Allium Cepa L.: Kemijski sastav i biološka aktivnost

Pervan, Nikolina

Undergraduate thesis / Završni 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:167:468654

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

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ALLIUM CEPA L.: KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST

ZAVRŠNI RAD

NIKOLINA PERVAN
MATIČNI BROJ: 870

Split, lipanj 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKA TEHNOLOGIJA
SMJER KEMIJSKO INŽENJERSTVO

ALLIUM CEPA L.: KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST

ZAVRŠNI RAD

NIKOLINA PERVAN
MATIČNI BROJ: 870

Split, lipanj 2017.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
ORIENTATION CHEMICAL ENGINEERING

ALLIUM CEPA L.: CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY

BACHELOR THESIS

NIKOLINA PERVAN
PARENT NUMBER: 870

Split, June 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij Kemijska tehnologija, smjer Kemijsko inženjerstvo

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta.
Mentor: doc. dr. sc. Ivica Blažević
Pomoć pri izradi: Azra Đulović, mag.chem.

Allium cepa L.: Kemijski sastav i biološka aktivnost

Nikolina Pervan, 870

Sažetak:
Luk (*Allium cepa* L.) je jedna od najčešće uzgajanih vrsta iz roda *Allium* (Amarylldaceae) koji broji više od 500 vrsta. Prepoznatljiv okus, miris, kao i česta lakrimacija (suzenje očiju) te farmakološka svojstva potječu od prisutnih organosumporovih spojeva nastalih enzimskom hidrolizom nehlapljivih *S*-alk(en)il cistein sulfoksida. U radu je napravljena izolacija eteričnog ulja hidrodestilacijom u aparaturi po Clevengeru iz triju vrsta komercijalno pribavljenih lukova (crveni, ljubičasti i srebrenac) te ekstrakcija diklormetanom nakon autolize 24 sata. Nehlapljivi vodeni ostatak u tikvici nakon hidrodestilacije je filtriran i liofiliziran. Dobiveni uzorci su testirani na antioksidaciju korištenjem tri različite metode (DPPH, FRAP i Rancimat) te na inhibiciju acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze (korištenjem Ellman metode). Inhibicija ovih kolinesteraza još uvijek predstavlja jedinu farmakoterapiju kod Alzheimerove bolesti koja sama čini preko 50% svih neuroloških oboljenja kod osoba starijih od 65 godina. Za testiranu koncentraciju od 227 µg/mL, utvrđena je vrlo slaba antioksidacijska aktivnost (<15%) svih testiranih uzoraka. S druge strane, pri istoj koncentraciji eterična ulja su pokazala dobru inhibiciju kolinesteraza u odnosu na hlapljivi diklormetanski i nehlapljivi vodeni ekstrakt. Analizom na GC-MS-u utvrđeno je da eterična ulja sve tri vrste luka sadrže dipropil disulfid (do 55%) i dipropil trisulfid (do 20%) u visokom postotku, dok hlapljivi diklormetanski ekstrakt ne sadrži navedene spojeve. Zbog svoje male molekulske mase i lipofilnosti, ovi hlapljivi sumporovi spojevi imaju sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru, čime predstavljaju potencijalno interesantnu klasu spojeva u tretmanu kako Alzheimerove tako i drugih neuroloških bolesti.

Rad je financiran od HRZZ projekta BioSMe (IP-2016-06-1316).

Ključne riječi: *Allium cepa* L.; antioksidacija, inhibicija kolinesteraza; GC-MS; dipropil disulfid; dipropil trisulfid

Rad sadrži: 41 stranica, 24 slika, 6 tablica, 0 priloga, 22 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. doc. dr. sc. Franko Burčul	predsjednik
2. doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić	član
3. doc. dr. sc. Ivica Blažević	član-mentor

Datum obrane: 21. lipnja 2017.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemestry and Technology Split
Undergraduate study of Chemical Technology, Orientation Chemical engineering

Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 21.
Mentor: Ivica Blažević, PhD, Assistant Professor
Technical assistance: Azra Đulović, MChem

Allium cepa L.: Chemical composition and biological activity

Nikolina Pervan, 870

Abstract:

Onion (*Allium cepa* L.) is one of the most widely cultivated species of the genus *Allium* (Amarylldaceae) which comprises over 500 species. The distinctive taste, smell as well as frequent lacrimation and pharmacological benefits are due to organosulphuric compounds formed by enzymatic hydrolysis of non-volatile S-alk(en)yl cysteine sulphoxides. In this work, the isolation of essential oils was performed by hydrodestillation in Clevenger type apparatus from commercially obtained samples (yellow, red and white onion) as well as by dichloromethane extraction after the autolysis for 24 hours. Non-volatile residue in the flask, collected after the hydrodestillation, was filtered and lyophilized. The samples were tested on the antioxidant activity using three methods (DPPH, FRAP and Rancimat) and acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition (by Ellman method). Inhibition of these cholinesterases still represents the only pharmacotherapy against Alzheimer's disease, which is responsible for more than 50% of neurological diseases among persons over the age of 65 years. The antioxidant activity of all tested samples was very low at tested concentration of 227 μg/mL (<15%). Contrary to the volatile dichloromethane extracts and non-volatile water extracts, the essential oils showed good cholinesterase inhibition. GC-MS analyses showed that the essential oils contained a high percentage of dipropyl disulphide (up to 50%) and dipropyl trisulphide (up to 20%) in all three varieties, while volatile dichloromethane extract had none of the mentioned compounds. Due to its low molecular weight and lipid solubility these volatile sulphur compounds have ability to pass the blood-brain barrier, and thus represent an interesting class of compounds in treatment of Alzheimer and other neurological diseases.

The research was funded by CSF project BioSMe (IP-2016-06-1316).

Keywords: *Allium cepa* L.; antioxidation, cholinesterase inhibition; GC-MS; dipropyl disulphide; dipropyl trisulphide

Thesis contains: 41 pages, 24 figures, 6 tables, 0 supplements, 22 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Franko Burčul, PhD, Assistant Professor	chair person
2. Ivana Generalić Mekinić, PhD, Assistant Professor	member
3. Ivica Blažević, PhD, Assistant Professor	supervisor

Defence date: June 21. 2017.
Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivice Blaževića, u razdoblju od ožujka do lipnja 2017. godine.

Rad je financiran od HRZZ projekta BioSMe (IP-2016-06-1316).

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Ivici Blaževiću na svoj pomoći koju mi je pružio prilikom realizacije ovog rada. Također se zahvaljujem asistentici Azri Đulović, mag. chem. na beskrajnoj pomoći i podršci koju mi je pružila. Posebno se zahvaljujem doc. dr. sc. Franku Burčulu na izdvojenom vremenu i pomoći, kao i doc. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić.

Osobito se zahvaljujem svojim roditeljima na povjerenju i bezuvjetnoj podršci tijekom studiranja. Zahvaljujem se i svojoj braći, sestri i prijateljima što su trpili moje kukanje posljednje tri godine.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

1. Izolirati hlapljive sumporove spojeve iz tri uzorka biljke *Allium cepa* L. destilacijom u aparaturi po Clevengeru i ekstrakcijom nakon 24 sata autolize.

2. Uzorke dobivene destilacijom i ekstrakcijom analizirati plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom (GC-MS).

3. Ispitati antioksidacijska svojstva dobivenih eteričnih ulja DPPH, FRAP i rancimat metodom.

4. Ispitati inhibiciju kolinesteraza testiranjem izoliranih eteričnih ulja Ellman metodom.

SAŽETAK

Luk (*Allium cepa* L.) je jedna od najčešće uzgajanih vrsta iz roda *Allium* (Amarylldaceae) koji broji više od 500 vrsta. Prepoznatljiv okus, miris, kao i česta lakrimacija (suzenje očiju) te farmakološka svojstva potječu od prisutnih organosumporovih spojeva nastalih enzimskom hidrolizom nehlapljivih *S*-alk(en)il cistein sulfoksida. U radu je napravljena izolacija eteričnog ulja hidrodestilacijom u aparaturi po Clevengeru iz triju vrsta komercijalno pribavljenih lukova (crveni, ljubičasti i srebrenac) te ekstrakcija diklormetanom nakon autolize 24 sata. Nehlapljivi vodeni ostatak u tikvici nakon hidrodestilacije je filtriran i liofiliziran. Dobiveni uzorci su testirani na antioksidaciju korištenjem tri različite metode (DPPH, FRAP i Rancimat) te na inhibiciju acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze (korištenjem Ellman metode). Inhibicija ovih kolinesteraza još uvijek predstavlja jedinu farmakoterapiju kod Alzheimerove bolesti koja sama čini preko 50% svih neuroloških oboljenja kod osoba starijih od 65 godina. Za testiranu koncentraciju od 227 μg/mL, utvrđena je vrlo slaba antioksidacijska aktivnost (<15%) svih testiranih uzoraka. S druge strane, pri istoj koncentraciji eterična ulja su pokazala dobru inhibiciju kolinesteraza u odnosu na hlapljivi diklormetanski i nehlapljivi vodeni ekstrakt. Analizom na GC-MS-u utvrđeno je da eterična ulja sve tri vrste luka sadrže dipropil disulfid (do 55%) i dipropil trisulfid (do 20%) u visokom postotku, dok hlapljivi diklormetanski ekstrakt ne sadrži navedene spojeve. Zbog svoje male molekulske mase i lipofilnosti, ovi hlapljivi sumporovi spojevi imaju sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru, čime predstavljaju potencijalno interesantnu klasu spojeva u tretmanu kako Alzheimerove tako i drugih neuroloških bolesti.

Ključne riječi: *Allium cepa* L.; antioksidacija; inhibicija kolinesteraza; GC-MS; dipropil disulfid; dipropil trisulfid

SUMMARY

Onion (*Allium cepa* L.) is one of the most widely cultivated species of the genus *Allium* (Amarylldaceae) which comprises over 500 species. The distinctive taste, smell as well as frequent lacrimation and pharmacological benefits are due to organosulphuric compounds formed by enzymatic hydrolysis of non-volatile S-alk(en)yl cysteine sulphoxides. In this work, the isolation of essential oils was performed by hydrodestillation in Clevenger type apparatus from commercially obtained samples (yellow, red and white onion) as well as by dichloromethane extraction after the autolysis for 24 hours. Non-volatile residue in the flask, collected after the hydrodestillation, was filtered and lyophilized. The samples were tested on the antioxidant activity using three methods (DPPH, FRAP and Rancimat) and acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition (by Ellman method). Inhibition of these cholinesterases still represents the only pharmacotherapy against Alzheimer's disease, which alone makes up for more than 50% of all neurological diseases among persons over the age of 65. The antioxidant activity of all tested samples was very low at tested concentration of 227 μg/mL (<15%). Contrary to the volatile dichloromethane extracts and non-volatile water extracts, the essential oils showed good cholinesterase inhibition. GC-MS analyses showed that the essential oils contained a high percentage of dipropyl disulphide (up to 50%) and dipropyl trisulphide (up to 20%) in all three varieties, while volatile dichloromethane extract had none of the mentioned compounds. Due to its low molecular weight and lipid solubility these volatile sulphur compounds have ability to pass the blood-brain barrier, and thus represent an interesting class of compounds in treatment of Alzheimer and other neurological diseases.

Keywords: *Allium cepa* L.; antioxidation; cholinesterase inhibition; GC-MS; dipropyl disulphide; dipropyl trisulphide

Sadržaj

UVOD 1

1. OPĆI DIO 2

1.1. *Allium cepa* L. 2

1.2. Sastav luka 3

1.3. Mehanizam hidrolize *S*-alk(en)il cistein sufoksida 5

1.4. Eterična ulja 6

1.4.1. Metode izolacije eteričnog ulja 7

1.4.2. Metode analize eteričnih ulja 9

1.5. Biološka važnost sumporovih spojeva 10

1.5.1. Oksidacijski stres 11

1.5.2. Neurodegenerativne bolesti 15

2. EKSPERIMENTALNI DIO 19

2.1. Biljni materijal 19

2.2. Korišteni uređaji i kemikalije 19

2.3. Metode rada 20

2.3.1. Destilacija po Clevengeru 20

2.3.2. Liofilizacija 22

2.3.3. Autoliza i ekstrakcija 23

2.3.4. Uparavanje otapala u struji dušika 23

2.4. Metoda analize 24

2.4.1. GC-MS analiza 24

2.5. Metode bioloških ispitivanja 25

2.5.1. DPPH metoda 25

2.5.2. FRAP metoda 26

2.5.3. Rancimat metoda 26
2.5.4. Ellman metoda 27
3. REZULTATI I RASPRAVA 29
3.1. Kemijski sastav lukova određen GC-MS analizom 29
3.2. Biološka svojstva 35
3.2.1. Antioksidacijska svojstva 35
3.2.2. Inhibicija kolinesteraza – Ellman metoda 38
4. ZAKLJUČAK 39
5. LITERATURA 40

UVOD

Luk (*Allium cepa* L.) je dvogodišnja biljka iz roda *Allium* s godišnjom svjetskom proizvodnjom od 55 milijuna tona. Poznato je da sadrži mnogo fitokemikalija poput karotenoida, minerala, fenola, fitoestrogena, vitamina, aminokiselina i drugih. Prosječno 80% sadržaja glavice luka čine ugljikohidrati poput glukoze, fruktoze, saharoze i niskomolekulskih fruktooligosaharida.[1] Specifičan miris i lakrimaciju (suzenje očiju) prilikom sjeckanja uzrokuje prisutnost hlapljivih sumporovih spojeva nastalih hidrolizom nehlapljivih *S*-alk(en)il cistein sulfoksida djelovanjem enzima aliinaza. Zbog svoga specifičnog mirisa i okusa jedan je od najčešćih sastojaka svakog jela, a koristi se i u medicinske svrhe, za smanjenja kolesterola i šećera u krvi.[2]

Alzheimerova bolest je jedna od najčešćih neurodegenerativnih bolesti koja uzrokuje demenciju kod velikog broja osoba starijih od 65 godina. Trenutno postoji veliko zanimanje za istraživanjem spojeva iz prirodnih izvora koji bi se koristili kao potencijalni terapeutici za ublažavanje simptoma ove bolesti. Jedan od najviše obećavajućih pristupa je tretman bolesti povećavajući razinu acetilkolina u mozgu inhibicijom kolinesteraza (acetilkolinesteraze, AChE i butirilkolinesteraze, BuChE).[3] Spojeve koje nalazimo u eteričnim uljima karakterizira mala molekulska masa i topljivost u mastima te time i sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru. Dosadašnja istraživanja većinom uključuju monoterpene kao česte sastojke eteričnih ulja. Međutim, druge klase spojeva koje uključuju i sumporove spojeve slabo su istražene te je u okviru ovog rada istražen potencijal isparljivih spojeva koji nastaju hidrolizom *S*-alk(en)il cistein sulfoksida prisutnih u *Allium* vrstama.

Između ostalih, oksidacijski stres se smatra jednim od uzroka pojave Alzheimerove bolesti stoga se učestalo paralelno provode istraživanja antioksidacijskih svojstava prirodnih, biološki aktivnih spojeva.

1. OPĆI DIO

1.1. *Allium cepa* L.

Luk (*Allium cepa* L.) (slika 1.) je vrsta roda *Allium* koji broji preko 500 vrsta, od kojih se čak 54 vrste nalaze na području Republike Hrvatske, svaka drukčijeg izgleda, boje, okusa, ali slične po biokemijskim i fitokemijskim svojstvima.

Slika 1. *Allium cepa* L.[4]

Sistematika luka:
Carstvo – Plantae
Divizija - Magnoliophyta
Razred - Liliopsida
Red - Asparagales
Porodica - Amaryllidaceae
Rod - *Allium*
Vrsta - *A. cepa* L.

Nazivi luka na drugim jezicima su *bulb onion* (engl.), *Zwiebel* (njem.), *oignon* (fr.), *cipolla* (tal.), *cebolla* (šp.), a nazivi za luk diljem Hrvatske su obični luk, kapula, ljutika glavata, crveni luk, crljenac, črlenec, itd.[5] Porijeklom je iz zapadne Azije, a danas se uzgaja diljem svijeta i spada u najkultiviraniju vrstu roda *Allium.* Luk je dvogodišnja jednosupnica, koja se koristi za ishranu tijekom godine kao lukovica i mladi luk. Luk se u kulinarstvu najčešće marinira i dehidrira. Od davnina je poznat kao narodni lijek protiv crijevnih oboljenja i bolesti koje izazivaju bakterije, za poboljšanje rada srca, regulaciju

šećera u organizmu, a nerijetko se koristi i kao oblog kod upalnih procesa i reumatizma. Posebno dragocjenu skupinu fitokemikalija u luku predstavljaju specifični flavonoidi (polifenoli s antioksidacijskim svojstvima), kvercetini i antocijani. Visoka biološka aktivnost luka rezultat je specifičnog kemijskog sastava te sadržaja ostalih komponenti od kojih dominiraju šećeri, vitamin C i karakteristično eterično ulje. Kemijski sastav lukovice i listova varira zavisno od sorte i načina proizvodnje, a za izravnu sjetvu u posljednjih dvadesetak godina stvoren je veliki broj hibrida različitih značajki. Prema obliku lukovice mogu biti plosnate, okrugle, četvrtaste, izdužene, a prema boji vanjske opne, odnosno unutrašnjih mesnatih listova bijele, žute i ljubičaste. Luk ne podnosi uzgoj u monokulturi zbog mogućnosti širenja bolesti i štetočina, stoga se obično ne uzgaja na istom mjestu 3 do 4 godine, što je preventiva protiv širenja plamenjače i lukove muhe.[6] Poznate vrste koje pripadaju ovom rodu su poriluk (*A. porrum*), češnjak (*A. sativum*), vlasac (*A. schoenoprasum*), medvjeđi luk (*A. ursinum*) i mnoge druge.

1.2. Sastav luka

Hranidbena vrijednost te vitaminsko-mineralni sastav luka prikazana je u tablici 1.:

Tablica 1. Hranidbena vrijednost te vitaminsko-mineralni sastav luka[7]

Nutritivne komponente	
Voda	88,6-92,8 %
Proteini	0,9-1,6 %
Masti	do 0,2 %
Ugljikohidrati	5,2-9,0 %
Ostalo	do 0,6 %
Energija	23-38 kalorija po 100 g

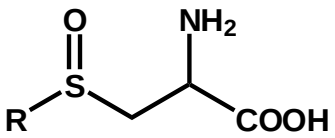
Elementi

Simbol	**mg u 100g svježe mase**
Ca	190-540
P	200-430
K	80-110
Na	31-50
Mg	81-150
Al	0,5-1
Ba	0,1-1
Fe	1,8-2,6
Sr	0,8-7
B	0,6-1
Cu	0,05-0,64
Zn	1,5-2,8
Mn	0,5-1,0
S	50-51

Vitamini

Vitamin D	0,3 mg
Riboflavin	0,05mg
Nikotinska kiselina	0,3mg
Vitamin C	0,0mg
Folna kiselina	16,0µg
Biotin	0,9 µg
Pantotenska kiselina	0,14mg

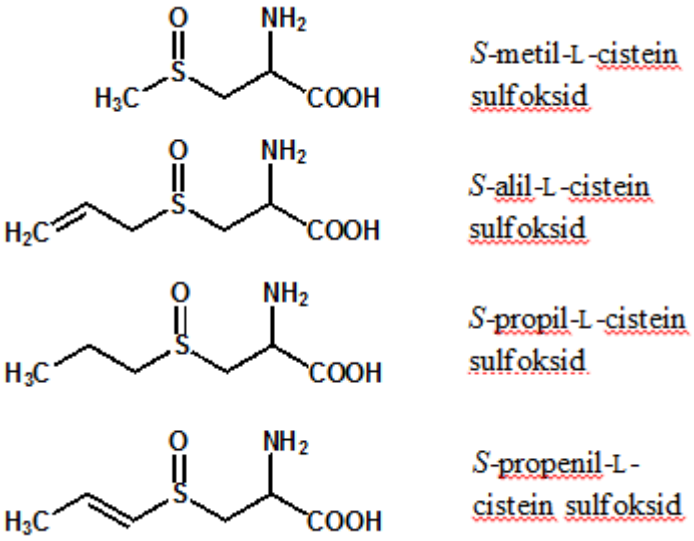
Specifični okus i miris koji se pojavljuje kad se biljka mehanički obrađuje, npr. sjeckanjem, nastaje zbog djelovanja enzima aliinaze koji hidrolizira nehlapljive *S*-alk(en)il cistein sulfokside (slika 2.) stvarajući reaktivne, hlapljive sumporove spojeve, tiosulfinate. Upravo su zbog tih spojeva luk i ostale *Allium* vrste cijenjene u kulinarstvu i sastavni su dio većine jela.



Slika 2. *S*-alk(en)il cistein sulfoksid

1.3. Mehanizam hidrolize *S*-alk(en)il cistein sufoksida

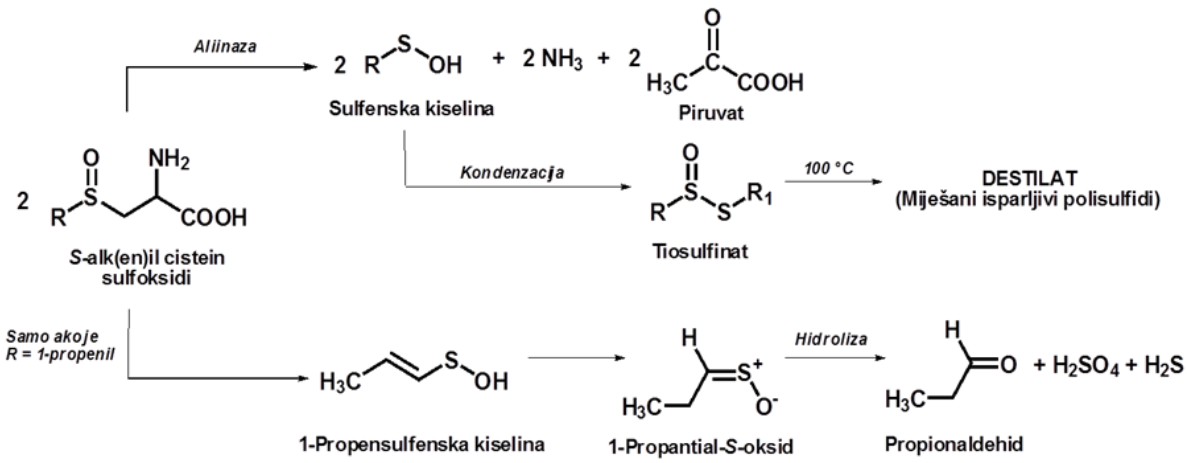
Karakteristični primjeri sekundarnih biljnih metabolita *S*-alk(en)il-cistein sulfoksida su *S*-metil-L-cistein sulfoksid (metiin), prisutan u većini *Allium* vrsta, *S*-alil-cistein sulfoksid (aliin), koji je karakterističan za češnjak, *S*-propenil-L-cistein sulfoksid (izoaliin), karakterističan za luk i *S*-propil-L-cistein sulfoksid (propiin), također prisutan u luku (slika 3.).[8]



Slika 3. Cistein sulfoksidi karakteristični za *Allium* vrste[9]

S-alk(en)il-cistein sulfoksidi su bez mirisa sve dok se tkivo ne ošteti. Kada se luk usitni, enzim aliinaza prisutan u vakuolama unutar stanice se oslobodi (slika 4.) čime dolazi do cijepanja veza između sumporovih i ugljikovih atoma. Enzim transformira *S*-alk(en)il-cistein sulfoksid dajući u početku alk(en)il sulfenske kiseline, amonijak i piruvat. Alk(en)il sulfenske kiseline su vrlo reaktivni međuprodukti iz kojih

kondezacijskim reakcijama odmah nastaju tiosulfinati. Tiosulfinati su nestabilni spojevi koji se dalje pregrađuju pri čemu nastaju različiti sumporovi spojevi.[8]



Slika 4. Mehanizam hidrolize *S*-alk(en)il cistein sulfoksida[9]

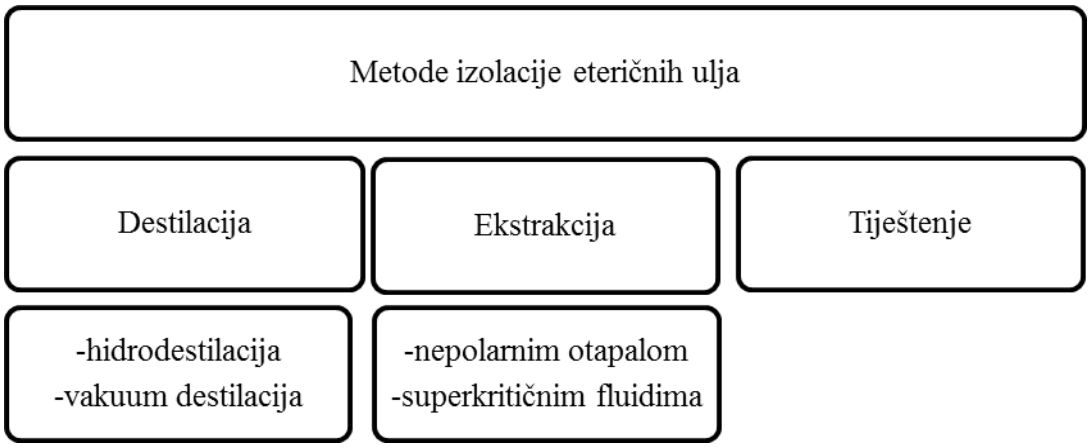
1.4. Eterična ulja

Eterična ulja su smjese slabih do jakih hlapljivih, lipofilnih sastavnica koje su izolirane iz čitavih biljaka ili biljnih dijelova. To su tekućine intenzivnog mirisa, najčešće ugodnog, a ponekad oštrog, gorkog te aromatičnog okusa čiji intenzitet i ton varira. Eterična ulja se dobro miješaju sa lipofilnim otapalima kao što su pentan, dietileter, kloroform, petroleter itd., dok im je topljivost u vodi vrlo niska. Imaju široku primjenu, od medicine, farmaceutske, kozmetičke i parfumerijske pa sve do prehrambene industrije.[10] Sastavne komponente eteričnog ulja se razlikuju po svojoj biosintezi pa se često dijele na terepenske i fenilpropenske spojeve.

Postoje i ulja koja sadrže spojeve s dušikom i/ili sumporom te ostale spojeve. Tako primjerice hlapljivo ulje crne gorušice (*Sinapis* aetherolum) ne pripada skupini tipičnih eteričnih ulja jer je u biljci lokalizirano u glikozidnom obliku (glukozinolati), a tek djelovanjem enzima mirozinaze cijepa se glikozidna veza. Eterična ulja agruma (*Aurantii amari* floris aetheroleum, *Limonis* aetheroleum) sadrže metilni ester antranilne kiseline, koji u strukturi ima dušik. S obzirom na funkcijske skupine sastavnice eteričnih ulja uključuju različite organske spojeve i to ugljikovodike, alkohole, fenole, aldehide, ketone, karboksilne kiseline, etere, estere, laktone, izotiocijanate, nitrile i dr. [11]

1.4.1. Metode izolacije eteričnog ulja

Eterična ulja su smjese velikog broja spojeva različite kemijske strukture. Sastojci eteričnog ulja su hlapljivi, nepolarni i slabo topljivi u vodi. Na osnovu tih svojstava razvile su se metode izolacije eteričnih ulja (slika 5).[10]



Slika 5. Shematski prikaz metode izolacije eteričnih ulja

1.4.1.1. Destilacija

Destilacija je postupak kod kojeg se tekućina zagrijava i prevodi u paru, a nastala para odvodi i hlađenjem kondenzira (ukapljuje). Najčešće vrste destilacija koje se primjenjuju su destilacije pri normalnom tlaku: jednostavna destilacija, frakcijska destilacija i destilacija s vodenom parom te destilacija pri sniženom tlaku (vakuum-destilacija: jednostavna i frakcijska).

Za pročišćavanje tekućina čije je vrelište do 200 °C, kao i za razdvajanje smjesa tekućina čija se vrelišta razlikuju za više od 80 - 100 °C, koristi se jednostavna destilacija pri normalnom tlaku. Smjese tekućina čija se vrelišta razlikuju za manje od 80 °C ne mogu se odvojiti jednostavnom destilacijom jer uz tekućinu nižeg vrelišta već na početku destilacije destilira i tekućina višeg vrelišta. Za odvajanje takvih smjesa tekućina primjenjuje se frakcijska destilacija ili rektifikacija.

Destilacija pri sniženom tlaku primjenjuje se za destilaciju tvari koje imaju vrelišta viša od 200 °C ili se raspadaju vrenjem pri normalnom tlaku. Smanjivanjem tlaka sustava u kojem se tekućina zagrijava snižava se i temperatura vrenja. Takva destilacija zove se i vakuum-destilacija.

Destilacija s vodenom parom primjenjuje se za izolaciju neke tvari iz smjese i za čišćenje organskih tvari visokog vrelišta (iznad 200 ºC) koje bi se termički razgradile jednostavnom destilacijom kod atmosferskog tlaka.[12]

1.4.1.2. Ekstrakcija

Ekstrakcija je jedna od metoda za pročišćavanje i za izolaciju neke tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću otapala. Bilo da se radi o ekstrakciji iz tekuće (ekstrakcija tekuće-tekuće) ili iz čvrste faze (ekstrakcija čvrsto-tekuće), organsko otapalo koje se primjenjuje za ekstrakciju treba zadovoljiti sljedeće uvjete:

- otapalo mora biti kemijski inertno prema prisutnim tvarima,
- tvar koju ekstrahiramo mora imati što bolju topljivost u tom otapalu,
- otopina iz koje ekstrahiramo željenu tvar i otapalo moraju se što više razlikovati prema gustoći,
- otapalo ne smije imati previsoko vrelište kako bi se, nakon ekstrakcije, moglo lako ukloniti,
- otapalo mora biti jeftino, što manje zapaljivo i otrovno.

Otapala koja se najčešće koriste za ekstrakciju su: dietil-eter, kloroform, petroleter, diklormetan itd. Ekstrakcija se temelji na različitoj topljivosti tvari koju želimo izdvojiti iz otopine i primjesa koje prate tvar, u dva otapala koja se ne miješaju. Pri tom dolazi do razdjeljenja tvari između dvaju otapala. Većinom su to voda (odnosno vodena otopina tvari) i neko organsko otapalo koje se s vodom ne miješa.[12]

Moderniji pristupi izolacije uključuju: ultrazvučnu ekstrakciju (ekstrakcija otapalom potpomognuta ultrazvukom), mikrovalnu ekstrakciju (ekstrakcija otapalom potpomognuta mikrovalovima), mikrovalnu ekstrakciju bez otapala i ubrzanu ekstrakciju otapalom (ekstrakcija kod povišene temperature i tlaka) te ekstrakciju aromatičnog bilja sa subkritičnim i superkritičnim fluidima (primjer je ekstrakcija s CO_2).

1.4.2. Metode analize eteričnih ulja

Kada govorimo o metodama analize eteričnih ulja, razlikujemo kromatografske i spektroskopske metode. Kromatografske metode služe za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje kemijskih sastojaka u složenim smjesama, a svim kromatografskim metodama zajedničko je postojanje nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne) faze. Kod ovih metoda plinovita ili tekuća mobilna faza nosi komponente uzorka kroz stacionarnu fazu, a odjeljivanje se temelji na razlikama u brzini kretanja komponenti kroz stacionarnu fazu.

Spektroskopija proučava interakciju elektromagnetskog zračenja i tvari pri čemu se u konačnici dobivaju emisijski (apsorpcijski) spektri karakteristični za određenu tvar. Spektroskopske tehnike se stoga danas široko primjenjuju za karakterizaciju i identifikaciju brojnih organskih i anorganskih vrsta.[10]

1.4.2.1 Plinska kromatografija – masena spektrometrija (GC-MS)

Kombinacija plinske kromatografije (GC) i masene spektrometrije (MS) je napravila preokret u analizi hlapljivih spojeva. Zanimljivost kombinacije tih tehnika leži u njihovom nadopunjavanju. Naime, dok GC služi za odjeljivanje i kvantitativnu analizu, MS precizno određuje kvalitativnu analizu uzorka uz postizanje osjetljivosti instrumenta od 10^{-12} do 10^{-15} grama uzorka.

U GC tehnici plin je pokretna faza i on se uvijek provodi u koloni tako da se analizirani spojevi prevedeni u plinoviti oblik eluiraju pomoću plina nositelja kao pokretne faze uzduž kolone. Kao plin nositelj obično se koriste inertni plinovi kao npr. He, Ar, N_2, pa nema interakcija s uzorkom koji se analizira.

Spektrometar mase kojim se analizira kvalitativni sastav uzorka je pod visokim vakuumom. Uzorak u plinskoj fazi ulazi u ionizator gdje se bombardira elektronima iz filametna (energije 70 eV). Ovim postupkom elektron-ionizacije, molekula uzorka se ionizira, stvarajući pozitivni molekulski ion, M^+ koji se dalje raspada na niz fragmenata što je posljedica visoke energije primljene tijekom ionizacijskog procesa. Koji će fragmenti nastati i u kojem intenzitetu ovisi o samoj strukturi molekule.

U magnetskom dijelu spektrometra masa ioni se ubrzavaju te pri prolazu kroz magnetsko polje ioni dobivaju otklon razmjeran njihovoj brzini, naboju i masi. Samo ioni određenog omjera mase i naboja (*m/z*) prolaze do detektora spektrometra masa. Kao rezultat analize dobije se spektar masa s odnosom intenziteta i omjera *m/z* nastalih fragmenata. Snimljeni spektri masa se uspoređuju s bazom podataka te računalnim putem računa postotak slaganja spektara, a time i pouzdanost identifikacije.[3,10]

1.5. Biološka važnost sumporovih spojeva

Sumporovim spojevima su dokazana brojna pozitivna biološka svojstva od kojih se posebno ističu antikancerogena, antioksidativna, antibakterijska svojstva, utjecaj na imunološki sustav i snižavanje lipida u krvi. Također se smatra se da konzumacija biljaka koje sadrže sumporove spojeve smanjuje mogućnost nastanka pojedinih tumora. Propil i propilen sulfatni derivati su rasprostranjeni u mnogim biljnim rodovima, a osobito u rodu *Allium*. Poznato je da u rodu *Allium* sumporove komponente sadrže različite prefikse sulfida, uključujući propilne, alilne, propenilne i metilne grupe. Kemotaksonomski *Allium* vrste se mogu podijeliti u četiri skupine: propilnu, alilnu, prop-1-enilnu i metilnu skupinu. Također, postoji velik broj tiosulfinata, kao što su alicin, dipropil-tiosulfinat i dimetil-tiosulfinat te tiosulfonata kao što su propil-metantiosulfonat i propil-propantiosulfonat, pronađenih isključivo u rodu *Allium*.

Sumporovi spojevi su rasprostranjeni u prirodi i predmet su interesa zbog raznolikog biološkog djelovanja. Većina ih ima neugodan miris, a razlog tomu je njihovo nastajanje razgradnjom organskih tvari. Iako ih zbog neugodnog mirisa ne očekujemo u eteričnim uljima, oni mogu biti dominantni spojevi. Primjerice eterično ulje češnjaka (*A. sativum*) ima drugačiji sastav od klasičnih ekstrakata češnjaka, no zadržava klasična djelovanja češnjaka. Djeluje antimikrobno, smanjuje krvni tlak i utječe na koagulaciju krvi (sprječava nastanak tromba). Glavni spojevi eteričnog ulja češnjaka su di-2-propenil-trisulfid, di-2-propenil-disulfid, metil-2-propenil-trisuflid i dialil-disulfid.[8]

1.5.1. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres se danas spominje u kontekstu mnogih bolesti poput ateroskleroze, Parkinsonove bolesti, infarkta miokarda, Alzheimerove bolesti te sindroma kroničnog umora. Pojam oksidacijskog stres označava poremećaj ravnoteže između stvaranja slobodnih radikala i sposobnosti obrambenih sustava u organizmu da te radikale eliminiraju. Slobodni radikali su atomi, ioni ili molekule koje u vanjskoj elektronskoj ljusci sadržavaju jedan nespareni elektron. Najčešće su to reaktivne kisikove vrste (ROS) i reaktivni dušikovi radikali (RNS). Oksidacijski stres, odnosno prekomjerno nakupljanje radikala u konačnici rezultira oštećenjem stanica čije su posljedice višestruke, od ubrzanog procesa starenja organizma (preuranjeno starenje stanica), pojave raznih kroničnih i malignih bolesti do izazivanja smrti stanica (apoptoza).

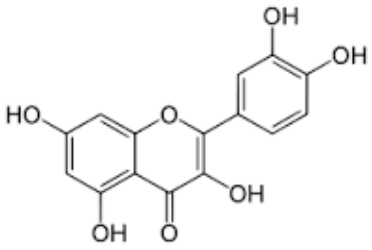
Reaktivni kisikovi radikali nastaju pri normalnim uvjetima aerobnog metabolizma svih naših stanica, a većina ih se oslobađa prilikom svake biokemijske redoks reakcije koja uključuje kisik. ROS se oslobađaju i posredstvom fagocita, tijekom različitih upalnih reakcija (npr. virusne infekcije). Kod zdravih ljudi, tijekom normalnog imunološkog odgovora organizam stvara povećanu količinu antioksidanasa i tako se održava ravnoteža koja sprječava pojavu stanja oksidacijskog stresa. Međutim, promjene okoliša, primarno kao posljedica povećanog zagađenja, tijekom zadnjih 10 godina rezultirale su povećanom izloženosti vanjskim izvorima ROS-a kojima je znatno više izložena populacija u velikim gradovima. Oni se oslobađaju kao posljedica izlaganja ionizacijskom zračenju, UV svijetlu, porastu koncentracije CO_2 u zraku, kemijskim zagađenjima, radioaktivnom otpadu i sl.

U stanjima kada vlastitom sintezom u stanicama ne nastaje dovoljna količina antiksidativnih enzima, nespareni elektroni ROS-a putuju našim tijelom u potrazi za elektronima koji se nalaze na terminalnim završecima biokemijskih tvari. Njihovo spajanje pokreće niz lančanih kemijskih reakcija i dovodi do oštećenja staničnih komponenata kao što su lipidi, proteini, enzimi pa i same stanične molekule DNA. Napadnute i oštećene stanične strukture više ne vrše svoju, za život važnu funkciju pa oštećenja nastala u napadnutoj stanici mogu predstavljati početak razvoja bolesti različitih organa i organskih sustava. Ukoliko se oštećenja ne poprave može doći do razvoja kroničnih i neizlječivih

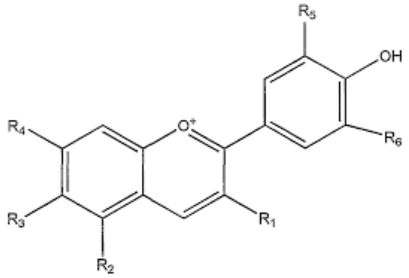
bolesti. Kumulativni efekt mnogih promjena induciranih slobodnim radikalima u konačnici može dovesti do nepopravljivih oštećenja i stanične smrti.[3]

1.5.1.1. Antioksidansi

Antioksidansi su tvari koje imaju sposobnost zaustavljanja ili odgađanja procesa oksidacije, na način da su same vrlo podložne oksidaciji. Antioksidansi imaju najbolji učinak u prevenciji bolesti uzrokovanih oksidacijskim stresom, a u organizam ih svakodnevno unosimo prehranom u obliku vitamina C, E i A, flavonoida, fenola, itd. [3]. Osim prethodno navedenih poznato je da *S*-alk(en)il cistein sulfoksidi iz *Allium* vrsta i njihovi produkti, polisulfidi i sulfoksidi imaju dobra antioksidacijska svojstva. Kao što je već rečeno flavanoidi koji su ujedno i jedni od najznačajnijih antioksidansa prisutnih u luku su kvercetin (slika 6.) i antocijani u obojenim lukovima (crvenom, ljubičastom) (slika 7.). Osim ovih spojeva iznimna antioksidacijska svojstva pokazuju alkil i alkenil disulfidi te njihovi sulfoksidi, prisutni čak u malim količinama. Mehanizam antioksidacije organskih disulfida, tj. sulfoksida prikazan je reakcijama (1), (2), (3) i (4), a reakcijom nastali RSSR ne dovodi do oksidacije u organizmu važnih molekula koje su inače podložne oksidaciji, čak štoviše on reagira sa radikalima poput $OH^{\bullet}$ čime pokazuje antioksidacijsku aktivnost te regenerira slobodne $RS^{\bullet}$ radikale, što je prikazano reakcijama (5) i (6).[13]



Slika 6. Kvercetin[14]



Slika 7. Antocijanin[15]

Mehanizam antioksidacije organskih sulfida[13] :

$$2RSS(O)R_1 + e^-aq \rightarrow RSSR_1{}^{-\bullet} + RSS(O_2)R_1 \quad (1)$$

$$RSSR_1{}^{-\bullet} \rightarrow RS^{\bullet} + R_1S^- \quad (2)$$

$$RS^- + OH^{\bullet} \rightarrow RS^{\bullet} + R_1S^- \quad (3)$$

$$RS^{\bullet} + RS^{\bullet} \rightarrow RSSR \quad (4)$$

Mehanizam regeneracije RS• radikala[13] :

$$RSSR + OH^{\bullet} \rightarrow RSOH + RS^{\bullet} \quad (5)$$

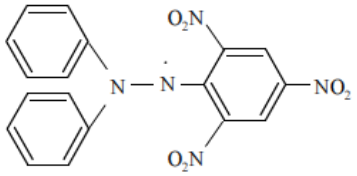
$$RSH + OH^{\bullet} \rightarrow RS^{\bullet} + H_2O \quad (6)$$

1.5.1.1.1. DPPH metoda

Metoda DPPH (metoda 'gašenja' slobodnih DPPH radikala) je jedna od najpoznatijih metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti različitih ekstrakata i spojeva. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH˙) je jedan od nekoliko stabilnih komercijalno dostupnih organskih dušikovih radikala koji sadrži jedan nespareni valentni elektron na jednom atomu dušikova mosta (slika 8.). Mehanizam reakcije antioksidansa (AH) s DPPH˙, temelji se na doniranju atoma vodika radikalu koji se reducira pri čemu nastaje DPPHH i radikal antioksidansa (A˙)

$$DPPH^{\cdot} + AH \leftrightarrow DPPHH + A^{\cdot}$$

Zbog svog nesparenog elektrona, DPPH˙ jako apsorbira u vidljivom dijelu spektra pri valnoj duljini 517 nm, a njegovom pretvorbom u neradikalni oblik dolazi do smanjenja apsorbancije, proporcionalno koncentraciji i antioksidacijskoj aktivnosti analiziranog uzorka. Uslijed redukcije dolazi do primjetnog blijeđenja otopine i promjene boje iz ljubičaste u žutu, a napredovanje reakcije se prati spektrofotometrom. Prednosti DPPH metode su jednostavnost izvedbe, dobra ponovljivost rezultata i mogućnost rada s malim količinama uzorka.[16]

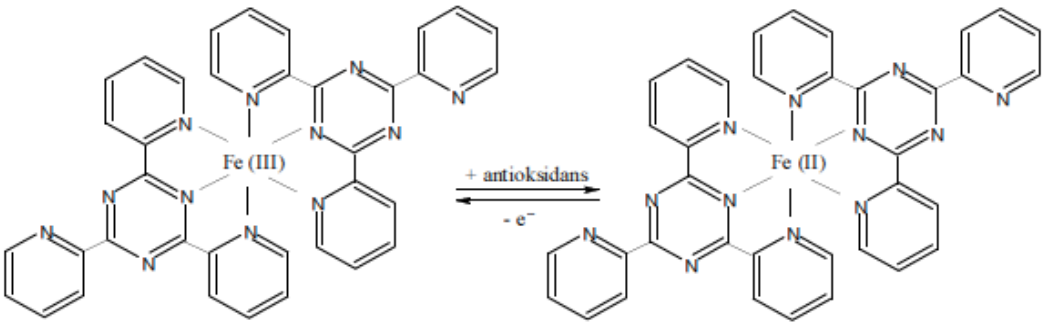


Slika 8. Struktura DPPH·[17]

1.5.1.1.2. FRAP metoda

Antioksidacijska svojstva istraživanih biljnih ekstrakata ispitana su metodom FRAP (engl. *Ferric Reducing/Antioxidant Power).* Metodu su inicijalno razvili Benzie i Strain (1996), kako bi odredili redukcijsku sposobnost plazme, pa je i njen prvobitni naziv bio *Ferric*

Reducing Ability of Plasma. Zbog daljnjeg razvoja i primjenu za određivanje antioksidacijske snage čajeva i vina naziv je korigiran u *Ferric Reducing/Antioxidant Power*. Mehanizam FRAP reakcije predstavlja reakciju izmjene jednog elektrona, u kojoj se kompleks željeza Fe(III)$(TPTZ)_2$ (TPTZ; 2,4,6-tripiridil-*s*-triazin) koristi kao oksidans (slika 9.). Redukcijom žuto obojenog kompleksa Fe^{III}-TPTZ u Fe^{II} oblik, uslijed prisustva antioksidansa i pri niskom pH, dolazi do pojave plavog obojenja, maksimalne apsorpcije pri 593 nm.[16]

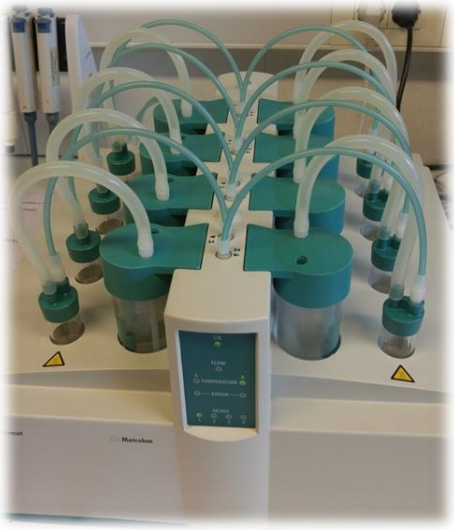


Slika 9. Mehanizam redukcije Fe^{III} u Fe^{II} [18]

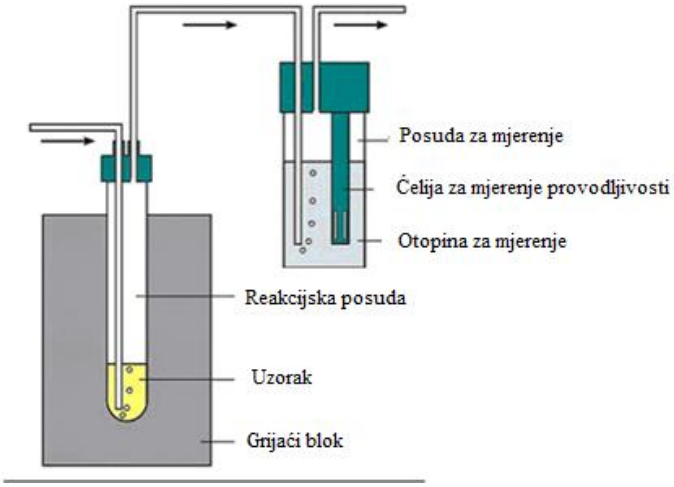
1.5.1.1.3. Rancimat metoda

temelji na određivanju vremena inhibicije, odnosno odgodi kvarenja nekog lipidinog medija (obično biljna ili životinjska ulja ili masti) koja je izložena akceleriranoj oksidaciji djelovanjem visokih temperature (intervala od 50 do 200ºC) i propuhivanjem uzorka u struji zraka (slike 10. i 11). Hlapljivi produkti oksidacije, uglavnom mravlja kiselina, nošeni strujom vrućeg zraka prelaze u posudu za mjerenje koja sadrži destiliranu vodu u kojoj se apsorbiraju i na taj način povećavaju njenu provodljivost. Provodljivost destilirane vode se kontinuirano prati, te se na temelju dobivenih podataka izradi krivulja oksidacije tzv. Rancimat krivulja, a određena točka infleksije dobivene krivulje je mjera oksidacijske stabilnosti uzorka. Indukcijski period (obično izražen kao vrijeme stabilnosti uzorka u satima) ukazuje na otpornost medija, u koji je dodan uzorak čiji se potencijalni antioksidacijski kapacitet ispituje, prema procesu oksidacije. Što je indukcijski period dulji,

to je oksidacijska stabilnost ili održivost medija veća, odnosno bolja je antioksidacijska aktivnost dodane tvari (uzorka).[3]



Slika 10. Uređaj Rancimat 743 (Methrom)



Slika 11. Shematski prikaz uređaja Rancimat[19]

1.5.2. Neurodegenerativne bolesti

U današnje vrijeme, kada se priča o neurodegenerativnim bolestima, poseban naglasak stavlja na Alzheimerovu bolest kao enigmu suvremene medicine jer pogađa preko 5% stanovništva u dobi iznad 65 godina, preko 50% stanovništva u dobi iznad 90 godina, a

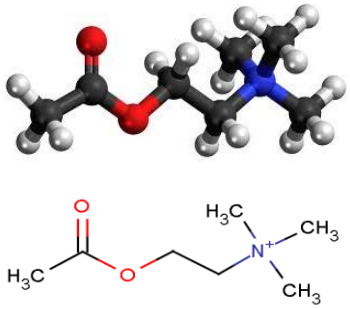
može se pojaviti i kod mladih ljudi, ali znatno rjeđe. Smatra se da samo u Hrvatskoj ima preko 80 000 oboljelih.[20]

1.5.2.1. Alzheimerova bolest

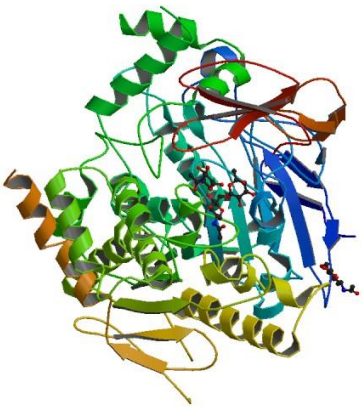
Alzheimerova bolest (AB) je prvenstveno bolest mozga koja napredovanjem dovodi do demencije, odnosno gubitka pamćenja, poremećaja mišljenja te promjena u ponašanju i osobnosti bolesnika. Unatoč brojnim novim spoznajama o AB, još uvijek nije poznat uzrok njenog nastanka. Ipak, suvremene teorije govore o moždanom deficitu acetilkolina i poremećaju metabolizma acetilkolina. Također, nije poznata ni adekvatna prevencija ove bolesti, a postojeće liječenje još uvijek je samo simptomatsko, tj. djeluje na usporavanje simptoma bolesti i odgodu težih faza bolesti.[20]

1.5.2.1.2. Acetilkolin, acetilkolinesteraza i Alzheimerova bolest

Acetilkolin (ACh) (slika 12.) je neuroprijenosnik u perifernom živčanom sustavu kojeg regulira enzim acetilkolinesteraza (AChE) (slika 13.). Enzimi su proteini koji kataliziraju gotovo sve biokemijske reakcije. Djelovanjem enzima značajno se povećavaju brzine reakcija, tako da biokemijske reakcije koje se odvijaju veoma sporo, uz pomoć enzima se događaju gotovo trenutno.



Slika 12. Kemijska struktura acetilkolina[3]



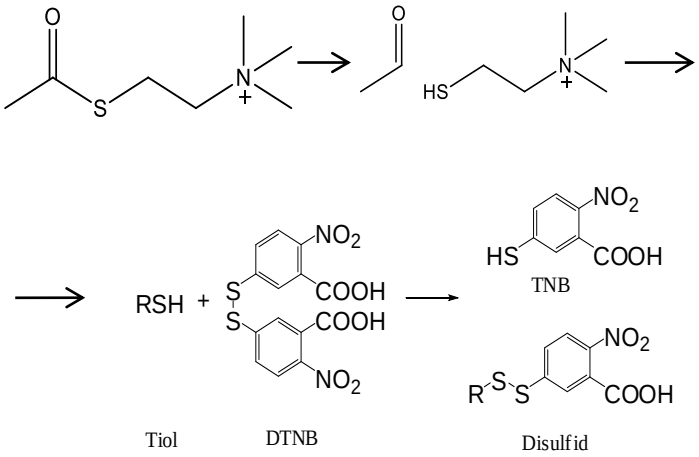
Slika 13. 3D struktura acetilkolinesteraza[10]

ACh se izlučuje u predsinaptičkoj pukotini te se veže na acetilkolinski proteinski receptor acetilkolina na postsinaptičkom području. Vezanjem ACh na receptor otvaraju se ionski kanali te dolazi do depolarizacije postsinaptičkog područja. Po otpuštanju s veznog mjesta na receptoru acetilkolin biva vrlo brzo razgrađen pomoću AChE na acetat i kolin. Ukoliko je esteraza inhibirana, acetilkolin se neće razgraditi i ponovo će se vezati na isti ili neki drugi receptor te uzrokovati depolarizaciju postsinaptičkog područja.

Dakle, hidrolizom acetilkolina, acetilkolinesteraza regulira efekt acetilkolina na kolinergičnoj sinapsi. Kolinergični neuroni su ključni u procesu pamćenja i učenja te primarno oni podliježu promjenama i degradaciji kod nastanka Alzheimerove bolesti Povećanje razine acetilkolina na način da se inhibicijom enzima acetilkolinesteraze uspori degradacija acetilkolina još uvijek predstavlja jedini način ublažavanja simptoma kod Alzheimerove bolesti. Budući da tvari koje se danas koriste kod AB (takrin, donepezil, rivastigmin, galantamin, mamantin i drugi) imaju i štetne utjecaje na zdravlje ljudi, nastoje se pronaći tvari prirodnog podrijetla koje će ih uspješno zamijeniti. Postoje također dokazi da oksidacijski procesi u organizmu dovode do oksidativnih oštećenja, od kojih je i navedeni poremećaj metabolizma acetilokolina. To je i razlog zbog čega se uz inhibicijsko djelovanje pojedinih tvari na kolinesteraze, ispituju i njihova antioksidacijska svojstva.[3,10]

1.5.2.2. Ellman metoda

Ellmanova metoda je jednostavna spektrofotometrijska metoda koja se koristi za mjerenje aktivnosti enzima acetilkolinesteraze (AChE), dnosno njegove inhibicije dodatkom potencijalnog inhibitora. Metoda se temelji na reakciji Ellmanovog reagensa, DTNB (5,5-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina)) s tiolnim skupinama supstrata koji nastaje djelovanjem AChE (slika 14.). DTNB reagira s tiolnim skupinama supstrata dajući 2-nitro-5-merkaptobenzojevu kiselinu (TNB), koja dalje u vodi ionizira u TNB^- anion kod neutralnog ili alkalnog pH. Oslobođeni TNB^- ion ima intenzivno žutu boju. Ellmanova metoda je brza metoda kod koje se dodatkom jednog mola tiola oslobađa jedan mol TNB^-. Dok je apsorpcijski maksimum DTNB-a pri 320 nm, količina oslobođenog TNB^- mjeri se pri valnoj duljini od 412 nm.[21]



Slika 14. Mehanizam reakcije u Ellman metodi[21]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal

Uzorak crvenog, ljubičastog i luka srebrenca (slika 15.) je pribavljen komercijalno. Podatci s deklaracije istaknute na pakiranju su sljedeći:

- Zemlja podrijetla: Hrvatska
- Distributer: Gomolava dd, Šeferova 10, Zagreb 10000
- Urod: 2016
- Klasa: 1
- Sastav: 2 luka crvena, 1 ljubičasti, 1 srebrenac

Slika 15. Uzorak luka

2.2. Korišteni uređaji i kemikalije

Uređaji:

- vodena kupelj, model SW22, Julabo GmbH, Seelbach, Njemačka
- tresilica, Vibromix 314EVT, Tehtnica, Slovenija
- uređaj za uparavanje s dušikom, Dri Block DB100/3, Techne, UK
- liofilizator, Shanghai Bilon Instrument Co. Ltd, Shanghai, Kina
- plinski kromatografa, model 3900 (Varian Inc., Lake Forest, CA, SAD)
- spektrometar masa, model 2100T (Varian Inc. Lake Forest, CA, SAD)
- višekanalni čitač mikrotitarskih pločica "Sunrise", Tecan GmbH, Austrija

Kemikalije:

- pentan, Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika
- dietil-eter, Panreac Quimica S.L.U., Barcelona, Španjolska
- bezvodni natrijev sulfat, AnalaR Normapur, Leuven, Belgija
- diklormetan, T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska
- natrijev-klorid ,T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH˙), Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- natrijev acetata, Alkaloid AD-Skopje, Skopje, Makedonija
- octena kiselina, Alkaloid Skopje, Skopje, Makedonija
- klorovodična kiselina, Kemika , Zagreb, Hrvatska
- 2,4,6-tripiridil-s-tirazin (TPTZ), Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka
- željezov (III) klorida, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka
- etanol, ,T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska
- DTNB, 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina) , Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka
- ATChI, acetiltiokolin jodid, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka
- AChE, enzim acetilkolinesteraza Tip V-S (E.C. 3.1.1.7, iz elektrofora električne jegulje) Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka
- BuTChI, butirilkolin jodid, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka

BuChE, butirilkolinesteraza (E.C. 3.1.1.8, iz konjskog seruma) Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka

2.3. Metode rada

2.3.1. Destilacija po Clevengeru

Destilacija po Clevengeru (slika 16.) spada u kategoriju vodenih destilacija. Kod ovog postupka, biljni materijal je uronjen u vodu u tikvici koja je smještena u kalotu za zagrijavanje. Sadržaj unutar tikvice se postupno zagrijava tako da hlapljivi spojevi isparavaju te se zajedno s vodenom parom dižu postranim cijevima aparature te se u konačnici kondenziraju u hladilu. Destilat se sakuplja u središnjem dijelu aparature. Destilacija se odvija pri temperaturi vrenja vode što nije dovoljno za izolaciju komponenti

visokog vrelišta. Vodeno-parni postupak destilacije ipak osigurava manju degradaciju sastojaka eteričnog ulja jer je biljni materijal nije uronjen u vodu već je u direktnom dodiru samo sa vodenom parom.[10]

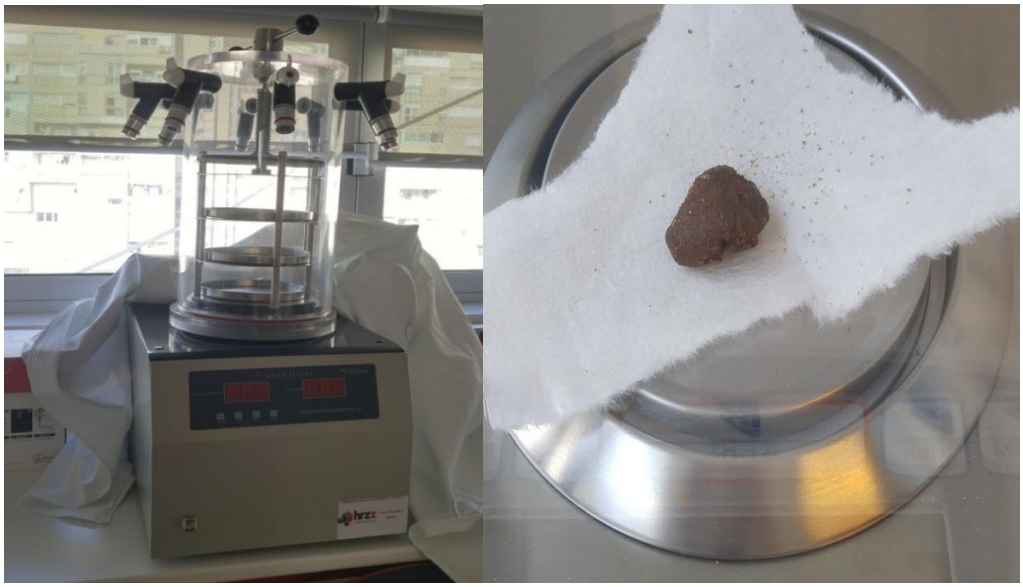
Slika 16. Aparatura za destilaciju po Clevengeru

Postupak: Nasjeckani uzorci tri različite vrste luka su stavljeni svaki u svoju tikvicu okruglog dna volumena 2L. U tikvicu s uzorkom dodana je destilirana voda te je sastavljen ostatak aparature za hidrodestilaciju po Clevengeru. Sadržaj tikvice se zagrijavao do vrenja, i nastavio se zagrijavati još 2,5 do 3 sata dok se odvijala destilacija. U središnjem dijelu aparature se skupljalo eterično ulje u trapu koji je pripravljen miješanjem pentana i dietil-etera u omjeru 3:1 (ukupni volumen trapa bio je 10 mL). Po završetku destilacije, nakon što su svi dijelovi aparature ohladili, trap se odijelio i dodao mu se bezvodni natrijev sulfat kako bi uklonio eventualno zaostalu voda. Uzorak je do analize čuvan u bočici u zamrzivaču.

2.3.2. Liofilizacija

Liofilizacija je proces dehidratacije kod kojeg se tvar ili namirnica iz koje se uklanja voda najprije zamrzne, a zatim se voda u namirnici izdvaja prvo postupkom sublimacije (primarno sušenje), a zatim i desorpcijom (sekundarno sušenje) do količine koja neće više podržavati rast živih organizama (aktivitet vode) ili kemijske/biokemijske reakcije. Postupak liofilizacije se koristi kao metoda sušenja u namirnicama kod kojih želimo očuvati miris, okus i nutritivno vrijedne sastojke, skladištiti je duži vremenski period bez značajnijeg gubitka kvalitete čak i na sobnoj temperaturi (uz pravilno pakiranje i skladištenje), postići sposobnost brze rehidratacije (rekonstitucija, nadoknada tekućine).[22]

Postupak: Nehlapljivi vodeni ostatak u tikvici je prvotno „grubo“ filtriran preko naboranog filtar papira kako bi se odijelio biljni materijal od ekstrakcijskog otapala (vode). Nakon stajanja 24 h u hladnjaku, dobivena otopina je filtrirana primjenom vakuum filtracije te je dobiven relativno bistri filtrat pogodan za liofilizaciju. Liofilizacija se izvodila u uređaju (slika 17.) koji se sastoji od komore za sušenje sa 5 do 8 držača tikvica; vakuum pumpe koja smanjuje tlak zraka okoline u komori za sušenje te kondenzatora koji uklanja vlagu kondenzacijom na hladnoj površini (-40 do -80°C).



Slika 17. Liofilizator i liofilizirani uzorak crvenog luka

2.3.3. Autoliza i ekstrakcija

Postupak: Uzorci luka su nasjeckani i stavljeni u Erlenmeyerovu tikvicu zatvorenu staklenim čepom i dobro zaštićenu parafilmom. Uronjeni su u vodenu kupelj i ostavljeni na autolizi 24 h na temperaturi od 37°C (pogodnoj za aktivnost enzima) uz miješanje (120 okretaja po minuti). Nakon provedene autolize dodano je 10 mL diklormetana i ostavljeno desetak minuta na tresilici. Dobiveni uzorak je procijeđen preko cijedila. Ekstrakcija je izvedena u lijevku za odjeljivanje gdje su se nakon intenzivnog miješanja sadržaja odvojila dva sloja, gornji vodeni i donji diklormetanski (slika 18.). Donji sloj se ispustio u suhu čašu i dodala mu se mala količina Na_2SO_4 kako bi se uklonila eventualno zaostala voda. Postupak ekstrakcije je ponovljen dva puta te su združeni organski slojevi nakon sušenja prebačeni u bočicu i skladišteni u zamrzivaču do analize.

Slika 18. Autoliza na vodenoj kupelji i ekstrakcija

2.3.4. Uparavanje otapala u struji dušika

Uzorci eteričnog ulja dobiveni destilacijom i ekstrakcijom su upareni u struji dušika uz grijanje kako bi se uklonilo prisutno otapalo i koncentrirao uzorak. Pri tome se koristio uređaj Dri- Block DB100/3 (slika 19.).

Slika 19. Dri – Block DB100/3

2.4. Metoda analize

2.4.1. GC-MS analiza

Kvalitativna analiza pripremljenih uzoraka je urađena uz korištenje plinskog kromatografa, model 3900 (Varian Inc., Lake Forest, CA, SAD) sa plamenoionizacijskim detektorom (FID) te spektrometrom masa (MS) model 2100T (Varian Inc. Lake Forest, CA, SAD). U analizi su korištene nepolarna kolona VF-5MS dimenzija: 30 m dužine, unutarnji promjer 0.25 mm i debljina stacionarne faze 0.25 μm (slika 20.). Temperaturni program za kolonu VF-5MS je postavljen na način da je početna temperatura bila 60°C i izotermalno postavljena 3 minute, nakon čega je povećavana do 246°C brzinom 3°C×min^{-1} i nakon toga postavljena izotermalno 25 minuta. Ostali kromatografski uvjeti su: plin nosioc je bio helij; brzina protoka 1 mL×min^{-1}; injekcijski blok je zagrijan na 250 °C; volumen analiziranog uzorka bio je 1μL; omjer raspodjele 1:50. Uvjeti MS su bili sljedeći: ionizacijski potencijal je bio 70 eV; temperatura ionskog izvora 200°C; raspon masa za skeniranje je bio od 40-350 masenih jedinica.

Pikovi su identificirani njihovih vremena zadržavanja (u odnosu na standardnu seriju n-alkana C_9-C_{30} za VF-5MS kolonu) s onim iz literature (Adams, 2007) i/ili vremenima zadržavanja komercijalnih standarda. Maseni spektri su također uspoređivani s literaturom.[10]

Slika 20. GC-MS uređaj

2.5. Metode bioloških ispitivanja

2.5.1. DPPH metoda

Reakcijska smjesa se sastojala od 200 μL otopine DPPH u etanolu koncentracije 0,04 g/L i 10 μL uzorka.

Postupak: Mjerenje se izvodi koristeći višekanalni čitač mikrotitarskih pločica "Sunrise" (Tecan GmbH, Austria) pri valnoj duljini od 517 nm, sa automatskim miješanjem i snimanjem podataka na računalo. Reaktanti se otpipetiraju u otvor pločice te im se očita apsorbancija nakon 60 min[21], a postotak inhibicije DPPH radikala (% inhibicije $DPPH^{\cdot}$) računa se prema izrazu:

$$\% \text{ inhibicije } DPPH^{\cdot} = [(A_{C(0)} - A_{A(t)})/ A] \times 100$$

gdje je:

- $A_{C(0)}$- apsorbancija kontrole (otopina DPPH radikala) kod t = 0 minuta
- $A_{A(t)}$- apsorbancija reakcijske smjese nakon t = 1 sata[16]

2.5.2. FRAP metoda

Priprema FRAP reagensa:

Acetatni pufer 0,3 M; pH 3,6; 1 L : pomiješati 3,1 g natrij-acetata trihidrata i 16 mL glacijalne octene kiseline (pomiješa se s vodom do volumena 1L).

10mM otopina 2,4,6-tripiridil-s-tirazin (TPTZ) u 40 mM HCl: Otopiti 0,031g TPTZ-a u 10 mL 40 mM otopine HCl (dodati 33 μL HCl 37% u 10 mL vode). (Otopinu čuvati na hladnom i tamnom mjestu.)

Otopina željezo (III) heksahidrata ($FeCl_3$ x $6H_2O$): otopiti 0,054g u destiliranoj vodi i nadopuniti do 10 mL.

FRAP reagens: pomiješati 25 mL acetatnog pufera sa 2,5 mL otopine TPTZ reagensa i 2,5 mL otopine $FeCl_3$ x $6H_2O$.

Standardna kalibracijska krivulja: pripremiti matičnu otopinu 2mM željezo (II) sulfata heptahidrata ($FeSO_4$ x $7H_2O$): otopiti 0,0056g ($FeSO_4$ x $7H_2O$) u 10 mL destilirane vode.[21]

Postupak: U svježe pripravljenu otopinu FRAP reagensa (225 μL) doda se 7,5 μL uzorka te se mjeri apsorbancija na mikrotitarskom čitaču pločica pri valnoj duljini 595 nm i 37°C. FRAP vrijednost uzorka izražava se u μmol ekvivalentima Fe^{2+}/L[21].

2.5.3. Rancimat metoda

Za određivanje antioksidacijske učinkovitosti uzoraka u inhibiciji oksidacije ribljeg ulja korišten je automatski uređaj za određivanje oksidacijske stabilnosti Rancimat model 743 (Metrohm, Švicarska) (slika 10).

Postupak: Za svako mjerenje je odvagana masa uzorka ribljeg ulja od 3,0 te je istom dodano po 100 μL ispitivanog uzorka. Temperatura grijačeg bloka je bila podešena na 100°C, a protok zraka na 20 $L \times h^{-1}$. Dobiveni rezultat je izražen kao indukcijski period (IP) u satima. Djelovanje antioksidansa (uzoraka) na produljenje oksidacijske stabilnosti određeno je stabilizacijskim ili zaštitnim faktorom (PF) prema izrazu:

$$PF = IP_{inh} / IP_0$$

gdje je:

- IP_{inh} = indukcijski period ribljeg ulja u koje je dodan uzorak (h)

- IP_0 = indukcijski period "čistog" ribljeg ulja bez dodanog uzorka (h)

Zaštitni faktor (PF) je mjera koliko se puta poveća stabilnost ili održivost nekog ulja ili masti po dodatku antioksidansa.[3]

2.5.4. Ellman metoda

Priprema reagensa:

Za AChE:

Otopina DTNB: otopiti 13.079 mg DTNB u 5 mL pufera (pH 7).

Otopina ATChI: otopiti 15.9 mg ATChI u 5 mL pufera (pH 8).

Otopina AChE: pomiješati 6.6 μL AChE s 5 mL pufera (pH 8).

Za BuChE:

Otopina DTNB: otopiti 11.89 mg DTNB u 5 mL pufera (pH 7).

Otopina S-BuTChI: otopiti 17.45 mg S-BuTChI u 5 mL pufera (pH 8).

Otopina BuChE: pomiješati 14 μL BuChE u 5 mL pufera (pH 8).

Postupak: Mjerenje se vršilo na višekanalnom čitaču mikrotitarskih pločica "Sunrise" pri 405 nm uz automatsko miješanje i pohranjivanje podataka na računalo. U reakcijsku smjesu je dodano 180 μL fosfatnog pufera te po 10 μL DTNB-a, AChE, ATChI i uzorka. Uzorci se otpipetiraju u jažice, s time da se supstrat, ATChI dodaje neposredno prije početka mjerenja budući da započinje reakciju. Za negativnu kontrolu korišten je etanol, a za pozitivnu takrin. Neenzimska hidroliza praćena je tzv. "blank" mjerenjima, odnosno slijepim probama. U jednoj slijepoj probi izostavljena je AChE, a u drugoj ATChI koji se zamijeni jednakim volumenom pufera Sva mjerenja su vršena u četiri ponavljanja pri sobnoj temperaturi, u trajanju od 6 minuta.[10,21]

Slika 21. Poluautomatska pipeta i višekanalni čitač mikrotitarskih pločica "Sunrise"[10]

3. REZULTATI I RASPRAVA

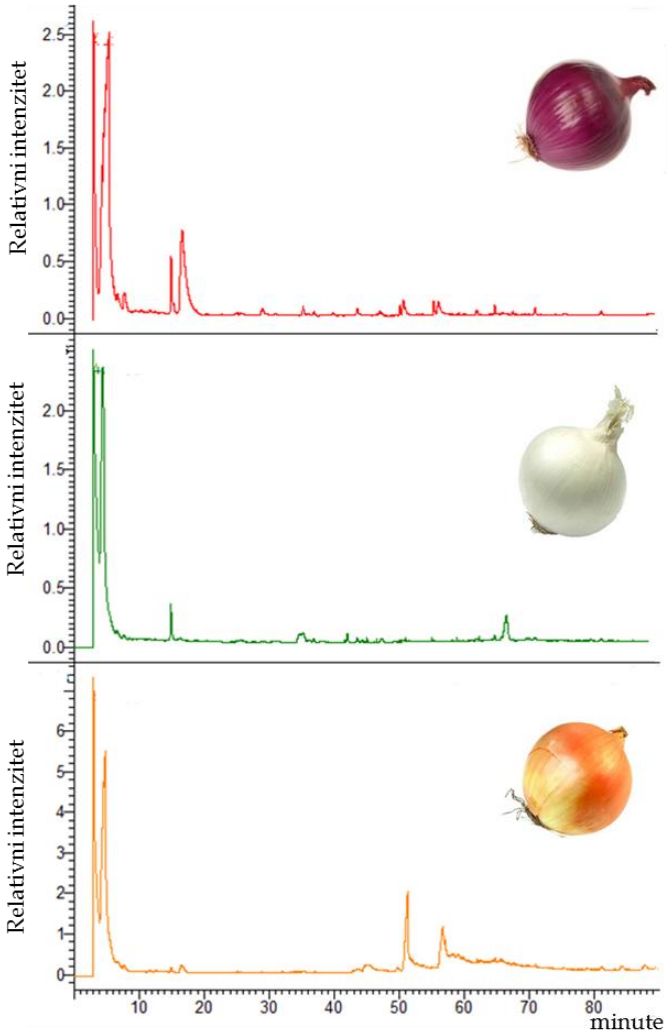
Luk (*Allium cepa L.*) je vrsta roda *Allium* koji broji preko 500 vrsta, od kojih se 54 vrste nalaze na području Republike Hrvatske. Od davnina je poznat kao narodni lijek protiv crijevnih oboljenja i bolesti koje izazivaju bakterije, za poboljšanje rada srca, regulaciju šećera u organizmu, a nerijetko se koristi i kao oblog kod upalnih procesa i reumatizma. Visoka biološka vrijednost luka rezultat je specifičnog kemijskog sastava u kojem dominiraju šećeri, vitamin C i karakteristično eterično ulje. Specifični okus i miris koji se pojavljuje kad se biljka mehanički obrađuje, npr. sjeckanjem, nastaje zbog djelovanja enzima aliinaze koji hidrolizira nehlapljive *S*-alk(en)il cistein sulfokside stvarajući reaktivne, hlapljive sumporove spojeve, tiosulfinate.

Cilj rada bio je odrediti sastav hlapljivih izolata tri varijeteta luka (*Allium cepa* L.) i to crvenog, ljubičastog i luka srebrenca. Hidrodestilacijom u aparaturi po Clevengeru nakon 2,5 do 3 sata dobivena su eterična ulja luka. Također, uzorci luka su sitno nasjeckani kako bi u luku prisutan enzim aliinaza mogao doći u kontakt s nehlapljivim *S*-alkenil cistein sulfoksidima. Djelovanjem enzima dolazi do hidrolize prisutnih nehlapljivih prekursora. Autoliza se provodila tijekom 24 sata pri temperaturi od 37 °C i brzini potresanja od 120 okretaja po minuti te su ekstrakcijom s diklormetanom dobivene hlapljive smjese. Svi hlapljivi izolati su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografja - spektrometrija masa (GC-MS).

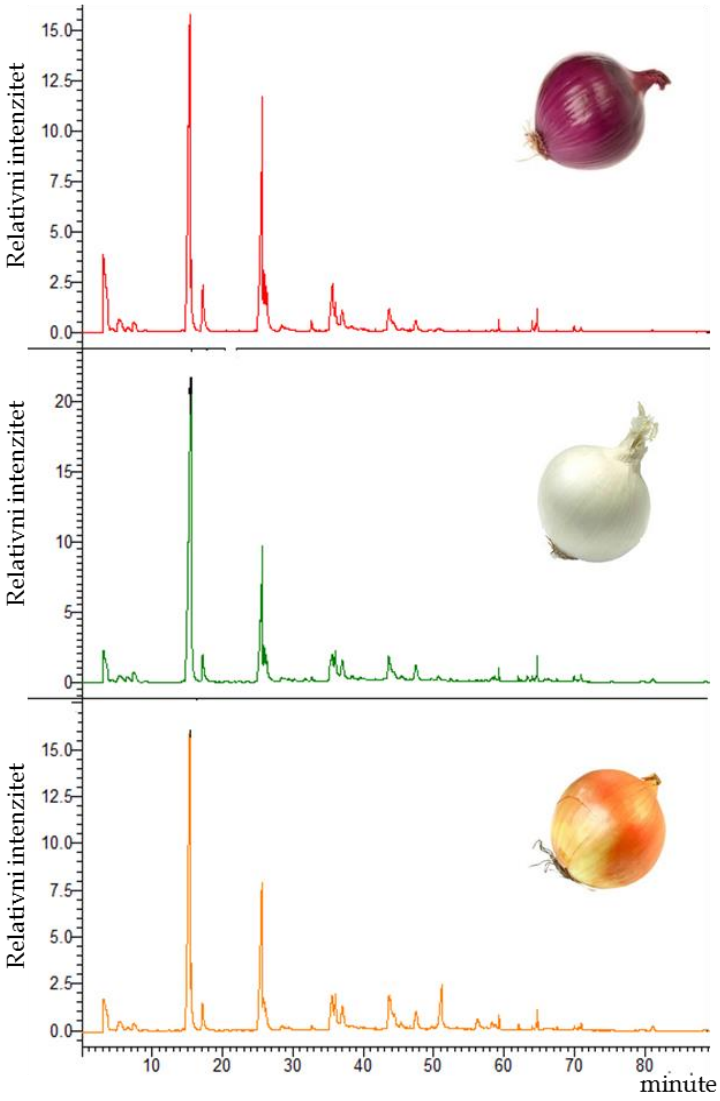
Cilj rada je bio ispitati biološka svojstva uzorka koja uključuju antioksidacijska svojstva i inhibiciju kolinesteraza.

3.1. Kemijski sastav lukova određen GC-MS analizom

Na slici 22. i 23. prikazani su kromatogrami ukupne ionske struje dobivenih diklormetanskih ekstrakata i hidrodestilacijom dobivenih eteričnih ulja.



Slika 22. Kromatogrami ukupne ionske struje diklormetanskog ekstrakta



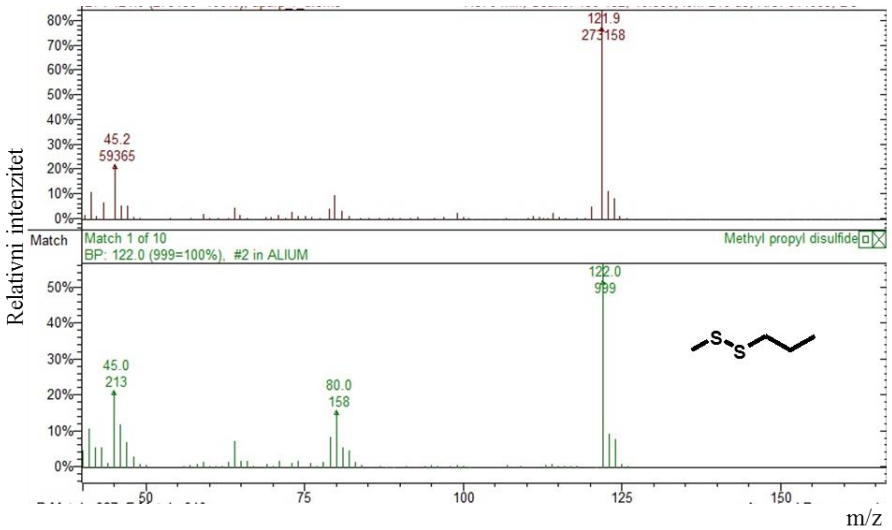
Slika 23. Kromatogrami ukupne ionske struje eteričnog ulja dobivenog hidrodestilacijom po Clevengeru

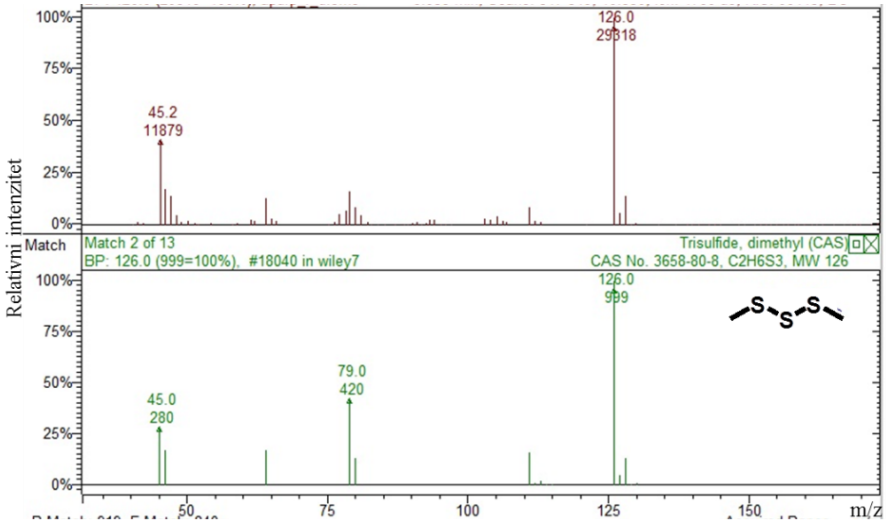
Usporedbom dobivenih kromatograma, može se uočiti razlika u kemijskom sastavu. Naime, GC-MS analiza je pokazala da su u eteričnom ulju dobivenom hidrodestilacijom prisutni hlapljivi sumporovi spojevi, dok se u diklormetanskom ekstraktu nije pokazala njihova prisutnost. Iz kromatograma se također vidi da je kemijski sastav eteričnog ulja crvenog luka i luka srebrenca jednak. Sastav eteričnih ulja prikazan je tablici 2.

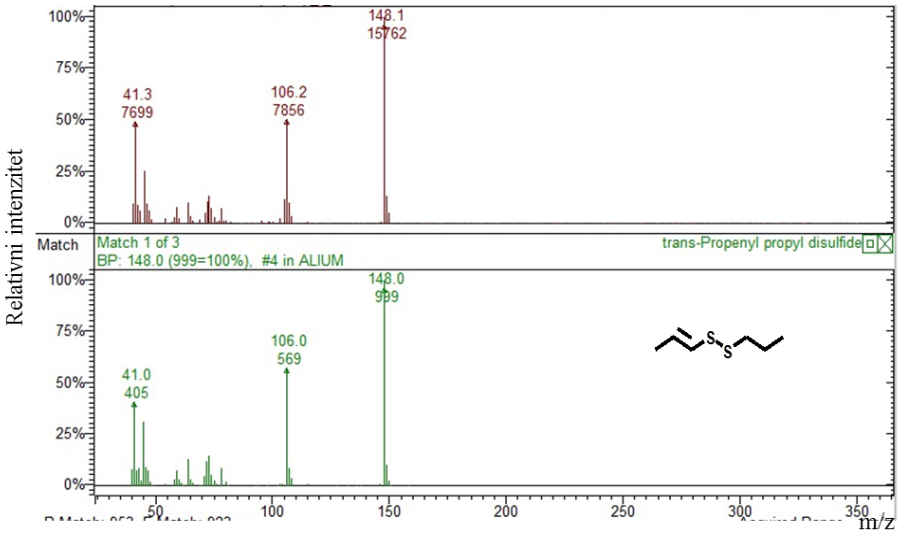
Tablica 2. Kemijski sastav eteričnih ulja luka dobivenih destilacijom

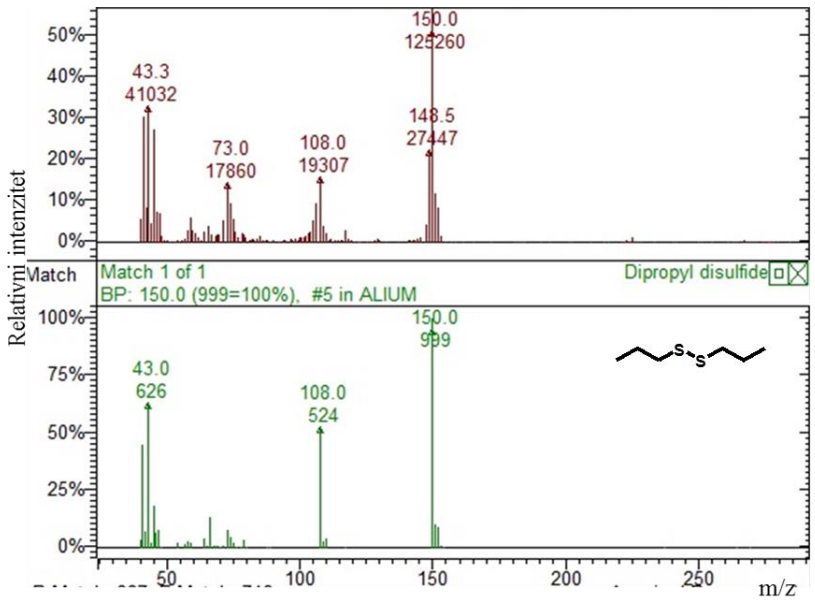
Kemijski spoj	**Vrijeme zadržavanja (min)**	**Eterično ulje (%)**
Metilpropil disulfid	7,2	1,0 - 1,5
Dimetil trisulfid	8,8	0,1 – 0,3
trans–Propenil propil disulfid	14,1	0,2 – 0,5
Dipropil disulfid	15,0	34,9 – 44,8
Dipropil trisulfid	25,5	17,6 – 20,3

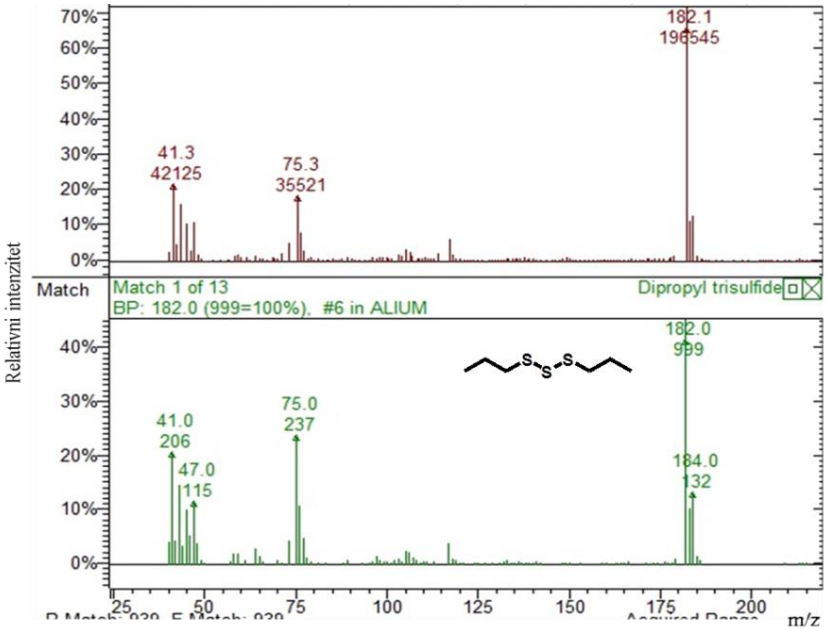
GC-MS analizom utvrđeno je da eterično ulje dobiveno hidrodestilacijom sadrži u najvišem postotku alkil sulfide, točnije dipropil disulfid (34,9 – 44,8%) i dipropil trisulfid (17,6 – 20,3%), dok je postotak prisutnog nezasićenog *trans*-propenilpropil disulfida vrlo nizak (0,2 – 0,5%) u odnosu na prethodno spomenute. Spektri masa identificiranih spojeva prikazani su na slici 24.




Relativni intenzitet
100%
75%
50%
25%
0%
126.0
29318
45.2
11879
Match
Match 2 of 13
BP: 126.0 (999=100%), #18040 in wiley7
Trisulfide, dimethyl (CAS)
CAS No. 3658-80-8, C2H6S3, MW 126
126.0
999
79.0
420
45.0
280
50
75
100
125
150
m/z


Relativni intenzitet
100%
75%
50%
25%
0%
148.1
15762
41.3
7699
106.2
7856
Match
Match 1 of 3
BP: 148.0 (999=100%), #4 in ALIUM
trans-Propenyl propyl disulfide
148.0
999
106.0
569
41.0
405
50
100
150
200
250
300
350
m/z


Relativni intenzitet
50%
40%
30%
20%
10%
0%
150.0
125260
43.3
41032
148.5
27447
73.0
17860
108.0
19307
Match
Match 1 of 1
BP: 150.0 (999=100%), #5 in ALIUM
Dipropyl disulfide
100%
75%
50%
25%
0%
150.0
999
43.0
626
108.0
524
50
100
150
200
250
m/z



Slika 24. Spektri masa eteričnog ulja dobivenog hidrodestilacijom

Na svakoj slici gornji spektar (otisnut crvenom bojom) predstavlja realni spektar, a donji spektar (otisnut zelenom bojom) onaj iz neke od dostupnih baza podataka. U svim spektrima se jasno uočava molekulski pik (M^+) koji odgovara molekulskoj masi spoja a ujedno je i osnovni pik, tj. za dipropil disulfid to je m/z =150, za dipropil trisulfid je m/z =182, za metilpropil disulfid je m/z =122, za *trans*–propenilpropil disulfid je m/z =148, a za dimetil trisulfid je m/z =126.

Na temelju spojeva (tablica 2.) koji predstavljaju razgradne produkte nehlapljivih cistein sulfoksida, pretpostavljena je prisutnost prekursora u *Allium cepa* L., i to: metiin, propiin i izoaliin. Ono po čemu je prisutnost propiina zanimljiva je upravo to što njegovom hidrolizom nastaje spoj, koji predstavlja lakrimacijski faktor tj. uzrokuje poznato suzenje očiju prilikom sjeckanja luka.

3.2. Biološka svojstva

U svrhu istraživanja bioloških svojstava testirane su sve analizirane hlapljive smjese. Pored navedenih uzoraka, testiran je i nehlapljivi dio dobiven liofilizacijom vodenog ekstrakta nakon hidrodestilacije. Prilikom istraživanja ispitivani su samo uzorci dobiveni od ljubičastog i crvenog luka, budući da je sastav sumporovih spojeva jednak u svim lukovima.

3.2.1. Antioksidacijska svojstva

U svrhu procjene antioksidacijskih svojstava korištene su tri metode (DPPH i FRAP, Rancimat metoda) koje se zasnivaju na različitim mehanizmima.

2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH*) metoda je spektrofotometrijska metoda (mjerenja pri 517 nm), a koja se temelji na sposobnosti „gašenja" molekula radikala. Rezultati su prikazani u tablici 3.

Tablica 3. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti korištenjem DPPH metode

Uzorak	Koncentracija (mg/mL)	DPPH (% inhibicije)
Crveni luk (destilat)	5	5,7
	1	5,5
Ljubičasti luk (destilat)	5	6,9
	1	5,9
Crveni luk (ekstrakt)	5	5,6
	1	5,6
Ljubičasti luk (ekstrakt)	5	5,8
	1	5,0
Crveni luk (liofilizat)	5	10,8
	1	8,8
Ljubičasti luk (liofilizat)	5	16,7
	1	9,3

Iz rezultata dobivenih testiranjem antioksidacijskih svojstava luka DPPH metodom može se zaključiti da eterična ulja pokazuju relativno slaba antioksidacijska svojstva za razliku od liofilizata koji su pokazali znatno veći postotak antioksidacije. Ipak, generalno gledajući antioksidacijska aktivnost liofiliziranih uzoraka određena metodom DPPH nije značajna.

FRAP (*Ferric Reducing/Antioxidant Power*) metoda je također spektrofotometrijska metoda (mjerenja pri 593 nm) koja se zasniva na sposobnosti antioksidansa da sudjeluje u reakciji redukcije Fe(III) u Fe(II). Rezultati FRAP metode su prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti korištenjem FRAP metode u Ekv

Uzorak	**Koncentracija (mg/mL)**	**FRAP (mM Fe^{2+})**
Crveni luk (destilat)	5	13,81
	1	6,94
Ljubičasti luk (destilat)	5	43,81
	1	15,06
Crveni luk (ekstrakt)	5	10,69
	1	8,81
Ljubičasti luk (ekstrakt)	5	43,81
	1	21,31
Crveni luk (liofilizat)	5	168,81
	1	69,44
Ljubičasti luk (liofilzat)	5	324,44
	1	78,19

Iz rezultata dobivenih FRAP metodom vidljivo da eterična ulja luka nemaju dobro antioksidacijsko djelovanje koje se očituje u sudjelovanju u redoks reakcijama. Kao i kod prethodne metode, liofilizat je pokazao značajnije bolje antioksidacijsko djelovanje.

Rancimat metoda koristi visoku temperaturu (100 °C) i struju zraka (20 L/h) u svrhu ubrzanja oksidacije ulja ili masti, a kao mjera užeglosti konduktometrijski (platinska

elektroda) se mjeri provodljivost otopine u kojoj se apsorbiraju produkti oksidacije. Rezultati su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Rezultati Rancimat metode

Uzorak	Vrijeme stabilnosti (h)
Kontrola (riblje ulje)	0,17
Crveni luk (destilat)	0,17
Ljubičasti luk (destilat)	0,42
Crveni luk (ekstrakt)	0,17
Ljubičasti luk (ekstrakt)	0,39
Crveni luk (liofilizat)	0,42
Ljubičasti luk (liofilizat)	0,39

Iz rezultata ispitivanja luka rancimat metodom vidljivo je da se dodatkom određenih uzoraka vrijeme stabilnosti produljilo u odnosu na kontrolu koja predstavlja čisto riblje ulje, ali nedovoljno da bi se moglo govoriti o antioksidacijskom učinku hlapljivih sumporovih spojeva. Ipak, zanimljivo je primijetiti kako je ova metoda, za razliku od DPPH i FRAP-a, pokazala različitost u rezultatima za pojedine varijetete luka, što otvara pitanje je li pojedine komponente prisutne u hlapljivim frakcijama ljubičastog luka tijekom same Rancimat metode (budući da se radi o povišenim temperaturama) doživljavaju strukturne promjene i degradiraju se u spojeve koji imaju značajnije antioksidacijsko djelovanje.

Slaba antiradikalna (DPPH metoda) i redukcijska (FRAP metoda) se potencijalno može povezati s kemijskim sastavom uzoraka, točnije visokim udjelom zasićenih sulfida. S druge strane, jedini prisutni nezasićeni sulfid ima dvostruku vezu u položaju 1, odnosno u blizini veze sa sumporom, što je prema dostupnim literaturnim podacima uzrok smanjene antioksidacijski aktivnosti spoja u odnosu kada je dvostruka veza u položaju 2.[11]

3.2.2. Inhibicija kolinesteraza – Ellman metoda

Povećanje razine acetilkolina na način da se inhibicijom enzima acetilkolinesteraze uspori degradacija acetilkolina još uvijek predstavlja jedini način liječenja ublažavanja simptoma kod Alzheimerove bolesti. U tu svrhu nastoje se pronaći djelotvorne tvari prirodnog podrijetla. U tu svrhu istraživanja koja uključuju spojeve male molekulske mase i lipofilnih svojstava koji mogu proći tzv. krvno-moždanu barijeru naročito su interesantna. Acetilkolinesteraza (AChE), predstavlja enzim važan u ranoj fazi Alzheimerove bolesti), dok butirilkolinesteraza (BuChE) predstavlja enzim važan u kasnoj fazi Alzheimerove bolesti. Djelovanje hlapljivih izolata i liofilizata testirano je Ellman metodom i prikazano je u tablici 6.

Tablica 6. Rezultati Ellman metode

Uzorak	Koncentracija (mg/mL)	AChE (%)	BuChE (%)
Crveni luk (destilat)	5	29,6	33,6
	1	26,6	-
Ljubičasti luk (destilat)	5	51,9	33,6
	1	31,4	-
Crveni luk (ekstrakt)	5	13,8	27,0
	1	-	-
Ljubičasti luk (ekstrakt)	5	-	14,0
	1	-	-
Crveni luk (liofilizat)	5	4,1	-
	1	-	-
Ljubičasti luk (liofilizat)	5	6,1	-
	1	-	-

Testiranja su bila preliminarna, stoga su se prvotno testirala eterična ulja (čiji je sastav hlapljivih sumporovih spojeva poznat) na inhibiciju AChE i BuChE te su pokazala dobre rezultate za testiranu koncentraciju 227 μg/mL. Ekstrakti i liofilizati su za istu koncentraciju pokazali neznatnu inhibiciju pa se nisu testirale niže koncentracije. Najbolji učinak inhibicije je pokazao uzorak eteričnog ulja ljubičastog luka dobivenog destilacijom čija je vrijednost prešla 50% inhibicije za testiranu koncentraciju od 227 μg/mL.

4. ZAKLJUČAK

- Cilj ovog rada bio je izolirati hlapljive smjese iz tri vrste luka i to ljubičastog, crvenog i luka srebrenca. Hidrodestilacijom u aparaturi po Clevengeru dobivena su eterična ulja luka, a hlapljive smjese ekstrakcijom s diklormetanom nakon 24 h autolize. Nehlapljivi vodeni ostatak u tikvici nakon hidrodestilacije je filtriran i liofiliziran.

- Dobivene hlapljive smjese analizirane su GC-MS-om te je utvrđeno da diklormetanski ekstrakt ne sadrži hlapljive sumporove spojeve, dok eterična ulja sadrže sumporove spojeve u značajnijoj koncentraciji i to redom od najveće zastupljenosti do najmanje: dipropil disulfid, dipropil trisulfid, metilpropil disulfid, *trans* – propenil propil disulfid, dimetil trisulfid.

- Na uzorcima hlapljivih izolata te na uzorcima liofilizata provedeno je biološko ispitivanje na antioksidacijska svojstva (DPPH, FRAP i Rancimat metoda) i inhibiciju kolinesteraze. Svi uzorci su pokazali slabo antioksidacijsko djelovanje (<15%). Pri istoj koncentraciji eterična ulja su pokazala dobru inhibiciju kolinesteraza u odnosu na hlapljivi diklormetanski i nehlapljivi vodeni ekstrakt.

- Sumporovi spojevi koji se nalaze u dobivenom eteričnom ulju luka, imaju svojstvo lipofilnosti, odnosno mogu proći krvno – moždanu barijeru. Eterično ulje ljubičastog luka je pokazalo 51,9% inhibicije enzima AChE za testiranu koncentraciju 227 µg/L. S obzirom da su eterična ulja pokazala dobru inhibiciju, kao nastavak istraživanja mogu se testirati identificirane sumporove spojeve iz eteričnih ulja, u svrhu utvrđivanja njihove sposobnosti inhibicije.

5. LITERATURA

1. Kwak. J.-H.et al., Variation of quercetin glycoside derivates in three onion (*Allium cepa* L.) varieties. Saudi Journal of Biological Sciences, 2016.

2. Havey M. J., Onion (*Allium cepa* L.), Theoretical and Applied Genetics, SAD, 1993.

3. Dužević S., Ispitivanje inhibicije enzima acetilkolinesteraze i antioksidacijskih ekstrakata iz biljaka obična pavitina (*Clematis vitalba* L.) i i plamenita pavitina (*Clematis flammula* L.), diplomski rad, Split, 2012.

4. http://www.istockphoto.com/hk/photo/onions-gm182372335-11326165 , 16. lipanj. 2017., 23:33 sati.

5. Flora Croatica „crveni luk“, http://hirc.botanic.hr/fcd/DetaljiFrame.aspx?IdVrste=27376, 12. lipanj 2017., 14:50 sati.

6. http://www.bilje.hr/POLJOPRIVREDA/AgBase_4/PDF/Lukovi.pdf, 12. lipanj 2017.

7. Lawande K. E., Onion, National Research Centre for Onion and Garlic, India, 2012.

8. Stojanov D., Hlapljivi sumporovi spojevi u biljkama porodice Brassicaceae i Phytolaccaceae i sinteza fenil – izotiocijanata, diplomski rad, Split, 2015.

9. Rose P., Whiteman M., Moore P. K., Zhun Zhu Y., Bioactive *S*-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus Allium: the chemistry of potential therapeutic agents, *Natural Products Reports*, 2005, *22*, 351-368

10. Đulović A., Usporedba dviju metoda za određivanje inhibicijske sposobnosti na kolinesteraze, diplomski rad, Split, 2014.

11. Blažević I. *Slobodni, glukozinolatno i glikozidno vezani hlapljivi spojevi biljaka porodice Brassicaceae,* Doktorski rad, Prirodoslovno matemtički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2009.

12. Jerković I., Radonić A., Praktikum iz organske kemije, Kemijsko – tehnološki fakultet, Split, 2009.

13. Augusti K. T., Jose R., Sajitha G. R., Augustine P., A Rethinking on the Benefits and Drawbacks of Common Antioxidant and a Proposal to Look for the Antioxidants in *Allium* Products as Ideal Agents: A Review, Association of Clinical Biochemists of India, 2011.

14. https://en.wikipedia.org/wiki/Quercetin , 16. lipanj 2017., 23:51 sati.

15. http://www.pathway27.eu/topstory/anthocyanins/, 16. lipanj 2017., 23:55 sati.

16. Generalić I., Fenolni profil, antioksidacijski i antimikrobni potencijal odabranog ljekovitoga bilja mediteranskoga podneblja, doktorski rad, Zagreb, 2011.

17. https://en.wikipedia.org/wiki/DPPH, 16. lipanj 2017., 23:59 sati.

18. http://radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Antioxid.html , 17. lipanj 2017., 00:09 sati.

19. https://lh3.googleusercontent.com/Qdcgguw8h-5P3wzFHh0rwrM1Pj2WG-SI1eXGyABeXgEUKxJeGfF1bufudYgpdz9oEtsadJI=s114, 17. lipanj 2017., 00:11 sati.

20. https://alzheimer.hr/ucionica/to-je-to-alzheimerova-bolest/ HUAB – Hrvatska udruga za Alzheimerovu bolest, članak 'Što je to Alzheimerova bolest', 12. lipanj 2017.

21. Burčul F., Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice Ranunculaceae / doktorska disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 30.09. 2014.

22. Pedisić S., Zorić Z., Osnovne faze u provođenju postupka liofilizacije, IPA 2007/HR/16IPO/001-040302