.^[15] Pripisuje mu se antimikrobno djelovanje, antitumorsko djelovanje, protuupalno djelovanje, antioksidativno djelovanje te djeluje kao analgetik.^[17]

Đumbir je jak antioksidans te je u korijenu đumbira uočena koncentracija od 3,85 mmol/100g ukupnih antioksidansa, a toliko ili višu koncentraciju imaju samo šipak i neke vrste bobičastog voća. Zbog velike razine antioksidansa smanjuje markere oksidativnog stresa koji su povezani s dobi, pa je u istraživanju na štakorima koji su bili tretirani etanolom štitio od hepatoksičnosti etanola suzbijanjem oksidativnih posljedica.^[11]

Antitumorsko djelovanje ispitivano je na pročišćenim ekstraktima seskviterpenskih spojeva, ponajviše na 6-gingerolu, 6-šogaolu i zerumbonu. Ispitivanja su se provodila na različitim vrstama tumora, kao što su rak dojke, tumor kože, rak mjehura i jetre. Pretpostavlja se da đumbir antitumorsko djelovanje ima preko antioksidativne aktivnosti i sposobnosti induciranja apoptoze, a smanjenja proliferacije što dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa.^[11]

1.3 ETERIČNA ULJA I NJIHOVO DOBIVANJE

Eterična ulja su složene mješavine lipofilnih organskih spojeva male molekulske mase. Većinom su u tekućem stanju, vrlo slabo su topljiva u vodi te ih karakterizira izrazito jak miris lako hlapljivih sastavnica. Sastavnice eteričnih ulja su primarno mono- i seskviterpeni te fenilpropanoidni spojevi, od kojih su najzastupljeniji upravo terpeni.^[18]

Prema Međunarodnoj organizaciji za standarde (engl. *International Standards Organization*, ISO) eterična ulja su ulja dobivena isključivo putem destilacije biljnog materijala vodom ili vodenom parom, odnosno kod citrusa suhom destilacijom epikarpa voćke ili pomoću mehaničkih postupaka. Prema ovom standardu eterična ulja mogu proći dodatne obrade (npr. aeracija ili dodatna destilacija) ukoliko ne dolazi do značajne promjene u njihovom sastavu.^[19]

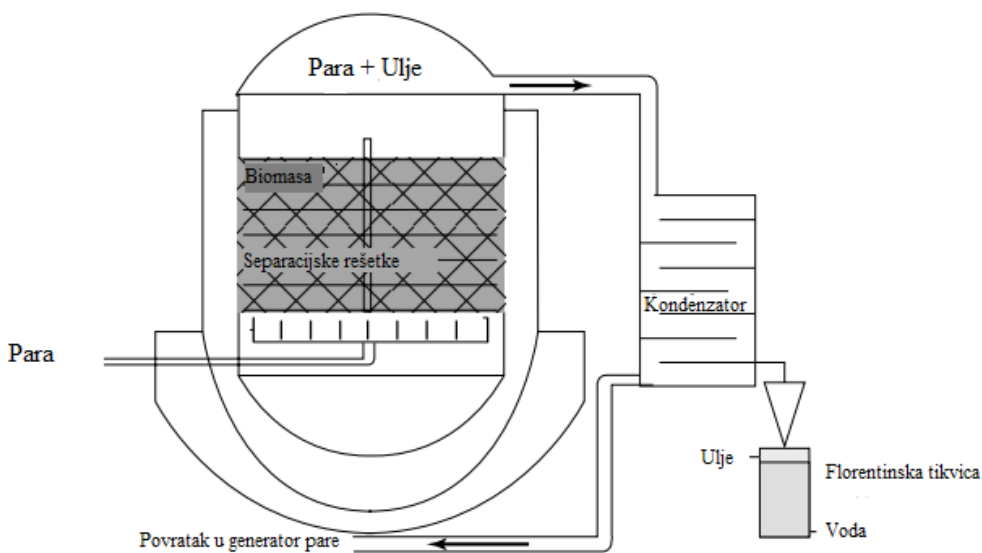
Povijest eteričnih ulja je izuzetno duga te datira i do 3000. godina prije nove ere, a prvi poznati zapisi potječu iz Mezopotamije. Znanstvenici pretpostavljaju da stare civilizacije destilaciju nisu koristile za dobivanje čistih eteričnih ulja kakve mi danas poznajemo, već su ona zapravo bila ekstrakti destilirane vodice dobivene s takvim postupkom, a mirisom su podsjećala na miris biljke od koje je dobivena. Oprema za destilaciju napredovala je stoljećima, ali tek se od sredine 18. stoljeća odnosno 19. stoljeća može početi govoriti o pravoj hidrodestilaciji koja je kao rezultat imala ulja puno bolje kvalitete.^[19]

Eterična ulja se pronalaze u gotovo svim dijelovima biljke pa ih tako ima u cvijeću, lišću, stabljikama, kori drveta, sjemenu (npr. celer) ili u podanku (npr. đumbir). Zašto ona postoje ne može se sa potpunom sigurnošću tvrditi, ali poznata je činjenica da kod biljaka djeluju protumikrobno te kao repelenti neželjenih insekata. Neka eterična ulja mogu služiti i za privlačenje kukaca zbog oprašivanja same biljke.^[19,20] Sama količina eteričnog ulja prisutna u biljci ovisi o mnogim faktorima pa je tako potrebno voditi računa o vrsti tla na kojem se biljka uzgaja, klimi i vremenskim prilikama, periodu branja i načinu branja biljke, njezinom skladištenju i pripremi biomase koja ide u proces destilacije.^[20]

1.3.1 Vodeno-parna destilacija

Vodeno-parna destilacija predstavlja najčešće korištenu metodu za ekstrakciju eteričnih ulja. Sam izraz dolazi od latinske riječi "*distillare*" što u prijevodu ima značenje "*kapati prema dolje*". U postupku destilacije s vodenom parom eterična ulja se iz stanica ulja oslobađaju pucanjem stijenki stanica zbog povećanog tlaka koji dovodi do ekspanzije stanica. Para dalje djeluje kao nositelj molekula eteričnog ulja.^[19]

Postupak destilacije se odvija na način da se vodena para generira u odvojenom kotlu te se takva para dovodi u kotao u kojem se na perforiranim mrežicama nalazi biljni materijal. Kao što je prije objašnjeno dolazi do pucanja stanica u kojima se nalazi eterično ulje, para skuplja to eterično ulje i zajedno odlaze u kondenzator pri čemu dolazi do kondenzacije i naknadnog odvajanja ulja od vode, voda ponovno odlazi u generator pare i koristi se dalje za destilaciju (Slika 4). U ovakvom procesu vrlo je važno smanjiti gubitak tvari u destiliranoj vodi, posebno se odnosi na fenole koji su u određenoj mjeri topivi.^[20]



Slika 4. Prikaz aparature za vodeno-parnu destilaciju^[19]

Prednosti ovakvog postupka su:

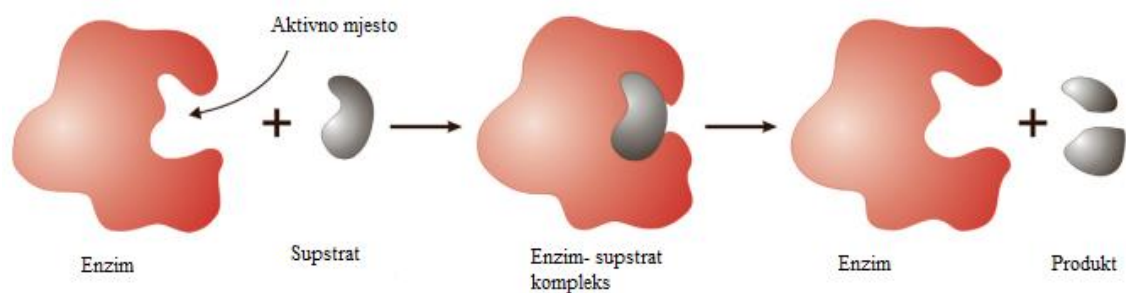
- Puno veći prinos eteričnog ulja u odnosu na vodenu destilaciju
- Postupak je puno brži i učinkovitiji
- Komponente eteričnog ulja nisu toliko osjetljive na polimerizaciju i hidrolizu
- Kvaliteta ulja je puno veća.^[20]

Nedostaci vodeno-parne destilacije:

- Tlak pare je dosta nizak pa ulja koja imaju znatno višu točku ključanja zahtijevaju i veću količinu pare
- Ovakvim se postupkom biljni materijal vlaži te se na taj način usporava destilacija jer para mora ispariti i kondenziranu vodu na biljnom materijalu.^[20]

1.4 ENZIMI

Enzimi su složene proteinske molekule koje se vrlo često nazivaju i biokatalizatorima. Izolirani su iz živih stanica te su pokazale aktivnost i u *in vitro* uvjetima. Vrlo su specifični za pojedine kemijske reakcije i supstrate s kojima reagiraju. Također ih uz visoku specifičnost odlikuje i velika katalitička moć.^[21,22] Postoji jako velik broj poznatih enzima, a prema Međunarodnom savezu biokemije razvijen je sustav nomenklature enzima. Prema takvoj nomenklaturi svaki enzim ima svoje ime i kodni broj koji se dobiva ovisno o vrsti katalitičke reakcije. Enzimi se mogu podijeliti u 6 glavnih razreda: transferaze, oksidoreduktaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze.^[22,23]



Slika 5. Međudjelovanje enzima i supstrata^[22]

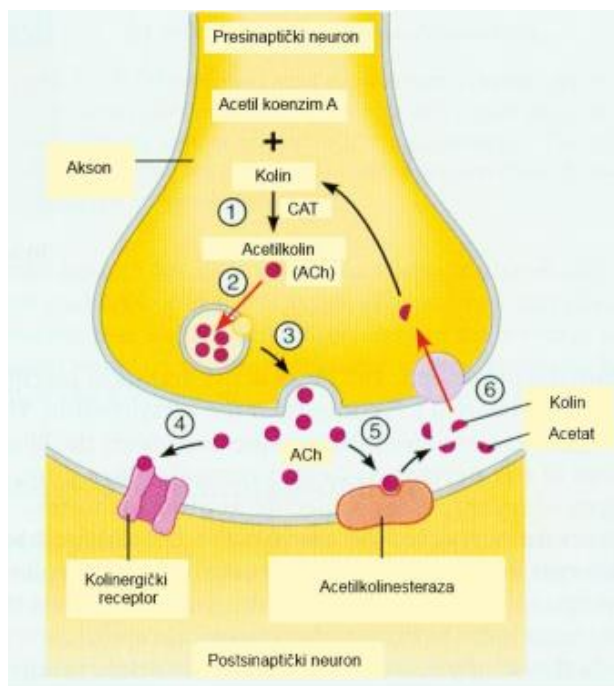
Pojedini enzim predstavlja katalizator jedne vrste reakcije te on djeluje na supstrat koji se veže na aktivno mjesto enzima po principu ključ-brava pri čemu se stvara enzim supstrat kompleks iz kojeg nastaje produkt i enzim. Na samu aktivnost enzima, tj. brzinu njegovog djelovanja mogu utjecati inhibitori i aktivatori koji, ukoliko se dodaju, će usporiti ili ubrzati reakciju.^[22,24]

1.4.1 KOLINESTERAZE

Kolinesteraze su hidrolaze karboksilnih estera koje cijepaju estere kolina. Najpoznatiji među njima su acetilkolinesteraza (engl. *acetylcholinesterase*, AChE) i butirilkolinesteraza (engl. *butyrylcholinesterase*, BChE).^[25] Rasprostranjene su u biljnom i životinjskom svijetu te imaju vrlo bitnu biološku ulogu. Pripadaju skupini hidrolaza, podskupini esteraza te potpodskupini hidrolaza estera karboksilnih kiselina.^[26]

1.4.1.1 Acetilkolinesteraza (AChE)

AChE ima vrlo važnu fiziološku ulogu u organizmu te predstavlja jedan od najučinkovitijih enzima u prirodi. U ljudskom organizmu nalazi se u vrlo visokim koncentracijama u mozgu, mišićima te je vezana za membrane eritrocita, ali prava uloga u eritrocitima još nije potpuno poznata. Njezina primarna funkcija je kontrola prijenosa živčanih impulsa putem kolinergičkih sinapsi centralnog i perifernog živčanog sustava uslijed hidrolize živčanog prijenosnika acetilkolina (ACh). Brzina hidrolize ACh je vrlo velika, te u ljudskom organizmu iznosi $400\,000\text{ min}^{-1}$, pri čemu je brzina hidrolize ograničena brzinom difuzije ACh u aktivno mjesto AChE. ACh se iz sinaptičkog mjehurića ispušta u sinaptičku pukotinu uslijed živčanog podražaja te se veže za kolinergičke receptore koji pokreću niz procesa koji kao rezultat imaju depolarizaciju membrane. AChE dovodi do brze razgradnje ACh u sinaptičkoj pukotini uslijed čega dolazi do prestanka prijenosa impulsa i ponovnog uspostavljanja polarizacije postsinaptičke membrane.^[26]

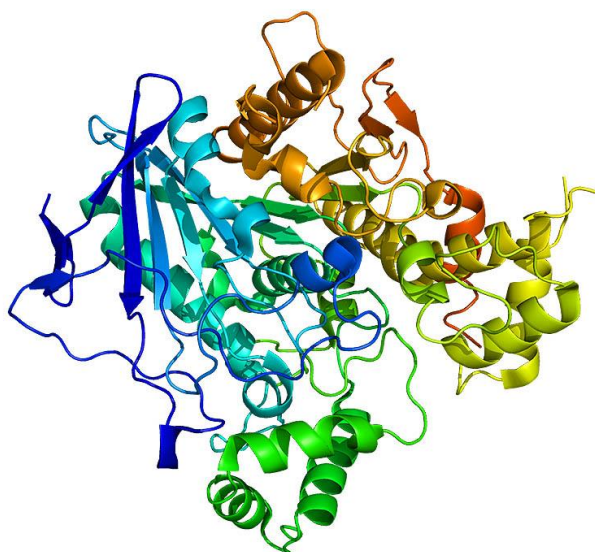


Slika 6. Prikaz sinteze i hidrolize neurotransmitera acetilkolina^[26]

AChE u organizmu nema ograničenu ulogu samo na njenu hidrolitičku funkciju, također je potvrđena njezina uloga u neuritogenezi, adheziji, tj. interakciji između stanica, aktivaciji dopaminskih neurona, stvaranju amiloidnih vlakana koji su karakteristični za Alzheimerovu bolest. Također su se povezuje s bolestima mrežnice te se smatra da ima ulogu u razvoju fotoreceptora.^[26]

1.4.1.2 Butirilkolinesteraza (BChE)

BChE pronalazimo u centralnom i perifernom živčanom sustavu, jetri, crijevima, srcu, gušterači, bubrezima, plućima i plazmi. U organizmu uloga BChE nije toliko esencijalna poput AChE, ali svejedno ima biološku važnost. U neurotransmisiji nema toliko izraženu ulogu, ali u određenim situacijama može zamijeniti AChE u hidrolizi ACh. Poznata je uloga u metabolizmu lipida i lipoproteina, regulaciji razine ACh u glatkim mišićima te diferencijaciji živčanog tkiva. Poznato je 65 različitih vrsta BChE u ljudskom organizmu koje nemaju jednaku enzimsku aktivnost.^[26]



Slika 7. Trodimenzionalna struktura BChE^[27]

1.4.1.3 Inhibicija kolinesteraza

Aktivnost enzima se može inhibirati vezivanjem malih iona ili molekula. Pri čemu nam sama inhibicija može pružiti uvid u mehanizam djelovanja enzima. Prema dosadašnjim saznanjima inhibicija AChE dovodi do nakupljanja ACh što će dovesti do poremećaja u prijenosu živčanog impulsa koji se u konačnici manifestira kolinergičkom krizom. Ovakva kriza dovodi do pojave mučnina, paralize dišnog sustava, a u konačnici može nastupiti i smrt. Prema navedenom inhibicija AChE je vrlo opasna, dok prema dosadašnjim saznanjima inhibicija BChE ne utječe na vitalne funkcije organizma. Inhibicija se može podijeliti na reverzibilnu i ireverzibilnu.^[28,29]

U ireverzibilne inhibitorne se ubrajaju karbamati i organofosforni spojevi. Oni djeluju na način da se kovalentno vežu na serin katalitičke trijade te je prvi poznati inhibitor karbamat fizostigmin. Primjenjuje se u liječenju Alzheimerove bolesti i kod glaukoma. Ireverzibilni inhibitori osim u svrhu liječenja bolesti mogu se koristiti i kao neurotoksični bojni otrovi, a to su organofosforni spojevi npr. tabun, soman. U medicinske svrhe može se koristiti inhibitor AChE zbog nedostatka ACh.^[30]

Reverzibilni inhibitori uglavnom su prirodnog podrijetla te se dobivaju izolacijom iz pojedinih biljaka. Najznačajniji su alkaloidi i flavonoidi (galangin), a uz njih provode se istraživanja na kumarinu, terpenima i njihovim derivatima.^[30]

1.5 ALZHEIMEROVA BOLEST

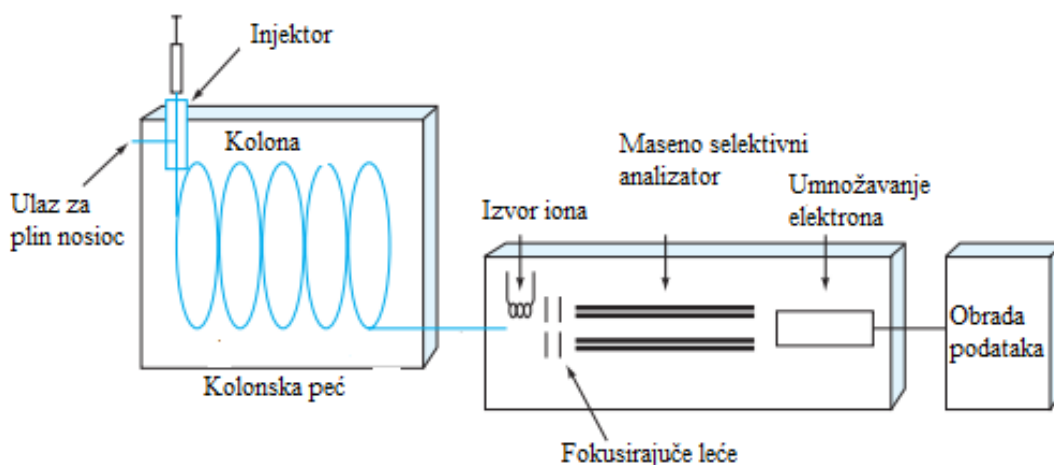
Alzheimerova bolest (engl. *Alzheimer's disease, AD*) je najčešći uzrok demencije u današnje doba te prema dosadašnjim saznanjima lijek nije poznat. Očituje se progresivnim propadanjem kognitivnih funkcija te pojavom senilnih plakova, depozita β -amiloida i stvaranjem neurofibrilarnih petlji u subkortikalnoj sivoj tvari i u kori mozga, ove pojave su karakteristične za sve oboljele. U postotku većina oboljelih su upravo žene pri čemu udio oboljelih između 65 i 74 godina je 4%, a taj udio rapidno raste za one preko 85 godina i iznosi 30%. Bolest može biti sporadična ili nasljedna. Kod osoba kojima je dijagnosticiran AD prije 65. godine života smatra se da je bolest nasljedna te se zbog toga ovaj oblik naziva i rani oblik AD. Sporadični oblik AD nastupa nakon 65 godine života te je najčešći oblik AD.^[31,32]

1.5.1 Liječenje Alzheimerove bolesti

U prošlosti su se za liječenje Alzheimerove bolesti upotrebljavali psihostimulansi, ergoloidi i nootropici, ali prema novijim istraživanjima kognitivni simptomi AD su posljedica nedostatka kolinergičke neurotransmisije. Kako bi se povećala količina kolinergičkih neuroprijenosnika koriste se: prekursori ACh, inhibitori AChE i kolinergički agonisti (muskarinski i nikotinski). Prekursori ACh se nisu dokazali kao učinkoviti te je takav način liječenja napušten, ali inhibitori AChE se i danas koriste. Neki od inhibitora su: takrin, donepezil, rivastigmin, galantamin. Iako svi navedeni lijekovi imaju određene nuspojave takrin se prestao koristiti zbog ozbiljnih nuspojava tijekom primjene. Kao najčešće nuspojave koje se pojavljuju kod donepezila, rivastigmina i galantamina su vrtoglavica, umor te glavobolja.^[32, 33]

1.6 PLINSKA KROMATOGRAFIJA / SPEKTROMETRIJA MASA

Plinska kromatografija je tehnika koja služi za separaciju smjese na njene sastavnice. U sprezi s različitim detektorima moguće je i kvalitativno i kvantitativno određivanje sastojaka pojedine smjese. S obzirom da su eterična ulja uglavnom hlapljive smjese za njihovu analizu koristi se plinska kromatografija u sprezi sa spektrometrom masa.^[34,35,36]



Slika 8. Shematski prikaz plinskog kromatografa u sprezi sa spektrometrom masa^[37]

Uzorak se u plinski kromatograf uvodi pomoću mikrolitarske štrcaljke putem injektora koji je zagrijan, pri čemu je potrebno voditi računa da je temperatura barem 50 °C viša od temperature vrelišta najmanje hlapljivih sastojaka u ispitivanom uzorku. Samo odvajanje sastojaka se događa na kapilarnoj koloni koja predstavlja nepokretnu fazu, dok je pokretna faza plin nosilac koji mora biti inertan, to su najčešće helij, dušik, argon i vodik. Brzina razdvajanja sastojaka ovisi o ravnoteži između nepokretne i pokretne faze te vremenu zadržavanja sastojaka u nepokretnoj fazi, odnosno njegovoj brzini eluiranja. Nakon prolaska kroz kolonu eluirani spojevi ulaze u spektrometar masa.

Spektrometrija masa je analitička tehnika koja omogućava karakterizaciju pojedinih tvari u uzorku te pomoću nje možemo saznati točnu atomsku ili molekularnu masu sastojaka prisutnih u smjesi. Plinska kromatografija sama za sebe nema mogućnost identifikacije pojedinih komponenti u smjesi te se zbog toga ista kombinira

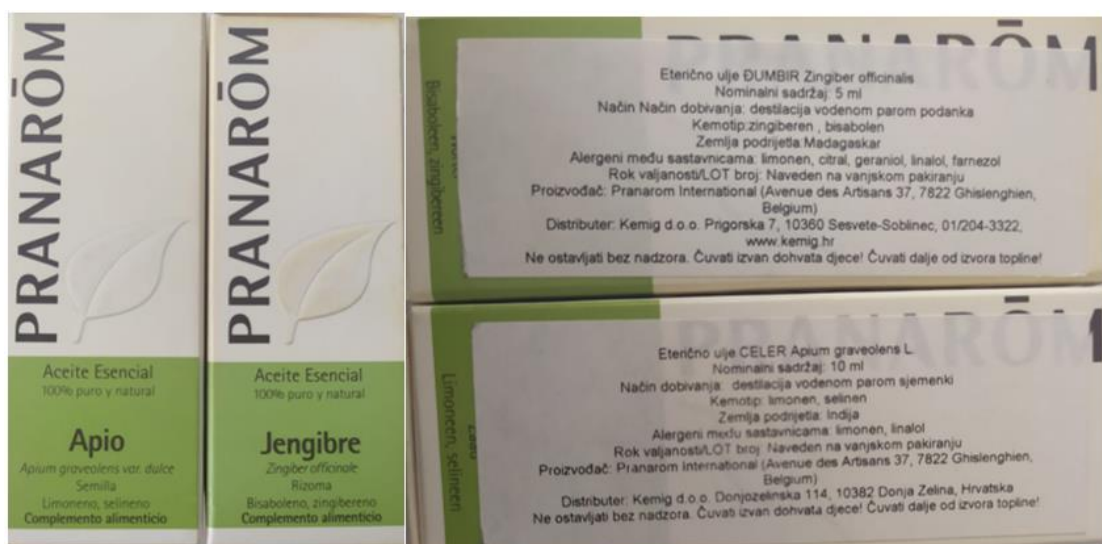
sa spektrometrijom masa kako bi se omogućila identifikacija nepoznatih komponenata te njihov udio.^[38,39]

Spektrometar masa se nalazi pod vakuumom, zagrijani spojevi iz plinskog kromatografa ulaze u isti te prolaze tri glavna dijela: ionizaciju, selektivni analizator masa i detektor iona. Procesom ionizacije dolazi do ionizacije spojeva bilo elektronskom ionizacijom ili kemijskom ionizacijom. Ionizirani ioni dalje dolaze do elektroničkih leća koje omogućavaju ubrzavanje i usmjeravanje u svrhu povećanja kinetičke energije iona. Tako ubrzani ioni dolaze na selektivni analizator masa koji ione razlikuje prema njihovom omjeru mase i naboja. Ioni potom dolaze na detektor koji mjeri omjer mase i naboja te prikazuje rezultate u obliku spektra masa.^[37,39]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1 KORIŠTENA ULJA

U ovom radu korištena su eteričnih ulja đumbira i celera proizvođača Panarom, dobivena postupkom vodeno parne destilacije sjemenki celera i podanka đumbira. Kao zemlja podrijetla za đumbir se navodi Madagaskar dok je za celer Indija. Prema deklaraciji najzastupljeniji spojevi u eteričnom ulju đumbira navedeni su zingiberen te bisabolen, dok su kod celera najzastupljeniji spojevi limonen i selenen.



Slika 9. Eterična ulja celera i đumbira (Panarom)

Za analizu korištene su otopine ulja u 96% etanolu različitih masenih koncentracija. Prvotne otopine koncentracija đumbira i celera (5 i 2,5 mg/L, redom) nisu korištene u daljnjem radu zbog nepotpunog otapanja ulja i vidnog zamućenja. Pripravljene su nove otopine početnih koncentracija prikazanih u tablici 2.1. Dok su konačne koncentracije korištene u pojedinim metodama prikazane u tablici 2.2.

Tablica 2.1. Početne koncentracije otopina ulja đumbira i celera

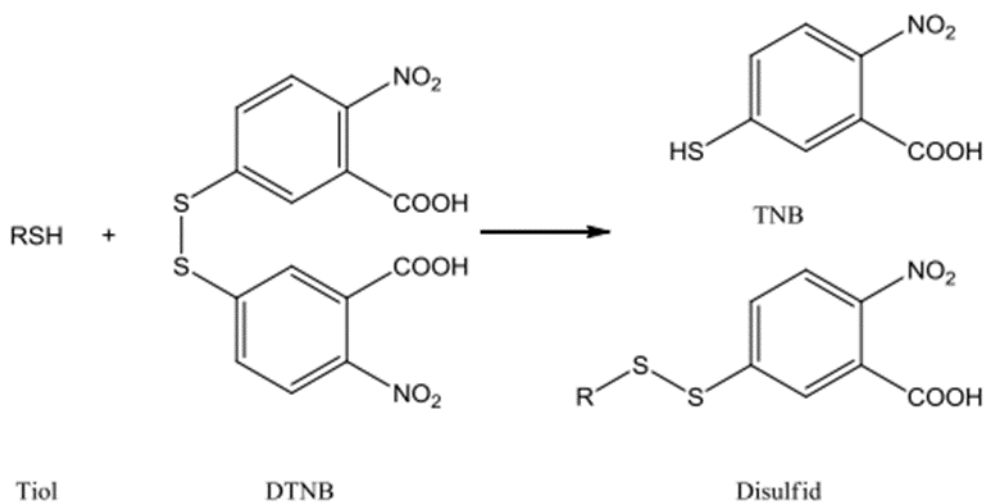
Početne koncentracije (mg/mL)	Đumbir	Celer
	2,500	1,250
	1,250	0,938
	0,625	0,625
	0,313	/

Tablica 2.2 Konačne koncentracije otopina ulja celera i đumbira u korištenim metodama

Konačne koncentracije (µg/mL)	Inhibicija enzima AChE /BChE	DPPH	FRAP
Đumbir	/	87	83,0
	/	43	42,0
	28	22	21,0
	14	11	10,0
Celer	57	43	42,0
	43	32	31,0
	28	22	21,0

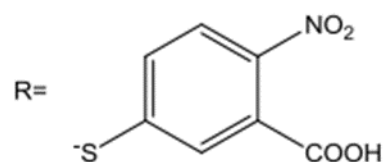
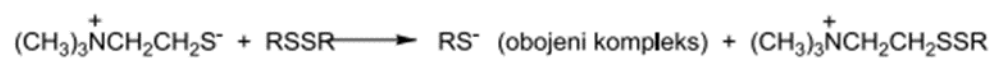
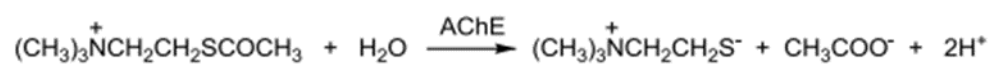
2.2 ISPITIVANJE SPOSOBNOSTI INHIBICIJE ENZIMA AChE i BChE METODOM PO ELLMANU

Metoda po Ellmanu predstavlja jednostavnu spektrofotometrijsku metodu, primjenjivu na vrlo malim koncentracijama enzima zbog svoje izuzetne osjetljivosti. Koristi se za ispitivanje aktivnosti AChE i BChE. Metoda se temelji na brzini stvaranja tiokolina uslijed hidrolize acetiltiokolina. Da bi došlo do toga potrebna je kontinuirana reakcija između tiola i Ellmanovog reagensa DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva) kiselina) pri čemu je produkt ove reakcije 2-nitro-5-tiobenzojeva kiselina (TNB). TNB u vodi u alkalijskom i neutralnom pH ionizira u TNB^- anion te daje intenzivno žuto obojenje. Valna duljina pri kojoj se očitava apsorpcijski maksimum TNB^- iznosi 412 nm, a sama reakcija se odvija vrlo brzo pri čemu ne dolazi do ograničenja mjerenja i u korištenim koncentracijama neće dovesti do inhibicije hidrolize enzima.^[40]



Slika 10. Mehanizam reakcije Ellmanovog reagensa i tiolne skupine^[40]

Reakcije na slici 11. prikazuju postupak nastanka obojenog aniona iz acetiltiokolina.



Slika 11. Kemijske reakcije dobivanja obojenog kompleksa iz acetiltiokolina^[40]

2.2.1 Određivanje inhibicijske sposobnosti na enzim AChE

Određivanje inhibicijske sposobnosti eteričnih ulja na enzim AChE provedeno je metodom po Ellmanu. Kod ove metode kao tiolni reagens upotrebljen je DTNB, enzim AChE izoliran je iz elektrofora električne jegulje (Tip V-S) te je kao supstrat enzima korišten acetiltiokolin jodid (ATChI).

U tablici 2.3 je prikazana priprema kemikalija za rad.

Tablica 2.3. Priprema kemikalija

Kemikalije	Osnovna otopina	Volumen (μL)	Konačna koncentracija
Pufer		190	0,1 mmol/L
DTNB	14,0 mg u 5,352 mL pufera (pH 7)	10	0,3 mmol/L
ATChI	19,4 mg u 6,101 mL pufera (pH 8)	10	0,5 mmol/L
AChE	10 μL u 5 mL pufera (pH 8)	10	0,03 U/mL
Uzorak/EtOH		10	Različite konc./ 96%

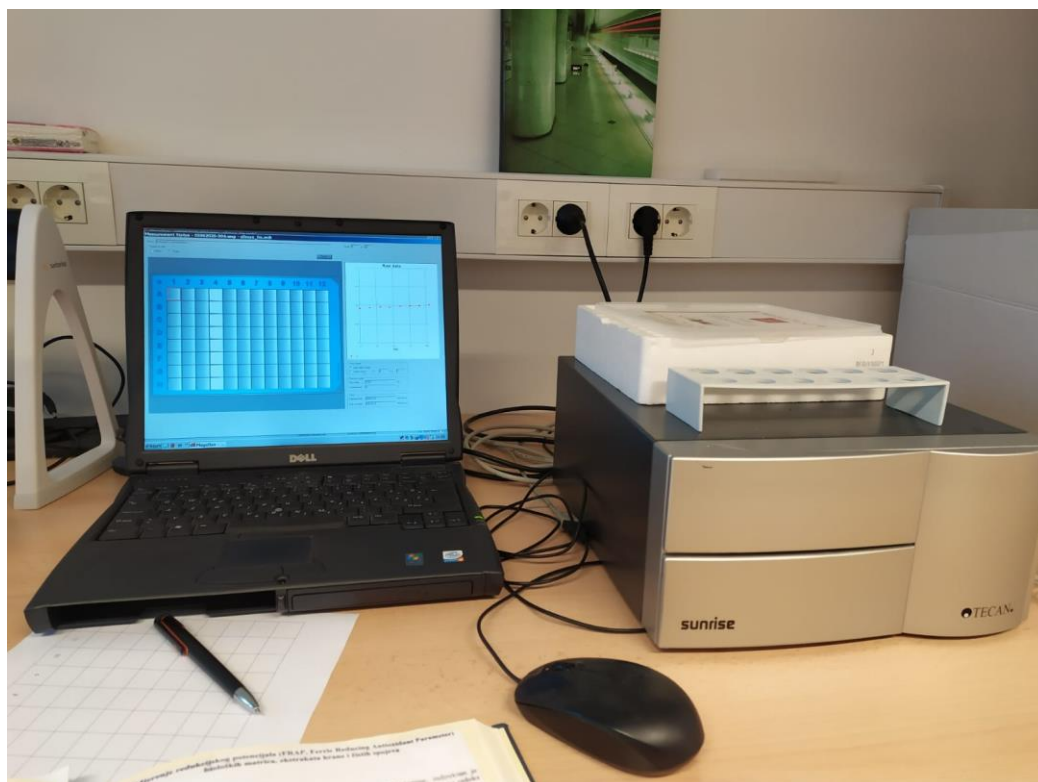
Postupak rada se odvijao prema shemi u Tablica 2.4 na način da se potrebne kemikalije otpipetiraju u jažice pri čemu se supstrat acetiltiokolin (ATChI) dodaje neposredno prije početka mjerenja iz razloga što njegovim dodatkom reakcija odmah započinje. Ukupni volumen u jažicama je iznosio 220 μL te je ne-enzimska hidroliza praćena tzv. "blank" mjerenjima, tj. slijepim probama.

Tablica 2.4. Shema otopina u eksperimentu

	Kontrola H ₂ O	BL H ₂ O	Kontrola EtOH	BL EtOH	Uzorak	BL Uzorak
Pufer	190	200	180	190	180	190
DTNB	10	10	10	10	10	10
AChE (BChE)	10	/	10	/	10	/
Uzorak/ EtOH	/	/	0/10	0/10	10/0	10/0
ATChI (BTChI)	10	10	10	10	10	10

BL- slijepa proba; sve vrijednosti su izražene u μL

Mjerenje se provodi pomoću višekanalnog čitača mikrotitarskih pločica "Sunrise" (Tecan GmbH, Austria, Slika 12.) pri valnoj duljini od 405 nm uz automatsko miješanje i pohranjivanje podataka u računalu.



Slika 12. Višekanalni čitač mikrotitarskih pločica "Sunrise" (Tecan, GmbH, Austrija)

Kako bismo izračunali inhibicijsku sposobnost enzima (postotak inhibicije) koristimo formulu:

$$\% \text{ inhibicije } AChE (BChE) = \frac{(A_K - A_A)}{A_K} * 100$$

A_K = apsorbancija test otopine

A_A = apsorbancija kontrolnog uzorka.

2.2.2 Određivanje inhibicijske sposobnosti na enzim BChE

Za određivanje inhibicijske sposobnosti eteričnih ulja na BChE također se koristila metoda po Ellmanu te se postupak rada također odvijao prema Tablica 2.4. Kao supstrat se koristio sintetski butiriltiokolin-jodid (BTChI), korišteni enzim je BChE dok su ostale korištene kemikalije identične. Sam postupak pripreme potrebnih kemikalija prikazan je u tablici 2.5.

Tablica 2.5. Priprema kemikalija

Kemikalije	Osnovna otopina	Volumen (μL)	Konačna koncentracija
Pufer		190	0,1 mmol/L
DTNB	13,4 mg u 5,123 mL pufera (pH 7)	10	0,3 mmol/L
BTChI	19,7 mg u 5,645 mL pufera (pH 8)	10	0,5 mmol/L
BChE	40 μL u 5 mL pufera (pH 8)	10	0,03 U/mL
Uzorak/EtOH		10	Različite konc./ 96%

2.3 ODREĐIVANJE KEMIJSKOG SASTAVA ETERIČNIH ULJA POMOĆU PLINSKE KROMATOGRAFIJE-SPEKTROMETRIJE MASA (GC-MS)

Kvalitativna i kvantitativna analiza eteričnih ulja se odvila pomoću GC-MS-a. Pri analizi je korišten kromatograf model 8890 i maseni spektrometar (MS) model 5977E (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, SAD). Za razdvajanje spojeva korištena je nepolarna kolona HP-5MS UI (((5% fenil)-metilpolisiloksan; 30 m × 250 µm × 0,25 µm) kojoj je početna temperatura postavljena na 70 °C pri čemu ta temperatura ostaje jednaka 2 minute nakon čega se povećava do 200 °C brzinom od 3 °C/min. Pri postizanju temperature od 200 °C temperatura se izotermno održala 18 minuta. Kao plin nositelj korišten je helij, mjesto injekcije je bilo zagrijano na 250 °C, brzina protoka je iznosila 1 mL/min, u "split" načinu rada 1:50, volumen analiziranog uzorka je iznosio 1 µL. "Transfer line" je održavana na konstantnoj temperaturi od 280 °C. U spektrometru masa vladali su sljedeći uvjeti: temperatura ionskog izvora iznosila je 230 °C, ionizacijski potencijal je iznosio 70 eV, a raspon masa za pretraživanje je iznosio 30 – 350 masenih jedinica.



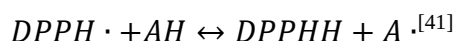
Slika 13. Vezani sustav GC-MS

Kako bi se odredili pojedini pikovi uspoređivali smo vrijeme njihovog zadržavanja u odnosu na standardnu seriju *n*-alkana C₉-C₁₉ za korištenu kolonu s onim iz "kućne" baze podataka, literaturom ili s vremenom zadržavanja komercijalnih standarda. Pojedini pikovi odnosno njihovi maseni spektri su uspoređeni s komercijalnim bazama podataka: Wiley 9 MS (Wiley, New York, SAD) i NIST 14 (Gaithersburg, MD, SAD), literaturom te "kućnom" bazom podataka.

"Kućna" baza podataka vremena zadržavanja i spektara masa načinjena je korištenjem komercijalnih standarda čistih spojeva i od glavnih spojeva mnogih eteričnih ulja iz prijašnjih istraživanja. Kvantitativni sastav pojedinog sastojka je izračunat kao srednja vrijednost površine ispod pika tri analize.

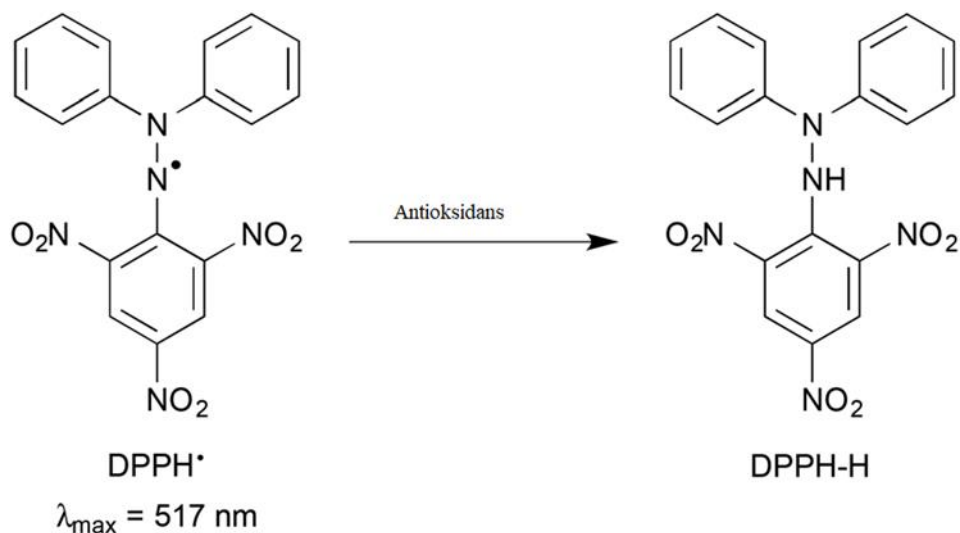
2.4 ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI VEZIVANJEM SLOBODNOG RADIKALA DPPH METODOM

Metoda DPPH (engl. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) predstavlja vrlo jednostavnu, brzu i ponajprije jeftinu metodu za testiranje antioksidativnog kapaciteta pojedinih sastojaka hrane ili eteričnog ulja. Metoda se temelji na reduciranju stabilnog slobodnog radikala DPPH• s vodikovim atomom prisutnog antioksidansa pri čemu nastaje DPPHH.^[41]



A• ulazi u daljnje reakcije gdje se na kraju neutralizira.

Maksimalna apsorpcija slobodnog radikala DPPH• uočava se pri 517 nm (ljubičasto obojenje), spajanjem radikala s vodikovim atomom se maksimalna apsorpcija smanjuje te obojenje prelazi iz intenzivno ljubičastog u žuto obojenje.^[41,42]



Slika 14. Reakcija nastanka DPPH-H uslijed djelovanja antioksidansa^[43]

Kao kontrola antioksidansa može se upotrijebiti askorbinska kiselina te ona predstavlja pozitivnu kontrolu, dok je reakcijska smjesa koja sadrži 50% vodenog metanola umjesto uzorka negativna kontrola.^[43]

Reakcijska smjesa sastoji se od: 290 μL DPPH radikala koncentracije 0,04 g/L otopljenog u 96% etanolu i 10 μL otopine uzorka. Samo mjerenje se provodi pomoću višekanalnog čitača mikrotitarskih pločica "Sunrise" (Tecan GmbH, Austria) pri valnoj duljini od 517 nm, s automatskim miješanjem i snimanjem podataka na računalo. Reaktante se otpipetiralo u mikrotitarske pločice te mu se apsorbancija očitala nakon 60 minuta. Postotak inhibicije radikala se računa prema izrazu :

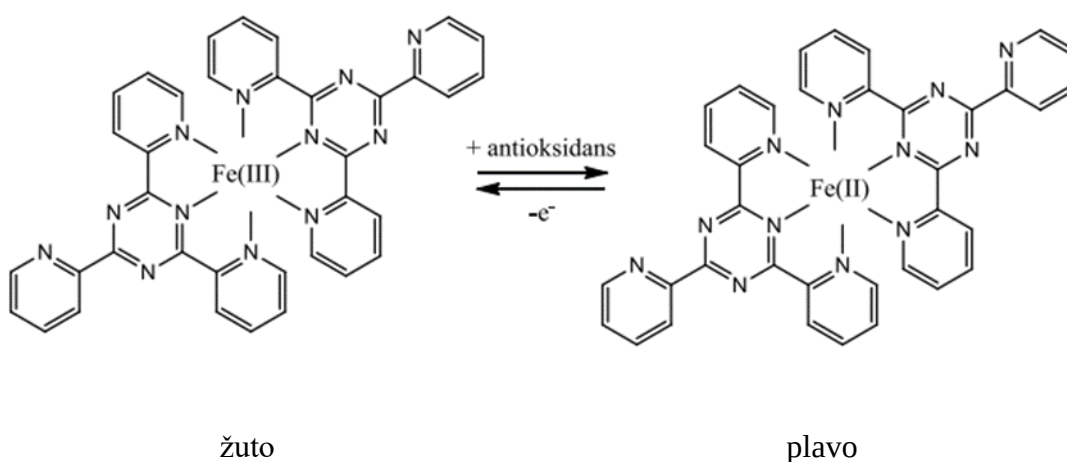
$$\% \text{ inhibicije DPPH} \cdot = \frac{(A_{C(0)} - A_{A(t)})}{A_{C(0)}} \cdot 100.$$

Pri čemu:

- $A_{C(0)}$ predstavlja apsorbanciju kontrole (otopina DPPH• radikala) kod $t = 0 \text{ min}$,
- $A_{A(t)}$ predstavlja apsorbanciju reakcijske smjese nakon $t = 60 \text{ min}$.

2.5 ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM

FRAP metoda (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) omogućava mjerenje ukupnog redukcijskog potencijala na vrlo brz i jednostavan način. U prisutnosti antioksidansa dolazi do redukcije Fe^{3+} iona (žuto obojenje) u Fe^{2+} ione koji u prisutnosti 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ reagens) tvori stabilan kompleks. Kompleks daje plavo obojenje te apsorbira pri 593 nm, a sama reakcija se odvija u kiselom mediju ($\text{pH} = 3,6$).^[45,46]



Slika 15. Mehanizam FRAP reakcije^[47]

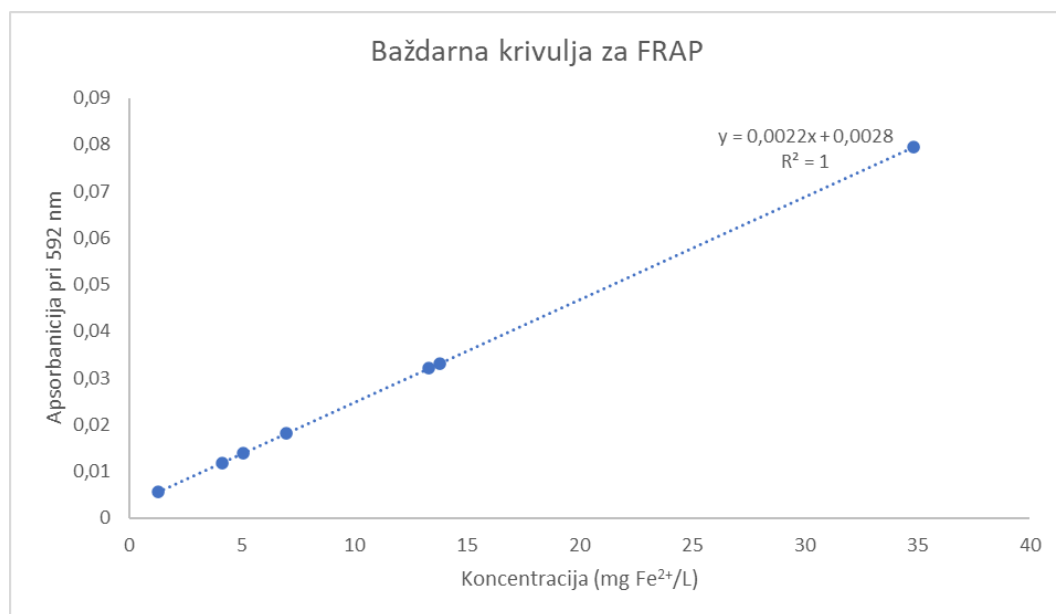
Korištene kemikalije za pripravu FRAP reagensa:

- 0,3 mol/L acetatni pufer $\text{pH} = 3,6$;
- 40 mmol/L klorovodična kiselina (HCl)
- 10 mmol/L otopina TPTZ u 40 mmol/L HCl
- 20 mmol/L otopina FeCl_3

Radni FRAP reagens se dobiva miješanjem 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL otopine TPTZ reagensa i 2,5 mL otopine FeCl_3 . Reakcijska smjesa se sastoji od 300 μL reagensa i 10 μL otopine uzorka. Kako bi se odredila antioksidacijska aktivnost, svježe pripremljeni FRAP reagens se stavlja u mikrotitratske pločice nakon čega mu se mjeri apsorbanacija pri 592 nm (A_0), nakon mjerenja u reagens se dodaje otopina uzorka pri

čemu se apsorbancija ponovno mjeri nakon 4 min (A_4). Kako bi se dobila tražena vrijednost apsorbanciju čistog reagensa potrebno je oduzeti od apsorbancije reagensa s uzorkom ($A_4 - A_0$), dobivenu vrijednost uspoređuje se s vrijednostima za otopinu standarda.

Za konstrukciju baždarne krivulje korištena je otopina FeCl_2 u rasponu koncentracija 0 – 40 mg/L, mjerenje se provodi prema opisanom postupku.



Slika 16. Baždarna krivulja za FRAP

3. REZULTATI

3.1 REZULTATI ODREĐIVANJA INHIBICIJSKE SPOSOBNOSTI NA ENZIM AChE

U tablici 3.1 su prikazani rezultati inhibicijska sposobnost eteričnih ulja celera i đumbira na enzim AChE.

Tablica 3.1. Inhibicijska sposobnost na enzim AChE

Uzorak	Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	Sposobnost inhibicije AChE (%)
Celer	57	61,55
	43	13,60
	28	ni
Đumbir	28	9,60
	14	ni

ni- nema inhibicije

3.2 REZULTATI ODREĐIVANJA INHIBICIJSKE SPOSOBNOSTI NA ENZIM BChE

U tablici 3.2 su prikazani rezultati inhibicijska sposobnost eteričnih ulja celera i đumbira na enzim BChE.

Tablica 3.2. Inhibicijska sposobnost na enzim BChE

Uzorak	Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	Sposobnost inhibicije BChE (%)
Celer	57	21,00
	43	16,20
	28	10,60
Đumbir	28	1,70
	14	ni

ni- nema inhibicije

3.3 REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

3.3.1 Rezultati antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

U tablici 3.3 prikazani su rezultati mjerenje antioksidacijske aktivnosti eteričnih ulja đumbira i celera nakon 60 minuta.

Tablica 3.3. Inhibicija DPPH radikala nakon 60 minuta

Uzorak	Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibicija DPPH radikala (%)
Đumbir	87	13,18
	43	16,60
	22	10,28
	11	7,69
Celer	43	12,59
	32	7,84
	22	20,96

3.3.2 Rezultati antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Rezultati reduksijske sposobnosti uzoraka određenih FRAP metodom prikazani su u tablici 3.4.

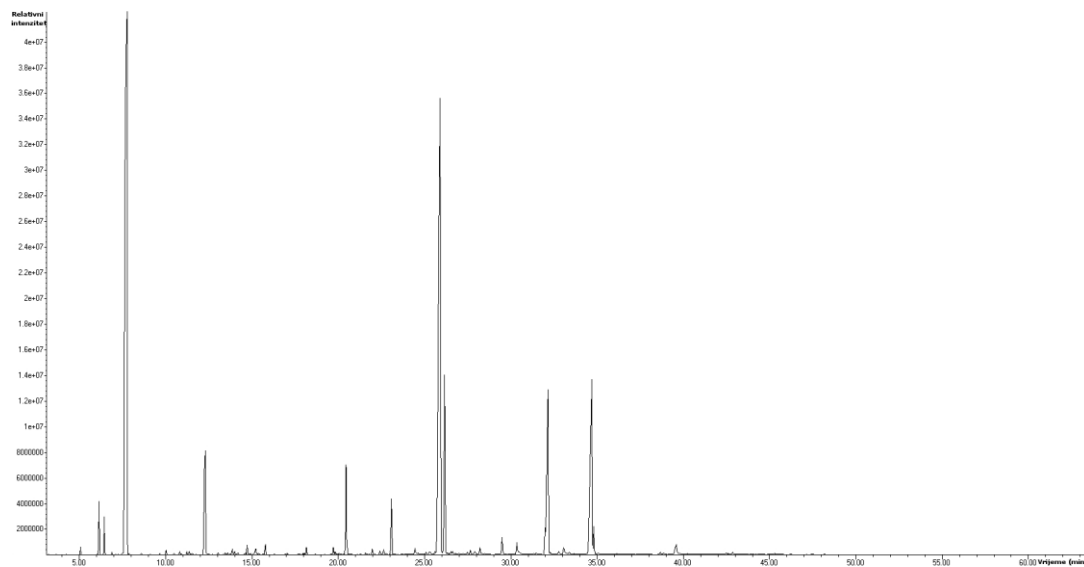
Tablica 3.4. Redukcijska sposobnost uzoraka

Uzorak	Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	FRAP (mg ekvivalentima Fe^{2+}/L)
Đumbir	83	34,818
	42	13,773
	21	6,955
	10	1,273
Celer	42	13,318
	31	5,045
	21	4,136

3.4 REZULTATI GC-MS ANALIZE

3.4.1 Eterično ulje celera

Na slici 17 prikazan je dobiveni kromatogram eteričnog ulja celera.



Slika 17. Kromatogram eteričnog ulja celera

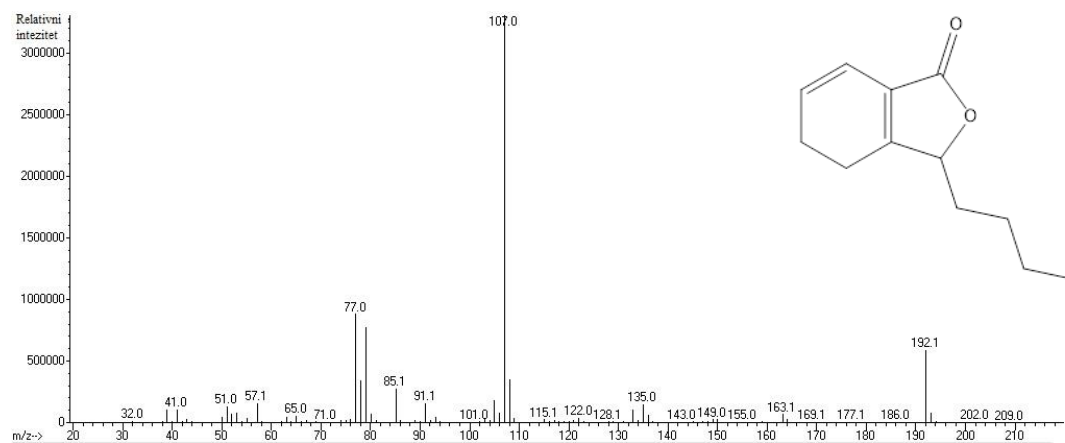
U tablici 3.5 prikazani su identificirani spojevi te njihovi udjeli u analiziranom ulju.

Tablica 3.5. Sastav i maseni udjeli spojeva prisutnih u eteričnom ulju celera

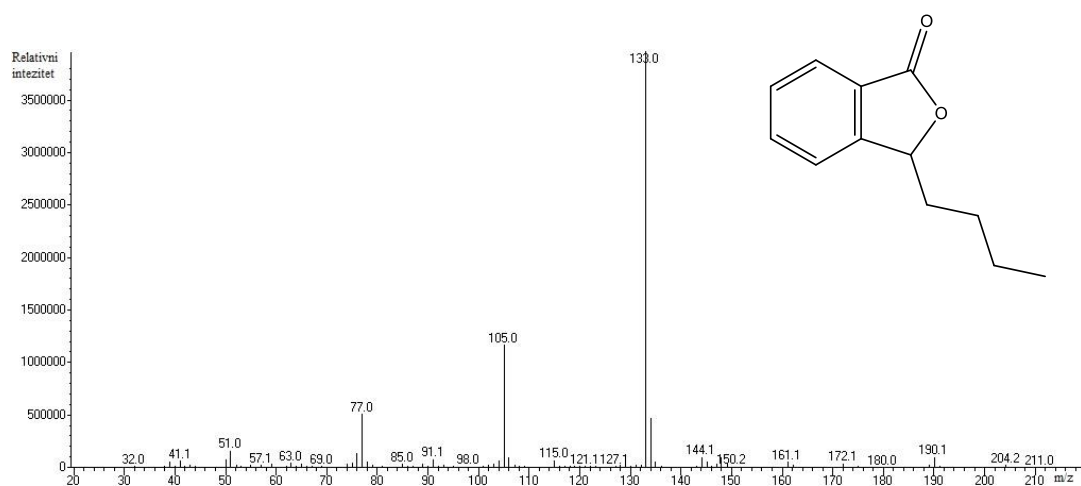
Redni broj	Retencijsko vrijeme / min	%	KI	Naziv spoja	Nid
1.	5,1	0,1	939	α -pinen	MS, KI, St
2.	6,1	1,0	982	β -pinen	MS, KI, St
3.	6,4	0,7	993	β -mircen	MS, KI
4.	7,8	34,2	1038	limonen	MS, KI, St
5.	10,0	0,1	1101	linalol	MS, KI, St
6.	12,3	2,1	1161	pentil-benzen	MS, KI
7.	12,3	2,2	1162	5-pentilcikloheksa-1,3-dien	MS, KI
8.	13,9	0,1	1198	trans-dihidrokarvon	MS, KI
9.	14,7	0,3	1221	cis-karveol	MS
10.	15,2	0,2	1233	trans-karveol	MS
11.	15,8	0,3	1247	karvon	MS, KI
12.	18,2	0,2	1301	cis-pinen-3-ol	MS
13.	19,7	0,2	1341	trans-karveil acetat	MS, KI
14.	20,5	2,4	1359	1-fenil-1-pentanon	MS, KI
15.	21,9	0,1	1393	(E)- β -elemen	MS, KI, St
16.	23,1	1,5	1421	t-kariofilen	MS, KI, St
17.	24,4	0,2	1456	humulen	MS, KI
19.	25,9	26,7	1491	β -selinen	MS, KI
20.	26,7	5,2	1497	α -selinen	MS, KI
21.	27,7	0,1	1537	(4 α R,8 α S)-4 α -metil-1-metilen-7-(propan-2-iliden)dekahidronaftalen	MS
23.	27,9	0,1	1544	selina-3,7(11)-dien	MS, KI
24.	29,5	0,5	1584	kariofilen-oksid	MS, KI, St
25.	31,9	0,7	1652	β -eudesmol	MS, KI
26.	32,2	6,9	1656	3-n-butilftalid	MS, KI
27.	32,8	0,1	1673	3-butilidenftalid	MS, KI
28.	34,7	10,1	1726	sedanenolid	MS, KI
29.	34,8	0,7	1729	trans-sedanolid	MS, KI
	Ukupno:	97,0			

Nid - način identifikacije; KI - Kovatsev indeks; % - maseni udio u eteričnom ulju; Način identifikacije (Nid): RI - identifikacija preko literature (Adams) i/ili "kućne" baze podataka; MS - identifikacija pomoću komercijalne baze masenih spektara NIST14 i Wiley 9; St - identifikacija potvrđena komercijalnim standardom.

Na sljedećim slikama prikazani su maseni spektri sedanenolida i 3-*n*-butilftalida.

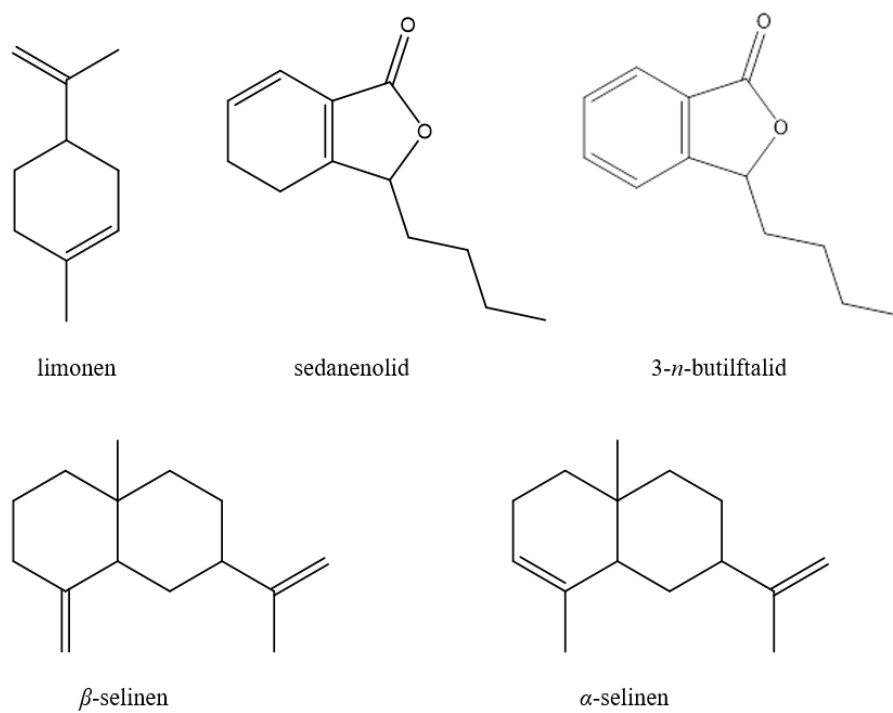


Slika 18. Spektar masa sedanenolida i njegova struktura



*Slika 19. Spektar masa 3-*n*-butilftalida i njegova struktura*

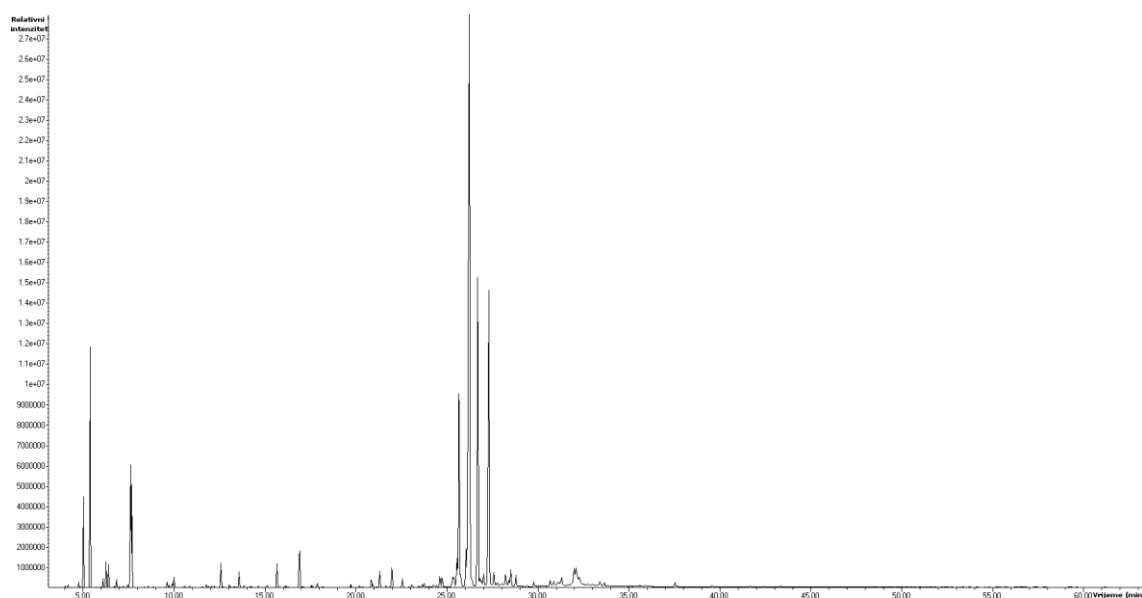
Strukture najzastupljenijih spojeva prisutnih u analiziranom ulju prikazane su na slici 20 te su poredane po njihovim masenim udjelima.



Slika 20. Strukture najzastupljenijih spojeva u eteričnom ulju celera

3.4.2 Eterično ulje đumbira

Na slici 21 je prikazan kromatogram eteričnog ulja đumbira te su u tablici 3.6 prikazani identificirani spojevi s njihovim udjelima u analiziranom ulju.



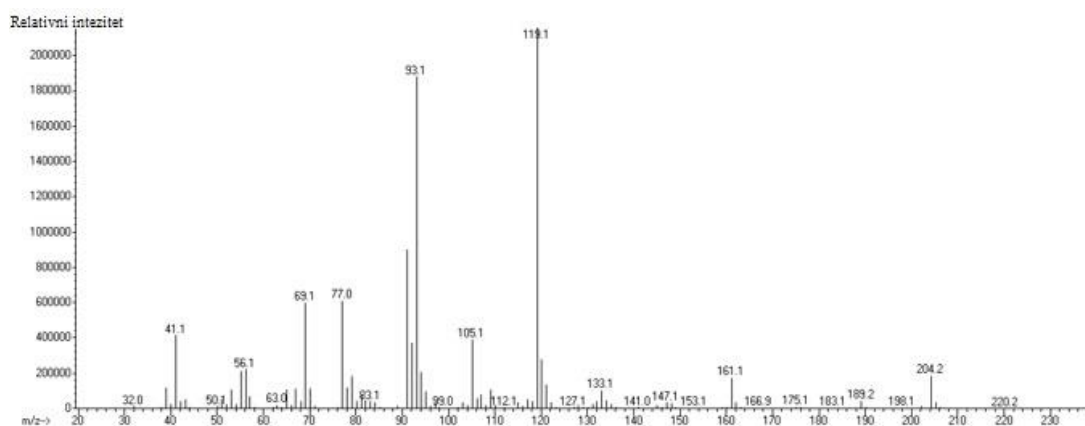
Slika 21. Kromatogram eteričnog ulja đumbira

Tablica 3.6. Sastav i maseni udjeli spojeva prisutnih u eteričnom ulju đumbira

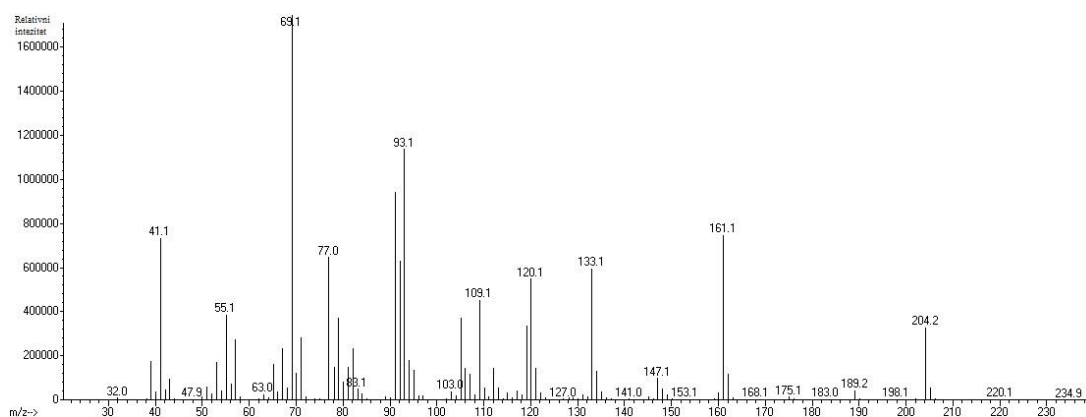
Redni broj	Retencijsko vrijeme / min	%	KI	Naziv spoja	Nid
1.	5,1	1,9	939	α -pinen	MS, KI, St
2.	5,4	5,4	953	kamfen	MS, KI
3.	6,1	0,2	982	β -pinen	MS, KI, St
4.	6,3	0,6	986	6-metil-5-hepten-2-on	MS
5.	6,4	0,5	993	β -mircen	MS, KI
6.	6,8	0,2	1006	α -felandren	MS, KI
7.	7,6	3,9	1033	β -felandren	MS, KI
8.	7,7	2,7	1035	1,8-cineol	MS, KI, St
9.	10,0	0,3	1101	linalol	MS, KI, St
10.	12,6	0,8	1169	borneol	MS, KI, St
11.	13,6	0,5	1192	α -terpineol	MS, KI, St
12.	15,7	0,8	1244	neral	MS, KI
13.	16,9	1,2	1273	citral	MS, KI
14.	20,8	0,3	1368	ciklosativen	MS
15.	21,3	0,6	1378	α -kopaen	MS, KI
16.	21,9	0,7	1393	(E)- β -elemene	MS, KI, St
17.	22,5	0,3	1407	7- <i>epi</i> -seskvitujen	MS
18.	23,1	0,1	1421	<i>t</i> -kariofilen	MS, KI, St
19.	24,6	0,4	1460	(E)- β -farnesen	MS, KI
20.	24,7	0,3	1463	aloaromadendren	MS, KI
21.	25,3	0,5	1477	4,11-selinadien	MS
23.	25,4	0,3	1479	γ -murolen	MS, KI
24.	25,5	1,2	1483	germakren D	MS, KI
25.	25,7	7,9	1485	α -kurkumen	MS, KI
26.	26,0	1,5	1494	valencen	MS, KI
27.	26,2	33,5	1499	α -zingiberen	MS, KI
28.	26,7	11,9	1510	β -bisabolen	MS, KI
29.	26,8	0,3	1513	β -kurkumen	MS
30.	26,9	0,2	1516	γ -kadinen	MS, KI
31.	27,0	0,4	1520	7- <i>epi</i> - α -selinen	MS
32.	27,3	12,8	1527	β -seskvifelandren	MS, KI
33.	27,6	0,4	1535	γ -bisabolen	MS
34.	28,2	0,4	1552	elemol	MS
35.	28,5	0,6	1559	germakren B	MS, KI
36.	28,8	0,4	1566	(E)-nerolidol	MS, KI, St
37.	31,3	0,5	1632	γ -eudesmol	MS
38.	31,9	1,0	1652	β -eudesmol	MS
39.	32,1	1,3	1654	valerianol	MS
40.	32,3	0,6	1659	7- <i>epi</i> - α -eudesmol	MS
Ukupno:		97,6			

Nid - način identifikacije; KI - Kovatsev indeks; % - maseni udio u eteričnom ulju; Način identifikacije (Nid): RI - identifikacija preko literature (Adams) i/ili "kućne" baze podataka; MS - identifikacija pomoću komercijalne baze masenih spektara NIST14 i Wiley 9; St - identifikacija potvrđena komercijalnim standardom

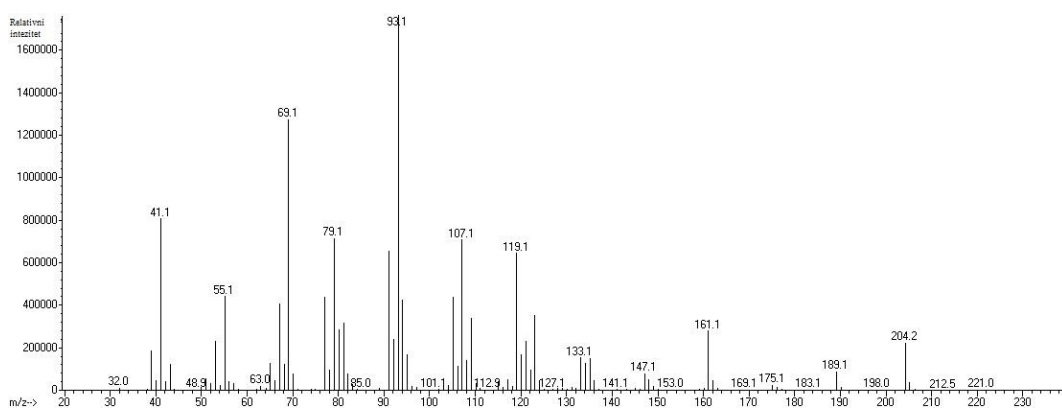
Na sljedećim slikama prikazani su spektri masa najzastupljenijih spojeva u eteričnom ulju đumbira.



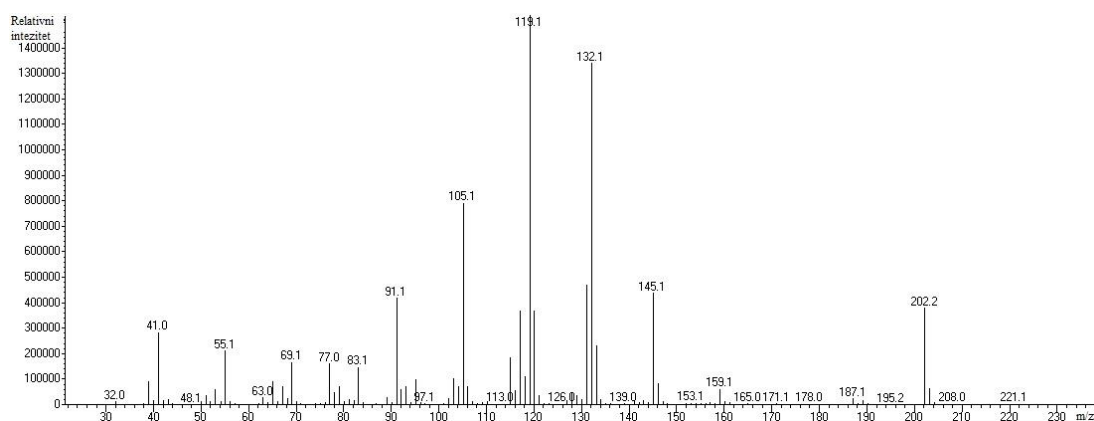
Slika 22. Spektar masa α -zingiberena



Slika 23. Spektar masa β -seskvifelandrena

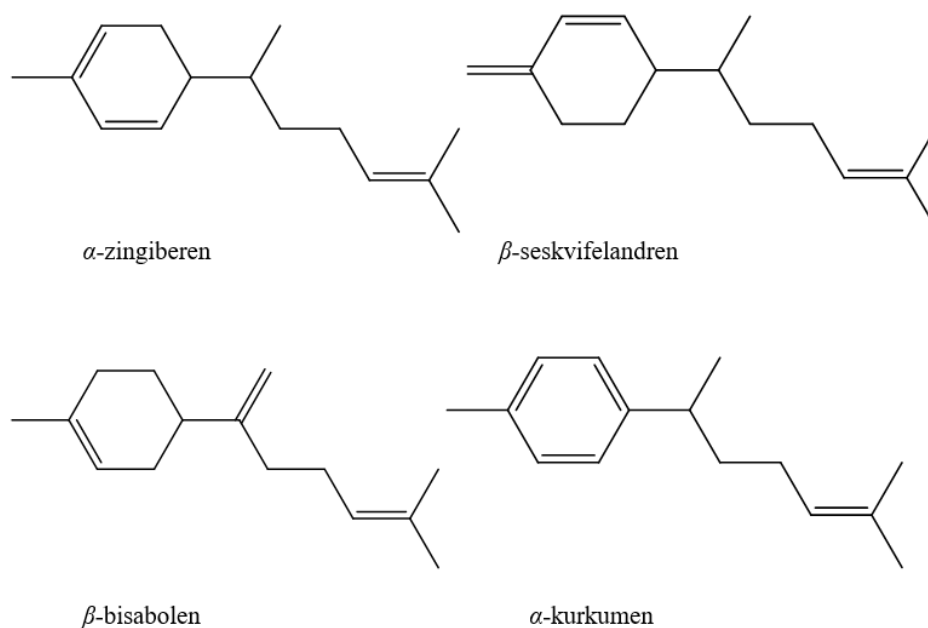


Slika 24. Spektar masa β -bisabolena



Slika 25. Spektar masa α -kurkumena

Strukture najzastupljenijih spojeva prisutnih u analiziranom ulju prikazane su na slici 26 te su poredane po njihovim masenim udjelima.



Slika 26. Strukture najzastupljenijih spojeva prisutnih u eteričnom ulju đumbira.

4. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je utvrditi kvantitativni i kvalitativni sastav eteričnih ulja đumbira i celera te ispitati njihova antioksidacijska svojstva i sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE.

Inhibicijska sposobnost AChE određena metodom po Ellmanu pokazuje određenu inhibiciju eteričnog ulja celera dok kod eteričnog ulja đumbira to nije slučaj, tj. inhibicija eteričnog ulja đumbira je izuzetno mala. Ovisno o koncentracijama ispitivanih otopina razlikuje se i sposobnost inhibicije enzima AChE pa je tako najveća inhibicija od 61,55% eteričnog ulja celera postignuta pri koncentraciji od 57 $\mu\text{g/mL}$, smanjenjem koncentracije otopine smanjuje se i sposobnost inhibicije enzima.

Osim inhibicijske sposobnosti enzima AChE metodom po Ellmanu određena je i inhibicijska sposobnost otopina na enzim BChE. Prema rezultatima prikazanim u tablica 3.2 i celer i đumbir su pokazali inhibiciju enzima, ali u vrlo malom postotku (21%; 1,7%; redom). Također sposobnost inhibicije BChE je opadala smanjenjem koncentracije eteričnog ulja.

Antioksidacijska aktivnost određena metodom vezanja DPPH radikala nije izrazito značajna ni za jedno eterično ulje. No najveću antioksidacijsku aktivnost postiglo je ulje celera konačne koncentracije 22 $\mu\text{g/mL}$ te je ona iznosila 20,96%, dok je najveći postotak antioksidacijske aktivnosti kod đumbira postignut pri konačnoj koncentraciji 43 $\mu\text{g/mL}$ te on iznosi 16,60%.

Redukcijski potencijal otopina eteričnih ulja određen je pomoću FRAP metode. Ni jedan od ispitivanih uzoraka nije pokazao značajni redukcijski potencijal. Najveći redukcijski potencijal kod ulja đumbira je postignut pri konačnoj koncentraciji od 83 $\mu\text{g/mL}$ te on iznosi 34,818 $\text{mg Fe}^{2+}/\text{L}$, dok je kod celera najveći redukcijski potencijal postignut pri konačnoj koncentraciji od 42 $\mu\text{g/mL}$ te on iznosi 13,318 $\text{mg Fe}^{2+}/\text{L}$. Redukcijski potencijal otopina je proporcionalan koncentraciji otopina te se smanjenjem koncentracije otopine smanjuje i redukcijski potencijal otopine.

Plinska kromatografija u sprezi sa spektrometrom masa nam omogućava kvantitativno i kvalitativno analiziranja uzoraka te smo za eterično ulje celera identificirali 29 spojeva od kojih su najzastupljeniji limonen, β -selinen, sedanenolid, 3-*n*-butilftalid, α -selinen (udjeli redom: 34,2%; 26,7%; 10,1%; 6,9%; 5,2%). Pri

analiziranju eteričnog ulja đumbira identificirano je 40 spojeva od kojih su najzastupljeniji α -zingiberen, β -seskvifelandren, β -bisabolen te α -kurkumen. (udjeli redom: 33,5%; 12,8%; 11,9%; 7,9%; 5,4%).

5. ZAKLJUČAK

- Dobiveni rezultati ispitivanja inhibicijskog djelovanja eteričnih ulja đumbira i celera na enzim BChE ne pokazuju sposobnost inhibicije bez obzira na testiranu koncentraciju otopine. Dok je za enzim AChE eterično ulje celera pokazalo prosječnu inhibiciju, za eterično ulje đumbira to nije zabilježeno.
- Metodama DPPH i FRAP nije utvrđena antioksidacijska sposobnost ispitivanih ulja neovisno o koncentracijama.
- Sveukupni rezultati pokazuju da eterična ulja celera i đumbira nisu dobri antioksidansi te također pokazuju na slabu, odnosno prosječnu sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE.
- GC-MS analizom potvrđena su prijašnja istraživanja koja u najzastupljenije spojeve eteričnog ulja celera svrstavaju limonen, β -selinen, sedanenolid, 3-*n*-butilftalid, α -selinen. Te je na identičan način potvrđena najveća zastupljenost α -zingiberena, β -seskvifelandrena, β -bisabolena te α -kurkumena u eteričnom ulju đumbira.

6. LITERATURA

- [1.] J.D.D. Tamokou, A.T. Mbaveng, V. Kuete, *Medicinal spices and vegetables from Africa*, (Eds: V. Kuete), Academic Press. Dschang, Camerún, **2017**, p. 220
- [2.] A. K. Al-Asmari, M. T Athar, S. G. Kadasah, *Pharmacogn Rev.*, **2017**, 11 (21), p. 13
- [3.] URL: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=11140> (16.9.2020.)
- [4.] URL: <https://antropocene.it/wp-content/uploads/2020/04/Apium-graveolens-var.-rapaceum.jpg> (16.9.2020.)
- [5.] URL: https://shirleytwofeathers.com/The_Blog/encyclopediaofherbology/wp-content/uploads/sites/23/2020/06/783d6ff76271666899804241f37c0935-475x932.jpg (16.9.2020.)
- [6.] URL: https://allegrow.be/uploads/files/_1200x630_crop_center-center_82_none/snijselder-1.jpg?mtime=1579095707 (16.9.2020.)
- [7.] A. Khalil, H. Nawaz, J. Ben Ghania, R. Rehman, F. Nadeem, *IJCBS*, **2015**, 8, p.40
- [8.] D. Hefer, I. Kovačić, B. Božić-Sumrak, *Proizvodnja celera u sustavu kap na kap*, Glasnik Zaštite Bilja, **2011.**,34 (4), p. 66
- [9.] A.E. Al-Snafi, *IJPRS*, 2014, 3, p. 671
- [10.] M. Murray, J. Pizzorno, L. Pizzorno, *The encyclopedia of healing food*, ATRIA BOOKS, New York, 2005, p. 184-186
- [11.] A.M. Bode, Z. Doug, *Herbal medicine: Biomolecular and clinical aspect*, 2nd edition, (Eds: I.F.F. Benzie, S. Wachtel- Galor),CRC Press/ Taylor & Francis, Boca Raton, **2011**, p. 131-147
- [12.] J. Buckle, *Clinical Aromatherapy Essential Oils in Healthcare*, Churchill Livingstone, Philadelphia, **2003**, p.210
- [13.] A. Karabašić, A. Dervišević, J. Lukić, R. Zelenović, M. Šljivić Husejnović, *Hrana u zdravlju i bolesti : znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*, **2016**, 5 (2), p. 62
- [14.] L. Khodaie, O. Sadeghpour, *Jundishapur J Nat Pharm Prod.*, **2015**, 10 (1) : e18402
- [15.] M. Murray, J. Pizzorno, L. Pizzorno, *The encyclopedia of healing food*, ATRIA BOOKS, New York, 2005, p. 484

- [16.] URL: https://www.netclipart.com/pp/m/59-598825_pickles-clipart-turmeric-zingiber-officinale-png.png (16.9.2020.)
- [17.] A.T. Mbavebg, V. Kuete, *Medicinal spices and vegetables from Africa*, (Eds: V. Kuete), Academic Press. Dschang, Camerún, **2017**, p. 627-363s
- [18.] G.H. da Casta Vierva, B.B Dias, *Essential Oils: Historical Significance, Chemical Composition and Medicinal Uses and Benefits*, (Eds: M. Peters), Nova Science Publishers, Inc, New York, **2016**, p.2
- [19.] E. Schmidt, *Handbook of essential oils: science, technology and applications*, (Eds: K. Hüsnü Can Baser, G. Buchbauer), CRC Press, Boca Raton, **2010**, p.87-103
- [20.] S. S. Handa, *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*, (Eds: S. S. Handa, S. P. Singh Khanuja, G. Longo, D. D. Rakesh) United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, Trst, **2008**, p. 35-46
- [21.] S. Bhatia, *IOP Publishing*, **2018**, 2, 1
- [22.] G. Blanco, A. Blanco, *Medical Biochemistry*, Academic Press, London, **2017**, p.153
- [23.] H. Ako, W.K. Nip, *Food biochemistry and food processing*, (Eds: Y.H. Hui), Blackwell publishing, Ames, **2006**, p 135-137
- [24.] D.J.H Shyu, J.T.C. Fzen, *Food biochemistry and food processing*, (Eds: Y.H. Hui), Blackwell publishing, Ames, **2006**, p 155-165
- [25.] B. W. Willson, *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*, (Eds: R. Krieger), Academic press, Davis, **2010**, p. 1457-1459
- [26.] N. Maček- Hrvat, *Kolinesteraze i oksimi kao pseudokatalitička čistila živčanih bojnih otrova*, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, **2015**, p. 5
- [27.] URL: <https://www.skolskiportal.hr/media/ovisnosttekst.jpg> (22.9.2020.)
- [28.] R. Kerep, *Inhibicija kolinesteraza karbamatom albuterola*, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, **2018**, p. 11
- [29.] A. Bosak, M. Katalinić, Z. Kovarik, *Arh Hig Rada Toksikol*, **2011**, 62, p. 175
- [30.] M. Zenčić, *Određivanje antioksidacijske aktivnosti i inhibicijsko djelovanje vodenog ekstrakta gorke naranče (Citrus aurantium L.) na aktivnost acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze*, Sveučilište u Splitu, Split, **2017**, p. 11
- [31.] M. Malner, M. Košiček, S. Hećimović, *Medicina*, **2009**, 45, p.234

- [32.] V. Folnegović-Šmalc, S. Uzun, O. Kozumplik, P. Folnegović-Grošić, N. Henigsberg, G. Makarić, M. Mihanović, N. Mimica, *MEDICUS*, **2002.**, 11, p. 217
- [33.] URL: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/neurologija/delirij-i-demencija/alzheimerova-bolest> (22.9.2020)
- [34.] V. Petrović, *Određivanje sastava eteričnog ulja nekih vrsta roda Artemisia L. plinskom kromatografijom.*, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, **2015**, p. 6
- [35.] M. Kaštelan-Macan, *Kemijska analiza u sustavu kvalitete*, Školska knjiga, Zagreb, **2003**, p. 217
- [36.] F.G. Kitson, B.S. Laren, C.N. McEwen, *Gas chromatography and mass spectrometry a practical guide*,: Academical Press, San Diego, London, **1996**, p. 3
- [37.] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Fundamental of Analytical chemistry*, Brooks/ Cole, Belmont, **2014**, p. 814.
- [38.] H.M. McNair, J.M. Miller, *Basic gas chromatography*, John Wiley&Sons, New Jersey, **2009**, p. 156
- [39.] F. Rouessac, A. Rouessac, *Chemical analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques*, John Wiley&Sons ,University of Le Mans, France, **2007** p. 369.
- [40.] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, R.M. Featherstone, *Biochemical Pharmacolog*, **1961**, 7, p. 88
- [41.] S.B. Kedare, R. P. Singh, *J Food Sci Technol*, **2011**, 48(4), p. 412
- [42.] T.C. Shekhar, G. Anju, *American Journal of Ethnomedicine*, ,**2014**, 1, p. 244
- [43.] URL: <https://www.researchgate.net/publication/305743300/figure/fig1/AS:566530205519872@1512082734940/DPPH-as-a-model-of-ROS.png> (23.9.2020.)
- [44.] A.R. Ndhlala, M. Moyo, J. Van Staden, *Molecules*, **2010**, 15, p.6905
- [45.] I.F.F. Benzie, J.J. Strain, *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, **1996**, 239, p. 70
- [46.] A.M. Pisoschi, G.P. Negulescu, *Biochem & Anal Biochem*, **2011**, 1, p.1
- [47.] K. Krejčir, *Određivanje antioksidacijske aktivnosti i ispitivanje sposobnosti inhibicije kolinesteraza vodenog ekstrakta i eteričnog ulja chia sjemenki*, Sveučilište u Splitu, Split, **2018**, p. 20