

Određivanje antioksidacijskog djelovanja odabranih vrsta roda *Salvia* L.

Škugor, Doris

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:121402>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Doris Škugor

**Određivanje antioksidacijskog djelovanja
odabranih vrsta roda *Salvia* L.**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmakognozija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom redovite profesorice dr. sc. Sande Vladimir-Knežević.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Sandi Vladimir-Knežević na dodijeljenoj temi i mogućnosti rada u laboratoriju te na savjetima i stručnom vodstvu prilikom izrade diplomskog rada.

Veliko hvala asistentici Mateji Mervić na pomoći u laboratoriju prilikom odrađivanja eksperimentalnog dijela rada te na stručnim savjetima i strpljenju.

Hvala svim djelatnicima Zavoda za Farmakognoziju na pruženoj pomoći i stručnim savjetima tijekom rada u laboratoriju.

Posebno hvala mojoj obitelji na velikoj podršci i što mi je omogućila studiranje te mojim prijateljima i dečku na pruženoj potpori tijekom studiranja.

This work was supported by the project “Bioactive molecules of medical plants as natural antioxidants, microbicides, and preservatives” (KK.01.1.1.04.0093), co-financed by the Croatian Government and the European Union through the European Regional Development Fund-Operational Programme Competitiveness and Cohesion (KK.01.1.1.04.).

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. Botanički podaci biljnih vrsta roda <i>Salvia</i> L.....	1
1.1.1. <i>Salvia brachyodon</i> Vandas – kratkozupčasta kadulja	2
1.1.2. <i>Salvia fruticosa</i> Mill. – grčka kadulja	3
1.1.3. <i>Salvia glutinosa</i> L. – ljepljiva kadulja.....	3
1.1.4. <i>Salvia nemorosa</i> L. – šumska ili stepska kadulja.....	4
1.1.5. <i>Salvia officinalis</i> L. – ljekovita kadulja	5
1.1.6. <i>Salvia pratensis</i> L. – livadna kadulja	6
1.1.7. <i>Salvia sclarea</i> L. – muškatna kadulja.....	7
1.1.8. <i>Salvia verticillata</i> L. – pršljenasta kadulja	8
1.2. Polifenolne sastavnice i antioksidacijska svojstva vrsta roda <i>Salvia</i> L.....	9
2. Obrazloženje teme	13
3. Materijali i metode	14
3.1. Istraživani biljni materijal.....	14
3.2. Instrumenti i pribor.....	15
3.3. Reagensi, standardi i ostale kemikalije	15
3.4. Istraživanje fenolnih spojeva metodom tankoslojne kromatografije	16
3.5. Istraživanje antioksidacijskog djelovanja	17
3.5.1. Priprema ekstrakata.....	17
3.5.2. Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala	18
3.5.3. Određivanje sposobnosti redukcije iona željeza(III).....	19
3.5.4. Određivanje sposobnosti keliranja iona željeza(II).....	20
3.6. Statistička analiza	21
4. Rezultati i rasprava	22
4.1. Flavonoidi i fenolne kiseline u odabranim vrstama roda <i>Salvia</i>	22
4.2. Antioksidacijsko djelovanje odabranih vrsta roda <i>Salvia</i>	24
4.2.1. Sposobnost hvatanja DPPH slobodnog radikala	24
4.2.2. Sposobnost redukcije iona željeza (III).....	28
4.2.3. Sposobnost keliranja iona željeza(II).....	31

4.2.4. Usporedna antioksidacijska aktivnost etanolnih ekstrakata vrsta roda <i>Salvia</i>	34
5. Zaključak	36
6. Literatura	37
7. Sažetak/Summary	40
8. Temeljna dokumentacijska kartica/Basic Documentation Card	

1. UVOD

Mnoge se biljke od pamtivijeka koriste u ljekovite svrhe. Među njima su i biljne vrste roda *Salvia* L. (Lamiaceae) koje u zadnje vrijeme privlače veliku pozornost znanstvenika zbog značajnih bioloških učinaka povezanih sa sadržajem polifenola i terpena. Rodu *Salvia* pripada oko 900 biljnih vrsta. Mnoge se koriste diljem svijeta u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji (Coisin i sur., 2012). U hrvatskoj flori prisutno je 19 vrsta roda *Salvia* (www.hirc.botanic.hr), od kojih su sljedeće predmetom istraživanja ovog diplomskog rada: *S. brachyodon* Vandas, *S. fruticosa* Mill., *S. glutinosa* L., *S. nemorosa* L., *S. officinalis* L., *S. pratensis* L., *Salvia sclarea* L. i *Salvia verticillata* L.

1.1. Botanički podaci biljnih vrsta roda *Salvia* L.

Salvia L. kozmopolitski je biljni rod s 900 vrsta rasprostranjenih većinom u Središnjoj i Južnoj Americi (oko 500 vrsta), Središnjoj Aziji i Mediteranu (oko 250 vrsta) te istočnoj Aziji (oko 90 vrsta). Latinski naziv ovaj rod duguje svojoj najznačajnijoj vrsti, *Salvia officinalis* L. (ljekovita kadulja). Podrijetlo imena dolazi iz latinskog jezika, od pridjeva „salvus“ što znači zdrav i glagola „salvare“ što znači spasiti i liječiti. Pripadnice ovog roda su jednogodišnje, dvogodišnje, ili višegodišnje zeljaste biljke i drvenasti polugrmovi. Listovi mogu biti srcoliki, jajasti, nepodijeljeni ili perasto razdijeljeni, cjelovitog, narovašenog ili nazubljenog ruba. Donji listovi često čine rozetu. Cvjetovi tvore grozdaste ili rjeđe metličaste cvatove. Veliki su, zigomorfni, plavi, ljubičasti do crveni, rjeđe bijeli ili žuti. Dvousnata čaška najčešće je cjevasta ili zvonasta. Vjenčić ima dvije usne, od kojih je donja široka i ima tri režnja. Rub vjenčića je nazubljen ili cjelovit. Plod je kalavac koji se raspada na četiri jajasta, četverobridna, glatka merikarpa. Brojne žljezdaste dlake smještene na svim biljnim organima izlučuju eterična ulja. Specifičnost ovog roda krije se u cvijetu sa samo 2 prašnika koji su specifično oblikovani (riječ je o tzv. mehanizmu poluge), čime je velikim kukcima omogućeno oprašivanje. Morfologija prašnika varira unutar roda, no mehanizam poluge u većine vrsta nije usko specijaliziran za jednog oprašivača, a kod nekih je i potpuno reduciran (Domac, 1950; www.hirc.botanic.hr).

1.1.1. *Salvia brachyodon* Vandas – kratkozupčasta kadulja

Kratkozupčasta kadulja raste samo na dva mjesta u svijetu i to na planini Orjen smještenoj na granici između Bosne i Hercegovine i Crne Gore te na poluotoku Pelješcu. Jedna je od najrjeđih biljnih vrsta dinarskog krša. U Hrvatskoj ima status endema dok je u Crnoj Gori klasificirana kao ugrožena vrsta. Raste na najvišem vrhu poluotoka Pelješca (Sv. Ilija) na dolomitskom vapnencu u šumi Dalmatinskog crnog bora ili uz rub šume. Kratkozupčasta kadulja je mali grm s relativno velikim listovima na dugoj peteljci, gusto raspoređenim na bazi stabljike. Plojka im je cjelovita ili perasto razdijeljena, a list se sastoji od 3 do 5 liski. Mladi su listovi gusto prekriveni dlakama. Razvijeni su listovi većinom dlakavi na licu dok su na naličju prekriveni bijelim dlačicama, a najstariji su listovi kožasti, žućkasti i manje dlakavi te imaju istaknute žile. Blijedo ljubičasto-plavi cvjetovi prekriveni su žljezdanim dlakama i formiraju labave grozdaste cvatove. Cvjetovi su smješteni na peteljka različitih duljina i prekriveni su brojnim žljezdanim dlakama. Čaška je cjevasto-zvonastog oblika s vidljivim uzdužnim žilama i duga je 8-10 mm. Lapovi čaške su široko trokutaski i suženi na vrhu. Latice su 3 do 4 puta dulje od čaške. Ima dva prašnika. Kratkozupčasta kadulja je diploidna vrsta koja ima $2n=14$ kromosoma, a njezino vrijeme cvatnje traje od srpnja do kolovoza (Domac, 1950; Liber i sur., 2014).



Slika 1. *Salvia brachyodon* Vandas

(preuzeto s www.hirc.botanic.hr)

1.1.2. *Salvia fruticosa* Mill. – grčka kadulja

Ova kadulja izgledom je najbližnja ljekovitoj kadulji. Samoniklo raste na području Italije, Libije, južnog dijela Balkana (Albanije, Grčke) pa sve do zapadne Sirije. Najrasprostranjenija je na području Grčke, što i samo ime kaže, a njezina se staništa nalaze i na obali i u unutrašnjosti. U Hrvatskoj raste isključivo na otoku Visu. Višegodišnji je grm koji može narasti do 120 cm. Ima četverbridnu stabljiku prekrivenu gustim dlakama. Jednostavni ili perasti listovi nerijetko imaju 1-2 para ovalnih bočnih segmenata i veliki duguljasto-eliptični vršni segment na lisnoj peteljci. Cvat je jednostavan i slabo razgranat, a čine ga nekoliko pršljenova s cvjetovima. Čaška je aktinomorfna i cjevastog oblika, dugačka je 5-12 mm. Najčešće je ljubičasta, prekrivena sitnim dlakama, sa ili bez žljezda. Vjenčić je dugačak oko 16-25 mm, ljubičast, rijetko bijele boje (slika 2). Medonosna je i ljekovita biljka, a u Hrvatskoj je zakonom zaštićena (Domac, 1950; www.hirc.botanic.hr).



Slika 2. *Salvia fruticosa* Mill.

(preuzeto s www.hirc.botanic.hr)

1.1.3. *Salvia glutinosa* L. – ljepljiva kadulja

Vrsta *Salvia glutinosa* trajna je zeljasta biljka. Raste na području središnje i istočne Europe te zapadne Azije. Njezina se staništa mogu pronaći na sjenovitim ili polusjenovitim mjestima, u nizinama pa sve do 1600 metara nadmorske visine. Ova biljna vrsta ima uspravnu, jednostavnu ili razgranatu, četverbridnu stabljiku koja može narasti i do 60 cm. Na gornjem dijelu stabljike nalaze se vrlo ljepljive žljezdaste dlake zbog čega ova biljna vrsta nosi naziv ljepljiva kadulja. Ima krupne srcoliko kopljaste listove koji su dugi 8 do 16 cm. Naglo su ušiljeni

i nazubljenih rubova. Listovi su dlakavi s obje strane i nalaze se na dlakavim peteljka koje su duge do 12 cm. Žuti dvospolni cvjetovi sa smečkastim linijama u unutrašnjosti skupljeni su u grozdaste cvatove koji mogu biti dugi i do 30 cm, a sastoje se od 2 do 8 cvjetova (slika 3). Čaška je ljepljivo dlakava. Dvije usne čine vjenčić: gornja koja je široka i savinuta te smeđe istočkana donja koja ima tri režnja, a srednji režanj nazubljen je i povijen prema dolje. Njezino vrijeme cvatnje traje od srpnja do rujna (Domac, 1950; www.plantea.com).



Slika 3. *Salvia glutinosa* L.

(preuzeto s www.plantea.com.hr)

1.1.4. *Salvia nemorosa* L. – šumska ili stepska kadulja

Vrsta *Salvia nemorosa* višegodišnja je zeljasta biljka (slika 4). Raste na području jugozapadne Azije te srednje i jugoistočne Europe. Općenito raste na livadama, suhim travnjacima i svjetlim listopadnim šumama na nadmorskoj visini do 1000 metara. Smatra se ugroženom biljnom vrstom, stoga je i strogo zaštićena zakonom. Ima uspravnu stabljiku koja je u gornjem dijelu razgranata i raste do 60 cm u visinu. Listovi su užji i dulji, golog lica i dlakavog naličja. Gornji listovi su sjedeći, a donji se nalaze na peteljci i brzo venu. Tanki i klasasti cvatovi sastavljeni su od dvospolnih cvjetova. Vjenčić čine plavoljubičaste laticice s dlačicama. Ima dvousnatu čašku u obliku zvona. Ispod gornje usne smještena su dva prašnika. Njezino vrijeme cvatnje traje od svibnja do srpnja (www.plantea.com).



Slika 4. *Salvia nemorosa* L.
(preuzeto s www.plantea.com)

1.1.5. *Salvia officinalis* L. – ljekovita kadulja

Vrsta *Salvia officinalis* višegodišnji je polugrm. Samo ime ukazuje na njezina ljekovita svojstva o kojima dodatno svjedoči i poslovice iz srednjeg vijeka koja kaže: „Cur moriatur homo cui Salvia crescit in horto?“ koja u prijevodu znači „Zašto da čovjek umre kada mu kadulja raste u vrtu?“. Raste na kamenitim brdima priobalnog područja kao i na mediteranskim otocima, no zbog izuzetnih ljekovitih svojstava uzgaja se diljem svijeta. Ima povijenu, razgranatu, ljubičasto prošaranu i u donjem dijelu drvenastu stabljiku. Stabljike su četverobridne ili gotovo okrugle, a mogu doseći visinu od oko 70 cm. Sivkastozeleni listovi prekriveni su sitnim dlačicama. Jednostavni su, naborani, jajasto lancetasti ili lancetasti. Dugi su 2 do 9 cm, a nalaze se na drškama dugim od 1 do 5 cm te su na stabljikama smješteni nasuprotno (slika 4). Dvospolni cvjetovi veličine 2 do 3 cm nalaze se na stapci dugoj 2 do 4 mm. U prividne pršljenaste cvatove na vrhu stabljike skupljeno je 5 do 10 cvjetova. Ocvijeće je dvostruko, a čaška dvousnata i cjevasto zvonasta, obrasla prileglim dlakama. Cjevast i dvousnat vjenčić plave ili ljubičaste boje obično je barem dvostruko dulji od čaške. Donja trorežnjasta usna je dulja od gornje dvorežnjaste. Dva su prašnika srasla s cijevi vjenčića dok tučak ima nadraslu plodnicu. Njezino vrijeme cvatnje traje od svibnja do srpnja. Ova vrsta prosječno cvate oko 20 dana (Domac, 1950; www.plantea.com.hr).



Slika 5. *Salvia officinalis* L.
(preuzeto s www.plantea.com)

1.1.6. *Salvia pratensis* L. – livadna kadulja

Livadna kadulja je trajna zeljasta aromatična biljka. Samoniklo raste na livadama Europe, zapadne Azije i sjeverne Afrike. Njezina su staništa prisutna na livadama, pašnjacima, obroncima i rubovima šuma. Šuplja četverobridna stabljika prekrivena je mekanim žljezdastim dlačicama i lagano je ljepljiva na dodir. Može biti jednostavna ili razgranata u gornjem dijelu i može doseći visinu od 30 do 70 cm. Tamnozeleni prizemni listovi skupljeni su u rozetu. Naborani su, ovalnog oblika, nazubljenih ili narovašenih rubova i dugački oko 5 do 15 cm. Pri bazi su sroliko urezani, na vrhu zaobljeni ili šiljasti i smješteni na peteljka dugim oko 3 do 7 cm. Listovi na stabljici su manji i malobrojniji, sjedeći ili s kratkom peteljkom. Pricvjetni listovi zelene su boje i savinuti prema natrag. Dvospolni cvjetovi s kratkom drškom skupljeni su u pršljenaste cvatove koji se sastoje od 4 do 6 cvjetova, a 6 do 12 takvih pršljenova oblikuje prividne klasaste cvatove duge oko 30 cm (slika 6). Malena zvonolika čaška duga je 5 do 10 mm. Tamnosmeđa je i prekrivena dlakama. Plavoljubičasti vjenčić nepravilnog oblika trostruko je dulji od čaške, a čine ga gornja srpasto svinuta usna i donja trorežnjasta usna. Za razliku od do sada spomenutih vrsta kadulja, ova vrsta ima 4 prašnika. Njezino vrijeme cvatnje traje od svibnja do kolovoza (Domac, 1950; www.plantea.com.hr).



Slika 6. *Salvia pratensis* L.
(preuzeto s www.amazon.com)

1.1.7. *Salvia sclarea* L. – muškatna kadulja

Muškatna kadulja višegodišnja je biljka. Prve godine ima samo prizemnu rozetu listova, a druge stvara cvijet i onda odumire (slika 7). Ime vrste potječe od latinske riječi „clarus” što znači čist, a naziv potječe od podatka da se u prošlosti njezino sjeme koristilo za odstranjivanje stranog tijela iz oka. Nalazi se na području južne Europe i sjeverne Afrike oko Mediterana te u srednjoj Aziji. Ima uspravnu četverbridnu stabljiku koja je u gornjem dijelu razgranata, a može biti visoka do 120 cm. Prizemni sroliki listovi, skupljeni u rozetu, imaju peteljku i jednostavni su. Široki su i dugi do 20 cm, gusto obrasli bijelim dlačicama zbog čega su meki na dodir. Listovi na stabljici su nasuprotni, sjedeći ili s kraćom peteljkom. Manji su i nepravilo nazubljeni. Bijeli do rozobijeli cvjetovi ugodno mirišu. Dvospolni su, dugi 2 do 2,5 cm. Tvore pršljenaste cvatove koji čine duguljaste klasove. Stvaraju se druge godine tijekom lipnja i srpnja (Domac, 1950; www.plantea.com.hr).



Slika 7. *Salvia sclarea* L.

(preuzeto s www.plantea.com)

1.1.8. *Salvia verticillata* L. – pršljenasta kadulja

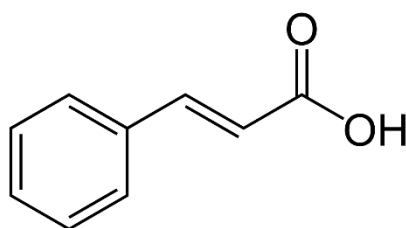
Vrsta *Salvia verticillata* zeljasta je trajnica (slika 8). Prirodno raste na području srednje Europe i zapadne Azije. Njezina se staništa mogu naći na sunčanim, suhim i toplim livadama, napuštenim zemljištima, pokraj staza, od nizina do planina. Ima uspravnu stabljiku koja može biti jednostavna ili razgranata u gornjem dijelu gdje se nalazi cvat. Stabljiku prekrivaju guste čekinjaste dlake, a može narasti do 80 cm. Jednostavni jajasti listovi srcoliki su pri bazi i mogu biti dugi do 12 cm. Nepravilno su nazubljeni, zaobljenog vrha i s malo dlaka na licu i naličju. Donji listovi nalaze se na peteljkaama i imaju dva palistića, a gornji su sjedeći i veličinom se smanjuju prema vrhu stabljike. Prizemni listovi uvenu prije cvjetanja. Čaška je cjevasto zvonastog oblika i ljubičaste boje, dok je vjenčić plavoljubičast. Gusti okruglasti pršljenasti cvatovi pri vrhu stabljike mogu biti sastavljeni od 20 do 40 cvjetova. Cvjeta od lipnja do rujna (Domac, 1950; www.plantea.com.hr).



Slika 8. *Salvia verticillata* L.
(preuzeto s www.mostlynatives.com)

1.2. Polifenolne sastavnice i antioksidacijska svojstva vrsta roda *Salvia* L.

Fenolni spojevi svrstavaju se među najvažnije biljne sekundarne metabolite, a obilježava ih najmanje jedan aromatski prsten supstituiran s jednom ili više hidroksilnih skupina. Derivati su cimetne kiseline (slika 9). Podijeljeni su u nekoliko skupina prema broju konstitutivnih ugljikovih atoma, a dijele se na jednostavne fenole, fenolne kiseline, fenilpropanoide i flavonoide. U novije vrijeme fenoli su znanstvenicima zanimljivi zbog svojih važnih bioloških svojstava, posebice protuupalnih, antioksidacijskih, antimutagenih i antitumorskih. Flavonoidi se smatraju blagotvornima za ljudsko zdravlje, a mogu se unijeti konzumacijom povrća, voća, crvenog vina, čaja ili ljekovitog bilja (Sajewicz i sur., 2012).



Slika 9. Struktura cimetne kiseline
(preuzeto s www.wikipedia.org)

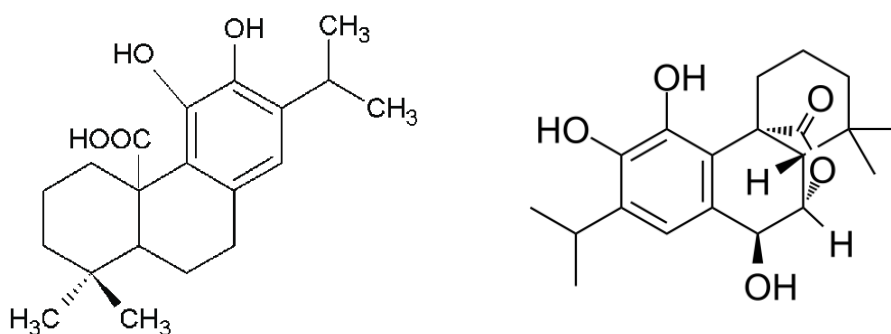
Poznato je da su fenolni spojevi odgovorni za antioksidacijska svojstva mnogih biljnih vrsta, pa tako i onih iz porodice Lamiaceae. Ti spojevi imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala zbog prisutnosti hidroksilnih skupina. Glavne fenolne sastavnice identificirane u ekstraktima kadulja su ružmarinska i karnozolska kiselina te njihovi derivati poput karnozola, metil-karnozata, rozmanola, epirozmanola, rozmadiala. Među njima je rozmanol, jedna od najzastupljenijih bioaktivnih sastavnica mnogih vrsta roda *Salvia* s izraženim antioksidacijskim svojstvima (Tosun i sur., 2009).

Primjenom tankoslojne kromatografije dokazana je prisutnost slobodnih i vezanih fenolnih kiselina te flavonoidnih glikozida u vrstama *S. officinalis* i *S. glutinosa*. Flavonoidni glikozidi detektirani su i u vrsti *S. sclarea* (Sajewicz i sur., 2012).

Udio ružmarinske kiseline u metanolnim ekstraktima nekoliko vrsta roda *Salvia* s područja Turske određen je tankoslojnom kromatografijom visoke djelotvornosti. Vrsta *S. officinalis* sadržavala je 1,2 %, *S. fruticosa* 3,8 % i *S. sclarea* 4,1 % ružmarinske kiseline (Bardakci Altan i sur., 2014).

Provedena je analiza acetonskih ekstrakata vrsta roda *Salvia* s područja Bugarske primjenom tankoslojne i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Vrsta *S. glutinosa* sadržavala je sljedeće flavonoide: velutin, cirsiliol, cirsilineol i cirsimaritin, kvercetin 3-metil eter, izokemferid, pahipodol te najzastupljeniji trihidroksi-dimetoksiflavanon. Od flavonoida u sastavu vrste *S. nemorosa* bili su: genkvanin, apigenin 7,4'-dimetileter, ladanein, cirsiliol, cirsilineol i cirsimaritin te salvigenin. U vrsti *S. officinalis* identificirani su luteolin, apigenin, genkvanin, skutelarein, ladanein, hispidulin, cirsiliol, cirsilineol i cirsimaritin te salvigenin (Nikolova i sur., 2006).

Ustanovljeno je da su alkoholni i vodeni ekstrakti vrste *S. officinalis* bogati fenolima, posebice ružmarinskom kiselinom i luteolin-7-glukozidom. U metanolnom ekstraktu ljekovite kadulje identificirane su fenolne kiseline poput kavene i klorogenske kiseline. Ružmarinska i elagna kiselina bile su najzastupljenije fenolne kiseline u infuzu, a zatim rutin, klorogenska kiselina i kvercetin (slika 11) (Ghorbani i Esmaeilizadeh, 2017).

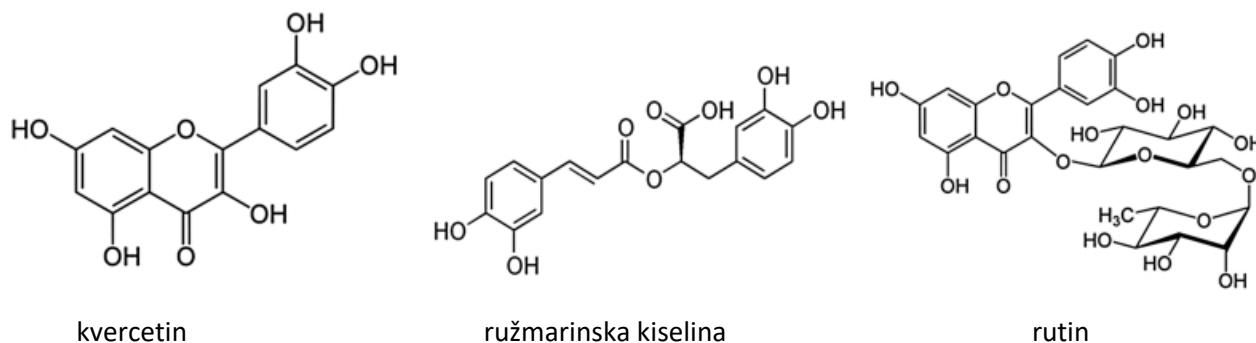


Slika 10. Strukture rozmanola i karnozolske kiseline

(preuzeto s www.medchemexpress.com i www.researchgate.net)

Tosun i suradnici (2009) ispitali su antioksidacijski učinak metanolnih ekstrakata osam vrsta roda *Salvia* s područja Turske koristeći metodu određivanja sposobnosti hvatanja slobodnog DPPH radikala. Najnižu vrijednost koncentracija ekstrakata koja pruža 50 %-tnu inhibiciju DPPH radikala, a time i najbolji antioksidacijski učinak, pokazala je vrsta *S. verticillata* ($IC_{50} = 18,3 \mu\text{g/mL}$), dok je za vrstu *S. nemorosa* vrijednost IC_{50} bila $32 \mu\text{g/mL}$, u usporedbi sa standardnim antioksidansom butil-hidroksianisolom (BHA, $IC_{50} = 15.2 \mu\text{g/mL}$).

Antolić i suradnici (2018) su analizirali ukupan sadržaj fenola i antioksidacijsko djelovanje vrste *Salvia brachyodon*. Spektrofotometrijski je određeno da listovi sadrže 0,08-0,23 % flavonoida, dok je udio ukupnih fenolnih kiselina iznosio 0,47-3,04 %. Testiranjem sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala, ustanovljeno je da ekstrakt vrste *S. brachyodon* ima jači antioksidacijski učinak (29-36 mg/mL ekvivalenta galne kiseline) u odnosu na *S. officinalis* (Antolić i sur., 2018).



Slika 11. Strukture nekih flavonoida izoliranih iz *S. officinalis*

(Ghorbani i Esmailzadeh, 2017)

Loizzo i suradnici (2014) su testirali antioksidacijsku aktivnost devet vrsta roda *Salvia* među kojima i vrste *S. glutinosa* i *S. sclarea*. *S. glutinosa* pokazala je najveću sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala s vrijednosti IC₅₀ od 3,2 µg/mL, a slijedi ju *S. sclarea* s IC₅₀ od 4,8µg/mL.

Nikolova (2011) je ispitala sposobnost hvatanja DPPH radikala metanolnih ekstrakata nekoliko vrsta kadulja s područja Bugarske. Dobivena vrijednost IC₅₀ za vrstu *S. officinalis* iznosila je 35,72 µg/mL, za *S. pratensis* 86,20 µg/mL te za vrstu *S.nemorosa* 93.72 µg/mL.

Pasias i suradnici (2009) su proveli istraživanje u kojemu su ispitali antioksidacijski učinak vrste *S. fruticosa* iz raznih dijelova Grčke. Rezultati su pokazali da etanolni ekstrakt listova posjeduje bolju sposobnost hvatanja DPPH radikala u odnosu na ekstrakt cvjetova te da biljni ekstrakti posjeduju snažnija antioksidacijska svojstva u odnosu na BHT. Za uzorke s Krete određene su najniže IC₅₀ vrijednosti (14,1- 27,4 mg/L).

2. Obrazloženje teme

U zadnje vrijeme postoji veliki interes za istraživanjem uloge reaktivnih kisikovih vrsta u biološkim sustavima i patološkim stanjima. Reaktivne kisikove vrste glavni su slobodni radikali u ljudskom tijelu koji se smatraju primarnim uzrokom oštećenja uzrokovanih oksidacijom. Oni mogu napasti stanične molekule poput lipida, proteina i DNA, što vodi do raznih kroničnih poremećaja poput neuroloških poremećaja, tumora, dijabetesa, upale itd. Slobodni radikali također mogu potaknuti oksidaciju lipida prisutnih u hrani, što utječe na kvalitetu i prihvatljivost proizvoda. Antioksidansi imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala te posljedično inhibiraju ili usporavaju oksidacijske procese. Njihov glavni zadatak je obrana organizma od štetnog utjecaja slobodnih radikala.. Nadalje, sintetski antioksidansi poput butilhidroksianisola (BHA), butilhidroksitoluena (BHT) i terc-butilhidrokinona (TBHQ) često se koriste u prehrambenoj industriji kako bi odgodili oksidaciju i produljili rok trajanja proizvoda. Međutim, zdravstvena sigurnost sintetskih antioksidansa je upitna pa je njihova primjena često ograničena. Zbog svega navedenog raste interes za pronalaskom učinkovitih i sigurnih prirodnih antioksidansa, a poznato je da mnoge prirodne sastavnice pronađene u biljkama, posjeduju antioksidacijska svojstva (Nickavar i sur., 2016).

Na području Hrvatske nalaze se brojne biljne vrste koje sadrže bioaktivne spojeve antioksidacijskog djelovanja, a koje su još uvijek slabo istražene. Stoga je u okviru ovog diplomskog rada istražen antioksidacijski potencijal osam vrsta roda *Salvia* koje rastu na području Hrvatske: *S. brachyodon* Vandas, *Salvia fruticosa* Mill., *Salvia glutinosa* L., *Salvia nemorosa* L., *Salvia officinalis* L., *S. pratensis* L., *S. sclarea* L. i *S. verticillata* L. U tu svrhu je provedena fitokemijska karakterizacija polifenola u listovima odabranih vrsta primjenom tankoslojne kromatografije te su spektrofotometrijski određeni antioksidacijski učinci etanolnih ekstrakata temeljeni na sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala, redukciji iona željeza(III) te keliranju iona željeza(II).

3. Materijali i metode

3.1. Istraživani biljni materijal

Za eksperimentalni dio ovog diplomskog rada korišteni su listovi osam vrsta roda *Salvia* sakupljeni na različitim lokalitetima diljem Republike Hrvatske (tablica 1). Prikupljeni biljni materijal osušen je na zraku pri sobnoj temperaturi, uz zaštitu od svjetlosti. Identifikacija biljnog materijala provedena je na Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta sveučilišta u Zagrebu.

Tablica 1. Istraživani biljni materijal i lokaliteti sakupljanja

Biljna vrsta	Lokacija sakupljanja
<i>Salvia brachyodon</i> Vandas	Sv. Ilija iznad Orebića, Pelješac
<i>Salvia fruticosa</i> Mill.	Komiža, otok Vis
<i>Salvia glutinosa</i> L.	Gorski kotar, Čabar
<i>Salvia nemorosa</i> L.	Baranja
<i>Salvia officinalis</i> L.	Čaša, Brbinj, Dugi otok
<i>Salvia pratensis</i> L.	Bundek, Zagreb
<i>Salvia sclarea</i> L.	Brbinj, Dugi otok
<i>Salvia verticillata</i> L.	odmorište „Dobra“ kraj Ogulina

3.2. Instrumenti i pribor

U eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada korišteni su sljedeći instrumenti:

- analitička vaga (Mettler-Toldeo, Švicarska-SAD)
- inkubator (Inko, Zagreb, Hrvatska)
- ploče za tankoslojnu kromatografiju (TLC) silikagel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- rotacijski vakuum-uparivač Büchi (Büchi Labortechnik AG, Postfach, Švicarska)
- ultrazvučna kupelj Sonorex Digital 10P (Bandelin, Berlin, Njemačka)
- UV-lampa (Camag, Muttenz, Švicarska)
- UV-Vis spektrofotometar *Helios γ* (Spectronic Unicam, Cambridge, Velika Britanija)
- vodena kupelj (Inko, Zagreb, Hrvatska)

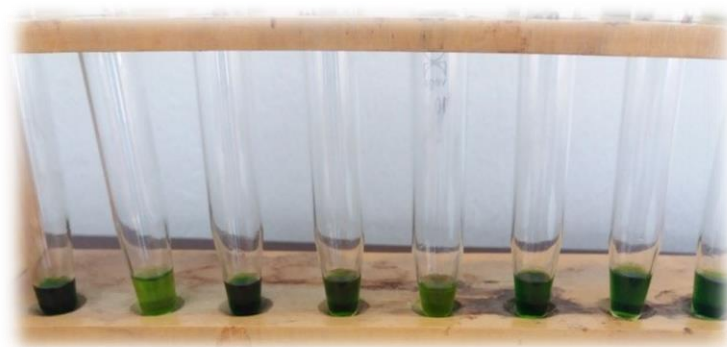
3.3. Reagensi, standardi i ostale kemikalije

U eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada korišteni su sljedeći reagensi, standardi i ostale kemikalije:

- β-aminoetilester difenil boratne kiseline (Fluka, Buchs, Švicarska)
- 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- etilendiamintetraoctena kiselina, dinatrijeva sol (EDTA) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- etil-acetat p.a. (POCH S.A., Gliwice, Poljska)
- etanol 96% p.a. (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- ferozin (dinatrijeva sol 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazin-4',4''-disulfonske kiseline) (Fluka, Buchs, Švicarska)
- kalijev heksacijanoferat (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- metanol p.a. (T.T.T., Zagreb, Hrvatska)
- mravlja kiselina 98-100% p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev dihidrogenfosfatdihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev hidrogenfosfatdihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- polietilenglikol 4000 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- trikloroctena kiselina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- troloks > 98% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- željezov (II) sulfatseptahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- željezov (III) klorid (Riedel-de Haën, Seelze, Njemačka)

3.4. Istraživanje fenolnih spojeva metodom tankoslojne kromatografije

0,2 g prethodno osušenog i usitnjenog biljnog materijala ekstrahirano je pet minuta s 10 mL metanola na vodenoj kupelji pri 70 °C. Metanolni ekstrakt je potom ohlađen i filtriran. Dobiveni filtrati (slika 12) su služili kao ispitivane otopine za dokazivanje prisutnosti flavonoida i fenolnih kiselina pomoću tankoslojne kromatografije.



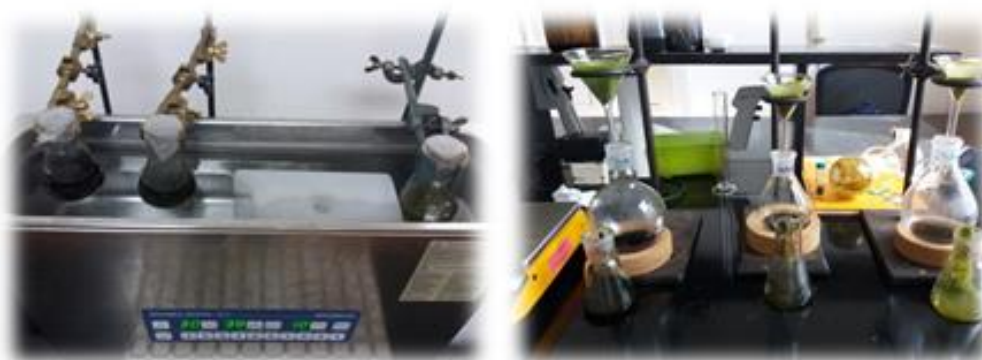
Slika 12. Pripremljeni metanolni ekstrakti listova odabranih vrsta roda *Salvia*

Ispitivanje flavonoida i fenolnih kiselina provedeno je na tankom sloju silikagela 60 F₂₅₄. Mobilnu fazu u ispitivanju činila je smjesa etil-acetata, mravlje kiseline i vode u volumnim omjerima 8:1:1. Kao poredbene otopine u ispitivanju korištene su 0,05%-tne otopine rutina, izokvercitrina, kvercitrina, luteolin-7-O-glukozida te ružmarinske kiseline. Detekcija odijeljenih sastavnica provedena je promatranjem zona gašenja fluorescencije na kromatogramu pri valnoj duljini od 254 nm nakon čega je kromatogram poprskan tzv. Naturstoff reagensom koji čine 1%-tna metanolna otopina β -aminoetilestera difenilboratne kiseline (NST) i 5%-tna etanolna otopina polietilenglikola 4000 (PEG). Kromatogram je potom promatran pod UV svjetlom pri valnoj duljini od 365 nm (Wagner i Bladt, 2009).

3.5. Istraživanje antioksidacijskog djelovanja

3.5.1. Priprema ekstrakata

U svrhu istraživanja antioksidacijskog djelovanja 5 g praškasto usitnjenog biljnog materijala preliveno je sa 50 mL 70 %-tnog etanola i ekstrahirano u ultrazvučnoj kupelji na 30 °C tijekom 30 minuta (slika 13). Ekstrakt je filtriran, a zatim je biljnom materijalu dodana nova porcija od 50 mL istog otapala. Ekstrakcija je ponovljena pod prethodno navedenim uvjetima. Dobiveni filtrati su sjedinjeni i upareni do suha pomoću rotacijskog vakuum-uparivača. Tikvica s ekstraktom ostavljena je još jedan dan u eksikatoru, a nakon sušenja izvagana. Suhi ekstrakt sastrugan je sa stijenki tikvice pomoću metalne špatule i prebačen u staklenu bočicu te čuvan u hladnjaku na 4°C.



Slika 13. Ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji i filtracija dobivenih ekstrakata

Iskorištenja dobivenih ekstrakata izračunata su prema sljedećem izrazu:

$$\text{iskorištenje (\%)} = \frac{m_{(t+e)} - m_{(t)}}{m_{(d)}} \times 100$$

gdje $m_{(t+e)}$ predstavlja masu tikvice s uparenim ekstraktom, $m_{(t)}$ masu prazne tikvice, a $m_{(d)}$ masu biljne droge. Dobiveni su sljedeći rezultati: 23 % za vrstu *S. brachyodon*, 26,17 % za vrstu *S. fruticosa*, 18 % za vrstu *S. glutinosa*, 23,56 % za vrstu *S. nemorosa*, 34,17 % za vrstu *S. officinalis*, 30,8 % za vrstu *S. pratensis*, 22,19% za vrstu *S. sclarea* i 34,39 % za vrstu *S. verticillata*.

3.5.2. Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala

Sposobnost hvatanja DPPH slobodnog radikala ispitana je spektrofotometrijskom metodom opisanom u radu Kindl i sur. (2015). Kako bi se ispitala navedena antiradikalna aktivnost uzoraka, troloks i suhi ekstrakti osam odabranih vrsta roda *Salvia* otopljeni su u 70 %-tnom etanolu. Potom su za ispitivanje serijskim razrjeđivanjem pripremljeni nizovi koncentracija u rasponu od 0,39 do 100 µg/mL. U epruvete s uzorkom otopljenim u 70 %-tnom etanolu dodaje se 0,5 mL 0,1 mM otopine slobodnog radikala DPPH (slika 14) nakon čega je sadržaj svake epruvete snažno promućkan. Reakcijska smjesa inkubirala se trideset minuta na tamnom mjestu na sobnoj temperaturi. Ružičasto obojenim ispitivanim otopinama izmjerena je apsorbanacija na valnoj duljini od 517 nm, a kao slijepa proba upotrijebljen je 70 %-tni etanol. Sposobnost hvatanja DPPH slobodnog radikala izražava se kao postotak, a računa se prema sljedećoj jednadžbi:

$$\%DPPH \text{ antiradikalne sposobnosti} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

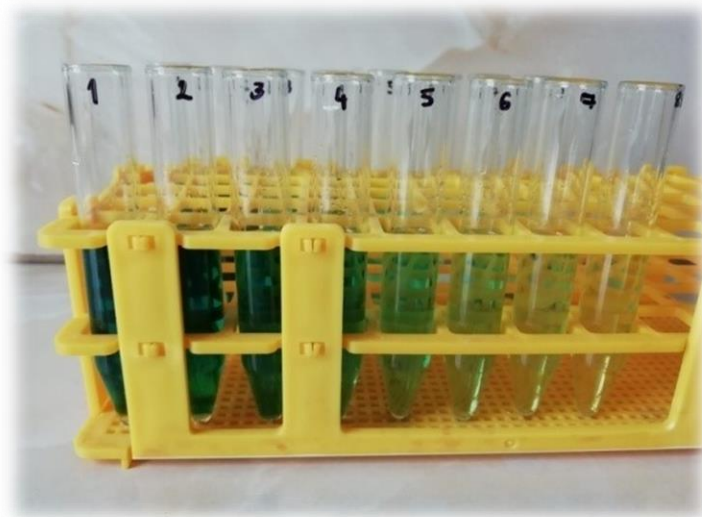
gdje A_0 predstavlja apsorbanaciju kontrolne otopine koja je umjesto ispitivanog uzorka sadržavala ekvivalentnu količinu otapala, odnosno 70 %-tnog etanola, a A_1 predstavlja apsorbanaciju ispitivane otopine. Koncentracija uzorka koja ostvaruje 50 %-tni učinak (IC_{50}) dobivena je interpolacijom na temelju linearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka.



Slika 14. Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala

3.5.3. Određivanje sposobnosti redukcije iona željeza(III)

Sposobnost redukcije iona željeza(III) ispitana je spektrofotometrijskom metodom opisanom u radu Kindl i sur. (2015). Kako bi se ispitaio učinak ekstrakata vrsta roda *Salvia* na redukciju željeza(III), uzorci su otopljeni u 70 %-tnom etanolu, a zatim je serijskim razrjeđivanjem priređen niz koncentracija za ispitivanje u rasponu od 0,78 do 100 $\mu\text{g/mL}$. U epruvete s 1,0 mL uzorka najprije je dodano 2,5 mL fosfatnog pufera koncentracije 0,2 M te pH vrijednosti 6,6. Nakon dodatka 2,5 mL 1 %-tne otopine kalijevog heksacijanoferata, reakcijska smjesa inkubira se dvadeset minuta u termostatu čija je temperatura podešena na 50 °C. Potom se u epruvete dodaje 2,5 mL 10%-tne trikloroctene kiseline i 2,5 mL bistrog supernatanta prebacuje se u nove epruvete. Uzeti supernatant pomiješa se s 2,5 mL destilirane vode i 0,5 mL 0,1 %-tne otopine željezovog(III) klorida. Zelenkasto-plavo obojenim ispitivanim otopinama (slika 15) izmjerena je apsorbancija na valnoj duljini od 700 nm, a kao slijepa proba upotrijebljena je destilirana voda. Koncentracije ispitivanih otopina čija je apsorbancija iznosila 0,5, odnosno čija apsorbancija odgovara 50%-tnoj redukcijskoj sposobnosti (IC_{50}) dobivene su linearnom interpolacijom iz odnosa izmjerenih vrijednosti apsorbancija i pripadajućih koncentracija uzoraka.



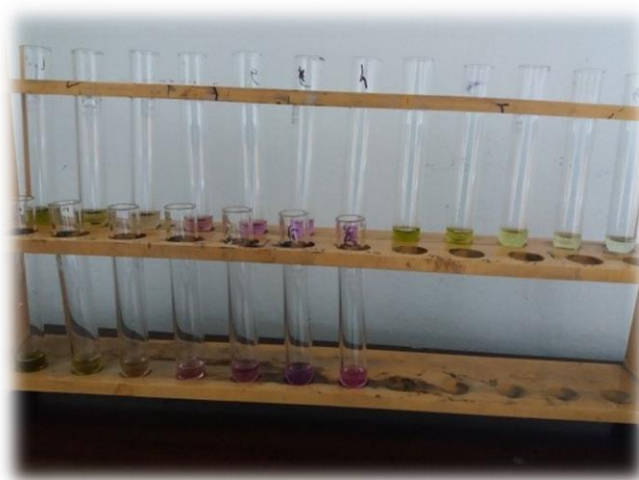
Slika 15. Određivanje sposobnosti redukcije

3.5.4. Određivanje sposobnosti keliranja iona željeza(II)

Sposobnost keliranja iona željeza(II) ispitana je spektrofotometrijskom metodom opisanom u radu Benabdallah i sur. (2016). Kako bi se ispitala sposobnost keliranja željeza(II) kod ekstrakata vrsta roda *Salvia*, uzorci su otopljeni u 70 %-tnom etanolu te je potom za ispitivanje serijskim razrjeđivanjem pripremljen niz koncentracija u rasponu od 100 do 1600 µg/mL. U epruvete koje su sadržavale 300 µL uzorka dodano je 300 µL 0,1 mM otopine željezovog(II) sulfata. Reakcijska smjesa inkubira se deset minuta na sobnoj temperaturi. Nakon dodatka 300 µL 0,25 mM otopine ferozina reakcijska smjesa se dobro promućka i potom ponovno inkubira deset minuta na sobnoj temperaturi. Ružičasto obojenim otopinama (slika 16) izmjerena je apsorbancija na valnoj duljini od 562 nm, a kao slijepa proba upotrijebljen je 70 %-tni etanol. Usporedno je kao referentni kelator ispitana EDTA. Postotak inhibicije ferozin – Fe²⁺ kompleksa, odnosno učinak keliranja iona metala, računa se prema sljedećoj jednadžbi:

$$\% \text{ keliranja željeza(II)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

gdje A_0 predstavlja apsorbanciju kontrolne otopine koja je umjesto uzorka sadržavala ekvivalentnu količinu otapala, odnosno 70 %-tnog etanola, a A_1 predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine umanjenu za vrijednost apsorbancije samog uzorka. Koncentracija uzorka koja ostvaruje 50 %-tni učinak (IC_{50}) dobivena je interpolacijom na temelju linearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka.



Slika 16. Određivanje sposobnosti keliranja iona željeza (II)

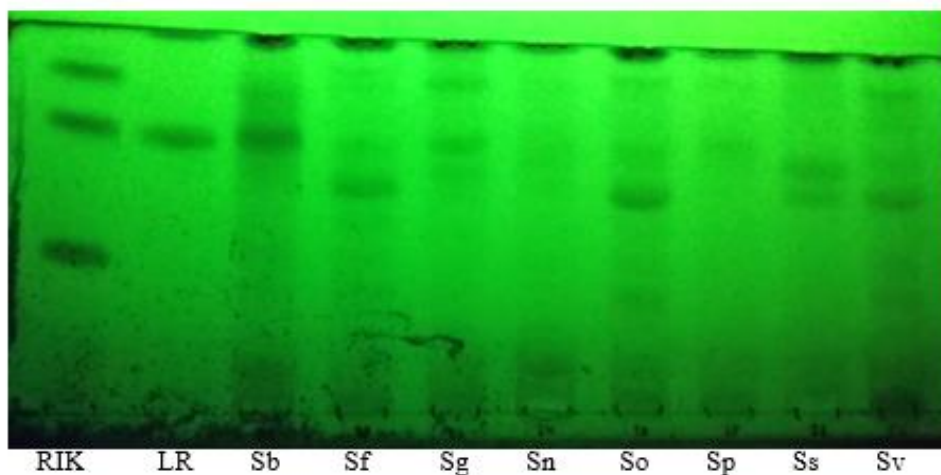
3.6. Statistička analiza

Računalni program Microsoft Excel 2010 programskog paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD) korišten je za statističku obradu dobivenih rezultata. Isti su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija triju određivanja. IC₅₀ vrijednosti dobivene su interpolacijom na temelju linearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka.

4. Rezultati i rasprava

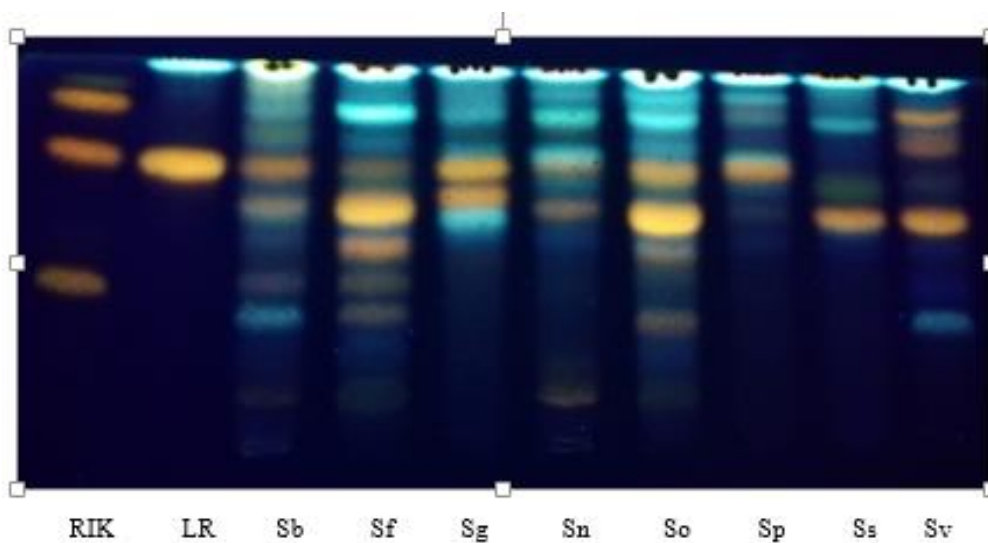
4.1. Flavonoidi i fenolne kiseline u odabranim vrstama roda *Salvia*

Metodom tankoslojne kromatografije provedena je kvalitativna analiza metanolnih ekstrakata vrsta roda *Salvia*. Prisutnost ružmarinske kiseline i flavonoida ispitana je na tankom sloju silikagela primjenom NST/PEG reagensa za detekciju i odgovarajućih mobilnih faza. Komponente su vizualizirane pod UV svjetlom na valnim duljinama od 254 nm i 365 nm prije i nakon prskanja ploče odgovarajućim reagensom. Rezultati su prikazani na slikama 17 i 18. Spojevi su identificirani prema faktoru zaostajanja R_F , odnosno prema položaju odijeljenih zona kao i boji i intenzitetu tih zona, u usporedbi s odgovarajućim poredbenim otopinama koje se sastoje od referentnih spojeva. S ciljem ispitivanja prisutnosti fenolnih spojeva provedena je metoda tankoslojne kromatografije metanolnih ekstrakata primjenom etil-acetata, mravlje kiseline i vode kao mobilne faze u volumnom omjeru 8:1:1. Jedna poredbena otopina sastoji se od rutina, izokvercitrina i kvercitrina, a druga od luteolin-7-O-glukozida te ružmarinske kiseline. Nakon prskanja ploče odgovarajućim reagensom, promatranjem na 365 nm uočene su zone plave boje u svim uzorcima. Plava zona R_F vrijednosti u iznosu od 0,96 odgovarala je ružmarinskoj kiselini. Zona intenzivne narančaste boje s R_F vrijednošću 0,71 u poredbenoj otopini 2 odgovarala je luteolin-7-O-glukozidu. Usporedbom zona vidi se da je luteolin-7-O-glukozid prisutan u svim uzorcima, no u vrstama *S. sclarea* i *S. verticillata* u nižoj koncentraciji budući da su zone slabijeg intenziteta. Narančasta zona, koja udaljenošću od starta odgovara kvercitrinu čiji je R_F 0,88, prisutna je samo u uzorku vrste *S. verticillata*. R_F vrijednost izokvercitrina iznosi 0,74 i uočeno je da nije prisutan ni u jednom uzorku. Na udaljenosti od oko 0,4 od starta uočene su narančaste zone u vrstama *S. brachyodon*, *S. fruticosa* i *S. officinalis*, što ukazuje na prisutnost rutina. Dobiveni kromatogrami pokazuju veliku sličnost sadržaja flavonoida i fenolnih spojeva u ispitanim biljnim vrstama.



Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ TLC ploča
Pokretna faza: etilacetat-mravljja kiselina-voda 8:1:1 (V/V/V)
Detekcija: UV-254nm
Metanolni biljni ekstrakti: Sb- *S. brachyodon*, Sf-*S. fruticosa*, Sg-*S. glutinosa*, Sn-*S. nemorosa*, So-*S. officinalis*, Sp-*S. pratensis*, Ss-*S. sclarea*, Sv-*S. verticillata*
Poredbene otopine: RIK-rutin, izokvercitrin, kvercitrin, LR- luteolin-7-o-glukozid, ružmarinska kiselina

Slika 17. Zone gašenja fluorescencije na kromatogramu fenolnih spojeva u listovima vrsta roda *Salvia*



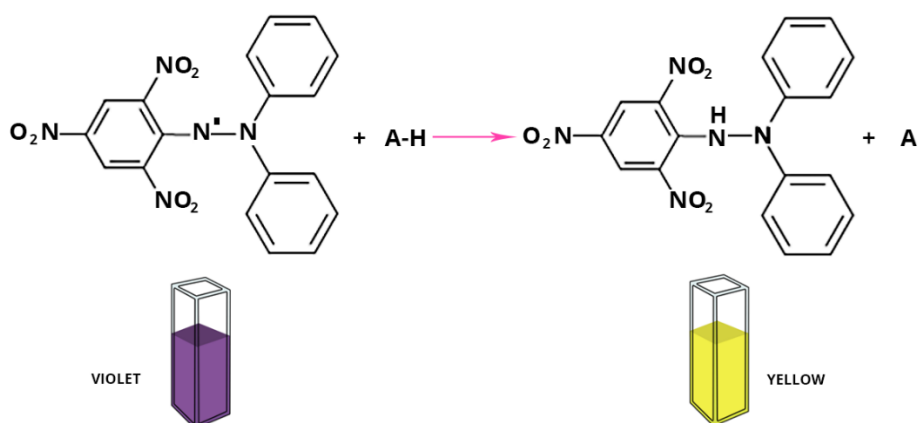
Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ TLC ploča
Pokretna faza: etilacetat-mravljja kiselina-voda 8:1:1 (V/V/V)
Detekcija: NST/PEG, UV-365 nm
Metanolni biljni ekstrakti: Sb- *S. brachyodon*, Sf-*S. fruticosa*, Sg-*S. glutinosa*, Sn-*S. nemorosa*, So-*S. officinalis*, Sp-*S. pratensis*, Ss-*S. sclarea*, Sv-*S. verticillata*
Poredbene otopine: RIK-rutin, izokvercitrin, kvercitrin, LR- luteolin-7-o-glukozid, ružmarinska kiselina

Slika 18. Kromatogram fenolnih spojeva u listovima vrsta roda *Salvia*

4.2. Antioksidacijsko djelovanje odabranih vrsta roda *Salvia*

4.2.1. Sposobnost hvatanja DPPH slobodnog radikala

Sposobnost ispitivanih ekstrakata biljnih vrsta roda *Salvia* da neutraliziraju slobodne radikale određena je spektrofotometrijskom metodom hvatanja DPPH radikala. Navedena metoda koristi se za evaluaciju učinkovitosti hvatanja slobodnih radikala raznih supstanci koje imaju antioksidacijski potencijal. DPPH(1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) u središtu strukture ima dušik s nesparenim elektronom i zbog toga reagira s fenolima putem 2 različita mehanizma: izravnom apstrakcijom fenolnih vodikovih atoma i procesom prijenosa elektrona. Doprinosa jednog ili drugog puta ovisi o prirodi otapala i/ili o redoks potencijalima tvari koje su u interakciji. DPPH je stabilni slobodni radikal s karakterističnom apsorpcijom na valnoj duljini od 517 nm. U interakciji s DPPH antioksidansi mu predaju ili elektron ili vodikov atom time neutralizirajući njegovu radikalnu sposobnost. Boja reakcijske smjese se mijenja iz ružičaste u žutu usporedno sa smanjenjem apsorpcije na valnoj duljini od 517 nm (slika 19). Stupanj promjene boje indicira antioksidacijski potencijal supstance (Vladimir-Knežević i sur., 2011).



Slika 19. Prikaz reakcije DPPH radikala i antioksidansa (preuzeto s <http://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe>)

Kako bi se ispitala antioksidacijska svojstva etanolnih ekstrakata biljnih vrsta roda *Salvia* i referentnog antioksidansa troloksa, pripremljeni su koncentracijski nizovi razrjeđenja u rasponu od 0,39 do 100 $\mu\text{g/mL}$, a apsorpcija je mjerena na valnoj duljini od 517 nm. Inhibicija slobodnog DPPH radikala za pojedine koncentracije uzoraka izračunata je i izražena u postocima (%). Dobiveni rezultati prikazani u tablici 2 pokazuju da ekstrakti biljnih vrsta roda *Salvia* posjeduju sposobnost hvatanja DPPH radikala, a utvrđena aktivnost ovisi o

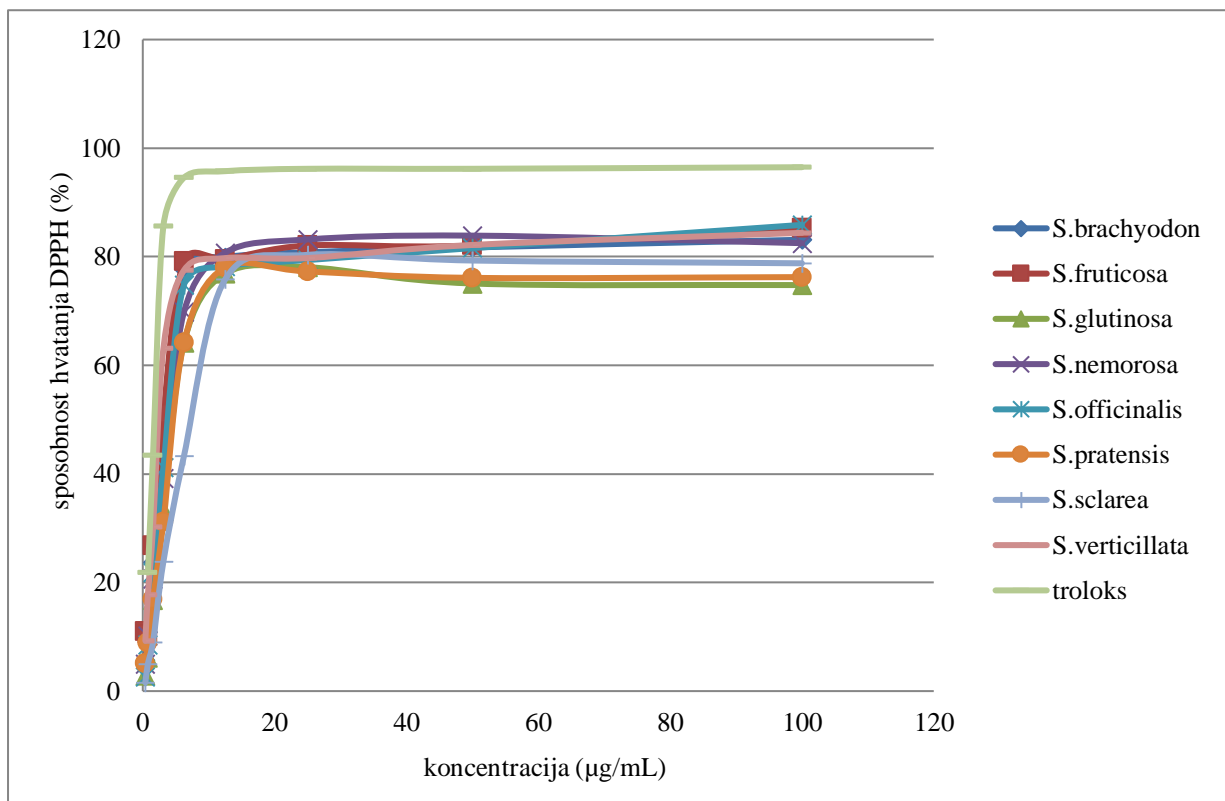
primijenjenoj koncentraciji. Aktivnosti ekstrakata u koncentracijama 0,78 µg/mL, 1,56 µg/mL, 3,125 µg/mL i 6,25 µg/mL iznosile su 5-18%, 9-30%, 23-63 % i 43-79 %. Pri navedenim koncentracijama najveću antioksidacijsku aktivnost imao je ekstrakt biljne vrste *S. verticillata* dok je najslabija aktivnost izmjerena kod biljne vrste *S. sclarea*. Pri koncentracijama od 12,5 µg/mL i višim svi testirani uzorci ušli su u tzv. plato-fazu, što znači da se daljnjim povećanjem koncentracije uzoraka sposobnost hvatanja DPPH nije značajno mijenjala ili je ostala nepromijenjena. Troloks je očekivano pokazao bolju antioksidacijsku aktivnost od testiranih ekstrakata. Pri koncentraciji od 1,56 µg/mL neutralizirao je čak 43,49 % slobodnih DPPH radikala.

Tablica 2. Sposobnost hvatanja slobodnog DPPH radikala etanolnih ekstrakata listova odabranih vrsta roda *Salvia* i referentnog antioksidansa troloksa

Uzorak	Sposobnost hvatanja slobodnog radikala DPPH (%) \pm SD								
	100 μ g/mL	50 μ g/mL	25 μ g/mL	12,5 μ g/mL	6,25 μ g/mL	3,13 μ g/mL	1,56 μ g/mL	0,78 μ g/mL	0,39 μ g/mL
<i>S.brachyodon</i>	83,13 \pm 0,12	81,71 \pm 0,11	80,82 \pm 0,15	79,93 \pm 0,10	77,61 \pm 2,69	49,17 \pm 1,07	23,79 \pm 4,35	10,85 \pm 2,34	5,68 \pm 1,97
<i>S. fruticosa</i>	85,33 \pm 0,33	82,06 \pm 1,89	82,07 \pm 0,16	79,53 \pm 1,39	79,16 \pm 0,88	51,09 \pm 0,26	26,80 \pm 2,94	10,49 \pm 5,59	11,05 \pm 0,21
<i>S. glutinosa</i>	74,78 \pm 0,43	75,07 \pm 1,29	78,06 \pm 0,51	76,89 \pm 0,41	64,21 \pm 2,04	33,23 \pm 1,42	16,78 \pm 1,63	6,19 \pm 1,44	2,87 \pm 0,18
<i>S. nemorosa</i>	82,50 \pm 0,29	83,89 \pm 0,21	83,19 \pm 0,28	80,74 \pm 0,33	69,84 \pm 3,34	39,14 \pm 3,48	20,63 \pm 1,77	10,22 \pm 0,77	5,03 \pm 0,23
<i>S. officinalis</i>	85,87 \pm 0,45	81,59 \pm 0,24	79,39 \pm 0,37	78,21 \pm 0,05	74,82 \pm 0,67	41,24 \pm 2,16	21,80 \pm 0,05	8,54 \pm 0,85	2,65 \pm 0,83
<i>S. pratensis</i>	76,25 \pm 0,51	76,11 \pm 0,12	77,29 \pm 0,29	78,02 \pm 1,32	64,17 \pm 2,26	31,13 \pm 1,02	16,93 \pm 0,47	8,86 \pm 0,53	5,15 \pm 1,40
<i>S. sclarea</i>	78,79 \pm 0,05	79,30 \pm 0,30	80,35 \pm 1,28	75,83 \pm 0,19	43,31 \pm 1,34	23,83 \pm 3,75	9,04 \pm 3,92	5,05 \pm 0,23	1,57 \pm 0,74
<i>S. verticillata</i>	84,40 \pm 0,78	82,17 \pm 0,89	79,76 \pm 0,75	79,75 \pm 1,27	77,51 \pm 0,28	63,08 \pm 0,00	30,18 \pm 2,43	17,74 \pm 2,79	9,28 \pm 7,67
troloks	96,49 \pm 0,01	96,20 \pm 0,40	96,20 \pm 0,01	95,76 \pm 0,62	94,56 \pm 0,23	85,65 \pm 2,93	43,49 \pm 0,12	21,81 \pm 2,23	-

*-:nije testirano; Rezultati su izraženi u postocima (%) kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija dvaju određivanja.

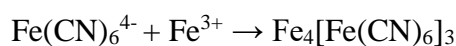
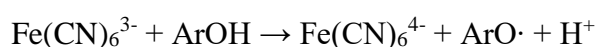
Slika 20. prikazuje antioksidacijsko djelovanje etanolnih ekstrakata listova biljnih vrsta roda *Salvia* i referentnog antioksidansa troloksa. Troloks je već pri koncentraciji od 6,25 $\mu\text{g/mL}$ postigao svoj maksimalni učinak dok se djelovanje kadulja približilo troloksu tek pri koncentraciji od 25 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrakti kadulja imaju sličnu aktivnost pri testiranim koncentracijama, no *S. verticillata* se dobivenim vrijednostima najviše približila troloksu te se može istaknuti kao kadulja s najjačim djelovanjem. Vrsta *S. sclarea* pokazala je najslabije djelovanje.



Slika 20. Usporedni grafički prikaz sposobnosti hvatanja DPPH radikala za različite koncentracije etanolnih ekstrakata listova vrsta roda *Salvia* i troloksa

4.2.2. Sposobnost redukcije iona željeza(III)

Mnoge studije ukazuju na povezanost sposobnosti doniranja elektrona, odnosno redukcijske moći bioaktivne supstance i antioksidacijske aktivnosti. Sposobnost redukcije generalno je povezana s prisutnošću reduktona koji vrše antioksidacijsku aktivnost kidajući lanac slobodnih radikala. Osim toga, reduktoni mogu reducirati oksidirane intermedijere procesa lipidne peroksidacije kako bi se mogli ponašati kao primarni i sekundarni antioksidansi. Metodom određivanja sposobnosti redukcije mjeri se sposobnost doniranja elektrona nekog antioksidansa pomoću metode redukcije kompleksa kalijevog heksacijanoferata. Antioksidans uzrokuje redukciju Fe³⁺/cijanoferatnog kompleksa u Fe²⁺, a antioksidacijska aktivnost mjeri se porastom apsorbancije pri valnoj duljini od 700 nm. Žuta boja ispitivane otopine mijenja se u različite nijanse zelene i plave ovisno o redukcijskoj moći ispitivanog uzorka (Vladimir-Knežević i sur.,2011). Metoda se izvodi u kiselom mediju uz dodatak soli trovalentnog željeza, a plavo obojena otopina koja nastaje kao produkt još se naziva i Berlinsko modriilo. Navedena reakcija može se prikazati na sljedeći način:



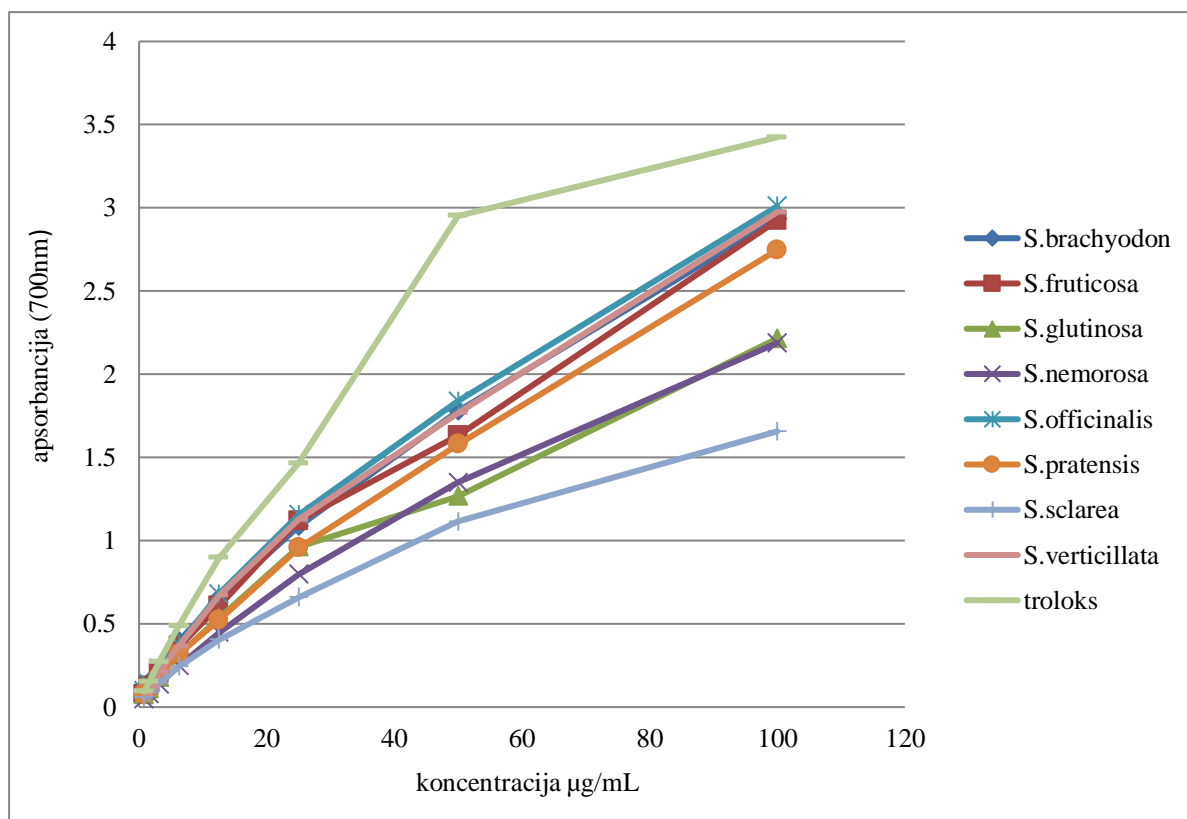
Kako bi se ispitalo antioksidacijsko djelovanje etanolnih ekstrakata biljnih vrsta roda *Salvia* i referentnog antioksidansa troloksa, pripremljeni su koncentracijski nizovi razrjeđenja u rasponu od 0,78 do 100 µg/mL, a apsorbancija je mjerena na valnoj duljini od 700 nm. Izmjerene vrijednosti apsorbancije pri različitim koncentracijama ekstrakata biljnih vrsta roda *Salvia* i troloksa prikazane su u tablici 3. Iz rezultata možemo vidjeti da su gotovo sve kadulje pri koncentraciji od 12,5 µg/mL postigle apsorbanciju veću od 0,5 što odgovara njihovoj sposobnosti 50 %-tne redukcije. Pri toj koncentraciji najvišu vrijednost apsorbancije imala je vrsta *S. officinalis*, a ona iznosi 0,681, dok je najmanja vrijednost apsorbancije od 0,405 zabilježena za vrstu *S. sclarea*. Troloks je pokazao bolju sposobnost redukcije od ekstrakata pri svim koncentracijama, a pri koncentraciji od 6,25µg/mL imao je gotovo 50 %-tnu sposobnost redukcije, s vrijednošću apsorbancije 0,488.

Tablica 3. Redukcijska sposobnost etanolnih ekstrakata listova odabranih vrsta roda *Salvia* i referentnog antioksidansa troloksa

Uzorak	Apsorbancija na 700 nm \pm SD							
	100 μ g/mL	50 μ g/mL	25 μ g/mL	12,5 μ g/mL	6,25 μ g/mL	3,13 μ g/mL	1,56 μ g/mL	0,78 μ g/mL
<i>S.brachyodon</i>	2,933 \pm 0,067	1,778 \pm 0,075	1,086 \pm 0,035	0,653 \pm 0,032	0,396 \pm 0,012	0,222 \pm 0,001	0,149 \pm 0,018	0,090 \pm 0,002
<i>S. fruticosa</i>	2,924 \pm 0,066	1,631 \pm 0,086	1,118 \pm 0,091	0,608 \pm 0,017	0,363 \pm 0,038	0,201 \pm 0,011	0,125 \pm 0,001	0,076 \pm 0,002
<i>S. glutinosa</i>	2,215 \pm 0,021	1,267 \pm 0,100	0,964 \pm 0,080	0,535 \pm 0,004	0,315 \pm 0,004	0,181 \pm 0,001	0,110 \pm 0,001	0,077 \pm 0,007
<i>S. nemorosa</i>	2,188 \pm 0,180	1,350 \pm 0,028	0,798 \pm 0,031	0,447 \pm 0,005	0,248 \pm 0,010	0,137 \pm 0,004	0,080 \pm 0,001	0,047 \pm 0,003
<i>S. officinalis</i>	3,099 \pm 0,249	1,839 \pm 0,013	1,156 \pm 0,018	0,681 \pm 0,023	0,375 \pm 0,008	0,232 \pm 0,017	0,139 \pm 0,008	0,098 \pm 0,020
<i>S. pratensis</i>	2,747 \pm 0,040	1,578 \pm 0,025	0,956 \pm 0,008	0,523 \pm 0,022	0,319 \pm 0,013	0,179 \pm 0,002	0,107 \pm 0,008	0,075 \pm 0,001
<i>S. sclarea</i>	1,657 \pm 0,052	1,115 \pm 0,015	0,659 \pm 0,034	0,405 \pm 0,014	0,243 \pm 0,024	0,143 \pm 0,005	0,087 \pm 0,001	0,059 \pm 0,003
<i>S. verticillata</i>	2,974 \pm 0,065	1,768 \pm 0,096	1,127 \pm 0,062	0,670 \pm 0,003	0,365 \pm 0,010	0,210 \pm 0,001	0,122 \pm 0,003	0,079 \pm 0,002
troloks	3,424 \pm 0,008	2,952 \pm 0,003	1,466 \pm 0,001	0,897 \pm 0,016	0,488 \pm 0,004	0,271 \pm 0,007	0,151 \pm 0,002	0,093 \pm 0,001

*Rezultati su izraženi u postotcima (%) kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija dvaju određivanja

Slika 21 predstavlja grafički prikaz ovisnosti sposobnosti redukcije Fe^{3+} iona o primijenjenoj koncentraciji ekstrakata vrsta roda *Salvia* i referentnog antioksidansa. Iz grafa je vidljiva linearna ovisnost apsorbancije odnosno sposobnosti redukcije testiranih ekstrakata o primijenjenoj koncentraciji ($R^2 = 0,986-0,997$). Pri svim koncentracijama vrsta *S. officinalis* ima najveću apsorbanciju u odnosu na ostale ekstrakte, a vrsta *S. sclarea* najmanju.



Slika 21. Usporedni grafički prikaz sposobnosti redukcije Fe^{3+} iona za različite koncentracije etanolnih ekstrakata vrsta roda *Salvia* i troloksa

4.2.3. Sposobnost keliranja iona željeza(II)

Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva može se vidjeti i iz njihove sposobnosti keliranja iona prijelaznih metala, poput iona željeza i bakra, koji su predloženi kao katalizatori za početno formiranje reaktivnih kisikovih vrsta. Kelirajuća sredstva mogu stabilizirati pro-oksidativne ione metala u živom sustavu tako da stvore kompleks s njima. Fe^{2+} ion poznat je kao moćan pokretač lipidne peroksidacije. On razlaže vodik i lipidne perokside na reaktivne slobodne radikale putem Fentonove reakcije i na taj način ubrzava lipidnu peroksidaciju. Ferozin može kvantitativno formirati komplekse s Fe^{2+} . U prisustvu kelirajućeg agensa ometano je formiranje kompleksa što rezultira smanjenjem crvene boje kompleksa. Mjerenje smanjenja intenziteta boje na valnoj duljini od 562 nm dopušta procjenu sposobnosti keliranja iona metala koegzistirajućeg kelatora (Vladimir-Knežević i sur., 2011). Kako bi se ispitalo antioksidacijsko djelovanje etanolnih ekstrakata biljnih vrsta roda *Salvia* i referentnog antioksidansa EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina), pripremljeni su koncentracijski nizovi razrjeđenja u rasponu od 100 do 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ za ekstrakte te od 0,78 do 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ za EDTA. Ferozin kvantitativno stvara kompleks s Fe^{2+} ionima pri čemu nastaje ružičasto obojen kompleks. Prisustvo kelatora u reakcijskoj smjesi sprječava nastajanje tog kompleksa. Kelirajuća sposobnost ispitivanih ekstrakata može se procijeniti na temelju smanjenja intenziteta obojenja reakcijske smjese. Apsorbancija je mjerena pri 562 nm, a rezultati inhibicije formiranja ferozin- Fe^{2+} kompleksa izraženi su u postocima (%). Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4. Može se vidjeti da je samo vrsta *S. sclarea* pri koncentraciji od 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ imala rezultat veći od 50 %, a on iznosi 69,30 %. Vrste *S. brachyodon*, *S. fruticosa*, *S. officinalis* i *S. verticillata* su tek pri najvećoj koncentraciji od 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pokazale učinak keliranja veći od 50 %. Testirana kadulja s najmanjom sposobnosti keliranja je vrsta *S. fruticosa* koja pri 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ima sposobnost keliranja tek 52,57 %. S druge strane, EDTA ima učinak keliranja veći od 50 % već pri koncentraciji od 3,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tablica 4. Sposobnost keliranja iona željeza(II) etanolnih ekstrakata listova roda *Salvia*

Uzorak	Sposobnost keliranja iona željeza(II) \pm SD				
	1600 $\mu\text{g/mL}$	800 $\mu\text{g/mL}$	400 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
<i>S.brachyodon</i>	54,31 \pm 0,55	29,47 \pm 1,12	22,86 \pm 3,30	8,68 \pm 0,98	-
<i>S. fruticosa</i>	52,57 \pm 2,25	8,60 \pm 1,95	1,66 \pm 0,63	1,36 \pm 1,06	0,38 \pm 0,11
<i>S. glutinosa</i>	59,02 \pm 1,39	56,10 \pm 2,11	42,69 \pm 1,86	22,63 \pm 1,88	9,58 \pm 0,13
<i>S. nemorosa</i>	83,99 \pm 1,56	76,12 \pm 1,15	55,61 \pm 1,75	23,81 \pm 0,21	3,81 \pm 1,34
<i>S. officinalis</i>	75,23 \pm 0,00	24,14 \pm 0,44	6,31 \pm 0,11	-	-
<i>S. pratensis</i>	74,70 \pm 2,23	68,10 \pm 1,80	61,71 \pm 0,42	19,52 \pm 6,80	5,86 \pm 4,04
<i>S. sclarea</i>	83,71 \pm 0,74	83,55 \pm 0,94	83,40 \pm 0,52	69,30 \pm 4,55	30,70 \pm 3,30
<i>S. verticillata</i>	54,36 \pm 1,97	45,02 \pm 1,21	26,83 \pm 2,52	9,92 \pm 3,50	2,90 \pm 1,74

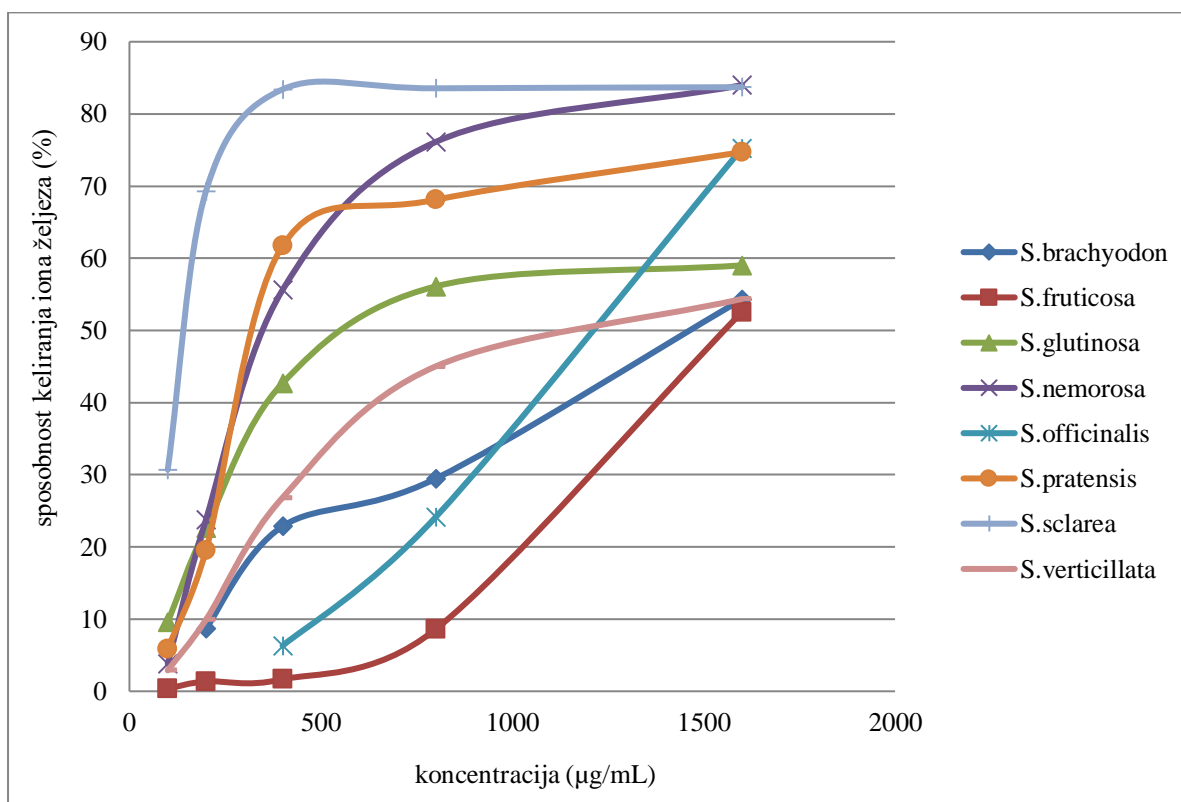
*-: nije testirano; Rezultati su izraženi u postotcima (%) kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija dvaju određivanja.

Tablica 5. Spособnost keliranja iona željeza(II) etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA)

Uzorak	Spособnost keliranja iona željeza(II) \pm SD				
	12,5 $\mu\text{g/mL}$	6,25 $\mu\text{g/mL}$	3,13 $\mu\text{g/mL}$	1,56 $\mu\text{g/mL}$	0,78 $\mu\text{g/mL}$
EDTA	97,68 \pm 0,34	97,28 \pm 0,23	63,50 \pm 1,02	12,78 \pm 3,62	1,60 \pm 2,26

*Rezultati su izraženi u postocima (%) kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija dvaju određivanja.

Slika 22 predstavlja grafički prikaz ovisnosti sposobnosti keliranja Fe^{2+} iona o primijenjenoj koncentraciji ekstrakata vrsta roda *Salvia*. Iz grafa je vidljivo da vrsta *S. sclarea* ima najveću sposobnost keliranja pri svim ispitanim koncentracijama, a najmanju vrsta *S. fruticosa*, također pri svim koncentracijama.



Slika 22 . Usporedni grafički prikaz sposobnosti keliranja iona željeza (II) ekstrakata vrsta roda *Salvia*

4.2.4. Usporedna antioksidacijska aktivnost etanolnih ekstrakata vrsta roda *Salvia*

U okviru ovog diplomskog rada ispitano je antioksidacijsko djelovanje etanolnih ekstrakata biljnih vrsta roda *Salvia*, u usporedbi s troloksom i EDTA kao referentnim antioksidansima, ovisno o korištenoj spektrofotometrijskoj metodi.

Iz tablice 6 vidljiv je usporedni prikaz izračunatih IC_{50} vrijednosti za primjenjene metode. IC_{50} vrijednosti označavaju koncentraciju ispitivane tvari pri kojoj se ostvaruje 50 %-tni učinak. Primjenom metode sposobnosti hvatanja DPPH radikala dobivene su IC_{50} vrijednosti ispitanih ekstrakata u rasponu od 3,88 do 7,93 $\mu\text{g/mL}$. Manja vrijednost znači bolju antioksidacijsku aktivnost. Rezultati pokazuju da vrsta *S. verticillata* ima najbolji antioksidacijski učinak jer vrijednost IC_{50} iznosi 3,88 $\mu\text{g/mL}$, dok najmanji učinak ima *S. sclarea* s IC_{50} u iznosu 7,93 $\mu\text{g/mL}$. Za usporedbu, IC_{50} referentnog antioksidansa, troloksa, iznosi 2,04 $\mu\text{g/mL}$. Pri mjerenju sposobnosti redukcije iona željeza (III) dobivene su vrijednosti IC_{50} ispitanih ekstrakata u rasponu od 9,43 do 18,36 $\mu\text{g/mL}$. Kadulja s najnižom IC_{50} vrijednosti (9,43 $\mu\text{g/mL}$), odnosno s najvećim antioksidacijskim učinkom je vrsta *S. officinalis*, a ona s najvišom IC_{50} (18,36 $\mu\text{g/mL}$), odnosno najmanjim učinkom je vrsta *S. sclarea*. IC_{50} troloksa iznosi 7,14 $\mu\text{g/mL}$. Metoda sposobnosti keliranja iona željeza(II) pokazuje da najbolji antioksidacijski učinak ima vrsta *S. sclarea* s vrijednošću IC_{50} 163,55 $\mu\text{g/mL}$, a najmanji učinak ima vrsta *S. fruticosa* čija IC_{50} vrijednost iznosi 1592,53 $\mu\text{g/mL}$. Dobiveni rezultati ukazuju da sve kadulje posjeduju antioksidacijska svojstva koja se temelje na sposobnosti hvatanja slobodnih radikala te redukciji i keliranju iona željeza.

Tablica 6. Usporedni prikaz IC₅₀ vrijednosti etanolnih ekstrakata listova odabranih vrsta roda *Salvia* te referentnih antioksidansa troloksa i EDTA

Uzorak	IC ₅₀ (µg/mL)		
	Sposobnost hvatanja slobodnog radikala DPPH	Sposobnost redukcije iona željeza(III)	Sposobnost keliranja iona željeza(II)
<i>S. brachyodon</i>	5,51±0,14	10,15±0,07	1471,6±16,69
<i>S. fruticosa</i>	5,27±0,28	11,42±0,43	1592,53±58,75
<i>S. glutinosa</i>	6,74±0,02	11,98±0,77	719,77±25,68
<i>S. nemorosa</i>	6,05±0,22	14,92±0,54	363,81±7,56
<i>S. officinalis</i>	6,01±0,04	9,43±0,17	1185,54±1,82
<i>S. pratensis</i>	6,66±0,02	12,12±0,00	343,46±7,91
<i>S. sclarea</i>	7,93±0,10	18,36±1,42	163,55±22,31
<i>S. verticillata</i>	3,88±0,00	10,71±0,04	1303,78±87,40
troloks	2,04±0,12	7,14±0,02	-
EDTA	-	-	3,18±0,11

*-: nije testirano; Rezultati su izraženi u postocima (%) kao srednja vrijednost ± standardna devijacija dvaju određivanja.

5. Zaključak

U okviru ovog diplomskog rada ispitan je antioksidacijski učinak i sadržaj polifenolnih spojeva u listovima odabranih vrsta roda *Salvia* (*S. brachyodon* Vandas, *S. fruticosa* Mill., *S. glutinosa* L., *S. nemorosa* L., *S. officinalis* L., *S. pratensis* L., *S. sclarea* L. i *S. verticillata* L.) iz hrvatske flore. Prisutnost flavonoida i fenolnih kiselina u metanolnim ekstraktima vrsta roda *Salvia* dokazana je tankoslojnom kromatografijom. Svi su ispitanu uzorci sadržavali ružmarinsku kiselinu i luteolin-7-O-glukozidu. Kvercitrin je prisutan samo u vrsti *S. verticillata*, a rutin u vrstama *S. brachyodon*, *S. fruticosa* i *S. officinalis*.

Primjenom triju različitih spektrofotometrijskih metoda ispitana su antioksidacijska svojstva etanolnih ekstrakata vrsta roda *Salvia*. Svi su ekstrakti pokazali antioksidacijsko djelovanje, što se očituje iz dobivenih IC_{50} vrijednosti. Ustanovljena je sposobnost hvatanja DPPH radikala (IC_{50} : 3,88-7,93 $\mu\text{g/mL}$), redukcije iona željeza(III) (IC_{50} : 9,43 - 18,36 $\mu\text{g/mL}$) te keliranja iona željeza(II) (IC_{50} : 163,55 - 1592,53 $\mu\text{g/mL}$). U provedenom testiranju vrsta *S. verticillata* je pokazala najveći antiradikalni učinak, vrsta *S. officinalis* najveću redukcijsku snagu, a vrsta *S. sclarea* najsnažniju kelirajuću sposobnost.

Iz dobivenih rezultata proizlazi zaključak da ispitane vrste roda *Salvia* posjeduju antioksidacijska svojstva koja se mogu velikim dijelom pripisati sadržaju flavonoida i fenolnih kiselina, što ukazuje na opravdanost budućih istraživanja i potencijal primjene u prevenciji i liječenju različitih bolesti u čijoj je podlozi oksidacijski stres.

6. Literatura

- Antolić A, Maleš Ž, Tomičić M, Bojić M. Učinak ekstrakata kratkozupčaste i dalmatinske kadulje na agregaciju trombocita. *Food Technol Biotechnol*, 2018, 56(2), str. 265-269.
- Bardakci Altan H, Akaydin G, Kirmizibekmez H, Yesilada E. Validated HPTLC Method for the quantitative analysis of rosmarinic acid in several *Salvia* sp. *Turk J Pharm Sci*, 2014, 11(3), 245-254.
- Benabdallah A, Rahmoune C, Boumendjel M, Aissi O, Messaoud C. Total phenolic content and antioxidant activity of six wild *Mentha* species (Lamiaceae) from northeast of Algeria. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2016, 6(9), 760-766.
- Coisin M, Necula R, Grigora V, Gille E, Rosenhech E, Zamfirache M. Phytochemical evaluation of some *Salvia* species from Romanian flora. *Scientific Annals of Alexandru Ioan Cuza University of Iasi. New Series, Section IIA, Vegetal Biolog*, 2012, 58, 35-44.
- Domac R. Flora za određivanje i upoznavanje bilja. Zagreb, Hrvatska seljačka tiskara, 1950. str. 333-334.
- Ghorbani A, Esmailizadeh M. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *J Trad Complem Med*, 2017, 7(4), 433-440.
- <https://www.amazon.com>, pristupljeno 17.07.2020.
- <http://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe>, pristupljeno 21.07.2020.
- <http://hirc.botanic.hr>, pristupljeno 14.07.2020.
- <https://www.medchemexpress.com>, pristupljeno 21.07.2020.
- <https://www.mostlynatives.com>, pristupljeno 18.07.2020.
- <https://www.plantea.com.hr>, pristupljeno 17.07.2020.
- <https://www.researchgate.net>, pristupljeno 22.07.2020.
- <https://www.wikipedia.org>, 20.07.2020.

- Khan A, Rehman N, AlKharfy KM, Gilani AH. Antidiarrheal and antispasmodic activities of *Salvia officinalis* mediated through activation of K⁺ channels. *Bangladesh J Pharmacol*, 2011, 6: 111-116.
- Kindl M, Blažeković B, Bucar F, Vladimir-Knežević S. Antioxidant and anticholinesterase potential of six *Thymus* species. *Evid Based Compl Altern Med*, 2015, 1-10.
- Kivrak S, Göktürk T, Kivrak I, Kaya E, Karababa E. Investigation of phenolic profiles and antioxidant activities of some *Salvia* species commonly grown in Southwest Anatolia using UPLC-ESI-MS/MS. *Food Sci Technol*, 2018.
- Liber Z, Bogdanović S, Radosavljević I, Pruša M, Filipović M, Stešević D, Šatović Z. Morphological Analysis of Short-Tooth Sage (*Salvia brachyodon* Vandas) Populations. *Agric Conspec Sci*, 2014, 79(2), str. 71-76.
- Loizzo MR, Abouali M, Salehi P, Sonboli A, Kanani M, Menichini F, Tundis R. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of nine *Salvia* species. *Nat Prodt Res* 2014, 28:24,2278-2285.
- Miroddi M, Navarra M, Quattropani MC, Calapai F, Gangemi S, Calapai G. Systematic Review of Clinical Trials Assessing Pharmacological Properties of *Salvia* Species on Memory, Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *CNS Neurosci Ther*, 2014, 20(6), 485-495.
- Narayanan N, Thangavelu L. *Salvia officinalis* in dentistry. *Dent Hypotheses*, 2015, 6:27-30.
- Nickavar B, Rezaee J, Nickavar A. Effect-Directed Analysis for the Antioxidant Compound in *Salvia verticillata*. *Iranian J Pharmac Res*, 2016, 15(1): 241–246.
- Nikolova M. Screening of radical scavenging activity and polyphenol content of Bulgarian plant species, *Pharmacognosy Res*, 2011, 3(4), 256.
- Nikolova MT, Grayer RJ, Genova E, Porter EA. Exudate flavonoids from Bulgarian species of *Salvia*. *Biochem System Ecol*, 2006, 34(4), 360-364.
- Pasias IN, Farmaki EG, Thomaidis NS, Piperaki EA. Elemental Content and Total Antioxidant Activity of *Salvia fruticosa*. *Food Anal Meth*, 2009, 3:195–204

- Sajewicz M, Stazsek D, Waksmundzka-Hajnos M, Kowalska T. Comparison of TLC and HPLC fingerprints of phenolic acids and flavonoids fractions derived from selected sage (*Salvia*) species. *J Liq Chromatogr Rel Technol*, 2012, 35:10, 1388-1403
- Soković M, Grubišić D, Ristić M. Chemical Composition and Antifungal Activities of Essential Oils from Leaves, Calyx and Corolla of *Salvia brachyodon* Vandas. *J Ess Oil Res*, 2005, 17:2, 227-229.
- Tosun M, Ercisli S, Sengul M, Ozer H, Polat T, Ozturk E. Antioxidant properties and total phenolic content of eight *Salvia* species from Turkey. *Biolog Res*, 2009, 42: 175-181.
- Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Bival Štefan M, Alegro A, Kőszegi T, Petrik J. Antioxidant Activities and Polyphenolic Contents of Three Selected *Micromeria* Species from Croatia. *Molecules*, 2011, 16(2), 1454-1470.
- Wagner H, Bladt S. Plant Drug Analysis: A thin-layer chromatography atlas. 2. izd., Berlin-Heidelberg, Springer, 2009, str. 195-196.

7. Sažetak/Summary

U okviru ovog diplomskog rada istraženi su prisutnost i antioksidacijski učinak fenolnih spojeva u metanolnim i etanolnim ekstraktima listova odabranih vrsta roda *Salvia* s područja Hrvatske (*S. brachyodon*, *S. fruticosa*, *S. glutinosa*, *S. nemorosa*, *S. officinalis*, *S. pratensis*, *S. sclarea* i *S. verticillata*). Primjenom metode tankoslojne kromatografije dokazana je prisutnost ružmarinske kiseline i luteolin-7-O-glukozida u listovima svih uzoraka. Kvercitrin je prisutan samo u vrsti *S. verticillata*, a rutin u vrstama *S. brachyodon*, *S. fruticosa* i *S. officinalis*. Antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata ispitan je pomoću tri spektrofotometrijske metode u usporedbi s troloksom i EDTA. Utvrđena je sposobnost hvatanja DPPH radikala (IC_{50} : 3,88-7,93 $\mu\text{g/mL}$), redukcije iona željeza(III) (IC_{50} : 9,43- 18,36 $\mu\text{g/mL}$) te keliranja iona željeza(II) (IC_{50} : 163,55-1592,53 $\mu\text{g/mL}$). Dobiveni rezultati pokazuju da istraživane biljne vrste sadrže flavonoide i fenolne kiseline koji doprinose njihovim antioksidacijskim učincima.

The presence of phenolic compounds and their antioxidative effect in methanolic and ethanolic leaf extracts of selected species of the *Salvia* genus from Croatia (*S. brachyodon*, *S. fruticosa*, *S. glutinosa*, *S. nemorosa*, *S. officinalis*, *S. pratensis*, *S. sclarea* and *S. verticillata*) were studied in this diploma thesis. The presence of rosmarinic acid and luteolin-7-O-glucoside was detected by thin-layer chromatography in all leaf samples. Quercitrin was present only in the *S. verticillata* extract and rutin was detected in leaf extracts of *S. brachyodon*, *S. fruticosa* and *S. officinalis*. The antioxidative effects of ethanolic extracts were determined by using three spectrophotometric methods in comparison to trolox and EDTA. The abilities of scavenging DPPH radical (IC_{50} : 3.88-7.93 $\mu\text{g/mL}$), reduce ferric ions (IC_{50} : 9.43-18.36 $\mu\text{g/mL}$) and chelate ferrous ions were determined. The obtained results have shown that the studied plant species contain flavonoids and phenolic acids which contribute to their antioxidative effects.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmakognoziju
Trg Marka Marulića 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG DJELOVANJA ODABRANIH VRSTA RODA *SALVIA L.*

Doris Škugor

SAŽETAK

U okviru ovog diplomskog rada istraženi su prisutnost i antioksidacijski učinak fenolnih spojeva u metanolnim i etanolnim ekstraktima listova odabranih vrsta roda *Salvia* s područja Hrvatske (*S. brachyodon*, *S. fruticosa*, *S. glutinosa*, *S. nemorosa*, *S. officinalis*, *S. pratensis*, *S. sclarea* i *S. verticillata*). Primjenom metode tankoslojne kromatografije dokazana je prisutnost ružmarinske kiseline i luteolin-7-O-glukozida u listovima svih uzoraka. Kvercitrin je prisutan samo u vrsti *S. verticillata*, a rutin u vrstama *S. brachyodon*, *S. fruticosa* i *S. officinalis*. Antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata ispitan je pomoću tri spektrofotometrijske metode u usporedbi s troloksom i EDTA. Utvrđena je sposobnost hvatanja DPPH radikala (IC₅₀: 3,88-7,93 µg/mL), redukcije iona željeza(III) (IC₅₀: 9,43- 18,36 µg/mL) te keliranja iona željeza(II) (IC₅₀: 163,55-1592,53 µg/mL). Dobiveni rezultati pokazuju da istraživane biljne vrste sadrže flavonoide i fenolne kiseline koji doprinose njihovim antioksidacijskim učincima.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 40 stranica, 22 slike, 6 tablica i 30 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Salvia*, flavonoidi, fenolne kiseline, antioksidacijsko djelovanje

Mentor: **Dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Maja Bival Štefan, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2020.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmacognosy
Trg Marka Marulića 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diploma thesis

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF SELECTED SALVIA SPECIES

Doris Škugor

SUMMARY

The presence of phenolic compounds and their antioxidative effect in methanolic and ethanolic leaf extracts of selected species of the *Salvia* genus from Croatia (*S. brachyodon*, *S. fruticosa*, *S. glutinosa*, *S. nemorosa*, *S. officinalis*, *S. pratensis*, *S. sclarea* and *S. verticillata*) were studied in this diploma thesis. The presence of rosmarinic acid and luteolin-7-O-glucoside was detected by thin-layer chromatography in all leaf samples. Quercitrin was present only in the *S. verticillata* extract and rutin was detected in leaf extracts of *S. brachyodon*, *S. fruticosa* and *S. officinalis*. The antioxidative effects of ethanolic extracts were determined by using three spectrophotometric methods in comparison to trolox and EDTA. The abilities of scavenging DPPH radical (IC₅₀: 3.88-7.93 µg/mL), reduce ferric ions (IC₅₀: 9.43-18.36 µg/mL) and chelate ferrous ions were determined. The obtained results have shown that the studied plant species contain flavonoids and phenolic acids which contribute to their antioxidative effects.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 40 pages, 22 figures, 6 tables and 30 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Salvia*, flavonoids, phenolic acids, antioxidant effects

Mentor: **Sanda Vladimir-Knežević, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Sanda Vladimir-Knežević, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Bival Štefan, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Renata Jurišić Grubešić, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2020