

Vodeni ekstrakti Centaurea vrsta: fitokemijski i biološki profil

Šarić, Maria

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:167:573201>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-06**

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

VODENI EKSTRAKTI CENTAUREA VRSTA:
FITOKEMIJSKI I BIOLOŠKI PROFIL

DIPLOMSKI RAD

MARIA ŠARIĆ

Matični broj: 75

Split, srpanj 2018.

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

VODENI EKSTRAKTI CENTAUREA VRSTA:
FITOKEMIJSKI I BIOLOŠKI PROFIL

DIPLOMSKI RAD

MARIA ŠARIĆ

Matični broj: 75

Split, srpanj 2018.

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

WATER EXTRACTS OF CENTAUREA SPECIES:
CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROFILES

DIPLOMA THESIS

MARIA ŠARIĆ

Parent number: 75

Split, July 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij organske kemije i biokemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta
Mentor: Izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo
Pomoć pri izradi: Dr. sc. Ivana Carev, mag.chem. Petra Brzović

VODENI EKSTRAKTI CENTAUREA VRSTA: FITOKEMIJSKI I BIOLOŠKI PROFIL

Maria Šarić, 75

Sažetak: Vodeni ekstrakti biljaka koriste se još od davnina iako njihova svojstva nisu u potpunosti istražena. Biljke su bogate mnogim ljekovitim svojstvima pa se veliki dio istraživanja danas posvećuje upravo njima. U ovom radu korišteni su vodeni ekstrakti koji su uzeti iz divljeg uzgoja vrsta *Centaurea ragusina*, *C. salonitana*, *C. alba*, *C. solstitialis*, *C. scabiosa*, *C. rupestris*, *C. jacea*, *C. calcitrapa* i *C. spinosociliata*. Cilj je bio ispitati kemijski sastav te biološku aktivnost vodenih ekstrakata odnosno antioksidacijski potencijal i inhibiciju enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze.

Analizom kemijskog sastava vodenih ekstrakata dokazano je prisustvo fenolnih spojeva kao i identifikacija istih u biljkama roda *Centaurea*. Fenolnim spojevima danas se pridaje velika važnost upravo jer pokazuju antioksidacijski potencijal koji je ključan faktor u obrani organizma od bolesti. Rezultati testiranja sposobnosti hvatanja slobodnog DPPH radikala kao i redukcijske sposobnosti testirane FRAP metodom pokazali su slab antioksidacijski potencijal testiranih vodenih ekstrakata. Također vodeni ekstrakti biljaka roda *Centaurea* kao i otopine čistih fenolnih spojeva pokazali su slabu sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze.

Ključne riječi: *Centaurea* vrste, fenolni spojevi, kemijski profil, HPLC-DAD, biološka aktivnosti

Rad sadrži: 54 stranice, 31 sliku, 9 tablica, 40 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

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

Datum obrane: 09. srpnja 2018.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

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

Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 3.

Mentor: Olivera Politeo, PhD, Assoc. Prof.
Technical assistance: Ivana Carev, PhD, Petra Brzović, mag.chem

WATER EXTRACTS OF CENTAUREA SPECIES: CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROFILES

Maria Šarić, 75

Abstract: Water extracts of plants are used since ancient times even though their properties were not fully investigated. These plants are rich in many healing properties, so a large part of today's research is devoted just to them. All water extracts used in this experiment were taken from wild breeding species of *Centaurea ragusina*, *C. salonitana*, *C. alba*, *C. solstitialis*, *C. scabiosa*, *C. rupestris*, *C. jacea*, *C. calcitrapa*, *C. spinosociliata*. The aim was to investigate the chemical composition and also the biological activity of water extracts: antioxidant potential and inhibition of the enzyme acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase.

A few analysis of the chemical composition of water extracts have proven the presence of phenolic compounds as well as the identification of the same in plants of the genus *Centaurea*. Today the phenolic compounds attract a huge attention because of the antioxidant potential. The antioxidant potential is a key factor in the defense of the organism from diseases. Results of testing DPPH radicals scavenging ability and the extracts reducing power, tested by FRAP method, showed low antioxidant potential of *Centaurea* water extracts. Also the water extracts of *Centaurea* species along with pure phenolic compounds showed a low inhibitory activity on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase.

Keywords: *Centaurea species*, *phenolic compounds*, *chemical profile*, *HPLC-DAD*, *biological activity*

Thesis contains: 54 pages, 31 figures, 9 tables, 40 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Mila radan, PhD, assistant prof. - chair person
2. Josipa Giljanović, PhD, associate prof. - member
3. Olivera Politeo, PhD, associate prof. - supervisor

Defence date: July 09, 2018.

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

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Olivere Politeo i neposrednim voditeljstvom Ivane Carev, dr. sc., tijekom 2017./2018. godine.

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Oliveri Politeo koja mi je omogućila izvođenje diplomskog rada na Zavodu za biokemiju. Zahvaljujem se na uloženom vremenu i strpljenju te brojnim stručnim savjetima i sugestijama kojima je pridonijela da rad bude jasniji i potpuniji. Zahvaljujem se i dr.sc. Ivani Carev i mag.chem Petri Brzović na nesebičnoj pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog rada, svakodnevnom dijalogu i diskusijama, a povrh svega na prijateljski posvećenom vremenu.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci i razumijevanju tokom cijelog školovanja.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Cilj ovog rada je testirati kemijski sastav i biološki potencijal vodenih ekstrakata biljaka roda *Centaurea*: *Centaurea ragusina*, *C. salonitana*, *C. alba*, *C. solstitialis*, *C. scabiosa*, *C. rupestris*, *C. jacea*, *C. calcitrapa*, *C. spinosociliata*.
- Kemijski profil ekstrakata ispitan je određivanjem sadržaja ukupnih fenolnih spojeva, metodom po Folin-Ciocalteu te određivanjem sadržaja 16 fenolnih spojeva, često prisutnih u vodenim ekstraktima biljaka, HPLC-DAD analitičkom tehnikom.
- Biološka aktivnost ekstrakata testirana je kroz antioksidacijski i inhibicijski učinak na enzim acetilkolinesterazu i butirilkolinesterazu.
- Antioksidacijski potencijal ekstrakata testiran je dvjema metodama, DPPH metodom i FRAP metodom.
- Inhibicijski učinak na dvije kolinesteraze testiran je metodom po Ellmanu,
- Na antikolinesterazni potencijal su testirani i čisti fenolni spojevi.

SAŽETAK

Vodeni ekstrakti biljaka koriste se još od davnina iako njihova svojstva nisu u potpunosti istražena. Biljke su bogate mnogim ljekovitim svojstvima pa se veliki dio istraživanja danas posvećuje upravo njima. U ovom radu korišteni su vodeni ekstrakti koji su uzeti iz divljeg uzgoja vrsta *Centaurea ragusina*, *C. salonitana*, *C. alba*, *C. solstitialis*, *C. scabiosa*, *C. rupestris*, *C. jacea*, *C. calcitrapa* i *C. spinosociliata*. Cilj je bio ispitati kemijski sastav te biološku aktivnost vodenih ekstrakata odnosno antioksidacijski potencijal i inhibiciju enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze.

Analizom kemijskog sastava vodenih ekstrakata dokazano je prisustvo fenolnih spojeva kao i identifikacija istih u biljkama roda *Centaurea*. Fenolnim spojevima danas se pridaje velika važnost upravo jer pokazuju antioksidacijski potencijal koji je ključan faktor u obrani organizma od bolesti. Rezultati testiranja sposobnosti hvatanja slobodnog DPPH radikala kao i redukcijske sposobnosti testirane FRAP metodom pokazali su slab antioksidacijski potencijal testiranih vodenih ekstrakata. Također vodeni ekstrakti biljaka roda *Centaurea* kao i otopine čistih fenolnih spojeva pokazali su slabu sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze.

Ključne riječi: *Centaurea* vrste, fenolni spojevi, kemijski profil, HPLC-DAD, biološka aktivnost

SUMMARY

Water extracts of plants are used since ancient times even though their properties were not fully investigated. These plants are rich in many healing properties, so a large part of today's research is devoted just to them. All water extracts used in this experiment were taken from wild breeding species of *Centaurea ragusina*, *C. salonitana*, *C. alba*, *C. solstitialis*, *C. scabiosa*, *C. rupestris*, *C. jacea*, *C. calcitrapa*, *C. spinosociliata*. The aim was to investigate the chemical composition and also the biological activity of water extracts: antioxidant potential and inhibition of the enzyme acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase.

A few analysis of the chemical composition of water extracts have proven the presence of phenolic compounds as well as the identification of the same in plants of the genus *Centaurea*. Today the phenolic compounds attract a huge attention because of the antioxidant potential. The antioxidant potential is a key factor in the defense of the organism from diseases. Results of testing DPPH radicals scavenging ability and the extracts reducing power, tested by FRAP method, showed low antioxidant potential of *Centaurea* water extracts. Also the water extracts of *Centaurea* species along with pure phenolic compounds showed a low inhibitory activity on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase.

Keywords: *Centaurea species, phenolic compounds, chemical profile, HPLC-DAD biological activity*

Sadržaj

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO	3
1.1. Porodica Asteraceae.....	3
1.1.1. Rod Centaurea.....	4
1.1.1.1. <i>Centaurea jacea</i>	4
1.1.1.2. <i>Centaurea rupestris</i>	5
1.1.1.3. <i>Centaurea solstitialis</i>	6
1.1.1.4. <i>Centaurea alba</i>	6
1.1.1.5. <i>Centaurea scabiosa</i>	7
1.1.1.6. <i>Centaurea salonitana</i>	8
1.1.1.7. <i>Centaurea ragusina</i>	8
1.1.1.8. <i>Centaurea calcitrapa</i>	9
1.1.1.9. <i>Centaurea spinosociliata</i>	10
1.2. Sekundarni metaboliti	11
1.2.1. Fenoli	11
1.2.1.1. Flavonoidi.....	12
1.2.1.2. Neflavonoidi	15
1.2.2. Biosinteza fenolnih spojeva	17
1.3. Biološka aktivnost fenolnih spojeva	19
1.3.1. Antioksidacijski učinak.....	19
1.3.2. Inhibicija enzima kolinesteraze	19
1.4. Kromatografija.....	20
1.5. Spektrofotometrija	21
1.5.1. Folin-Ciocalteu metoda.....	23
1.6. Metode određivanja biološkog potencijala	23
1.6.1. Metoda određivanja sposobnosti uklanjanja DPPH radikala, DPPH metoda	23
1.6.2. Metoda određivanja redukcijskog potencijala, FRAP metoda	24
1.7. Metode određivanja sposobnosti inhibicije kolinesteraza, metoda po Ellmanu.....	25

2. EKSPERIMENTALNI DIO	27
2.1. Biljni materijal	27
2.2. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva u uzorcima vodenih ekstrakata biljaka roda Centaurea metodom po Folin-Ciocalteu	27
2.3. Određivanje kemijskog sastava vodenih ekstrakata biljaka roda Centaurea HPLC-DAD metodom	29
2.4. Metode određivanja biološke aktivnosti	31
2.4.1. Određivanje sposobnosti hvatanja slobodnog DPPH radikala DPPH metodom	31
2.4.2. Određivanje redukcijske sposobnosti vodenih ekstrakata biljaka roda Centaurea, FRAP metodom	32
2.5. Određivanje sposobnosti inhibicije acetilkolinesteraze (AChE).....	33
2.6. Određivanje sposobnosti inhibicije butirilkolinesteraze (BChE)	33
3. REZULTATI I RASPRAVA	35
3.1. Određivanje kemijskog sastava vodenih ekstrakata biljaka roda Centaurea	35
3.1.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola metodom po Folin-Ciocalteu	35
3.1.2. HPLC/DAD analiza vodenih ekstrakata biljaka roda Centaurea.....	37
3.2. Određivanje antioksidacijskog potencijala vodenih ekstrakata biljaka roda Centaurea	43
3.2.1. DPPH metoda	43
3.2.2. FRAP metoda.....	45
3.3. Inhibicijski potencijal vodenih ekstrakata biljaka roda Centaurea na enzime acetilkolinesterazu (AChE) i butirilkolinesterazu (BChE)	47
3.4. Inhibicijski potencijal čistih fenolnih spojeva na enzime acetilkolinesterazu (AChE) i butirilkolinesterazu (BChE)	49
4. ZAKLJUČAK	51
5. LITERATURA.....	52

UVOD

Biljna porodica Asteraceae jedna je od najraširenijih i najbrojnijih porodica rasprostranjena diljem svijeta. Ovoj porodici pripada rod *Centaurea* L. koji broji oko 500 različitih vrsta, rasprostranjenih u različitim dijelovima Azije, Europe i sjeverne Amerike. Zbog ljekovitih svojstava, od davnina se koriste u narodnoj medicini. Biljke su bogate spojevima s biološkim učincima na zdravlje ljudi te iz tog razloga ljudi često posežu za biljkama i pripravcima od biljaka kako bi ublažili različite bolesti i tegobe.

^{1,2,3} Među biološki vrijednim spojevima koje nalazimo u biljkama ubrajaju se i njihovi sekundarni metaboliti, kao što su terpenski spojevi, flavonoidi, fenilpropanoidi i drugi. Stalnim unosom ovih biljnih metabolita moguće je utjecati na smanjenje kardiovaskularnih bolesti, te na prevenciju pojave raka. Starenjem se u ljudskom organizmu događaju promjene u živčanim stanicama što se najčešće manifestira u obliku motoričkih ili kognitivnih teškoća. Iako se zaboravljanje smatra normalna popratna pojava starenja, dio starije populacije obolijeva od demencija. Uzrok većeg dijela demencija je Alzheimerova bolest, degenerativna bolest mozga. Oksidativni stres je jedan od glavnih uzroka razvoja Alzheimerove bolesti. Stoga se smatra kako se redovnom konzumacijom antioksidansa može doprinijeti odgađanju razvoja bolesti. Medicina danas koristi brojne sintetske supstance koje imaju sposobnost sprečavanja oksidativnog stresa kao i inhibiciju enzima kolinesteraza.

U ovom radu ispitan je kemijski sastav te biološka aktivnost vodenih ekstrakata devet vrsta biljaka roda *Centaurea*. Biološki potencijal uzoraka testiran je u smislu antioksidacijskog potencijala te sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze .

Metodom po Folin-Ciocalteu određen je ukupni sadržaj fenolnih komponenti u vodenim ekstraktima biljaka roda *Centaurea*, a HPLC-DAD analizom određen je sastav i sadržaj fenolnih spojeva često zastupljenih u vodenim ekstraktima biljaka. Antioksidacijska aktivnost vodenih ekstrakata određena je DPPH metodom (metoda hvatanja slobodnih DPPH radikala) i FRAP metodom (metoda testiranja redukcijskog potencijala). Ellmanovom metodom testirana je sposobnost vodenih ekstrakata da inhibiraju enzime acetilkolinesterazu i butirilkolinesterazu, ključnih enzima jer je

njihovom inhibicijom onemogućena hidroliza acetilkolina čime se produžava njegova aktivnost u prijenosu živčanih impulsa, a to je već poznat tretman u liječenju Alzheimerove bolesti. Jednako, testirana je sposobnost inhibicije čistih fenolnih spojeva, čestih sastavnica vodenih ekstrakata biljaka, na enzime acetil- i butirilkolinesterazu.

1. OPĆI DIO

1.1. Porodica Asteraceae

Porodica Asteraceae ili Compositeae jedna je od najvećih porodica u svijetu, s oko 17000 biljnih rodova i oko 24000 različitih biljnih vrsta rasprostranjenih širom svijeta.⁴

Asteraceae (glavočike) su uglavnom zeljaste biljke, jednogodišnje ili trajnice karakteristične po svojim središnjim cjevastim cvjetovima žute boje, koji po obodu postaju i jezičasti. Cvat (racemozna glavica) može biti pojedinačan ili sastavljen (gronja) dok su cvjetovi u pupu zaštićeni ovojnim listovima i vrlo su karakterističnog oblika i rasporeda. Čaška je najčešće metemorfozirana u dlakavi papus, krunicu ili čekinje sa zupcima. Vjenčić je sastavljen od pet latica sraslih u cijev, prašnici su srasli svojim filamentima za cijev vijenčića, a tučak je sastavljen od dva plodna lista. Plodnica je podrasla i sadrži jedan sjemeni zametak iz kojeg se razvija plod oraščić odnosno roška. Ona se rasprostranjuje anemokorno (vjetrom), ali i ornitokorno (pticama).^{5,6}

Entomofilne su biljke, odnosno njihov cvat je u potpunosti pseudantij koji privlači kukce živim bojama, nektarom i ljepljivim polenom. Mnoge vrste iz porodice Asteraceae u svojim shizogenim kanalima sadrže eterična ulja pa zbog toga slove kao ljekovite biljke.⁵

1.1.1. Rod *Centaurea*

Rod *Centaurea* predstavlja jedan od najvećih i najsloženijih rodova porodice Asteraceae od kojih se neke vrste koriste u narodnoj medicini. Različite vrste roda *Centaurea* imaju različite biološke aktivnosti pa se koriste kao protuupalni i antibakterijski lijekovi, te kao antioksidansi. Rod *Centaurea* broji preko 2000 vrsta od kojih su najviše rasprostranjenih po mediteranskoj obali i južnoj Aziji.^{2,3,7}

Vrste roda *Centaurea* uglavnom su višegodišnje, dvogodišnje, ali rijetko jednogodišnje biljke koje na svojim vrhovima stabljika imaju mnogobrojne sitne glavice bogato razgranjene. Sadrže ovojne listove koji su cjeloviti, okrugli, membranasti ili nepravilno rascijepani. Cvatovi su obično žute ili ljubičaste boje. Zbog velikih cvatova lijepih i raznovrsnih boja te dugotrajne cvatnje (2-3 mjeseca) često se uzgajaju i kao ukrasne. Rod *Centaurea* taksonomski je vrlo složen jer obuhvaća veliki broj vrsta i njihovu geografsku rasprostranjenost. Istraživanjem različitih aspekata ovog roda možemo dobiti jasniju i precizniju podjelu među vrstama.^{3,8}

U ovom radu istraženo je devet samoniklih biljnih vrsta roda *Centaurea*: *Centaurea jacea*, *Centaurea rupestris*, *Cenetaurea salonitana*, *Cenaturea scabiosa*, *Centaurea solstitialis*, *Centaurea alba*, *Centaurea spinosociliata*, *Centaurea calcitrapa* i *Centaurea ragusina*.

1.1.1.1. *Centaurea jacea*

C. jacea je zeljasta višegodišnja biljka široko rasprostranjena na travnjacima (**Slika 1.1**) . Zbog svoje široke klimatske prilagodbe ova vrsta je autohtona u mnogim europskim zemljama.⁹

Listovi su joj zeleni, elipsasti ili lancetasti, a privjesci ovojnih listova su plosnati dok je vanjski dio često resast. Na vrhu stabljike nalaze se pojedinačne cvjetne glavice koje čine ljubičasto crveni cvjetovi. Cvate od srpnje do listopada. Obitava na planinama i livadama. Omiljena je biljka pčelama zbog skupljanja nektara i peluda.^{10,11}



Slika 1.1. *Centaurea jacea* ¹²

1.1.1.2. *Centaurea rupestris*

Zaštićena žutocvjetna kamenjarska zečina (**Slika 1.2.**). Odsječci listova su usko linealni, široki oko 3mm, a privjesci ovojnih listova trokutasti i tamnosmeđi. Obitava na kamenjarskom dijelu.¹⁰



Slika 1.2. *Centaurea rupestris* ⁸

1.1.1.3. *Centaurea solstitialis*

Centaurea solstitialis ili zlatni pustinjak bodljikava je biljka s trnom dugim 10-15 mm i najviše obitava u mediteranskom dijelu (**Slika 1.3.**). Ovojni listovi su goli i zelenkasti, a cvjetovi se ističu karaterističnom žutom bojom.¹⁰



Slika 1.3. *Centaurea solstitialis*⁸

1.1.1.4. *Centaurea alba*

Centaurea alba (bijela zečina) je dvogodišnja zeljasta biljka (**Slika 1.4.**) . Grane su joj malo produljene, a ovojni listovi bijeli ili u sredini smeđi. Cvjetovi su roze ili bijele boje. Cvate od lipnja do kolovoza i najviše obitava u sredozemnom području na livadama i kamenjarskim dijelovima.^{10,13}



Slika 1.4. *Centaurea alba* ¹⁴

1.1.1.5. *Centaurea scabiosa*

Velika zečina je trajna zeljasta biljka (**Slika 1.5.**). Listovi su hrapavi sa obje strane i jajolikog oblika. Cvjetovi su skupljeni u glavice i purpurnog su obojenja, nalaze se na vrhu same stabljike. Cvate u srpnju i kolovozu i obično se može pronaći na livadama i pašnjacima.^{10,15}



Slika 1.5. *Centaurea scabiosa* ¹⁶

1.1.1.6. *Centaurea salonitana*

Solinska zečina ili hrapava zečina odlikuje se karakterističnom žutom bojom (**Slika 1.6.**). Odsječci središnjih listova su lancelasti ili jajoliki, a privjesci ovojnih listova polumjesečasti i blijedosmeđi.¹⁰



Slika 1.6. *Centaurea salonitana*¹⁷

1.1.1.7. *Centaurea ragusina*

Dobro poznati jadranski endem dubrovačka zečina rasprostranjena je od sjeverne do južne Dalmacije, a s obzirom da joj je klasično pronalazište u okolici Dubrovnika tako i dolazi ime ove endemične vrste. Gusto, snježno bijela biljka s listovima u rozeti, ovojni listovi su blijedozeleni sa malim crnim ili smeđim privjescima koji završavaju sa trnom dugačkim oko 4 mm savijenim unatrag. Cvjetovi su jarko žute boje promjera 20-25 mm. (**Slika 1.7.**). Ova biljka cvate od svibnja do srpnja, a plod koji

nosi je roška. Obitava u pukotinama vapnenačkih stijenama uz more te vulkanskim stijenama na otoku Brusniku.^{3,10}



Slika 1.7. *Centaurea ragusina*⁸

1.1.1.8. *Centaurea calcitrapa*

Centaurea calcitrapa ili purpurna zvijezda (**Slika 1.8.**) rasprostranjena je u velikom dijelu Europe. Jednogodišnja je biljka koja raste u visinu do 1,3 metra. Stabljika joj je obložena sa dlačicama, a listovi su ispunjeni žlijezdama. Cvat sadrži nekoliko cvjetnih glavica. Raste od srpnja do rujna.¹⁸



Slika 1.8. *Centaurea calcitrapa*¹⁸

1.1.1.9. *Centaurea spinosociliata*

Dvogodišnja zelena biljka koja je u gornje dijelu razgranata. Stabljika je uspravna, nema papus. Listovi su zeleni, a uz rubove hrapavi. **(Slika 1.9.)** Obitava u sredozemnom području.¹⁹



Slika 1.9. *Centaurea spinosociliata*²⁰

1.2. Sekundarni metaboliti

Metaboliti su (među) produkti metabolizma. Klasificiramo ih na primarne i sekundarne metabolite. Primarni metaboliti su spojevi koji su važni za stanično disanje, rast, razvoj, također su korisni u procesima fotosinteze. To su lipidi, nukleotidi, aminokiseline i organske kiseline. Sekundarni metaboliti ima ulogu da zaštite biljku od mikrobnih infekcija, od UV zračenja, obrambeni su signali i signalne molekule u interakciji biljke sa okolinom, privlače oprašivače i životinje koje raznose sjemenke. Također koriste se kao boje, vlakna, voskovi, ulja, ljepila, lijekovi, parfemi.^{21,22}

Sekundarni metaboliti smatraju se bioaktivnim komponentama koje jako blagotvorno utječu na ljudsko zdravlje. Dugoročan unos u manjim količinama može dovesti do smanjenja kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa tipa II, može utjecati i na smanjenje incidencije raka. Sekundarne metabolite podijeli smo na²¹

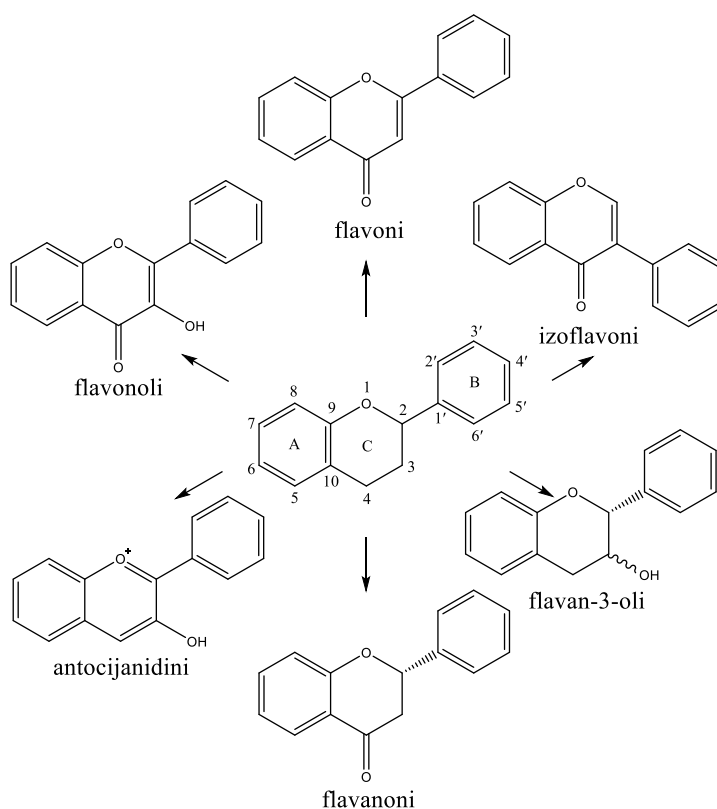
- flavonoidi i srodni fenolni i polifenolni spojevi,
- terpenoidi
- spojevi koji sadrže dušik – alkaloidi
- spojevi koji sadrže sumpor

1.2.1. Fenoli

Kao sekundarni metaboliti, fenoli spojevi obuhvaćaju široki spektar molekula koje su sastavljene od aromatske skupine i jedne ili više hidroksilnih grupa na aromatskom prstenu. U ovu skupinu spojeva uključujemo i fenolne kiseline, koje su zapravo derivati benzojeve kiseline i cimetne kiseline, ali također obuhvaća i skupinu flavonoida i tanina. Zbog izrazite antioksidacijske moći fenoli i flavonoidi su jako bitni u antioksidacijskom obrambenom mehanizmu bioloških sustava. Flavonoidi se mogu svrstati na osnovu broja i rasporeda ugljikovih atoma. Uglavnom su konjugirani sa šećerima i organskim kiselinama. Možemo ih klasificirati u 2 skupine: flavonoidi i neflavonoidi.^{21,23}

1.2.1.1. Flavonoidi

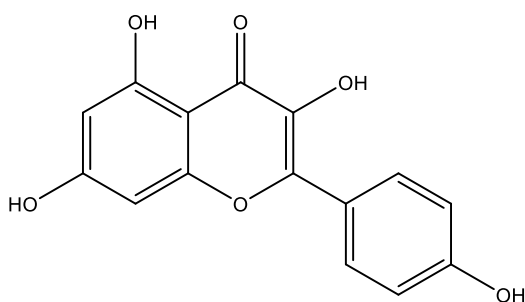
Flavonoidi su skupina polifenolnih spojeva koji se prepoznaju kao jedna od najvećih i najrasprostranjenijih grupa biljnih sekundarnih metabolita sa izrazitim antioksidacijskim i antimikrobnim svojstvima. U svojoj strukturi sadrže petnaest atoma ugljika i grade dva aromatska prstena spojena tročlanim mostom (C₆-C₃-C₆). Glavna uloga je da inhibiraju inicijaciju oksidacijskog lanca te sprječavaju razmnožavanje lanca djelovanjem kao slobodni radikali. Imaju ulogu u procesima pigmentacije i zaštiti od UV zračenja. U biljkama ih uglavnom nalazimo kao glikozidne derivate koji u svojoj strukturi sadrže monosaharidne i disahardine dijelove. Zastupljeni su u visokim koncentracijama u epidermi listova i kori voća. U vodi su topive komponente.^{21,23,24} Podijelili smo ih na flavone, flavonole, flavan-3-ole, izoflavone, flavanone i antocijanidine. (Slika 1.10.)



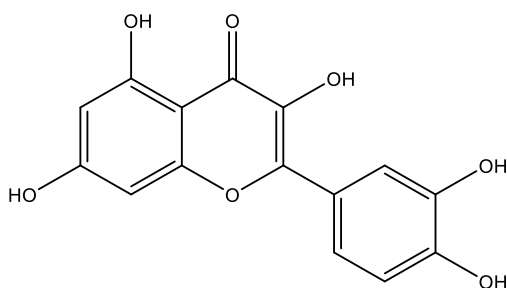
Slika 1.10. Struktura i klasifikacija flavonoidnih spojeva²¹

Flavonoli

Široko rasprostranjeni flavonoidi koji postoje kao brojni konjugati s više od 200 različitih šećera od kemferola (**Slika 1.11.**) Konjugacija se događa na položaju 3' u ugljikovodičnom lancu, a susptitucija se može događati na pozicijama 5, 7, 4, 3' i 5' u ugljikovodičnom lancu. Sastavni su dio voća i povrća. Najpoznatiji flavonoli su kempferol, miricetin, kvercetin, a pronalazimo ih kao O-glikozide.^{21,23}



Kempferol



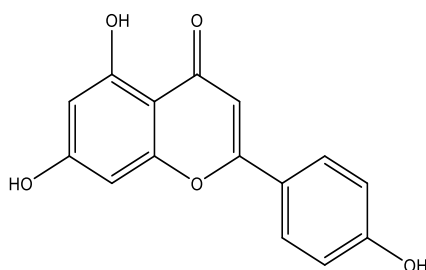
Kvercetin

Slika 1.11. Flavonoli kempferol i kvercetin

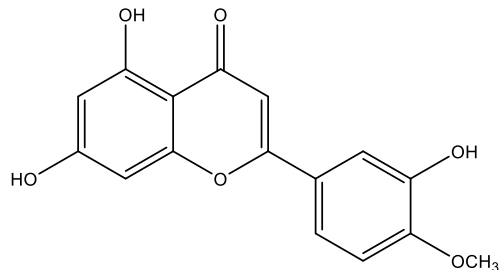
Flavoni

Kod flavona je moguć širok spektar supstitucija kao hidroksilacija, metilacija i glikozilacija. Flavoni imaju supstituente na prstenu A i C, ali im nedostaje hidroksilna

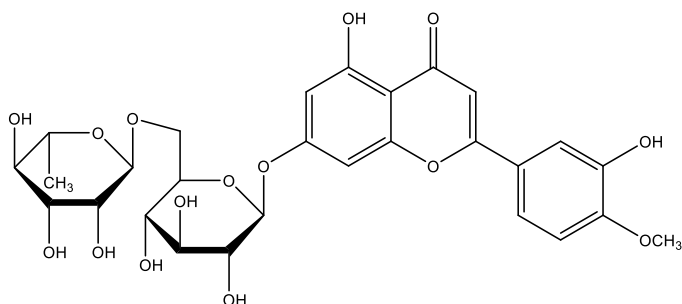
skupina na položaju C3. Imaju jako blisku strukturnu vezu sa flavonolima. Nalazimo ih u peršinu, celeru. Najpoznatiji flavoni su apigenin, diosmin i diosmetin^{21,25} (**Slika 1.12.**)



Apigenin



Diozmetin

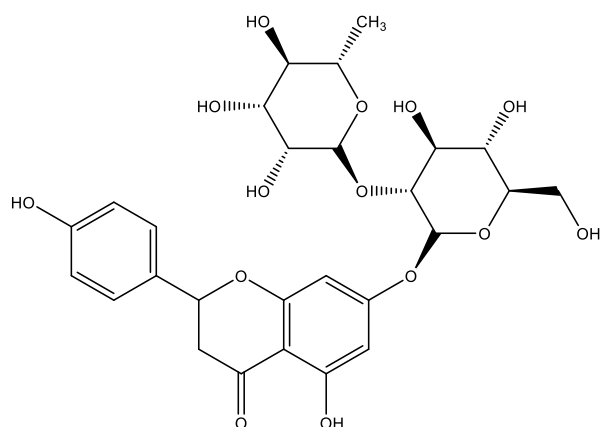


Diozmin

Slika 1.12. Flavoni apigenin, diozmetin i diozmin

Izoflavoni

Njihova struktura je karakteristična po tome što imaju B prsten na položaju C3 umjesto na C2. Uobičajen su sastojak biljne porodice Fabaceae (mahunarke) te sadrže estrogensku aktivnost čime potiču razmnožavanje životinja koje pasu travu (ovce, krave) i nazivamo ih fitoestrogenima. Izgleda kao da izoflavoni oponašaju hormon estrogen. Jedan od poznatijih izoflavona je naringenin.^{21,24} (**Slika 1.13.**)



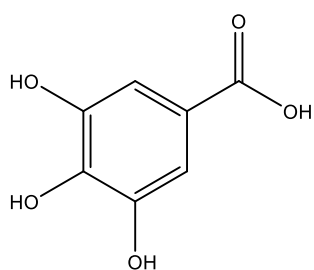
Naringenin

Slika 1.13. Izoflavon naringenin

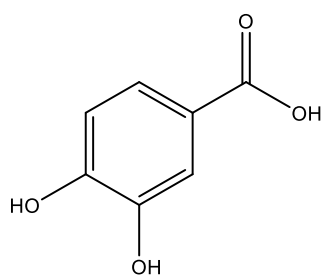
1.2.1.2. Neflavonoidi

Fenolne kiseline

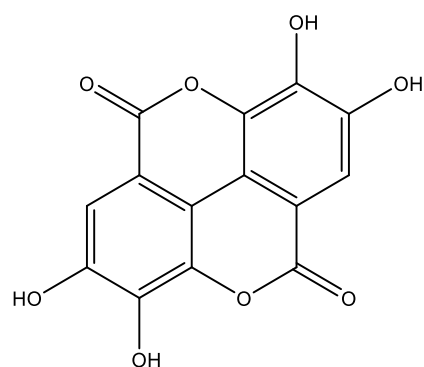
Fenolne kiseline ili hidroksibenzoati predstavljaju glavnu skupinu fenolnih spojeva i jako su raširene u biljnom svijetu. Najvažniji predstavnik je galna kiselina, a uz nju bitni predstavnici hidroksibenzojeve kiseline su protokatehinska kiselina, elaginska kiselina i siringinska kiselina.^{21,23} (**Slika 1.14.**)



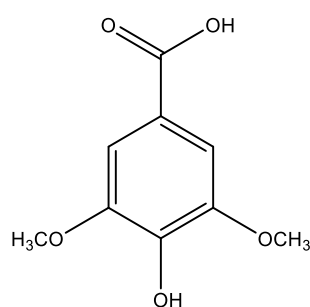
Galna kiselina



Protokatehinska kiselina



Elaginska kiselina



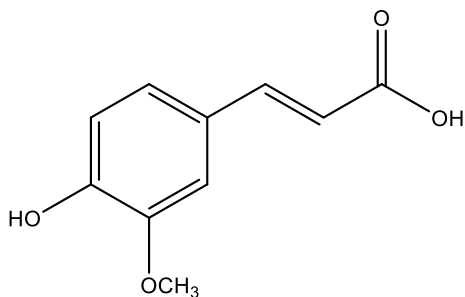
Siringinska kiselina

Slika 1.14. Fenolne kiseline

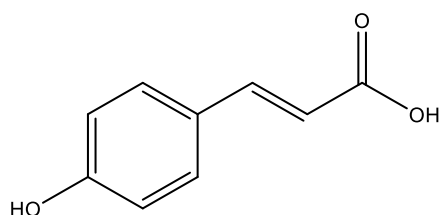
Hidroksicimetne kiseline

Drugim imenom to su fenilpropanoidi upravo zato jer se cimetna kiselina ubraja u hidroksicinate, produkte fenilpropanoidnog puta. Poznate hidroksicimetne kiseline su *p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska, klorogenska i ružmarinska kiselina.^{21,25}

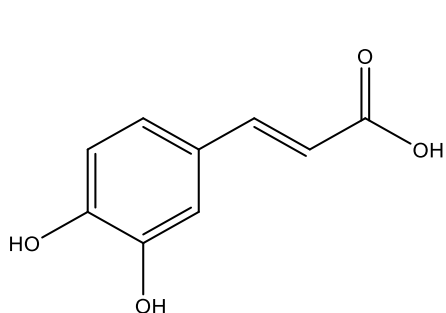
(Slika 1.15.) Kafeinska i *p*-kumarinska kiselina nalazi se u zelenim i prženim zrnima kave.²⁴



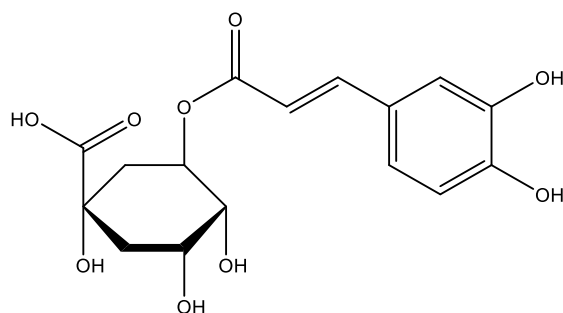
Ferulinska kiselina



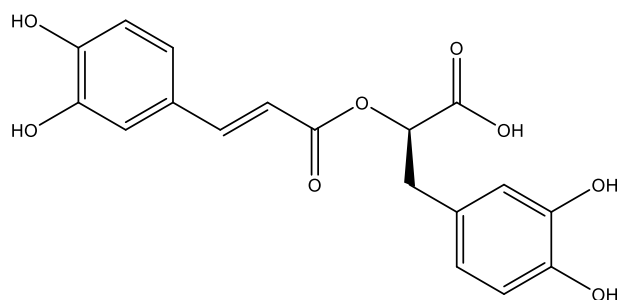
p-kumarinska kiselina



Kafeinska kiselina



Klorogenska kiselina



Ružmarinska kiselina

Slika 1.15. Hidroksicimetne kiseline

1.2.2. Biosinteza fenolnih spojeva

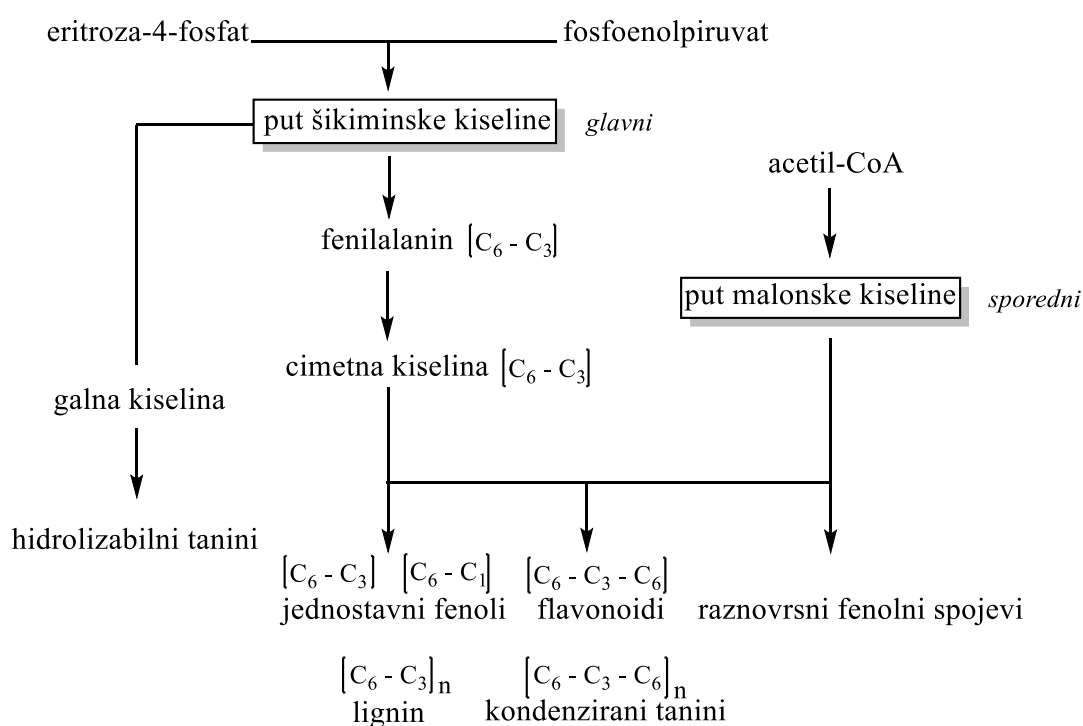
Prirodni spojevi biosintetiziraju se u seriji reakcija kataliziranih enzimima. Enzimi utječu na transformacije spojeva učinkovitije i brže i također mogu voditi reakcije stereospecifično. Sekundarni metaboliti nastaju od intermedijera acetatnog puta uključujući i fenilpropanske derivate.

Bitna molekula u sintezi fenilpropanskih derivata je šikiminska kiselina. Prvi korak u biosintetičkom putu je aldolna kondenzacija pri čemu povezivanjem fosfoenol piruvata (PEP) sa D-eretroza-4-fosfata nastaje fosfat 3-deoksi-D-arabino-heptulosonske kiseline (DAHP). Intermolekulskom eliminacijom fosfatne kiseline iz DAHP nastaje prvi karbociklički međuprodukt 3-dehidrokinonska kiselina. Redukcija 3-dehidrokinonske kiseline vodi do kininske kiseline. Dehidracijom i redukcijom 3-dehidrokinonske kiseline preko 3-dehidrošikiminske kiseline nastaje šikiminska kiselina.

Važan međuprodukt šikiminskog puta je korizminska kiselina čijom pregradnjom nastaju L-fenilalanin i L-tirozin koji su ishodni spojevi širokog spektra sekundarnih metabolita. Naime Claisenovom pregradnjom korizminske kiseline nastaje prefenska kiselina iz koje daljnjim reakcijama dekarboksilacijske aromatizacije, transaminacije ili oksidacije nastaju L-fenilalanin i L-tirozin. **(Slika 1.16.)**

Fenilpropanski derivati nastaju direktno iz L-fenilalanina. Deaminacijom L-fenilalanina nastaje cimetna kiselina, a daljnjim reakcijama hidroksilacije i metilacije dobivamo derivate poput kumarina, lignina i drugih.

U šikiminskom putu osim složenih nastaju i jednostavni derivati benzojeve kiseline, C_6-C_1 spojevi. Mogu nastati direktno iz interemedijera u ranom šikiminskom putu ili od C_6-C_3 fenilpropanskih spojeva. Tu ubrajamo eugenol, galnu kiselinu, salicilnu kiselinu, benzojevu kiselinu, vanilin i druge.



Slika 1.16. Biosinteza fenilpropanskih derivata ²¹

Cimetna kiselina katalitičkim reakcijama također može prijeći u p-kumarinsku kiselinu koja daljnjom hidroksilacijom, i metilacijom prelazi u β -hidroksibenzojevu kiselinu tako da se bočni lanac u fenilpropanskoj strukturi skрати β -oksidacijom i time nastaje kafeinska, ferulinska, sinapinska i 5-hidroksiferulinska kiselina. ^{25,27}

1.3. Biološka aktivnost fenolnih spojeva

Biološki aktivni spojevi koriste se širom svijeta i to najviše u tradicionalnoj medicini u različite medicinske svrhe. Poznato je da su biljke roda *Centaurea* bogate biološkim aktivnim svojstvima čime posjeduju antioksidacijsku i antimikrobnu moć.²⁸

Velika pozornost danas se pripisuje fenolnim spojevima upravo zbog njihovog antimikrobnog i antioksidacijskog svojstva. Fenoli su zastupljeni u hrani biljnog podrijetla i doprinose značajnoj kvaliteti mnogih prehrambenih proizvoda. Neki od njih, kao što su flavonoidi, pronašli su svoju ulogu u prehrambenoj industriji kao zamjena za sintetske aditive.²⁹

1.3.1. Antioksidacijski učinak

Antioksidansi su molekule koje imaju sposobnost da neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala i drugih oksidansa, odnosno da sprječavaju neželjene oksidacije tvari. Antioksidansi se unose u organizam hranom ili putem dodataka. Mogu se podijeliti na različite načine obzirom na podrijetlo, mehanizmu djelovanja, tijeku lančanih reakcija te prisutnosti u tijelu (endogeni i egzogeni). Najznačajniji prirodni antioksidansi su vitamin C, vitamin E, BHA (butilhidroksianisol), BHT (butilhidroksitoluen).^{30,31}

Posebno se ističu fenolni spojevi, odnosno flavonoidi koji u svojoj strukturi imaju benzenski prsten i OH skupinu u blizini π -konjugiranog elektrona, koji ima ulogu da sudjeluje u reakcijama primanja elektrona pri čemu se uklanjaju slobodni radikali, a spojevi koji nastaju nisu opasni za stanicu.⁸

1.3.2. Inhibicija enzima kolinesteraze

Zbog svoje značajne uloge u organizmu acetilkolinesteraza i butirilkolinesteraza intenzivno se istražuju. Oba enzima strukturno su homologna, ali se razlikuju prema katalitičkoj aktivnosti. Uz posjedovanje esterazne aktivnosti posjeduju

peptidaznu aktivnost čime se povezuju sa razvojem i napredovanjem Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti i Miastenien gravis. Osnovnu strukturu ovih enzima čini 12 β -nabranih pločica okruženih sa 14 α -uzvojnica čime obje kolinesteraze spadaju u hidrolaze α,β -strukture.

Acetilkolinesteraza bitna je za očuvanje homeostaze organizma upravo zato jer je njezin supstrat acetilkolin jedan od prijenosnika živčanih impulsa. Hidrolizom acetilkolina, AChE kontrolira prijenos živčanih impulsa kroz središnji i periferni živčani sustav. Živčani impuls uzrokuje otpuštanje acetilkolina iz sinaptičkog mjehura koji se zatim veže na kolinergične receptore vezane na kolinergične sinapse ili mišićne stanice. Vezivanjem acetilkolina dolazi do depolarizacije membrane i prijenosa živčanog impulsa. Nakon razgradnje acetilkolina u sinaptičkoj pukotini, AChE opet uspostavlja polarizaciju membrane i prijenos impulsa prestaje. Sinteza AChE odvija se u mozgu, mišićima, koštanoj srži i nalazi se u krvi vezana za eritrocite.

Butirilkolinesteraza (BChE) je enzim prisutan u centralnom i perifernom živčanom sustavu, jetri, gušterači i plućima. BChE kao i AChE može hidrolizirati acetilkolin, ali njezin specifični supstrat još uvijek nije otkriven. Uloga ovog enzima je da sudjeluje u diferencijaciji i rastu živčanog tkiva u metabolizmu lipida i lipoproteina. Pojačana ekspresija enzima BChE očituje se kod Alzheimerove bolesti, ali točna uloga ovoga enzima i dalje nije u potpunosti poznata.

Ako se AChE inhibira dolazi do nakupljanja acetilkolina i poremećaja u prijenosu živčanih impulsa i nastaje tzv. kolinergična kriza koja se manifestira mučninom, paralizom dišnog sustava i naposljetku smrt organizma. Inhibicija BChE pak ne dovodi do posljedica opasnih za život, odnosno ne utječu na vitalne funkcije organizma. Mnogi inhibitori prirodnog su podrijetla i izoliraju se iz biljaka npr. flavonoida.³²

1.4. Kromatografija

Kromatografske tehnike razdvajanja temelje se na razdiobi komponenti smjese između stacionarne i mobilne faze. Stacionarna faza uglavnom je nepokretna, dok je

mobilna faza tekuća i prolazi kroz stacionarnu fazu. Kromatografske tehnike koriste se u analitičke i preparativne svrhe.²⁶

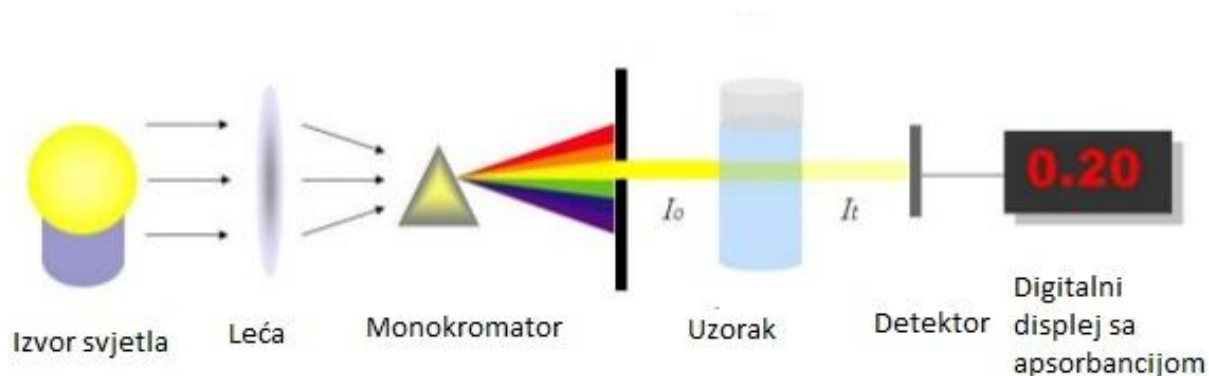
HPLC metoda koristi se za kvalitativno i kvantitativno određivanje ukupnog sadržaja fenola u smjesi. Kod HPLC tehnike razlikujemo HPLC sa normalnim i obrnutim fazama. HPLC sa normalnim fazama koristi stacionarnu fazu koja je polarna i mobilnu fazu koja je manje polarna. Tako će se za stacionarnu fazu jače vezati komponente sa polarnim funkcijskim skupinama, pa će se manje polarne komponente brže eluirati s kolone od onih polarnijih. HPLC sa normalnim fazama slabo se koristi, osim ako imamo slabo polarne fenolne spojeve. HPLC na obrnutim fazama koristi nepolarnu stacionarnu fazu i polarnu mobilnu fazu. Kolona je ispunjena silikagelom za kojeg su vezani nepolarni ugljikovodici, najčešće C18 duljine lanca. Upravo zato što je stacionarna faza silikatna i vrijeme zadržavanja za manje polarne faze je duže. Dodatkom polarnih tvari u mobilnu fazu vrijeme zadržavanja se povećava, a dodatkom hidrofnih otapala smanjuje. Ova tehnika se temelji na hidrofnim interakcijama koje su posljedica odbijajućih sila između polarnog otapala, nepolarne tvari koja se analizira i nepolarne stacionarne faze. pH utječe na brzinu eluiranja upravo zbog mogućnosti promjene polarosti tvari.²⁷

1.5. Spektrofotometrija

Spektroskopske metode odnose se na analitičke metode koje proučavaju međudjelovanje elektromagnetskog zračenja i supstance koju proučavamo. Ova metoda mjeri sposobnost tvari da apsorbira, reflektira i emitira zračenje. Prilikom prolaska elektromagnetskog zračenja kroz molekulu dolazi do apsorpcije ili emisije zračenja, ovisno o samoj strukturi tvari kroz koju zračenje prolazi kao i o njegovoj frekvenciji. Iz toga proizlazi da energija elektromagnetskog zračenja apsorpcijom može dati energiju molekuli koja je apsorbira.

Jedan od često korištenih spektroskopskih uređaja je spektrofotometar (**Slika 1.17.**) koji mjeri količinu svjetla koju molekula apsorbira, emitira ili reflektira, mjereći

intenzitet svjetla koje prolazi kroz uzorak smjese. Uz pomoć ovog uređaja moguće je odrediti koncentraciju proučavane smjese.⁸



Slika 1.17. Spektrofotometar³³

Kod spektrofotometrijskih mjerenja bitne su nam dva pojma kojima opisujemo svojstva tvari, a to su transmitacija (T) i apsorbancija (A).

Transmitacija se definira kao dio upadnog zračenja i izračunava se prema formuli:

$$T = P/P_0$$

Apsorbancija se definira kao logaritam odnosa zračenja koji je prošao kroz otopinu (P_0) i upadnog zračenja (P):

$$A = \log (P_0 / P)$$

Ove dvije fizikalne veličine opisuju se Lambert-Beerovim zakonom koji nam govori o odnosu apsorbancije i koncentracije neke tvari koja apsorbira elektromagnetsko zračenje prema jednadžbi:

$$A = \log (P_0 / P) = a b c$$

gdje je a apsorptivnost (apsorpcijski koeficijent), b duljina puta zračenja kroz uzorak, a c koncentracija apsorbirajuće vrste.⁸

1.5.1. Folin-Ciocalteu metoda

Folin-Ciocalteu metoda jedna je od značajnih metoda za određivanje ukupne količine fenola u pojedinim uzorcima. Ova metoda određuje se primjenom standarda uz dodatak reagensa i Folin-Ciocalteu reagensa koji u svom sastavu ima molibden(VI). U osnovi fenolni se spojevi određuju redukcijom Mo^{6+} u Mo^{5+} koji se boji u plavo i pokazuje optičku aktivnost na 730 nm. Ove reakcije su izrazito nestabilne u alkalnim otopinama, ali su zato stabilne u kiselim otopinama.

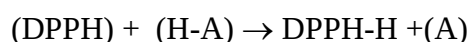
Folin-Ciocalteu metoda je jednostavna i praktična te ne zahtijeva neku posebnu opremu u laboratoriju što je njezina prednost. Ova metoda pokazuje svoju veliku specifičnost jer osim što pokazuje veliki raspon fenolnih tvari, ona je također pod utjecajem i nekih drugih nefenolnih spojeva.³⁴

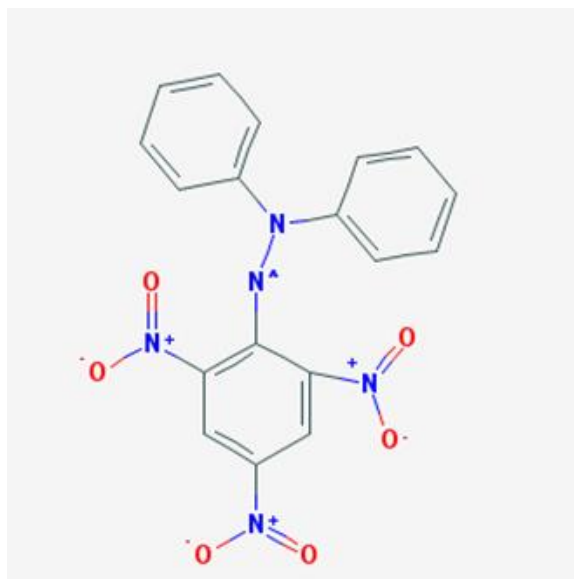
1.6. Metode određivanja biološkog potencijala

1.6.1. Metoda određivanja sposobnosti uklanjanja DPPH radikala, DPPH metoda

DPPH metoda je spektrofotometrijska metoda koja koristi sposobnost antioksidansa za uklanjanje slobodnih radikala. DPPH je stabilni slobodni radikal koji je ljubičaste boje i u prisutnosti nekog antioksidansa prelazi u žuto obojenje odnosno reducirani oblik. (**Slika 1.18.**). DPPH je topiv u organskim otapalima i ima apsorpcijski maksimum na 515 nm.³⁵

Antioksidans reagira sa radikalom DPPH i pretvara ga u neradikalni oblik DPPH-H :





Slika 1.18. Slobodni DPPH radikal

Postotak inhibicije uklanjanja DPPH radikala računa se prema formuli : ³⁶

$$\% = \frac{A(\text{DPPH}) - A(\text{uzorka})}{A(\text{DPPH})} \times 100$$

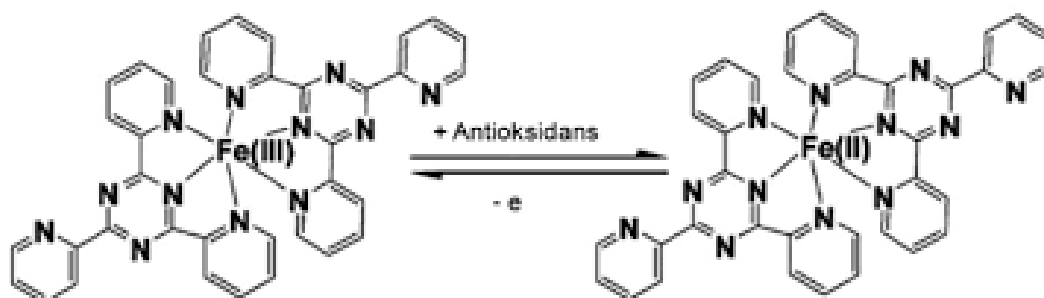
- A(DPPH) predstavlja apsorbanciju čiste otopine DPPH
- A (uzorka) predstavlja apsorbanciju ispitivanog uzorka sa DPPH

Najmjerodavniji način izražavanja antioksidacijskog kapaciteta je preko IC₅₀. To je količina uzorka koja je potrebna za smanjenje početne koncentracije DPPH radikala za 50%. Veće vrijednosti IC₅₀ znače manji antioksidativni kapacitet uzorka.³⁷

1.6.2. Metoda određivanja reduksijskog potencijala, FRAP metoda

FRAP metoda je jednostavna spektrofotometrijska metoda za mjerenje reduksijskog potencijala antioksidansa. Na niskim pH vrijednostima djelovanjem antioksidansa obojeni kompleks Fe^{III}–TPTZ se reducira do kompleksa Fe^{II}–TPTZ pri čemu se razvija plavo obojenje sa apsorbancijskim maksimumom od 593 nm. (**Slika 1.19.**) Intenzitet plavog obojenja uspoređuje se sa količinom željezovih iona u otopini

na osnovu toga određujemo redukcijski potencijal samog antioksidansa. FRAP test je jednostavan, pristupačan i daje nam brze rezultate, reagensi su jeftini, a sva potrebna oprema se obično nalazi u laboratoriju.^{38,39}

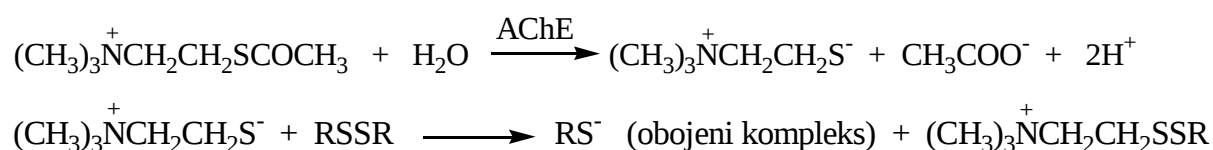


Slika 1.19. Redukcija Fe^{3+} -TPTZ u Fe^{2+} -TPTZ

Redukcijski potencijal nepoznatog uzorka određuje se u odnosu na signal uzorka poznate koncentracije, odnosno iz baždarne krivulje. Da bi se odredila apsorbanciju uzorka, apsorbanciju izmjerenu u četvrtoj minuti oduzme se od apsorbancije na početku ($A_4 - A_0$).

1.7. Metode određivanja sposobnosti inhibicije kolinesteraza, metoda po Ellmanu

Ellmanova metoda je kolorimetrijska metoda koja se koristi za određivanje inhibicije enzima kolinesteraza. Acetilkolinesteraza (AChE) i butirilkolinesteraza (BChE) kataliziraju hidrolizu acetilkolina na tiokolin i acetat. Aktivnost samog enzima mjeri se pojavom žutog obojenja u reakciji tiokolin sa 5-ditio-2-nitrobenzoatnim(I) ionom uz nastanak 5-thio-2-nitro-benzilne kiseline.



Reakcija se odvija brzo i jako je osjetljiva. Stupanj samog obojenja mjeri se u spektrofotometru na 412 nm.⁴⁰

Sposobnost inhibicije izračunava se prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A(k) - A(u)}{A(k)}$$

- A(k) - apsorbancija kontrolnog uzorka
- A(u) - apsorbancija uzorka

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal

Za izradu ovog diplomskog rada korišteni su vodeni ekstrakti devet samoniklih biljnih vrsta roda *Centaurea*: *Centaurea jacea*, *Centaurea rupestris*, *Cenetaurea salonitana*, *Cenaturea scabiosa*, *Centaurea solstitialis*, *Centaurea alba*, *Centaurea spinosociliata*, *Centaurea calcitrapa* i *Centaurea ragusina*, koji su uzeti sa različitih lokaliteta prikazanih u **Tablici 2.1.**

Tablica 2.1. Biljne vrste roda *Centaurea* sa različitih lokaliteta

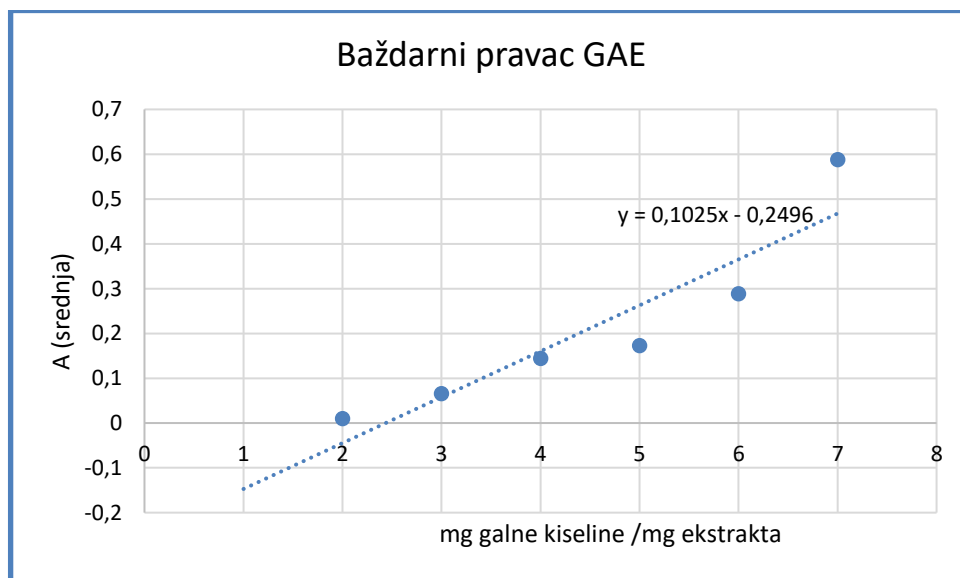
Oznaka uzorka	Biljna vrsta	Lokalitet
1C	<i>Centaurea jacea</i>	Kozjak
2C	<i>Centaurea rupestris</i>	Tijarica
3C	<i>Centaurea spinosociliata</i>	Cavtat
4C	<i>Centaurea alba</i>	Klis
5C	<i>Centaurea solstitialis</i>	Marjan
6C	<i>Centaurea jacea</i>	Kozjak
7C	<i>Centaurea jacea</i>	Rijeka
8C	<i>Centaurea rupestris</i>	Kozjak
9C	<i>Centaurea salonitana</i>	Glavaš
10C	<i>Centaurea salonitana</i>	Glavaš
11C	<i>Centaurea ragusina</i>	Palagruža
12C	<i>Centaurea scabiosa</i>	Tijarica
13C	<i>Centaurea calcitrapa</i>	Klis

2.2. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva u uzorcima vodenih ekstrakata biljaka roda *Centaurea* metodom po Folin-Ciocalteu

Reakcijska smjesa dobije se miješanjem 0,5 mL uzorka, 30 mL destilirane vode i 2,5 mL reagensa Folin – Ciocalteu. Otopinu dobro promućkati i nakon 1 minute dodati 7,5 mL 20 %-tne otopine natrijeva karbonata (Na_2CO_3), te nadopuniti do oznake. Ostaviti

stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm.

Udio ukupnih fenola računa iz jednadžbe baždarnog pravca galne kiseline (**Slika 2.1.**), a rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po mg ekstrakta, mg GAE / mg ekstrakta.



Slika 2.1. Baždarna krivulja galne kiseline

Za izradu baždarnog pravca pripremljene su otopine galne kiseline različitih koncentracija. Pipetiramo 0-, 1-, 2-, 3-, 5- i 10-mL matične otopine fenola u tikvice od 100 mL i nadopuniti do oznaka s vodom. Fenolne koncentracije ovako pripremljenih radnih otopina standarda su 0, 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L.

Iz svake tikvice se odpipetira po 1 mL otopine i prenese u zasebnu odmjernu tikvicu te se u svaku doda po 60 mL destilirane vode i dobro promućka; potom se doda po 5 mL Folin-Ciocalteu reagensa i ponovo dobro promućka, a zatim se nakon 1 minute doda po 15 mL 20 %-tne otopine natrijeva karbonata, dobro promućka i nadopuniti do oznake s vodom. Tikvice se ostave stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se izmjeri apsorbancija svake otopine kod 765 nm prema vodi u kivetama širine 1 cm. Standardna krivulja se napravi s podacima: koncentracija prema apsorbanciji.

Iz dobivenog baždarnog pravca je izračunata koncentracija ukupnih fenola u uzorcima vodenih ekstrakata biljaka roda *Centaurea*.

2.3. Određivanje kemijskog sastava vodenih ekstrakata biljaka roda *Centaurea* HPLC-DAD metodom

Za razdvajanje i identifikaciju pojedinih spojeva korišten je HPLC-DAD uređaj (**Slika 2.2.**) i kolona InertSustain C18, veličina čestice stacionarne faze iznosila je 5 μ m, dimenzija 250 x 4,6 mm. Korišteni su standardi i metanol HPLC čistoće, te mravlja kiselina (98-100%) p.a. čistoće.



Slika 2.2. Uređaj HPLC-DAD Agilent 1200

Metoda sa obrnutim fazama korištena je za razdvajanje i identifikaciju fenolnih kiselina i flavonoida. Za pripremu ove metode 25 mg ekstrakta je otopljeno u 10 mL 50% otopine metanola. Nakon toga uzorci su stavljeni u ultrazvučna kupelj u trajanju od 30 sekundi, te filtrirani kroz PTFE filter. Konačna koncentracija ekstrakta u otopini iznosila je 2,1739 mg/mL.

Standardi koji su korišteni :

- Topljivi u metanolu: kempferol, miricetin, kvercetin, rutin, krizoeriol, naringenin, eriodiktiol, galna kiselina, siringinska kiselina, elaginska kiselina, ferulinska kiselina, kafeinska kiselina, klorogenska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ružmarinska kiselina, protokatehinska
- Topljivi u dimetilsulfoksidu (DMSO) : luteolin, diozmetin, apigenin i diozmin.

Konačna koncentracija svakog standarda u standardnom dodatku je iznosila 0,0652 mg/mL. Optimizaciju metode odredili smo analizom otopine standarda na različitim kolonama, korištenjem različitih mobilnih faza i gradijenata. Elucija je praćena na 280, 270, 254, 220, 310, 350 i 370 nm.

Ukupno vrijeme analize je iznosilo 70 minuta. Protok mobilne faze je bio 0,5 mL/min., temperatura kolone 30 °C, injektirani volumen uzorka je iznosio 20 µL. Kromatogrami su snimani pri 280 nm.

2.4. Metode određivanja biološke aktivnosti

2.4.1. Određivanje sposobnosti hvatanja slobodnog DPPH radikala DPPH metodom

Za određivanje sposobnosti antioksidacijskog djelovanja vodenih ekstrakata biljaka roda *Centaurea* koristili smo DPPH metodu.

Reakcijska smjesa pripremi se tako da se u 96% etanolu otopi 4 mg 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala i ostavi nekoliko minuta na ultrazvučnu kupelj.

U kivete širine 1 cm stavlja se po 1 mL pripravljenog reagensa i 50 µL uzorka različitih koncentracija (0,5 mg/mL, 1 mg/mL i 10 mg/mL), odnosno etanola za slijepu probu. Nakon 60 minuta mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 517 nm i računa se postotak inhibicije DPPH radikala prema jednadžbi :

$$\% \text{ inhibicije DPPH} = \frac{A(\text{DPPH}) - A(\text{uzorka})}{A(\text{DPPH})} \times 100$$

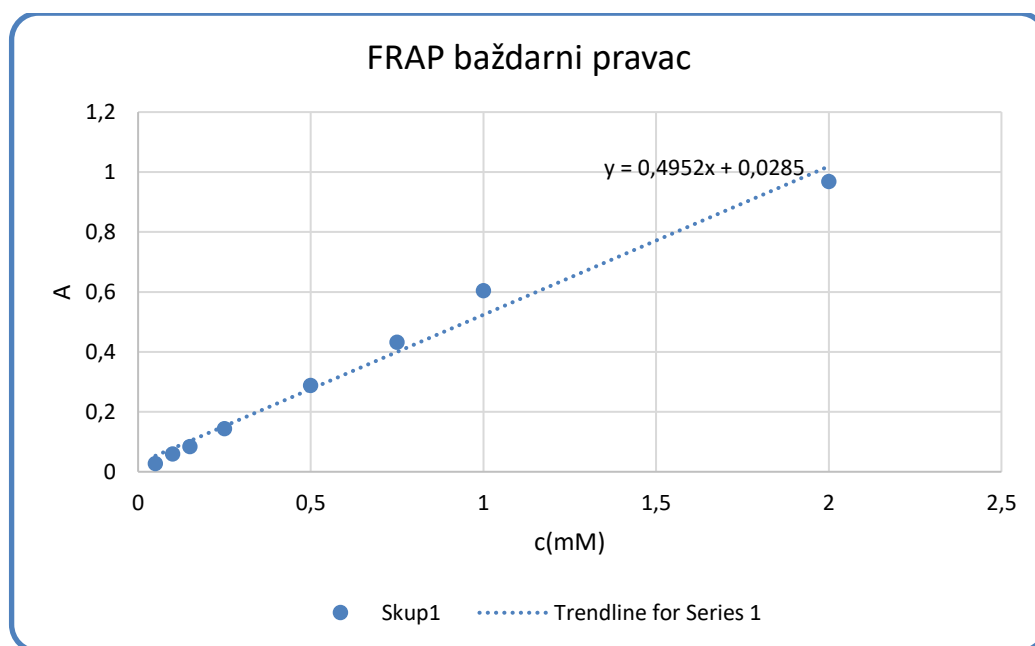
- A (DPPH) –apsorbancija čiste otopine DPPH
- A (uzorka) – apsorbancija ispitivanog uzorka sa DPPH

Kao standard smo koristili askorbinsku kiselinu (vitamin C).

Iz dobivenih rezultata nacrtan je graf ovisnosti koncentracija uzoraka u otopini c (mg/mL) o preostaloj količini DPPH (%) i iz jednadžbe pravca izračunata koncentracija uzorka (mg/mL) potrebna za 50%-tno smanjenje početne koncentracije DPPH (IC₅₀). Što je dobivena vrijednost za IC₅₀ manja, veći je antioksidativni kapacitet uzorka.

2.4.2. Određivanje reduksijske sposobnosti vodenih ekstrakata biljaka roda Centaurea, FRAP metodom

Redukcijski potencijal vodenih ekstrakata biljaka roda Centaurea određen je uz pomoć FRAP metode. Određivanje se temeljilo na njihovoj usporedbi sa dobivenim rezultatima za mjerenje s otopinama poznatih koncentracija Fe^{2+} iona. (Slika 2.3.)



Slika 2.3. Baždarni pravac za FRAP metodu

Reakcijska smjesa za FRAP sastojala se od 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL otopine TPTZ-reagensa i 2,5 otopine FeCl_3 u što je dodano 7,5 mL otopine vodenih ekstrakata.

Reagensi koji su korišteni za pripremu FRAP-reagensa su 40 mmol/L klorovodična kiselina (HCl); 0,2 mol/L acetatnog pufera pH= 3,6; 20 mmol/L otopine FeCl_3 ; 10 mmol/L otopine TPTZ u 40 mmol/L HCl .

Da bi odredili apsorbanciju čistog uzorka, apsorbanciju izmjerena u četvrtoj minuti oduzme se od apsorbancije na početku ($A_4 - A_0$) te dobivene vrijednosti usporede s onima za uzorke poznate koncentracije, tj. s baždarnom krivuljom. Dobiveni rezultati su iskazani kao mmol Fe^{2+} /L.

2.5. Određivanje sposobnosti inhibicije acetilkolinesteraze (AChE)

Za mjerenje sposobnost inhibicije AChE pripremljene su sljedeće otopine:

- Enzim AChE koncentracije 0,03 U/mL 6,6 μ L reagensa u 5 mL pufera, pH= 8
- Supstrat ATChI (acetiltiokolinjodid) koncentracije 0,5 mM otapanjem 15,9 mg reagensa u 5 mL pufera, pH=8
- DTNB koncentracije 0,3 mM otapanjem 13,079 mg reagensa u 5 mL pufera, pH=7

Tablica 2.2. Shema otopina

	Kontrola	BL ₁	BL ₂	Uzorak	Uzorak BL
Pufer	190	200	200	180	190
DTNB	10	10	10	10	10
Uzorak	/	/	/	10	10
AChE	10	/	10	10	/
ATChI	10	10	/	10	10

2.6. Određivanje sposobnosti inhibicije butirilkolinesteraze (BChE)

Za mjerenje sposobnost inhibicije BChE pripremljene su sljedeće otopine:

- Enzim BChE koncentracije 0,03 U/mL 14 μ L reagensa u 5 mL pufera, pH= 8
- Supstrat BTChI (butiriltiokolinjodid) koncentracije 0,5 mM otapanjem 17,45 mg supstrata u 5 mL pufera, pH=8
- DTNB koncentracije 0,3 mM otapanjem 13,079 mg DTNB u 5 mL pufera, pH=7

Tablica 2.3 . Shema otopina

	Kontrola	BL₁	BL₂	Uzorak	Uzorak BL
Pufer	190	200	200	180	190
DTNB	10	10	10	10	10
Uzorak	/	/	/	10	10
BChE	10	/	10	10	/
BTChI	10	10	/	10	10

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Određivanje kemijskog sastava vodenih ekstrakata biljaka roda *Centaurea*

U vodenim ekstraktima biljaka roda *Centaurea* određen je sadržaj ukupnih fenolnih spojeva, metodom po Folin-Ciocalteu, te je HPLC-DAD analizom utvrđena prisutnost 16 fenolnih spojeva, za koje proučavanjem literature utvrđeno da je riječ o čestim fenolnim komponentama vodenih ekstrakata biljaka.

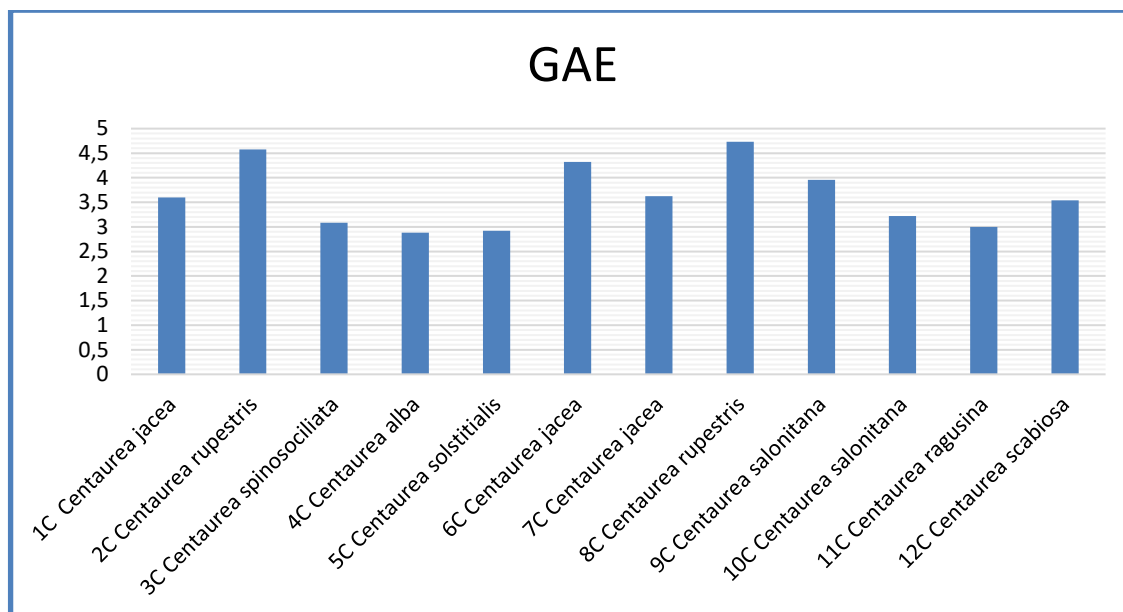
3.1.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola metodom po Folin-Ciocalteu

Ukupan sadržaj fenola u vodenim ekstraktima biljaka roda *Centaurea* određen je Folin-Ciocalteu metodom. Početne koncentracije vodenih ekstrakata bile su 1 mg/mL, a kao standard korištena je galna kiselina (GA).

Tablica 3.1. Ukupan sadržaj fenola u vodenim ekstraktima biljaka roda *Centaurea*

Oznaka uzorka	Biljna vrsta	mg GAE / mg ekstrakta
1C	<i>Centaurea jacea</i>	3,596
2C	<i>Centaurea rupestris</i>	4,578
3C	<i>Centaurea spinosociliata</i>	3,082
4C	<i>Centaurea alba</i>	2,884
5C	<i>Centaurea solstitialis</i>	2,923
6C	<i>Centaurea jacea</i>	4,321
7C	<i>Centaurea jacea</i>	3,625
8C	<i>Centaurea rupestris</i>	4,734
9C	<i>Centaurea salonitana</i>	3,960
10C	<i>Centaurea salonitana</i>	3,222
11C	<i>Centaurea ragusina</i>	3,001
12C	<i>Centaurea scabiosa</i>	3,541

GAE = ekvivalent galne kiseline



Slika 3.1. Grafički prikaz ukupnog sadržaja fenolnih spojeva u vodenim ekstraktima biljaka roda *Centaurea*

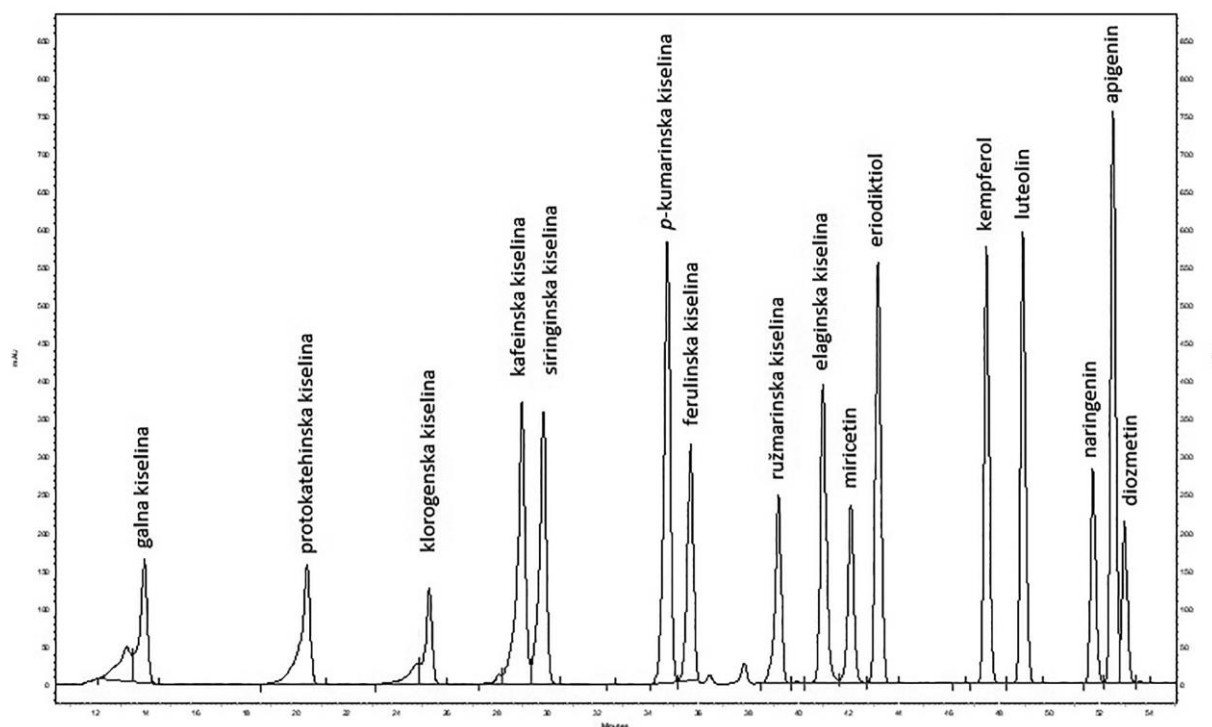
Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u vodenim ekstraktima biljaka roda *Centaurea*, za testiranu koncentraciju od 1 mg/mL kreže se u rasponu 2,884 mg GAE/mg ekstrakta (*C. alba*, lokalitet Klis) do 4,734 mg GAE/mg ekstrakta (*C. rupestris*, lokalitet Kozjak) što je znatno mala koncentracija.

3.1.2. HPLC/DAD analiza vodenih ekstrakata biljaka roda *Centaurea*

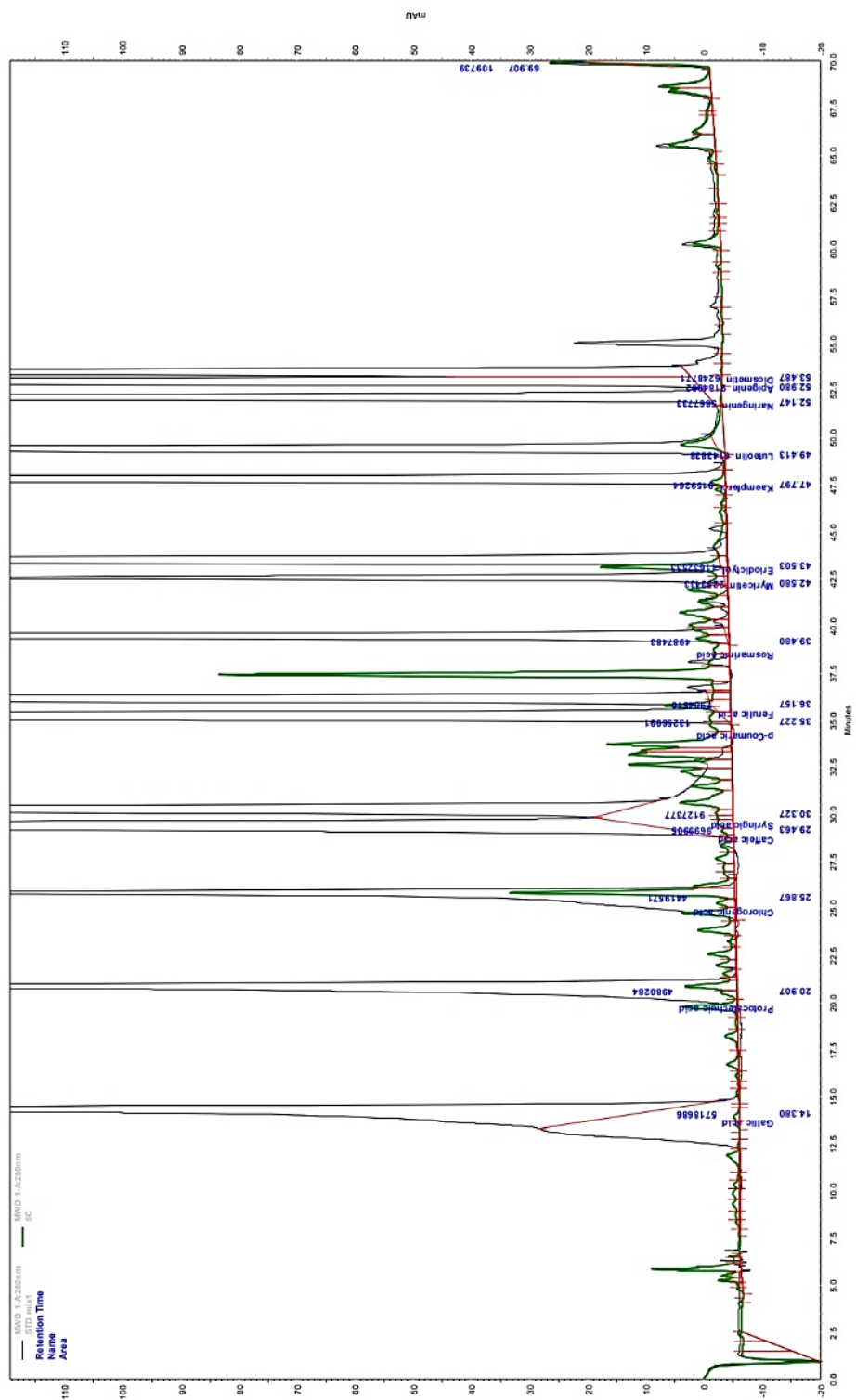
Za identifikaciju fenolnih spojeva u vodenim ekstraktima biljaka roda *Centaurea* za standarde korišteno je 16 čistih fenolnih spojeva za koje je pregledom literature utvrđeno da je riječ o često prisutnim komponentama vodenih ekstrakata biljaka.

Na kromatogramu je prikazano 16 različitih standarda koji su korišteni kod HPLC-DAD analiza. (**Slika 3.2.**) To su: kempferol, miricetin, naringenin, eriodiktiol, galna kiselina, siringska kiselina, elaginska kiselina, ferulinska kiselina, kafeinska kiselina, klorogenska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ružmarinska kiselina i protokatehinska kiselina (topljivi u metanolu), te luteolin, diozmetin i apigenin (DMSO). (**Slika 3.2.**)

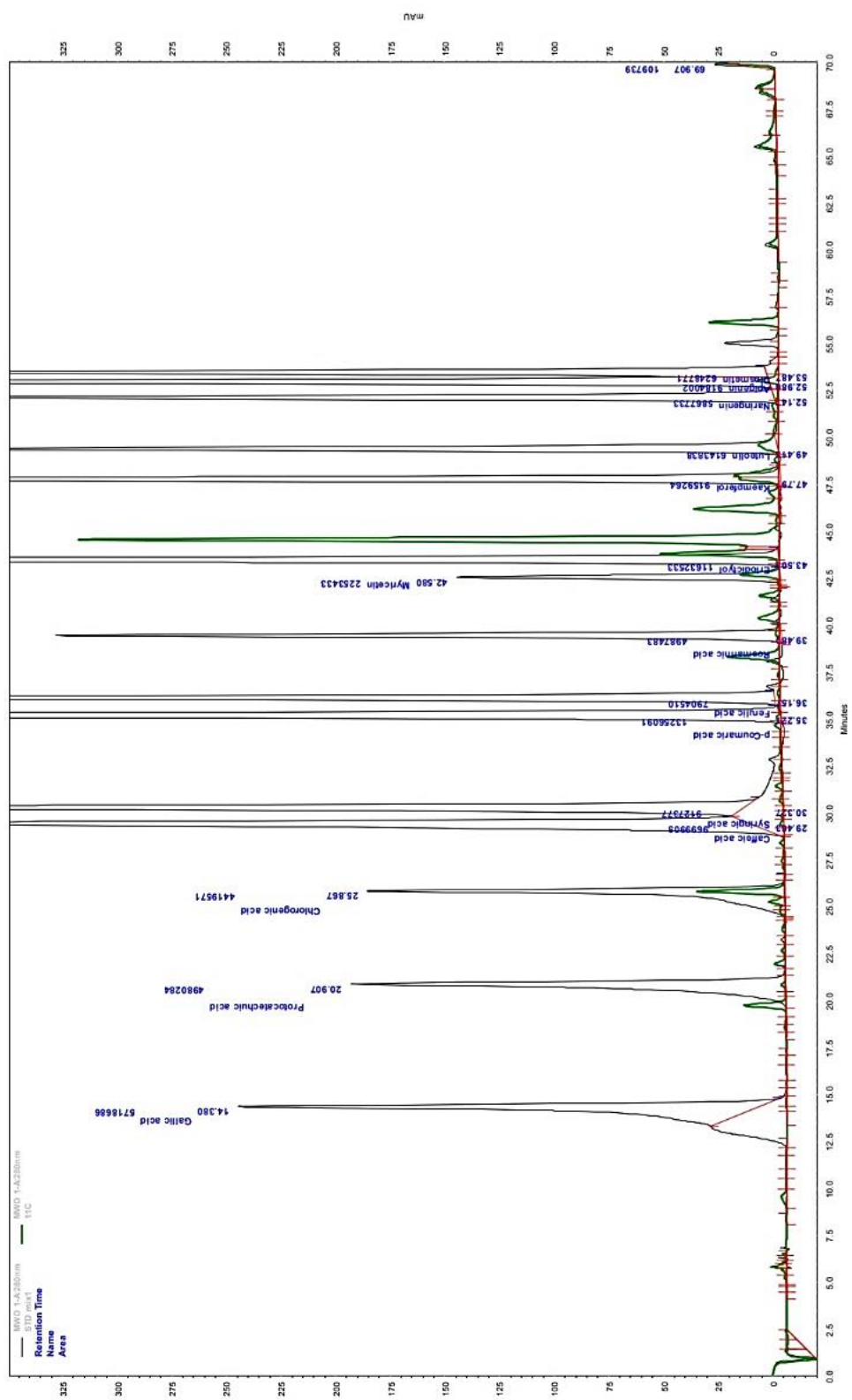
Za analizu su odabrana tri vodena ekstrakta: vodeni ekstrakt biljke *C. solstitialis*, *C. ragusina* i *C. scabiosa*. (**Slike 3.3., 3.4. i 3.5.**)



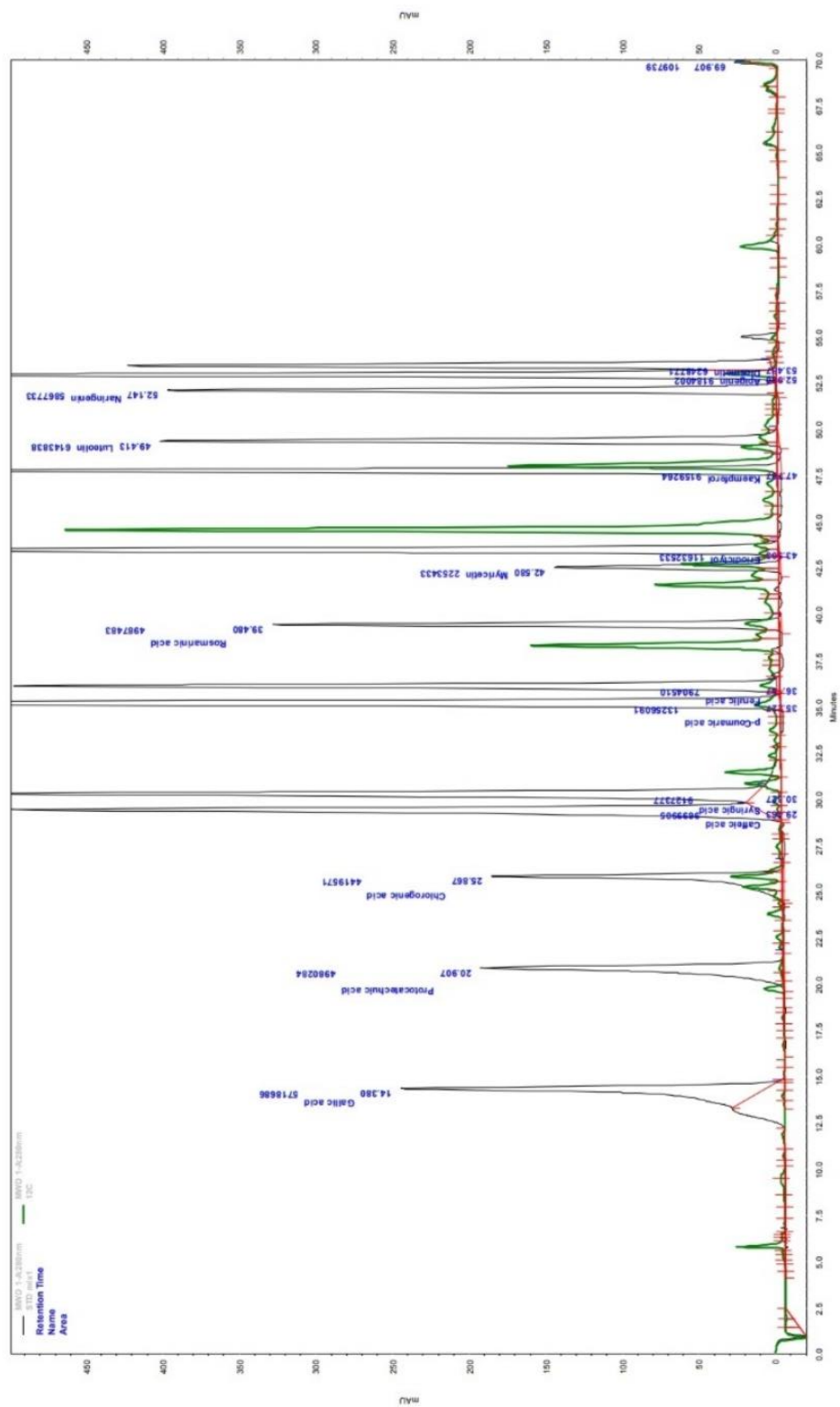
Slika 3.2. Kromatogram šesnaest različitih standarda korištenih kod HPLC-DAD analize



Slika 3.3. HPLC-DAD kromatogramski prikaz 16 fenolnih spojeva u vodenom ekstraktu biljke *C. solstitialis*



Slika 3.4. HPLC-DAD kromatogramski prikaz 16 fenolnih spojeva u vodenom ekstraktu biljke *C. ragusina*



Slika 3.5. HPLC-DAD kromatogramski prikaz 16 fenolnih spojeva u vodenom ekstraktu biljke *C. scabiosa*

Tablica 3.4. Kemijski sastav vodenih ekstrakata biljaka roda *Centaurea*: *C. solstitialis*, *C. ragusina* i *C. scabiosa*; određen HPLC-DAD metodom

	Fenolna komponenta	<i>Centaurea solstitialis</i>	<i>Centaurea ragusina</i>	<i>Centaurea scabiosa</i>
Flavonoli				
	Kempferol	-	+	+
	Myricetin	-	-	+
	Kvercetin	-	-	-
	Rutin	-	-	-
Flavoni				
	Apigenin	-	-	-
	Diosmetin	-	-	-
	Luteolin	+	-	+
	Diosmin	-	-	-
	krizoeriol	-	-	-
Flavanoni				
	Naringenin	-	-	-
	Eriodiktiol	-	-	-
Hidroksibenzojeve kiseline				
	Galna kiselina	-	-	-
	Siringinska kiselina	-	-	-
	Elaginska kiselina	-	-	-
Hidroksicimetne kiseline				
	ferulinska kiselina	-	-	+
	kafeinska kiselina	-	-	-
	klorogenska kiselina	+	+	+
	<i>p</i> -kumarinska kiselina	+	-	-
	ružmarinska kiselina	-	+	-
	protokatehinska kiselina	-	-	-

+ = prisutna navedena fenolna komponenta; - = nije prisutna navedena fenolna komponenta

HPLC-DAD analizama triju odabranih ekstrakata zaključuje se da je među 16 fenolnih spojeva tek mali dio spojeva zastupljen u izoliranim vodenim ekstraktima biljaka roda *Centaurea*. Tako je u vodenom ekstraktu biljke *C. solstitialis* (lokalitet *Marjan*) identificiran flavonski spoj luteolin te dvije hidroksicimetne kiseline: klorogenska kiselina i *p*-kumarinska kiselina. U ekstraktu biljke *C. Scabiosa* (lokalitet *Tijarica*) identificiran je flavonol kemferol te dvije hidroksicimetne kiseline:

klorogenska i ružmarinska kiselina. U ekstraktu biljke *C. ragusina* (lokalitet Palagruža) identificirane su dvije flavonolne komponente: kempferol i miricetin, flavon luteolin te dvije hidroksicimetne kiseline: ferilinska i klorogenska kiselina. Obzirom da su identificirane komponente zastupljene tek s malim udjelima u ukupnoj površini pika, nije se pribjeglo kvantifikaciji pikova.

3.2. Određivanje antioksidacijskog potencijala vodenih ekstrakata biljaka roda *Centaurea*

Za testiranje antioksidacijskog potencijala vodenih ekstrakata biljaka roda *Centaurea* korištene su dvije metode: DPPH metoda (metoda hvatanja slobodnih DPPH radikala) i FRAP metoda (metoda testiranja redukcijskog potencijala). Dobiveni rezultati uspoređeni su s onim za poznato dobar antioksidans vitamin C (askorbinska kiselina).

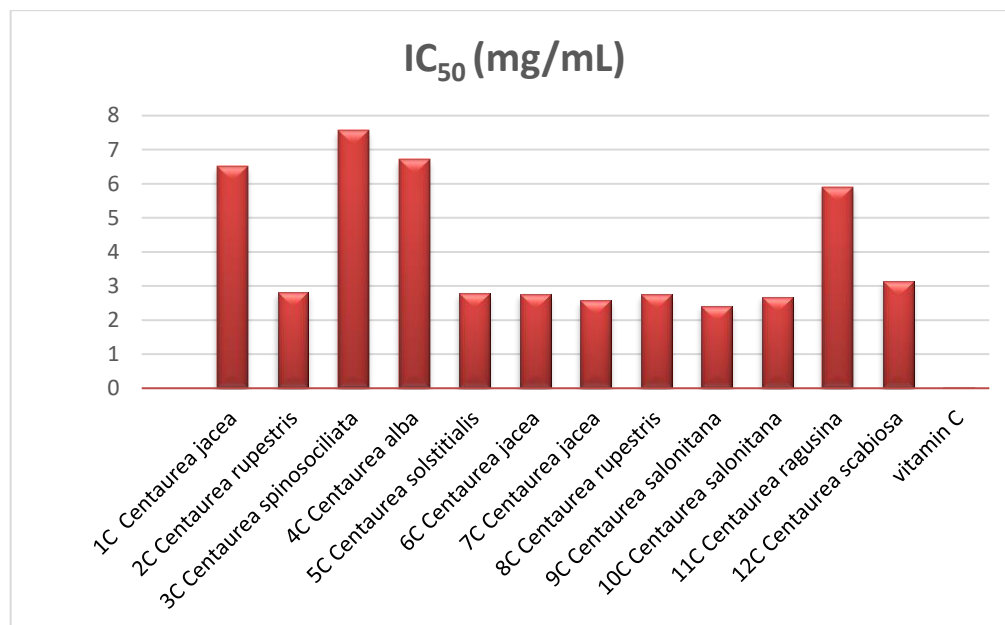
3.2.1. DPPH metoda

Antioksidacijski potencijal uzoraka vodenih ekstrakata biljaka roda *Centaurea* testiran je na uzorcima različitih koncentracija, kroz veći broj mjerenja za svaki od uzoraka, kako bi se izračunao IC_{50} za svaki uzorak, odnosno koncentracija potrebna za 50%-tnu inhibiciju DPPH radikala. IC_{50} je dobiven iz jednadžbe pravca dobivenom tijekom mjerenja antioksidacijskog potencijala uzoraka različitih koncentracija. Rezultati su prikazani **tablicom 3.5.** i **slikom 3.6.** Za usporedbu testiran je i uzorak poznato dobrog antioksidansa, vitamina C.

Tablica 3.5. Sposobnost hvatanja slobodnog DPPH radikala vodenim ekstraktima biljaka roda *Centaurea*

Oznaka uzorka	Biljna vrsta	IC_{50} (mg/mL)
1C	<i>Centaurea jacea</i>	6,517
2C	<i>Centaurea rupestris</i>	2,813
3C	<i>Centaurea spinosociliata</i>	7,562
4C	<i>Centaurea alba</i>	6,723
5C	<i>Centaurea solstitialis</i>	2,781
6C	<i>Centaurea jacea</i>	2,757
7C	<i>Centaurea jacea</i>	2,578
8C	<i>Centaurea rupestris</i>	2,744
9C	<i>Centaurea salonitana</i>	2,412
10C	<i>Centaurea salonitana</i>	2,679
11C	<i>Centaurea ragusina</i>	5,902
12C	<i>Centaurea scabiosa</i>	3,134
	Vitamin C	0,035

IC_{50} = koncentracija potrebna za 50%-tnu inhibiciju DPPH radikala



Slika 3.6. Grafički prikaz sposobnosti hvatanja slobodnog DPPH radikala vodenim ekstraktima biljaka roda Centaurea

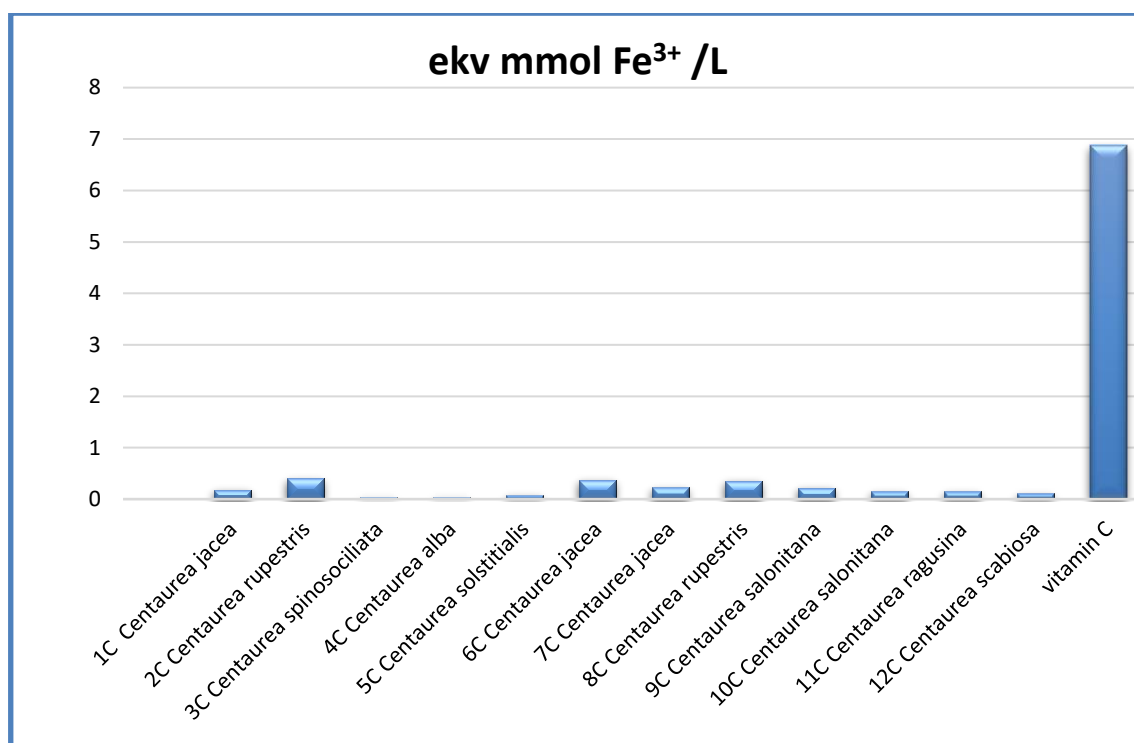
Testirani vodeni ekstrakti biljaka roda Centaurea pokazuju slab antioksidacijski potencijal metodom hvatanja slobodnih DPPH radikala (DPPH metoda), u odnosu na poznato dobar antioksidans vitamin C ($IC_{50} = 0,035$ mg/mL). Njihov antioksidacijski potencijal se u rasponu $IC_{50} = 2,412$ mg/mL za ekstrakt *C. salonitana* (lokalitet Glavaš) do $IC_{50} = 7,562$ mg/mL za ekstrakt *C. spinosociliata* (lokalitet Cavtat). Specifičan je ekstrakt vrste *C. jacea* (1C) sa lokaliteta Kozjak koji pokazuje niži antioksidacijski potencijal, $IC_{50} = 6,517$ mg/mL od ekstrakta vrste *C. jacea* (7C) sa područja Rijeke, $IC_{50} = 2,578$ mg/mL. Slab antioksidacijski potencijal testiran ovom metodom, možemo objasniti slabom zastupljenosti fenolnih spojeva kojima se uglavnom može pripisati ova vrsta aktivnosti.

3.2.2. FRAP metoda

Redukcijski potencijal vodenih ekstrakata biljaka roda *Centaurea* testiran je FRAP metodom. Za mjerenja su korištene koncentracije uzoraka 1 mg/mL. Rezultati su iskazani kao ekvivalentni mmol Fe³⁺/L. (**Tablica 3.6.** i **Slika 3.7.**). Za usporedbu testiran je redukcijski potencijal poznato dobrog antioksidansa vitamina C iste koncentracije (1 mg/mL).

Tablica 3.6. Redukcijski potencijal vodenih ekstrakata biljaka roda *Centaurea*

Oznaka uzorka	Biljna vrsta	ekv mmol Fe ³⁺ /L
1C	<i>Centaurea jacea</i>	0,177
2C	<i>Centaurea rupestris</i>	0,404
3C	<i>Centaurea spinosociliata</i>	0,041
4C	<i>Centaurea alba</i>	0,033
5C	<i>Centaurea solstitialis</i>	0,079
6C	<i>Centaurea jacea</i>	0,369
7C	<i>Centaurea jacea</i>	0,221
8C	<i>Centaurea rupestris</i>	0,353
9C	<i>Centaurea salonitana</i>	0,217
10C	<i>Centaurea salonitana</i>	0,148
11C	<i>Centaurea ragusina</i>	0,144
12C	<i>Centaurea scabiosa</i>	0,107
	Vitamin C	6,876



Slika 3.7. Grafički prikaz redukcijskog potencijala vodenih ekstrakata biljaka roda Centaurea

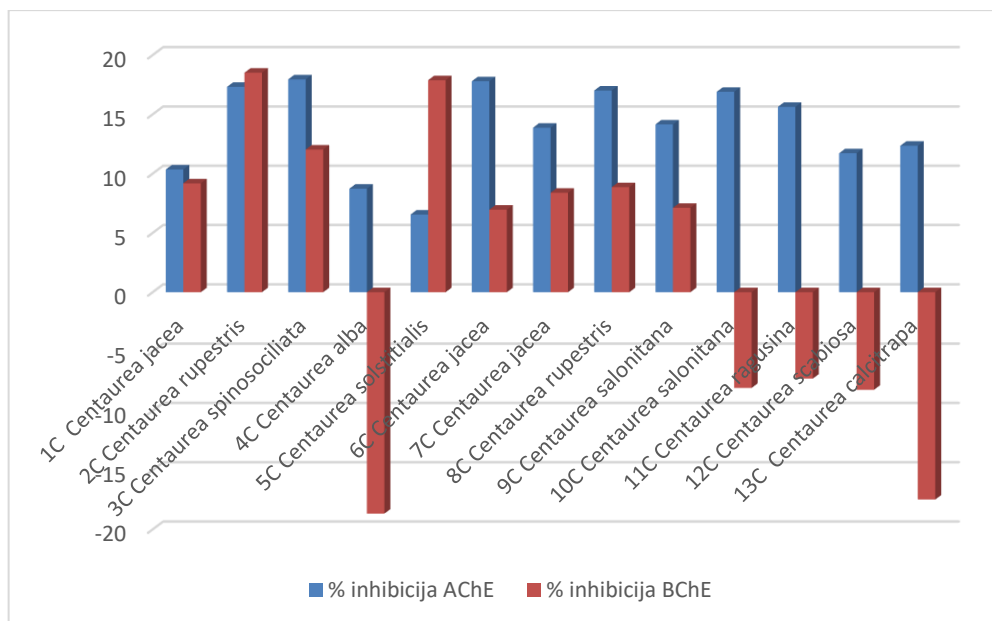
Vodeni ekstrakti biljaka roda Centaurea pokazuju slab redukcijski potencijal, testiran FRAP metodom, u odnosu na poznato dobar redukcijski agens, vitamin C (6,876 ekv. mmol Fe³⁺/L). Njihov redukcijski potencijal je u rasponu 0,404 ekv. mmol Fe³⁺/L za uzorak *C. rupestris* (lokalitet Tijarica) do 0,033 ekv. mmol Fe³⁺/L za ekstrakt *C. Alba* (lokalitet Klis). Vodeni ekstrakt vrste *C.jacea* (1C) sa područja Kozjak pokazuje nešto slabiji redukcijski potencijal od vrste *C. jacea* (7C) sa područja Rijeke (0,177 / 0,221 ekv. mmol Fe³⁺ /L). Slab redukcijski potencijal ekstrakata biljaka roda Centaurea može se objasniti slabom zastupljenosti fenolnih komponenti za koje je poznato da posjeduju dobra redukcijska svojstva.

3.3. Inhibicijski potencijal vodenih ekstrakata biljaka roda *Centaurea* na enzime acetilkolinesterazu (AChE) i butirilkolinesterazu (BChE)

Metodom po Ellmanu testirana je sposobnost vodenih ekstrakata biljaka roda *Centaurea* da inhibiraju enzime acetilkolinesterazu (AChE) i butirilkolinesterazu (BChE). Testirani su uzorci koncentracija 1 mg/mL i 0,5 mg/mL, ali su zbog stvaranja zamućenja kao mjerodavna uzeta mjerenja kod koncentracije osnovne otopine 0,5 mg/mL i ti su rezultati i prikazani. Koncentracije uzoraka u reakcijskom sustavu su 22X manje. Rezultati su prikazani **Tablicom 3.7.** i **slikom 3.8.**

Tablica 3.7. Inhibicijski potencijal vodenih ekstrakata biljaka roda *Centaurea* na enzime acetilkolinesterazu (AChE) i butirilkolinesterazu (BChE)

Oznaka uzorka	Biljna vrsta	inhibicija AChE %	inhibicija BChE %
1C	<i>Centaurea jacea</i>	10,35	9,18
2C	<i>Centaurea rupestris</i>	17,32	18,51
3C	<i>Centaurea spinosocilata</i>	17,95	12,03
4C	<i>Centaurea alba</i>	8,73	-18,67
5C	<i>Centaurea solstitialis</i>	6,55	17,88
6C	<i>Centaurea jacea</i>	17,79	6,96
7C	<i>Centaurea jacea</i>	13,87	8,39
8C	<i>Centaurea rupestris</i>	17,01	8,86
9C	<i>Centaurea salonitana</i>	14,15	7,12
10C	<i>Centaurea salonitana</i>	16,90	-8,07
11C	<i>Centaurea ragusina</i>	15,63	-7,28
12C	<i>Centaurea scabiosa</i>	11,72	-8,23
13C	<i>Centaurea calcitrapa</i>	12,35	-17,48



Slika 3.8. Grafički prikaz inhibicijskog potencijala vodenih ekstrakata biljaka roda *Centaurea* na enzime acetilkolinesterazu (AChE) i butirilkolinesterazu (BChE)

Testiranje sposobnosti inhibicije enzima AChE vodenim ekstraktima biljaka roda *Centaurea* pokazalo je da ekstrakti u koncentraciji 0,5 mg/mL inhibiraju enzim u rasponu do 6,55% (*C. solstitialis*, lokalitet Marjan) do 17,95% (*C. spinosociliata*, lokalitet Cavtat). Testiranje pak sposobnosti inhibicije enzima BChE vodenim ekstraktima biljaka roda *Centaurea* pokazalo je da ekstrakti u koncentraciji 0,5 mg/mL inhibiraju enzim do 18,55% (*C. rupestris* lokalitet Tigarica). Generalno, vodeni ekstrakti testiranih biljaka pokazuju nešto bolju sposobnost inhibicije AChE u odnosu na BChE. Izuzetak su ekstrakti biljaka *C. rupestris* (lokalitet Tigarica) (17,32% / 18,51%) i *C. solstitialis* (lokalitet Marjan) (6,55% / 17,88%). Eserin, poznato dobar inhibitor kolinesteraza je uzet kao referentna komponenta. Utvrđeno je da eserin u koncentraciji 0,1 mg/mL inhibira enzim AChE za 98,57 %, dok enzim BChE inhibira za 79,12 %. Na osnovu ovog može se zaključiti da vodeni ekstrakti biljaka roda *Centaurea* slabo inhibiraju enzime AChE i BChE.

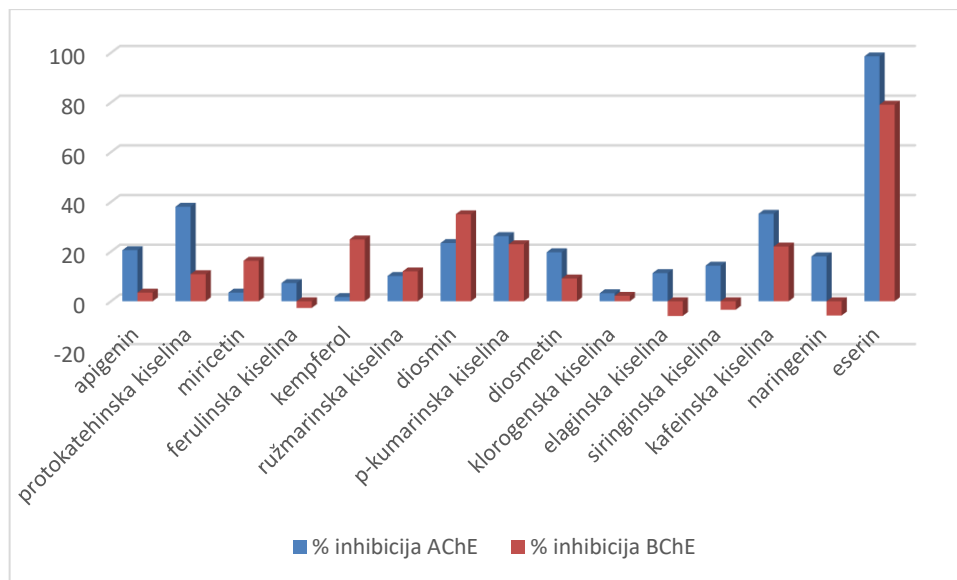
3.4. Inhibicijski potencijal čistih fenolnih spojeva na enzime acetilkolinesterazu (AChE) i butirilkolinesterazu (BChE)

Metodom po Ellmanu određena je i sposobnost inhibicije AChE i BChE otopinama čistih fenolnih spojeva. Uzorak protokatehinske kiseline otopljen je u vodi, dok su svi ostali uzorci otopljeni u 86 % etanolu. Testirani su uzorci koncentracija 1 mg/mL i 0,1 mg/mL ali su zbog stvaranja zamućenja kao mjerodavna uzeta mjerenja kod koncentracije osnovne otopine 0,1 mg/mL i ti su rezultati i prikazani. Koncentracija uzoraka fenolnih spojeva u reakcijskom sustavu je 22X manja. Rezultati su prikazani **Tablicom 3.8.** i **Slikom 3.9.** .

Tablica 3.8. Inhibicijski potencijal čistih fenolnih spojeva na enzime acetilkolinesterazu (AChE) i butirilkolinesterazu (BChE)

Uzorak	otapalo	Inhibicija AChE %	Inhibicija BChE %
Apigenin	EtOH	20,57	3,49
Protokatehinska kiselina	H ₂ O	38,06	10,92
Miricetin	EtOH	3,49	16,32
Ferulinska kiselina	EtOH	7,34	-2,69
Kempferol	EtOH	1,73	24,9
Ružmarinska kiselina	EtOH	10,18	12,04
Diosmin	EtOH	23,43	35,02
p-kumarinska kiselina	EtOH	26,25	22,98
Diosmetin	EtOH	19,74	9,19
Klorogenska kiselina	EtOH	3,25	2,21
Elaginska kiselina	EtOH	11,36	-5,9
Siringinska kiselina	EtOH	14,32	-3,4
Kafeinska kiselina	EtOH	35,2	22,03
Naringenin	EtOH	18,1	-5,71
Eserin	EtOH	98,57	79,12

Testirane koncentracije osnovnih otopina bile su 0,1 mg/mL (koncentracija u reakcijskom sustavu je 22X manja).



Slika 3.9. Grafički prikaz inhibicijskog potencijala čistih fenolnih spojeva na enzime acetilkolinesterazu (AChE) i butirilkolinesterazu (BChE)

Na sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE testirani su i čisti fenolni spojevi za koje je poznato da posjeduju dobra antioksidacijska svojstva, a koji su česte komponente vodenih ekstrakata biljaka. Testiranje sposobnosti inhibicije enzima AChE fenolnim spojevima pokazalo je da fenolni spojevi u koncentraciji 0,1 mg/mL inhibiraju enzim u rasponu 1,73% (kemferol) do 38,06% (protokatehinska kiselina). Testiranje pak sposobnosti inhibicije enzima BChE čistim fenolnim spojevima u koncentraciji 0,1 mg/mL pokazalo je da fenolni spojevi inhibiraju BChE do 35,02% (diosmin). Veći broj fenolnih spojeva jače inhibira AChE u odnosu na BChE. Izuzetak su miricetin (3,49% / 16,32%), kemferol (1,73% / 24,9%), ružmarinska kiselina (10,18% / 12,04%) i diosmin (23,43% / 35,02%). Na osnovu ovog, a u odnosu na poznato dobar inhibitor eserin, možemo izvesti zaključak da testirani fenolni spojevi slabo ili srednjom jakosti inhibiraju AChE, te slabo inhibiraju BChE.

4. ZAKLJUČAK

- U ovom diplomskom rada cilj je bio određivanje kemijskog sastava i biološke aktivnosti vodenih ekstrakata biljaka roda *Centaurea*.
- Folin-Ciocalteu metodom dokazali smo postojanje fenolnih komponenti u vodenim ekstraktima biljaka roda *Centaurea* i to najviše u vrsti *Centaurea rupestris* 4,734 mg GAE/mg ekstrakta.
- Analizom vodenih ekstrakata vrste *C. solstitialis* identificirali smo sljedeće fenolne komponente: hidroksicimetne kiseline (p-kumarinska kiselina i klorogenska kiselina) i flavoni (luteolin).
- Analizom vodenih ekstrakata vrste *C. rupestris* identificirali smo također hidroksicimetne kiseline (ružmarinska kiselina i klorogenska kiselina) te flavonole (kempferol).
- Analizom vodenih ekstrakata vrste *C. scabiosa* identificirali smo hidroksicimetne kiseline (klorogenska kiselina i ferulinska kiselina), flavonoli (miricetin i kempferol) te flavoni (luteolin).
- Antioksidacijski potencijal vodenih ekstrakata vrsta roda *Centaurea* ispitan je FRAP i DPPH metodom. Dobiveni rezultati pokazuju malu antioksidacijsku sposobnost
- DPPH metodom najbolju antioksidacijsku moć pokazala je *C. rupestris* 2,74 mg/mL IC₅₀.
- FRAP metodom najbolji redukcijski potencijal daje *C. rupestris*, 0,404 ekv. mmol Fe³⁺ /L ; *C. jacea*, 0,369 ekv. mmol Fe³⁺ /L .
- Antikolinesterazni potencijal vodenih ekstrakata biljaka roda *Centaurea* kao i otopina čistih fenolnih spojeva testirani su Ellmanovom metodom te su pokazali slabi postotak inhibicije ovih enzima.
- Najbolju sposobnost inhibicije AChE pokazao je vodeni ekstrakt *C. spinosociliata* (17,95 %), dok je najbolji inhibitor BChE *C. rupestris* (18,51 %).
- Kod otopine čistih fenolnih spojeva najbolji inhibitor AChE je protokatehinska kiselina (38,06 %) , a za BChE to je diosmin (35,02 %).

5. LITERATURA

1. S.D.Sarker, Y. Kumarasamy, M. Shoeb, S. Celik, E. Eucel, M. Middleton, L. Nahar, *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine* **5** (2005) 246-250
2. E. Koukoulitsa, H. Skaltsa, A. Karioti, C. Demetzos, K. Dimas, *Planta Med* **68** (2002) 649-658
3. S. Kovačić, T. Nikolić, M. Ruščić, M. Milović, V. Stamenković, N. Jasprica, J. Topić, D. Mihelj, S. Bogdanović, *Flora jadranske obale i otoka-250 najčešćih vrsta*, Školska knjiga, Zagreb (2008) str. 349-351
4. W. Sun, X. Ma, J. Zhang, F. Su, Y. Zhang, Z. Li, *Karyotypes of nineteen species of Asteraceae in the Hengduan Mountains and adjacent regions*, *Plant diversity* **39** (2017) str. 194-201
5. Z. Pavletić, *Cormobionta*, Interna skripta, Zagreb (1997) str.83-85
6. R. Matić, *Morfološke karakteristike jednogodišnjih cvjetnih vrsta porodice Asteraceae*, Završni rad, Poljoprivredni fakultet, Osijek (2017)
7. A.M. Beltagy, *J.Pharm. Sci. & Res.* **7** (2015) 103-107
8. I. Carev, *Fitokemijski i citogenetski profil odabranih biljaka roda Centaurea (Asteraceae)*, Doktorski rad, Prirodoslovno.matematički fakultet, Zagreb (2016)
9. A. Francini, C. Nali, E. Pellegrini, G. Lorenzini, *Characterization and isolation of some genes of the shikimate pathway in sensitive and resistant Centaurea jacea plants after ozone exposure*, *Environmental Pollution* **151** (2008) str. 272-279
10. R. Domac, *Flora Hrvatske*, Školska knjiga, Zagreb (1994) str. 364-367
11. <https://www.plantea.com.hr/livadna-zecina/> (18.6. 2018.)
12. <https://www.minnesotawildflowers.info/flower/brown-knapweed> (18.6.2018.)
13. <https://www.pijanitvor.com/threads/bijela-zecina-centaurea-deusta-subsp-concolor.28043/> (18.6.2018.)
14. <https://floressilvestresdelmediterraneo.blogspot.com/2012/09/asteraceae-centaurea-alba-subsp-alba.html> (18.6.2018.)
15. <https://www.plantea.com.hr/velika-zecina/> (18.6. 2018.)
16. <https://www.first-nature.com/flowers/centaurea-scabiosa.php> (18.6.2018.)
17. https://bgflora.net/families/asteraceae/centaurea/centaurea_salonitana/centaurea_salonitana_2_en.html (18.6.2018)
18. https://en.wikipedia.org/wiki/Centaurea_calcitrapa (27.6.2018.)

19. R. Domac, *Mala flora Hrvatske i susjednih područja*, Školska knjiga, Zagreb (1984.) str. 413-415
20. <https://www.google.hr/search?q=centaurea+spinosociliata&safe=off&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=0ahUKEwiNnpLLsPfbAhVNr6QKHS8UDGkQsAQIJQ&biw=1707&bih=793#imgsrc=SAZwTJZDA42shM>: (29.6.2018.)
21. A. Crozier, M. N. Clifford, H. Ashihara, *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford (2006) str. 2-19
22. P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3rd edition, Wiley, UK (2009) str. 167-178
23. M. de C Sánchez-Mata, J. Tardío, *Mediterranean Wild Edible Plants Ethnobotany and Food Composition Tables*, Springer, New York (2016) str. 235-240
24. L. J. Cseke, A. Kirakosyan, P. B. Kaufman, S. Warber, J. A. Duke, H. L. Briemann, *Natural product from plant 2nd edition*, CRC Press, Boca Raton (2006) str. 19-25
25. M. Bektašević, I. Carev, M. Roje, M. Jurin, O. Politeo, *Phytochemical Composition and Antioxidant Activities of the Essential Oil and Extracts of Satureja subspicata Vis. growing in Bosnia and Herzegovina*, Chemistry and biodiversity **14** (2017)
26. I. Jerković, *Kemija aroma*, Interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, (2011) str. 79-83
27. M. Anderson, K.R. Markham, *Flavonoids-Chemistry, biochemistry and application*, CRC Press, Boca Raton (2006) str. 4-30
28. F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, *Biological effects of essential oils*, Food and Chemical Toxicology **46** (2008) str. 446-475
29. S.P. Kazazić, *Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida*, Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, **55** (2004) str. 279-290
30. P. Vehtersbah-Stojan, *Antioksidansi u aterosklerozi*, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb (2015)
31. F. Burčul, *Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice Ranunculaceae*, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2014)

32. A. Bosak, M. Katalinić, Z., Kovarik, *Kolinesteraze: struktura, uloga, inhibicija*, Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, **62** (2011) str. 175-190
33. https://www.google.hr/search?q=spektrofotometri&safe=off&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjipsjxl9bAhXHiiwKHfgebA4IQ_AUICigB&biw=1707&bih=732#imgsrc=xhn7aybr1maNM: (18.6.2018.)
34. L.Y. Chen, C.W. Cheng, J.Y. Liang, *Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols*, Food Chemistry **170** (2015) str. 10-15,
35. S. F. M. Bessada, J. C. M, Barreira ,M.B.P.P. Oliveira, *Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications*, Industrial crops and products **76** (2015) str. 604-615
36. J-K. Moon , A. Shibamoto, *J. Agric. Food Chem* **57** (2009) 1655-1666
37. W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, *Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity*, LWT - Food Science and Technology **28** (1995) str. 25-30
38. Iris F.F. Benzie, J.J. Strain, *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of „Antioxidant Power“: The FRAP Assay*, Analytical Biochemistry **239** (1996) str. 70-76
39. V. Katalinić, M.Miloš, T. Kulišić, M.Jukić, *Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols*, Food Chemistry **94** (2006) str. 550-557
40. G .L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, J. and R. M. Featherstone, *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*, Biochemical Pharmacology **7** (1961) str. 88-95