

Antioksidacijska svojstva nekih biljnih svojti s područja Blidinja (Bosna i Hercegovina)

Rogić, Renata

Master's thesis / Diplomski rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:275423>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Renata Rogić

**Antioksidacijska svojstva nekih biljnih svojti s područja Blidinja
(Bosna i Hercegovina)**

Diplomski rad

Zagreb, 2014.

Ovaj rad, izrađen u Zagrebu, pod vodstvom doc.dr.sc. Sandre Radić Brkanac, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakultetu Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar struke znanosti o okolišu.

Zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Sandri Radić Brkanac na strpljenju i stručnoj pomoći pri izradi diplomskog rada te posebno za pomoć u eksperimentlanom dijelu izrade.

Veliko hvala prof. Valeriji Vujčić na pomoći u laboratoriju.

Hvala mojoj obitelji što je bila uz mene i pružala mi potporu tijekom studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Antioksidacijska svojstva nekih biljnih svojti s područja Blidinja (Bosna i Hercegovina)

Renata Rogić

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Polifenoli su najviše istraživana skupina sekundarnih metabolita zbog njihove biološke aktivnosti i pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje. Antioksidacijski učinci polifenola se povezuju s njihovom sposobnošću razgradnje slobodnih radikala, heliranja metala i inhibicije enzima uključenih u oksidacijske procese. U ovom radu istražen je sadržaj fenola i flavonoida te antioksidacijska aktivnost vodenih i etanolnih ekstrakata nekoliko biljnih svojti koje se diljem svijeta tradicionalno koriste u medicinske svrhe: divlja metvica (*Mentha longifolia* L.), kopriva (*Urtica dioica* L.), gospina trava (*Hypericum perforatum* L.), veliki čičak (*Arctium lappa* L.) i sitnoglavičasti stričak (*Carduus pycnocephalus* L.). Biljke su sakupljene na dvije različite nadmorske visine (850 i 1185 m) na području Blidinja (Bosna i Hercegovina). Rezultati su pokazali da su ispitivane biljne svojte razmjerno bogate polifenolnim tvarima. Također je utvrđeno da je, u usporedbi s vodom, etanol pogodnije otapalo za ekstrakciju polifenola budući su etanolni ekstrakti istraživanih biljnih svojti bogatiji fitokemikalijama te su pokazali veću biološku aktivnost nego vodeni ekstrakti istih biljnih svojti. Nadmorska visina je utjecala na antioksidacijsku aktivnost u vodenim ekstraktima istraživanih biljnih svojti. Utvrđena je pozitivna korelacija između sadržaja polifenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta mjerenog DPPH, ABTS i FRAP metodama.

(38 stranice, 15 slika, 4 tablice, 64 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski),

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: antioksidacijska aktivnost / polifenoli / Blidinje / nadmorska visina / ljekovite biljke

Mentor: Dr. sc. Sandra Radić Brkanac, doc.

Ocjenjivači: Dr. sc. Sandra Radić Brkanac, doc.,

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Antioxidant activity of some plant species from Blidinje (Bosnia and Hercegovina)

Renata Rogić

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Polyphenols are the most studied group of secondary metabolites due to their biological activity and positive effects on human health. Antioxidant effects of polyphenols are associated with their free radical scavenging activity, metal chelating ability and inhibition of enzymes involved in the oxidative processes. In this work the contents of phenolics and flavonoids and antioxidant activity of aqueous and ethanol extracts of several plant species traditionally used worldwide for medicinal purposes: wild mint (*Mentha longifolia* L.), nettle (*Urtica dioica* L.), St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.), burdock (*Arctium lappa* L.) and Italian thistle (*Carduus pycnocephalus* L.) were investigated. Plants were harvested at two different altitudes (850 and 1185) in the area of Blidinje (Bosnia and Herzegovina). Obtained results showed that investigated plant species are relatively rich in polyphenolic substances. It was also found that, compared to water, ethanol is preferred solvent for the extraction of polyphenols as the ethanolic extracts of the studied plant species showed higher levels of phytochemicals and higher antioxidant activity than their aqueous extracts. The influence of altitude on the antioxidant activity was visible in the water extracts of the studied plant species. A positive correlation was determined between the content of polyphenolic compounds and antioxidant capacity measured by DPPH, ABTS and FRAP methods.

(38 pages, 15 figures, 4 tables, 64 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: antioxidant activity / polyphenols / Blidinje / altitude / herbs

Supervisor: Dr. sc. Sandra Radić Brkanac, Asst.Prof.

Reviewers: Dr. sc. Sandra Radić Brkanac, Asst.Prof.

Thesis accepted:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. UPORABA LJEKOVITIH BILJAKA U SVIJETU.....	1
1.2. FLORA BLIDINJA.....	1
1.2.1. <i>Urtica dioica</i> L.	2
1.2.2. <i>Menta longifolia</i> (L.) Huds.	2
1.2.3. <i>Hypericum perforatum</i> L.	3
1.2.4. <i>Arctium lappa</i> L.	3
1.2.5. <i>Carduus pycnocephalus</i> L.	4
1.3. SEKUNDARNI BILJNI METABOLITI.....	4
1.3.1. POLIFENOLI.....	5
1.3.2. POLIFENOLI I ZDRAVLJE.....	7
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	9
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1. SAKUPLJANJE BILJNOG MATERIJALA.....	10
3.2. PRIPREMA EKSTRAKTA.....	11
3.3. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH FENOLA	11
3.4. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH FLAVONOIDA	12
3.5. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI BILJNIH EKSTRAKATA	12
3.5.1. DPPH METODA	12
3.5.2. ABTS METODA	13
3.5.3. FRAP METODA	14
3.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	15
4. REZULTATI	16
4.1. SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA.....	16
4.2. SADRŽAJ UKUPNIH FLAVONOIDA.....	18
4.3. DPPH METODA	20
4.4. ABTS METODA	22
4.5. FRAP METODA.....	24
4.6. KORELACIJE	26
5. RASPRAVA	27
5.1. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST	27
5.2. SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA.....	27

5.3. SADRŽAJ UKUPNIH FLAVONOIDA.....	28
5.4. DPPH METODA	29
5.5. ABTS METODA	29
5.6. FRAP METODA.....	30
5.7. KORELACIJE	31
6. ZAKLJUČAK.....	32
7. LITERATURA.....	33

1. UVOD

1.1. UPORABA LJEKOVITIH BILJAKA U SVIJETU

Od prapovijesnog doba, biljke su bile osnova za gotovo sve terapije u medicini do razvoja sintetskih lijekova u 19. stoljeću (Verpoorte, 2000). Zapisi o uporabi biljaka u liječenju bolesti i ublažavanju različitih tegoba sežu još iz vremena srednjeg paleolitika, prije 60 000 godina (Solecki, 1975).

Uporaba ljekovitih biljaka i danas zauzima važno mjesto u suvremenom društvu. Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) oko 65% svjetske populacije još uvijek koristi tradicionalnu medicinu kao primarni oblik zdravstvene zaštite. Većina tradicionalnih medicina, kao što su Ajurveda, Kineska, Unani, Tibetanska, Amazonaska i Afrička, uporabu biljaka u liječenju (fitoterapiju) uvrštavaju u svoju doktrinu (WHO, 2007). Uporaba biljaka za liječenje nije raširena samo u nerazvijenim zemljama već se biljke sve više ponovno koriste i u razvijenim zemljama gdje je dostupna suvremena medicina. Razlozi porasta uporabe biljaka su razočarenje zbog nedjelotvornosti sintetskih lijekova, ozbiljne i neugodne nuspojave, te visoke cijene lijekova (Jakovljević i sur., 2002). Stoga se sve više ljudi okreće prirodnim proizvodima i lijekovima. No, iako je uporaba biljaka veoma raširena, udio fitokemikalija i njihova biološka aktivnost sa znanstvenog stajališta veoma je malo istražena. Prema podacima iz 2000. godine u samo 15% od ukupnog broja biljaka na Zemlji određen je sastav fitokemikalija, a u njih samo 6% biološka aktivnost (Verpoorte, 2000). Zbog toga i WHO ističe važnost istraživanja na biljkama, posebice onima koje se koriste u tradicionalnoj medicini (WHO, 2005).

1.2. FLORA BLIDINJA

Park prirode Blidinje nalazi se u sjevernoj Hercegovini. Na površini od 364 km² obuhvaća planinske masive Čvrsnice (2 228 m) i Vrana (2 074 m) odijeljene 12 km dugom udolinom Dugog polja na čijem je južnom dijelu Blidinjsko jezero.

Područje Blidinje jedno je od najvažnijih centara endemičnosti ne samo Bosne i Hercegovine, već čitavog Balkana, koji se pak ističe kao jedno od vrućih točaka (hot spot) europske i mediteranske flore. Od 450 biljnih endemskih vrsta u BiH polovica raste u endemskom centru Čvrsnica-Čabilja-Prenj. Uz široko rasprostranjene vrste, prisutan je značaj broj vrsta koje pripadaju alpskim, mediteranskim, Ilirskim, dinarskim i balkanskim flornim elementima. Prevladavaju vrste iz porodica: *Compositae*, *Caryophyllaceae*, *Fabaceae*, *Scrophulariaceae*, *Lamiaceae*, *Rosaceae* i drugih. U PP Blidinje zabilježeno je oko 500 biljnih svojti (Redžić i sur., 2010).

1. UVOD

1.2.1. Obična kopriva (*Urtica dioica* L.)

Vrsta: *Urtica dioica* L.

Rod: *Urtica*

Porodica: *Urticaceae*

Red: *Rosales*



Narodna imena: dvodomna kopriva, obična kopriva, velika kopriva, prava kopriva, žara.

Slika 1. Obična kopriva (*Urtica dioica* L.) (Flora Croatica Database)

Urtica dioica L. (**Slika 1**) je jednogodišnja i višegodišnja biljka koju odlikuju žareće dlačice. Rasprostranjena je u umjerenim geografskim širinama u svijetu. U ljekovite svrhe sakuplja se čitava biljka, a koristi se u liječenju upala mokraćnih kanala i bubrega, gastritisa te slabokrvnosti. Pokazuje antivirusno (Uncini Manganelli i sur., 2005), antiulcerozno, antimikrobno i anelgezijsko djelovanje (Gülçin i sur., 2004). Mladi listovi su jestivi.

1.2.2. Dugolisna metvica (*Mentha longifolia* (L.) Huds.)

Vrsta: *Mentha longifolia* (L.) Huds.

Rod: *Mentha*

Porodica: *Lamiaceae*

Red: *Lamiales* *Bromhead*



Narodna imena: dugolisna metvica, konjska metvica

Slika 2. Dugolisna metvica (*Mentha longifolia* (L.) Huds.) (Flora Croatica Database)

Rod *Mentha* obuhvaća 25 vrsta koje su uglavnom višegodišnje biljke rasprostranjene u umjerenim geografskim širinama Europe, Azije, Australije i Južne Amerike (Lange i Croteau, 1999). Dugolisna metvica (*Mentha longifolia* L.) (**Slika 2**) ima vrlo široku upotrebu u narodnoj medicini, prehrambenoj te kozmetičkoj industriji. Također je dokazano da eterično

1. UVOD

ulje i ekstrakt metvice imaju antioksidacijsko, antibakterijsko i antivirusno djelovanje (Hajlaoui i sur., 2009).

1.2.3. Gospina trava (*Hypericum perforatum* L.)

Vrsta: *Hypericum perforatum* L.

Rod: *Hypericum*

Porodica: *Clusiaceae*

Red: *Malpighiales* Juss. ex Bercht. et J. Presl



Narodna imena: kantarion, gospina trava, zvončac, ručica Gospina, pljuskavica, trava Sv.Ivana

Slika 3. Gospina trava (*Hypericum perforatum* L.) (Flora Croatica Database)

Gospina trava (*Hypericum perforatum* L.) (**Slika 3**) je višegodišnja biljka autohtona u Europi. U ljekovite svrhe sakuplja se čitava biljka u cvatu. Cvjetovi su žute boje, a trljaju li se među prstima, iz njih istječe crveni sok bogat flavonoidima, kloroglucinolima (hiperforin) i naftodiatronima (hipericin). Koristi se prije svega u liječenju depresije i nesаницe, a u obliku ulja kao sredstvo za njegu kože (Benedi i sur., 2004).

1.2.4. Veliki čičak (*Arctium lappa* L.)

Vrsta: *Arctium lappa* L.

Rod: *Arctium*

Porodica: *Asteraceae*

Red: *Asterales* Link



Narodna imena: veliki čičak, obični čičak.

repusina, divičina divja, lopuh

Slika 4. Veliki čičak (*Arctium lappa* L.) (Flora Croatica Database)

Veliki čičak (*Arctium lappa* L.) je dvogodišnja biljka iz porodice *Asteraceae*, a prirodno raste u umjerenim područjima Euroazije (**Slika 4**). U ljekovite svrhe se obično

1. UVOD

koristi korijen dvogodišnjih biljaka koji u obliku čaja djeluje kao diuretik i antipiretik. Obzirom da korijen čička sadrži visoki sadržaj inulina, vrlo je koristan i za dijabetičare. Za arktigenin, lignan izoliran iz čička, dokazano je antitumorsko i antioksidacijsko djelovanje (Susanti i sur., 2012).

1.2.5. Sitnoglavičasti stričak (*Carduus pycnocephalus* L.)

Vrsta: *Carduus pycnocephalus* L.

Rod: *Carduus*

Porodica: *Asteraceae*

Red: *Asterales* Link



Narodna imena: sitnoglavičasti stričak, badelj divji

Slika 5. Sitnoglavičasti stričak (*Carduus pycnocephalus* L.) (Flora Croatica Database)

Carduus pycnocephalus L. ili sitnoglavičasti stričak (*Asteraceae*) je vrsta čička slične rasprostranjenosti kao i veliki čičak, a u tradicionalnoj medicini se koristi u liječenju želučanih tegoba i reumatskih oboljenja (**Slika 5**). Također, biljke iz roda *Carduus* pokazuju antiupalno, antitumorsko i antibakterijsko djelovanje (Al-Shammari i sur., 2012).

1.3. SEKUNDARNI BILJNI METABOLITI

Sekundarni biljni metaboliti su spojevi sintetizirani u biljkama koji sudjeluju u interakciji biljke s okolinom, a produkt su sekundarnog metabolizma. Često su prisutni u samo jednoj biljnoj vrsti ili skupini taksonomski srodnih vrsta. Nemaju neposrednu funkciju u rastu i razvitku biljaka tj. nemaju ulogu u primarnom metabolizmu kao npr. klorofil, nukleotidi, aminokiseline, ugljikohidrati ali mnogi imaju važnu ekološku funkciju jer predstavljaju zaštitu od herbivornih organizama i infekcije mikrobima. Tako npr. soja sadrži fenolne spojeve koji ju štite od gljivičnih infekcija, a nikotin iz duhana otrovan je za brojne kukce. Osim toga, ovi spojevi također služe i za primamljivanje oprašivača i životinja koje rasprostranjaju sjemenke, te kao tvari koje posreduju u kompeticiji biljka-biljka (alelopatija).

Biljne obrambene tvari razvile su se tijekom evolucije zahvaljujući nasljednim mutacijama, prirodnoj selekciji i evolucionim promjenama. Mutacije u temeljnim

1. UVOD

metaboličkim putovima rezultirale su pojavom novih tvari od kojih su neke bile otrovne za herbivore ili su svojim mirisom ili okusom odvrćale od hranjenja biljkama koje ih sadrže. Tako dugo dok te tvari nisu bile otrovne za biljku, biljci su pružale prednost pred biljkama koje ih nisu sadržavale (Pevalek-Kozlina, 2003).

Dugo se smatralo da oni nisu neophodni za rast i razvoj biljaka, no novija istraživanja sve više potvrđuju njihovu esencijalnu ulogu u razvoju biljaka, a posebno u prilagodbi i preživljavanju u nepovoljnim uvjetima (Kliebenstein i Osbourn, 2012). Osim važnih uloga u biljci, upravo su mnogi sekundarni metaboliti odgovorni za blagotvoran i pozitivan učinak biljaka na zdravlje ljudi, stoga ih se često naziva i bioaktivnim komponentama, fitokemikalijama i nutraceuticima. Do sada je otkriveno oko 100 000 različitih bioaktivnih spojeva, a ta se brojka gotovo svakodnevno povećava (Ribera i Zuniga, 2012).

Na temelju načina njihove biosinteze, sekundarni biljni metaboliti se dijele u tri velike skupine: terpene, fenolne spojeve i sekundarne tvari koje sadrže dušik.

1.3.1. POLIFENOLI

Polifenoli su najveća skupina sekundarnih metabolita. Do sada ih je otkriveno oko 8000. Sastoje se od jednog ili više aromatskih prstenova koji posjeduju jednu ili više hidroksilnih grupa (Dai i Mumper, 2010). Polifenoli su raznolika skupina sekundarnih metabolita zbog čega se u literaturi mogu naći različiti načini njihove klasifikacije: prema strukturi, na temelju broja ugljikovih atoma u molekuli, na temelju biološke aktivnosti, biosintetskog puta i sl. (Tsao, 2010).

Za njihovo kvantitativno određivanje u biljnom tkivu često se koriste spektrofotometrijske metode, dok se za točnu identifikaciju koristi tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti povezana sa spektrometrom masa (LC-MS) (Gruz i sur., 2008; Prokudina i sur., 2012)

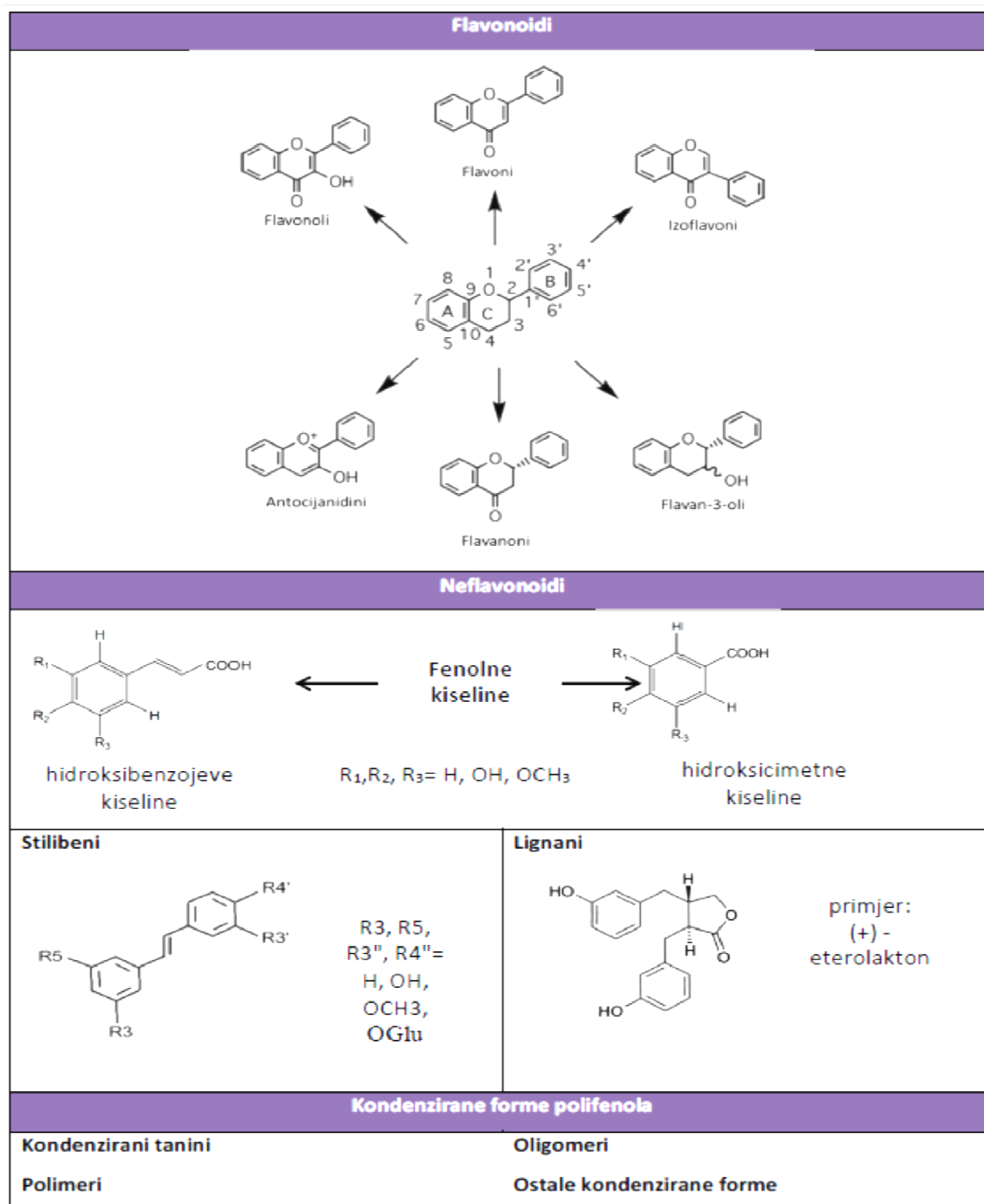
U biljci spojevi iz skupine polifenola imaju različite uloge, kao sastavnice podupirajućih i zaštitnih tkiva, obrambeni su signali, sudjeluju u razmnožavanju jer kao atraktanti privlače oprašivače, djeluju kao alelopatski agensi, štite biljku od ultraljubičastog zračenja te su signalne molekule u interakciji biljke s okolinom (Jaganath i Crozier, 2010). Najčešće se u biljkama nalaze u obliku glikozida različitih šećera. Flavonoidi kao podskupina polifenola obuhvaćaju preko 4000 do sada otkrivenih spojeva i zauzimaju prvo mjesto među

1. UVOD

istraživanim sekundarnim metabolitima (Scalbert i sur., 2005). Veliki interes za flavonoide prvenstveno je potaknut njihovim pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje.

Neke od skupina i podskupina polifenola prikazane su u **Tablici 1**.

Tablica 1. Podjela polifenola (Šamec, 2013. prema Fuss i sur., 2003; Chong i sur., 2009; Stalikas, 2010)



1. UVOD

Sastav polifenola u biljci ovisi o raznim unutarnjim i vanjskim čimbenicima (Dai i Mumper, 2010). Kako polifenoli sudjeluju u komunikaciji biljke s okolinom njihova količina uvelike ovisi o vanjskim uvjetima rasta. U biljkama se povećava udio polifenolnih komponenata uslijed stresnih uvjeta (Lule i Xia, 2005). Prijašnja istraživanja pokazala su da lokalitet rasta utječe na razinu polifenola u ljekovitom i endemičnom bilju (Šamec i sur., 2010)

1.3.2. POLIFENOLI I ZDRAVLJE

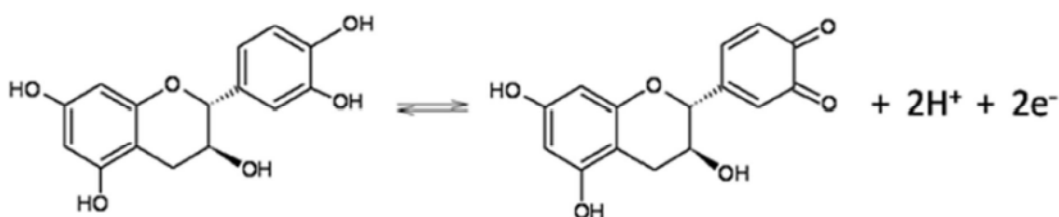
Polifenoli, a posebno flavonoidi postali su najviše istraživana skupina sekundarnih metabolita sredinom devedesetih godina prošlog stoljeća zbog njihove biološke aktivnosti i pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje (Stevenson i Hurst, 2007). Sve je više znanstvenih studija koje podupiru hipotezu da prehrana bogata polifenolima ima preventivnu ulogu u nastajanju kardiovaskularnih bolesti, nekih vrsta karcinoma, dijabetesa tipa 2, bolesti probavnog trakta i sl. Polifenoli u prehrani su u visokim koncentracijama zastupljeni u voću (Piljac-Žegarac i Šamec, 2011) i povrću (Šamec i sur., 2011). Posebno se ističu ljekovite biljke i njihovi oparci kao bogat izvor polifenola (Katalinić i sur., 2006; Surveswaran i sur., 2007; Li i sur., 2008)

Veliki broj biokemijskih procesa u našem organizmu potiče stvaranje slobodnih radikala (engl. reactive oxygen species - ROS). To je skupina veoma reaktivnih molekula koje uključuju reaktivne kisikove vrste (ROS), superoksida (O_2^\bullet), hidroksila (HO^\bullet), peroksila (ROO^\bullet), vodikov peroksid (H_2O_2), slobodni kisik (O_2), dušikove okside (NO^\bullet), peroksinitrate ($ONOO^\bullet$) i hipokloride ($HOCl$) (Noorhajati i sur., 2012).

U normalnim uvjetima, homeostaza slobodnih radikala regulirana je antioksidansima prisutnim u organizmu. U specifičnim uvjetima, uslijed izloženosti negativnim vanjskim čimbenicima ili bolesti ta je ravnoteža narušena. U tom slučaju u organizmu nastaje višak slobodnih radikala koji mogu oštetiti lipide, proteine, ugljikohidrate ili DNA te na taj način izazvati različita patološka stanja (Zhao i sur., 2005). Proces lipidne oksidacije uključen je u procese starenja jer lipidi koji ulaze u sastav kože reagiraju sa slobodnim radikalima i prelaze u lipidne peroksida koji ubrzavaju starenje (Lee i sur., 2001). Nadalje, oštećenja staničnih membrana lipidnom oksidacijom i/ili oštećenja DNA izazvana slobodnim radikalima povezana su i s nastajanjem mnogih bolesti kao što su neke vrste karcinoma, ateroskleroza i neurodegenerativne bolesti (Deng i sur., 2005). Uslijed povećane razine slobodnih radikala

1. UVOD

povećava se razina lipoproteina male gustoće (engl. low density lipoprotein- LDL) koji uzrokuju nakupljanje kolesterola što dovodi do razvoja kardiovaskularnih oboljenja (Noorhajati i sur., 2012). U situaciji kada je ravnoteža između slobodnih radikala i antioksidansa u organizmu narušena potrebno je unositi antioksidanse hranom. Jedni od najjačih antioksidansa prisutnih u hrani upravo su polifenoli koji zbog svoje specifične kemijske strukture imaju sposobnost prekidanja lančanih reakcija doniranjem atoma vodika ili elektrona slobodnom radikalu (**Slika 6**), dok sami poprimaju stabilne, nereaktivne konformacije.



Slika 6. Reakcija oksidacije katehina pri čemu dolazi do otpuštanja dva elektrona i dva vodikova protona (Piljac i sur., 2004).

U ljudskom organizmu antioksidansi djeluju na tri načina (Noorhajati i sur., 2012):

- spečavaju ili inhibiraju nastanak lipidnih peroksida
- neutraliziraju slobodne radikale
- popravljaju štetu izazvanu djelovanjem slobodnih radikala

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Ciljevi:

- Odrediti biološku aktivnost vodenih i etanolnih ekstrakata biljnih svojti (*Urtica dioica* L., *Mentha longifolia* L., *Hypericum perforatum* L., *Arctium lappa* L., *Carduus pycnocephalus* L.) s područja Blidinja s posebnim naglaskom na antioksidacijsku aktivnost
- Usporediti dobivene vrijednosti u vodenim i etanolnim ekstraktima
- Usporediti dobivene vrijednosti s obzirom na različite nadmorske visine lokaliteta rasta (Blidinje 1185 m i Sovići 750 m)

Hipoteze:

- Biljne vrste s područja Blidinja bogate su fitokemikalijama te pokazuju biološku aktivnost
- Etanolni ekstrakti istraživanih biljnih svojti su bogatiji fitokemikalijama i imaju veću biološku aktivnost nego vodeni ekstrakti istih biljnih svojti
- Nadmorska visina utječe na sintezu sekundarnih metabolita i biološku aktivnost
- Kod mjerenja antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakata potrebno je koristiti nekoliko metoda paralelno jer izmjerena vrijednost ovisi o korištenoj metodi

3. MATERIJALI I METODE

3.1. SAKUPLJANJE BILJNOG MATERIJALA

Predmet istraživanja u ovom radu su pet biljnih vrsta prikupljenih u kasno ljeto (2013.g) na području Blidinja (Bosna i Hercegovina) na dva lokaliteta različitih nadmorskih visina (Sovići 750 m, Blidinje 1185 m) (**Slika 7, Tablica 2**). Svaka pojedina biljna vrsta nađena je na 750 i 1185 m izuzev velikog čička koji raste samo na nižoj nadmorskoj visini pa je stoga na višoj nadmorskoj visini sakupljena druga vrsta čička (sitnoglavičasti stričak) (**Tablica 2**) koji pripada istoj porodici (Asteraceae) kao i veliki čičak. Na svakom lokalitetu biljni uzorci su prikupljeni po principu slučajnosti te su determinirani u Botaničkom vrtu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta uz pomoć prof. Antuna Alegra. Sakupljeno je po pet primjeraka pojedine biljne vrste. Biljke su osušene na prozračnom i suhom mjestu u hladu i čuvane u papirnatim vrećicama do analize.



1 cm na karti = 25 km u prirodi

Slika 7. Karta područja na kojem su sakupljene biljke.

(Izvor: Plan upravljanja za Park prirode Blidinje, Federalno ministarstvo okoliša i turizma).

3. MATERIJALI I METODE

Tablica 2. Popis istraživanih biljnih vrsta, analizirani biljni organi, lokaliteti rasta i nadmorska visina.

Istraživana vrsta	Biljni organ	Lokaliteti Nadmorska visina (m)
Kopriva (<i>Urtica dioica</i> L.)	list	Sovići, 750 m Blidinje, 1185 m
Dugolisna metvica (<i>Mentha longifolia</i> L.)	list	Sovići, 750 m Blidinje, 1185 m
Gospina trava (<i>Hypericum perforatum</i> L.)	cvat	Sovići, 750 m Blidinje, 1185 m
Veliki čičak (<i>Arctium lappa</i> L.)		Sovići, 750 m
Sitnoglavičasti stričak (<i>Carduus pycnocephalus</i> L.)	korijen	Blidinje, 1185 m

3.2. PRIPREMA EKSTRAKTA

50 mg uzoraka osušenih listova, korijena i cvata istraživanih biljaka su samljeveni u tarioniku u prah, homogenizirani uz dodatak 2 mL destilirane vode ili 80%-tnog etanola (v/v), sonificirani u ultrazvučnoj kupelji na 80°C (35 kHz, 360 W / 30 min) te centrifugirani (15 000×g / 10 min) u rotoru 12154H visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18) pri temperaturi od 4°C. Tako dobiven supernatant upotrijebljen je za određivanje sadržaja fenola i flavonoida te antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakata.

3.3. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH FENOLA

Sadržaj ukupnih fenola u vodenim i etanolnim ekstraktima istraživanih vrsta određen je spektrofotometrijski, mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri valnoj duljini 765 nm (Zhishen i sur., 1999). Ova kolorometrijska metoda se temelji na reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfowolframove i fosfomolibden kiseline, a pri oksidaciji fenolnih spojeva ove kiseline reduciraju se u wolfram-oksidi i molibden-oksidi koji su plavo obojeni (Ough i Amerine, 1998).

Određeni alikvot etanolnog ili vodenog biljnog ekstrakta (20 µL) pomiješan je s 100 µL Folin-Ciocalteu reagensom i s 1580 µL dH₂O te su zatim na mućkalici dobro promiješani. U svaku je probu dodano po 300 µL 1.88M Na₂CO₃ te su probe još jednom promiješane. Probe su zatim inkubirane trideset minuta u vodenoj kupelji na 45 °C te im je zatim izmjerena apsorbanca na spomenutoj valnoj duljini.

3. MATERIJALI I METODE

Sadržaj ukupnih fenola u pojedinim uzorcima određen je očitavanjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije vodenih i etanolnih otopina galne kiseline poznatih koncentracija (0,1-1,0 mg/mL) te je izražen u miligramima ekvivalenta galne kiseline po gramu suhe mase uzorka (mg GAE/g sm).

3.4. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH FLAVONOIDA

Sadržaj ukupnih flavonoida u vodenim i etanolnim ekstraktima istraživanih vrsta određen je spektrofotometrijski, mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri valnoj duljini 510 nm (Zhishen i sur., 1999). Određivanje flavonoida temelji se na svojstvu flavonoida da s aluminijevim kloridom (AlCl_3) tvore kompleks. Intenzitet obojenja proporcionalan je količini prisutnih flavonoida.

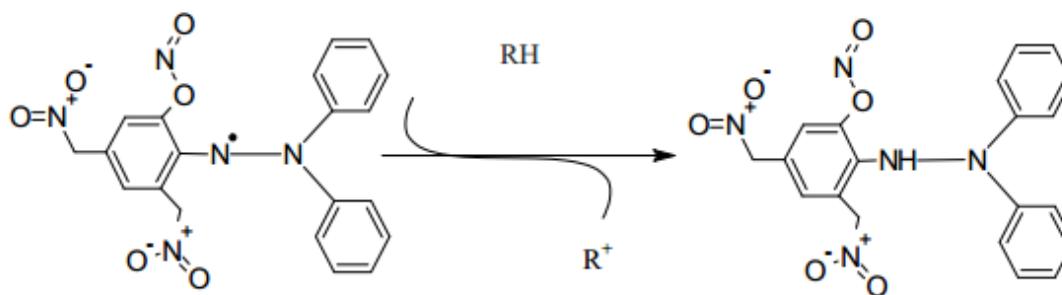
Određeni alikvot etanolnog ili vodenog biljnog ekstrakta (200 μL) pomiješan je s 60 μL 5% NaNO_2 i s 800 μL dH_2O te su zatim na mućkalici dobro promiješani. Nakon pet min inkubacije, u svaku je probu dodano po 60 μL 10% AlCl_3 te su probe još jednom promiješane. Probe su zatim inkubirane tijekom šest minuta, te je zatim u probe dodano po 400 μL 1M NaOH i 480 μL dH_2O do ukupnog volumena od 2 mL. Nakon zadnjeg miješanja, probama je izmjerena apsorbancija na spomenutoj valnoj duljini.

Sadržaj ukupnih flavonoida u pojedinim uzorcima određen je očitavanjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije etanolnih otopina kvercetina poznatih koncentracija (0,025- 0,6 mg/mL) te je izražen u miligramima ekvivalenta kvercetina po gramu suhe mase uzorka (mg QuE/g sm).

3.5. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI BILJNIH EKSTRAKATA

3.5.1. METODA DPPH

Metoda DPPH temelji se na redukciji slobodnih DPPH(2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala antioksidansom koji služi kao donor atoma vodika ili elektrona (**Slika 8**). Redukcija radikala dovodi do promjene boje otopine slobodnih radikala od izrazito ljubičaste do žute što se detektira spektrofotometrijski pri valnoj duljini 515 nm.



Slika 8. Mehanizam reakcije DPPH radikala s antioksidansom (Brand-Williams i sur.,1995)

Za mjerenje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom korištena je metoda prema Germano i sur. (2002) s malim izmjenama. Alikvot (50 μL) etanolnog ili vodenog biljnog ekstrakta pomiješan je sa 950 μL svježe pripremljene 0,1 mM otopine DPPH u etanolu. Nakon miješanja i inkubacije od 30 min, mjerena je apsorbancija proba na 517 nm u odnosu na referentno mjerenje (950 μL 96 %-tnog etanola i 50 μL destilirane vode ili 80%-tnog etanola), a kao kontrola (proba bez ekstrakta s najvećim intenzitetom ljubičaste boje) korišteno je 950 μL 0,1 mM otopine DPPH i 50 μL destilirane vode ili 80%-tnog etanola.

Postotak inhibicije DPPH radikala izračunat je prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100$$

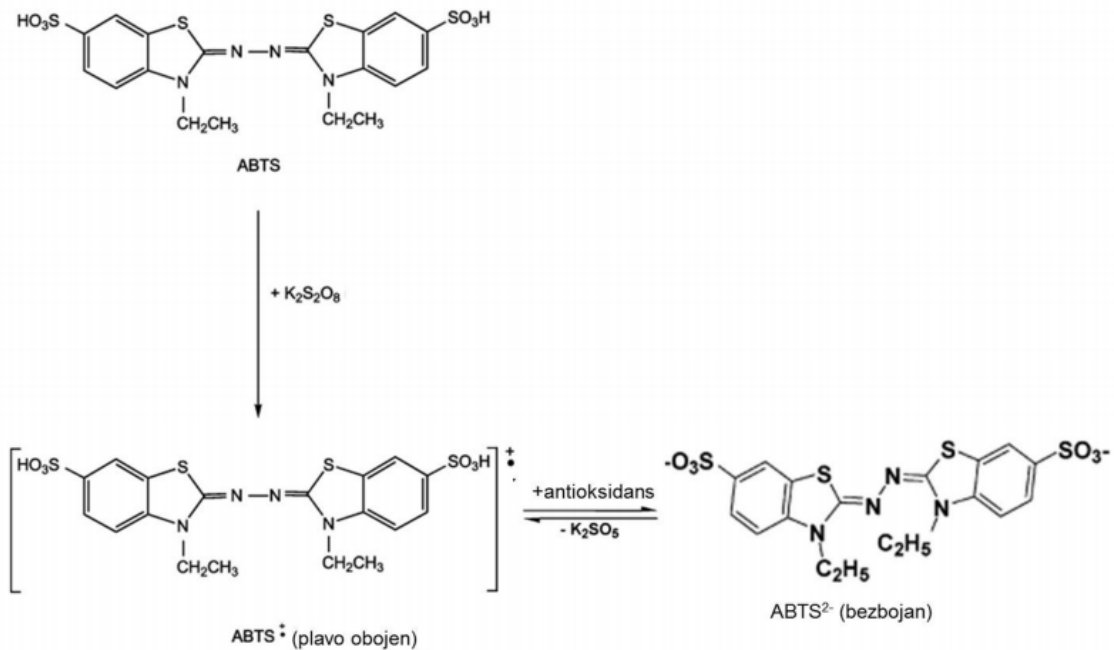
A_0 apsorbancija kontrole (bez ekstrakta)

A_t apsorbancija uzorka (sa ekstraktom)

Za konstruiranje baždarnog pravca korištene su vodene i etanolne otopine galne kiseline (0,05-0,3 mM).

3.5.3.METODA ABTS

Mehanizam ABTS metode sličan je mehanizmu DPPH metode ali se ovdje kao radikal koristi plavo-zelena obojeni radikal-kation 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske) kiseline (ABTS radikal) koji se formira oksidacijom otopine ABTS-a (Re i sur., 1999) (**Slika 9**).

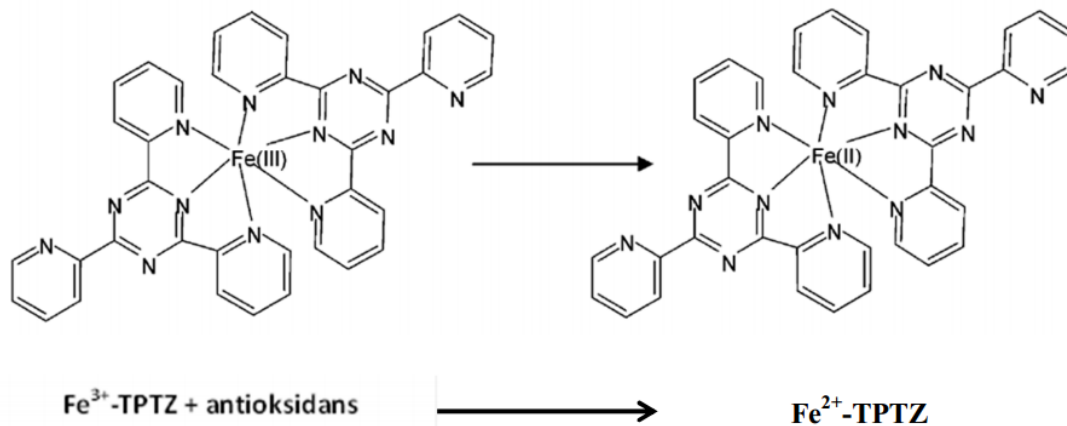


Slika 9. Mehanizam oksidacije ABTS radikala i reakcija s antioksidansom (Re i sur., 1999).

Dodatak antioksidansa izaziva gubitak boje, a ta se promjena detektira spektrofotometrijski pri valnoj duljini 734 nm. Volumen od 10 μ L biljnog ekstrakta pomiješan je s 2 mL otopine ABTS radikala te je nakon 6 min inkubacije mjerena apsorbancija proba pri valnoj duljini 734 nm. Otopina ABTS radikala priprema se tako da se 7 mM otopina ABTS-a oksidira s 140 mM otopinom kalijeveg peroksidisulfata. Na dan analize otopina se razrjeđuje s etanolom tako da apsorbancija te otopine iznosi oko 0,700. Za slijepu probu korišteno je 2 mL 96%-tnog etanola i 10 μ L destilirane vode ili 80%-tnog etanola, a kao kontrola (proba bez ekstrakta) korišteno je 950 μ L otopine ABTS+ radikala i 50 μ L destilirane vode ili 80%-tnog etanola. Za konstruiranje baždarnog pravca također su korištene vodene i etanolne otopine galne kiseline (0,2-1,4 mM). Postotak inhibicije ABTS radikala izračunat je na isti način kao i postotak inhibicije DPPH radikala.

3.5.3.METODA FRAP

Mehanizam FRAP (*Ferric Reducing/Antioxidant Power*) metode temelji se na prijenosu elektrona, a kompleks željeza s 2,4,6-tripiridil-s-triazinom – Fe(III)(TPTZ)₂Cl₃ – koristi se kao oksidans (Benzie i Strain, 1999) (**Slika 10**).



Slika 10. Mehanizam djelovanja FRAP reakcije (Benze i Strain, 1999).

Redukcijom žuto obojenog kompleksa Fe(III)-TPTZ u Fe(II) u prisutnosti antioksidansa i pri niskom pH reakcijska smjesa mijenja boju u plavo čiji je maksimum apsorbancije na valnoj duljini 593 nm. Kod mjerenja aktivnosti FRAP metodom 50 μL uzorka pomiješano je sa 950 μL prethodno pripremljenog i zagrijanog FRAP reagensa te je mjerena apsorbancija proba na 593 nm nakon 4 min (slijepa proba: 950 μL FRAP reagensa bez TPTZ i 50 μL destilirane vode ili 80%-tnog etanola), a kao kontrola (proba bez ekstrakta) korištena je smjesa 950 μL FRAP reagensa i 50 μL destilirane vode ili 80%-tnog etanola. FRAP reagens se priprema miješanjem acetatnog pufera (300 mM, pH 3,6), otopine TPTZ (10 mM u 40 mM kloridnoj kiselini) te željezo (II) klorida (20 mM) u omjeru 10:1:1. Za pripremu baždarnog pravca korišten je željezo-sulfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (0-1000 μM). Postotak redukcije TPTZ izračunat je na sličan način kao i za prethodne dvije metode.

3.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Svaki brojčani podatak prikazan grafikonom aritmetička je sredina određenog broja replika (po 5 za svaku biljnu vrstu). Usporedba kontrole i tretmana (pojedinačno i međusobno) provedena je testom "Duncan's New Multiple Range Test" (DNMRT) za svaki pojedini dan (Duncan, 1955). Statistički značajnim smatrani su rezultati koji su se razlikovali na razini $p < 0,05$. Pri statističkoj obradi podataka korišten je računalni program STATISTICA 12.0 (Stat Soft Inc., SAD). Također, izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije za izmjerene parametre u istraživanim biljnim vrstama.

4. REZULTATI

U vodenom i etanolnom ekstraktu koprive (*Urtica dioica* L.), dugolisne metvice (*Mentha longifolia* L.) i gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) prikupljenih na području Blidinja na dvije nadmorske visine (750 m i 1185 m), te velikog čička (*Arctium lappa* L.) prikupljenog na 750 m nadmorske visine i sitnoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.) prikupljenog na 1185 m nadmorske visine određen je sadržaj ukupnih fenola i flavonoida, te su izmjerene antioksidacijske aktivnosti korištenjem tri metode: DPPH, FRAP i ABTS.

4.1. SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA

Sadržaj ukupnih fenola određen u vodenom i etanolnom ekstraktu istraživanih biljnih svojti prikazan je na **Slici 11**. Rezultati su izraženi u miligramima ekvivalenta galne kiseline po gramu suhe mase uzorka (mg GAE/g sm).

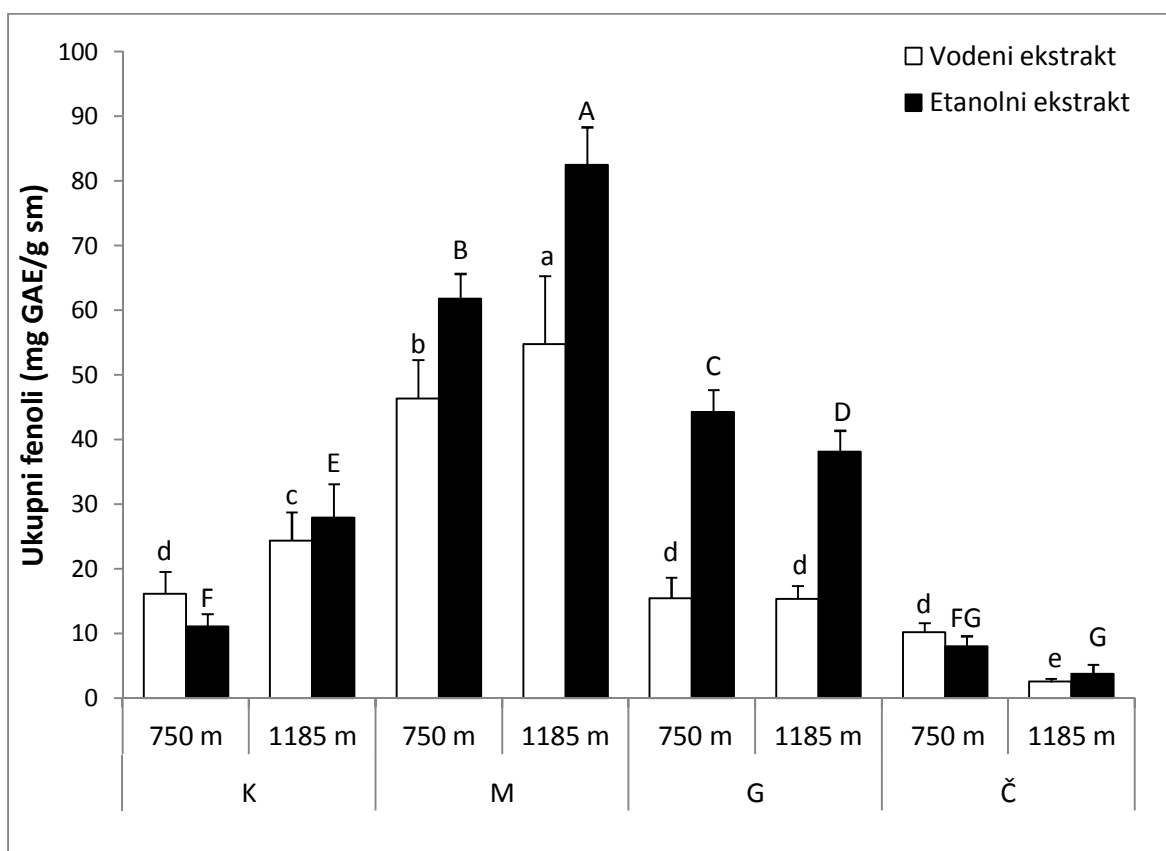
Najviši sadržaj ukupnih fenola izmjeren je u etanolnom ekstraktu dugolisne metvice (*Mentha longifolia* L.) prikupljene na 1185 m nadmorske visine (82,5 mg GAE/g sm). Najniži sadržaj ukupnih fenola izmjeren je u vodenom ekstraktu sitnoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.) prikupljenog na 1185 m nadmorske visine (2,5 mg GAE/g sm).

Kod većine biljnih svojti prikupljenih na istoj nadmorskoj visini, sadržaj ukupnih fenola bio je viši u etanolnom nego u vodenom ekstraktu. Izuzetak su kopriva (*Urtica dioica* L.) i veliki čičak (*Arctium lappa* L.) prikupljeni na 750 m nadmorske visine - u vodenom ekstraktu koprive sadržaj ukupnih fenola iznosi 16, a u etanolnom 11 mg GAE/g sm dok u vodenom ekstraktu velikog čička sadržaj ukupnih fenola iznosi 10, a u etanolnom 8 mg GAE/g sm.

U etanolnom ekstraktu koprive (*Urtica dioica* L.) i dugolisne metvice (*Mentha longifolia* L.) prikupljenih na 1185 m nadmorske visine sadržaj ukupnih fenola je bio viši (kopriva 28, a dugolisna metvica 82 mg GAE/g sm) nego u etanolnom ekstraktu istih biljnih svojti prikupljenih na 750 m nadmorske visine (kopriva 11, a dugolisna metvica 62 mg GAE/g sm). U etanolnom ekstraktu gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) prikupljene na 750 m nadmorske visine sadržaj ukupnih fenola bio je viši (44 mg GAE/g sm) nego u etanolnom ekstraktu iste biljne svojte prikupljene na 1185 m nadmorske visine (38 mg GAE/g sm). Sličan trend je zabilježen kod vrsta iz porodice *Asteraceae*. Sadržaj ukupnih fenola je viši u etanolnom ekstraktu velikog čička (*Arctium lappa* L.) prikupljenom na 750 m nadmorske visine (8 mg GAE/g sm) nego u etanolnom ekstraktu sitnoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.) prikupljenom na 1185 m nadmorske visine (4 mg GAE/g sm).

4. REZULTATI

U vodenom ekstraktu koprive (*Urtica dioica* L.) i dugolisne metvice (*Mentha longifolia* L.) prikupljenih na 1185 m nadmorske visine sadržaj ukupnih fenola bio je viši nego u vodenom ekstraktu istih biljnih svojti prikupljenih na 750 m nadmorske visine dok kod gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) nadmorska visina nije utjecala na sadržaj tih metabolita u vodenom ekstraktu te biljke. Sadržaj ukupnih fenola bio je viši u vodenom ekstraktu velikog čička (*Arctium lappa* L.) prikupljenom na 750 m nadmorske visine (10 mg GAE/g sm) nego u vodenom ekstraktu sitnoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.) prikupljenom na 1185 m nadmorske visine (2,5 mg GAE/g sm).



Slika 11. Sadržaj fenola (mg GAE /g sm) u vodenom i etanolnom ekstraktu koprive, dugolisne metvice, gospine trave prikupljenih na dvije nadmorske visine (750 i 1185 m) te velikog čička (750 m) i sitnoglavičastog strička (1185 m). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$). Oznake: K – kopriva, M – dugolisna metvica, G – gospina trava, Č – čičak i sitnoglavičasti stričak.

4. REZULTATI

4.2. SADRŽAJ UKUPNIH FLAVONOIDA

Sadržaj ukupnih flavonoida određen u vodenom i etanolnom ekstraktu istraživanih biljnih svojti prikazan je na **Slici 12**. Rezultati su izraženi u miligramima ekvivalenta kvercetina po gramu suhe mase uzorka (mg QuE/g sm).

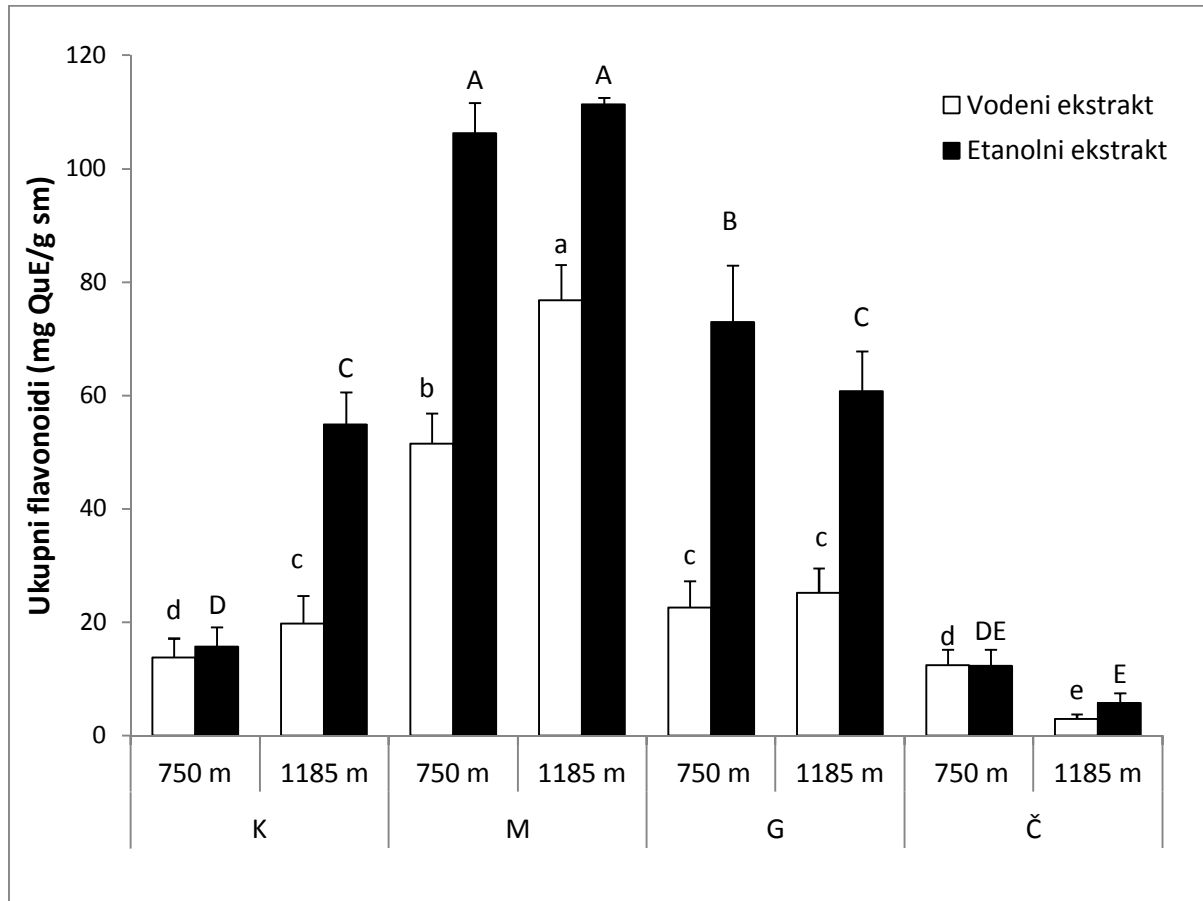
Najveći sadržaj ukupnih flavonoida određen je u etanolnom ekstraktu dugolisne metvice (*Mentha longifolia* L.) prikupljene na 1185 m nadmorske visine (111 mg QuE/g sm). Najmanji sadržaj ukupnih flavonoida određen je u vodenom ekstraktu sitnoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.) prikupljenog na 1185 m nadmorske visine (3 mg QuE/g sm).

Kod većine biljnih svojti prikupljenih na istoj nadmorskoj visini, sadržaj ukupnih flavonoida bio je viši u etanolnom u usporedbi s vodenim ekstraktom. Izuzetak su veliki čičak (*Arctium lappa* L.) i sitnoglavičasti stričak (*Carduus pycnocephalus* L.) te kopriva (*Urtica dioica* L.) prikupljena na 750 m nadmorske visine kod kojih je sadržaj ukupnih flavonoida bio sličan u vodenom i etanolnom ekstraktu.

U etanolnom ekstraktu koprive (*Urtica dioica* L.) prikupljene na 1185 m nadmorske visine sadržaj ukupnih flavonoida bio je veći (55 mg QuE/g sm) nego u etanolnom ekstraktu te biljne svojte prikupljene na 750 m nadmorske visine (16 mg QuE/g sm). Sadržaj tih sekundarnih metabolita u etanolnim ekstraktima dugolisne metvice (*Mentha longifolia* L.) nije se bitno razlikovao obzirom na nadmorsku visinu. Za razliku od koprive, sadržaj ukupnih flavonoida u etanolnom ekstraktu gospine trave prikupljene na 750 m nadmorske visine bio je veći (73 mg QuE/g sm) nego u etanolnom ekstraktu gospine trave prikupljene na 1185 m nadmorske visine (61 mg QuE/g sm).

U vodenom ekstraktu koprive (*Urtica dioica* L.) i dugolisne metvice (*Mentha longifolia* L.) prikupljenih na 1185 m nadmorske visine sadržaj ukupnih flavonoida bio je viši nego u vodenom ekstraktu istih biljnih svojti prikupljenih na 750 m nadmorske visine dok je u vodenom ekstraktu velikog čička (*Arctium lappa* L.) prikupljenog na 750 m nadmorske visine sadržaj ukupnih flavonoida (12 mg QuE/g sm) bio viši nego u vodenom ekstraktu sitnoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.) prikupljenog na 1185 m nadmorske visine (3 mg QuE/g sm). Sadržaj ukupnih flavonoida u vodenim ekstraktima gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) nije se bitno razlikovao obzirom na nadmorsku visinu.

4. REZULTATI



Slika 12. Sadržaj flavonoida (mg QuE/g sm) u vodenom i etanolnom ekstraktu koprive, mente, gospine trave prikupljenih na dvije nadmorske visine (750 i 1185 m) te velikog čička (750 m) i sitnoglavičastog strička (1185 m). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$). Oznake: K – kopriva, M – dugolisna metvica, G – gospina trava, Č – čičak i sitnoglavičasti stričak.

4. REZULTATI

4.3. METODA DPPH

Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti vodenih i etanolnih ekstrakata DPPH metodom kojom se određuje sposobnost gašenja slobodnih DPPH radikala prikazani su na **Slici 13**.

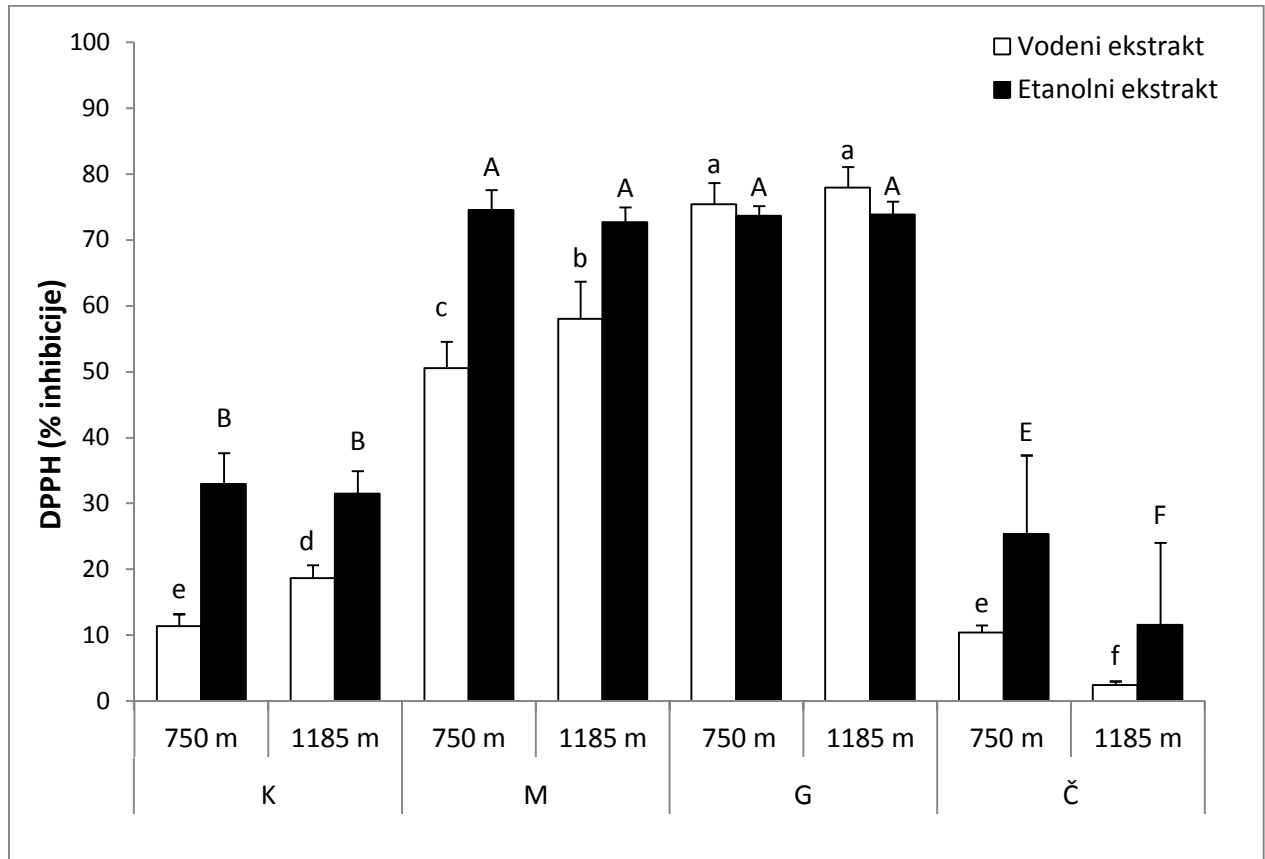
Najveći postotak inhibicije DPPH radikala (78%) izmjeren je u vodenom ekstraktu gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) prikupljene na 1185 m nadmorske visine. Najniži postotak inhibicije DPPH radikala (2,5 %) izmjeren je u vodenom ekstraktu sitnoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.) prikupljenom na 1185 m nadmorske visine.

Kod svih biljnih svojti prikupljenih na istoj nadmorskoj visini, postotak inhibicije DPPH radikala bio je viši u etanolnom ekstraktu nego u vodenom ekstraktu. Izuzetak su ekstrakti gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) kod kojih je, neovisno o upotrijebljenom otapalu, zabilježen podjednak postotak inhibicije DPPH radikala.

Nadmorska visina nije utjecala na postotak inhibicije DPPH radikala u etanolnim ekstraktima sakupljenih biljnih svojti budući se ti postotci nisu međusobno bitno razlikovali. Izuzetak je etanolni ekstrakt velikog čička (*Arctium lappa* L.) kod kojeg je zabilježen viši postotak inhibicije u usporedbi s etanolnim ekstraktom sitnoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.)

U vodenom ekstraktu koprive (*Urtica dioica* L.) i dugolisne metvice (*Mentha longifolia* L.) prikupljenih na 1185 m nadmorske visine postotak inhibicije DPPH radikala bio je viši nego u vodenom ekstraktu istih biljnih svojti prikupljenih na 750 m nadmorske visine dok je u vodenom ekstraktu velikog čička (*Arctium lappa* L.) postotak inhibicije bio viši nego u vodenom ekstraktu sitnoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.). Postotak inhibicije DPPH radikala u vodenim ekstraktima gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) nije se bitno razlikovao obzirom na nadmorsku visinu.

4. REZULTATI



Slika 13. Postotak inhibicije DPPH[•] radikala u vodenom i etanolnom ekstraktu koprive, dugolisne metvice, gospine trave prikupljenih na dvije nadmorske visine (750 i 1185 m) te velikog čička (750 m) i sitnoglavičastog strička (1185 m). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$). Oznake: K – kopriva, M – dugolisna metvica, G – gospina trava, Č – čičak.

4. REZULTATI

4.5. METODA ABTS

Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti vodenih i etanolnih ekstrakata ABTS metodom kojom se određuje sposobnost gašenja slobodnih ABTS radikala prikazani su na **Slici 14**. Rezultati su izraženi kao postotak inhibicije.

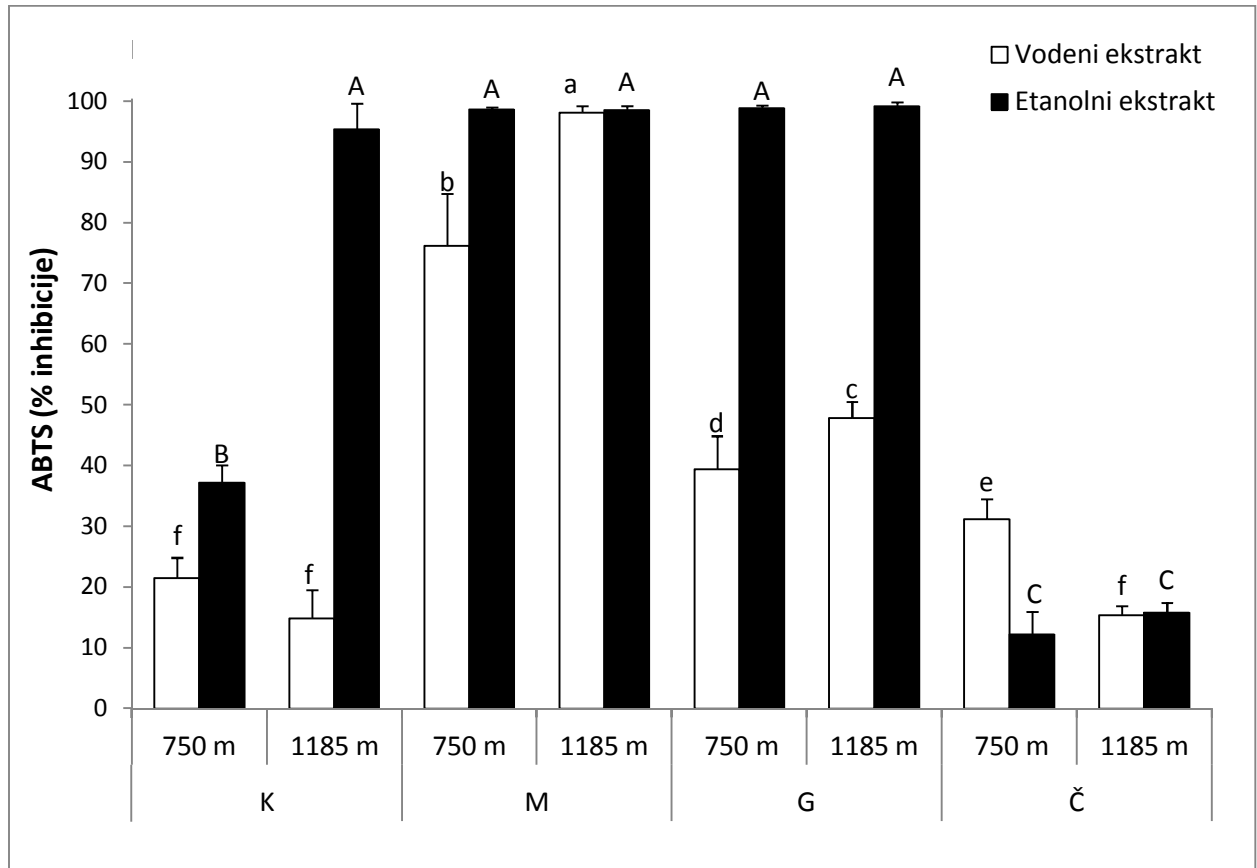
Najviši postotak inhibicije ABTS radikala (99% inhibicije) izmjeren je u etanolnom ekstraktima dugolisne metvice (*Mentha longifolia* L.) i gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) prikupljenih na 1185 m nadmorske visine. Najniži postotak inhibicije (12% inhibicije) izmjeren je u etanolnom ekstraktu velikog čička (*Arctium lappa* L.) prikupljenom na 750 m nadmorske visine.

Kod većine biljnih svojti prikupljenih na istoj nadmorskoj visini, postotak inhibicije bio je viši u etanolnom nego u vodenom ekstraktu, osim kod velikog čička (*Arctium lappa* L.) gdje je zabilježena obrnuta situacija. Također, postotci inhibicije bili su slični u vodenom i etanolnom ekstraktu dugolisne metvice (*Mentha longifolia* L.) i sitnoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.) prikupljenih na 1185 m nadmorske visine.

U etanolnim ekstraktima većine sakupljenih biljnih svojti nije bio vidljiv utjecaj nadmorske visine na postotak inhibicije ABTS radikala budući su ti postotci međusobno bili podjednaki. Izuzetak je kopriva (*Urtica dioica* L.) kod koje je postotak inhibicije bio viši (95% inhibicije) u etanolnom ekstraktu izrađenom od biljke prikupljene na 1185 m nadmorske visine nego u istom ekstraktu izrađenom od biljke prikupljene na 750 m nadmorske visine (37% inhibicije).

U vodenom ekstraktu dugolisne metvice (*Mentha longifolia* L.) i gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) prikupljenih na 1185 m nadmorske visine postotak inhibicije bio je viši (dugolisna metvica 98%, gospina trava 48% inhibicije) nego u vodenim ekstraktima istih biljnih svojti prikupljenih na 750 m nadmorske visine (dugolisna metvica 76%, gospina trava 40% inhibicije). Postotak inhibicije ABTS radikala u vodenim ekstraktima koprive (*Urtica dioica* L.) nije se bitno razlikovao obzirom na nadmorsku visinu. U vodenom ekstraktu velikog čička (*Arctium lappa* L.) prikupljenog na 750 m nadmorske visine postotak inhibicije bio je viši (31% inhibicije) nego u vodenom ekstraktu sitnoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.) prikupljenog na 1185 m nadmorske visine (15% inhibicije).

4. REZULTATI



Slika 14. Postotak inhibicije ABTS radikala u vodenom i etanolnom ekstraktu koprive, dugolisne metvice, gospine trave prikupljenih na dvije nadmorske visine (750 i 1185 m) te velikog čička (750 m) i sitnoglavičastog strička (1185 m). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$). Oznake: K – kopriva, M – dugolisna metvica, G – gospina trava, Č – čičak.

4. REZULTATI

4.4. METODA FRAP

Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti vodenih i etanolnih ekstrakata FRAP metodom kojom se određuje sposobnost redukcije kompleksa Fe(III)-TPTZ u Fe(II) prikazani su na **Slici 15**. Rezultati su izraženi kao postotak redukcije.

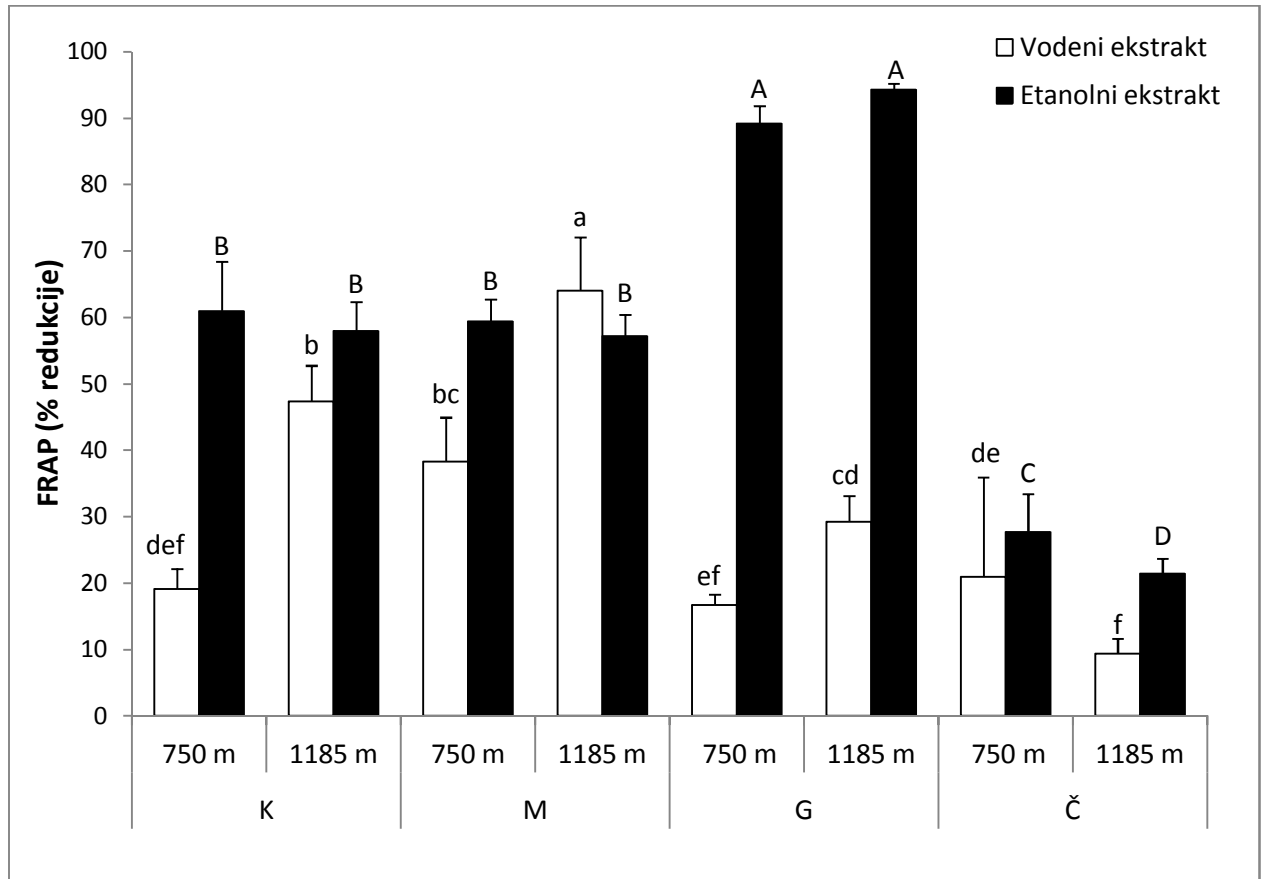
Najviši postotak redukcije spomenutog kompleksa (94% redukcije) izmjeren je u etanolnom ekstraktu gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) prikupljene na 1185 m nadmorske visine. Najniži postotak redukcije (9% redukcije) određen je u vodenom ekstraktu sintoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.) prikupljenog na 1185 m nadmorske visine.

Kod svih biljnih svojti prikupljenih na istoj nadmorskoj visini, postotak redukcije bio je viši u etanolnom nego u vodenom ekstraktu. Izuzetak je dugolisna metvica (*Mentha longifolia* L.) prikupljena na 1185 m nadmorske visine kod koje postotak redukcije u vodenom ekstraktu iznosi 64%, a u etanolnom 57%.

Nadmorska visina nije utjecala na postotak redukcije kompleksa Fe(III)-TPTZ u Fe(II) u etanolnim ekstraktima sakupljenih biljnih svojti budući se ti postotci nisu međusobno bitno razlikovali. Izuzetak je etanolni ekstrakt velikog čička (*Arctium lappa* L.) kod kojeg je zabilježen viši postotak redukcije u usporedbi s etanolnim ekstraktom sitnoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.)

U vodenom ekstraktu većine biljnih svojti prikupljenih na 1185 m nadmorske visine postotak redukcije bio je viši nego u vodenom ekstraktu istih biljnih svojti prikupljenih na 750 m nadmorske visine. Izuzetak su 2 vrste iz porodice *Asteraceae*, veliki čičak (*Arctium lappa* L.) i sitnoglavičasti stričak (*Carduus pycnocephalus* L.) gdje je rezultat obrnut. Postotak redukcije je viši u vodenom ekstraktu velikog čička (*Arctium lappa* L.) prikupljenog na 750 m nadmorske visine (21% redukcije) nego u vodenom ekstraktu sitnoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.) prikupljenom na 1185 m nadmorske visine (9% redukcije).

4. REZULTATI



Slika 15. Postotak redukcije kompleksa Fe(III)-TPTZ u Fe(II) u vodenom i etanolnom ekstraktu koprive, dugolisne metvice, gospine trave prikupljenih na dvije nadmorske visine (750 i 1185 m) te velikog čička (750 m) i sitnoglavičastog strička (1185 m). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$). Oznake: K – kopriva, M – dugolisna metvica, G – gospina trava, Č – čičak.

4. REZULTATI

4.6. KORELACIJE

U svrhu određivanja korelacija između antioksidacijske aktivnosti mjerene različitim metodama i sadržaja polifenolnih metabolita izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije.

Tablica 3. Matriks Pearsonovog koeficijenta za antioksidacijske metode i sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u vodenom ekstraktu istraženih biljnih vrsta. Podebljane vrijednosti pokazuju značajnu korelaciju na razini značajnosti $p \leq 0,05$.

	FI	DPPH	FRAP	ABTS
F	0,941	0,374	0,787	0,860
FI		0,515	0,797	0,956
DPPH			0,295	0,600
FRAP				0,681

Pearsonov koeficijent korelacije za ispitane uzorke u vodenim ekstraktima prikazan je u **Tablici 3**. Prema razini značajnosti većina metoda pokazuju značajnu korelaciju između vrijednosti antioksidacijskih aktivnosti te sadržaja ukupnih fenola i sadržaja ukupnih flavonoida. Vidljivo je da nije značajan koeficijent korelacije između FRAP i DPPH metode. Najviši Pearsonov koeficijent (0,956) izračunat je za ABTS i sadržaj ukupnih flavonoida, a vrijednost iznad 0,900 pokazuje sadržaj ukupnih fenola i sadržaj ukupnih flavonoida (0,941).

Tablica 4. Matriks Pearsonovog koeficijenta za antioksidacijske metode te sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u etanolnom ekstraktu istraženih biljnih vrsta. Podebljane vrijednosti pokazuju značajnu korelaciju na razini značajnosti $p \leq 0,05$.

	FI	DPPH	FRAP	ABTS
F	0,968	0,816	0,407	0,806
FI		0,851	0,452	0,862
DPPH			0,780	0,887
FRAP				0,782

Pearsonov koeficijent korelacije za ispitane uzorke u etanolnim ekstraktima prikazan je u **Tablici 4**. Prema razini značajnosti sve metode pokazuju značajnu korelaciju između vrijednosti antioksidacijskih aktivnosti te sadržaja ukupnih fenola i sadržaja ukupnih flavonoida. Najviši Pearsonov koeficijent izračunat je za sadržaj ukupnih fenola i sadržaj ukupnih flavonoida (0,968).

4. REZULTATI

U vodenom i etanolnom ekstraktu koprive (*Urtica dioica* L.), dugolisne metvice (*Mentha longifolia* L.) i gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) prikupljenih na području Blidinja na dvije nadmorske visine (750 m i 1185 m), te velikog čička (*Arctium lappa* L.) prikupljenog na 750 m nadmorske visine i sitnoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.) prikupljenog na 1185 m nadmorske visine određen je sadržaj ukupnih fenola i flavonoida, te su izmjerene antioksidacijske aktivnosti korištenjem tri metode: DPPH, FRAP i ABTS.

4.1. SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA

Sadržaj ukupnih fenola određen u vodenom i etanolnom ekstraktu istraživanih biljnih svojti prikazan je na **Slici 11**. Rezultati su izraženi u miligramima ekvivalenta galne kiseline po gramu suhe mase uzorka (mg GAE/g sm).

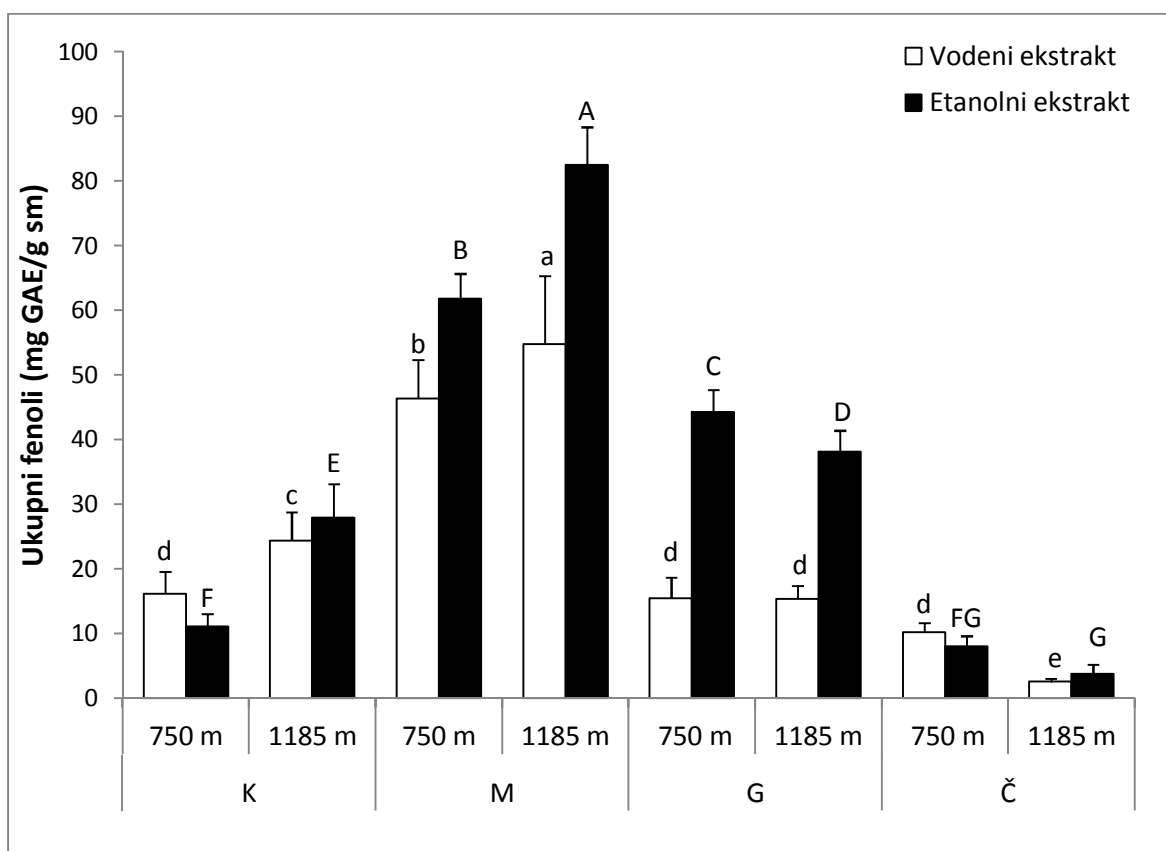
Najviši sadržaj ukupnih fenola izmjeren je u etanolnom ekstraktu dugolisne metvice (*Mentha longifolia* L.) prikupljene na 1185 m nadmorske visine (82,5 mg GAE/g sm). Najniži sadržaj ukupnih fenola izmjeren je u vodenom ekstraktu sitnoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.) prikupljenog na 1185 m nadmorske visine (2,5 mg GAE/g sm).

Kod većine biljnih svojti prikupljenih na istoj nadmorskoj visini, sadržaj ukupnih fenola bio je viši u etanolnom nego u vodenom ekstraktu. Izuzetak su kopriva (*Urtica dioica* L.) i veliki čičak (*Arctium lappa* L.) prikupljeni na 750 m nadmorske visine - u vodenom ekstraktu koprive sadržaj ukupnih fenola iznosi 16, a u etanolnom 11 mg GAE/g sm dok u vodenom ekstraktu velikog čička sadržaj ukupnih fenola iznosi 10, a u etanolnom 8 mg GAE/g sm.

U etanolnom ekstraktu koprive (*Urtica dioica* L.) i dugolisne metvice (*Mentha longifolia* L.) prikupljenih na 1185 m nadmorske visine sadržaj ukupnih fenola je bio viši (kopriva 28, a dugolisna metvica 82 mg GAE/g sm) nego u etanolnom ekstraktu istih biljnih svojti prikupljenih na 750 m nadmorske visine (kopriva 11, a dugolisna metvica 62 mg GAE/g sm). U etanolnom ekstraktu gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) prikupljene na 750 m nadmorske visine sadržaj ukupnih fenola bio je viši (44 mg GAE/g sm) nego u etanolnom ekstraktu iste biljne svojte prikupljene na 1185 m nadmorske visine (38 mg GAE/g sm). Sličan trend je zabilježen kod vrsta iz porodice *Asteraceae*. Sadržaj ukupnih fenola je viši u etanolnom ekstraktu velikog čička (*Arctium lappa* L.) prikupljenom na 750 m nadmorske visine (8 mg GAE/g sm) nego u etanolnom ekstraktu sitnoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.) prikupljenom na 1185 m nadmorske visine (4 mg GAE/g sm).

4. REZULTATI

U vodenom ekstraktu koprive (*Urtica dioica* L.) i dugolisne metvice (*Mentha longifolia* L.) prikupljenih na 1185 m nadmorske visine sadržaj ukupnih fenola bio je viši nego u vodenom ekstraktu istih biljnih svojti prikupljenih na 750 m nadmorske visine dok kod gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) nadmorska visina nije utjecala na sadržaj tih metabolita u vodenom ekstraktu te biljke. Sadržaj ukupnih fenola bio je viši u vodenom ekstraktu velikog čička (*Arctium lappa* L.) prikupljenom na 750 m nadmorske visine (10 mg GAE/g sm) nego u vodenom ekstraktu sitnoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.) prikupljenom na 1185 m nadmorske visine (2,5 mg GAE/g sm).



Slika 11. Sadržaj fenola (mg GAE /g sm) u vodenom i etanolnom ekstraktu koprive, dugolisne metvice, gospine trave prikupljenih na dvije nadmorske visine (750 i 1185 m) te velikog čička (750 m) i sitnoglavičastog strička (1185 m). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$). Oznake: K – kopriva, M – dugolisna metvica, G – gospina trava, Č – čičak i sitnoglavičasti stričak.

4. REZULTATI

4.2. SADRŽAJ UKUPNIH FLAVONOIDA

Sadržaj ukupnih flavonoida određen u vodenom i etanolnom ekstraktu istraživanih biljnih svojti prikazan je na **Slici 12**. Rezultati su izraženi u miligramima ekvivalenta kvercetina po gramu suhe mase uzorka (mg QuE/g sm).

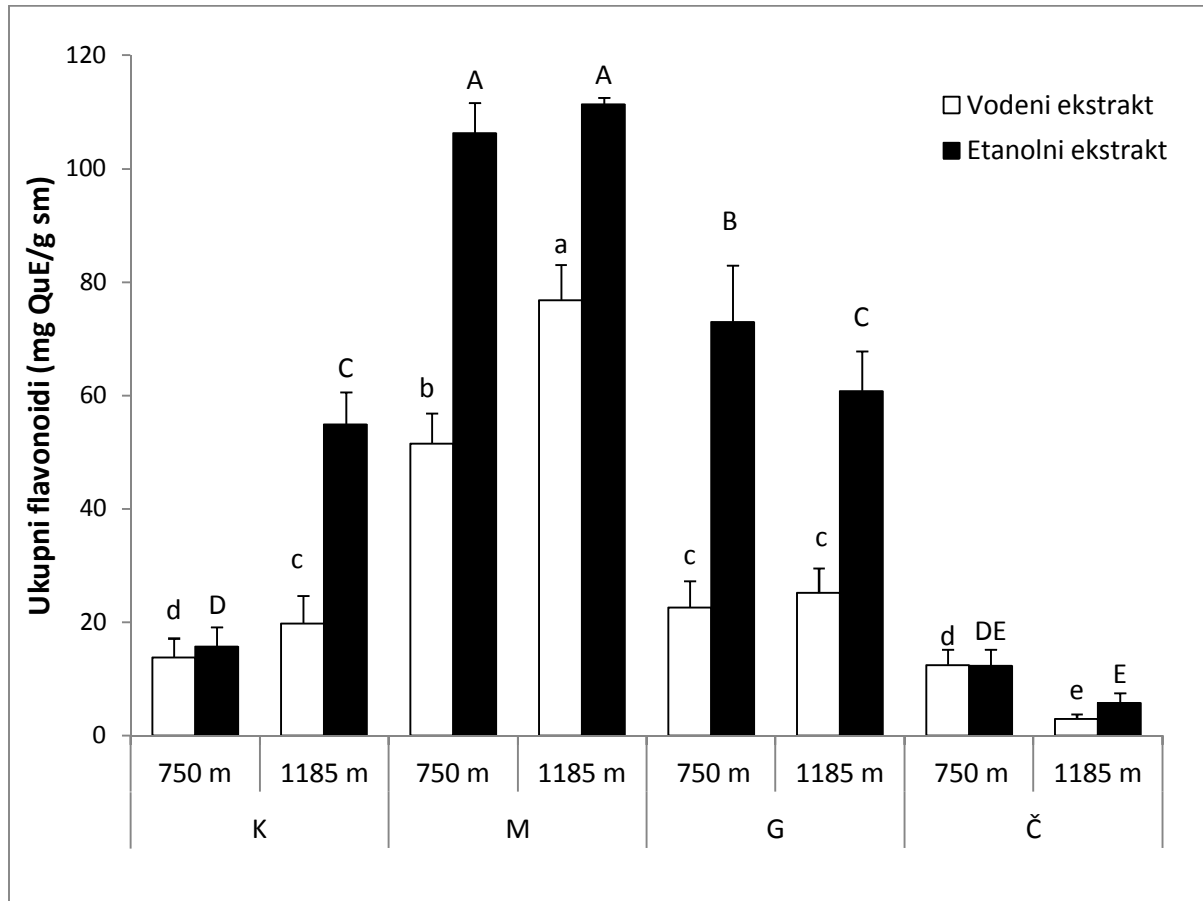
Najveći sadržaj ukupnih flavonoida određen je u etanolnom ekstraktu dugolisne metvice (*Mentha longifolia* L.) prikupljene na 1185 m nadmorske visine (111 mg QuE/g sm). Najmanji sadržaj ukupnih flavonoida određen je u vodenom ekstraktu sitnoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.) prikupljenog na 1185 m nadmorske visine (3 mg QuE/g sm).

Kod većine biljnih svojti prikupljenih na istoj nadmorskoj visini, sadržaj ukupnih flavonoida bio je viši u etanolnom u usporedbi s vodenim ekstraktom. Izuzetak su veliki čičak (*Arctium lappa* L.) i sitnoglavičasti stričak (*Carduus pycnocephalus* L.) te kopriva (*Urtica dioica* L.) prikupljena na 750 m nadmorske visine kod kojih je sadržaj ukupnih flavonoida bio sličan u vodenom i etanolnom ekstraktu.

U etanolnom ekstraktu koprive (*Urtica dioica* L.) prikupljene na 1185 m nadmorske visine sadržaj ukupnih flavonoida bio je veći (55 mg QuE/g sm) nego u etanolnom ekstraktu te biljne svojte prikupljene na 750 m nadmorske visine (16 mg QuE/g sm). Sadržaj tih sekundarnih metabolita u etanolnim ekstraktima dugolisne metvice (*Mentha longifolia* L.) nije se bitno razlikovao obzirom na nadmorsku visinu. Za razliku od koprive, sadržaj ukupnih flavonoida u etanolnom ekstraktu gospine trave prikupljene na 750 m nadmorske visine bio je veći (73 mg QuE/g sm) nego u etanolnom ekstraktu gospine trave prikupljene na 1185 m nadmorske visine (61 mg QuE/g sm).

U vodenom ekstraktu koprive (*Urtica dioica* L.) i dugolisne metvice (*Mentha longifolia* L.) prikupljenih na 1185 m nadmorske visine sadržaj ukupnih flavonoida bio je viši nego u vodenom ekstraktu istih biljnih svojti prikupljenih na 750 m nadmorske visine dok je u vodenom ekstraktu velikog čička (*Arctium lappa* L.) prikupljenog na 750 m nadmorske visine sadržaj ukupnih flavonoida (12 mg QuE/g sm) bio viši nego u vodenom ekstraktu sitnoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.) prikupljenog na 1185 m nadmorske visine (3 mg QuE/g sm). Sadržaj ukupnih flavonoida u vodenim ekstraktima gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) nije se bitno razlikovao obzirom na nadmorsku visinu.

4. REZULTATI



Slika 12. Sadržaj flavonoida (mg QuE/g sm) u vodenom i etanolnom ekstraktu koprive, mente, gospine trave prikupljenih na dvije nadmorske visine (750 i 1185 m) te velikog čička (750 m) i sitnoglavičastog strička (1185 m). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$). Oznake: K – kopriva, M – dugolisna metvica, G – gospina trava, Č – čičak i sitnoglavičasti stričak.

4. REZULTATI

4.3. DPPH METODA

Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti vodenih i etanolnih ekstrakata DPPH metodom kojom se određuje sposobnost gašenja slobodnih DPPH[•] radikala prikazani su na **Slici 13**.

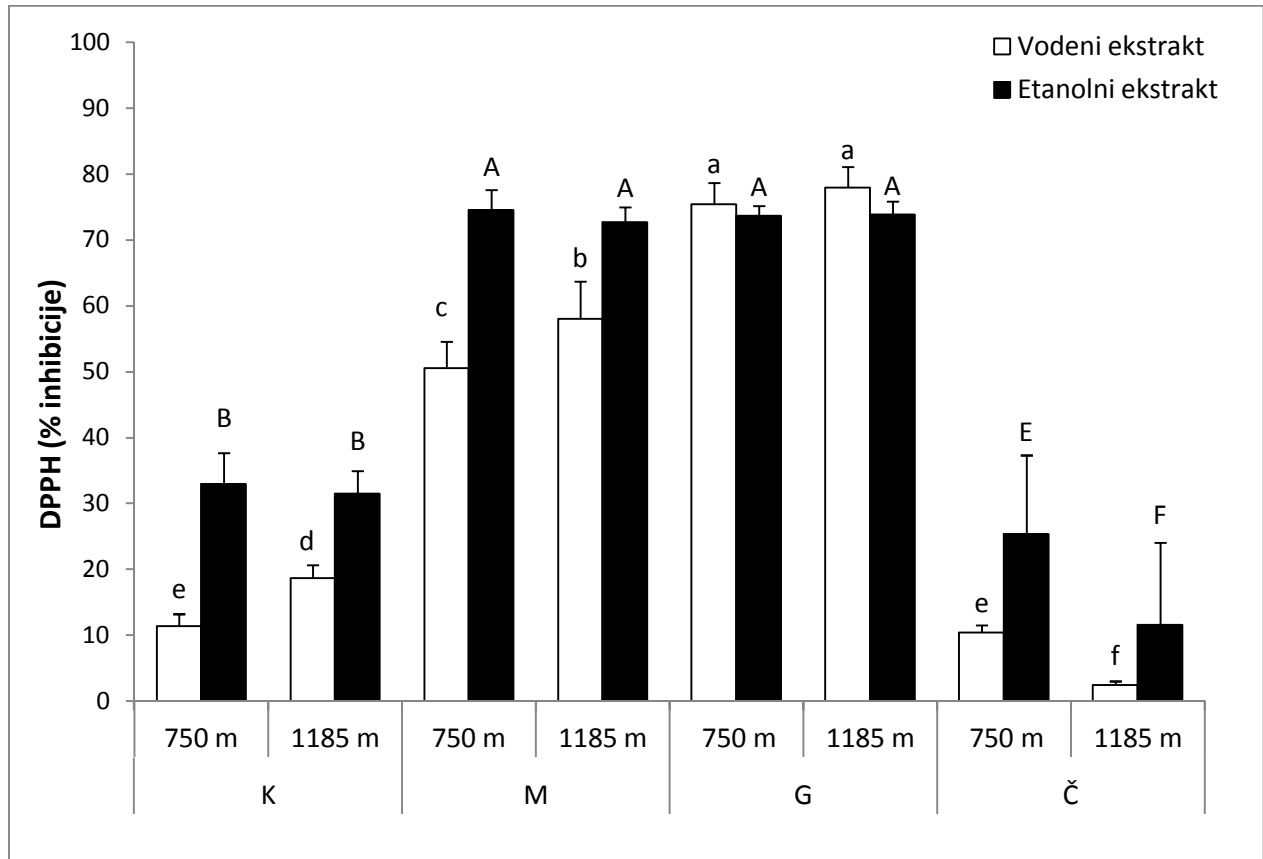
Najveći postotak inhibicije DPPH[•] radikala (78%) izmjeren je u vodenom ekstraktu gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) prikupljene na 1185 m nadmorske visine. Najniži postotak inhibicije DPPH[•] radikala (2,5 %) izmjeren je u vodenom ekstraktu sitnoglavičatog strička (*Carduus pycnocephalus* L.) prikupljenom na 1185 m nadmorske visine.

Kod svih biljnih svojti prikupljenih na istoj nadmorskoj visini, postotak inhibicije DPPH[•] radikala bio je viši u etanolnom ekstraktu nego u vodenom ekstraktu. Izuzetak su ekstrakti gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) kod kojih je, neovisno o upotrijebljenom otapalu, zabilježen podjednak postotak inhibicije DPPH[•] radikala.

Nadmorska visina nije utjecala na postotak inhibicije DPPH[•] radikala u etanolnim ekstraktima sakupljenih biljnih svojti budući se ti postotci nisu međusobno bitno razlikovali. Izuzetak je etanolni ekstrakt velikog čička (*Arctium lappa* L.) kod kojeg je zabilježen viši postotak inhibicije u usporedbi s etanolnim ekstraktom sitnoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.)

U vodenom ekstraktu koprive (*Urtica dioica* L.) i dugolisne metvice (*Mentha longifolia* L.) prikupljenih na 1185 m nadmorske visine postotak inhibicije DPPH[•] radikala bio je viši nego u vodenom ekstraktu istih biljnih svojti prikupljenih na 750 m nadmorske visine dok je u vodenom ekstraktu velikog čička (*Arctium lappa* L.) postotak inhibicije bio viši nego u vodenom ekstraktu sitnoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.). Postotak inhibicije DPPH[•] radikala u vodenim ekstraktima gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) nije se bitno razlikovao obzirom na nadmorsku visinu.

4. REZULTATI



Slika 13. Postotak inhibicije DPPH[•] radikala u vodenom i etanolnom ekstraktu koprive, dugolisne metvice, gospine trave prikupljenih na dvije nadmorske visine (750 i 1185 m) te velikog čička (750 m) i sitnoglavičastog strička (1185 m). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$). Oznake: K – kopriva, M – dugolisna metvica, G – gospina trava, Č – čičak.

4. REZULTATI

4.4. FRAP METODA

Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti vodenih i etanolnih ekstrakata FRAP metodom kojom se određuje sposobnost redukcije kompleksa Fe(III)-TPTZ u Fe(II) prikazani su na **Slici 14**. Rezultati su izraženi kao postotak redukcije.

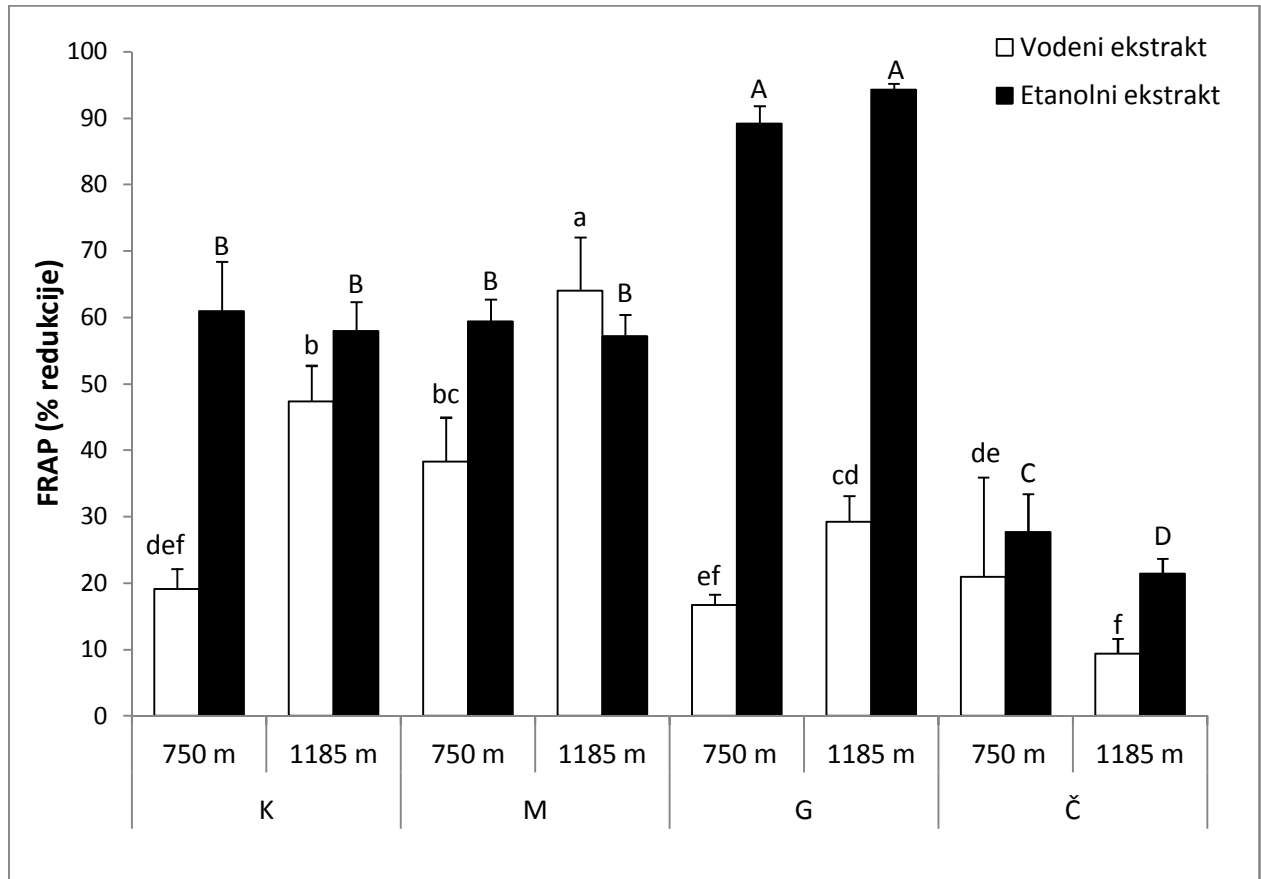
Najviši postotak redukcije spomenutog kompleksa (94% redukcije) izmjeren je u etanolnom ekstraktu gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) prikupljene na 1185 m nadmorske visine. Najniži postotak redukcije (9% redukcije) određen je u vodenom ekstraktu sintoglavicastrag strička (*Carduus pycnocephalus* L.) prikupljenog na 1185 m nadmorske visine.

Kod svih biljnih svojti prikupljenih na istoj nadmorskoj visini, postotak redukcije bio je viši u etanolnom nego u vodenom ekstraktu. Izuzetak je dugolisna metvica (*Mentha longifolia* L.) prikupljena na 1185 m nadmorske visine kod koje postotak inhibicije u vodenom ekstraktu iznosi 64%, a u etanolnom 57%.

Nadmorska visina nije utjecala na postotak redukcije kompleksa Fe(III)-TPTZ u Fe(II) u etanolnim ekstraktima sakupljenih biljnih svojti budući se ti postotci nisu međusobno bitno razlikovali. Izuzetak je etanolni ekstrakt velikog čička (*Arctium lappa* L.) kod kojeg je zabilježen viši postotak inhibicije u usporedbi s etanolnim ekstraktom sitnoglavicastrag strička (*Carduus pycnocephalus* L.)

U vodenom ekstraktu većine biljnih svojti prikupljenih na 1185 m nadmorske visine postotak inhibicije bio je viši nego u vodenom ekstraktu istih biljnih svojti prikupljenih na 750 m nadmorske visine. Izuzetak su 2 vrste iz porodice *Asteraceae*, veliki čičak (*Arctium lappa* L.) i sitnoglavicastrag stričak (*Carduus pycnocephalus* L.) gdje je rezultat obrnut. Postotak redukcije je viši u vodenom ekstraktu velikog čička (*Arctium lappa* L.) prikupljenog na 750 m nadmorske visine (21% inhibicije) nego u vodenom ekstraktu sitnoglavicastrag strička (*Carduus pycnocephalus* L.) prikupljenom na 1185 m nadmorske visine (9% inhibicije).

4. REZULTATI



Slika 14. Postotak redukcije kompleksa Fe(III)-TPTZ u Fe(II) u vodenom i etanolnom ekstraktu koprive, dugolisne metvice, gospine trave prikupljenih na dvije nadmorske visine (750 i 1185 m) te velikog čička (750 m) i sitnoglavičastog strička (1185 m). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$). Oznake: K – kopriva, M – dugolisna metvica, G – gospina trava, Č – čičak.

4. REZULTATI

4.5. ABTS METODA

Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti vodenih i etanolnih ekstrakata ABTS metodom kojom se određuje sposobnost gašenja slobodnih ABTS radikala prikazani su na **Slici 15**. Rezultati su izraženi kao postotak inhibicije.

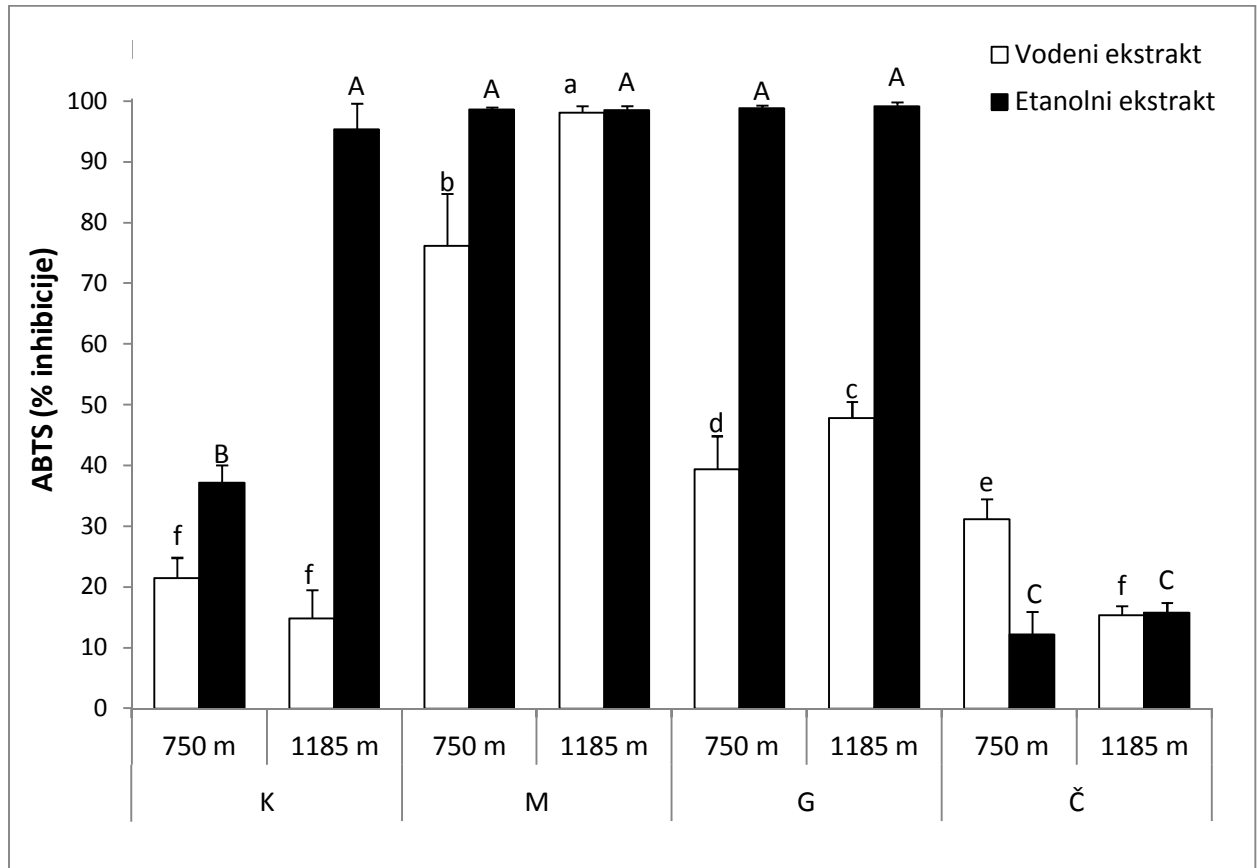
Najviši postotak inhibicije ABTS radikala (99% inhibicije) izmjeren je u etanolnom ekstraktima dugolisne metvice (*Mentha longifolia* L.) i gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) prikupljenih na 1185 m nadmorske visine. Najniži postotak inhibicije (12% inhibicije) izmjeren je u etanolnom ekstraktu velikog čička (*Arctium lappa* L.) prikupljenom na 750 m nadmorske visine.

Kod većine biljnih svojti prikupljenih na istoj nadmorskoj visini, postotak inhibicije bio je viši u etanolnom nego u vodenom ekstraktu, osim kod velikog čička (*Arctium lappa* L.) gdje je zabilježena obrnuta situacija. Također, postotci inhibicije bili su slični u vodenom i etanolnom ekstraktu dugolisne metvice (*Mentha longifolia* L.) i sitnoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.) prikupljenih na 1185 m nadmorske visine.

U etanolnim ekstraktima većine sakupljenih biljnih svojti nije bio vidljiv utjecaj nadmorske visine na postotak inhibicije ABTS radikala budući su ti postotci međusobno bili podjednaki. Izuzetak je kopriva (*Urtica dioica* L.) kod koje je postotak inhibicije bio viši (95% inhibicije) u etanolnom ekstraktu izrađenom od biljke prikupljene na 1185 m nadmorske visine nego u istom ekstraktu izrađenom od biljke prikupljene na 750 m nadmorske visine (37% inhibicije).

U vodenom ekstraktu dugolisne metvice (*Mentha longifolia* L.) i gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) prikupljenih na 1185 m nadmorske visine postotak inhibicije bio je viši (dugolisna metvica 98%, gospina trava 48% inhibicije) nego u vodenim ekstraktima istih biljnih svojti prikupljenih na 750 m nadmorske visine (dugolisna metvica 76%, gospina trava 40% inhibicije). Postotak inhibicije ABTS radikala u vodenim ekstraktima koprive (*Urtica dioica* L.) nije se bitno razlikovao obzirom na nadmorsku visinu. U vodenom ekstraktu velikog čička (*Arctium lappa* L.) prikupljenog na 750 m nadmorske visine postotak inhibicije bio je viši (31% inhibicije) nego u vodenom ekstraktu sitnoglavičastog strička (*Carduus pycnocephalus* L.) prikupljenog na 1185 m nadmorske visine (15% inhibicije).

4. REZULTATI



Slika 15. Postotak inhibicije ABTS radikala u vodenom i etanolnom ekstraktu koprive, dugolisne metvice, gospine trave prikupljenih na dvije nadmorske visine (750 i 1185 m) te velikog čička (750 m) i sitnoglavičastog strička (1185 m). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$). Oznake: K – kopriva, M – dugolisna metvica, G – gospina trava, Č – čičak.

4. REZULTATI

4.6. KORELACIJE

U svrhu određivanja korelacija između antioksidacijske aktivnosti mjerene različitim metodama i sadržaja polifenolnih metabolita izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije.

Tablica 3. Matriks Pearsonovog koeficijenta za antioksidacijske metode i sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u vodenom ekstraktu istraženih biljnih vrsta. Podebljane vrijednosti pokazuju značajnu korelaciju na razini značajnosti $p \leq 0,05$.

	FI	DPPH	FRAP	ABTS
F	0,941	0,374	0,787	0,860
FI		0,515	0,797	0,956
DPPH			0,295	0,600
FRAP				0,681

Pearsonov koeficijent korelacije za ispitane uzorke u vodenim ekstraktima prikazan je u **Tablici 3**. Prema razini značajnosti većina metoda pokazuju značajnu korelaciju između vrijednosti antioksidacijskih aktivnosti te sadržaja ukupnih fenola i sadržaja ukupnih flavonoida. Vidljivo je da nije značajan koeficijent korelacije između FRAP i DPPH metode. Najviši Pearsonov koeficijent (0,956) izračunat je za ABTS i sadržaj ukupnih flavonoida, a vrijednost iznad 0,900 pokazuje sadržaj ukupnih fenola i sadržaj ukupnih flavonoida (0,941).

Tablica 4. Matriks Pearsonovog koeficijenta za antioksidacijske metode te sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u etanolnom ekstraktu istraženih biljnih vrsta. Podebljane vrijednosti pokazuju značajnu korelaciju na razini značajnosti $p \leq 0,05$.

	FI	DPPH	FRAP	ABTS
F	0,968	0,816	0,407	0,806
FI		0,851	0,452	0,862
DPPH			0,780	0,887
FRAP				0,782

Pearsonov koeficijent korelacije za ispitane uzorke u etanolnim ekstraktima prikazan je u **Tablici 4**. Prema razini značajnosti sve metode pokazuju značajnu korelaciju između vrijednosti antioksidacijskih aktivnosti te sadržaja ukupnih fenola i sadržaja ukupnih flavonoida. Najviši Pearsonov koeficijent izračunat je za sadržaj ukupnih fenola i sadržaj ukupnih flavonoida (0,968).

6. ZAKLJUČAK

U etanolnim i vodenim ekstraktima biljnih svojti s područja Blidinja prvi put je određena antioksidacijska aktivnost. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- s izuzetkom čička, ispitivane biljne svojte su razmjerno bogate polifenolnim tvarima
- etanol je pogodnije otapalo za ekstrakciju polifenola budući su etanolni ekstrakti istraživanih biljnih svojti bogatiji fitokemikalijama te su pokazali veću biološku aktivnost nego vodeni ekstrakti istih biljnih svojti, uz izuzetak velikog čička
- utjecaj nadmorske visine na antioksidacijsku aktivnost bio je vidljiv u vodenim ekstraktima istraživanih biljnih svojti
- utvrđena je pozitivna korelacija između sadržaja polifenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta mjenog DPPH, ABTS i FRAP metodama

7. LITERATURA

- Al-Shammari LA, Hassan WHB, Al-Youssef HM. 2012. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil and lipid content of *Carduus pycnocephalus* L. growing in Saudi Arabia. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 4:1281-1287.
- Benedí J, Arroyo R, Romero C, Martín-Aragón S, Villar AM. 2004. Antioxidant properties and protective effects of a standardized extract of *Hypericum perforatum* on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in PC12 cells. *Life Sciences* 75: 1263-1276.
- Benzie IFF, Strain JJ. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology* 299: 15-27.
- Bilger W, Rolland M, Nybakken L. 2007. UV screening in higher plants induced by low temperature in the absence of UV-B radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences* 6: 190-195.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* 28: 25-30.
- Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences* 74: 2157-2184.
- Chong J, Poutaraud A, Hugueney P. 2009. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science* 177: 143-155.
- Dai J, Mumper RJ. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313-7352.
- Deng SL, Chen WF, Zhou B, Lang Y, Liu ZL. 2005. Protective effects of curcumin and its analogues against free radical-induced oxidative haemolysis of human red blood cells. *Food Chemistry* 98: 112-119.
- Druzynska B, Stepniowska A, Wołosiak R. 2007. The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 6: 27-36.
- Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon J-M. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 1768-1774.

7. LITERATURA

- Duncan DB. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11: 1-42.
- Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M, Abdely C. 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies* 331: 372–379.
- Federalno ministarstvo okoliša i turizma, Plan upravljanja za Park prirode Blidinje.
- Frankel EN, Finley JW. 2008. How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 4901-4908.
- Fuss E, 2003. Lignans in plant cell and organ cultures: An overview. *Phytochemistry Reviews* 2: 307-320.
- Ganžera M, Guggenberger M, Stuppner H, Zidorn C. 2008. Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Matricaria chamomilla* cv. BONA. *Planta Medica* 74: 453-457.
- Germano MP, Pasquale RD, Valeria DA, Catania S, Silvari V, Costa C. 2002. Evaluation of extracts and isolated fraction from *Capparis spinosa* L. buds as an antioxidant source. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1168-1171.
- Gruz J, Novák O, Strnad M. 2008. Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLCMS/ MS. *Food Chemistry* 111: 789-794.
- Gülçin İ, Küfrevioğlu Öİ, Oktay M, Büyükokuroğlu ME. 2004. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Ethnopharmacology* 90: 205-215.
- Hajlaoui H, Trabelsi N, Noumi E, Snoussi M, Fallah H, Ksouri R, Bakhrouf A. 2009. Biological activities of the essential oils and methanol extract of two cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 2227-2238.
- Jaganath IB, Crozier A. 2010. Dietary flavonoids and phenolic compounds. U: Fraga CG. (ur.), *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*. Wiley & Sons, str. 1-50.

7. LITERATURA

- Jakovljević M, Mihaljević-Peješ A, Šagud M, Rajačić M. 2002. Prirodni lijekovi u terapiji mentalnih poremećaja. *Medicus* 11: 263-269.
- Katalinić V, Miloš M, Kulišić T, Jukić M. 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry* 94: 550–557.
- Kiselova Y, Ivanova D, Chervenkov T, Gerova D, Galunska B, Yankova T. 2006. Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs. *Phytotherapy Research* 20: 961-965.
- Kliebenstein DJ, Osbourn A. 2012. Making new molecules – evolution of pathways for novel metabolites in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 15: 415–423.
- Körner C. 1999. Global change at high elevation. *Alpine Plant Life*: 291-298.
- Lange BM, Croteau R. 1999. Genetic engineering of essential oil production in mint. *Current Opinion in Plant Biotechnology* 2:139–144.
- Lee C, Lee P, Kuo Y. 2001. The chemical constituents from the aril of *Cassia Fistula* L. *Journal of Chinese Chemical Society* 48: 1053-1058.
- Li HB, Wong CC, Cheng KW, Chen F. 2008. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT- Food Science and Technology* 41: 385-390.
- Lule SU, Xia W. 2005. Food Phenolics, Pros and Cons: A Review. *Food Reviews International* 21: 367-388.
- Muanda F, Soulimani R, Diop B, Dicko A (2010) Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *LWT – Food Science and Technology* 44: 1865-1872.
- Noorhajati H, Tanjung M, Aminah NS, Suwandi JSA. 2012. Antioxidant activities of extracts of trengguli stem bark (*Cassia fistula* L.). *International Journal of Basic & Applied Sciences* 12: 85-89.
- Ough CS, Amerine MA. 1998. *Methods for Analysis of Musts and Wines*. Wiley & Sons. Washington.
- Pevalek- Kozlina B. (2003). *Fiziologija bilja*, Profil International, Zagreb.

7. LITERATURA

- Piljac-Žegarac J, Šamec D. 2011. Antioxidant stability of small fruits in postharvest storage at room and refrigerator temperatures. *Food Research International* 44: 345-350.
- Piljac J, Martinez S, Stipčević T, Petrović Ž, Metikoš-Huković M. 2004. Cyclic voltammetry investigation of the phenolic content of Croatian wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 55: 417-422.
- Pourmorad F, Hosseinimehr SJ, Shahabimajd N. 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* 5: 1142-1145.
- Prokudina EA, Havlicek L, Al-Maharik N, Lapcik O, Strnad M, Gruz J. 2012. Rapid UPLC–ESI–MS/MS method for the analysis of isoflavonoids and other phenylpropanoids. *Journal of Food Composition and Analysis* 26: 36-42.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26: 1231-1237.
- Redžić S, Barudanović S, Trakić S, Kulijer D. 2010. Vascular plant biodiversity richness and endemo-relictness of the karst mountains Prenj, Čvrsnica and Čabulja in Bosnia and Herzegovina (W.Balkan). *Acta Carsologica* 40/3: 527-555.
- Ribera AE, Zuñiga G. 2012. Induced plant secondary metabolites for phytopathogenic fungi control: a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 12: 893-911.
- Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition* 81: 215-217.
- Solecki R. 1975. Shanidar IV, a Neanderthal flower burial in northern Iraq. *Science* 190: 880-881.
- Spitaler R, Schlorhauser D, Ellmerer E, Merfort I, Bortenschlager S, Stuppner H, Zidorn C. 2006. Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO. *Phytochemistry* 67: 409-417.
- Spitaler R, Winkler A, Lins I, Yanar S, Stuppner H, Zidorn C. 2008. Altitudinal variation of pPhenolic contents in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO: a 3-year comparison. *Journal of Chemical Ecology* 34: 369-375.

7. LITERATURA

- Stevenson DE, Hurst RD. 2007. Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more? *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 2900-2916.
- Stalikas CD. 2010. Phenolic acids and flavonoids: Occurrence and analytical methods. U: Uppu RM i sur. (ur.), *Free Radicals and Antioxidant Protocols, Methods in Molecular Biology* 610, Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, LLC, str. 65-90.
- Surveswaran S, Cai Y-Z, Corke H, Sun M. 2007. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry* 102: 938-953.
- Susanti WS, Iwasaki H, Itokazu Y, Nago M, Taira N, Saitoh S, Oku H. 2012. Tumor specific cytotoxicity of arctigenin isolated from herbal plant *Arctium lappa* L. *Journal of Natural Medicines* 66: 614-621.
- Šamec D, Gruz J, Strnad M, Kremer D, Kosalec I, Jurišić Grubešić R, Karlović K, Lucić A, Piljac-Žegarac J. 2010. Antioxidant and antimicrobial properties of *Teucrium arduini* L. (*Lamiaceae*) flower and leaf infusions (*Teucrium arduini* L. antioxidant capacity). *Food and Chemical Toxicology* 48: 113-119.
- Šamec D, Piljac-Žegarac J, Bogović M, Habjanič K, Grúz J. 2011. Antioxidant potency of white (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) and Chinese (*Brassica rapa* L. var. *pekinensis* (Lour.)) cabbage: The influence of development stage, cultivar choice and seed selection. *Scientia Horticulturae* 128: 78-83.
- Šamec D. 2013. Fitokemijska i genetska istraživanja endemskih vrsta *Teucrium arduini*, *Moltkia petraea*, *Micromeria croatica* i *Rhamnus intermedia*. Doktorski rad, Zagreb.
- Tsao R. 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2: 1231-1246.
- Turkmen N, Velioglu YS, Sari F, Polat G. 2007. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules* 12: 484-496.
- Udovičić M, Baždarić K, Bilić-Zulle L, Petrovečki M. 2007. Što treba znati kada izračunavamo koeficijent korelacije? *Biochemia Medica* 17: 10-15.
- Uncini Manganelli RE, Zaccaro L, Tomei PE. 2005. Antiviral activity in vitro of *Urtica dioica* L., *Parietaria diffusa* M. et K. and *Sambucus nigra* L. *Journal of Ethnopharmacology* 98: 323-327.

7. LITERATURA

Verpoorte R. 2000. Pharmacognosy in the new millenium: leadfinding and biotechnology. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 52: 253-262.

World Health Organisation 2005. National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines. WHO Press, Geneva, Switzerland.

World Health Organisation 2007. WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. WHO Press, Geneva, Switzerland.

Wojdyło A, Oszmiański J, Czemerys R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* 105: 940-949.

Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64: 555-559.

Zhao XY, Sun HD, Hou AJ, Zhao QS., Wei TT, Xin WJ. 2005. Antioxidant properties of two gallotannins isolated from the leaves of *Pistacia weinmannifolia*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1725: 103-110.

Web

hirc.botanic.hr/fcd/ (28.6.2014.)

ŽIVOTOPIS

Renata Rogić rođena je 1. listopada 1990. godine u Mostaru (Bosna i Hercegovina). Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja u Srednjoj medicinskoj školi Sestara milosrdnica, 2009. godine upisuje preddiplomski studij Znanosti o okolišu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Diplomski studij Znanosti o okolišu upisuje 2012. godine. Sudjelovala je na Noći biologije 2011. i 2012.godine. Od 2012. godine aktivna je članica sekcije za edukaciju u Udruzi studenata biologije BIUS, te je sudjelovala na dva istraživačko-edukacijska projekta: „Apsyrtides 2013" i „Grabovača 2014". Sa sekcijom za edukaciju organizirala je radionice na Festivalu znanosti u Zagrebu 2013. i 2014. godine. 2014. položila je ispit za speleologa pripravnika u SO PDS Velebit, te se aktivno bavi speleologijom.