

## Određivanje količine flavonoida u listovima matičnjaka – *Melissa officinalis* L.

ŽELJAN MALEŠ<sup>1</sup>, KATARINA ŽUNIĆ<sup>2</sup>, VALENTINA SUBAN JAKUŠ<sup>3</sup>, MIRZA BOJIĆ<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zavod za farmaceutsku botaniku, Schrottova 39, 10 000 Zagreb

<sup>2</sup>Studentica 5. godine studija farmacije, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Ante Kovačića 1, 10 000 Zagreb

<sup>3</sup>Suban d.o.o., Galici 8, 10 434 Strmec

<sup>4</sup>Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zavod za farmaceutsku kemiju, Ante Kovačića 1, 10 000 Zagreb

### Determination of the flavonoid content in the leaves of lemon balm – *Melissa officinalis* L.

*A b s t r a c t* – Medicinal properties of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) have been known for centuries in Europe and the wider Mediterranean area. In Croatia, use of lemon balm as a medicinal plant begun under the influence of German monasteries during the Middle Ages. Antidepressant, antidiabetic, cardioprotective and antimicrobial properties have been investigated in numerous studies. Polyphenols, including flavonoids, are considered to be the main components responsible for pharmacological activity. The amount of flavonoids in dried leaves collected from various locations was assessed in this study using the spectrophotometric method by Christ and Müller. The highest flavonoid content of 0.420 % was found in leaves collected from the Pharmaceutical Botanical Garden of Medicinal Plants »Fran Kušan« (2016) while the lowest one of 0.140 % was detected in leaves from Našice (2014).

(<sup>1</sup>University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Pharmaceutical Botany, Schrottova 39, 10 000 Zagreb, Croatia, <sup>2</sup>5<sup>th</sup> year student of pharmacy at University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb, Croatia, <sup>3</sup>Suban d.o.o., Galici 8, 10434 Strmec, Croatia and <sup>4</sup>University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Medicinal Chemistry, A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb, Croatia)

Liječenje biljnim pripravcima izrazito je učestalo, stoga je istraživanje i širenje spoznaja o njima od interesa za javno zdravstvo. Pozadina farmakološkog djelovanja pojedinih biljaka, ovisnost kemijskog sastava o podneblju, sigurnost primjene i mogućnost krivotvorenja u središtu su suvremenih istraživanja.

Ljekovita svojstva matičnjaka stoljećima su poznata u Europi i širem mediteranskom području. Učinci poput antidepresivnog, anksiolitičkog, antidijabetičkog i antimikrobnog istraženi su u brojnim ispitivanjima. Polifenolima, među kojima su i flavonoidi, najčešće se pripisuju antivirusni i neuroprotektivni učinci. Postizanje upravo ovih dvaju djelovanja i danas su najveći izazov farmaceutske znanosti. Virusi često i brzo mutiraju te lako postaju otporni na sintetske antivirusne lijekove. Mentalne bolesti danas su u eksponencijalnom porastu, izrazito su zahtjevne za liječenje te bi idealno bilo spriječiti njihov nastanak razvijanjem lijeka s neuroprotektivnim učincima.

Matičnjak – *Melissa officinalis* L. je u prosjeku 50 cm visoka višegodišnja biljka (slika 1.). Ima uspravnu, razgranjenu, četverbridastu stabljiku. Plodovi su izduženo jajastog oblika. Listovi, koji su oficinalna droga, mogu biti na kraćoj ili duljoj peteljci, a jajolikog su ili obrnuto srcolikog oblika s krupno nazubljenim pilastim rubom. Gornja strana lista tamnije je zelena i slabo dlakava, dok je donja strana lista svjetlije zelena s dlakama na jasno istaknutim provodnim žilama (1, 2).



Slika 1. *Melissa officinalis* L.  
(Farmaceutski botanički vrt »Fran Kušan«)

Matičnjak je mediteranskog podrijetla, a danas je rasprostranjen u svim dijelovima svijeta kao uzgojena ukrasna i medonosna, ali i samonikla biljka. Zbog izrazito razgranatog korijena prilagodljiv je različitim okolišnim uvjetima. Raste dobro na suncu, ali i u djelomičnom hladu, najbolje na vapnenačkom tlu koje ima pH od 5 do 7 (1, 3, 4).

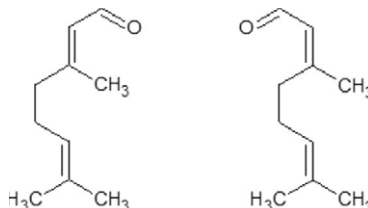
Svrha ovog rada bila je kvantitativna analiza flavonoida u listovima matičnjaka skupljenim na različitim nalazištima u Hrvatskoj i regiji. Pri tome je dan pregled dosadašnjih spoznaja o kemijskom sastavu i farmakološkim učincima ekstrakata i eteričnog ulja matičnjaka.

### Kemijski sastav

Poznavanjem kemijskog sastava bolje se upoznaje s djelatnim tvarima biljke, ali i ostalim sastavnica koje omogućuju razlikovanje pojedinih vrsta od ostalih pripadnika istog roda i vrlo slične morfologije. Matičnjak sadrži čitav niz različitih

kemijskih sastavnica kao što su eterično ulje, fenilkarboksilne kiseline, triterpeni, flavonoidi i mnoge druge (1).

**Eterično ulje.** Listovi matičnjaka sadrže 0,02–0,3 % (*V/m*) eteričnog ulja te se zbog malog sadržaja u listovima često patvore vrstama roda *Cymbopogon* Spreng. ili limunovim uljem. Takvo krivotvorenje biljnih vrsta manje je opasno kad su posrijedi kozmetički proizvodi sve dok se osigurava mikrobiološka ispravnost. Međutim, krivotvorena droga može ozbiljno narušiti zdravlje čovjeka i dovesti do nepovjerenja zdravstvenih djelatnika pri propisivanju i izdavanju liječenja biljnim pripravcima. Eterično ulje dobiva se destilacijom svježih vršnih dijelova. Glavne sastavnice su geranial i neral, poznate i pod nazivima citral a i b (slika 2.) te citronelal (+). Odnos geraniala prema neralu u pravilu je stalan, 4:3. Od seskviterpena prevladava kariofilen (1).

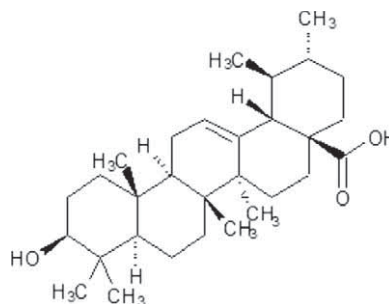


Slika 2. Strukture geraniala (lijevo) i nerala (desno)

Prema jednom istraživanju, glavne sastavnice eteričnog ulja listova su:  $\beta$ -kariofilen oksid, geranial, neral,  $\beta$ -kariofilen i geranil-acetat, dok eterično ulje cvjetova sadrži najviše geraniala, zatim nerala,  $\beta$ -kariofilena i  $\beta$ -kariofilen oksida (5).

**Fenilkarboksilne kiseline.** U sastavu listova najzastupljenije fenilkarboksilne kiseline su slobodno i heterozidno vezane klorogenska i kavena kiselina, *p*-kumarinska te ružmarinska kiselina. Neka opažanja ukazuju na to da u biljci fenilkarboksilne kiseline signaliziraju završetak rasta. Poznato je da *p*-kumarinska kiselina snažno inhibira rast stabljike i njenih dijelova. Isto tako, pokazano je da dolazi do nakupljanja fenilkarboksilnih kiselina i flavonoida u proljeće nakon što se otvore pupoljci i u jesen prije početka procesa dormancije (1, 6).

**Triterpeni.** Triterpeni su ugljikovi spojevi koji se sastoje od šest izoprenskih jedinica. Iz matičnjaka su izolirane ursolna (slika 3.) i oleanolna kiselina. Terpeni u biljkama mogu biti lako hlapljivi i svojim mirisom privući razne kukce za opravljanje. Gorak okus nekih terpena može štiti od biljojeda, a razmatra se i njihova uloga kao fitohormona (4).



Slika 3. Struktura ursolne kiseline

**Flavonoidi.** Od flavonoidnih spojeva u matičnjaku se u najvećem udjelu nalaze aglikon kvercetin te derivati apigenina i luteolina (4).

**Ostale sastavnice.** Stabljika se sastoji uglavnom od različitih oblika celuloze s visokim udjelom  $\alpha$ -celuloze i manjeg postotka lignina odgovornih za mehaničku čvrstoću biljke (4).

## Farmakološki učinci

Matičnjak je izrazito istraživana biljka zbog mnogih potencijalno poželjnih učinaka. Poznavali su ga već Grci i Rimljani, Plinije ga je preporučivao u liječenju hipohondričnih i histeričnih pacijenata. Arapi ga prenose u Europu, a zatim se uzgaja u njemačkim samostanima u 16. stoljeću (1). Najpoznatiji proizvedeni ljekoviti oblik srednjovjekovnih samostanskih ljekarni alkoholni je destilat listova matičnjaka i drugih droga s eteričnim uljem – *Karmelitergeist* (Spiritus *Melissae compositus*), a danas je još uvijek prisutan na tržištu kao *Klosterfrau-Melissengeist* (1, 7).

Matičnjak se upotrebljava i za dobivanje eteričnog ulja koje služi kao mirisna nota u parfemima te u industriji alkoholnih pića za izradu likera i koktela. Može služiti i kao kuhinjski začim umjesto limunove kore, ali duljim stajanjem listovi gube miris, stoga treba koristiti svježe skupljene listove (8).

Istraživanja novih antimikrobnih tvari danas se izrazito potiču zbog rastuće rezistencije mikroorganizama, ali kad se otkriju ostaju sačuvane kao rezervni lijekovi za teške infekcije. Matičnjakovo eterično ulje ima antimikrobni učinak naspram čestih uzročnika bolničkih infekcija i stoga postoji mogućnost njegovog korištenja za dezinfekciju bolničke opreme i prostora (9).

Istraživanja na ljudima pokazala su pozitivne učinke biljnih pripravaka matičnjaka na predmenstrualni sindrom (PMS), hiperaktivnosti kod djece, hiperlipidemije, palpitacija i infekcija.

**PMS.** Rezultati kliničkih pokusa pokazuju da 500 mg matičnjaka danog dvaput dnevno u kapsulama tijekom lutealne faze menstrualnog ciklusa ublažava predmenstrualne simptome te poboljšava fizičku i psihološku kvalitetu života u odnosu na placebo kod studentica (10). 1200 mg dnevno tijekom lutealne faze menstrualnog ciklusa dovoljno je za značajno ublažavanje predmenstrualnih simptoma. Istraživanje je trajalo tri mjeseca i svaki mjesec značajno se smanjivala težina predmenstrualnih simptoma (11).

**Hiperaktivnost kod djece.** 640 mg ekstrakta korijena odoljena (valerijane) i 320 mg ekstrakta matičnjaka smanjile su hiperaktivnost, impulzivnost i teškoće pri koncentriranju kod djece predškolske dobi, koja unatoč pokazanim poteškoćama nisu zadovoljila kriterije za dijagnozu ADHD-a. Neželjeni učinci razvili su se kod dvoje ispitanika, ali analizom je pokazano da je vrlo malo vjerojatno da je do tih učinaka došlo zbog uzimanja prethodno navedenog preparata (12).

**Hiperlipidemija.** Pacijentima koji boluju od hiperlipidemije, 1000 mg praška dobivenog od listova matičnjaka značajno je smanjilo vrijednosti LDL-a i AST-a. Prašak matičnjaka nije pokazao značajan utjecaj na ostale lipidne parametre (13).

**Palpitacije.** Srčane palpitacije često su benigno stanje koje je povezano sa stresom u većine ljudi te ih je stoga teško liječiti. 500 mg liofiliziranog vodenog ekstrakta

matičnjaka dvaput na dan tijekom 14 dana primjene značajno je smanjilo učestalost srčanih palpitacija i anksioznost kod ispitanika (14).

**Antimikrobni učinak.** Gel s matičnjakom nije se pokazao jednako učinkovitim u usporedbi s 5 %-tnom kremom koja je sadržavala aciklovir u liječenju *herpesa labialis*. Ipak, učinkovitost je dokazana u lokalnom smanjenju jačine boli prouzrokovane herpesom (15).

Istraživanja na animalnim modelima pokazala su da ekstrakti matičnjaka imaju pozitivan učinak kod depresije, ulkusa, dijabetesa, pretilosti i aritmija.

**Depresija.** Vodeni ekstrakt matičnjaka pokazao je serotonergički antidepresivni učinak u štakora kao i sama ružmarinska kiselina. Opravdano bi bilo korištenje matičnjaka kao dodatne terapije depresije uz standardne lijekove ili za sprječavanje nastajanja klinički značajnog oblika bolesti, uz dokaze koje trebaju pokazati istraživanja na ljudima (16).

**Ulkus.** Metanolni ekstrakt matičnjaka u dozama od 150 i 300 mg/kg pokazao je gastroprotektivni učinak u štakora. Pretpostavka je da je opaženi učinak posljedica inhibicije lipidne peroksidacije ili pojačavanja antioksidativnih obrambenih mehanizama (17).

**Dijabetes.** Učinkovitost matičnjaka dokazana je i u štakora kao modela dijabetesa. Primjenom 0,04 mg eteričnog ulja matičnjaka na dan uklonila se hiperalgezija nastala kao komplikacija dijabetesa. Eterično ulje matičnjaka stoga predstavlja potencijalni tretman za dijabetičku neuropatiju. Također, dugotrajnom primjenom ekstrakta uspostavljena je euglikemija i smanjena je tjelesna masa (18). Khodsooz i sur. (19) su pretpostavili da je smanjenje razine glukoze, kolesterola, LDL-a, triglicerida te povećanje razine HDL-a u dijabetičkih štakora posljedica antioksidativnog učinka flavonoida iz vodenoalkoholnog ekstrakta matičnjaka.

**Pretilost.** Autori istraživanja testirali su pretpostavku da ekstrakt matičnjaka, koji se već pokazao inhibitorom angiogeneze reduciranjem ekspresije mRNA faktora VEGF-A i FGF-2, djeluje i na inhibiciju adipogeneze te hipertrofiju adipocita. Hipoteza je potvrđena, a ukazano je i na povezanost angiogeneze i adipogeneze. Mogući mehanizam djelovanja na supresiju adipogeneze je i inhibicija ekspresije mRNA matriksnih metaloproteinaza (20).

**Aritmije.** Istraživanje učinka vodenog ekstrakta matičnjaka na EKG štakora tijekom tjedan dana pokazalo je značajne promjene, ali potrebna su dodatna istraživanja da se pokažu klinički učinci takvih promjena (21). Na štakorima je također pokazan kardioprotektivni učinak manjih doza vodenog ekstrakta (50 i 100 mg/kg) prije infarkta miokarda, dok su veće doze (200 mg/kg) pojačale ishemiju (21). Vodenoalkoholni ekstrakt u dozama od 100 i 200 mg/kg smanjio je učestalost ventrikularne fibrilacije, tahikardije i preuranjenih otkucaja u štakora kojima je inducirana aritmija, te se stoga smatra da ima kardioprotektivni učinak (22).

*In vitro* istraživanja su pokazala da ekstrakt matičnjaka može djelovati antiparazitski, antivirusno te da ima potencijal za suportivnu terapiju Alzheimerove bolesti, karcinoma i sprječavanje nastanka tromba.

**Antiparazitsko djelovanje.** Etanolni ekstrakt u količinama manjim od 500 mg/L pokazao je inhibiciju rasta različitih faza razvoja roda *Leishmania* kao i faze epimastigota kod vrste *Trypanosoma cruzi*. HPLC analizom, kao glavne sastavnice ekstrakta dokazane su kavena kiselina i rutin (23).

**Antivirusno djelovanje.** Učinak eteričnog ulja matičnjaka kod virusa gripe H9N2 najjači je prije same infekcije stanica virusom jer onemogućava prijanjanje virusa na ljudske stanice. Hemaglutinacija nije bila spriječena uporabom eteričnog ulja. Pokazan je i sinergistički učinak s niskim dozama oseltamivira. GC-MS analiza pokazala je da se istraživano ulje najvećim dijelom sastojalo od geraniala i nerala (24).

**Alzheimerova bolest.** U istraživanju učinka matičnjaka na Alzheimerovu bolest, stanice PC12 linije bile su izložene ukupnom ekstraktu matičnjaka ili samo njegovom polifenolima bogatom frakcijom nakon čega su izazvane oksidativne promjene. Frakcija bogata polifenolima pokazala je bolji neuroprotektivni učinak od ukupnog ekstrakta te bi se stoga polifenoli mogli koristiti u pripravcima za sprječavanje bolesti (25).

**Antitumorsko djelovanje.** Antiproliferativni i proapoptotički učinak ekstrakta matičnjaka pokazan je na HT-29 i T84 stanicama ljudskog karcinoma crijeva. Autori ukazuju na mogućnost korištenja ekstrakta matičnjaka ili nekih njegovih frakcija u sprječavanju nastanka karcinoma crijeva. U drugom istraživanju, 50 %-tni etanolni ekstrakt pokazao je antiproliferativni i antioksidativni učinak, a kao glavna djelotvorna sastavnica označena je ružmarinska kiselina (26, 27). Inhibicija rasta stanica karcinoma korištenjem vodenookolnog ekstrakta utvrđena je na staničnim linijama adenokarcinoma dojke i prostate, karcinoma jajnika i karcinoma ne-malih plućnih stanica. O hormonima ovisni tumori pokazali su se puno osjetljivijima na antitumorski učinak ekstrakta (28).

**Antitrombotsko djelovanje.** U našim istraživanjima pokazano je da etanolni ekstrakti matičnjaka djeluju antitrombotski sprječavajući agregaciju trombocita zahvaćujući prisutnosti ružmarinske kiseline (29).

## EKSPERIMENTALNI DIO

**Materijal za istraživanje.** U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su osušeni (slika 4.) i usitnjeni listovi vrste *Melissa officinalis* L. uzgojene 2014., 2015., i 2016. u Farmaceutskom botaničkom vrtu »Fran Kušan« Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutskobiokemijskog fakulteta, 2014. u Našicama, 2014. u Banja Luci (Bosna i Hercegovina) i 2014. u Novom Sadu (Srbija).

### Identifikacija biljnog materijala.

Identitet istraživane biljne vrste potvrđen je ispitivanjem vanjske i unutarnje građe skupljenih uzoraka listova (30).

### Određivanje količine flavonoida.

Kvantitativna analiza flavonoida provedena je spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru (31), koja se temelji na određivanju ukupnih flavonoidnih aglikona nakon stvaranja kompleksa s  $Al^{3+}$  u smjesi metanola, etilacetata i octene kiseline. Količina flavonoida u svim uzorcima određena je tri puta, a iz dobivenih rezultata izračunate su srednje vrijednosti i standardne devijacije.

**Računalni programi.** Obrada podataka provedena je u programu Microsoft Excel 2010.



Slika 4. Osušeni listovi matičnjaka

## REZULTATI I RASPRAVA

Količina flavonoida u svim je uzorcima određena tri puta, a iz dobivenih rezultata izračunate su srednje vrijednosti i standardne devijacije (tablica 1.).

Tablica 1. Udio flavonoida (%) u uzorcima matičnjaka

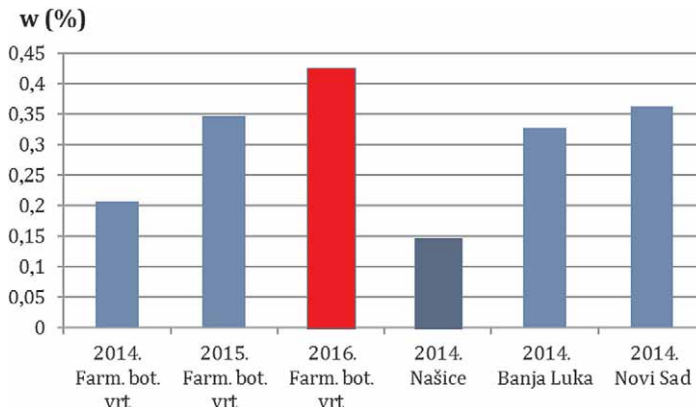
Uzorci	w (% ± SD, n=3)
1A/ (»Fran Kušan«, 2014.)	0,210 ± 0,001
1B / (»Fran Kušan«, 2015.)	0,350 ± 0,004
1C/ (»Fran Kušan«, 2016.)	0,420 ± 0,009
2/ Našice, 2014.	0,140 ± 0,001
3/ Banja Luka, 2014.	0,33 ± 0,01
4/ Novi Sad, 2014.	0,360 ± 0,003

Sadržaj flavonoida u uzorcima kretao se od 0,140 % do 0,420 %. Najveću količinu flavonoida (0,420 %) imao je uzorak uzgojen 2016. u Farmaceutskom botaničkom vrtu »Fran Kušan«, a najmanju (0,140 %) imao je uzorak uzgojen 2014. u Našicama.

Statistički značajnu razliku pokazali su uzorci matičnjaka (*M. officinalis* L.) uzgojeni u Farmaceutskom botaničkom vrtu »Fran Kušan« 2014. i 2015. godine, 2015. i 2016. godine kao i 2014. i 2016. godine. Razlika u sadržaju flavonoida pokazana je i između uzoraka matičnjaka (*M. officinalis* L.) iz Našica 2014. i Banja Luke 2014., kao i između uzoraka iz Našica 2014. i Novog Sada 2014.

Značajka je ljekovitih biljaka da sadrže više različitih ljekovitih sastavnica. Često se jedna od tih sastavnica izdvaja kao glavna i ljekovita, ali u stvarnosti više njih pridonose djelovanju biljaka. Stoga je oponašanje ljekovitih učinaka biljke kemijskom sintezom jedne sastavnice vrlo zahtjevno, gotovo i nemoguće. Ipak, standardizacija pripravka na jednu sastavnicu u velikoj mjeri određuje kvalitetu takvog pripravka.

Ljekovite tvari u biljkama pohranjene su u njenim različitim dijelovima i nisu ravnomjerno raspoređene, već ovisno o funkciji u biljci. Također, količina flavonoida u biljnim dijelovima može biti različita. Na količinu flavonoida utječu brojni čimbenici poput mjesta uzgoja, vrste tla, nadmorske visine, količine sunca, oborina i hranjivih tvari koje su bile dostupne za razvoj mlade biljke. Navedeni podaci potvrđeni su i u ovom radu (slika 5.) Biljke su tijekom rasta izložene različitim vrstama stresnih čimbenika kao što su vremenske nepogode, toplina, suša, jake oborine, biljojedi, patogeni, zagađenje zraka i brojnim drugima.



Slika 5. Grafički prikaz rezultata kvantitativne analize flavonoida

U različitim biljnim vrstama i biljnim dijelovima količina flavonoida je promjenljiva te je najčešće najveća u cvjetovima i listovima, a najmanja u stabljici i korijenu. U jednom istraživanju na matičnjaku pokazano je da se eterično ulje dobiveno od cvjetova i listova gotovo u potpunosti sastojalo od monoterpena i seskviterpena, dok se ulje stabljike uglavnom sastojalo od zasićenih i nezasićenih masnih kiselina uz manje količine lako hlapljivih terpenoida (5).

## ZAKLJUČAK

Spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru kvantitativno su istraženi osušeni listovi matičnjaka (*M. officinalis*). Najveća količina flavonoida od 0,420 % utvrđena je u uzorku iz Farmaceutskog botaničkog vrta »Fran Kušan« skupljenom 2016., a najmanja vrijednost od 0,140 % u uzorku uzgojenom 2014. u Našicama. Statističkom analizom potvrđene su različitosti u količinama flavonoida



između uspoređivanih uzoraka te je utvrđeno da količina flavonoida u istoj biljnoj drogi varira ovisno o godini i mjestu uzgoja što može biti značajno za farmaceutsku kvalitetu.

Literatura – References

1. Kuštrak D. Farmakognozija Fitofarmacija. Zagreb: Golden marketing-Tehnička knjiga, 2005.
2. Kovačević N. Osnovi farmakognozije (III. izdanje). Beograd: Institut za farmakognoziju, 2004.
3. Usai M, Atzei AD, Marchetti M. A Comparative Study on Essential Oil Intraspecific and Seasonal Variations: *Melissa romana* MILL. and *Melissa officinalis* L. from Sardinia. Chem Biodivers. 2016; 13:1076–1087.
4. Shakeri A, Sahebkar A, Javadi B. *Melissa officinalis* L. – A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. J Ethnopharmacol. 2016; 188:204–228.
5. Afsharypuor S, Alijaniha F, Mosaddegh M, Naseri M, Noorbala A, Fallahi F, Montazeri A. Essential Oil Constituents of Leaf, Flower and Stem of *Melissa officinalis* L. Grown in Gonbad-Kavus (Iran). J Essent Oil Bear Pl. 2015; 18:460–463.
6. Kefeli V, Kalevitch MV. Natural Growth Inhibitors and Phytohormones in Plants and Environment. New York: Springer Science and Business Media, 2013.
7. Wagner H. Pharmazeutische Biologie. Drogen und ihre Inhaltsstoffe. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1982.
8. Grlić Lj. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja (II. izdanje). Zagreb: August Cesarec Zagreb, 1990.
9. Jalal Z, El Atki Y, Lyoussi B, Abdellaoui A. Phytochemistry of the essential oil of *Melissa officinalis* L. growing wild in Morocco: Preventive approach against nosocomial infections. Asian Pac J Trop Biomed. 2015; 5:458–461.
10. Mirghafourvand M, Malakouti J, Charandabi SMA, Khalili AF, Solmaz HG. The efficacy of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) alone and combined with lemon balm-Nepeta menthoides on premenstrual syndrome and quality of life among students: A randomized controlled trial. J Herb Med. 2016; 6:142–148.
11. Akbarzadeh M, Dehghani M, Moshfeghy Z, Emamghorieshi M, Tavakoli P, Zare N. Effect of *Melissa officinalis* Capsule on the Intensity of Premenstrual Syndrome Symptoms in High School Girl Students. Nurs Midwifery Stud. 2015; 4: e27001.
12. Gromball J, Beschorner F, Wantzen C, Paulsen U, Burkart M. Hyperactivity, concentration difficulties and impulsiveness improve during seven weeks' treatment with valerian root and lemon balm extracts in primary school children. Phytomedicine. 2014; 21:1098–1103.
13. Jandaghi P, Noroozi M, Ardalani H, Alipour M. Lemon balm: A promising herbal therapy for patients with borderline hyperlipidemia-A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. Complement Ther Med. 2016; 26:136–140.
14. Alijaniha F, Naseri M, Afsharypuor S, Fallahi F, Noorbala A, Mosaddegh M, Faghihzadeh S, Sadrai S. Heart palpitation relief with *Melissa officinalis* leaf extract: Double blind, randomized, placebo controlled trial of efficacy and safety. J Ethnopharmacol. 2015; 164:378–384.
15. Ahadian H, Karbassi MH, Ghaneh S, Hakimian R. Therapeutic Effect of *Melissa* Gel and 5% Acyclovir Cream in Recurrent Herpes labialis: A Double-Blind Randomized Clinical Trial. J Nat Pharm Prod. 2015; 10: e26160.

16. Lin S, Chou M, Chen W, Lai YS, Lu KH, Hao CW, Sheen LY. A medicinal herb, *Melissa officinalis* L. ameliorates depressive-like behavior of rats in the forced swimming test via regulating the serotonergic neurotransmitter. *J Ethnopharmacol.* 2015; 175:266–272.
17. Saberi A, Abbasloo E, Sepehri G, Yadzanpanah M, Mirkamandari E, Sheibani V, Safi Z. The Effects of Methanolic Extract of *Melissa officinalis* on Experimental Gastric Ulcers in Rats. *Iran Red Crescent Me.* 2016; 18: e24271.
18. Hasanein P, Riahi H. Antinociceptive and Antihyperglycemic Effects of *Melissa officinalis* Essential Oil in an Experimental Model of Diabetes. *Med Princ Pract.* 2015; 24: 47–52.
19. Khodsooz S, Moshtaghian J, Eivani M. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of hydroalcoholic extract of *Melissa officinalis* (Lemon Balm) in alloxan-induced diabetic rats. *J Physiol Pharmacol.* 2016; 20:4–30.
20. Woo S, Yoon M, Kim J, Hong Y, Kim MY, Shin SS, Yonn M. The anti-angiogenic herbal extract from *Melissa officinalis* inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and suppresses adipocyte hypertrophy in high fat diet-induced obese C57BL/6J mice. *J Ethnopharmacol.* 2016; 178:238–250.
21. Joukar S, Asadipour H, Sheibani M, Najafipour H, Dabiri S. The effects of *Melissa officinalis* (lemon balm) pretreatment on the resistance of the heart to myocardial injury. *Pharm Biol.* 2016; 54:1005–1013.
22. Akhondali Z, Dianat M, Radan M. Negative Chronotropic and Antidysrhythmic Effects of Hydroalcoholic Extract of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) on CaCl<sub>2</sub>-Induced Arrhythmias in Rats. *Electron physician.* 2015; 7:971–976.
23. Cunha F, Tintino SR, Figueredo, et al. HPLC-DAD phenolic profile, cytotoxic and anti-kinetoplastidae activity of *Melissa officinalis*. *Pharm Biol.* 2016; 54:1664–1670.
24. Pourghanbari G, Nili H, Moattari A, Mohammadi A, Iraj A. Antiviral activity of the oseltamivir and *Melissa officinalis* L. essential oil against avian influenza A virus (H9N2). *Virus Disease.* 2016; 27:170–178.
25. Sepand MR, Soodi M, Hajimehdipoor H, Soleimani M, Sahraei E. Comparison of Neuroprotective Effects of *Melissa officinalis* Total Extract and Its Acidic and Non-Acidic Fractions against A beta-Induced Toxicity. *Iran J Pharm Res.* 2013; 12:415–423.
26. Weidner C, Rousseau M, Plauth A, Wovro SJ, Fischer C, Abdel-Aziz H, Sauer S. *Melissa officinalis* extract induces apoptosis and inhibits proliferation in colon cancer cells through formation of reactive oxygen species. *Phytomedicine.* 2015; 22:262–270.
27. Encalada AM, Hoyos, MK, Rehecho S, et al. Anti-proliferative Effect of *Melissa officinalis* on Human Colon Cancer Cell Line. *Plant Food Hum Nutr.* 2011; 66:328–334.
28. Jahanban-Esfahlan A, Modaeinama S, Abasi M, Abbasi MM, Jahanbah-Esfahlan R. Anti Proliferative Properties of *Melissa officinalis* in Different Human Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer P.* 2015; 16:5703–5707.
29. Maleš Ž, Antolić A, Babić I, Jurić S, Bojić M. Quantitative Analysis of Phenolic Acids and Antiplatelet Activity of *Melissa officinalis* Leaf Extracts. *Nat Prod Commun.* 2017; 12: 93–94.
30. Domac R. Flora Hrvatske – priručnik za određivanje bilja (II. izdanje). Zagreb: Školska knjiga, 2002.
31. Christ B, Müller KH. Zur serienmäßigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol Derivaten in Drogen. *Arch Pharm.* 1960; 293:1033–1042.

Primljeno 17. veljače 2017.