

Antioksidacijska svojstva ljekovitog bilja

Smoljo, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:912695>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

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

ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA
LJEKOVITOG BILJA

DIPLOMSKI RAD

MARINA SMOLJO

Matični broj: 10

Split, listopad 2020

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA
LJEKOVITOG BILJA

DIPLOMSKI RAD

MARINA SMOLJO

Matični broj: 10

Split, listopad 2020.

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

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF HERBS

GRADUATE THESIS

MARINA SMOLJO

Parent number: 10

Split, October 2020

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet
Diplomski studij prehrambene tehnologije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Tema rada: je prihvaćena na 28. Sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Danijela Skroza

ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA LJEKOVITOG BILJA

Marina Smoljo, 10

Sažetak:

Zabrinutost potrošača o štetnosti sintetskih aditiva sve više utječe na primjenu prirodnih aditiva koji jednako dobro mogu osigurati sigurnu i kvalitetnu hranu. Interes za mogućom primjenom prirodnih dodataka u hrani, bilo da se spriječi rast patogena koji se prenose hranom ili da se odgodi njeno oksidativno kvarenje, sve je veći. Mnoga istraživanja ukazuju na činjenicu da biljni ekstrakti zahvaljujući fenolnim spojevima, posjeduju dobra antioksidacijska svojstva. Za određivanje aktivnosti nekog uzorka, koriste se različite metode temeljene na različitim mehanizmima djelovanja. U cilju određivanja antioksidacijskog kapaciteta vodenih ekstrakata ljekovitog bilja kadulje, klinčića, lovora, masline i ružmarina korištene su tri antioksidacijske metode: FRAP (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power), DPPH (engl. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay) i ORAC (engl. Oxygen Radical Absorbing Capacity) metoda. Rezultati antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom ukazuju na izuzetno dobru redukcijsku sposobnost svih testiranih ekstrakata ljekovitog bilja. ORAC i DPPH metodom ekstrakt masline imao je najveću antioksidacijsku aktivnost, a FRAP metodom ekstrakt klinčića. Obzirom na udio ukupnih fenola i antioksidacijski potencijal može se zaključiti da se ekstrakt klinčića pokazao kao najbolji, no i ostali testirani ekstrakti pokazuju izniman antioksidacijski potencijal i mogućnost primjene u prehrambenoj industriji kao zamjena za sintetske aditive.

Ključne riječi: antioksidacijska aktivnost, ljekovito bilje, FRAP, DPPH, ORAC

Rad sadrži: 35 stranica, 19 slika, 6 tablica, 65 literaturnih referenci

Jezik izvornik: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu

1. Doc. dr. sc. Miće Jakić
2. Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović
3. Doc. dr. sc. Danijela Skroza

Datum obrane: 21. listopada 2020. god.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology
Orientation: Nutritional technology

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food Technology

Thesis subject: was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session No. 28

Mentor: Assistant Professor Danijela Skroza, Ph. D.

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF HERBS

Marina Smoljo, 10

Abstract:

Consumer concerns about the harmfulness of synthetic additives are increasingly affecting the use of natural additives that can provide safe and equally quality food. Interest in the possible use of natural food additives, whether to prevent the growth of foodborne pathogens or to delay its oxidative spoilage, is growing. Many studies point to the fact that plant extracts, thanks to phenolic compounds, possess good antioxidant properties. To determine the activity of a sample, different methods based on different mechanisms of action are used. In order to determine the antioxidant capacity of aqueous extracts of sage, clove, laurel, olive, and rosemary, three antioxidant methods were used: FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay), and ORAC (Oxygen Radical Absorbing Capacity) method. The results of antioxidant activity determined by the DPPH method indicate an extremely good reducing ability of all tested herbs extracts. The olive extract showed the highest antioxidant activity using ORAC and DPPH method, and clove extract using the FRAP method. Considering the total phenols content and antioxidant potential, it can be concluded that clove extract proved to be the best, but other tested extracts show exceptional antioxidant potential and the possibility of application in the food industry as a substitute for synthetic additives.

Keywords: antioxidant activity, herbs, FRAP, DPPH, ORAC

Thesis contains: 35 pages, 19 figures, 6 tables, 65 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Assistant Professor Miće Jakić, Ph. D.
2. Assistant Professor Zvonimir Marijanović, Ph. D.
3. Assistant Professor Danijela Skroza, Ph. D.

Defence date: 21th October 2020.

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

*Diplomski rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju,
Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod vodstvom i mentorstvom doc. dr. sc.
Danijele Skroze, u razdoblju od veljače do rujna 2020. godine.*

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Danijeli Skroza na ukazanom povjerenju i pomoći pri izradi ovog rada te za svu potporu tokom studija.

Također, jedno veliko hvala mojoj obitelji, roditeljima i prijateljima na razumijevanju i nesebičnoj podršci koju su mi pružali kroz cijeli period studiranja.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Odrediti antioksidacijsku aktivnost ljekovitog bilja (kadulja, klinčić, lovor, maslina i ružmarin) korištenjem različitih metoda: FRAP (*Ferric-Reducing Antioxidant Power*), DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay*) i ORAC (*Oxygen Radical Absorbing Capacity*) metode.
- Usporediti rezultate i izvesti zaključke o antioksidacijskoj aktivnosti analiziranih ekstrakata ljekovitog bilja.

SAŽETAK

Zabrinutost potrošača o štetnosti sintetskih aditiva sve više utječe na primjenu prirodnih aditiva koji jednako dobro mogu osigurati sigurnu i kvalitetnu hranu. Interes za mogućom primjenom prirodnih dodataka u hrani, bilo da se spriječi rast patogena koji se prenose hranom ili da se odgodi njeno oksidativno kvarenje, sve je veći. Mnoga istraživanja ukazuju na činjenicu da biljni ekstrakti zahvaljujući fenolnim spojevima, posjeduju dobra antioksidacijska svojstva. Za određivanje aktivnosti nekog uzorka, koriste se različite metode temeljene na različitim mehanizmima djelovanja. U cilju određivanja antioksidacijskog kapaciteta vodenih ekstrakata ljekovitog bilja kadulje, klinčića, lovora, masline i ružmarina korištene su tri antioksidacijske metode: FRAP (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power), DPPH (engl. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay) i ORAC (engl. Oxygen Radical Absorbing Capacity) metoda. Rezultati antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom ukazuju na izuzetno dobru redukcijsku sposobnost svih testiranih ekstrakata ljekovitog bilja. ORAC i DPPH metodom ekstrakt masline imao je najveću antioksidacijsku aktivnost, a FRAP metodom ekstrakt klinčića. Obzirom na udio ukupnih fenola i antioksidacijski potencijal može se zaključiti da se ekstrakt klinčića pokazao kao najbolji, no i ostali testirani ekstrakti pokazuju izniman antioksidacijski potencijal i mogućnost primjene u prehrambenoj industriji kao zamjena za sintetske aditive.

Ključne riječi: antioksidacijska aktivnost, ljekovito bilje, FRAP, DPPH, ORAC

SUMMARY

Consumer concerns about the harmfulness of synthetic additives are increasingly affecting the use of natural additives that can provide safe and equally quality food. Interest in the possible use of natural food additives, whether to prevent the growth of foodborne pathogens or to delay its oxidative spoilage, is growing. Many studies point to the fact that plant extracts, thanks to phenolic compounds, possess good antioxidant properties. To determine the activity of a sample, different methods based on different mechanisms of action are used. In order to determine the antioxidant capacity of aqueous extracts of sage, clove, laurel, olive, and rosemary, three antioxidant methods were used: FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay), and ORAC (Oxygen Radical Absorbing Capacity) method. The results of antioxidant activity determined by the DPPH method indicate an extremely good reducing ability of all tested herbs extracts. The olive extract showed the highest antioxidant activity using ORAC and DPPH method, and clove extract using the FRAP method. Considering the total phenols content and antioxidant potential, it can be concluded that clove extract proved to be the best, but other tested extracts show exceptional antioxidant potential and the possibility of application in the food industry as a substitute for synthetic additives.

Keywords: antioxidant activity, herbs, FRAP, DPPH, ORAC

SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO.....	2
1.1. LJEKOVITO BILJE.....	2
1.1.1. Upotreba i potencijal ljekovitog bilja	2
1.2. KADULJA (<i>Salvia officinalis</i> L.)	4
1.2.1. Kemijski profil kadulje	4
1.2.2. Biološka aktivnost kadulje.....	5
1.3. KLINČIĆ (<i>Syzgium aromaticum</i>)	6
1.3.1. Kemijski profil klinčića	7
1.3.2. Biološka aktivnost klinčića	9
1.4. LOVOR (<i>Laurus nobilis</i> L.).....	10
1.4.1. Kemijski profil lovora.....	11
1.4.2. Biološka aktivnost lovora	11
1.5. MASLINA (<i>Olea europaea</i> L.).....	12
1.5.1. Kemijski profil masline	13
1.5.2. Biološka aktivnost masline	14
1.6. RUŽMARIN (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	15
1.6.1. Kemijski profil ružmarina.....	16
1.6.2. Biološka aktivnost ružmarina	17
2. EKSPERIMENTALNI DIO	19
2.1. MATERIJAL.....	19
2.2. UREĐAJI I KEMIČALIJE	19
2.3. METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI.....	20
2.3.1. FRAP metoda (engl. <i>Ferric-Reducing Antioxidant Power</i>)	20
2.3.2. DPPH metoda (engl. <i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay</i>)	21
2.3.3. ORAC metoda (engl. <i>Oxygen Radical Absorbing Capacity</i>)	22
3. REZULTATI I RASPRAVA	24
3.1. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM	24
3.2. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM	26
3.3. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI ORAC METODOM	27
4. ZAKLJUČCI	29
5. LITERATURA	30

UVOD

Upotreba kemikalija i sintetskih konzervansa kao inhibitora rasta patogena ili kao antioksidansa je postala neophodna. No isto tako zabrinutost potrošača o štetnosti sintetskih aditiva sve više potiče primjenu prirodnih aditiva koji jednako dobro mogu osigurati sigurnu i kvalitetnu hranu. Interes za mogućom primjenom prirodnih dodataka u hrani, bilo da se spriječi rast patogena koji se prenose hranom ili da se odgodi njeno oksidativno kvarenje, sve je veći.

Rezultati brojnih istraživanja ukazali su na činjenicu da biljni ekstrakti, zahvaljujući fenolnim spojevima, posjeduju izrazito dobra antioksidacijska svojstva. Stoga fenolni antioksidansi iz prirodnih izvora, u prehrambenoj industriji postaju sve češća alternativa sintetskim antioksidansima. Bogat fenolni potencijal i dobra antioksidacijska aktivnost ljekovitog bilja također imaju veliki značaj za zdravlje čovjeka, osobito u zaštiti od pojave oksidacijskog stresa i brojnih drugih oboljenja.

U svrhu dokazivanja pozitivnog antioksidacijskog učinka ljekovitog bilja u radu su testirani ekstrakti ljekovitog bilja kadulje, klinčića, lovora, masline i ružmarina, korištenjem tri različite antioksidacijske metode temeljene na različitim mehanizmima djelovanja (FRAP, DPPH i ORAC).

1. OPĆI DIO

1.1. LJEKOVITO BILJE

U ljekovito bilje, prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije (*World Health Organization, WHO*), ubrajaju se one vrste čiji jedan dio ili više dijelova bilja sadrže biološki aktivnu tvar koja se može iskoristiti u terapijske svrhe ili za kemijske i farmaceutske sinteze, dok aromatično bilje predstavlja one vrste koje sadrže jednu ili više aktivnih tvari posebnog okusa ili mirisa koje se upotrebljavaju za spravljanje mirisa, napitaka i aroma te kozmetičkih proizvoda (1, 2). U novijoj literaturi ljekovito, začinsko i aromatično bilje često se naziva zajedničkim imenom - ljekovito bilje (1). Najčešće se definira kao divlje i/ili uzgajane biljne kulture koje se mogu izravno ili neizravno koristiti u medicinske svrhe (3).

Aktivne tvari ljekovitog bilja nastaju specifičnom biljnom sintezom onih dijelova biljke koji sadrže te aktivne tvari, a to su: list, cvijet, plod, stabljika i korijen (1). Mogu se podijeliti na:

- primarne tvari: šećeri i proteini (nužni biljci za rast i reprodukciju) i
- sekundarne tvari: alkaloidi, heteroglikoni (glikzidi), gume, biljne ljepljive sluzi (mucilagini), gorke tvari, tanini, organske kiseline, enzimi, vitamini, smole, balzami, gumene smole te eterična ulja (1).

1.1.1. Upotreba i potencijal ljekovitog bilja

Upotreba različitih dijelova biljaka, osim u narodnoj medicini, sve je češća u javnom zdravstvu. Zbog svojih antioksidacijskih svojstava značajno smanjuju nuspojave, toksičnost lijekova i njihovo nakupljanje u tijelu te tako predstavljaju dobru alternativu kemijskim lijekovima (4).

Zbog sadržaja bioloških aktivnih tvari ljekovito bilje ima višestruku ulogu i široku primjenu u liječenju ljudi i životinja. Aromatično bilje se pak koristi u prehrambenoj industriji radi poboljšavanja okusa te služi za dobivanje eteričnih ulja (1).

Čaj je najčešći pripravak i proizvod od ljekovitog bilja. Priprema se na razne načine, ovisno o učincima koje želimo postići s njim te ovisno o dijelu biljke od koje se pripravlja. Može biti pripravljen kao:

- **oparak ili infuz:** Za pripravu se koristi suha, usitnjena biljka, rjeđe svježa biljka, koja se prelijeva kipućom vodom. Nakon 10 min i filtracije čaj je spreman za konzumaciju. To je najčešći način pripreme čaja koji se priprema od nježnih struktura biljaka i onih koje sadrže termolabilne tvari (alkaloidi) ili lako hlapive tvari (eterično ulje), npr. čaj od mente, nevena, smilja, stolisnika itd.
- **uvarak:** Ovaj način pripreme se koristi za biljke iz kojih se aktivne tvari teže ekstrahiraju, npr. čaj od lista oraha, od islandskog lišaja itd. Usitnjena suha biljka se prelijeva sa hladnom vodom, zagrijava do vrenja i nakon 10 min procijedi.
- **provarak:** To je način pripreme čaja od biljaka kod kojih se ljekovite tvari teško ekstrahiraju (korijen, kora) ili od biljaka koje sadrže termostabilne tvari (npr. saponini).
- **naljev:** Način pripreme čaja od biljaka koje sadrže sluzi ili neke druge sastojke osjetljive na toplinu. Biljni materijal prelije se hladnom vodom i ostavi preklopljeno 6 sati, npr. čaj od bijelog i crnog sljeza ili sjemenki dunje koje sadrže sluzi (5).

S druge strane, za one aktivne tvari iz biljaka koje se bolje tope u alkoholu nego u vodi, pogodan je biljni pripravak koji se naziva tinktura. Obično se pripravlja od suhog bilja koje se prelijeva sa 70%-tnim alkoholom (omjer bilja i alkohola 1:5). U slučaju pripreme tinkture od svježeg lišća potrebno je dvostruko ili trostruko veću količinu bilja prelitati sa 96%-tnim alkoholom (5).

Biljni pripravci od ljekovitog bilja od davnina se koriste u narodnoj medicini za liječenje raznih tegoba. Tako se za dišne tegobe često koristi sirup pripravljen od trpuca, borovih iglica, divizme ili maslačka. Močenjem svježeg ili suhog bilja u ulju nastaju macerati koji se koriste kao ulja za masažu, za zacjeljivanje rana i izradu drugih biljnih pripravaka kao npr. emulzija, krema itd. (5).

Također, ljekovito bilje ima značajnu upotrebu kod pripreme biljne masti i biljnog octa koji se mogu koristiti za začinjavanje jela te biljne kupke za poboljšanje cirkulacije (5).

1.2.KADULJA (*Salvia officinalis* L.)

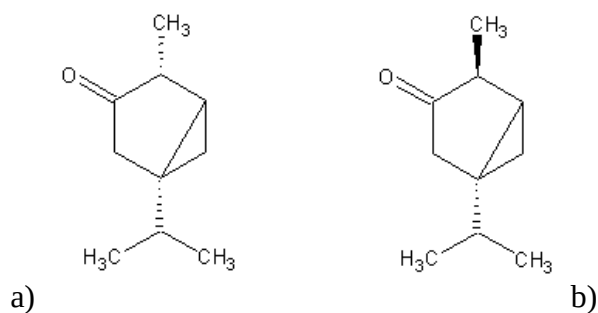
Ljekovita kadulja, latinskog imena *Salvia officinalis* koje potječe od riječi *salvare* = spasiti (liječiti) je višegodišnja, zimzelena polugrmovita biljka iz porodice Lamiaceae. Samonikla je biljka koja može narasti do 90 cm. Stabljike su razgranate i povijene, a u donjem dijelu drvenaste. Cvjetovi su ljubičasto-plave, a listovi sivkasto-zelene boje izduženo-ovalnog oblika. Za iskorištavanje ljekovitih svojstava koriste se listovi i vrhovi grančica koji se beru kada biljka počne cvjetati (6, 7).



Slika 1. Kadulja (8)

1.2.1. Kemijski profil kadulje

Udio pojedinih komponenti varira ovisno o čimbenicima okoliša i klimatskim uvjetima. Dominante komponente izolirane iz kadulje i eteričnog ulja kadulje su α -tujon, β -tujon, kamfor i 1,8-cineol. Terpeneol i linalil-acetat imaju najveće antibakterijsko djelovanje (9, 10).



Slika 2. Kemijska struktura: a) α -tujona i b) β -tujona (11)

Kemijski sastav kadulje čine proteini, ugljikohidrati, masti i dijetalna vlakna. Također sadrže brojne vitamine: C, B1 (tiamin), B2 (riboflavin), B3 (niacin), B6 (piridoksin) i B9 (folna kiselina), A, D, E i K. Od minerala prisutni su kalcij, željezo, magnezij, fosfor, kalij, natrij, cink, mangan, selen i bakar (12).

Tablica 1. Glavni sastojci esencijalnog ulja ljekovite kadulje (13)

Spoj	%	Spoj	%
limonen	3,54	mirtenol	0,26
1,8-cineol	17,83	karveol	0,10
linalol	0,20	ledol	0,95
α -tujon	13,82	γ -selinen	3,73
β -tujon	5,96	kariofilen oksid	1,06
β -pinen	0,27	santolin	0,19
kariofilen	3,86	spathulenol	0,47
γ -elemen	0,20	humulen epoksid	1,02
(Z)-pinokamfon	0,31	miristicin	0,13
kamfor	26,38	izoaromadendren epoksid	0,31
humulen	4,59	α -santalol	0,11
kamfen	0,25	trans-Z- α -bisabolen epoksid	0,25
terpineol	1,50	kariofilen (I3)	1,10
borneol	3,06	manoil oksid	5,46
α -terpinil acetat	2,02	β -selinen	0,45
geranil acetat	0,21	Ukupno identificirani spojevi	92,45

1.2.2. *Biološka aktivnost kadulje*

Antioksidansi su važan dio redovite prehrane. Djelujući kao hvatači slobodnih radikala, sprječavaju nastanak oksidacijskog stresa, odnosno oksidativno oštećenje stanica. Kadulja je jedna od ljekovitih biljaka sa najbogatijim izvorom antioksidansa. Za povoljnu biološku aktivnost i antioksidacijski učinak odgovorni su fenolni spojevi od kojih se posebno ističu karnozol, karnozolna i ružmarinska kiselina. Nadalje, drugi antioksidacijski sastojci identificirani u kadulji su kava i ferulinska kiselina, rosmanol, cirsimaritin i epirosmanol (14, 15, 16).

Njena ljekovita svojstva prepoznata su još od najstarijih vremena kada se koristila kao stimulans, tonik, antiseptik i antihidrotik. Osim što se dugo koristila u narodnoj medicini, primjenu je našla u industriji farmacije, kozmetike i u kulinarstvu. Može se koristiti suha ili svježa, a najčešće se koristi kao slana aroma hrane, odnosno kao suho lišće (13, 17). Biljna sredstva pripremljena pomoću kadulje pomažu apsorpciji hranjivih tvari i uklanjaju simptome nedostatka estrogena i menopauze. Korisna je i u liječenju gastrointestinalnih poremećaja (14). Aromatična i ljekovita vrijednost kadulje temelji se na visokoj koncentraciji hlapljivih ulja koji se nalaze u nadzemnim dijelovima biljke (5, 13). Destilacijom vodenom parom biljke u cvatu dobiva se eterično ulje kadulje koje zbog slatkastog i toplog mirisa povoljno djeluje u liječenju stresa, paranoje, depresije i anksioznosti. Sabinol, komfor, α -tujon i eukaliptol (1,8–cineol), kao glavni sastojci eteričnog ulja kadulje odgovorni su za antimikrobna i antibiotska svojstva. Vrijednost kadulje pripisuje se velikoj koncentraciji tujona i njegovoj ljekovitosti u eteričnom ulju i lišću (5, 13, 17).

Koristi se kao antioksidans i konzervans protiv kvarenja hrane te u kulinarstvu za aromatiziranje hrane (5, 14, 17). Zbog antiseptičkog djelovanja, u narodnoj medicini se koristila u liječenju vrućice, upale grla, bronhitisa, reume i znojenja. Stoga se i danas razne vrste ekstrakta kadulje mogu pronaći u pripravcima za njegu kože, kose i usne šupljine te u raznim deterdžentima i sapunima (5, 13, 18).

1.3.KLINČIĆ (*Syzygium aromaticum*)

Klinčić, biljka iz porodice Myrtaceae, jedan je od najcjenjenijih začina i ljekovitih biljaka. To je vazdazeleno visoko drveće porijeklom iz Indonezije (19, 20). Za dobivanje eteričnog ulja i u proizvodnji začina koriste se cvjetni pupovi klinčića koji se sakupljaju u fazi sazrijevanja prije cvatnje (19). Na latinskom se zove *clavus*, što znači čavao, na koji i liče njegovi cvjetni pupovi. Okus mu je vrlo jak i slatkasto-trpak, a miris opor i aromatičan. Tradicionalno se koristi kao konzervans hrane (20, 21). Široku primjenu ima u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji (19, 21). Također, primjenu je našao i u poljoprivredi gdje može biti od velike koristi za uzgoj raznih povrtnih kultura kao što su luk, salate, rajčice i razni biljni čajevi (20, 21).



Slika 3. Klinčić (22)



Slika 4. Klinčić kao začin (23)

1.3.1. Kemijski profil klinčića

Kemijski sastav bilja određen je agro-klimatskim uvjetima uzgoja biljke i skladištenja proizvoda. Osušeni cvjetni pupovi sadrže hlapljivo ulje, smole, tanine, celulozu, pentozane i hranjive sastojke kao što su ugljikohidrati, proteini, vitamini i mineralni elementi. Klinčić daje različite vrste hlapljivog ulja koje može biti ekstrahirano iz lišća, stabljike, pupoljaka i ploda. Eugenol je glavna komponenta svih vrsta ulja i općenito glavni bioaktivni spoj klinčića. Na 100 g svježeg biljnog materijala nalazi se u koncentracijama od 9,4 do 14,7 g (19, 21).

Tablica 2. Komponente raznih vrsta ulja klinčića (19)

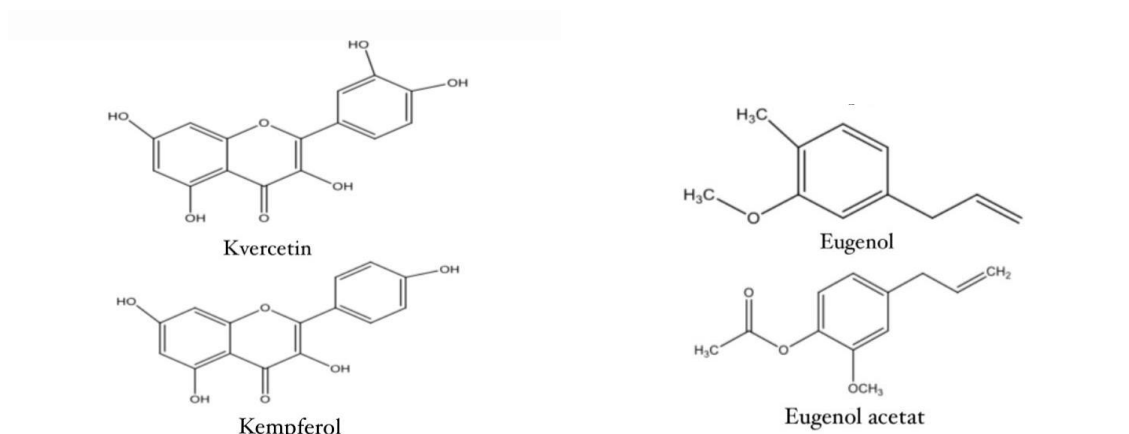
Vrsta ulja	Eterično ulje (%)	Dominantne komponente
Ulje pupa	15 - 20	eugenol (70-85%), eugenil-acetat, β -kariofilen, matilamilketon, metil salicilat, benzaldehid
Ulje lišća	3,0 – 4,8	eugenol (80,2%), eugenil-acetat, kariofilen, razne vrste spojeva kao npr. monoterpeni, aldehidi i ketoni
Ulje stabljike	6	eugenol, β -kariofil
Voćno ulje	2	eugenol (50-55%)

Tablica 3. Sadržaj vitamina i minerala u klinčiću (12)

Vitamin C	0,200 mg
Vitamin B1	0,158 mg
Vitamin B2	0,220 mg
Vitamin B3	1,560 mg
Vitamin B5	0,509 mg
Vitamin B6	0,391 mg
Vitamin B9	0,025 mg
Vitamin A	160 IU*
Vitamin E	8,820 mg
Vitamin K	0,142 mg
Kalcij	632 mg
Željezo	11,830 mg
Magnezij	259 mg
Fosfor	104 mg
Kalij	1020 mg
Natrij	277 mg
Cink	2,320 mg
Bakar	0,368 mg
Mangan	60,127 mg
Selen	0,007 g

Vrijednosti se odnose na količinu od 100 g uzorka; *IU – *International unit* (Međunarodna jedinica – IJ), jedinica mjere za količinu supstance koja se zasniva na mjerenju bioloških efekata. Vitamin A: 1 IU je biološki ekvivalent za 0,3 µg retinola, ili 0,6 µg β-karotena

Nehlapljive sastojke klinčića čine tanini, triterpeni, steroli i flavonoidi. Tanini u klinčiću u omjeru 10-13% imaju isti kemijski sastav kao galotaninska kiselina, dok su triterpeni zastupljeni u omjeru od oko 2%. Steroli klinčića uključuju stigmasterol, sitosterol i kampesterol. Od fenolnih kiselina, najzastupljenija je galna kiselina, a u manjim koncentracijama zastupljene su kava, elaginska, salicilna i ferulična kiselina. Također, u klinčiću su prisutni i flavonoidi poput kempferola, kvercetina i njihovih derivata (19, 21).



Slika 5. Strukturne formule nekih važnih fitokemikalija u klinčiću (21)

1.3.2. *Biološka aktivnost klinčića*

Bogat izvor fenolnih sastojaka pružaju mu snažnu antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost te antibakterijska, protugljivična, antivirusna i antikancerogena svojstva, zbog čega se posebno ističe među ostalim začinima (19). Njegovo antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje značajno je veće od drugih začina i od mnogih vrsta voća i povrća (21). Najznačajnije vrste fenolnih spojeva pronađenih u klinčiću su fenolne kiseline, flavonoli, tanini, glukozidi i fenolna hlapljiva ulja od kojih je najznačajniji eugenol. Eugenol, kao glavni sastojak arome klinčića, zbog zanimljive konjugacije ugljikovog lanca s aromatskim prstenom, sudjeluje u stabilizaciji fenoksilnog radikala. Omogućuje i doniranje atoma vodika stvarajući pri tom stabilne spojeve koji onemogućuju širenje oksidacije, samim tim i pojavu oksidacijskog stresa (19, 21). Eugenol je primjenu našao i u stomatologiji kao lokalni anestetik te kao sastojak zubnog cementa za privremenu ispunu zuba (24). Antioksidacijsko djelovanje eugenola može se usporediti s djelovanjem sintetskog antioksidansa, BHA (beta-hidroksi kiselina) i pirogalola. Osim doniranja vodika, klinčić ima veliki kapacitet u smanjenju peroksidacije lipida (19, 21).

Povoljno djelovanje klinčića uglavnom se pripisuje njegovoj aromi i ulju klinčića koje povoljno djeluje na poboljšanje pamćenja i smanjenje respiratornih problema (prehlada, kašalj, astma, bronhitis). Mnoga istraživanja ukazuju da ulje klinčića smanjenjem oksidacijskog stresa može kratkoročno, ali i dugoročno, vratiti nedostatke pamćenja.

Aroma klinčića smanjuje nemir i glavobolju. Koristi se u raznim sredstvima za ispiranje usta, sprejevima za grlo, zubnim pastama te zubnim kremama zbog svog antibakterijskog djelovanja. Zbog prisutnosti flavonoida ulje klinčića ima i izrazita protuupalna svojstva te pomaže u borbi protiv napada mikroba. Klinčić kontrolira razinu glukoze u krvi, stoga je pogodan za dijabetičare, a antikancerogeni potencijal opravdava njegovu upotrebu u liječenju kože i karcinoma pluća (19, 21).

Kao začin u kulinarstvu koristi se za aromatiziranje kolača, čokolade, mesnih proizvoda, peciva, bezalkoholnih pića i kuhanog vina. Često se miješa sa drugim začinima (20, 21). Eterična ulja koriste se u farmaceutskoj industriji i proizvodnji kozmetike, sapuna, parfema te insekticida (25).

1.4.LOVOR (*Laurus nobilis* L.)

Lovor je mediteranska biljka iz porodica Laureaceae. Raste u obliku grmova ili drveća tvoreći široku i gustu krošnju (26, 27). Široko je rasprostranjeno drvo na Mediteranskom području i u Europi. Uzgaja se kao ukrasna biljka diljem Europe i Amerike, a prvenstveno kao visoko vrijedna začinska kultura zbog svog aromatičnog lišća (28, 29). Može narasti od 10 do 18 m. Listovi su vazdazeleni, kožasti, duguljasti i zašiljeni. U ljekovite i začinske svrhe koriste se listovi i bobice (2).

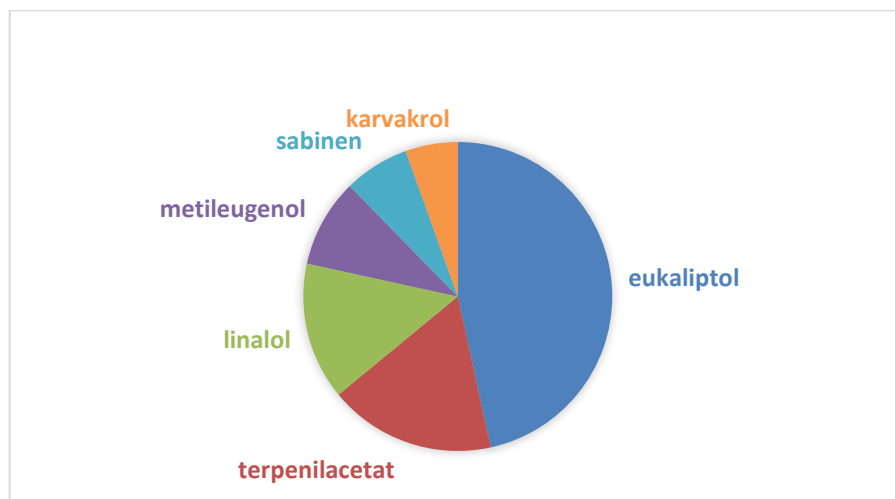


Slika 9. Lovorov list (30)

Eterično ulje dobiveno iz listova lovora i sami listovi koriste se u prehrambenoj industriji kao začini (26). Koriste se i u prirodnoj medicini za tretiranje epilepsije te u narodnim lijekovima za liječenje raznih želučanih bolesti i drugih zdravstvenih problema kao što su dermatitis i reumatizam (26, 28, 29).

1.4.1. Kemijski profil lovora

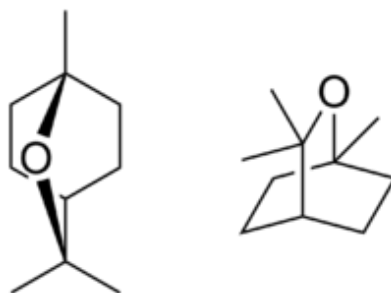
Analize pokazuju prisutnost spojeva hlapljivih i nehlapljivih ulja, alkohola, alkaloida, minerala, vitamina, tanina i flavonoida (29). List s glavnom sastavnicom 1,8-cineolom, monoterpenolima i manjom količinom aktivnih seskviterpenskih laktone, sadrži 1-3% eteričnog ulja. Plod sadrži 30-40% masti i ulja, šećera i škroba te 1% eteričnog ulja (31).



Slika 10. Glavne komponente eteričnog ulja lovora (32)

1.4.2. Biološka aktivnost lovora

Lovor, kao bogat izvor prirodnih antimikrobnih spojeva i antioksidansa, pokazuje antioksidativna i antimikrobna svojstva, a listovi i bobice koriste se protiv reumatizma, kožnih osipa i želučanih bolesti (33, 34). Također, suho lišće i eterično ulje dobiveno iz listova lovora predstavlja dragocjen začim u kulinarstvu (34). Glavne komponente eteričnog ulja odgovorne za antioksidacijsko i antibakterijsko djelovanje su 1,8-cineol, linalol, karvakrol, terpenil acetat, metil eugenol i sabinen (32).



Slika 11. Strukturna formula 1,8-cineola (35)

1.5.MASLINA (*Olea europaea* L.)

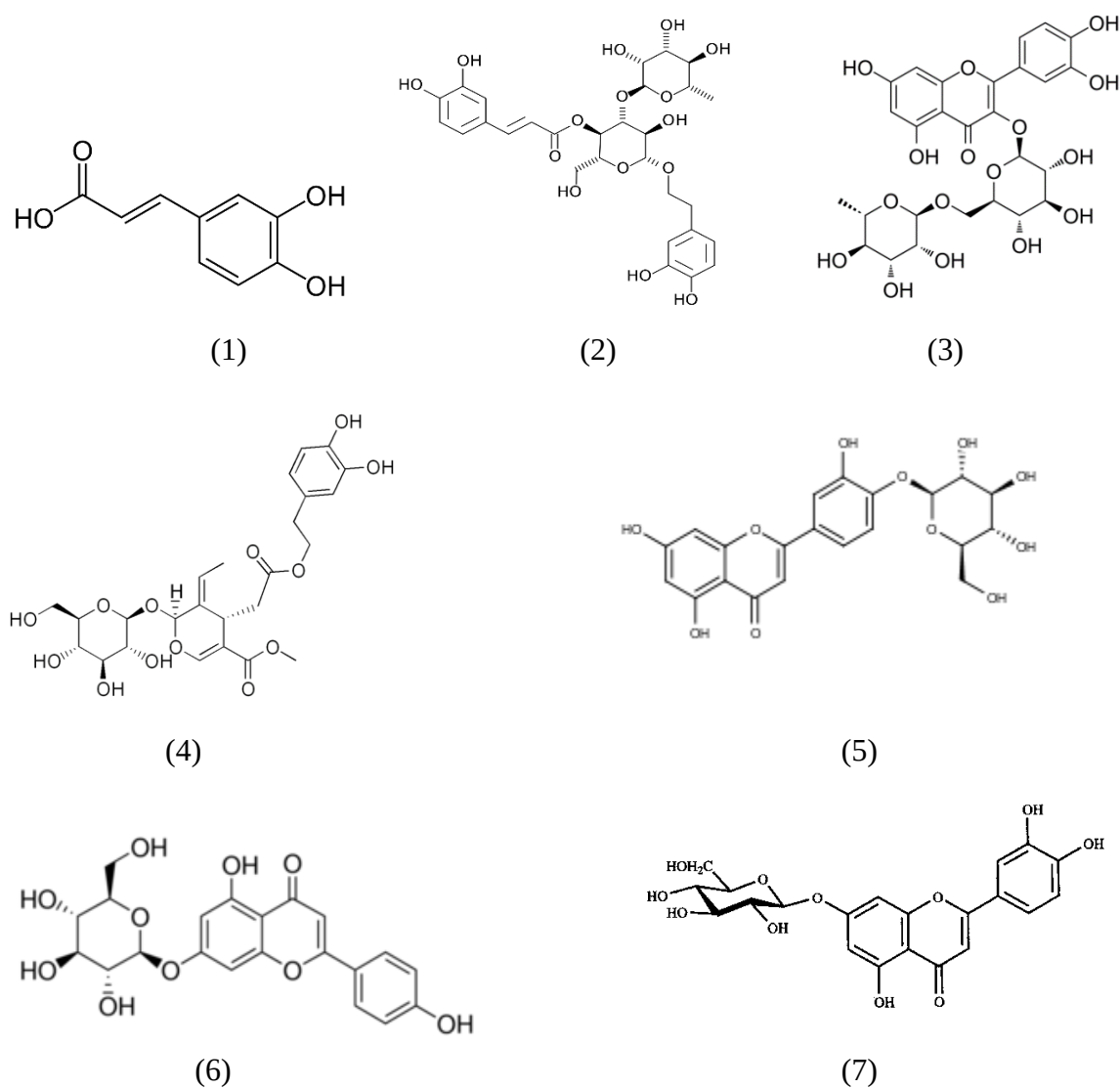
Maslina botanički pripada porodici Oleaceae. Stablo nepravilnog oblika, koje može narasti do visine od 10 m, sadrži mnoštvo kvrga i lišća eliptičnog izgleda, svijetlo ili tamnozeleno boje. Ova zimzelena suptropska biljka najviše je rasprostranjena u zemljama Mediterana (oko 95%). Danas se u svijetu uzgaja više od 800 000 000 stabala maslina, od kojih velika većina služi za proizvodnju maslinovog ulja. Plod masline i ulje koje se od njega dobiva važni su sastojci u svakodnevnoj prehrani velikog dijela svjetske populacije. Zemlje Mediterana, od kojih su na prvom mjestu Španjolska i Italija, njegovi su najveći proizvođači. Postoji veliki broj sorti maslina, a neke od najpoznatijih na našim područjima su: Oblica, Drobница, Lastovka, Levantinka, Buža, Istarska bjelica, Crnica, itd. (36).



Slika 12. Masline (37)

1.5.1. Kemijski profil masline

Otkriven je širok spektar fenolnih spojeva prilikom analize vodenog ekstrakta lista masline. Identificirano je sedam fenolnih spojeva: kava kiselina, verbaskozid, oleuropein, luteolin 7-*O*-glukozid, rutin, apigenin 7-*O*-glukozid i luteolin 4'-*O*-glukozid (Slika 13.) (38).



Slika 13. Kemijske strukture identificiranih fenolnih spojeva: (1) kava kiselina; (2) verbaskozid; (3) rutin; (4) oleuropein; (5) luteolin 4'-*O*-glukozid; (6) apigenin 7-*O*-glukozid; (7) luteolin 7-*O*-glukozid (39 - 45).

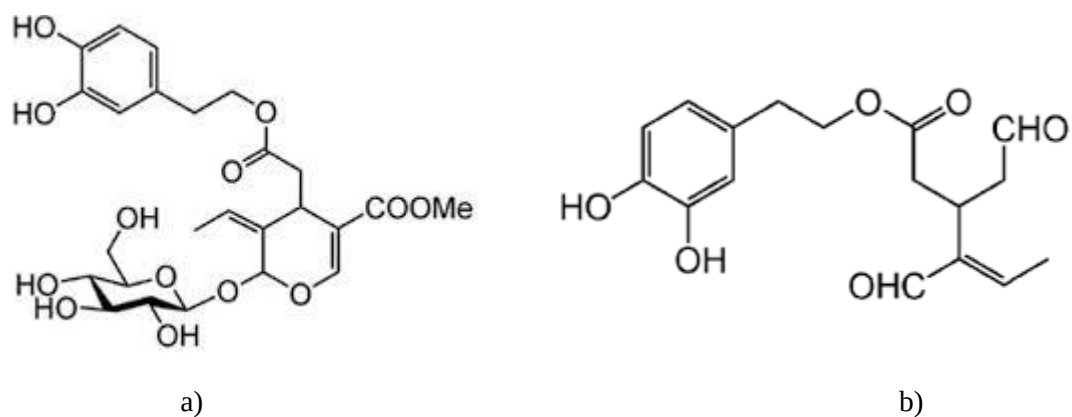
Kvantifikacija fenola prisutnih u vodenom ekstraktu otkrila je veliku količinu ovih spojeva, koja je bila znatno veća od prethodno pronađenih vrijednosti za hidrometanolne ekstrakte iste i drugih sorti maslinovog lista. Za razliku od onoga što se dogodilo s hidrometanolnim ekstraktima u kojima su glavnu ulogu imali flavonoidni spojevi, vodeni ekstrakt pokazao je profil u kojem je spoj oleuropein bio prisutan u najvećoj količini, čak 73% od ukupno identificiranih spojeva (tablica 4). Kava kiselina činila je oko 1% od ukupnih identificiranih fenola (46).

Tablica 4. Kvantifikacija fenolnih spojeva u liofiliziranom ekstraktu lista masline (46)

Spoj	mg/kg
Kava kiselina	220,5 ± 23,3
Verbaskozid	966,1 ± 18,1
Oleuropein	26471,4 ± 1760,2
Luteolin 7- <i>O</i> -glukozid	4208,9 ± 97,8
Rutin	495,9 ± 12,2
Apigenin 7- <i>O</i> -glukozid	2333,1 ± 74,7
Luteolin 4'- <i>O</i> -glukozid	1355,9 ± 75,9

1.5.2. Biološka aktivnost masline

U listu masline nalaze se vrlo važni sekoiridoidni spojevi: oleacein, odgovoran za hipotenzivno djelovanje i oleuropein, odgovoran za hipoglikemijsku aktivnost. Nekoliko radova je pokazalo da ekstrakt lišća masline ima sposobnost snižavanja krvnog tlaka kod životinja. Također povećava protok krvi u koronarnim arterijama, ublažava aritmiju i sprječava grčeve crijevnih mišića. Lišće se može koristiti i u infuzijama, dopuštajući znatan unos bioaktivnih spojeva. Znanstvene studije koje opisuju antimikrobna svojstva fenolnih spojeva u proizvodima od maslina odnose se na spojeve dobivene iz ploda masline, posebno hidroksitirozol i oleuropein (38).



Slika 14. Kemijska struktura: a) oleuropeina i b) oleacina (47)

1.6. RUŽMARIN (*Rosmarinus officinalis* L.)

Ružmarin je višegodišnja zimzelena ljekovita biljka iz porodice Lamiaceae podrijetlom iz mediteranske regije. Ime *rosmarinus* potječe od latinskog *ros* što znači rosa i *marinus* što znači more, odnosno "morska rosa" (48).

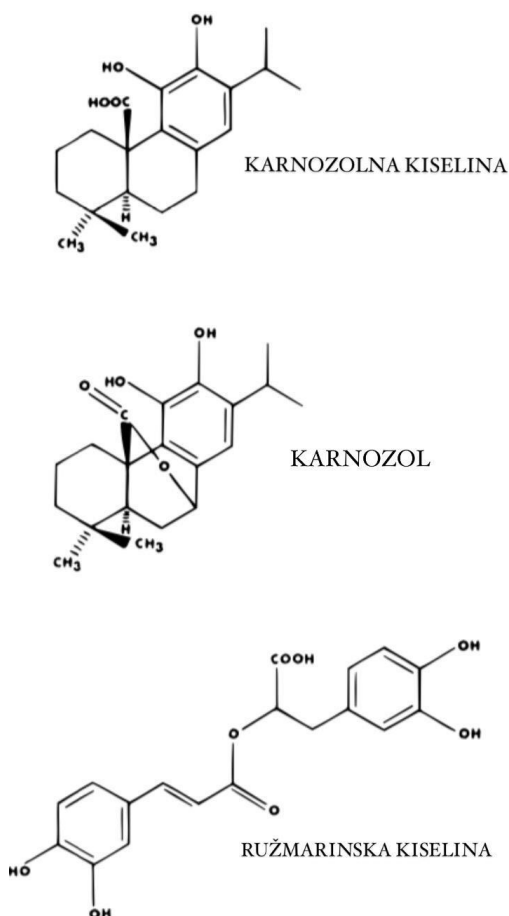


Slika 15. Ružmarin (49)

Obično je 1-2 metra visok, a uzgaja se diljem svijeta na tlu bogatom kalcijem. To je aromatična i grmolika biljka s mirisnim igličastim listovima pikantnog, ljutog i gorkog okusa. Grane su crvenkaste, gusto obrasle igličastim i kožastim listovima. U "pazusima" listova formiraju se ljubičasto-plavi cvjetovi. Najčešće se koristi u obliku eteričnog ulja ili sušenom obliku (6, 50, 51, 52).

1.6.1. *Kemijski profil ružmarina*

Najzastupljeniji fenolni spojevi u ružmarinu su fenolne kiseline (kava, ružmarinska i klorogenska kiselina), sufavonoidi (homoplantagin, genkvanin i cirsimaritin) te fenolni diterpeni (karnozol, ružmarinska i karnozolna kiselina) (31).



Slika 16. Strukturne formule najznačajnijih spojeva u ružmarinu (i kadulji) (53)

Tablica 5. Nutritivne vrijednosti svježeg ružmarina na 100 g uzorka (12)

Nutrijent	Količina
Energetska vrijednost (kcal)	131,00
Proteini (g)	3,31
Ugljikohidrati (g)	20,70
Mati (g)	5,86
Vlakna (g)	14,10
Voda (g)	67,77
Mononezasićene masne kiseline (g)	1,16
Polinezasićene masne kiseline (g)	0,90
Vitamini (mg)	25,03
Minerali (g)	1,18

1.6.2. Biološka aktivnost ružmarina

Zbog svojih terapijskih, protuupalnih i antioksidacijskih svojstava koristi se u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji te narodnoj medicini kod bolesti bubrega, jetre, srca, reume te u liječenju upalnih bolesti. Ružmarin poboljšava cirkulaciju i koncentraciju na način da potiče tok krvi prema mozgu (48, 51.). Svjež ili osušen ružmarin našao je veliku primjenu i u prehrambenoj industriji. List se dodaje raznim vrstama jela kao začim zbog poboljšanja organoleptičkih svojstava (48, 54). Koristi se i kao prirodni konzervans u hrani te u industriji kozmetike i farmacije, najčešće u proizvodnji parfema i sapuna. Dodaje se u kozmetičke preparate poput šampona ili regeneratora u svrhu jačanja korijena kose (48, 50).

Tablica 6. Biološke aktivnosti i mehanizmi djelovanja ekstrakta ružmarina (53)

Biološka aktivnost	Mehanizmi djelovanja
Protuupalna aktivnost	Karnozolna kiselina inhibira NO. Karnozol smanjuje atopijski dermatitis. Ekstrakt ružmarina pokazao je protuupalno djelovanje slično indometacinu.
Rak kože	Ekstrakt ružmarina povećava razdoblje latencije i smanjuje broj, promjer, težinu i učestalost tumora. Karnozolna kiselina pokazala je zaštitni učinak protiv melanoma.
Zarastanje rane	Krema od ružmarina ubrzala je zacjeljivanje rana. Ulje ružmarina ubrzalo je zarastanje rana kod dijabetičara i ne dijabetičara.
Transdermalni učinci	Monoterpeni prisutni u ulju ružmarina potiču kožnu apsorpciju.
Protugljivična aktivnost	Ekstrakt ružmarina inhibira rast gljivica.
Ginoidna lipodistrofija (celulitis)	Krema s karnozolnom kiselinom bila je odgovorna za poboljšanje izgleda celulitisa.
Alopecija	Ekstrakt ružmarina potiče rast kose.
Protiv starenja	Nano čestice esencijalnog ulja ružmarina pokazale su veću sposobnost hidrataciju i poboljšavaju elastičnost kože.
Zaštita od ultraljubičastog zračenja	Ekstrakt ružmarina smanjio je oštećenje kože uzrokovano suncem.

Značajno se ističe zbog protuupalnog, antimikrobnog, antitumorskog, antioksidacijskog, protugljivičnog te zaštitnog i inhibicijskog djelovanja (50, 51). Općenito, biološka aktivnost ružmarina javlja se zbog prisutnosti antioksidansa, točnije flavonoida, fenolne kiseline i fenolnih diterpena (50). Kao i kod kadulje fenolni sastojci koji se posebno ističu su karnozol, karnozolna kiselina i ružmarinska kiselina (slika 16.) (56). Ekstrakt ružmarina ima jako antioksidacijsko djelovanje protiv bakterija, posebno protiv Gram-pozitivnih bakterija i *C. jejuni*. Također, odlično djeluje protiv gljivica roda *Candida* (56).

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1.MATERIJAL

U eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada korišteni su prethodno pripremljeni vodeni ekstrakti ljekovitog bilja: kadulje, klinčića, lovora, masline i ružmarina. Vodeni ekstrakti (15 g/100 mL) su pripremljeni korištenjem ultrazvučne kupelji (2 h, 60 °C). Po završetku ekstrakcije uzorci su filtrirani preko filter papira i čuvani u hladnjaku do trenutka analize.

2.2.UREĐAJI I KEMIČALIJE

Od uređaja u eksperimentalnom dijelu diplomskog rada korišteni su:

- Tecan MicroPlates Reader, model Sunrise, *Tecan Group Ltd, Mannedorf, Švicarska*
- Tecan BioTek, model: Synergy HTX, Inc., Winooski, VT
- Analitička vaga, *Kern, Model ALS 120-4, Kingston, Ujedinjeno Kraljevstvo*
- Mikrotitrarske pločice, nesterilne, *Sarsted, Njemačka*

Korišteni reagensi i otapala u radu su:

- natrijev fosfat dihidrat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (*Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, SAD*)
- dinatrijev hidrogenfosfat, Na_2HPO_4 (*Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, SAD*)
- fluorescein (*Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany*)
- AAPH, 2,2 - azobis (2 - metilpropionamid) – dihidroklorid (*Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, SAD*)
- trolox, (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksilna kiselina) $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$, $M_r=250,29$ g/mol, 97% čistoće (*Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka*)
- natrijev acetat, $\text{CH}_3\text{COONa} \times \text{H}_2\text{O}$ (*Alkaloid AD-Skopje, Skopje, Makedonija*)
- glacijalna octena kiselina, $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (*Alkaloid AD-Skopje, Skopje, Makedonija*)

- klorovodična kiselina, 37% (*Panreac, Barcelona, Španjolska*)
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) $C_{18}H_{12}N_6$ (*Fluka, Sigma-Aldrich, Njemačka*)
- željezo (III) klorid, $FeCl_3$ (*Kemika, Zagreb, Hrvatska*)
- etanol p.a. (*Alkaloid AD-Skopje, Skopje, Makedonija*)
- DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, free radical) $C_{18}H_{22}N_5O_6$ (*Sigma-Aldrich, Steinhem, Njemačka*)

2.3.METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

Za određivanje antioksidacijskih svojstava ljekovitog bilja u radu su korištene tri različite spektrofotometrijske metode: FRAP, DPPH i ORAC metoda.

2.3.1. FRAP metoda (*engl. Ferric-Reducing Antioxidant Power*)

FRAP metoda se prvenstveno razvila za mjerenje reduksijske snage krvne plazme, ali se naknadno prilagodila pa se danas učestalo koristi za ispitivanje antioksidansa. Temelji se na sposobnosti antioksidansa da reduciraju žuti feril-tripiridil-s-triazin kompleks ($Fe(III)$ –TPTZ) u plavi željezni kompleks ($Fe(II)$ –TPTZ) djelovanjem antioksidansa. FRAP metoda se izvodi pri kiselom pH ($pH=3,6$). Rezultati FRAP-a mogu varirati ovisno o ispitivanom uzorku i duljini trajanja analize, pa se metoda može provoditi u kratkim vremenskim intervalima (npr. 4 minute) ili u slučaju nekih polifenola koji reagiraju sporije pa zahtijevaju dulje vrijeme reakcije i do 30 minuta (57).

Reagensi:

- Acetatni pufer, $c(C_2H_3NaO_2 \times 3H_2O) = 300 \text{ mmol/L}$, $pH 3,6$
- Otopina klorovodične kiseline, $c(HCl) = 40 \text{ mmol/L}$
- Otopina 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) u 40 mmol/L HCl , $c(C_{18}H_{12}N_6) = 10 \text{ mmol/L}$
- Otopina $FeCl_3$ $c(Fe^{3+}) = 20 \text{ mmol/L}$

- FRAP reagens se priprema miješanjem 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL otopine TPTZ i 2,5 mL otopine FeCl₃

Postupak određivanja:

U mikrotitarsku pločicu se otpipetira 300 μ L svježe pripravljene otopine FRAP reagensa i očita mu se absorbancija pri 595 nm. Potom se u reagens doda 10 μ L uzorka i prati se promjena absorbancije nakon 4 minute. Promjena absorbancije, izračunava se kao razlika konačne vrijednosti absorbancije reakcijske smjese nakon 4 minute i absorbancije FRAP reagensa prije dodatka uzorka, te se uspoređuje s vrijednostima dobivenim za otopinu standarda. Kao standard korišten je sintetski antioksidans (analog vitamina E topiv u vodi) pod nazivom Trolox, a rezultati su izraženi kao μ M Trolox ekvivalenti (TE). Sva mjerenja izvršena su u 3 ponavljanja, a rezultati prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD).

2.3.2. DPPH metoda (engl. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay)

DPPH metoda ili metoda gašenja slobodnih DPPH radikala (2,2,-difenil-1-pikrilhidrazil) u pravilu je nezaobilazna kod određivanja antioksidacijske aktivnosti čistih spojeva i/ili biljnih ekstrakata. Ljubičasto obojani radikal DPPH $\cdot$ jedan je od rijetkih stabilnih i komercijalno dostupnih organskih dušikovih radikala. Reakcija DPPH radikala sa antioksidansom (A), temelji se na redukciji DPPH radikala kojemu se donira atom vodika i tako nastaje DPPHH i radikal antioksidansa (A $\cdot$). Sposobnost hvatanja slobodnih radikala izračunava se preko postotka preostalog DPPH $\cdot$ koji je proporcionalan koncentraciji antioksidansa. Napredovanje reakcije se prati spektrofotometrom, a posljedica gašenja DPPH radikala je promjena boje iz ljubičaste u žutu boju (58).

Reagensi

- Otopina DPPH radikala, $c=0,04$ mg/mL
- Radni DPPH pripravlja se razrjeđivanjem otopine DPPH radikala etanolom, sve dok se ne postigne absorbancija otopine 1,2 ($\pm 0,002$) pri 492 nm i to neposredno prije mjerenja.

Postupak određivanja

U mikrotitrarske pločice otpipetira se volumen od 290 μ L radne otopine DPPH radikala i očita se absorbancija prije dodatka uzorka. Nakon toga, u otopinu DPPH radikala se doda 10 μ L uzorka prethodno razrijeđenoj 1:10 s destiliranom vodom. Promjena absorbancije pri 492 nm očita se nakon jednog sata. Sve analize, odnosno mjerenja izvršena su u 3 ponavljanja, a rezultati su iskazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD. Antioksidacijski kapacitet, odnosno % inhibicije DPPH radikala računa se prema izrazu:

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

gdje je: $A_{C(0)}$ – absorbancija kontrole (otopina DPPH radikala) kod $t = 0$ minuta;

$A_{A(t)}$ – absorbancija reakcijske smjese nakon 1 h.

2.3.3. ORAC metoda (engl. Oxygen Radical Absorbing Capacity)

Za razliku od FRAP metode koja pripada skupini ET metoda (engl. *Electron transfer*) koji se temelje na prijenosu elektrona, ORAC metoda (kao i DPPH metoda) se temelji na prijenosu vodika i pripada skupini HAT metoda (engl. *Hydrogen atom transfer*). To je metoda koja mjeri stupanj inhibicije peroksil radikala ($R^{\bullet}O_2$) koji reagira sa fluorescentnom probom kako bi se formirao ne-fluorescentni produkt. ORAC test reakciju prati kroz dulji vremenski period, najmanje 30 minuta. Površina ispod krivulje mjerenja intenziteta fluorescencije predstavlja ukupni antioksidacijski učinak, a kao standardna otopina korišten je Trolox (59, 60).

Reagensi

- Fosfatni pufer, pH=7, c=0,2 M
- Fosfatni pufer, pH=7,4, c=0,075 M
- Fluorescein: Stock otopina (c=4,2 mM)
- Radna otopina fluoresceina (c=0,8 μ M)
- AAPH: 0,207 g AAPH otopi se u 5 ml 0,075 M pufera. Svaki dan se priprema svježi reagens, do mjerenja se čuva u ledenoj kupelji i stabilan je 8 h
- Otopina standarda – Trolox: c=5-50 μ M

Postupak određivanja

U svaku rupicu mikrotitarske pločice doda se 150 μ L fluoresceina i 25 μ L uzorka. Uzorak predstavljaju 0,075 M fosfatni pufer za slijepu probu (blank), otopina standarda Trolox-a za izradu baždarne krivulje i uzorci ekstrakata začinskog bilja (pri odgovarajućem razrjeđenju). Tako pripremljene otopine se termostatiraju 30 minuta pri 37 °C. Potom se dodaje 25 μ L AAPH, te se svake minute mjeri promjena intenziteta fluorescencije pri $\lambda_{\text{eks}} = 485$ nm i $\lambda_{\text{em}} = 520$ nm. Sva mjerenja su izvršena u 3 ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD.

3. REZULTATI I RASPRAVA

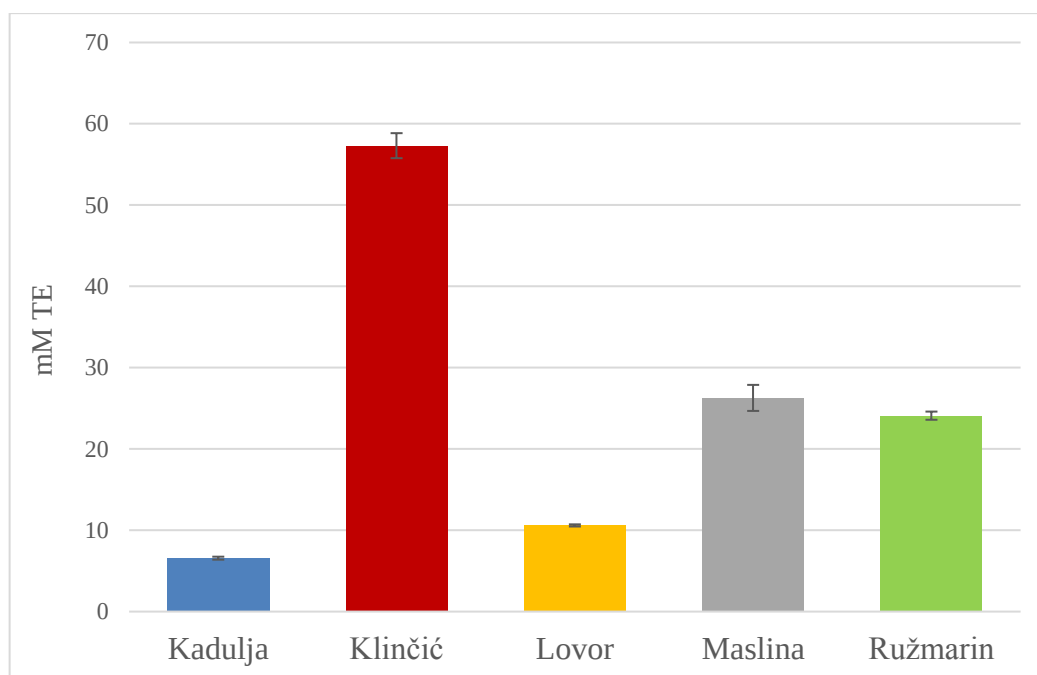
Danas postoji veliki broj metoda kojima se određuje antioksidacijski kapacitet uzoraka, pa tako i biljnih ekstrakata. Budući da svaka metoda posjeduje drugačiji mehanizam djelovanja, vrlo često se antioksidacijska aktivnost testiranih uzoraka određuje korištenjem više različitih metoda.

U cilju određivanja antioksidacijske aktivnosti vodenih ekstrakata ljekovitog bilja, u ovom radu korištene su metode koje se temelje na prijenosu atoma vodika (engl. *Hydrogen Atom Transfer, HAT*) i metode temeljene na prijenosu elektrona (engl. *Elektron Transfer, ET*). FRAP metoda korištena u radu pripada skupini ET metoda dok ORAC i DPPH metoda pripadaju skupini HAT.

Rezultati ispitivanja antioksidacijske aktivnosti prikazani su na slikama 17, 18 i 19.

3.1. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM

Redukcijska sposobnost ispitivanog ljekovitog bilja određena FRAP metodom prikazana je na slici 17. Usporedbom FRAP vrijednosti može se uočiti da je najbolju antioksidacijsku aktivnost imao ekstrakt klinčića s FRAP vrijednosti 57,31 mM TE. Zanimljivo je uočiti kako postoji iznimno velika razlika u antioksidacijskoj aktivnosti između ekstrakta klinčića i ostalih ispitivanih ekstrakata ljekovitog bilja, posebno lovora (FRAP vrijednost 10,60 mM TE) i kadulje koja je ujedno pokazala i najmanju antioksidacijsku aktivnost (FRAP vrijednost 6,57 mM TE). Ekstrakti masline (FRAP vrijednost 26,28 mM TE) i ružmarina (FRAP vrijednost 24,10 mM TE) također su pokazali izvrsnu redukcijsku sposobnost.



Slika 17. Usporedni prikaz rezultata redukcijske sposobnosti ekstrakata ljekovitog bilja određene FRAP metodom

Usporedbom sadržaja ukupnih fenola s dobivenim FRAP vrijednostima, može se uočiti izvrsnu korelaciju između dobivenih rezultata. U završnom radu Rašić (2019) ekstrakt klinčića je istaknut s najvećim sadržajem ukupnih fenola (6231 mg GAE/L) u odnosu na druge testirane ekstrakte (2,4 puta više fenola u odnosu na ružmarin; oko 3 puta više fenola u odnosu na kadulju, lovor i maslinu). Kadulja s najmanjim udjelom ukupnih fenola (1917 mg GAE/L) dala je najslabiju redukcijsku sposobnost (61).

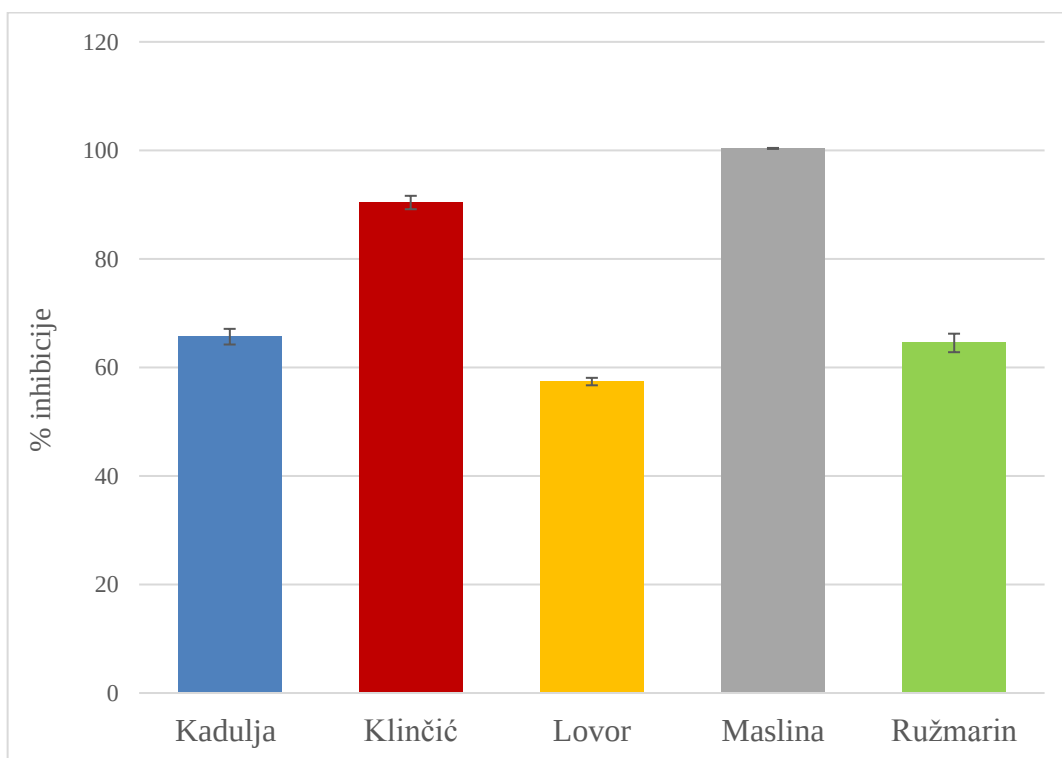
Hossain i sur. (2008) u svom znanstvenom radu ispitivali su antioksidacijsko djelovanje različitih biljnih ekstrakata. Prema dobivenim rezultatima klinčić je imao najveću antioksidacijsku aktivnost izmjerenu FRAP metodom (61,63 μ M TE). Antioksidacijska aktivnost ružmarina, odnosno FRAP vrijednost iznosila je 14,54 μ M TE, a kadulja 14,28 μ M TE. Snažno antioksidacijsko djelovanje klinčića potonji autori pripisuju sposobnosti doniranja vodika i uklanjanja slobodnih radikala. Općenito začini i bilje koje pripadaju porodicama Myrtaceae (klinčić), Lauraceae (lovor) i Lamiaceae (ružmarin, kadulja) imali su vrlo visoke FRAP vrijednosti. (62).

Dudonné i sur (2009) osim što u svom znanstvenom radu prikazuju rezultate koji opravdavaju snažna antioksidacijska svojstva vodenog ekstrakta klinčića, dokazali su da

sadrži i visok sadržaj fenola (oko 200 mg GAE/g). Dakle, dokazana je veza između ukupnog sadržaja fenola i antioksidacijske aktivnosti što ukazuje na to da su glavni čimbenici antioksidacijskih svojstava ovih biljaka fenolni spojevi (63).

3.2.REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM

Antioksidacijski kapacitet testiran DPPH metodom određen je nakon 1 h i dobiveni rezultati su prikazani na slici 18.



Slika 18. Usporedni prikaz rezultata antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata ljekovitog bilja određenog DPPH metodom

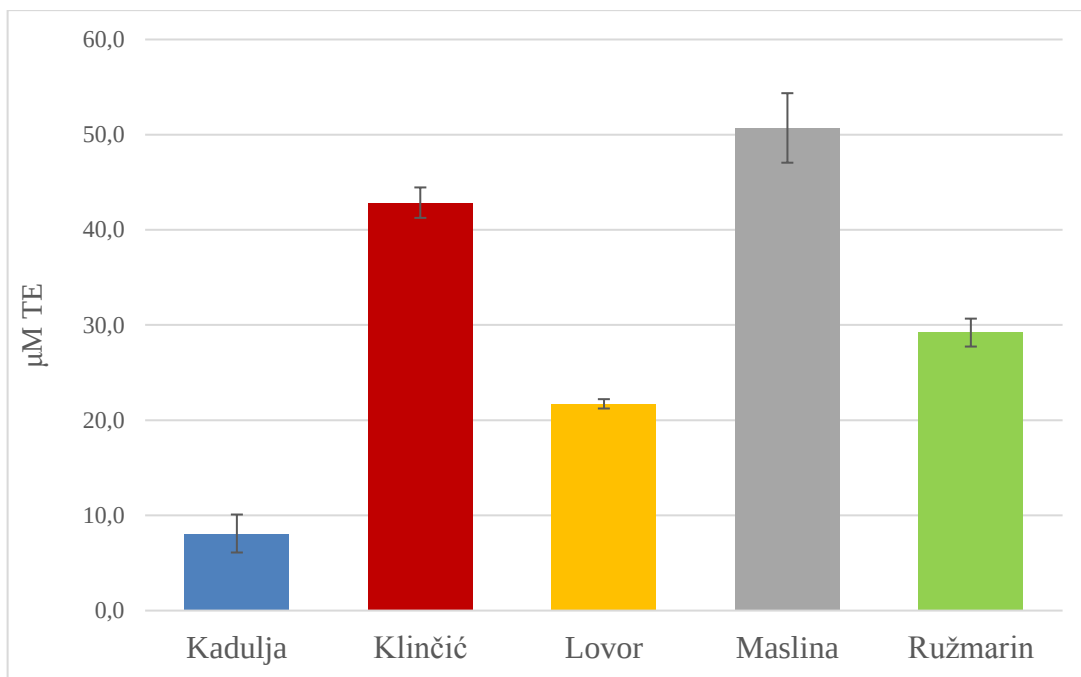
Rezultati antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom ukazuju na izuzetno dobru redukcijsku sposobnost svih testiranih ekstrakata ljekovitog bilja. U slučaju ekstrakta masline inhibicija DPPH radikala iznosila je 100 %, dok je klinčića koji je FRAP metodom pokazao najbolju aktivnost, ovom metodom postigao % inhibicije od 90,4 %. Kadulja s najmanjim udjelom ukupnih fenola i najslabijom redukcijskom snagom, pokazala se kao izvrstan *hvatač* slobodnih radikala (% inhibicije iznosio je 66 %). Ekstrakt ružmarina i lovora reducirali su više od 50 % slobodnih DPPH radikala što ukazuje da i ovi ekstrakti imaju snažan antioksidacijski kapacitet.

Pereira i Tavano (2014) uporabom DPPH metode ispitivali su antioksidacijsku aktivnost bilja i povrća, između ostalog i lovora koji je pokazao iznimno snažan antioksidacijski kapacitet (90,03 % inhibicije). Također, istraživanje je pokazalo da u odnosu na drugo ispitivano bilje i začine sadrži najveći sadržaj ukupnih fenola (12,03 mg GAE/g) (64).

3.3.REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI ORAC METODOM

Rezultati antioksidacijske aktivnosti ekstrakata ljekovitog bilja dobiveni ORAC metodom pri razrjeđenju 1:2000 prikazani su na slici 20.

Usporedbom rezultata dobivenih ORAC i DPPH metodom mogu se uočiti sličnosti u antioksidacijskoj aktivnosti među ekstraktima ljekovitog bilja. Sličnosti u aktivnosti bile su očekivane, obzirom da se ove dvije metode temelje na istom mehanizmu djelovanja, odnosno na prijenosu atoma vodika (HAT). Najbolji kapacitet ili sposobnost da neutralizira slobodne radikale (peroksil radikale) pokazao je ekstrakt lista masline (50,7 $\mu\text{M TE}$) a slijedio ga je ekstrakt klinčića (42,9 $\mu\text{M TE}$). Ekstrakt kadulje pokazao je najnižu ORAC vrijednost (8,10 $\mu\text{M TE}$), odnosno najslabiju antioksidacijsku aktivnost, kao i kod FRAP metode. Nešto slabiju antioksidacijsku aktivnost od ekstrakta masline, a gotovo dvostruko slabiju u odnosu na ekstrakt klinčića, imali su ekstrakt lovora (ORAC vrijednosti iznosila je 21,7 μM) i ružmarina (ORAC vrijednost iznosila je 29,2 $\mu\text{M TE}$).



Slika 19. Usporedni prikaz ORAC vrijednosti ekstrakata ljekovitog bilja pri razrjeđenju 1:2000

Ninfali i sur. (2005) istražili su i usporedili antioksidacijsku aktivnost povrća, začinskog i ljekovitog bilja, uključujući ružmarin i kadulju. Od ispitivanih biljnih ekstrakata, među onima sa najvećom koncentracijom fenola i najvećom ORAC vrijednosti našli su se ekstrakti kadulje (32004 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$) i ružmarina (290,3 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$) (65). Rezultati ukazuju na višestruko veće (110 puta veće) ORAC vrijednosti kadulje u odnosu na ružmarin što nije bio slučaj u ovom radu.

4. ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenih istraživanja i prezentiranih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- FRAP metodom ekstrakt klinčića je pokazao najveću, a ekstrakt kadulje najslabiju redukcijsku sposobnost.
- Rezultati antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom ukazuju na izuzetno dobru redukcijsku sposobnost svih testiranih ekstrakata ljekovitog bilja.
- Potpunu inhibiciju slobodnog sintetskog DPPH radikala uradio je ekstrakt masline, dok je ekstrakta lovora pokazao najslabiji antioksidacijski kapacitet.
- ORAC metodom ekstrakt masline imao je najveću antioksidacijsku aktivnost, dok je ekstrakt kadulje pokazuje najslabiju sposobnost neutralizacije peroksil radikala.
- Obzirom na udio ukupnih fenola i antioksidacijski potencijal, određen FRAP, DPPH i ORAC metodom, može se zaključiti da se ekstrakt klinčića pokazao kao najbolji, no i ostali testirani ekstrakti pokazuju izniman antioksidacijski potencijal i mogućnost primjene u prehrambenoj industriji kao zamjena za sintetske aditive.

5. LITERATURA

1. Ibraković V. Uzgoj ljekovitog, začinskog i aromatičnog bilja. Slavonski Brod, Hrvatska; 2019.
2. Mihailović I. Proizvodnja i prerada ljekovitog i aromatičnog bilja. Ustanova za cjeloživotno učenje Magistra. Pula, Hrvatska.
3. Ingab AN. Medicinal & Aromatic Plants. Med. Aromat. Plants. 2012;1(2):1-2. doi: <http://dx.doi.org/10.4172/map.1000e109>
4. Kooti W, Moradi M, Aliakbari S, Sharafi-Ahvazi N, Asadi-Samani A, Ashtary-Larky D. Therapeutic and pharmacological potential of *Foeniculum vulgare* Mill: a review. J. HerbMed Pharmacol. 2015;4(1):1-9.
5. Ekološka udruga Krka-Knin. Priručnik o sakupljanju ljekovitog bilja. Knin, Hrvatska; 2015.
6. Pašić S, Delalić E. Priručnik za skupljače ljekovitog i aromatskog bilja, šumskih plodova i bilja. Sarajevo; 2001.
7. URL: <https://www.plantea.com.hr/ljekovita-kadulja/> (PRISTUPLJENO 2.9.2020.)
8. URL: <http://www.zosradio.ba/contents/16357> (PRISTUPLJENO 2.9.2020.)
9. Veličković DT, Randjelović NV, Ristić MS, Veličković AS, Šmelcerović AA. Chemical constituents and antimicrobial activity of the ethanol extracts obtained from the flower, leaf and stem of *Slavia officinalis* L. J. Serb. Chem. Soc. 2003;68(1):17-24. doi:10.2298/JSC0301017V
10. Russo A, Formisano C, Rigano D, Senatore F, Delfine S, Cardile V, *et al.* Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grow in different environmental conditions. Food Chem. Toxicol. 2013;55:42-47. doi:10.1016/j.fct.2012.12.036
11. URL: <https://www.pijanitvor.com/threads/tanini-saponini-glikozidi-gorke-tvari.25855/page-2> (PRISTUPLJENO 2.9.2020.)
12. URL: <https://data.nal.usda.gov/dataset/usda-national-nutrient-database-standard-reference-legacy-release> (PRISTUPLJENO 2.9.2020.)
13. Ahl HS, Hussein MS, Gendy ASH, Tkachenko KG. Quality of Sage (*Salvia officinalis* L.) Essential Oil Grow in Egypt. Int. J. Plant Res. 2015;1(4):119-123.

14. Jasicka-Misiak I, Poliwoda A, Petecka M, Busolovych O, Shlyapnikov VA, Wieczorek PP. Antioxidant phenolic compounds in *Salvia officinalis* L. and *Salvia sclarea* L. Ecol. Chem. Eng. S. 2018;25(1):133-142.
doi: <https://doi.org/10.1515/eces-2018-0009>
15. Cuvelier ME, Berset C, Richard H. Antioxidant Constituents in Sage (*Salvia officinalis*). J. Agric. Food Chem. 1994;42:665-669.
doi: <https://doi.org/10.1021/jf00039a012>
16. Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Jovin E. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Roemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. J. Agric. Food Chem. 2007;55:7879-7885.
doi: 10.1021/jf0715323
17. Sellami IH, Rebey JS, Rahali FZ, Limam F, Marzouk B. Drying Sage (*Salvia officinalis* L.) Plant and Its Effect on Content, Chemical Composition, and Radical Scavenging Activity of the Essential Oil. Food Bioprocess Tech. 2012;5:2978-2989. doi: 10.1007/s11947-011-0661-0
18. Jurić V. Određivanje hlapljivih spojeva i ukupnih fenola iz ružmarina, kadulje, origana i timijana nakon postupka liofilizacije i sušenja sprejem [Završni rad]. Split, Hrvatska: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2018.
19. Cortes-Rojas DF, de Souza CRF, Oliveira WP. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2014; 4 (2): 90-96.
doi: 10.1016/S2221-1691(14)60215-X
20. Kljajić E. Egzotične drvenaste biljke – Začini [Završni rad]. Zagreb, Hrvatska: Šumarski fakultet; 2014.
21. Hussain S, Rahman R, Mushtaq A, Zerey-Belaskri AE. Clove: A review of a precious species with multiple uses. IJCBS. 2017;11:129-133.
22. URL: <https://www.zdravobiljebg.com/karanfilic-najzdravija-biljka-na-zemlji-prva-na-orac-listi-sa-314-446-jedinica/> (PRISTUPLJENO 3.9.2020.)
23. URL: <https://alternativa-za-vas.com/index.php/clanak/article/klincic> (PRISTUPLJENO 3.9.2020.)

24. Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi AB, Rouabhia M, Mahdouani K, *et al.* The Chemical Composition and Biological Activity of Clove Essential Oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): A Short Review. *Phytother. Res.* 2007;21:501-506. doi: 10.1002/ptr.2124
25. Viduka K. Izolacija i identifikacija spojeva eteričnog ulja klinčića [Završni rad]. Split, Hrvatska: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2018.
26. Vujović T. Utjecaj lovora (*Laurus nobilis* L.) na patogene mikroorganizme iz skupine Oomycetes [Završni rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet; 2018.
27. URL: <https://www.plantea.com.hr/lovor/> (PRISTUPLJENO 3.9.2020.)
28. Dall'Acqua S, Cervellati R, Speroni E, Costa S, Guerra MC, Stella L, *et al.* Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of *Laurus nobilis* L. Leaf Infusion. *J. Med. Food.* 2009;12(4):869-876. doi: 10.1089/jmf.2008.0119
29. Fidan H, Stefanova G, Kostova I, Stankov S, Damyanova S, Stoyanova A, *et al.* Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Laurus nobilis* L. Essential Oils from Bulgaria. *Molecules.* 2019;24,804:1-10. doi: 10.3390/molecules24040804
30. URL: http://crnozlato.eu/trgovina/lovor_list/ (PRISTUPLJENO 3.9.2020)
31. Palić S. Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenolne vrste *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) s područja sjevernog i srednjeg Jadrana [Diplomski rad]. Zagreb, Hrvatska: Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2017.
32. Ramos C, Teixeira B, Batista I, Matos O, Serrano C, Neng NR, *et al.* Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay laurel *Laurus nobilis* Linnaeus (Lauraceae) from Portugal. *Nat. Prod. Res.* 2012;26(6):518-529. doi: <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.531478>
33. Bozan B, Karakaplan U. Antioxidants from laurel (*Laurus nobilis* L.) berries: Influence of extraction procedure on yield and antioxidant activity of extracts. *Acta Aliment.* 2007;36(3):321-328. doi: 10.1556/AAlim.36.2007.3.4

34. Santoyo S, Lloría R, Jaime L, Ibañez E, Señoráns FJ, Reglero G. Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compound from *Laurus nobilis* L. Chemical and functional characterization. Eur Food Res Technol. 2006;222:565-571. doi: 10.1007/s00217-005-0027-9
35. URL: <https://sh.wikipedia.org/wiki/Eukaliptol> (PRISTUPLJENO 4.9.2020.)
36. Barbarić M, Raič A, Karačić A. Priručnik iz maslinarstva. Mostar, 2014.
37. URL: <http://www.kuzinavanje.com/kako-pripremiti-masline-za-jelo/> (PRISTUPLJENO 4.9.2020)
38. Carrasco-Pancorbo A, Cerretani L, Bendini A, Segura-Carretero A, Del Carlo M, Gallina-Toschi T, *et al.* Evaluation of the Antioxidant Capacity of Individual Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. J. Agric. Food Chem. 2005;53(23):2918-8925. doi: <https://doi.org/10.1021/jf0515680>
39. URL: https://bs.wikipedia.org/wiki/Kofeinska_kiselina (PRISTUPLJENO 7.9.2020.)
40. URL: <https://sh.wikipedia.org/wiki/Verbaskozid> (PRISTUPLJENO 7.9.2020.)
41. URL: <https://www.medchemexpress.com/Rutin.html> (PRISTUPLJENO 7.9.2020.)
42. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Oleuropein> (PRISTUPLJENO 7.9.2020.)
43. URL: <https://www.extrasynthese.com/luteolin-4-o-glucoside.html> (PRISTUPLJENO 7.9.2020.)
44. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/44692?lang=en®ion=US> (PRISTUPLJENO 7.9.2020.)
45. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/44692?lang=en®ion=BA> (PRISTUPLJENO 7.9.2020.)
46. Pereira AP, Ferreira I, Marcelino F, Valentino P, Andrade PB, Seabra R, *et al.* Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. Molecules. 2007; 12 (5): 1153-112. doi: <https://doi.org/10.3390/12051153>
47. Matelić I. Biološki učinci oleuropeina [Diplomski rad]. Zagreb, Hrvatska: Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2015.
48. Agroklub. Dostupno na: <https://www.agroklub.com/sortna-lista/ljekovito-bilje/ruzmarin-276/> (PRISTUPLJENO 10.9.2020.)
49. URL: <http://herbalist.blogger.ba/arhiva/2012/03/14/3257099> (PRISTUPLJENO 2.9.2020)

50. De Oliveira JR, Camargo SEA, de Oliveira LD. *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. J. Biomed. Sci. 2019;26:5. doi:10.1186/s12929-019-0499-8
51. De Macedo LM, dos Santos ÉM, Militão L, Tundisi LL, Ataíde JA, Souto EB, *et al.* Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L., syn *Salvia rosmarinus* Spenn.) and Its Topical Applications: A Review. Plants. 2020;9:651. doi: 10.3390/plants9050651
52. Hussain AI, Anwar F, Chatha SAS, Jabbar A, Mahboob S, Nigam PS. *Rosmarinus officinalis* essential oil: Antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. Braz. J. Microbiol. 2010;41:1070-1078. doi: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400027>
53. Frankel EN, Huang SW, Aeschbach R, Prior E. Antioxidant Activity of a Rosemary Extract and Its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion. J. Agric. Food Chem. 1996;44:131-135. doi: <https://doi.org/10.1021/jf950374p>
54. Erjavec F. Inkapsulacija polifenolnog ekstrakta ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) u alginatne nosače s dodatkom kakaovog praha i rogača [Završni rad]. Zagreb, Hrvatska: Prehrambeno-biotehnološki fakultet; 2017.
55. Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Jovin E. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. J. Agric. Food Chem. 2007;55(19):7879-85. doi: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0715323>
56. Abramović H, Terpene P, Generalić I, Skroza D, Klančnik A, Katalinić, *et al.* Antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and vine (*Vitis vinifera*) leaves. Croat. J. Food Sci. Technol. 2012;4(1):1-8.
57. Benzie IFF, Strain JJ. 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 Enzym. 1999;299:15-27. doi: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99005-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5)
58. Von Gadow A, Joubert E, Hunsmann CF. Comparison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Polyphenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*), α -Tocopherol, BHT, and BHA. J. Agric. Food Chem. 1997;45(3):632-638. doi: <https://doi.org/10.1021/jf960281n>

59. Badarinath AV, Mallikarjuna K, Chetty CMS, Ramkanth S, Rajan TVS, Gnanaprakash K. A Review on *In-vitro* Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations. *Int. J. Pharmtech Res.* 2010;2(2):1276-1285.
60. Skroza D. Učinak odabranih fenolnih spojeva na antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost resveratrola u binarnim fenolnim smjesama [Doktorska disertacija]. Zagreb, Hrvatska: Prehrambeno-biotehnološki fakultet; 2015.
61. Rašić TM. Određivanje antimikrobnog učinka začinskog bilja na *Enterococcus faecalis* [Završni rad]. Split, Hrvatska: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2019.
62. Hossain MB, Brunton NP, Barry-Ryan C, Martin-Diana AB, Wilkinson M. Antioxidant activity of spice extract and phenolics in comparison to synthetic antioxidants. *Rasayan J. Chem.* 2008;11(4):751-756.
63. Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon JM. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC Assays. *J. Agric. Food Chem.* 2009;57:1768-1778. doi: 10.1021/jf803011r
64. Pereira MP, Tavano OL. Use of Different Spices as Potential Natural Antioxidant Additives on Cooked Beans (*Phaseolus vulgaris*). Increase of DPPH Radical Scavenging Activity and Total Phenolic Content. *Plant. Foods Hum. Nutr.* 2014;69:337-343. doi: 10.1007/s11130-014-0439-4
65. Ninfali P, Mea G, Giorgini S, Rocchi M, Bacchiocca M. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. *Br. J. Nutr.* 2005;93:257-266. doi: 10.1079/BJN20041327