

Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidativna aktivnost vrsta *Globularia alypum* L., *G. cordifolia* L., *G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz i *G. punctata* Lapeyr.

Skorup, Stella

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:437489>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

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



Stella Skorup

**Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i
antioksidativna aktivnost vrsta *Globularia
alypum* L., *G. cordifolia* L., *G. meridionalis*
(Podp.) O. Schwarz i *G. punctata* Lapeyr.**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmaceutska botanika Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku botaniku pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Maje Friščić.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Maji Friščić na pruženoj pomoći pri izboru teme i mentoriranju ovog diplomskog rada.

Hvala obitelji, a prvenstveno roditeljima i sestri, na bezuvjetnoj ljubavi, podršci i motivaciji tijekom svih ovih godina.

Zahvaljujem svojim prijateljima i kolegama s fakulteta koji su bili uz mene i zbog kojih će mi ovaj period života ostati u lijepoj uspomeni.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	ROD <i>GLOBULARIA</i> L.....	1
1.1.1.	Taksonomija i rasprostranjenost vrsta roda <i>Globularia</i>	1
1.1.2.	Morfologija vrsta roda <i>Globularia</i>	1
1.1.3.	Vrste roda <i>Globularia</i> u Hrvatskoj	2
1.1.3.1.	<i>Globularia alypum</i> L.....	2
1.1.3.2.	<i>Globularia cordifolia</i> L.....	3
1.1.3.3.	<i>Globularia meridionalis</i> (Podp.) O. Schwarz.....	3
1.1.3.4.	<i>Globularia punctata</i> Lapeyr.....	3
1.1.4.	Djelovanje i primjena vrsta roda <i>Globularia</i>	4
1.1.5.	Kemizam vrsta roda <i>Globularia</i>	8
1.2.	OKSIDATIVNI STRES	9
1.2.1.	Nastanak oksidativnog stresa	9
1.2.2.	Reaktivne vrste u oksidativnom stresu.....	9
1.2.3.	Posljedice oksidativnog stresa	10
1.3.	ANTIOKSIDANSI	11
1.3.1.	Uloga antioksidansa	11
1.3.2.	Podjela antioksidansa	11
1.3.3.	Upotreba antioksidansa	12
1.3.4.	Antioksidansi u vrstama roda <i>Globularia</i>	12
1.4.	POLIFENOLI.....	14
1.4.1.	Struktura i klasifikacija polifenola	14
1.4.2.	Fenolne kiseline	14
1.4.3.	Flavonoidi.....	15
1.4.3.1.	Flavonoli.....	16
1.4.3.2.	Izoflavoni	16
1.4.3.3.	Flavanoni	16
1.4.3.4.	Antocijani.....	16
1.4.3.5.	Flavoni.....	16
1.4.3.6.	Flavanoli.....	17
1.4.4.	Lignani.....	17
1.4.5.	Stilbeni.....	17
1.4.6.	Antioksidativna svojstva polifenola	18
1.5.	METODE ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLA I FLAVONOIDA ..	19
1.5.1.	Određivanje ukupnih polifenola	19

1.5.2. Određivanje flavonoida	20
1.6. METODE ZA ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG DJELOVANJA	21
1.6.1. Test keliranja metala	22
1.6.2. FRAP test	23
1.6.3. ABTS test	24
1.6.4. DPPH Test.....	25
2. OBRAZLOŽENJE TEME	27
3. MATERIJALI I METODE	28
3.1. MATERIJALI	28
3.1.1. Biljni materijal.....	28
3.1.2. Kemikalije	28
3.1.3. Uređaji.....	29
3.1.4. Pribor.....	29
3.2. METODE ISPITIVANJA.....	31
3.2.1. Priprema uzoraka za analizu	31
3.2.2. Određivanje ukupnih polifenola	31
3.2.3. Određivanje flavonoida	33
3.2.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti <i>in vitro</i> testom keliranja metala.....	35
3.2.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti <i>in vitro</i> FRAP testom	37
3.2.6. Određivanje antioksidativne aktivnosti <i>in vitro</i> ABTS testom.....	40
3.2.7. Određivanje antioksidativne aktivnosti <i>in vitro</i> DPPH testom	42
3.3. POSTUPAK ODREĐIVANJA SADRŽAJA UKUPNIH POLIFENOLA, FLAVONOIDA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI	45
3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	46
4. REZULTATI I RASPRAVA	47
4.1. ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLA	47
4.1.1. Baždarni pravac galne kiseline	47
4.1.2. Sadržaj ukupnih polifenola	47
4.2. ODREĐIVANJE FLAVONOIDA	51
4.2.1. Baždarni pravac kvercetina	51
4.2.2. Sadržaj flavonoida.....	51
4.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI <i>IN VITRO</i> TESTOM KELIRANJA METALA	54
4.3.1. Baždarni pravac EDTA	54
4.3.2. Antioksidativna aktivnost uzoraka u testu keliranja metala	54
4.4. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI <i>IN VITRO</i> FRAP TESTOM.....	56
4.4.1. Baždarni pravac troloksa u FRAP testu	56

4.4.2. Antioksidativna aktivnost uzoraka u FRAP testu.....	56
4.5. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI <i>IN VITRO</i> ABTS TESTOM.....	58
4.5.1. Baždarni pravac troloksa u ABTS testu	58
4.5.2. Antioksidativna aktivnost uzoraka u ABTS testu	58
4.6. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI <i>IN VITRO</i> DPPH TESTOM.....	60
4.6.1. Baždarni pravac troloksa u DPPH testu	60
4.6.2. Antioksidativna aktivnost uzoraka u DPPH testu	60
4.7. KORELACIJA IZMEĐU IZMJERENIH PARAMETARA	62
5. ZAKLJUČCI	65
6. LITERATURA	66
7. SAŽETAK/SUMMARY	76
7.1. SAŽETAK.....	76
7.2. SUMMARY.....	77

1. UVOD

1.1. ROD *GLOBULARIA* L.

1.1.1. Taksonomija i rasprostranjenost vrsta roda *Globularia*

Vrste roda *Globularia* L. su kritosjemenjače te pripadaju porodici Plantaginaceae Juss., iako su prema nekim starijim izvorima svrstane u odvojenu porodicu Globulariaceae DC. Ime roda dolazi od lat. *globulus*, što znači malena lopta, kojeg su dobile po prepoznatljivim plavo-ljubičastim cvatovima koji često imaju kuglast oblik. Hrvatski naziv za ovu vrstu je „glavulja“ ili „mračnica“ (Innangi i sur., 2020; Nikolić, 2020).

Broj vrsta koje pripadaju ovom rodu i njihova taksonomija tumačeni su na nekoliko načina od strane autora koji su godinama proučavali ove biljke. Prvu opsežniju klasifikaciju predložio je Otto Schwarz koji je identificirao između 22 i 25 vrsta. Trenutno se smatra da rod *Globularia* čini približno 30 vrsta i podvrsta od kojih su mnoge endemi (Innangi i sur., 2020; Nikolić, 2020; Affenzeller i sur., 2018).

Provedena su molekularna istraživanja roda *Globularia* čiji su podaci dokazali neovisnu evoluciju roda *Globularia* u tri europske alpske skupine i dvije mediteranske skupine. Te podatke podupire činjenica da su predstavnice ovog roda rasprostranjene u većim koncentracijama na području srednje i južne Europe, Anatolije, sjeverne Afrike i Makaronezije. U Europi su najrasprostranjenije u mediteranskoj regiji, a u sjevernoj Africi na području Tunisa, Maroka, Libije i Alžira. Također, uočene su izdvojene populacije na atlantskim otocima (npr. na Kanarskom otočju), otocima u Sredozemnom moru (npr. na Balearskom otočju) te pojedinim švedskim otocima. Značajan broj endemskih vrsta pojavljuje se oko Volge, na gorju Atlas u sjevernoj Africi, u Italiji, Grčkoj i Turskoj (Innangi i sur., 2020; Rodríguez-Pérez i sur., 2018; Khlifi i sur., 2013).

Vrste roda *Globularia* uspijevaju na suhim i otvorenim staništima, često na vapnenačkim tlima kao što su gole planinske stijene, kameniti obronci i travnjaci (Innangi i sur., 2020; Nikolić, 2020).

1.1.2. Morfologija vrsta roda *Globularia*

Pripadnici roda *Globularia* su uglavnom maleni zimzeleni i višegodišnji grmovi koji nalikuju na vriješove ili mogu biti zeljaste biljke (Innangi i sur., 2020; Nikolić, 2020; Khlifi i sur., 2013).

Kada proučavamo građu ovih vrsta, možemo uočiti da sadrže malene jednostavne listove koji su izmjenično postavljeni na stabljici, a često mogu biti i skupljeni u rozetu. Na vrhu stabljike izrastaju maleni plavi cvjetovi grupirani u cvat koji ima oblik kuglaste glavice, po čemu je rod i dobio ime (Nikolić, 2020; Crkvenčić i sur., 2016; Tutin i sur., 1972). Cvjetovi vrsta *Globularia* su zigomorfni (monosimetrični) i dvospolni. Dijelovi cvijeta poredani su u određeni broj ciklusa, točnije oni čine četiri ciklusa zbog čega kažemo da su njihovi cvjetovi tetraciklički. S obzirom na broj članova u jednom ciklusu kažemo da su to pentamerni cvjetovi. Cvatne glavice imaju još i poseban ovoj od neplodnih, sterilnih listića.

Ocvijeće je heterohlamidejsko, odnosno razlučeno (dvostruko). Heterohlamidejsko ocvijeće znači da se listovi ocvijeća razlikuju oblikom i bojom te je razlučeno na vanjsku čašku i unutarnji vjenčić. Čaška je građena od pet sraslih lapova (sinsepalna), a može biti jednosimetrična. Vjenčić je građen od pet sraslih latica (sinpetalni), a može biti jednosimetričan do izrazito dvousnat. Andrecej je u većini vrsta građen od četiri prašnika pri čemu su dva kraća, a dva dulja, tzv. dvomoćni prašnici, te su oni prirasli uz cijev vjenčića. Rjeđe mogu imati manje prašnika ili peti prašnik koji je znatno reduciran. Ginecej je pseudomonomeran. Dva plodna lista su srasla rubovima te je plodnica jednogradna, parakarpna. Budući da su plodni listovi srasli plodnicama i vratovima, kažemo da je ginecej sinstiloovarni. Plodnica je u odnosu na cvjetište nadrasla, to je tzv. hipoginski cvijet. Plod je jednosjemeni orah koji je obavijen trajnom čaškom, obično 1 – 1,5 mm (Innangi i sur., 2020; Nikolić, 2020; Tutin i sur., 1972).

1.1.3. Vrste roda *Globularia* u Hrvatskoj

Budući da su predstavnice ovog roda rasprostranjene najvećim dijelom u mediteranskoj regiji, tako ih možemo pronaći i na području Hrvatske. Glavne predstavnice u Hrvatskoj su *Globularia alypum* L., *Globularia cordifolia* L., *Globularia meridionalis* (Podp.) O. Schwarz i *Globularia punctata* Lapeyr. (Nikolić, 2020).

1.1.3.1. *Globularia alypum* L.

Vrsta *Globularia alypum* L. geografski je rasprostranjena u mediteranskim regijama obuhvaćajući cijelo Sredozemlje, područja od južne Europe do Grčke, ali se proteže i do Sjeverne Afrike i Male Azije. Na području Sjeverne Afrike pronađena je u Alžiru te na područjima od Maroka do Sahare (Massinissa i sur., 2022; Ghilissi i sur., 2016; Es-Safi i sur., 2005). U Hrvatskoj raste samo na području Konavoskih stijena (Šugar, 1994). Ova vrsta uglavnom raste u šumama i na stjenovitom terenu (Massinissa i sur., 2022; Šugar, 1994).

Vrsta *G. alypum* je u Hrvatskoj poznata pod nazivima „grmasta glavulja“, „pokus“ i „subotica“. To je višegodišnji samonikli uspravni grm, visok do 100 cm. Listovi su duguljastog i usko ovalnog oblika, boja im je svijetlo ili plavičasto zelena. Rubovi su cjeloviti s dva do tri zuba na vrhu. Ogranci su bez listova te nose kuglasti cvat plave boje koji se pojavljuje tijekom zime ili proljeća. Cvat je obavijen jajastim, kožastim braktejama. U nodijima se nikad ne zakorjenjuje (Beghalia i sur., 2020; Nikolić, 2020; Kušan, 1943).

1.1.3.2. *Globularia cordifolia* L.

Vrsta *Globularia cordifolia* L. je geografski rasprostranjena na području od Španjolske do Turske (Innangi i sur., 2020).

Vrsta *G. cordifolia* je u Hrvatskoj poznata pod nazivima „srcolika glavulja“ i „srdcolistna glavulja“. To je patuljasti polegli grm, visine 15 – 20 cm. Listovi su gotovo okrugli do obrnuto jajasti (Nikolić, 2020). Oblik vrha lista se uvelike razlikuje među populacijama i unutar populacije (Innangi i sur., 2020). Vrh lista može biti zaobljeni ili izrubljeni, a ponekad i šiljasti. Ogranci stabljike su bezlisni ili rijetko nose tri malena listića. Ogranci nose cvat. Listovi su u rozeti. U nodijima se zakorjenjuje (Nikolić, 2020; Kušan, 1943).

1.1.3.3. *Globularia meridionalis* (Podp.) O. Schwarz

Vrsta *Globularia meridionalis* (Podp.) O. Schwarz uglavnom je ograničena na područje Balkana, od Grčke i Bugarske do Hrvatske, ali može se pronaći i na području Slovenije, Austrije i duž talijanskih Apenina (Innangi i sur., 2020; Tutin i sur., 1972).

Vrsta *G. meridionalis* je u Hrvatskoj poznata pod nazivom „modra glavulja“ (Nikolić, 2020). Prije se ova biljka smatrala podvrstom vrste *Globularia cordifolia* te je nosila naziv *Globularia cordifolia* L. ssp. *bellidifolia* (Ten.) Wettst (Tutin i sur., 1972). Listovi su lancetasti do obrnuto lancetasti, a na vrhu su šiljasti ili vrlo rijetko neznatno izrubljeni (Nikolić, 2020).

1.1.3.4. *Globularia punctata* Lapeyr.

Vrsta *Globularia punctata* Lapeyr. je rasprostranjena na području sjeverne Španjolske, Francuske, južne Italije, sjeveroistočne Grčke, Češke, Slovačke i Rusije (Tutin i sur., 1972; Kušan, 1943).

Vrsta *Globularia punctata* u Hrvatskoj je poznata po nazivima „točkasta glavulja“ i „Willkomova glavulja“. U literaturi dolazi još pod nazivima *Globularia bisnagarica* L. i *Globularia vulgaris* L. ssp. *willkommii* (Nyman) Wettst. (Nikolić, 2020). To je biljka visine do 30 cm. Stabljika joj je uspravna te joj ogranci završavaju s jednom cvatnom glavicom promjera oko 1,5 cm. Na stabljici se nalazi veliki broj jajastih ili lancetastih listova. Listovi na dnu

stabljike su lopatastog oblika (Tutin i sur., 1972; Kušan, 1943). Za nju su karakteristične postrane žile na listovima rozete koje su jako vidljive na gornjoj strani plojke (Nikolić, 2020).

1.1.4. Djelovanje i primjena vrsta roda *Globularia*

Vrste roda *Globularia* poznate su po svojem ljekovitom djelovanju. Najviše je istražena vrsta *Globularia alypum* te se malo zna o kemijskom sastavu i biološkim učincima drugih vrsta (Rodríguez-Pérez i sur., 2018; Crkvenčić i sur., 2016).

Vrsta *G. alypum* je aromatična i ljekovita biljka koja se uvelike koristi zbog svojih terapijskih učinaka te ima široku tradicionalnu primjenu u liječenju mnogih bolesti. U tradicionalnoj medicini se koristi kao diuretik, laksativ, hipoglikemik, kolagog, tonik, antacid, purgativ, afrodizijak, u liječenju reumatskih bolesti, artritisa, hemoroida, bubrežnih i kardiovaskularnih bolesti (El-Mernissi i sur., 2023; Asraoui i sur., 2021; Beghalia i sur., 2020; Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a; Bello i sur., 2002). Prema etnobotaničkim izvješćima najčešće korišteni dijelovi su njezini listovi i stabljike, a pripremaju se u obliku infuza, dekokta, macerata i kataplazmi (El-Mernissi i sur., 2023). Vodeni infuz cvjetova u tradicionalnoj medicini koristi se kao diuretik, laksativ i sredstvo protiv brucele (Bello i sur., 2002). Tako se, prema etnobotaničkom istraživanju provedenom u Alžiru, vrsta *G. alypum* koristi u liječenju urinarne inkontinencije i kožnih problema kao što su ekcemi (Asraoui i sur., 2021). Dekokt listova vrste *G. alypum* daje se u obliku praha, ali se može koristiti i u obliku infuza ili macerata za liječenje dijabetesa (El-Mernissi i sur., 2023). Također, smatra se da ima antivirusne i antitumorske učinke (Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a).

Mnogi znanstvenici su nastojali opravdati tradicionalnu primjenu ove biljke provodeći različita istraživanja. Tako su ispitivali antioksidativno, antimalarično, antitumorsko (antiproliferativno), protuupalno, antibakterijsko, antituberkulozno, antikoagulantno, hipoglikemijsko, hipolipemično i antihemolitičko djelovanje (Hajji i sur., 2023; Nour i sur., 2023a; Nefzi i sur., 2022; Ouffai i sur., 2022; Hajji i sur., 2021; Hajji i sur., 2020; Ghilissi i sur., 2016; Khlifi i sur., 2013; Merghache i sur., 2013; Khlifi i sur., 2011; Caldes i sur., 1975).

Budući da je sve veći javnozdravstveni problem rastuća rezistencija bakterija na postojeće antibiotike, istraživači su potaknuti potražiti alternativne terapije kao što je primjena biljnih ekstrakata bogatih različitim sekundarnim metabolitima poput fenolnih spojeva, antrakinona, tanina, flavonoida i alkaloida. Upravo se visoki sadržaj polifenolnih spojeva vrste *G. alypum* pripisuje njezinom antimikrobnom djelovanju. Caldes i sur. (1975) su proučavali antibakterijsko djelovanje vodenog ekstrakta vrste *G. alypum* na *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i *Streptococcus faecium* ATCC 19635 te su rezultati pokazali da ekstrakt nije bio

djelotvoran na ove sojeve bakterija. Taghzouti i sur. (2016) su proširili istraživanje antimikrobnog djelovanja vrste *G. alypum* te su proučavali djelovanje metanolnih i etil acetatnih ekstrakata listova, korijena i stabljike na *S. aureus* ATCC 29213, *Bacillus subtilis* ATCC 3366, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 i *Escherichia coli* ATCC 25922. Pokazalo se da svi ekstrakti nisu bili djelotvorni na Gram-negativne bakterije (*E. coli* i *P. aeruginosa*), ali su uspjeli inhibirati rast *S. aureus* i *B. subtilis* dok je samo etil acetatni ekstrakt pokazao inhibitorno djelovanje na rast *M. luteus*.

Novije istraživanje proveli su Nefzi i sur. (2022) gdje su istraživali *in vitro* antibakterijsko djelovanje etanolnog ekstrakta vrste *G. alypum* protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (*S. aureus* i *E. coli*). Pokazalo se da je ekstrakt vrste *G. alypum* bio djelotvoran protiv obje testirane bakterije te nije pokazao selektivno djelovanje na temelju građe bakterijske stanične stijenke. Friščić i sur. (2022) proučavali su antibakterijsko djelovanje metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova vrsta *G. alypum*, *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata*. Sve istraživane vrste pokazale su značajno antibakterijsko djelovanje protiv *S. aureus* rezistentnog na meticilin (MRSA) dok je *G. punctata* također pokazala djelovanje protiv *E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus* i *Enterococcus faecalis*. Nour i sur. (2023a) su proučavali antibakterijsko i antibiofilmsko djelovanje etanolnih ekstrakata dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom, maceracijom i Soxhlet ekstrakcijom te je ekstrakt dobiven ultrazvučnom ekstrakcijom pokazao značajno najjače djelovanje protiv *S. aureus*. Rezultati provedenih istraživanja podupiru upotrebu ekstrakta vrste *G. alypum* u tradicionalnoj medicini za liječenje infekcija, ali i ukazuju na to da njezini ekstrakti mogu biti izvor novih potencijalnih antimikrobnih spojeva (Nour i sur., 2023a; Friščić i sur., 2022; Nefzi i sur., 2022; Taghzouti i sur., 2016; Caldes i sur., 1975).

Osim istraživanja provedenih na *S. aureus* i *E. coli*, neki istraživači su proučavali djelovanje ekstrakata vrste *G. alypum* na bakteriju *Mycobacterium tuberculosis*. Prema rezultatima Khlifi i sur. (2011) najbolju antituberkuloznu aktivnost pokazao je petroleterski ekstrakt vrste *G. alypum*. Taj ekstrakt je imao nizak sadržaj polifenola što ukazuje na to da potencijalnu antituberkuloznu aktivnost uzrokuju neki drugi spojevi.

Proučavano je i antimalarično djelovanje ekstrakta vrste *G. alypum*. Testirano je djelovanje njezinog vodenog ekstrakta na *Plasmodium berghei*, ali on se nije pokazao učinkovitim (Caldes i sur., 1975).

Testirano je i antitumorsko djelovanje ekstrakta vrste *G. alypum*. Caldes i sur. (1975) su proučavali djelovanje vodenog ekstrakta na limfocitnu leukemiju P388 u miševa i *in vitro* na kulturu neoplastičnih stanica KB te je ekstrakt pokazao značajan učinak na produljenje života

miševa oboljelih od leukemije P388. Nour i sur. (2023a) navode da je etanolni ekstrakt dobiven ultrazvučnom ekstrakcijom pokazao značajno djelovanje na stanice kolorektalnog karcinoma SW620.

Važna svojstva ekstrakata vrste *G. alypum* su njihovo protuupalno i antioksidativno djelovanje. U istraživanju kojeg su proveli Hajji i sur. (2021), vodeni ekstrakt navedene vrste je uzrokovao smanjenje produkcije vodikovog peroksida u česticama kvasca DCF-A405 i staničnih reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *Reactive oxygen species*; ROS) u PLB-985 stanicama te je inhibirao djelovanje ciklooksigenaze 2 (COX-2) i nuklearnog faktora κB u upaljenom tkivu debelog crijeva ljudi. Zahvaljujući značajnoj antioksidativnoj aktivnosti *in vitro*, vodeni ekstrakt ima protuupalno djelovanje. Počivajući na ovoj hipotezi, Hajji i sur. (2023) su u novijem istraživanju proučavali učinak vodenog ekstrakta u liječenju upalnih bolesti crijeva. Zabilježili su smanjenje proizvodnje proupalnih citokina i kemokina te antioksidativno djelovanje ekstrakta koji je „hvatao“ reaktivne kisikove vrste. Protuupalno djelovanje se može ostvariti i djelovanjem na koncentraciju histamina i serotoninina, agonista koji uzrokuju kontrakciju glatkih mišića i molekula koje igraju važnu ulogu u upali. Bello i sur. (2002) izvještavaju kako su metanolni i diklormetanski ekstrakti biljke *G. alypum* smanjili kontraktilni učinak izazvan histaminom i serotoninom. Dobiveni rezultati mogli bi objasniti tradicionalnu primjenu ove biljke u liječenju reumatskih bolesti i želučane acidoze, ali i u liječenju niza drugih upalnih bolesti kod ljudi. Da bi se mogla potvrditi hipoteza da je vodeni ekstrakt *G. alypum* pogodan kao pomoćna terapija upalnih bolesti crijeva kao što je ulcerozni kolitis, trebalo bi provesti još dodatna opsežnija ispitivanja (Hajji i sur., 2023).

Budući da je ekstrakt vrste *G. alypum* pokazao protuupalno, antioksidativno i antimikrobno djelovanje, Ghilisi i sur. (2016) su istražili njegov učinak na zacjeljivanje rana od opekline. Naime, jedna od faza zacjeljivanja rane je faza upale te je cilj djelovati na smanjenje upale kako bi se smanjila destrukcija tkiva te potaknula proliferacija i remodeliranje izvanstaničnog matriksa. Autori navode da je metanolni ekstrakt vrste *G. alypum* poboljšao zacjeljivanje rane i smanjio edem u odnosu na kontrolu. Prema tome, njihova studija je potvrdila tradicionalnu primjenu vrste *G. alypum* za liječenje kožnih rana i opekline, ali su potrebna daljnja preciznija istraživanja za buduću kliničku primjenu.

Jedno od važnijih proučavanih djelovanja ekstrakta vrste *G. alypum* je njezino hipoglikemijsko djelovanje. Tiss i Hamden (2022) su proučavali hipoglikemijsko djelovanje metanolnog i vodenog ekstrakta vrste *G. alypum* te se pokazalo da je njihova primjena štakorima s dijabetesom tipa 1 smanjila glukozu u krvi natašte, zaštitila β-stanice gušterače od smrti i ozljeda, uspostavila normalnu razinu glikogena u jetri i mišićima te poboljšala oralni test

tolerancije glukoze zbog čega vodeni ekstrakt vrste *G. alypum* ima potencijal kao antidijabetički oralni lijek. Merghache i sur. (2013) su izolirali globularin, glavni spoj u listovima vrste *G. alypum*, i proučavali njegov hipoglikemijski i hipolipemični učinak nakon intraperitonealne primjene kod normalnih i dijabetičkih štakora. Dobiveni rezultati su pokazali da izolirani spoj igra važnu ulogu u smanjenju glukoze u krvi kod blage hiperglikemije i smanjenju serumske razine ukupnog kolesterola i triglicerida. Rezultati daju znanstvenu osnovu za korištenje ove biljke u tradicionalnoj medicini.

Pokazalo se da vrsta *G. alypum* sadrži tvari s antikoagulantnim djelovanjem. Ghilisi i sur. (2019) su pokazali da sulfatizirani polisaharidi vrste *G. alypum* u dozi od 200 i 500 mg/kg tjelesne težine imaju značajno *in vitro* i *in vivo* antikoagulantno djelovanje u odnosu na kontrolu. Koristili su standardne testove koagulacije kao što su testovi aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (aPTT), protrombinskog vremena (PT) i trombinskog vremena (TT).

U istraživanju Beghalia i sur. (2020) ekstrakti cvjetova i korijena vrste *G. alypum* pokazali su sposobnost inhibicije nukleacije i agregacije kristala kalcijevog oksalata *in vitro* zbog čega bi mogli zaštititi pojedince od kristalizacije kalcijevog oksalata i stvaranja bubrežnih kamenaca.

Hajji i sur. (2020) su potvrdili tradicionalnu primjenu vrste *G. alypum* kao biljnog laksativa. Vodeni ekstrakt listova je smanjio zatvor induciran loperamidom. Navedeni ekstrakt ima i dodatno djelovanje, a to je da štiti debelo crijevo od upala tako što poboljšava integritet epitela i povećava broj stanica koje proizvode sluz.

Vrsta *G. alypum* pokazala je potencijalnu primjenu u terapiji Alzheimerove bolesti. Khlifi i sur. (2013) su zabilježili snažno inhibitorno djelovanje metanolnog ekstrakta navedene vrste na acetilkolinesterazu čime se povećava koncentracija acetilkolina u mozgu, a upravo isti mehanizam djelovanja imaju sintetski lijekovi koji se koriste u terapiji Alzheimerove bolesti. Liječenju Alzheimerove bolesti dodatno bi moglo pridonijeti i antioksidativno djelovanje metanolnog ekstrakta.

Osim djelovanja vrste *G. alypum*, proučavano je djelovanje i nekih drugih vrsta roda *Globularia*. Tako se pokazalo da je metanolni ekstrakt vrste *G. arabica* učinkovit u cijeljenju rana kod dijabetičkih štakora te potiče proliferaciju i migraciju fibroblasta zbog čega bi se mogao koristiti kao novi terapeutik za zacjeljivanje rana kod dijabetičara. Uz to, ista biljka je poznata i po antimikrobnom i antitumorskom djelovanju (Alsarayreh i sur., 2022; Rodríguez-Pérez i sur., 2018). Ekstrakti vrste *G. meridionalis* su pokazali sposobnost inhibicije acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze zbog čega imaju potencijalnu primjenu u liječenju Alzheimerove bolesti (Tundis i sur., 2012).

Prema istraživanju Rodríguez-Pérez i sur. (2018) ekstrakti vrsta *G. trichosantha* Fisch. & C.A.Mey. i *G. orientalis* L. su pokazali izvrsno antioksidativno djelovanje te su inhibirali enzime acetilkolinesterazu, butirilkolinesterazu, alfa-amilazu, alfa-glukozidazu, tirozinazu i lipazu.

1.1.5. Kemizam vrsta roda *Globularia*

Biološka djelovanja biljke *G. alypum* se pripisuju različitim bioaktivnim spojevima u ovoj biljci. Glavni sekundarni metaboliti ove vrste su polifenolni spojevi poput flavonoida i feniletanoida te iridoidi i sekoiridoidi (Hajji i sur., 2021; Rodríguez-Pérez i sur., 2018; Friščić i sur., 2016; Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a). U vrstama *G. punctata*, *G. cordifolia* i *G. meridionalis* glavni sekundarni metaboliti su iridoidi i bisiridoidni glikozidi, feniletanoidi i flavonoidi (Friščić i sur., 2016). Niz derivata feniletanoida također je prisutan u vrstama *G. trichosantha*, *G. dumulosa*, *G. orientalis*, *G. davisiana* i *G. sintenisii* (Es-Safi i sur., 2005). Općenito se smatra da su fenolni spojevi i iridoidi glavni sekundarni metaboliti vrsta roda *Globularia* te su vjerojatno oni odgovorni za većinu bioloških aktivnosti (Friščić i sur., 2022; Rodríguez-Pérez i sur., 2018; Friščić i sur., 2016; Es-Safi i sur., 2005). Identifikaciju bioaktivnih spojeva otežava nedostatak komercijalno dostupnih standarada (Friščić i sur., 2016).

1.2. OKSIDATIVNI STRES

1.2.1. Nastanak oksidativnog stresa

Posljedica metabolizma u živim organizmima je oksidacija različitih molekula. Pri tome dolazi do stvaranja potencijalno štetnih reaktivnih vrsta. Te stvorene reaktivne vrste u normalnim okolnostima ne predstavljaju problem jer antioksidativni sustav u ljudskom tijelu može ukloniti nastale produkte te time održati ravnotežu oksidacije i antioksidacije, tzv. redoks homeostazu. Postoje situacije kada proizvedena količina reaktivnih vrsta premaši kapacitet unutarstaničnog antioksidativnog enzimskog sustava i izvanstaničnih antioksidativnih spojeva. To se događa kod neravnoteže u staničnom metabolizmu, ali i kod patoloških stanja kao što su akutna i kronična upala. Tada govorimo o oksidativnom stresu. Prema tome, oksidativni stres je neravnoteža između oksidansa i antioksidansa u korist oksidansa (El-Mernissi i sur., 2023; Hajji i sur., 2021; Ji i sur., 2020; Pisoschi i sur., 2016; Khantouche i sur., 2015; Khlifi i sur., 2013).

1.2.2. Reaktivne vrste u oksidativnom stresu

Usljed oksidacije dolazi do stvaranja štetnih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i reaktivnih dušikovih vrsta (eng. *Reactive nitrogen species*; RNS). Osim *in vivo* i aerobnim metabolizmom, one mogu nastati djelovanjem različitih egzogenih izvora kao što su kemikalije, UV zračenje i onečišćenje okoliša. Reaktivne vrste mogu biti oksigenirani/nitrogenirani slobodni radikali ili neutralne molekule (neradikalne vrste poput H_2O_2 , HClO , RO_2H , NO) (Ji i sur., 2020; Pisoschi i sur., 2016; Khantouche i sur., 2015; Harzallah i sur., 2010; Es-Safi i sur., 2007).

Slobodni radikali su visoko reaktivne nabijene molekule ili atomi koji su nestabilni i vrlo reaktivni jer sadrže nesparene elektrone u valentnoj ljusci. Nespareni elektroni nastoje doći u kontakt s novim „partnerom“ pri čemu dolazi do stvaranja novih radikalnih spojeva. Novonastali radikal može doći u kontakt s nekom drugom molekulom i dovesti do formiranja dodatnih radikala. Ovo je poznato kao „lančana reakcija“. Zbog opisane visoke reaktivnosti, slobodni radikali su opasniji od neutralnih, neradikalnih oksidansa (Faisal i Handayani, 2019; Pisoschi i sur., 2016; Khlifi i sur., 2013; Es-Safi i sur., 2007).

Primjeri slobodnih radikala su: superoksidni anionski radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal (OH^{\bullet}) i peroksilni radikal (ROO^{\bullet}), hidroperoksilni radikal (HO_2^{\bullet}), alkoksilni radikal (RO^{\bullet}), dušikov oksid ($^{\bullet}\text{NO}$), peroksinitrit ($\text{O}=\text{NOO}^{\bullet}$) i dušikov dioksid (NO_2) (Pisoschi i sur., 2016; Harzallah i sur., 2010).

Neke od neutralnih molekula koje sudjeluju u oksidativnom stresu su vodikov peroksid (H_2O_2) i dušikov oksid (NO). H_2O_2 nastaje djelovanjem superoksid dismutaze ili spontanom razgradnjom superoksida unutar fagosoma u fagocitima. Zbog svoje slabe polarnosti on izlazi iz fagosoma te ima bitnu ulogu u signalizaciji imunosne reakcije i oksidativnom oštećenju stanica. Pokazalo se da H_2O_2 može uzrokovati oštećenje stanica ili čak stimulirati staničnu smrt. NO se sintetizira iz L-arginina pomoću konstitutivne i inducibilne sintaze dušikovog oksida (cNOS i iNOS) u brojnim stanicama i tkivima sisavaca. Enzim iNOS je induciran oksidansima, lipopolisaharidima (LPS), bakterijama, virusima i proupalnim citokinima. NO može djelovati direktno i indirektno citotoksično. Djeluje indirektno citotoksično tako što stupa u interakciju sa superoksidnim anionom pri čemu nastaje najreaktivniji RNS peroksinitrit ($O=NOO^-$) (Hajji i sur., 2021; Khlifi i sur., 2013).

1.2.3. Posljedice oksidativnog stresa

Posljednjih nekoliko desetljeća smrtnost ljudi je značajno porasla zbog povećane prevalencije bolesti povezanih s oksidativnim stresom. Naime, nastale reaktivne vrste su nestabilne i mogu napasti vitalne biomolekule u stanicama i tjelesnim tekućinama kao što su proteini, ugljikohidrati, lipidi i DNA. To dovodi do teških oštećenja stanica i poremećaja stanične funkcije. Oštećenja uzrokovana oksidativnim stresom igraju važnu ulogu u starenju te su glavni uzrok mnogih patoloških stanja kao što su akutna i kronična upala, ateroskleroza, rak, dijabetes, reumatoidni artritis, osteoartritis, koronarna bolest srca, hipertenzija, pretilost, bolesti jetre uzrokovane alkoholom, ulcerozni kolitis te neurodegenerativne bolesti kao što su Alzheimerova i Parkinsonova bolest. Oksidativni stres će se zaustaviti ako antioksidativni spojevi „ugase“ reaktivne vrste pa prehrana bogata antioksidansima može učinkovito spriječiti i smanjiti pojavnost spomenutih bolesti (Ouffai i sur., 2022; Asraoui i sur., 2021; Hajji i sur., 2021; Ji i sur., 2020; Pisoschi i sur., 2016; Khantouche i sur., 2015; Khlifi i sur., 2013; Harzallah i sur., 2010).

Reaktivne vrste mogu utjecati na kvalitetu hrane. Najpodložnija je hrana bogata višestruko nezasićenim masnim kiselinama. Nezasićene masne kiseline su podložne oksidaciji te je njihova peroksidacija toksična reakcija čime se smanjuje nutritivni sadržaj hrane i dolazi do razvoja užglosti hrane i njezinog neugodnog okusa. Sprečavanje ovih procesa ima financijske i prehrambene dobrobiti (Es-Safi i sur., 2007).

1.3. ANTIOKSIDANSI

1.3.1. Uloga antioksidansa

Antioksidansi su spojevi koji reagiraju sa slobodnim radikalima te ih neutraliziraju u neradikalne proizvode zbog čega su korisni u stanjima oksidativnog stresa. Imaju sposobnost doniranja vodikovih atoma ili elektrona radikalima čineći tako radikalni spoj stabilnijim i inhibirajući lančane reakcije stvaranja slobodnih radikala. Time imaju sposobnost da potpuno zaustave ili minimaliziraju štetni učinak slobodnih radikala u ljudskom tijelu. Antioksidansi se mogu izolirati i koristiti u prevenciji i liječenju poremećaja povezanih sa slobodnim radikalima. Važno je identificirati što veći broj antioksidativnih spojeva te napraviti analizu kako bi se utvrdile njihove koristi i rizici. Zbog te svrhe testirano je brojno povrće, usjevi, začini i ljekovito bilje (Asraoui i sur., 2021; Faisal i Handayani, 2019; Khantouche i sur., 2015; Djeridane i sur., 2006; Kirby i Schmidt, 1997).

1.3.2. Podjela antioksidansa

Antioksidanse možemo podijeliti na primarne i sekundarne. Primarni antioksidansi prekidaju lančane reakcije slobodnih radikala i sposobni su ukloniti radikalne vrste. Sekundarni antioksidansi ne neutraliziraju izravno slobodne radikale. To su antioksidansi koji razlažu reaktivne vrste na neradikalne vrste, inhibiraju oksidativne enzime (npr. lipooksigenaze), apsorbiraju UV zračenje ili keliraju metale.

Postoji i druga podjela antioksidansa, podjela s obzirom na njihovo porijeklo. Prema toj podjeli razlikujemo endogene i egzogene antioksidanse. Endogeni antioksidansi mogu biti enzimski i neenzimski. Procijenjeno je da enzimski antioksidansi razgrađuju slobodne radikale i pretvaraju ih u vodikov peroksid i vodu dok neenzimski antioksidansi uglavnom djeluju na način da prekidaju lančane reakcije slobodnih radikala. Primjer neenzimskih antioksidansa su glutacion, alfa-lipoična kiselina, koenzim Q, feritin, mokraćna kiselina, bilirubin, metalotionein, L-karnitin, melatonin, albumin i kofaktori antioksidativnih enzima ili enzima kao što su superoksid dismutaza, katalaza, glutacion peroksidaza, tioredoksini i peroksiredoksini. Enzimski antioksidansi su grupirani u primarne i sekundarne. Primarni enzimski antioksidansi su glutacion peroksidaza, katalaza i superoksid dismutaza. Glutacion peroksidaza neutralizira slobodne radikale doniranjem dvaju elektrona reducirajući tako perokside, katalaza razgrađujući vodikov peroksid na vodu i molekularni kisik, a superoksid dismutaza pretvarajući superoksidne anione u vodikov peroksid. Sekundarni enzimski antioksidansi su glutacion reduktaza i glukoza-6-fosfat dehidrogenaza. Glutacion reduktaza reciklira reducirani oblik

glutationa, dok glukoza-6-fosfat dehidrogenaza reciklira NADPH. Egzogeni antioksidansi igraju važnu ulogu u suzbijanju oksidativnog stresa kada endogeni antioksidansi nisu bili uspješni. Egzogeni antioksidansi su antioksidansi iz prehrambenih proizvoda, lijekova, dodataka prehrani te različite aromatične i ljekovite biljke. Oni mogu biti prirodni ili sintetski. Prirodni egzogeni antioksidansi mogu biti enzimi iz hrane kao što su superoksid dismutaza, glutaciona peroksidaza i katalaza te mogu biti spojevi niske molekularne mase poput glutationa, askorbata, karotenoida, tokoferola, vitamina D, fenolnih kiselina i flavonoida. Sintetski antioksidansi su butilirani hidroksianisol (BHA), butilirani hidroksitoluen (BHT) i *t*-butilhidrokinon (TBHQ) (Asraoui i sur., 2021; Pisoschi i sur., 2016; Khantouche i sur., 2015; Es-Safi i sur., 2007; Djeridane i sur., 2006).

1.3.3. Upotreba antioksidansa

Prirodni antioksidansi pokazuju širok raspon farmakoloških aktivnosti, a pokazalo se da imaju antikancerogena i protuupalna svojstva te svojstva protiv starenja. Sintetski antioksidansi se dodaju u hranu kako bi spriječili užeglost lipida čime povećavaju stabilnost proizvoda, odnosno njihovu kvalitetu i rok trajanja. Primjena sintetskih antioksidansa je ograničena zbog njihove kancerogenosti. Zbog njihovog štetnog djelovanja na ljudsko zdravlje, ali i općeg odbacivanja od strane potrošača postoji potreba da se sintetski antioksidansi zamijene prirodnim antioksidansima. Posljedično, mnogi istraživači su se usredotočili na otkrivanje prirodnih antioksidansa pa tako i antioksidansa iz različitih biljnih vrsta (Asraoui i sur., 2021; Pisoschi i sur., 2016; Khantouche i sur., 2015; Es-Safi i sur., 2007; Djeridane i sur., 2006).

Antioksidansi se koriste u brojnim područjima kao što su prehrambena industrija, kozmetički i farmaceutski proizvodi, alternativna medicina i prirodni lijekovi (El-Mernissi i sur., 2023; Asraoui i sur., 2021; Es-Safi i sur., 2007).

1.3.4. Antioksidansi u vrstama roda *Globularia*

Posljednjih godina raste interes za pronalaženjem prirodnih antioksidansa. Znajući da mnoge biljke sadrže prirodne antioksidanse, brojni istraživači su se usmjerili na pronalaženje i izoliranje antioksidansa iz biljaka, među njima i iz biljaka roda *Globularia* (Rodríguez-Pérez i sur., 2018; Khlifi i sur., 2013; Tundis i sur., 2012; Khlifi i sur., 2011; Es-Safi i sur., 2007).

Istraživanja su pokazala da različiti ekstrakti biljaka roda *Globularia* pokazuju značajno antioksidativno djelovanje (Nouir i sur., 2023a; Friščić i sur., 2022; Ouffai i sur., 2022; Friščić i sur., 2018; Es-Safi i sur., 2007). To su biljke koje sadrže mnoge sekundarne metabolite kao što su iridoidi, flavonoidi, feniletanoidi, siringini, tanini, terpenoidi, saponini, antocijani itd.

(Nouir i sur., 2023a; Ouffai i sur., 2022; Tiss i Hamden, 2022; Rodríguez-Pérez i sur., 2018; Frišćić i sur., 2016; Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014a; Es-Safi i sur., 2007; Es-Safi i sur., 2005). Dobiveni rezultati pokazali su da flavonoidi, kao što su kvercetin ili derivati kvercetina, kempferol, hesperidin dihidrokalkon, galokatehin ili epigalokatehin, luteolin ili derivati luteolina i apigenin, imaju snažno antioksidativno djelovanje (Harzallah i sur., 2010; Boutiti i sur., 2008; Es-Safi i sur., 2007). Sljedeći po antioksidativnom djelovanju su feniletanoidi, dok su iridoidi pokazali slabije antioksidativno djelovanje (Es-Safi i sur., 2007). Općenito, polifenolni spojevi poput flavonoida, fenolnih kiselina i tanina smatraju se glavnima za antioksidativna djelovanja ljekovitog bilja (Harzallah i sur., 2010).

Identificirani sekundarni metaboliti daju objašnjenje za brojne dobrobiti i terapijska svojstva ekstrakata vrsta *Globularia*. Zbog velikog udjela polifenola i flavonoida te jakog antioksidativnog djelovanja, ekstrakti vrste *G. alypum* mogli bi se koristiti kao izvor prirodnih antioksidansa (El-Mernissi i sur., 2023; Nouir i sur., 2023a).

1.4. POLIFENOLI

1.4.1. Struktura i klasifikacija polifenola

Polifenoli su organski spojevi koje strukturno karakterizira prisutnost dvije ili više fenolnih jedinica. Točnije, oni su karakterizirani s dvama ili više aromatskih, benzenskih ili fenilnih prstenova, s jednom ili više hidroksilnih skupina u svojoj molekularnoj građi. Obuhvaćaju veliki broj heterogenih spojeva s obzirom na njihovu složenost, od spojeva niske molekularne težine do velikih složenih molekula. Npr. polifenoli mogu doći u obliku osnovnih monomera do složenih polimeriziranih struktura, a nadalje mogu postojati u obliku aglikona ili glikozida. Skupine i podskupine polifenola se dodatno razlikuju po vrsti i položaju funkcionalnih skupina te tipu veze između fenolnih jedinica. Posljedično, više od 8000 strukturnih varijanti polifenola je identificirano u literaturi (Grabska-Kobyłecka i sur., 2023; Hong i Qin, 2023; Iqbal i sur., 2023; Rahim i sur., 2023; Zagoskina i sur., 2023; Platzer i sur., 2021; Ahmad i sur., 2019; Singla i sur., 2019).

Polifenoli se mogu podijeliti u mnogo skupina, ali na temelju broja aromatskih prstenova koje sadrže i strukturnih elemenata koji povezuju te prstenove postoje četiri glavne skupine: fenolne kiseline, flavonoidi, lignani i stilbeni (Hong i Qin, 2023; Rahim i sur., 2023).

S obzirom na broj fenolnih jedinica razlikujemo monomerne, oligomerne i polimerne oblike. Oligomerni polifenoli uključuju dimere fenilpropanoide, flavona i flavonola, kao i flavan-3-ole i flavan-3,4-diole (proantocijane). Polimerni polifenoli su tanini, lignani i melanin. Tanini se dijele na hidrolizirajuće, kondenzirane, tearubigine i florotanine (Zagoskina i sur., 2023).

Najjednostavnija klasifikacija polifenola je na flavonoide i neflavonoide. Osnovna struktura neflavonoidnih molekula je jedan aromatski prsten te su to fenolne kiseline, lignani i stilbeni (Grabska-Kobyłecka i sur., 2023; Singla i sur., 2019).

Raznolikost u sastavu polifenola u voću može biti uzrok različitih bioloških aktivnosti (Ahmad i sur., 2019).

1.4.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su skupina organskih spojeva koji su sastavljeni od aromatskih prstenova povezanih s karboksilnom skupinom (-COOH) (Iqbal i sur., 2023; Rahim i sur., 2023).

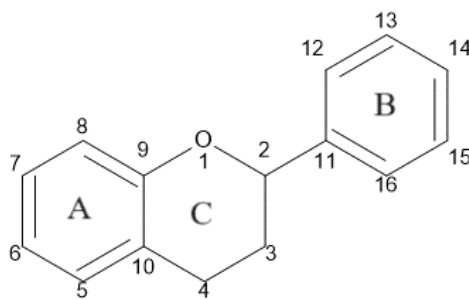
Dijele se u dvije podskupine, a to su hidroksibenzojeve kiseline (C₆-C₁ okosnica) i hidroksicimetne kiseline (C₆-C₃ okosnica) koje se nalaze u gotovo svim namirnicama biljnog podrijetla. Hidroksibenzojeve kiseline su derivati benzojeve kiseline (C₇H₆O₂), dok su

hidroksicimetne kiseline derivati cimetine kiseline ($C_9H_8O_2$). Obje podskupine u strukturi imaju jedan aromatski prsten, a razlikuju se po broju ugljikovih atoma u bočnom lancu. Derivati hidroksibenzojeve kiseline imaju bočni lanac od jednog ugljikovog atoma, dok derivati hidroksicimetne kiseline imaju bočni lanac od tri ugljikova atoma. Raznolikost spojeva unutar ovih podskupina nastaje zbog promjene broja, kao i položaja metoksilne i hidroksilne skupine na benzenskom prstenu, iako osnovni okvir ostaje isti. Najčešće hidroksibenzojeve kiseline su galna, benzojeva, vanilinska, elaginska, salicilna, protokatehinska i siringinska kiselina. Nalazimo ih u sjemenkama grožđa i čaju. Najčešće hidroksicimetne kiseline su ferulinska, kumarinska, cimetna, klorogenska, sinapinska i kavena kiselina. Glavni izvori su kava, jabuka, žitarice, bobičasto voće i kivi (Hong i Qin, 2023; Iqbal i sur., 2023; Rahim i sur., 2023; Zagorskina i sur., 2023; Platzer i sur., 2021; Ahmad i sur., 2019; Singla i sur., 2019).

1.4.3. Flavonoidi

Flavonoidi su složene organske molekule čija je osnova strukture difenilpropan, dva aromatska prstena spojena lancem od tri atoma ugljika. Opća formula za flavonoide označena je kao C6-C3-C6. Aromatski prstenovi (Slika 1: prsten A i prsten B) su obično povezani s heterocikličkim prstenom (Slika 1: prsten C) koji je najčešće zatvoreni piran (Zagorskina i sur., 2023; Singla i sur., 2019).

Trenutno je identificirano više od 6000 spojeva koji su svrstani u šest podskupina na temelju varijacija u njihovim kemijskim strukturama. Podskupine flavonoida su flavonoli, flavanoli, flavanoni, flavoni, antocijani i izoflavoni (Hong i Qin, 2023; Ahmad i sur., 2019).



Slika 1: Osnovna struktura flavonoida (za crtanje strukture korišten je program BIOVIA Draw, Dassault Systèmes, 2022)

1.4.3.1. Flavonoli

Flavonoli, ili dihidroflavonoli, su flavonoidi čije strukture karakteriziraju dvostruka veza C2-C3 i karbonilna skupina na C4 poziciji te hidroksilna skupina na C3 poziciji ([Slika 1](#)). Najpoznatiji i najistraživaniji flavonoli su kvercetin, kempferol i miricetin (Rahim i sur., 2023; Singla i sur., 2019).

1.4.3.2. Izoflavoni

U strukturi izoflavona atom kisika je vezan za ugljikov atom na C4-položaju te je aromatski prsten (prsten B) vezan za ugljikov atom na C3-položaju heterocikličkog prstena (umjesto na položaju C2, [Slika 1](#)). Najpoznatiji izoflavoni su daidzein i genistein (Iqbal i sur., 2023; Ahmad i sur., 2019; Singla i sur., 2019).

1.4.3.3. Flavanoni

Flavanoni imaju heterociklički prsten s zasićenim lancem od tri ugljika bez hidroksilne skupine na položaju C3, s karbonilnom skupinom na položaju C4 ([Slika 1](#)). Karakterizira ih veliki broj supstituiranih derivata. Oni se mogu podvrgnuti kemijskim reakcijama kao što su glikozilacija, hidroksilacija i *o*-metilacija, najčešće u položaju C7. Najpoznatiji flavanoni su eriodiktiol, hesperidin i naringenin (Rahim i sur., 2023; Singla i sur., 2019).

1.4.3.4. Antocijani

Antocijani (antocijanidini) se od ostalih flavonoida razlikuju po prisutnosti dviju dvostrukih veza u svojim heterocikličkim prstenovima. Glikozilirani oblici antocijana se zovu antocijanini te njihovu strukturu karakterizira hidroksilacija i metoksilacija na prstenu B ([Slika 1](#)). Priroda i broj vezanih jedinica šećera, kao što su glukoza, galaktoza i arabinoza te varijacije u broju hidroksiliranih skupina, rezultira različitim antocijanima (Singla i sur., 2019).

Antocijani su u vodi dobro topljivi pigmenti te upravo oni daju boju plavom, crvenom ili ljubičastom voću i povrću kao što su crni ribiz, šumsko voće, trešnja, rotkvica, cikla itd. Imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje zbog svog antioksidativnog djelovanja. Smatra se da njihova konzumacija uzrokuje snižavanje razine kolesterola, triglicerida i povećanje lipoproteina visoke gustoće (Iqbal i sur., 2023; Rahim i sur., 2023).

1.4.3.5. Flavoni

U strukturi flavona na C2-položaju heterocikličkog prstena vezan je prsten B, na C4-položaju je prisutna karbonilna skupina, a između C2 i C3 atoma postoji dvostruka veza ([Slika 1](#)). Najvažniji flavoni su apigenin i luteolin (Rahim i sur., 2023; Singla i sur., 2019).

1.4.3.6. Flavanoli

Flavanoli se točnije nazivaju flavan-3-oli jer na C3 položaju heterocikličkog prstena imaju vezanu hidroksilnu skupinu. Heterociklički prsten kod flavanola je zasićen jer nemaju dvostruku vezu između C2 i C3 atoma ([Slika 1](#)). U hrani se nalaze samo kao aglikoni. Mogu se naći kao monomerne jedinice ili kao oligomerni oblici. Monomerne jedinice su katehin, epikatehin, galokatehin, a polimerni oblici se zovu tanini. Tanini, usprkos relativno visokoj molekulskoj masi, pokazuju dobru topljivost u vodi te se mogu naći u kompleksima s alkaloidima, polisaharidima i proteinima (Iqbal i sur., 2023; Ahmad i sur., 2019; Singla i sur., 2019).

1.4.4. Lignani

Lignani su složeni organski spojevi koji u svojoj strukturi imaju fenilpropanoidne jedinice. Točnije, sadrže dvije propilbenzenske jedinice (C6-C3). Pozicije C9 i C9' lignana su supstituirane u različitim obrascima, što rezultira širokim rasponom različitih strukturnih oblika. Kao posljedica toga, lignani su podijeljeni u osam podskupina (Rahim i sur., 2023; Singla i sur., 2019).

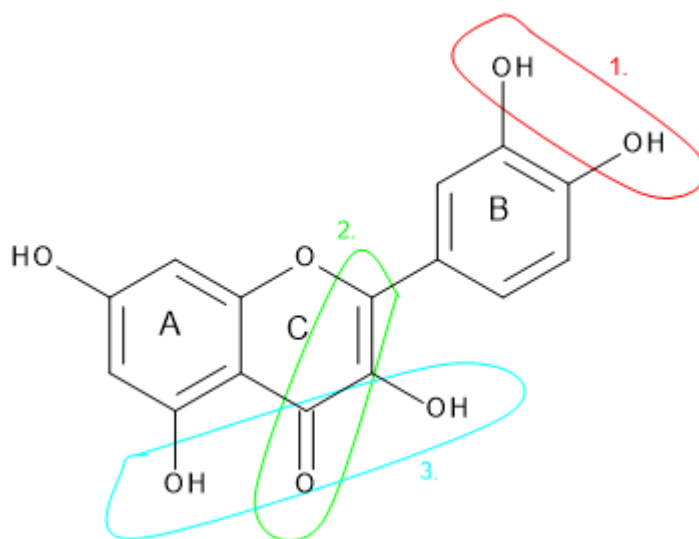
Lignani su široko rasprostranjeni u biljnim tkivima budući da pomažu u formiranju stanične stijenke čime osiguravaju snagu i krutost biljaka i drveća. U biljkama se uglavnom nalaze u slobodnom obliku, a manje kao glikozidni derivati. Najčešći lignani su sezamol, pinorezinol, sinol i enterodiol (Iqbal i sur., 2023; Rahim i sur., 2023; Zagorskina i sur., 2023; Ahmad i sur., 2019; Singla i sur., 2019).

1.4.5. Stilbeni

Stilbeni su organski spojevi izvedeni iz fenola, poznati i kao 1,2-diarileteni (C₁₄H₁₂). Osnovnu strukturu čine dva fenolna prstena povezana metilenskim mostom (C6-C2-C6). Prsten A je obično supstituiran u *m*-položaju s dvije hidroksilne skupine, dok prsten B može biti supstituiran na različitim položajima s hidroksilnim i metoksilnim skupinama. Stilbeni mogu postojati u *cis* i *trans* konfiguraciji. U prirodi se uglavnom pojavljuju u *trans* obliku. Najpoznatiji stilbeni su resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) i piceatanol. Resveratrol proizvodi nekoliko biljaka poput bobičastog voća, kikirikija i grožđa (crno vino). On ima potencijalne zdravstvene koristi kao što su snižavanje krvnog tlaka i zaštitni učinak od sunca (Hong i Qin, 2023; Iqbal i sur., 2023; Rahim i sur., 2023; Ahmad i sur., 2019; Singla i sur., 2019).

1.4.6. Antioksidativna svojstva polifenola

Antioksidativna aktivnost polifenola ovisi o odnosu strukture i aktivnosti (eng. *Structure-activity relationship*; SAR). Prema njemu, na antioksidativnu aktivnost utječe ukupna struktura polifenola te položaj i vrsta bočnih skupina. To se može objasniti pomoću tri kriterija ([Slika 2](#)). Prvi kriterij je prisutnost kateholne skupine na prstenu B koja povećava stabilnost nastalog antioksidativnog radikala. Sljedeći kriterij govori o važnosti kombinacije C2-C3 dvostruke veze s 4-okso skupinom na prstenu C koja olakšava delokalizaciju elektrona. Posljednji kriterij govori o važnosti kombinacije hidroksilne skupine na C3 i C5 poziciji s 4-okso skupinom koja omogućuje delokalizaciju elektrona putem vodikovih veza (Platzer i sur., 2021).



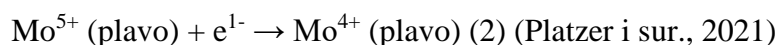
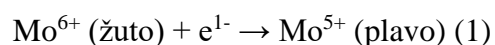
Slika 2: Dijelovi strukture polifenola (flavonoida) važni za antioksidativnu aktivnost (za crtanje strukture korišten je program BIOVIA Draw, Dassault Systèmes, 2022)

1.5. METODE ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLA I FLAVONOIDA

1.5.1. Određivanje ukupnih polifenola

Jedna od najčešćih metoda za detekciju i kvantifikaciju ukupnog sadržaja polifenola u hrani i biljnim proizvodima je Folin-Ciocalteu metoda. Prvotno je bila razvijena za detekciju i kvantifikaciju tirozina i triptofana u proteinima, a kasnije je modificirana za mjerenje sadržaja polifenola u crvenom vinu. Također se može koristiti za mjerenje proteina, ugljikohidrata, nukleotida, tiola, nezasićenih masnih kiselina, vitamina, amina, aldehida i ketona. Danas se sve više primjenjuje u ljudskim biološkim uzorcima poput krvi i urina kao način procjene ukupnog unosa polifenola (Dominguez-López i sur., 2023; Airin i Islam, 2022; Platzer i sur., 2021).

Folin-Ciocalteu reagens sadrži mješavinu heteropolikiselina, fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline. Koristi se u oksidacijsko-redukcijskim reakcijama u laboratoriju te se može primijeniti samo na hidrofilne antioksidanse. Naime, kad se Folin-Ciocalteu reagens izloži antioksidansu, on prima elektron od antioksidansa te se prevodi u plavi kompleks koji se može kvantificirati spektrofotometrijski te ima maksimalnu apsorpciju na 765 nm. Promjena boje nastaje zbog promjene oksidacijskog stanja molibdena iz Mo^{6+} u Mo^{4+} , kao što je prikazano u jednadžbama (1) i (2). U kojoj mjeri reagens mijenja boju ovisi o redukcijskoj aktivnosti antioksidativnih spojeva. Intenzitet plave boje proporcionalno je povezan s količinom polifenola prisutnog u svakom ekstraktu (Dominguez-López i sur., 2023; Airin i Islam, 2022; Platzer i sur., 2021).



Prednosti ove metode su njezina jednostavnost, ponovljivost i robusnost. Zbog velike osjetljivosti testa treba paziti na pH, temperaturu i vrijeme reakcije. Reakcija se provodi u bazičnim uvjetima (pH približno 10) kako bi došlo do deprotoniranja hidroksilne skupine u polifenolnom prstenu, ali treba izbjeći pretjeranu lužnatost. Uzorci se s reagensom inkubiraju 60 – 120 minuta na sobnoj temperaturi (Dominguez-López i sur., 2023; Singleton i Rossi; 1965).

Sadržaj polifenola određen je mjerenjem apsorbancije uzorka na 765 nm i usporedbom s kalibracijskom krivuljom standarda. Često se kao standard koristi galna kiselina jer je galna kiselina pokazala najveću apsorbanciju u usporedbi s drugim spojevima pa se rezultati izražavaju kao ekvivalenti galne kiseline (Dominguez-López i sur., 2023).

1.5.2. Određivanje flavonoida

Sadržaj flavonoida smatra se važnim parametrom za ocjenu uzoraka hrane ili ljekovitog bilja zbog čega je važno odrediti ukupan sadržaj flavonoida u tim uzorcima. Jedan od najčešće korištenih postupaka za određivanje ukupnih flavonoida je spektrofotometrijska analiza s aluminijevim kloridom (AlCl_3), gdje dolazi do stvaranja kompleksa s ionima aluminija. Ovu metodu su prvi predložili Christ i Müller 1960. godine za analizu biljnih materijala, a kasnije je nekoliko puta modificirana (Shraim i sur., 2021; Pečkal i Pyrzynska, 2014; Christ i Müller, 1960).

Flavonoidi imaju brojne okso- i hidroksilne skupine koje imaju afinitet za vezanje metalnih iona, poput Al^{3+} , uglavnom u omjeru 1:1. Ova metoda se temelji na stvaranju kelata Al^{3+} -flavonoid. Jedna od varijanti je da se uzorku dodaje samo otopina AlCl_3 . Nakon dodatka AlCl_3 nastaje žuto obojeni Al^{3+} -flavonoidni kompleks. Mjerenja apsorbancije se obavljaju nakon 2 – 60 min od dodavanja AlCl_3 na specifičnoj valnoj duljini u rasponu 404 – 440 nm. U drugoj varijanti je uveden natrijev nitrit (NaNO_2) prije dodatka AlCl_3 . Još jedna od izmjena je da se kompleksiranje izvodi u prisutnosti acetata. NaNO_2 služi kao nitrirajući agens koji je selektivan za aromatske vicinalne diole što dovodi do nastanka flavonoid-nitroksil derivata. Točnije, dolazi do nitriranja aromatskog prstena koji nosi kateholnu skupinu s tri ili četiri nesupstituirana ili sterički ne-blokirana položaja te nastaje narančasta otopina kompleksa. Dodatkom AlCl_3 postaje žute boje te dodatkom natrijevog hidroksida (NaOH) prelazi u crvenu boju zbog nastalog flavonoid-nitroksil derivata. Vrijednost apsorbancije mjeri se na 500 – 510 nm (Fawwaz i sur., 2023; Shraim i sur., 2021; Pečkal i Pyrzynska, 2014).

Ova metoda određivanja ukupnih flavonoida ima nedostatke koji ograničavaju njezinu valjanost. Određivanje ukupnih flavonoida u uzorku pomoću AlCl_3 moguće je samo ako metalni kelati pojedinačnih flavonoida prisutnih u uzorku kvantitativno imaju slične apsorbancije na određenoj valnoj duljini (λ_{max}). Naime, pogrešno je pretpostaviti da različiti flavonoidi imaju iste apsorpcijske spektre. Različiti flavonoidi imaju različite vrijednosti apsorbancije na λ_{max} , različite λ_{max} , a mnogi od njih možda neće stvarati kompleks s Al^{3+} i stoga neće biti uzeti u obzir u analizi (Shraim i sur., 2021).

Sadržaj ukupnih flavonoida određen je mjerenjem apsorbancije na 404 – 440 nm u metodi bez NaNO_2 , odnosno na 500 – 510 nm u metodi s NaNO_2 te usporedbom s kalibracijskom krivuljom standarda. Često se u prvoj metodi kao standardi koriste kvercetin i rutin, a u drugoj katehin (Shraim i sur., 2021; Pečkal i Pyrzynska, 2014).

1.6. METODE ZA ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG DJELOVANJA

Antioksidativno djelovanje vrsta roda *Globularia* određeno je različitim *in vitro* metodama, uključujući DPPH test, FRAP test, ABTS test, β -karoten linoleatni test, fosfomolibden test, test keliranja metala, CUPRAC test, test peroksidacije linolne kiseline, test oksidacije DNA, test oksidacije proteina i test hvatanja H_2O_2 , pri čemu je najčešće korišten DPPH test ([Tablica 1](#)).

Tablica 1: Metode korištene za određivanje antioksidativne aktivnosti vrsta roda *Globularia*

Istraživanje	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	GA										
2	GA	GA			GA						
3			GA	GA							
4			GA	GA							
5	GA, GC, GM, GP										
6	GA	GA									
7	GA				GA						
8	GA	GA									
9	GA	GA	GA								
10	GA				GA						
11	GA	GA		GA							
12	GA, GC, GM, GP		GA, GC, GM, GP								
13	GA		GA	GA							
14	GO, GT	GO, GT	GO, GT		GO, GT	GO, GT	GO, GT				
15	GA	GA				GA		GA	GA	GA	
16	GA	GA		GA							
17	GA										

18	GA										
19	GA			GA							
20	GA			GA		GA					
21	GA	GA			GA						GA
22	GA	GA									
23	GM			GM							
24	GA		GA								
25		GA									
26	GA										
27			GA								
28	GA										

A: DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) test; **B:** FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) test; **C:** ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) test; **D:** β -karoten linoleatni test; **E:** Fosfomolibden test; **F:** Test keliranja metala; **G:** CUPRAC (eng. *Cupric Reducing Antioxidant Capacity*) test; **H:** Test peroksidacije linolne kiseline; **I:** Test oksidacije DNA; **J:** Test oksidacije proteina; **K:** Test hvatanja H_2O_2 (eng. *H₂O₂ scavenging assay*); **1:** El-Mernissi i sur., 2023; **2:** Fatehi i sur., 2023; **3:** Nour i sur., 2023a; **4:** Nour i sur., 2023b; **5:** Friščić i sur., 2022; **6:** Massinissa i sur., 2022; **7:** Nefzi i sur., 2022; **8:** Ouffai i sur., 2022; **9:** Asraoui i sur., 2021; **10:** Kraza i sur., 2020; **11:** Amri i sur., 2018; **12:** Friščić i sur., 2018; **13:** Khantouche i sur., 2018; **14:** Rodríguez-Pérez i sur., 2018; **15:** Bouriche i sur., 2017; **16:** Ghilissi i sur., 2016; **17:** Taghzouti i sur., 2016; **18:** Touaibia i Chaouch, 2016; **19:** Khantouche i sur., 2015; **20:** Amessis-Ouchemoukh i sur., 2014b; **21:** Barhouchi i sur., 2014; **22:** Chograni i sur., 2012; **23:** Tundis i sur., 2012; **24:** Khlifi i sur., 2011; **25:** Harzallah i sur., 2010; **26:** Es-Safi i sur., 2007; **27:** Djeridane i sur., 2006; **28.** Es-Safi i sur., 2005; GA – *G. alypum*; GC – *G. cordifolia*, GM – *G. meridionalis*, GO – *G. orientalis*, GP – *G. punctata*, GT – *G. trichosantha*

1.6.1. Test keliranja metala

Kelatori metala stvaraju komplekse i smanjuju reaktivnost metala, čineći ih neaktivnima. Kod nekih biomolekula, glavna antioksidativna sposobnost je povezana s njihovom sposobnošću keliranja metala. Naime, biomolekule zahvaljujući svojim funkcionalnim skupinama mogu djelovati kao sustavi višestrukih veznih mjesta za metale. Spojevi koji sadrže dvije ili više funkcionalnih skupina -OH, -COOH, -SH, -OCH₃, -C=O, -PO₃H₂, -NR₂, -O i -S u odgovarajućoj konfiguraciji mogu kelirati Fe²⁺ ione. Tako su flavonoidi pokazali sposobnost keliranja viška metalnih iona u ljudskom tijelu (Gulcin i Alwasel, 2022; Berker i sur., 2010).

Određivanje kapaciteta keliranja biljnih ekstrakata moguće je provesti mjerenjem slobodnih željezovih iona (Fe²⁺) pomoću kelirajućeg sredstva kao što je ferozin pri čemu nastaje kompleks

koji se lako spektroskopski detektira. Antioksidans putem svojih funkcionalnih skupina kelira ione željeza (Fe^{2+}) čime sprječava da ti ioni reagiraju s ferozinom. Višak iona željeza će reagirati s ferozinom i tvoriti Fe^{2+} -ferozin kompleks čija se apsorbanacija može izmjeriti spektrofotometrijski. Nastali kompleks Fe^{2+} -ferozin je crvene boje te pokazuje maksimalnu apsorbanaciju na 562 nm. Apsorbanacija se smanjuje povećanjem koncentracije antioksidansa koji ima sposobnost keliranja metala (Gulcin i Alwasel, 2022; Berker i sur., 2010).

Ferozin ili 3-(2-piridil)-5,6-di(4-fenilsulfonska kiselina)-1,2,4-triazin mononatrijeva sol se općenito koristi u literaturi u ispitivanju željeza ili „kapaciteta vezanja željeza“ hrane i ljudskog seruma. Ferozin je djelomično selektivan i vrlo osjetljiv reagens na ione željeza (Fe^{2+}), a stehiometrijski reakcijski omjer između iona željeza (Fe^{2+}) i ferozina je 1:3 (Im i sur., 2013; Berker i sur., 2010). Kao izvor iona željeza (Fe^{2+}) koriste se željezov(II) klorid (FeCl_2) ili željezov(II) sulfat (FeSO_4) (Gulcin i Alwasel, 2022). Kao standard se često koristi etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) jer ima visoku sposobnost keliranja metala. U mnogim studijama je sposobnosti keliranja metala antioksidansa ili ekstrakata izražena u ekvivalentima EDTA (Gulcin i Alwasel, 2022).

1.6.2. FRAP test

FRAP ili analiza antioksidativne snage redukcijom željeza (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) je metoda temeljena na prijenosu elektrona. Izvorno je korištena za mjerenje redukcijske moći u plazmi, ali je njezina upotreba proširena na procjenu antioksidativne snage u drugim biološkim tekućinama, hrani i biljnim ekstraktima (Zhong i Shahidi, 2015; Benzie i Strain, 1996).

FRAP reagens se priprema neposredno prije analize. Pripremi se miješanjem acetatnog pufera ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$; 30 mM; pH 3,6), otopine 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ; 10 mM) u 40 mM klorovodičnoj kiselini (HCl) i otopine željezovog(III) klorida ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 20 mM) u volumnom omjeru 10:1:1. Natrijev acetatni pufer dobije se miješanjem natrijevog acetata ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) i octene kiseline ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$). Otopina TPTZ-a dobije se miješanjem HCl-a i TPTZ-a. Pripremljeni FRAP reagens sadrži Fe^{3+} -TPTZ kompleks svijetloplave boje (Kwon i sur., 2020; Kraujalyté i sur., 2013). Kao ligandi se osim TPTZ-a mogu koristiti i alternativni ligandi koji također vežu željezo poput ferozina i kalijevog fericijanida. FRAP test se provodi u kiselom mediju (pH 3,6) kako bi se održala topljivost željeza i potaknuo prijenos elektrona (Zhong i Shahidi, 2015).

Nakon dodatka FRAP reagensa u uzorak u kiselom mediju, antioksidansi reduciraju Fe^{3+} iz svijetloplavog Fe^{3+} -TPTZ kompleksa u Fe^{2+} što rezultira nastajanjem Fe^{2+} -TPTZ kompleksa

intenzivnije plave boje. Nastali kompleks ima maksimum apsorpcije na 593 nm. Što je veća antioksidativna aktivnost, to je veća vrijednost apsorpcije (Kwon i sur., 2020; Zhong i Shahidi, 2015; Benzie i Strain, 1996).

Snaga redukcije u FRAP testu može se izraziti u ekvivalentima Fe^{2+} i/ili ekvivalentima troloksa (Danilewicz, 2015; Kraujalytė i sur., 2013).

1.6.3. ABTS test

ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) test je jedna od najčešćih metoda koja se koristi za mjerenje ukupne antioksidativne aktivnosti čistih tvari, tjelesnih tekućina i biljnih materijala. Još se naziva „Test antioksidativnog kapaciteta ekvivalenta troloksa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline)“ (TEAC; eng. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*). Moguće je odrediti ukupnu antioksidativnu aktivnost jer ova metoda mjeri oba antioksidativna kapaciteta, hidrofilni i lipofilni, koristeći isti reaktivni kromogen.

ABTS test se temelji na sposobnosti antioksidativnih spojeva da stabiliziraju spojeve slobodnih radikala, u ovom slučaju ABTS^{•+} radikal kationa. Reakcija se temelji na prijenosu jednog elektrona (eng. *Single Electron Transfer*; SET) kojemu se pripisuju brze reakcije i na prijenosu atoma vodika kojemu se pripisuju spore reakcije (eng. *Hydrogen Atom Transfer*; HAT) (Cano i sur., 2023; Kusumorini i sur., 2022; Kut i sur., 2022; Kosakowska i sur., 2018; Zhong i Shahidi, 2015).

Otopina ABTS^{•+} radikal kationa se priprema miješanjem ABTS-a i kalijevog persulfata ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) u vodi i inkubiranjem na sobnoj temperaturi u mraku 12 – 16 sati prije upotrebe. Nastaje zelenkasto plava otopina ABTS^{•+} koja ima apsorpciju na valnoj duljini od 734 nm. Prije upotrebe, otopina ABTS^{•+} se razrjeđuje da se dobije apsorpcija od $0,700 \pm 0,020$ na 734 nm. Kalijev persulfat je najčešće korišten oksidans za stvaranje ABTS^{•+}. Prije su se koristili metmioglobini i vodikov peroksid (Kusumorini i sur., 2022; Kut i sur., 2022; Asraoui i sur., 2021; Kosakowska i sur., 2018; Zhong i Shahidi, 2015; Kraujalytė i sur., 2013; Djeridane i sur., 2006).

Razrijeđena otopina ABTS^{•+} dodaje se ispitivanom uzorku pri čemu dolazi do redukcije ABTS^{•+} radikal kationa antioksidativnim spojevima iz uzorka što se uočava kao promjena zelenkasto plave boje u bezbojnu. Jačina promjene boje kvantificira se kao smanjenje apsorpcije ABTS^{•+} na 734 nm. Smanjenje ovisi o trajanju reakcije, antioksidativnoj aktivnosti i koncentraciji uzorka (Kusumorini i sur., 2022; Kosakowska i sur., 2018; Zhong i Shahidi, 2015).

Za izradu kalibracijske krivulje koristi se koncentracijski niz otopina troloksa te se rezultati izražavaju kao ekvivalenti troloksa (TEAC). TEAC je kvantifikacija antioksidativne aktivnosti uzorka pri čemu više vrijednosti TEAC-a znače veću antioksidativnu aktivnost uzorka (Kut i sur., 2022; Kraujalytė i sur., 2013; Djeridane i sur., 2006).

1.6.4. DPPH Test

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (Faisal i Handayani, 2019; Kosakowska i sur., 2018), a prema nekim izvorima 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (Famurewa, 2023; Asraoui i sur., 2021; Zhong i Shahidi, 2015; Es-Safi i sur., 2007) test je jedan od najpopularnijih spektrofotometrijskih testova koji se koriste za određivanje antioksidativnog kapaciteta različitih uzoraka.

DPPH test se temelji na reakcijama prijenosa jednog elektrona (SET) s marginalnim mehanizmom doniranja vodikovog atoma (HAT) antioksidativnih spojeva DPPH radikalima čime dolazi do njegovog „hvatanja“ (redukcije) (Kusumorini i sur., 2022; Kosakowska i sur., 2018; Zhong i Shahidi, 2015). Mehanizam reakcije između DPPH i različitih antioksidansa ovisi o njihovoj molekularnoj strukturi. Na primjer, pokazalo se da askorbinska kiselina vrlo brzo reducira molekule DPPH, dok su mnogi drugi testirani antioksidansi pokazali sporiju brzinu reakcije. Zbog jednostavnosti, brzine izvođenja, osjetljivosti i ponovljivosti ovaj test ima široku primjenu u procjeni aktivnosti „hvatanja“ slobodnih radikala pa se tako naširoko koristi za ispitivanje antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata ili fenolnih spojeva. Dva pokazatelja antioksidativne snage mogu se dobiti u DPPH testu: (i) ukupna količina uklonjenih radikala tijekom cijelog reakcijskog razdoblja i (ii) brzina uklanjanja radikala (Gulcin i Alwasel, 2023; Kusumorini i sur., 2022; Kwon i sur., 2020; Faisal i Handayani, 2019; Kosakowska i sur., 2018; Zhong i Shahidi, 2015; Kraujalytė i sur., 2013; Khelifi i sur., 2011; Es-Safi i sur., 2007).

DPPH je stabilan slobodni radikal tamnoljubičaste boje s maksimalnom apsorbancijom na 517 nm koji može lako prihvatiti elektrone ili atome vodika iz antioksidansa. Komercijalno je dostupan i ne treba ga generirati prije analize. Slabo je topljiv u nepolarnim otapalima, a dobro se otapa u različitim polarnim organskim otapalima. Kada se DPPH radikalima dodaju antioksidansi, ljubičasti DPPH radikal reagira s antioksidansima pri čemu mu antioksidativni spojevi doniraju atom vodika te nastaje stabilniji, blijedo žuto obojeni hidrazin DPPH-a (difenil-pikrilhidrazin: DPPH-H ; $\text{DPPH} + \text{RH} \rightarrow \text{DPPH}_2 + \text{R}$). Promjena boje se može kvantificirati mjerenjem smanjenja apsorbancije na valnoj duljini od 517 nm te ukazuje na aktivnost „hvatanja“ slobodnih radikala tj. pokazuje učinkovitost antioksidansa (Famurewa,

2023; Gulcin i Alwasel, 2023; Kusumorini i sur., 2022; Rodríguez-Arce i Saldias, 2021; Zhong i Shahidi, 2015; Kraujalytė i sur., 2013; Es-Safi i sur., 2007).

Jedan od načina procjene sposobnosti uklanjanja radikala u DPPH testu je da se rezultati izraze kao ekvivalenti troloksa (Gulcin i Alwasel, 2023).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Procjenjuje se da je najmanje jedna trećina svih lijekova biljnog podrijetla. Biljke imaju mnoge prednosti kao izvor aktivnih spojeva jer su lako dostupne, imaju manje nuspojava u odnosu na kemijske lijekove, jeftinije su i time isplativije te su jednostavne za upotrebu. Iz tog su razloga danas mnogi istraživači usredotočeni na pronalaženje lijekova iz ljekovitog bilja. Biljke mogu proizvesti veliki broj različitih bioaktivnih molekula, tzv. sekundarnih metabolita. Kemijska svojstva ovih sastojaka znatno se razlikuju među različitim biljnim dijelovima, ali i različitim vrstama. Zbog sekundarnih metabolita, biljni ekstrakti mogu imati antibakterijske, antioksidativne, analgetske, protuupalne i mnoge druge biološke aktivnosti, a time i ljekoviti potencijal.

Pojedine pripadnice roda *Globularia* proučavane su zbog svojeg potencijalnog ljekovitog djelovanja. Najviše istražena vrsta ovoga roda je *G. alypum* te se malo zna o drugim vrstama. Različiti ekstrakti biljaka roda *Globularia* pokazali su značajno antioksidativno djelovanje zbog prisutnih sekundarnih metabolita, poglavito flavonoida i feniletanoida.

Cilj ovog rada bio je dopuniti dosadašnja istraživanja antioksidativne aktivnosti vrsta roda *Globularia* s obzirom na različite mehanizme djelovanja (keliranje metala, redukcijska sposobnost i antioksidativna aktivnost) te su uspoređeni sadržaji polifenola, flavonoida i antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova vrsta *Globularia alypum* L., *Globularia cordifolia* L., *Globularia meridionalis* (Podp.) O. Schwarz i *Globularia punctata* Lapeyr. čiji su uzorci bili sakupljeni na području Republike Hrvatske. Za određivanje antioksidativne aktivnosti korišteni su test keliranja metala, FRAP test, ABTS test i DPPH test, pri čemu su prva dva testa kod svih istraženih vrsta, osim vrste *G. alypum*, korišteni po prvi put.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Biljni materijal

U ovom radu istražene su sljedeće biljne vrste: *Globularia alypum* L., *Globularia cordifolia* L., *Globularia meridionalis* (Podp.) O. Schwarz i *Globularia punctata* Lapeyr. Biljni materijal je prikupljen s različitih prirodnih staništa na području Republike Hrvatske ([Tablica 2](#)), a činili su ga nadzemni dijelovi (zelen) koji su osušeni pri sobnoj temperaturi i usitnjeni u prah.

Tablica 2: Lokacija i datum prikupljanja uzoraka

Vrsta	Lokacija	Datum prikupljanja
<i>G. alypum</i>	Konavoske stijene	29. ožujka 2015.
<i>G. cordifolia</i>	Biokovo	10. svibnja 2015.
<i>G. meridionalis</i>	Baške Oštarije	2. lipnja 2015.
<i>G. punctata</i>	Vugrovec	25. travnja 2015.

3.1.2. Kemikalije

U ispitivanjima su korištene sljedeće kemikalije:

1. 2,2'-Azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina (ABTS) diamonijeva sol (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
2. Aluminijev klorid heksahidrat ($\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; p.a.; Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
3. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH; Fluka, Buchs, Švicarska)
4. Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA; p.a.; Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
5. Ferozin (za spektrofotometrijsku detekciju Fe; Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
6. Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
7. Galna kiselina (97,5 – 102,5 %; Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
8. Hidrokloridna kiselina 35 % (HCl 35 %; p.a.; Lach-Ner, Neratovice, Češka)
9. Kalijev peroksodisulfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$; p.a.; Kemika, Zagreb, Hrvatska)
10. Kvercetin (za HPLC; > 95 %; Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
11. Metanol (p.a.; Kemika, Zagreb, Hrvatska)
12. Natrijev acetat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
13. Natrijev karbonat dekahidrat ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$; krist.; p.a.; Kemika, Zagreb, Hrvatska)
14. Octena kiselina (99 – 100 %, ledena; J.T.Baker, Avantor Performance Materials B.V., Deventer, Nizozemska)

15. 2,4,6-Tripiridil-*s*-triazin (TPTZ; za spektrofotometrijsku detekciju Fe; Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
16. Troloks (97 %; Acros Organics, Geel, Belgija)
17. Željezov(II) klorid tetrahidrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$; p.a.; Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
18. Željezov(III) klorid (FeCl_3 ; > 97 %; Fluka, Buchs, Švicarska)

3.1.3. Uređaji

U ispitivanjima su korišteni sljedeći uređaji:

1. Analitička vaga (H51AR; Mettler Toledo)
2. Magnetska miješalica (Hotplate Stirrer; Witeg)
3. pH-metar (FiveEasy Plus, Mettler Toledo)
4. Precizna vaga (PB303 Delta Range, Mettler Toledo)
5. Termo tresilica (TS-100, BioSan)
6. Ultrazvučna kupelj (Sonorex Super RK 255 H; Bandelin electronic)
7. UV-Vis spektrometar (T70 UV/VIS Spectrometer, PG Instruments Ltd)
8. Vorteks miješalica (REAX top; Heidolph)

3.1.4. Pribor

U ispitivanjima je korišten sljedeći pribor:

1. Automatska mikropipeta 10 – 100 μL (Gilson, Middleton, SAD)
2. Automatska mikropipeta 100 – 1000 μL (Gilson, Middleton, SAD)
3. Automatska mikropipeta 1 – 10 mL (Gilson, Middleton, SAD)
4. Erlenmeyerova tikvica širokog grla od 500 mL
5. Filter papir
6. Kvarcna kiveta
7. Magnet za miješanje
8. Metalna pinceta
9. Metalna špatula
10. Odmjerne tikvice od 5 mL
11. Odmjerne tikvice od 10 mL
12. Odmjerne tikvice od 15 mL
13. Odmjerne tikvice od 20 mL
14. Odmjerne tikvice od 25 mL

15. Odmjerne tikvice od 50 mL
16. Odmjerne tikvice od 100 mL
17. Odmjerne tikvice od 250 mL
18. Parafilm
19. Plastične boce štrcaljke
20. Plastične Eppendorf epruvete od 2 mL
21. Plastične Falcon epruvete od 15 mL
22. Plastični nastavci za pipetu od 10 – 100 μ L
23. Plastični nastavci za pipetu od 100 – 1000 μ L
24. Plastični nastavci za pipetu od 1 – 10 mL
25. Plastične odmjerne ladice
26. Plastične Pasteur pipete
27. Plastični stalak za epruvete
28. Staklene čaše od 50 mL
29. Staklene čaše od 100 mL
30. Staklene čaše od 250 mL
31. Staklene epruvete od 10 mL
32. Stakleni lijevak
33. Staklena menzura
34. Staničevina

3.2. METODE ISPITIVANJA

3.2.1. Priprema uzoraka za analizu

Nadzemni dijelovi (zelen) biljnih vrsta *Globularia alypum* L., *Globularia cordifolia* L., *Globularia meridionalis* (Podp.) O. Schwarz i *Globularia punctata* Lapeyr. bili su podvrgnuti Soxhlet ekstrakciji u trajanju od 8 sati uz primjenu metanola (50 g : 500 mL). Upareni ekstrakti otopljeni su u 50 %-tnom metanolu (100 mL), tri puta izmućkani kloroformom (50 mL), te su zatim ponovno upareni, smrznuti i liofilizirani. Liofilizirani ekstrakti pohranjeni su na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Liofilizirani prašci četiriju odabranih vrsta roda *Globularia* izvagani su neposredno prije mjerenja (Tablica 3). Liofilizirani prašci vagani su u odmjernoj lađici, a zatim su kvantitativno preneseni u Falcon epruvete od 15 mL. Odvaganim liofiliziranim prašcima dodalo se 10 mL metanola automatskom pipetom te se sadržaj miješao na vorteks miješalici dok se nije otopio do kraja.

Tablica 3: Odvage liofiliziranih prašaka za pripremu otopina uzoraka u 10 mL metanola

Vrsta	Odvaga [g]
<i>G. alypum</i>	0,202 g
<i>G. cordifoila</i>	0,200 g
<i>G. meridionalis</i>	0,203 g
<i>G. punctata</i>	0,201 g

3.2.2. Određivanje ukupnih polifenola

Za određivanje ukupnih polifenola korištena je spektrofotometrijska metoda temeljena na primjeni Folin-Ciocalteu reagensa (Singleton i Rossi, 1965) prema postupku kojeg opisuju Frišić i sur. (2018). Kao standard korištena je galna kiselina.

Priprema otopine natrijevog karbonata dekahidrata ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$):

U staklenu čašu od 100 mL direktno je izvagano 7,501 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$. Jedna trećina staklene čaše napunjena je destiliranom vodom te je krutina otopljena uz lagano zagrijavanje na magnetskoj miješalici. Dobivena otopina je filtrirana u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

Priprema otopine Folin-Ciocalteu reagensa:

U odmjernu tikvicu od 50 mL dodalo se malo destilirane vode prije pipetiranja Folin-Ciocalteu reagensa koji je smjesa kiselina. Zatim se pipetiralo 5 mL Folin-Ciocalteu reagensa u odmjernu tikvicu te se nadopunila destiliranom vodom do oznake.

Slijepa proba

Slijepa proba je 2000 μL destilirane vode.

Priprema otopine standarda galne kiseline:

Odvagala se galna kiselina (0,020 g) u epruvetu Eppendorf od 2 mL. U epruvetu Eppendorf s galnom kiselinom se dodalo 1 mL metanola te se miješalo na vorteks miješalici dok se galna kiselina nije otopila. Kvantitativno se prenijela u odmjernu tikvicu od 20 mL, a epruveta Eppendorf se nekoliko puta isprala metanolom. Odmjerna tikvica se nadopunila metanolom do oznake. Dobila se temeljna otopina galne kiseline koncentracije (γ_0) 1 mg/mL.

Izrada baždarnog pravca:

Iz temeljne otopine galne kiseline ($\gamma_0 = 1 \text{ mg/mL}$) dobio se koncentracijski niz radnih otopina ($\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$ itd.) tako što su se miješali različiti volumeni temeljne otopine galne kiseline (γ_0) i metanola, a da je ukupni volumen ostao uvijek isti ($1000 \mu\text{L} = 1 \text{ mL}$):

- redom su se odpipetirali volumeni temeljne otopine galne kiseline ($V(\gamma_0)$ u [Tablici 4](#)) u epruvete od 1 do 7
- automatskom pipetom su se odmjerili odgovarajući volumeni metanola ($V(\text{MeOH})$ u [Tablici 4](#)) do ukupnog volumena od $1000 \mu\text{L}$ u epruveti

Dobilo se sedam otopina standarda galne kiseline različitih koncentracija ($\gamma_n; \gamma_1\text{-}\gamma_7$), a jednakih ukupnih volumena ($1000 \mu\text{L}$). Iz svake epruvete se pipetiralo $250 \mu\text{L}$ u praznu čistu epruvetu. Za svaku koncentraciju (γ_n) postupak se ponovio dva puta jer se reakcija radila u duplikatu. Zatim se redom u svaku epruvetu dodavalo dva puta po $625 \mu\text{L}$ (ukupno $1250 \mu\text{L}$) Folin-Ciocalteu reagensa automatskom pipetom, u razmacima od 1 minute između epruveta. Nakon 5 minuta od dodavanja Folin-Ciocalteu reagensa, dodao se 1 mL otopine $\text{Na}_2\text{CO}_3 * 10 \text{ H}_2\text{O}$. Nakon 60 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, mjerila se apsorbancija na 765 nm. Na temelju prosjeka izmjerenih vrijednosti dobiven je baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standarda galne kiseline ([Slika 3](#)).

Tablica 4: Izrada koncentracijskog niza standarda galne kiseline (γ_n) za baždarni pravac

Epruvete (n)	γ_n [$\mu\text{g/mL}$]	Temeljna otopina standarda galne kiseline ($\gamma_0 = 1 \text{ mg/mL}$)	V (MeOH) [μL]
		V (γ_0) [μL]	
1	30	30	970
2	40	40	960
3	50	50	950

4	60	60	940
5	70	70	930
6	80	80	920
7	90	90	910

Mjerenje otopina uzoraka vrsta roda *Globularia*:

Dobivene metanolne otopine uzoraka četiriju vrsta *Globularia* bilo je potrebno razrijediti 20 puta. Preneseno je 50 μL otopine uzorka u čistu epruvetu te se dodalo 950 μL metanola (do ukupnog volumena od 1000 μL = 1 mL). Iz dobivene razrijeđene otopine uzorka 250 μL preneseno je u novu epruvetu. Za svaki uzorak postupak se ponovio tri puta jer se pokus radio u triplikatu. Zatim se redom u svaku epruvetu dodavalo dva puta po 625 μL (ukupno 1250 μL) Folin-Ciocalteu reagensa automatskom pipetom, u razmacima od 1 min između epruveta. Nakon 5 minuta od dodavanja Folin-Ciocalteu reagensa, dodalo se 1 mL otopine $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ te se nakon 60 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi mjerila apsorbancija na 765 nm. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog ekstrakta (mg EGK/g SE; [Tablica 11](#)).

3.2.3. Određivanje flavonoida

Za određivanje flavonoida korištena je spektrofotometrijska metoda s aluminijskim kloridom prema postupku kojeg opisuju Friščić i sur. (2018). Kao standard korišten je kvercetin.

Priprema otopine aluminijevog klorida heksahidrata ($\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$):

U staklenu čašu od 100 mL direktno je izvagano 1,005 g $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$. Jedna trećina staklene čaše napunjena je metanolom te je $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ otopljen uz lagano zagrijavanje na magnetskoj miješalici. Dobivena otopina je filtrirana u tikvicu od 50 mL i nadopunjena metanolom do oznake. Dobivena je otopina $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ koncentracije 0,02 g/mL.

Slijepa proba:

Slijepa proba je 1 mL kvercetina ili uzorka u koji se dodalo 1 mL metanola.

Priprema otopine standarda kvercetina:

Odvagao se kvercetin (0,020 g) u epruveti Eppendorf od 2 mL. U epruvetu Eppendorf s kvercetinom se dodalo 1 mL metanola te se miješalo na vorteks miješalici dok se kvercetin nije otopio. Kvantitativno se prenijelo u odmjernu tikvicu od 10 mL, a epruveta Eppendorf se nekoliko puta isprala metanolom. Odmjerna tikvica se nadopunila metanolom do oznake. Petsto μL (0,5 mL) dobivene otopine se prenijelo u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopunilo metanolom do oznake čime se dobila temeljna otopina kvercetina koncentracije (γ_0) 100 $\mu\text{g/mL}$.

Izrada baždarnog pravca:

Iz temeljne otopine standarda kvercetina ($\gamma_0 = 100 \mu\text{g/mL}$) dobio se koncentracijski niz radnih otopina ($\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$ itd.) tako što su se miješali različiti volumeni temeljne otopine kvercetina (γ_0) i metanola, a da je ukupni volumen bio $1000 \mu\text{L}$ (1 mL):

- redom su se odpipetirali volumeni temeljne otopine kvercetina ($V(\gamma_0)$ u [Tablici 5](#)) u epruvete od 1 do 7
- automatskom pipetom su se odmjerili odgovarajući volumeni metanola ($V(\text{MeOH})$ u [Tablici 5](#)) do ukupnog volumena od $1000 \mu\text{l}$

Dobilo se sedam otopina standarda kvercetina različitih koncentracija ($\gamma_n; \gamma_1\text{-}\gamma_7$), a jednakih ukupnih volumena ($1000 \mu\text{L}$). Za svaku koncentraciju kvercetina (γ_0) postupak se ponovio tri puta jer se pokus radio u duplikatu uz slijepu probu koja je sadržavala kvercetin. Zatim se redom u svaku epruvetu dodavao 1 mL otopine $\text{AlCl}_3 * 6 \text{ H}_2\text{O}$, u razmacima od 1 minute između epruveta. Nakon 15 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi mjerila se apsorbancija na 415 nm . Na temelju prosjeka izmjenjenih vrijednosti dobiven je baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standarda kvercetina ([Slika 4](#)).

Tablica 5: Izrada koncentracijskog niza standarda kvercetina (γ_n) za baždarni pravac

Epruvete (n)	γ_n [$\mu\text{g/mL}$]	Temeljna otopina standarda kvercetina ($\gamma_0 = 100 \mu\text{g/mL}$)	V (MeOH) [μL]
		V (γ_0) [μL]	
1	5	50	950
2	10	100	900
3	15	150	850
4	20	200	800
5	25	250	750
6	30	300	700
7	35	350	650

Mjerenje otopina uzoraka vrsta roda *Globularia*:

Dobivene metanolne otopine uzoraka četiriju vrsta *Globularia* bilo je potrebno razrijediti 20 puta. Preneseno je $50 \mu\text{L}$ otopine uzorka u epruvetu te se dodalo $950 \mu\text{L}$ metanola (do ukupnog volumena od $1000 \mu\text{L} = 1 \text{ mL}$). Za svaki uzorak postupak se ponovio četiri puta jer se pokus radio u triplikatu uz slijepu probu koja je sadržavala uzorak. Zatim se redom u svaku epruvetu dodavalo 1 mL otopine $\text{AlCl}_3 * 6 \text{ H}_2\text{O}$ automatskom pipetom, u razmacima od 1 min

između epruveta. Nakon 15 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi mjerila se apsorbancija na 415 nm. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta kvercetina/g suhog ekstrakta (mg EK/g SE; [Tablica 13](#)).

3.2.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti *in vitro* testom keliranja metala

Za određivanje antioksidativne aktivnosti *in vitro* korišten je test keliranja metala prema postupku Dinis i sur. (1994) kojeg su izmijenili Grochowski i sur. (2017). Kao standard korištena je EDTA.

Priprema otopine željezovog(II) klorida tetrahidrata ($\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$):

Potrebno je izraditi otopinu $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ koncentracije 2 mM. U epruvetu Eppendorf od 2 mL se odvagao $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (0,020 g) te se dodao 1 mL destilirane vode. Miješalo se na vorteks miješalici dok se $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ nije otopio. Kvantitativno se prenijelo u odmjernu tikvicu od 5 mL, a epruveta Eppendorf se nekoliko puta isprala destiliranom vodom. Odmjerna tikvica se nadopunila destiliranom vodom do oznake. Dobivena otopina (20 mM) se nije koristila u analizi nego se razrijedila na način da se 1 mL dobivene otopine prenio u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopunio destiliranom vodom do oznake. Dobila se otopina željene koncentracije (2 mM) te se ona koristila u analizi.

Priprema otopine ferozina:

Potrebno je izraditi otopinu ferozina koncentracije 5 mM. U epruvetu Eppendorf od 2 mL se odvagao ferozin (0,037 g) te se dodao 1 mL destilirane vode. Miješalo se na vorteks miješalici dok se ferozin nije otopio. Kvantitativno se prenijelo u odmjernu tikvicu od 15 mL, a epruveta Eppendorf se nekoliko puta isprala destiliranom vodom. Odmjerna tikvica se nadopunila destiliranom vodom do oznake. Dobila se otopina željene koncentracije (5 mM) te se ona koristila u analizi.

Slijepa proba:

Slijepa proba je 2 mL EDTA ili uzorka u koji se dodalo 50 μL FeCl_2 i 200 μL destilirane vode.

Priprema otopine standarda EDTA:

Potrebno je odvagati EDTA (0,020 g) u epruvetu Eppendorf od 2 mL. U epruvetu Eppendorf s EDTA se dodao 1 mL destilirane vode te se miješalo na vorteks miješalici dok se nije otopila. Kvantitativno se prenijela u odmjernu tikvicu od 20 mL, a epruveta Eppendorf se nekoliko puta

isprala destiliranom vodom. Odmjerna tikvica se nadopunila destiliranom vodom do oznake čime se dobila temeljna otopina EDTA koncentracije (γ_0) 1 mg/mL.

Izrada baždarnog pravca

Iz temeljne otopine EDTA ($\gamma_0 = 1$ mg/mL) dobio se koncentracijski niz radnih otopina (γ_1 , γ_2 , γ_3 itd.) tako što su se miješali različiti volumeni temeljne otopine EDTA (γ_0) i destilirane vode, a da je ukupni volumen bio 10 mL:

- redom su se odpipetirali volumeni temeljne otopine EDTA ($V(\gamma_0)$ u [Tablici 6](#)) u odmjerne tikvice od 10 mL od 1 do 5
- odmjerne tikvice od 10 mL su se nadopunile destiliranom vodom do oznake

Dobilo se pet otopina standarda EDTA različitih koncentracija (γ_n ; γ_1 - γ_5), a jednakih ukupnih volumena (10 mL). Dobivene otopine EDTA (γ_n) su se radi lakšeg pipetiranja prenijele u staklene čaše iz kojih se pipetiralo po 2 mL (dva puta po 1000 μ L) u novu čistu epruvetu. Za svaku koncentraciju (γ_n) postupak se ponovio četiri puta jer se pokus radio u triplikatu uz slijepu probu koja je sadržavala EDTA. Zatim se redom u svaku epruvetu dodavalo 50 μ L otopine FeCl₂ i 200 μ L ferozina automatskom pipetom, u razmacima od 1 minute između epruveta. Nakon 10 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi mjerila se apsorbancija na 562 nm. Na temelju prosjeka izmjerenih vrijednosti dobiven je baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standarda EDTA ([Slika 5](#)).

Tablica 6: Izrada koncentracijskog niza standarda EDTA (γ_n) za baždarni pravac

Odmjerna tikvica (n)	γ_n [μ g/mL]	Temeljna otopina standarda EDTA ($\gamma_0 = 1$ mg/mL)	V (destil. voda) [mL]
		V (γ_0) [μ L]	
1	2,5	25	9,975
2	5	50	9,950
3	7,5	75	9,925
4	10	100	9,900
5	12,5	125	9,875

Mjerenje otopina uzoraka vrsta roda *Globularia*:

Dobivene metanolne otopine uzoraka četiriju vrsta *Globularia* bilo je potrebno razrijediti pet puta. Prenijelo se 400 μ L otopine uzorka u epruvete te se dodalo 1600 μ L metanola (do ukupnog volumena od 2000 μ L = 2 mL). Za svaki uzorak postupak se ponovio četiri puta jer

se pokus radio u triplicatu uz slijepu probu koja je sadržavala uzorak. Zatim se redom u svaku epruvetu s razrijeđenim uzorkom (2000 μL) dodavalo 50 μL FeCl_2 i 200 μL ferozina automatskom pipetom, u razmacima od 1 minute između epruveta. Nakon 10 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi mjerila se apsorbancija na 562 nm. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta EDTA/g suhog ekstrakta (mg EE/g SE; [Tablica 15](#)).

3.2.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti *in vitro* FRAP testom

Za određivanje antioksidativne aktivnosti *in vitro* korišten je FRAP test prema postupku kojeg opisuju Benzie i Strain (1996), a kojeg su izmijenili Grochowski i sur. (2017) te Wang i sur. (2013). Kao standard korišten je troloks.

Izrada reagensa:

Reagens za FRAP test dobio se miješanjem triju otopina u odgovarajućem omjeru. Pomiješane su 20 mM otopina FeCl_3 , 10 mM otopina TPTZ-a u 40 mM HCl-u i otopina 0,3 M octenog pufera pH = 3,6 u volumnom omjeru 1:1:10. Da bi se dobio ovaj reagens, pomiješano je 9 mL 20 mM otopine FeCl_3 , 9 mL 10 mM otopine TPTZ-a u 40 mM HCl-u i 90 mL 0,3 M octenog pufera pH = 3,6 u staklenoj čaši od 250 mL.

Priprema otopine željezovog(III) klorida (FeCl_3):

Potrebno je izraditi otopinu FeCl_3 koncentracije 20 mM. Za izradu 10 mL 20 mM otopine FeCl_3 bilo je potrebno odvagati 0,032 g FeCl_3 u epruvetu Eppendorf od 2 mL. U epruvetu Eppendorf s FeCl_3 se dodao 1 mL destilirane vode te se miješalo na vorteks miješalici dok se nije otopio. Kvantitativno se prenijelo u odmjernu tikvicu od 10 mL. Odmjerna tikvica se nadopunila destiliranom vodom do oznake.

Priprema otopine 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ):

Potrebno je izraditi otopinu 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ-a) koncentracije 10 mM u 40 mM HCl-u. Imajući u vidu da je omjer otopine FeCl_3 , TPTZ u HCl-u i octenog pufera 1:1:10 te da se pripremalo 10 mL otopine FeCl_3 , bilo je potrebno izraditi 10 mL otopine TPTZ u HCl-u. Odvagan je TPTZ (0,031g) u epruvetu Eppendorf od 2 mL. U epruvetu Eppendorf s TPTZ-om se dodao 1 mL 40 mM HCl-a te se miješao na vorteks miješalici dok se nije otopio. Kvantitativno se prenijelo u odmjernu tikvicu od 10 mL. Odmjerna tikvica se nadopunila s 40 mM HCl-om do oznake.

Priprema 40 mM hidrokloridne kiseline (HCl):

Potrebno je pripremiti 40 mM otopinu HCl-a iz 35 % HCl-a ($c = 11,42 \text{ mol/L} = 11,42 \text{ M}$). Imajući u vidu da je omjer otopine FeCl₃, TPTZ u HCl-u i octenog pufera 1:1:10 te da se pripremalo 10 mL otopine FeCl₃, bilo je potrebno izraditi 10 mL otopine TPTZ u HCl-u za što je bilo potrebno 20 mL 40 mM HCl-a. Za pripremu 20 mL 40 mM HCl-a pipetirano je dva puta po 35 μL 35 %-tnog HCl-a u odmjernu tikvicu od 20 mL i nadopunjeno destiliranom vodom do oznake.

Priprema octenog pufera (pH = 3,6):

Potrebno je izraditi 0,3 M octeni pufer pH = 3,6. 0,3 M octeni pufer se dobio se miješanjem 0,3 M natrijevog acetata (otopina A) i 0,3 M octene kiseline (otopina B).

OTOPINA A (Otopina 0,3 M natrijevog acetata)

Potrebno je izraditi otopinu natrijevog acetata koncentracije 0,3 M. Izrađivalo se 100 mL otopine A. Bilo je potrebno odvagati natrijev acetat (2,461 g) u staklenu čašu. Natrijev acetat se otopio u 20 – 30 mL destilirane vode. Otopina natrijevog acetata se lagano miješala na magnetskoj miješalici dok se kristali natrijevog acetata nisu otopili. Kada se natrijev acetat otopio, filtrirala se i kvantitativno prenijela u odmjernu tikvicu od 100 mL. Odmjerna tikvica se nadopunila destiliranom vodom do oznake.

OTOPINA B (Otopina 0,3 M octene kiseline)

Potrebno je izraditi otopinu octene kiseline koncentracije 0,3 M. Izrađivalo se 100 mL otopine B. Pipetiralo se 1,724 mL (1000 μL + 724 μL) koncentrirane octene kiseline u tikvicu od 100 mL u koju je već bilo dodano nekoliko mL destilirane vode te se nadopunila destiliranom vodom do oznake.

OCTENI PUFER pH = 3,6

Octeni pufer 0,3 M, pH 3,6 bio je pripremljen na način da se otopini natrijevog acetata postepeno u manjim obrocima dodavala 0,3 M octena kiselina uz kontinuirano mjerenje pH vrijednosti pomoću pH metra do postizanja pH 3,61.

Slijepa proba:

Slijepa proba je 2000 μL reagensa u koji se dodalo 100 μL metanola.

Priprema otopine standarda troloksa:

Bilo je potrebno odvagati troloks (0,020 g) u epruvetu Eppendorf od 2 mL. U epruvetu Eppendorf s troloksom se dodao 1 mL metanola te se miješalo na vorteks miješalici dok se nije

otopio. Kvantitativno se prenio u odmjernu tikvicu od 10 mL, a epruveta Eppendorf se nekoliko puta isprala metanolom. Odmjerna tikvica se nadopunila metanolom do oznake čime se dobila otopina troloksa koncentracije (γ) 2 mg/mL (2000 $\mu\text{g/mL}$). Sljedeći korak je bilo dobivanje razrijeđene otopine troloksa tako što se pipetirao 1 mL otopine troloksa (γ) u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopunilo metanolom do oznake. Time se dobila temeljna otopina troloksa koncentracije (γ_0) 200 $\mu\text{g/mL}$.

Izrada baždarnog pravca

Iz temeljne otopine troloksa ($\gamma_0 = 200 \mu\text{g/mL}$) dobio se koncentracijski niz radnih otopina ($\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$ itd.) tako što su se miješali različiti volumeni temeljne otopine troloksa (γ_0) i metanola, a da je ukupni volumen bio 1000 μL (1 mL):

- redom su se odpipetirali volumeni temeljne otopine troloksa ($V(\gamma_0)$ u [Tablici 7](#)) u epruvete od 1 do 8
- automatskom pipetom su se odmjerili odgovarajući volumeni metanola ($V(\text{MeOH})$ u [Tablici 7](#)) do ukupnog volumena od 1000 μL

Dobilo se osam otopina standarda troloksa različitih koncentracija ($\gamma_n; \gamma_1\text{-}\gamma_8$), a jednakih ukupnih volumena (1000 μL). Iz svake epruvete s otopinom troloksa (γ_n) se pipetiralo 100 μL u novu čistu epruvetu. Za svaku koncentraciju (γ_n) postupak se ponovio tri puta jer se pokus radio u triplikatu. Redom se u svaku epruvetu dodavalo 2 mL reagensa, u razmacima od 1 minute između epruveta. Nakon 30 minuta inkubacije na 37 °C u termo tresilici mjerila se apsorbanacija na 593 nm. Na temelju prosjeka izmjerenih vrijednosti dobiven je baždarni pravac ovisnosti apsorbanacije o koncentraciji standarda troloksa ([Slika 6](#)).

Tablica 7: Izrada koncentracijskog niza standarda troloksa (γ_n) za baždarni pravac

Epruvete (n)	γ_n [$\mu\text{g/mL}$]	Temeljna otopina standarda troloksa ($\gamma_0 = 200 \mu\text{g/mL}$)	
		$V(\gamma_0)$ [μL]	V (MeOH) [μL]
1	20	100	900
2	30	150	850
3	40	200	800
4	50	250	750
5	60	300	700
6	70	350	650
7	80	400	600

8	90	450	550
---	----	-----	-----

Mjerenje otopina uzoraka vrsta roda *Globularia*

Dobivene metanolne otopine uzoraka četiriju vrsta *Globularia* bilo je potrebno razrijediti 50 puta. Prenijelo se 20 μL otopine uzorka u epruvete te se dodalo 980 μL metanola (do ukupnog volumena od 1000 μL = 1 mL). Iz dobivenih razrijeđenih otopina uzorka pipetiralo se 100 μL u prazne čiste epruvete. Za svaki uzorak postupak se ponovio tri puta jer se pokus radio u triplikatu. Zatim se redom u svaku epruvetu dodavalo 2 mL reagensa, u razmacima od 1 minute između epruveta. Nakon 30 minuta inkubacije na 37 °C u termo tresilici mjerila se apsorbancija na 593 nm. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta troloksa/g suhog ekstrakta (mg ET/g SE) i mmol ekvivalenta troloksa/L otopine ekstrakta (mmol ET/L OE; [Tablica 17](#)).

3.2.6. Određivanje antioksidativne aktivnosti *in vitro* ABTS testom

Za određivanje antioksidativne aktivnosti *in vitro* korišten je ABTS test prema postupku kojeg opisuju Friščić i sur. (2018). Kao standard korišten je troloks.

Izrada reagensa:

Potrebno je izraditi 5 mL koncentriranog reagensa miješanjem otopine kalijevog peroksodisulfata ($\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$; $c = 2,45 \text{ mM}$) i otopine ABTS-a ($c = 7 \text{ mM}$).

U odmjernu tikvicu od 5 mL kvantitativno se prenijela otopina ABTS-a iz epruvete Eppendorf, a zatim i otopina kalijevog peroksodisulfata iz epruvete Eppendorf te se odmjerna tikvica nadopunila destiliranom vodom do oznake, zatvorila i omotala parafilmom. Otopina se ostavila stajati u tami 19 sati.

Sljedeći dan pipetiralo se 2000 μL koncentrirane otopine ABTS radikala u tikvicu širokog grla i ona se zatim postupno razrjeđivala destiliranom vodom dok apsorbancija ABTS radikala na 734 nm nije bila oko 0,70. Ovim se mjerilo samo apsorbancija reagensa. Da bi se odredila točna početna apsorbancija (A_0) za kalibracijsku krivulju, mjerenje apsorbancije se izvodilo s 2000 μL razrijeđene otopine ABTS radikala i 10 μL metanola. U ovoj analizi A_0 je bila 0,7016 te se dobivena razrijeđena otopina ABTS radikala koristila u daljnjim koracima analize.

Priprema otopine kalijevog peroksodisulfata:

Bilo je potrebno izraditi otopinu kalijevog peroksodisulfata koncentracije 2,45 mM. Kalijev peroksodisulfat (0,00331 g) se izvagao u epruveti Eppendorf od 2 mL. Za vaganje kalijevog peroksodisulfata koristila se analitička vaga. U epruvetu Eppendorf s kalijevim

peroksidisulfatom dodalo se 200 μL destilirane vode te se miješalo na vorteks miješalici dok se nije otopio.

Priprema otopine ABTS-a:

Bilo je potrebno izraditi otopinu ABTS-a koncentracije 7 mM. ABTS diamonijeva sol (0,01920 g) se izvagala u epruvetu Eppendorf od 2 mL. Za vaganje ABTS-a korištena je analitička vaga. U epruveti Eppendorf s ABTS-om se dodalo 200 μL destilirane vode te se miješalo na vorteks miješalici dok se nije otopio.

Slijepa proba:

Slijepa proba je 2000 μL destilirane vode.

Priprema otopine standarda troloksa:

Bilo je potrebno odvagati troloks (0,020 g) u epruvetu Eppendorf od 2 mL. U epruvetu Eppendorf s troloksom se dodalo 1 mL metanola te se miješalo na vorteks miješalici dok se troloks nije otopio. Kvantitativno se prenijelo u odmjernu tikvicu od 20 mL, a epruveta Eppendorf se nekoliko puta isprala metanolom. Odmjerna tikvica se nadopunila metanolom do oznake čime se dobila temeljna otopina troloksa koncentracije (γ_0) 1 mg/mL.

Izrada baždarnog pravca

Iz temeljne otopine troloksa ($\gamma_0 = 1 \text{ mg/mL}$) dobio se koncentracijski niz radnih otopina ($\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$ itd.) tako što su se miješali različiti volumeni temeljne otopine troloksa (γ_0) i metanola, a da je ukupni volumen bio 1000 μL (1 mL):

- redom su se odpipetirali volumeni temeljne otopine troloksa ($V(\gamma_0)$ u [Tablici 8](#)) u epruvete od 1 do 10
- automatskom pipetom su se odmjerali odgovarajući volumeni metanola ($V(\text{MeOH})$ u [Tablici 8](#)) do ukupnog volumena od 1000 μL

Dobilo se deset otopina standarda troloksa različitih koncentracija ($\gamma_n; \gamma_1-\gamma_{10}$), a jednakih ukupnih volumena (1000 μL). Iz svake epruvete s otopinom troloksa (γ_n) se pipetiralo 10 μL u kivetu. Analiza se radila direktno u kiveti jer je vrijeme inkubacije bila samo jedna minuta, a za svaku koncentraciju (γ_n) postupak se ponovio tri puta jer se pokus radio u triplicatu. U kivetu s 2 mL reagensa se pipetiralo 10 μL otopine troloksa. Nakon 1 minute inkubacije na sobnoj temperaturi mjerila se apsorbancija na 734 nm. Na temelju prosjeka izmjerenih vrijednosti dobiven je baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standarda troloksa ([Slika 7](#)).

Tablica 8: Izrada koncentracijskog niza standarda troloksa (γ_n) za baždarni pravac

Epruvete (n)	γ_n [$\mu\text{g/mL}$]	Temeljna otopina standarda troloksa ($\gamma_0 = 1 \text{ mg/mL}$)	V (MeOH) [μL]
		V(γ_0) [μL]	
1	100	100	900
2	200	200	800
3	300	300	700
4	400	400	600
5	500	500	500
6	600	600	400
7	700	700	300
8	800	800	200
9	900	900	100
10	1000	1000	0

Mjerenje otopina uzoraka vrsta roda *Globularia*

Dobivene metanolne otopine uzoraka četiriju vrsta *Globularia* bilo je potrebno razrijediti pet puta. Prenijelo se 200 μL otopine uzorka u epruvete te se dodalo 800 μL metanola (do ukupnog volumena od 1000 $\mu\text{L} = 1 \text{ mL}$). Iz dobivenih razrijeđenih otopina uzorka pipetiralo se 10 μL direktno u kivetu. Analiza se radila direktno u kiveti jer je vrijeme inkubacije bila samo jedna minuta, a za svaki uzorak postupak se ponovio tri puta jer se pokus radio u triplikatu. U kivetu s 2 mL reagensa se pipetiralo 10 μL uzorka. Nakon 1 minute inkubacije na sobnoj temperaturi mjerila se apsorbancija na 734 nm. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta troloksa/g suhog ekstrakta (mg ET/g SE; [Tablica 19](#)).

3.2.7. Određivanje antioksidativne aktivnosti *in vitro* DPPH testom

Za određivanje antioksidativne aktivnosti *in vitro* korišten je DPPH test prema postupku kojeg opisuju Friščić i sur. (2018). Kao standard korišten je troloks.

Priprema otopine DPPH:

Odvagalo se 0,008 g DPPH u epruvetu Eppendorf od 2 mL. U epruvetu Eppendorf s DPPH se dodao 1 mL metanola te se miješalo na vorteks miješalici dok se nije otopio. Teško se otapalo pa je bilo potrebno često prenositi otopinu iznad taloga u tikvicu širokog grla od 500 mL. Otopina DPPH iz epruvete Eppendorf se kvantitativno prenosila u tikvicu širokog grla od 500

mL dok se dodavanjem metanola nije u epruveti Eppendorf dobila u potpunosti prozirna otopina, koja je prije bila ljubičaste boje zbog otopljenog DPPH. Otopina DPPH se razrjeđivala u tikvici širokog grla metanolom dok se nije dobila razrijeđena otopina DPPH radikala apsorbancije oko 0,70 na 517 nm. Ovim se mjerila samo apsorbancija reagensa. Da bi se odredila točna početna apsorbancija (A_0) za kalibracijsku krivulju, mjerenje apsorbancije se izvodilo s 2000 μL razrijeđene otopine DPPH radikala i 10 μL metanola. U ovoj analizi A_0 je bila 0,7072 te se dobivena razrijeđena otopina DPPH radikala koristila u daljnjim koracima analize.

Slijepa proba:

Slijepa proba je 2000 μL metanola.

Priprema otopine standarda troloksa:

Potrebno je odvagati troloks (0,020 g) u epruvetu Eppendorf od 2 mL. U epruvetu Eppendorf s troloksom dodao se 1 mL metanola te se miješalo na vorteks miješalici dok se nije otopio. Kvantitativno se prenijelo u odmjernu tikvicu od 20 mL, a epruveta Eppendorf se nekoliko puta isprala metanolom. Odmjerna tikvica se nadopunila metanolom do oznake čime se dobila temeljna otopina troloksa koncentracije (γ_0) 1 mg/mL.

Izrada baždarnog pravca

Iz temeljne otopine troloksa ($\gamma_0 = 1 \text{ mg/mL}$) dobio se koncentracijski niz radnih otopina ($\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$ itd.) tako što su se miješali različiti volumeni temeljne otopine troloksa (γ_0) i metanola, a da je ukupni volumen bio 1000 μL (1 mL):

- redom su se odpipetirali volumeni temeljne otopine troloksa ($V(\gamma_0)$ u [Tablici 9](#)) u epruvete od 1 do 9
- automatskom pipetom su odmjereni odgovarajući volumeni metanola ($V(\text{MeOH})$ u [Tablici 9](#)) do ukupnog volumena od 1000 μL

Dobilo se devet otopina standarda troloksa različitih koncentracija ($\gamma_n; \gamma_1\text{-}\gamma_9$), a jednakih ukupnih volumena (1000 μL). Iz svake epruvete s otopinom troloksa (γ_n) se pipetiralo 10 μL u epruvetu s reagensom. Za svaku koncentraciju (γ_n) postupak se ponovio tri puta jer se reakcija radila u triplikatu. U epruvetu s 2 mL reagensa se pipetiralo 10 μL otopine standarda troloksa, u razmacima od 1 minute između epruveta. Nakon 30 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi mjerila se apsorbancija na 517 nm. Na temelju prosjeka izmjerenih vrijednosti dobiven je baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standarda troloksa ([Slika 8](#)).

Tablica 9: Izrada koncentracijskog niza standarda troloksa (γ_n) za baždarni pravac

Epruvete (n)	γ_n [$\mu\text{g/mL}$]	Temeljna otopina standarda troloksa ($\gamma_0 = 1 \text{ mg/mL}$)	V (MeOH) [μL]
		V(γ_0) [μL]	
1	100	100	900
2	200	200	800
3	300	300	700
4	400	400	600
5	500	500	500
6	600	600	400
7	700	700	300
8	800	800	200
9	900	900	100

Mjerenje otopina uzoraka vrsta roda *Globularia*

Dobivene metanolne otopine uzoraka četiriju vrsta *Globularia* bilo je potrebno razrijediti pet puta. Prenijelo se 200 μL otopine uzorka u epruvete te se dodalo 800 μL metanola (do ukupnog volumena od 1000 $\mu\text{L} = 1 \text{ mL}$). Iz dobivenih razrijeđenih otopina uzorka pipetiralo se 10 μL u epruvetu s reagensom. Za svaku razrijeđenu otopinu uzorka postupak se ponovio tri puta jer se reakcija radila u triplikatu. U epruvetu s 2 mL reagensa se pipetiralo 10 μL uzorka, u razmacima od 1 minute između epruveta. Nakon 30 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi mjerila se apsorbancija na 517 nm. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta troloksa/g suhog ekstrakta (mg ET/g SE; [Tablica 21](#)).

3.3. POSTUPAK ODREĐIVANJA SADRŽAJA UKUPNIH POLIFENOLA, FLAVONOIDA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Da bi se odredio sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida ili antioksidativna aktivnost uzoraka četiriju biljnih vrsta roda *Globularia* bilo je potrebno pripremiti niz otopina standarda poznatih koncentracija. Zatim su izmjerene apsorbancije pripremljenih otopina standarda te su izračunate njihove srednje vrijednosti za svaku koncentraciju za izradu baždarnog pravca. Prema Beer-Lambertovom zakonu apsorbancija je proporcionalna koncentraciji:

$$A = \varepsilon * c * l$$

A – apsorbancija

ε – molarni apsorpcijski koeficijent

c – množinska koncentracija tvari u uzorku

l – širina kivete kojom prolazi svjetlost

Baždarni pravac je izrađen u programu Microsoft Excel 2007. Jednadžba dobivenog baždarnog pravca korištena je za izračun sadržaja ukupnih polifenola i flavonoida ili procjenu antioksidativnog djelovanja. Uzorcima četiriju biljnih vrsta roda *Globularia* je izmjerena apsorbancija te se uvrštavanjem izmjerenih apsorbancija u jednadžbu pravca dobila koncentracija ispitivanog analita nakon razrjeđenja (γ) [$\mu\text{g/mL}$]. Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidativna aktivnost izraženi su u mg ekvivalenta standarda po g suhog ekstrakta, a dobiveni su preko sljedeće formule:

$$w = \frac{\gamma \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] * x * V [\text{mL}] * 0,001}{m [\text{g}]}$$

γ – koncentracija ispitivanog analita nakon razrjeđenja [$\mu\text{g/mL}$]

x – razrjeđenje uzorka

V – volumen otopine uzorka [mL]; V = 10 mL

0,001 – faktor pretvorbe μg u mg

m – odvaga liofiliziranog uzorka [g] prikazana u [Tablici 3](#)

Ova formula primijenjena je za sva mjerenja te su potom izračunate srednje vrijednosti i standardne devijacije za svaki uzorak korištenjem funkcija AVERAGE i STDEV u programu Microsoft Excel 2007.

3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

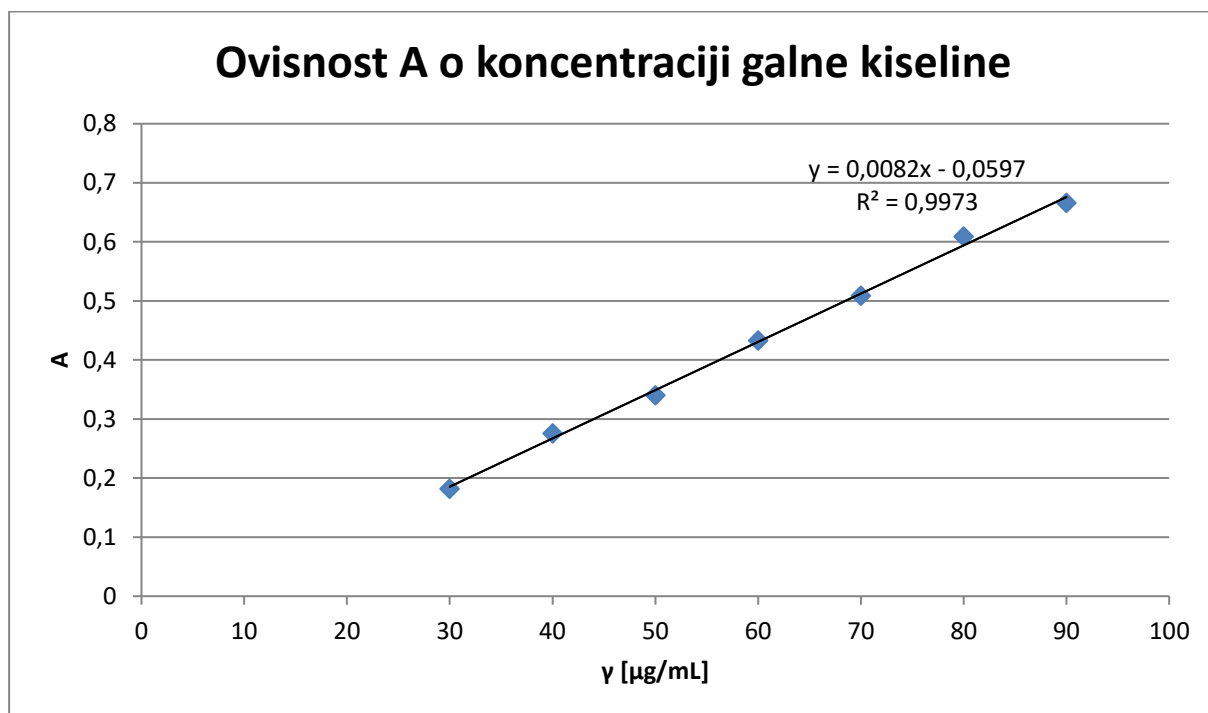
Mjerenja sadržaja ukupnih polifenola i flavonoida kao i mjerenja antioksidativne aktivnosti uzoraka pomoću testa keliranja metala, FRAP, DPPH i ABTS testa provedena su u triplikatu, a dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Statistički značajne razlike između uzoraka procijenjene su pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA) nakon koje je slijedio Tukeyev *post-hoc* test. Povezanost između različitih parametara procijenjena je pomoću Pearsonovog koeficijenta koleracije (r), uz razinu značajnosti $\alpha = 0,05$. Obrada podataka provedena je pomoću programa Microsoft Excel 2007 (Microsoft) i IBM SPSS Statistics 29.0.1.0 (SPSS Statistics).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLA

4.1.1. Baždarni pravac galne kiseline

Kao standard za određivanje ukupnih polifenola korištena je galna kiselina. Jednadžba pravca je $y = 0,0082x - 0,0597$ gdje je y = srednja apsorbancija pri 765 nm dobivena na temelju dva uzastopna mjerenja, a x = koncentracija galne kiseline.



Slika 3: Baždarni pravac galne kiseline

4.1.2. Sadržaj ukupnih polifenola

Sva mjerenja uzoraka provedena su u triplikatu. Izmjerene su apsorbancije uzoraka na 765 nm ([Tablica 10](#)).

Tablica 10: Apsorbancija ispitivanih razrijeđenih uzoraka u reakciji s Folin-Ciocalteu reagensom

Uzorak	A ₁	A ₂	A ₃
<i>G. alypum</i>	0,7895	0,8727	0,8767
<i>G. cordifolia</i>	0,5604	0,6225	0,6201
<i>G. meridionalis</i>	0,5915	0,6901	0,6954
<i>G. punctata</i>	0,5755	0,6305	0,6463

Sadržaj ukupnih polifenola se izražava u mg ekvivalenta galne kiseline po g suhog ekstrakta (mg EGK/g SE; [Tablica 11](#)).

Tablica 11: Sadržaj ukupnih polifenola u uzorcima (srednja vrijednost ± standardna devijacija, n = 3)

<i>G. alypum</i> [mg EGK/g SE]	<i>G. cordifolia</i> [mg EGK/g SE]	<i>G. meridionalis</i> [mg EGK/g SE]	<i>G. punctata</i> [mg EGK/g SE]
109,39 ± 5,94 ^a	80,57 ± 4,29 ^b	86,35 ± 7,03 ^b	82,17 ± 4,51 ^b

EGK – ekvivalent galne kiseline, SE – suhi ekstrakt; Vrijednosti naznačene različitim slovima u eksponentu se međusobno statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$): $a > b$

Najveća prosječna količina polifenola određena je u ekstraktu nadzemnih dijelova vrste *G. alypum*, a iznosila je $109,39 \pm 5,94$ mg EGK/g SE te se ona značajno razlikovala od ostalih ispitivanih vrsta. Sadržaj polifenola između ostalih ispitivanih vrsta nije se statistički značajno razlikovao. Po prosječnom sadržaju polifenola, nakon ekstrakta vrste *G. alypum* slijedili su metanolni ekstrakti vrsta *G. meridionalis* i *G. punctata* ($86,35 \pm 7,03$ mg EGK/g SE i $82,17 \pm 4,51$ mg EGK/g SE). Najmanji prosječni sadržaj polifenola pronađen je kod vrste *G. cordifolia*, a iznosio je $80,57 \pm 4,29$ EGK/g SE.

U istraživanju El-Mernissija i sur. (2023) sadržaj polifenola u metanolnom ekstraktu listova vrste *G. alypum* bio je $183,33 \pm 3,25$ mg EGK/g SE. Također su ustanovili da etil acetatni ($264 \pm 1,32$ mg EGK/g SE), butanolni ($201 \pm 1,15$ mg EGK/g SE) i vodeni ($198 \pm 2,64$ mg EGK/g SE) ekstrakti listova navedene vrste imaju znatno veće vrijednosti od onih dobivenih u našem radu. Prema radu Massinisse i sur. (2022), ukupan sadržaj polifenola u 80 %-tnom metanolnom ekstraktu listova vrste *G. alypum* bio je znatno veći od onih dobivenih u ovom radu ($240 \pm 6,20$ mg EGK/g SE). Ouffai i sur. (2022) su pripremili vodene ekstrakte nadzemnih dijelova vrste *G. alypum* različitim metodama ekstrakcije čime su dobili macerat, infuz i dekokt. U svim ekstraktima je ukupni sadržaj polifenola bio veći od onih u našoj studiji (macerat: $134,82 \pm 7,05$ mg EGK/g SE; infuz: $195,50 \pm 2,90$ mg EGK/g SE ; dekokt: $196,52 \pm 10,76$ mg EGK/g SE). U radovima Massinisse i sur. (2022) te Ouffai i sur. (2022) biljni materijal je bio sakupljen na područja grada Batna u Alžiru dok je u radu El-Mernissija i sur. (2023) bio sakupljen na područja grada Taounate u Maroku. Uzrok većim količinama ukupnih polifenola u uzorcima s navedenih područja mogli bi biti nepovoljniji klimatski uvjeti poput ekstremnih temperatura, suše, veće izloženosti ionizirajućem zračenju i visokom intenzitetu svjetlosti (Ahmad i sur., 2019). Naime, povećanje okolišnog stresa uzrokuje povećanje sekundarnih metabolita u

biljkama, a među njima i polifenola (Zagoskina i sur., 2023; Ahmad i sur., 2019; Djeridane i sur., 2006).

Friščić i sur. (2022) također su dobili da je sadržaj ukupnih polifenola u metanolnim ekstraktima nadzemnih dijelova najveći za vrstu *G. alypum* ($112,34 \pm 2,17$ mg EGK/g SE) i *G. meridionalis* ($98,90 \pm 3,93$ mg EGK/g SE). Nešto manje vrijednosti je imala vrsta *G. cordifolia* ($95,59 \pm 1,62$ mg EGK/g SE), dok je najnižu vrijednost imala *G. punctata* ($79,92 \pm 2,18$ mg EGK/g SE). Također su istražili i ukupan sadržaj polifenola u metanolnim ekstraktima listova istih vrsta te su vrijednosti bile nešto veće od onih u našoj studiji (u rasponu od $98,50 \pm 1,23$ mg EGK/g SE do $159,82 \pm 2,34$ mg EGK/g SE).

Prema Khantouchi i sur. (2015), sadržaj ukupnih polifenola u metanolnom ekstraktu listova vrste *G. alypum* bio je $142,3 \pm 1,5$ mg EGK/g SE. Slične vrijednosti pokazali su ostali ispitivani ekstrakti pa je tako sadržaj ukupnih polifenola u heksanskom ekstraktu bio $150,3 \pm 1,8$ mg EGK/g SE, u diklormetanskom ekstraktu $147,1 \pm 1,3$ mg EGK/g SE te u vodenom ekstraktu $140,1 \pm 1,2$ mg EGK/g SE.

Prema Taghzoutiju i sur. (2016), metanolni ekstrakti listova ($67,55 \pm 2,26$ mg EGK/g SE) i stabljike ($94,83 \pm 1,27$ mg EGK/g SE) imali su manji sadržaj ukupnih polifenola od onih u našoj studiji, ali je metanolni ekstrakt korijena ($131,48 \pm 8,5$ mg EGK/g SE) imao veće vrijednosti. Uz to, odredili su sadržaj ukupnih polifenola u etil acetatnim ekstraktima listova, stabljike i korijena vrste *G. alypum* te su ti ekstrakti imali manji sadržaj ukupnih polifenola od naših ($50,99 \pm 1,39$ mg EGK/g SE; $51,42 \pm 1,86$ mg EGK/g SE; $83,70 \pm 5,79$ mg EGK/g SE). Asraoui i sur. (2021) su Soxhlet ekstrakcijom listova vrste *G. alypum* manje polarnim otapalima dobili manji sadržaj polifenola od onih u ovom radu (etil acetat: $56,5 \pm 0,61$ mg EGK/g SE; kloroform: $18,9 \pm 0,48$ mg EGK/g SE).

Touaibia i Chaouch (2016) dobili su veće vrijednosti ukupnih polifenola od onih u našem radu. Naime, oni su pripremili etanolne ekstrakte listova vrste *G. alypum* dvjema različitim ekstrakcijskim metodama – Soxhlet ekstrakcijom i maceracijom. Oba ekstrakta su imali veći sadržaj ukupnih polifenola od onih dobivenih u našem radu (Soxhlet ekstrakt: $198 \pm 0,52$ mg EGK/g SE; macerat: $139 \pm 1,22$ mg EGK/g SE).

Khelifi i sur. (2011) su u metanolnom ekstraktu listova vrste *G. alypum* pripremljenom ekstrakcijom u jednom koraku dobili sadržaj ukupnih polifenola od $116,86 \pm 2,80$ mg EGK/g SE dok su ekstrakcijom u više koraka dobili vrijednost od $139,95 \pm 3,40$ mg EGK/g SE. Prema istom radu, sadržaj ukupnih polifenola u vodenom ekstraktu listova iste vrste bio je $55,10 \pm 2,30$ mg EGK/g SE, u diklormetanskom ekstraktu $41,19 \pm 1,33$ mg EGK/g SE, a u petroleterskom ekstraktu $8,50 \pm 0,10$ mg EGK/g SE.

Možemo uočiti da ekstrakti listova sadrže više ukupnih polifenola od ekstrakata stabljike i nadzemnih dijelova biljke (El-Mernissi i sur., 2023; Friščić i sur., 2022; Massinissa i sur., 2022; Friščić i sur., 2018).

Za razliku od našeg rada, u nekim radovima su rezultati izražavani po gramu suhog biljnog materijala što je rezultiralo mnogo nižim vrijednostima sadržaja polifenola (Djeridane i sur., 2006).

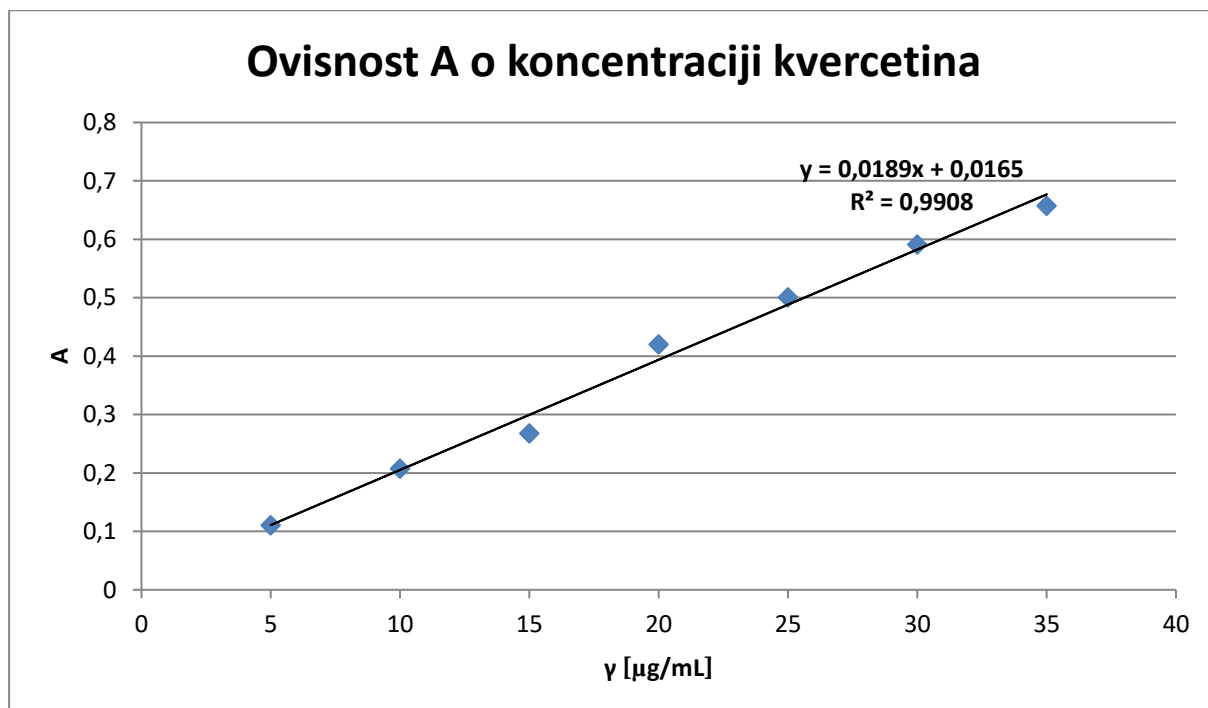
Varijabilnost u količini polifenola mogla bi biti posljedica bioloških i okolišnih čimbenika kao što su klimatski uvjeti, sastav tla, salinitet, vodeni stres, intenzitet svjetla temperatura, faze sazrijevanja, razdoblje i mjesto berbe (Khantouche i sur., 2018). Na primjer, teški klimatski uvjeti (visoka izloženost suncu, visoka temperatura, suša) uzrokuju povećani metabolizam polifenola (Djeridane i sur., 2006). Na sadržaj ukupnih polifenola bitno utječu metoda i vrijeme ekstrakcije, topljivost i vrsta korištenog otapala. Tako polarne frakcije imaju više polifenola u sebi od nepolarnih frakcija (Kraza i sur., 2020; Khlifi i sur., 2011).

4.2. ODREĐIVANJE FLAVONOIDA

4.2.1. Baždarni pravac kvercetina

Kao standard za određivanje flavonoida korišten je kvercetin.

Jednadžba pravca je $y = 0,0189x + 0,0165$ gdje je y = srednja apsorbancija pri 415 nm dobivena na temelju dva uzastopna mjerenja, a x = koncentracija kvercetina.



Slika 4: Baždarni pravac kvercetina

4.2.2. Sadržaj flavonoida

Sva mjerenja uzoraka provedena su u triplikatu. Izmjerene su apsorbancije uzoraka na 415 nm ([Tablica 12](#)).

Tablica 12: Apsorbancija ispitivanih razrijeđenih uzoraka u reakciji s $AlCl_3$

Uzorak	A ₁	A ₂	A ₃
<i>G. alypum</i>	0,4079	0,3868	0,4101
<i>G. cordifolia</i>	0,5698	0,5913	0,5778
<i>G. meridionalis</i>	0,3911	0,3892	0,3604
<i>G. punctata</i>	0,6183	0,6220	0,6212

Sadržaj flavonoida se izražava u miligramima ekvivalenta kvercetina po gramu suhog ekstrakta (mg EK/g SE; [Tablica 13](#)).

Tablica 13: Sadržaj flavonoida u uzorcima (srednja vrijednost \pm standardna devijacija, $n = 3$)

<i>G. alypum</i> [mg EK/g SE]	<i>G. cordifolia</i> [mg EK/g SE]	<i>G. meridionalis</i> [mg EK/g SE]	<i>G. punctata</i> [mg EK/g SE]
20,17 $\pm 0,67^c$	29,80 $\pm 0,57^b$	18,96 $\pm 0,90^c$	31,80 $\pm 0,10^a$

EK – ekvivalent kvercetina, SE – suhi ekstrakt. Vrijednosti naznačene različitim slovima u eksponentu se međusobno statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$): $a > b > c$

Najveći sadržaj flavonoida određen je u metanolnim ekstraktima vrste *G. punctata*, a iznosio je $31,80 \pm 0,10$ mg EK/g SE te se značajno razlikovao od onih ostalih ispitivanih vrsta. Zatim je slijedio metanolni ekstrakt vrste *G. cordifolia* ($29,80 \pm 0,57$ mg EK/g SE). Najmanji prosječni sadržaj flavonoida zabilježen je u vrstama *G. alypum* i *G. meridionalis* ($20,17 \pm 0,67$ mg EK/g SE; $18,96 \pm 0,90$ mg EK/g SE).

U istraživanju El-Mernissija i sur. (2023) sadržaj flavonoida bio je veći od onog dobivenog u ovom radu. U njihovom radu sadržaj flavonoida u metanolnom ekstraktu listova vrste *G. alypum* je bio $43,04 \pm 1,35$ mg EK/g SE dok je sadržaj flavonoida u butanolnom ekstraktu listova navedene vrste bio $41,90 \pm 0,83$ mg EK/g SE, u etil acetatnom ekstraktu $30,42 \pm 2,17$ mg EK/g SE te u vodenom ekstraktu $36,71 \pm 1,67$ mg EK/g SE.

Friščić i sur. (2022) su također dobili da je sadržaj flavonoida u metanolnim ekstraktima nadzemnih dijelova najveći za vrstu *G. punctata* ($43,25 \pm 0,31$ mg EK/g SE). Manje vrijednosti su imale vrste *G. alypum* ($26,85 \pm 0,46$ mg EK/g SE), *G. cordifolia* ($26,19 \pm 0,40$ mg EK/g SE) i *G. meridionalis* ($25,42 \pm 0,24$ mg EK/g SE). Isti autori istražili su i sadržaj flavonoida u metanolnim ekstraktima listova istih vrsta te su vrijednosti bile nešto veće od onih u nadzemnim dijelovima biljke (*G. punctata* $48,49 \pm 2,37 - 63,03 \pm 0,72$ mg EK/g SE > *G. meridionalis* $39,72 \pm 0,60 - 43,57 \pm 0,50$ mg EK/g SE > *G. cordifolia* $36,54 \pm 1,45 - 42,23 \pm 0,67$ mg EK/g SE > *G. alypum* $30,43 \pm 0,29 - 32,26 \pm 1,37$ mg EK/g SE).

Khantouche i sur. (2018) te Touaibia i Chaouch (2016) su određivali sadržaj flavonoida u etanolnom ekstraktu listova vrste *G. alypum* dobivenom maceracijom. U oba istraživanja su dobivene vrijednosti bile usporedive s vrijednostima dobivenim u ovom radu. U studiji Khantouche i sur. (2018) sadržaj flavonoida je bio $20,7 \pm 0,7$ mg EK/g SE, a u studiji Touaibia i Chaouch $19,26 \pm 0,22$ mg EK/g SE. Uz to, Touaibia i Chaouch su ispitali etanolni ekstrakt listova vrste *G. alypum* dobiven Soxhlet ekstrakcijom te je on imao manji sadržaj flavonoida ($10,20 \pm 0,58$ mg EK/g SE) od onog dobivenog u ovom radu.

Prema radu Taghzoutija i sur. (2016) sadržaj flavonoida u metanolnom ekstraktu listova bio je $25,90 \pm 0,18$ mg EK/g SE dok je metanolni ekstrakt stabljike vrste *G. alypum* imao veće vrijednosti ($39,14 \pm 0,48$ mg EK/g SE) od onih dobivenih u ovom radu. Suprotno tome, metanolni ekstrakt korijena imao je nižu vrijednost ($14,48 \pm 0,22$ mg EK/g SE). Osim u metanolnim ekstraktima, isti autori odredili su sadržaj flavonoida i u etil acetatnim ekstraktima te je sadržaj u ekstraktu listova iznosio $8,96 \pm 0,42$ mg EK/g SE.

Metanolni ekstrakt listova vrste *G. alypum* u radu Khantouche i sur. (2015) imao je niži sadržaj flavonoida ($13,2 \pm 0,4$ mg EK/g SE) od onih u ovom radu. Sadržaj flavonoida u heksanskom ekstraktu listova vrste *G. alypum* bio je $15,6 \pm 0,5$ mg EK/g SE, u diklormetanskom ekstraktu $14,3 \pm 0,7$ mg EK/g SE te u vodenom ekstraktu $12,3 \pm 0,3$ mg EK/g SE.

Khelifi i sur. (2011) su u metanolnom ekstraktu listova dobivenom ekstrakcijom u jednom koraku ($18,20 \pm 0,2525$ mg EK/g SE) i ekstrakcijom u više koraka ($19,29 \pm 0,04$ mg EK/g SE) dobili slične vrijednosti kao u ovom radu. Prema istoj studiji, vodeni, diklormetanski i petroleterški ekstrakti listova vrste *G. alypum* su imali manji sadržaj flavonoida od onih zabilježenih u ovom radu (voda: $1,33 \pm 0,02$ mg EK/g SE; diklormetan: $0,34 \pm 0,02$ mg EK/g SE; petroleter: $0,31 \pm 0,02$ mg EK/g SE).

Kao i kod polifenola, na sadržaj flavonoida mogu utjecati klimatski uvjeti, razdoblje i mjesto berbe, te metoda i vrijeme ekstrakcije, topljivost i vrsta korištenog otapala (Khantouche i sur., 2018; Khelifi i sur., 2011).

Možemo uočiti da ekstrakti listova sadrže više flavonoida u usporedbi s ekstraktima drugih biljnih dijelova (El-Mernissi i sur., 2023; Friščić i sur., 2018). Također, metanolni ekstrakti imaju veći sadržaj flavonoida od vodenih i manje polarnih ekstrakata (El-Mernissi i sur., 2023; Khantouche i sur., 2015; Khelifi i sur., 2011).

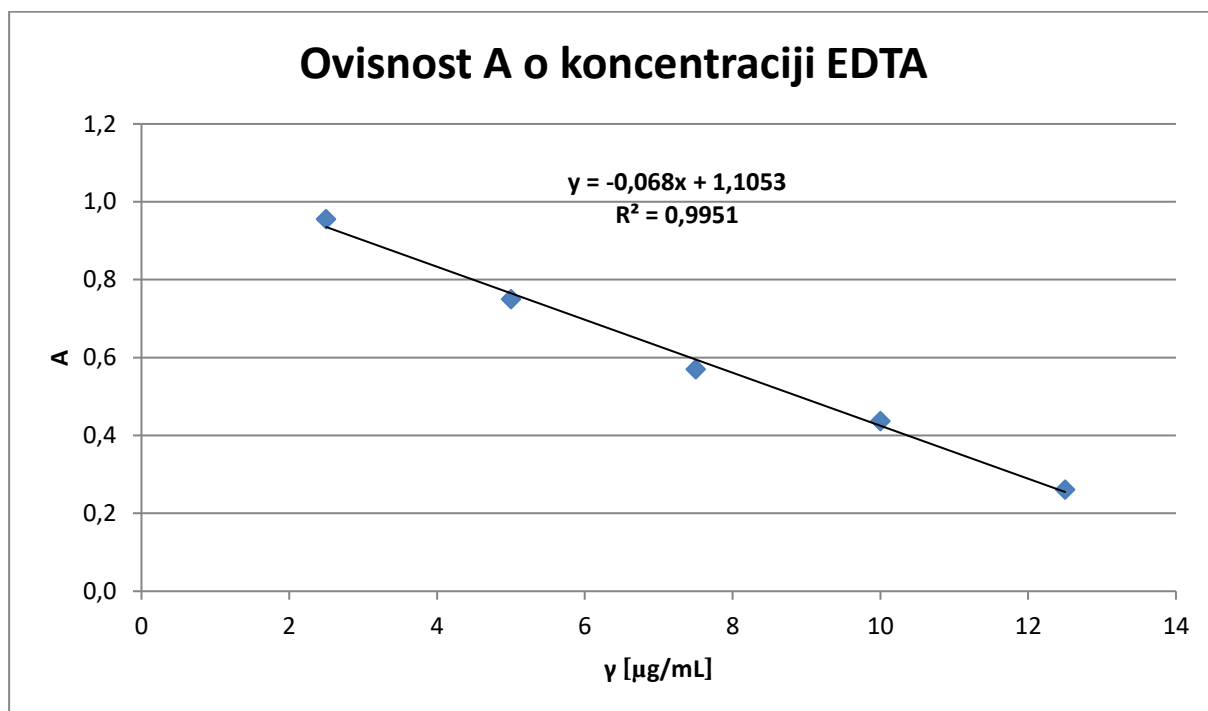
Prema podacima u literaturi (Friščić i sur., 2022), ali i prema rezultatima u ovom radu, vrsta *G. alypum* je među istraženim vrstama roda *Globularia* biljka s najvećim ukupnim sadržajem polifenola, ali ne i najvećim sadržajem flavonoida što ukazuje na to da sadrži relativno veću količinu neflavonoidnih polifenola, primjerice feniletanoida (Friščić i sur., 2022).

4.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI *IN VITRO* TESTOM KELIRANJA METALA

4.3.1. Baždarni pravac EDTA

Kao standard za određivanje antioksidativne aktivnosti *in vitro* testom keliranja metala korištena je EDTA.

Jednadžba pravca je $y = -0,068x + 1,1053$ gdje je y = srednja apsorbancija pri 562 nm dobivena na temelju tri uzastopna mjerenja, a x = koncentracija EDTA.



Slika 5: Baždarni pravac EDTA

4.3.2. Antioksidativna aktivnost uzoraka u testu keliranja metala

Sva mjerenja provedena su u triplikatu. Izmjerene su apsorbancije uzoraka na 562 nm ([Tablica 14](#)).

Tablica 14: Apsorbancija ispitivanih razrijeđenih uzoraka u reakciji s ferozinom

Uzorak	A ₁	A ₂	A ₃
<i>G. alypum</i>	0,8120	0,8050	0,7888
<i>G. cordifolia</i>	0,7650	0,7565	0,7813
<i>G. meridionalis</i>	0,3657	0,3427	0,3472
<i>G. punctata</i>	0,4781	0,4768	0,4574

Antioksidativna aktivnost se izražava u miligramima ekvivalenta EDTA po gramu suhog ekstrakta (mg EE/g SE; [Tablica 15](#)).

Tablica 15: Antioksidativna aktivnost uzoraka u testu keliranja metala (srednja vrijednost \pm standardna devijacija, $n = 3$)

<i>G. alypum</i> [mg EE/g SE]	<i>G. cordifolia</i> [mg EE/g SE]	<i>G. meridionalis</i> [mg EE/g SE]	<i>G. punctata</i> [mg EE/g SE]
1,10 $\pm 0,04^d$	1,24 $\pm 0,05^c$	2,73 $\pm 0,04^a$	2,32 $\pm 0,04^b$

EE – ekvivalent EDTA, SE – suhi ekstrakt. Vrijednosti naznačene različitim slovima u eksponentu se međusobno statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$): $a > b > c > d$

Najveći antioksidativni učinak imao je metanolni ekstrakt vrste *G. meridionalis* ($2,73 \pm 0,04$ mg EE/g SE), a najmanji metanolni ekstrakt vrste *G. alypum* ($1,10 \pm 0,04$ mg EE/g SE). Metanolni ekstrakt vrste *G. punctata* pokazao je antioksidativnu aktivnost od $2,32 \pm 0,04$ mg EE/g SE, a metanolni ekstrakt vrste *G. cordifolia* od $1,24 \pm 0,05$ mg EE/g SE.

Rodríguez-Pérez i sur. (2018) su istraživali dvije vrste roda *Globularia*, *G. orientalis* i *G. trichosantha*, te su određivali antioksidativnu aktivnost njihovih etil acetatnih, metanolnih i vodenih ekstrakata pomoću testa keliranja metala. Svi ispitani ekstrakti navedenih vrsta su imali jaču antioksidativnu aktivnost od ekstrakata vrsta roda *Globularia* ispitanih u ovom radu (etil acetat: *G. orientalis*: $4,08 \pm 0,30$ mg EE/g SE; *G. trichosantha*: $11,14 \pm 0,10$ mg EE/g SE; metanol: *G. orientalis*: $4,22 \pm 0,10$ mg EE/g SE; *G. trichosantha*: $7,64 \pm 0,36$ mg EE/g SE; voda: *G. orientalis*: $16,17 \pm 0,08$; *G. trichosantha*: $16,59 \pm 0,08$).

U istraživanju Amessis-Ouchemoukh i sur. (2014b) metanolni ekstrakti devet odabranih mediteranskih ljekovitih biljaka podvrgnuti su *in vitro* testu keliranja metala, a među njima i metanolni ekstrakti vrste *G. alypum* (listovi i cvjetovi). Ti metanolni ekstrakti su pokazali najmanju moć keliranja Fe^{2+} iona u usporedbi s ekstraktima drugih vrsta koje su bile uključene u navedeno istraživanje.

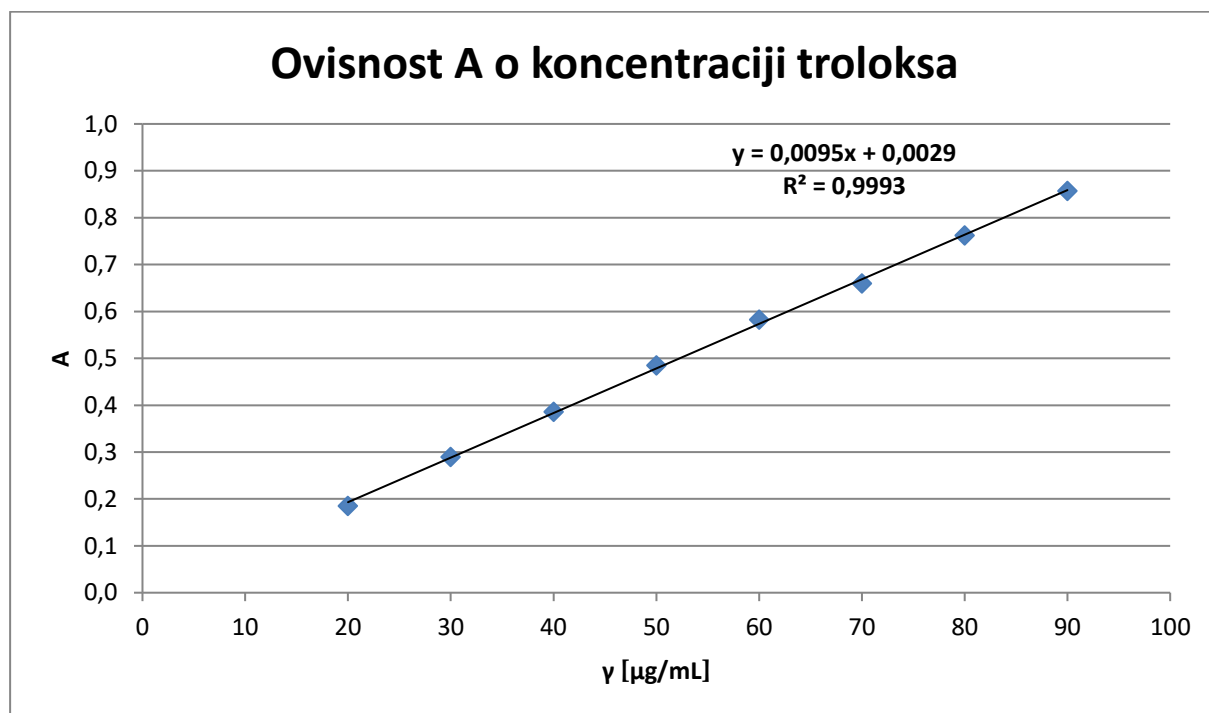
Proučavajući vodeni i metanolni ekstrakt vrste *G. alypum*, Bouriche i sur. (2017) su uočili da su oba ekstrakta pokazala sposobnost keliranja metala. Vodeni ekstrakt pokazao je veću sposobnost keliranja od metanolnog ekstrakta te je pri koncentraciji 300 $\mu\text{g/mL}$ njegova kelirajuća aktivnost bila 97,53 % dok je kelirajuća aktivnost metanolnog ekstrakta bila 91,02 %.

4.4. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI *IN VITRO* FRAP TESTOM

4.4.1. Baždarni pravac troloksa u FRAP testu

Kao standard za određivanje antioksidativne aktivnosti *in vitro* FRAP testom korišten je troloks.

Jednadžba pravca je $y = 0,0095x + 0,0029$ gdje je y = srednja apsorbancija pri 593 nm dobivena na temelju tri uzastopna mjerenja, a x = koncentracija troloksa.



Slika 6: Baždarni pravac troloksa u FRAP testu

4.4.2. Antioksidativna aktivnost uzoraka u FRAP testu

Sva mjerenja uzoraka provedena su u triplikatu. Izmjerene su apsorbancije uzoraka na 593 nm (Tablica 16).

Tablica 16: Apsorbancija ispitivanih razrijeđenih uzoraka u reakciji s FRAP reagensom

Uzorak	A ₁	A ₂	A ₃
<i>G. alypum</i>	1,0714	0,8982	0,8882
<i>G. cordifolia</i>	0,6531	0,7542	0,6353
<i>G. meridionalis</i>	0,6904	0,6837	0,7994
<i>G. punctata</i>	0,8188	0,7017	0,8198

Antioksidativna aktivnost se izražava na dva načina kako bi lakše usporedili naše rezultate s literaturnim podacima, u miligramima ekvivalenta troloksa po gramu suhog ekstrakta (mg ET/g SE) i milimolima ekvivalenta troloksa po litri otopine ekstrakta (mmol ET/L OE; [Tablica 17](#)).

Tablica 17: Antioksidativna aktivnost uzoraka u FRAP testu (srednja vrijednost \pm standardna devijacija, $n = 3$)

<i>G. alypum</i> [mg ET/g SE]/ [mmol ET/L OE]	<i>G. cordifolia</i> [mg ET/g SE]/ [mmol ET/L OE]	<i>G. meridionalis</i> [mg ET/g SE]/ [mmol ET/L OE]	<i>G. punctata</i> [mg ET/g SE]/ [mmol ET/L OE]
247,45 $\pm 26,84$ / 19,97 $\pm 2,17^a$	178,41 $\pm 16,88$ / 14,26 $\pm 1,35^b$	187,09 $\pm 16,84$ / 15,17 $\pm 1,37^b$	203,51 $\pm 17,78$ / 16,34 $\pm 1,43^{ab}$

ET – ekvivalent troloksa, SE – suhi ekstrakt, OE – otopina ekstrakta. Vrijednosti naznačene različitim slovima u eksponentu se međusobno statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$): $a > b > c$

Najveći antioksidativni učinak imao je metanolni ekstrakt vrste *G. alypum* ($247,45 \pm 26,84$ mg ET/g SE; $19,97 \pm 2,17$ mmol ET/L OE), a najmanji metanolni ekstrakt vrste *G. cordifolia* ($178,41 \pm 16,88$ mg ET/g SE; $14,26 \pm 1,35$ mmol ET/L OE). Metanolni ekstrakt vrste *G. meridionalis* pokazao je antioksidativnu aktivnost od $187,09 \pm 16,84$ mg ET/g SE (odnosno $15,17 \pm 1,37$ mmol ET/L OE), a metanolni ekstrakt vrste *G. punctata* od $203,51 \pm 17,78$ mg ET/g SE (odnosno $16,34 \pm 1,43$ mmol ET/L OE).

Harzallah i sur. (2010) su ispitivali antioksidativnu aktivnost metanolnih ekstrakata listova vrste *G. alypum* te je njihova vrijednost bila manja od vrijednosti dobivene u ovom radu ($8,5 \pm 0,004$ mmol ET/L OE). Isti autori su također ispitali antioksidativnu aktivnost vodenih, etil acetatnih i petroleterških ekstrakata listova te su i one bile manje od onih zabilježenih u ovom radu.

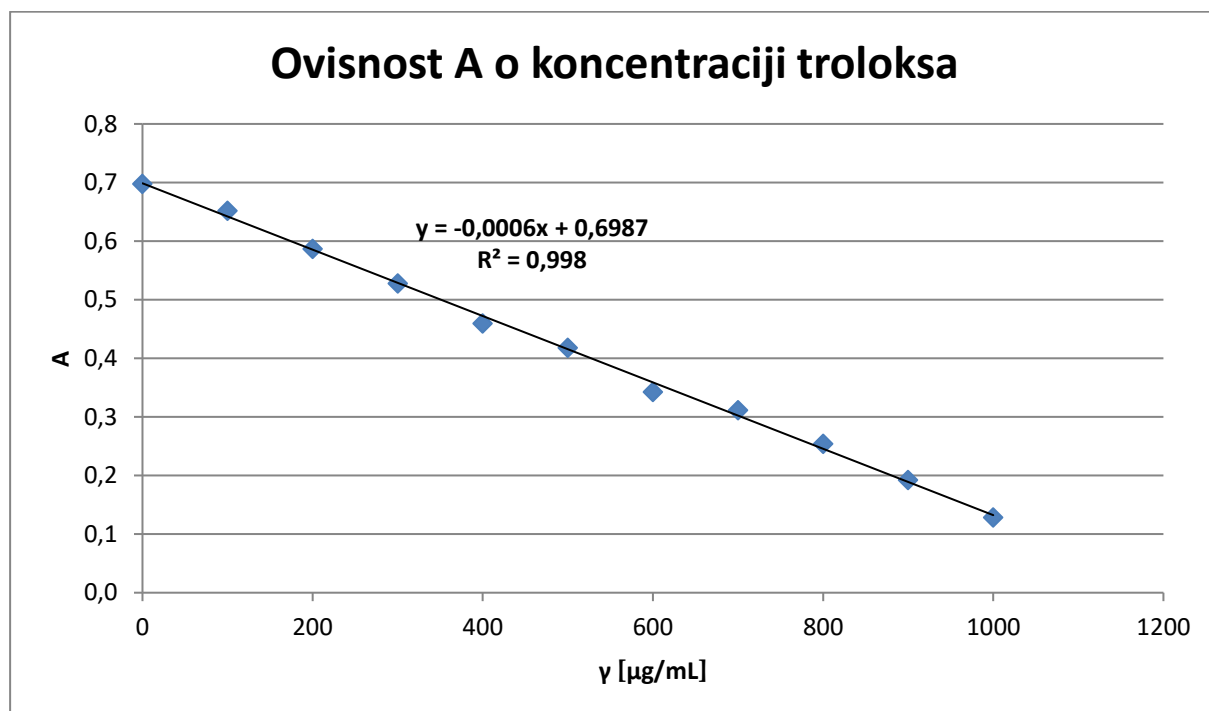
Rodríguez-Pérez i sur. (2018) su istraživali dvije vrste roda *Globularia*, *G. orientalis* i *G. trichosantha*, te su određivali antioksidativnu aktivnost njihovih metanolnih, vodenih i etil acetatnih ekstrakata pomoću FRAP testa. Oba metanolna ekstrakta imala su slabiju antioksidativnu aktivnost (*Globularia orientalis*: $127,96 \pm 1,38$ mg ET/g SE; *Globularia trichosantha*: $131,34 \pm 2,66$ mg ET/g SE) od ekstrakata svih vrsta roda *Globularia* ispitanih u ovom radu.

4.5. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI *IN VITRO* ABTS TESTOM

4.5.1. Baždarni pravac troloksa u ABTS testu

Kao standard za određivanje antioksidativne aktivnosti *in vitro* ABTS testom korišten je troloks.

Jednadžba pravca je $y = -0,0006x + 0,6987$ gdje je y = srednja apsorbancija pri 734 nm dobivena na temelju tri uzastopna mjerenja, a x = koncentracija troloksa.



Slika 7: Baždarni pravac troloksa u ABTS testu

4.5.2. Antioksidativna aktivnost uzoraka u ABTS testu

Sva mjerenja uzoraka provedena su u triplikatu. Izmjerene su apsorbancije uzoraka na 734 nm ([Tablica 18](#)).

Tablica 18: Apsorbancija ispitivanih razrijeđenih uzoraka u reakciji s ABTS^{•+} radikal kationom

Uzorak	A ₁	A ₂	A ₃
<i>G. alypum</i>	0,3256	0,339	0,3229
<i>G. cordifolia</i>	0,4278	0,4228	0,4333
<i>G. meridionalis</i>	0,3991	0,3860	0,3754
<i>G. punctata</i>	0,3886	0,3988	0,3995

Antioksidativna aktivnost se izražava u miligramima ekvivalenta troloksa po gramu suhog ekstrakta (mg ET/g SE; [Tablica 19](#)).

Tablica 19: Antioksidativna aktivnost uzoraka u ABTS testu (srednja vrijednost \pm standardna devijacija, $n = 3$)

<i>G. alypum</i> [mg ET/g SE]	<i>G. cordifolia</i> [mg ET/g SE]	<i>G. meridionalis</i> [mg ET/g SE]	<i>G. punctata</i> [mg ET/g SE]
152,45 $\pm 3,56^a$	112,81 $\pm 2,19^c$	128,02 $\pm 4,87^b$	125,65 $\pm 2,53^b$

ET – ekvivalent troloksa, SE – suhi ekstrakt. Vrijednosti naznačene različitim slovima u eksponentu se međusobno statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$): $a > b > c$

Najveći antioksidativni učinak imao je metanolni ekstrakt vrste *G. alypum* ($152,45 \pm 3,56$ mg ET/g SE), a najmanji vrste *G. cordifolia* ($112,81 \pm 2,19$ mg ET/g SE). Metanolni ekstrakt vrste *G. meridionalis* pokazao je antioksidativnu aktivnost od $128,02 \pm 4,87$ mg ET/g SE, a vrste *G. punctata* od $125,65 \pm 2,53$ mg ET/g SE.

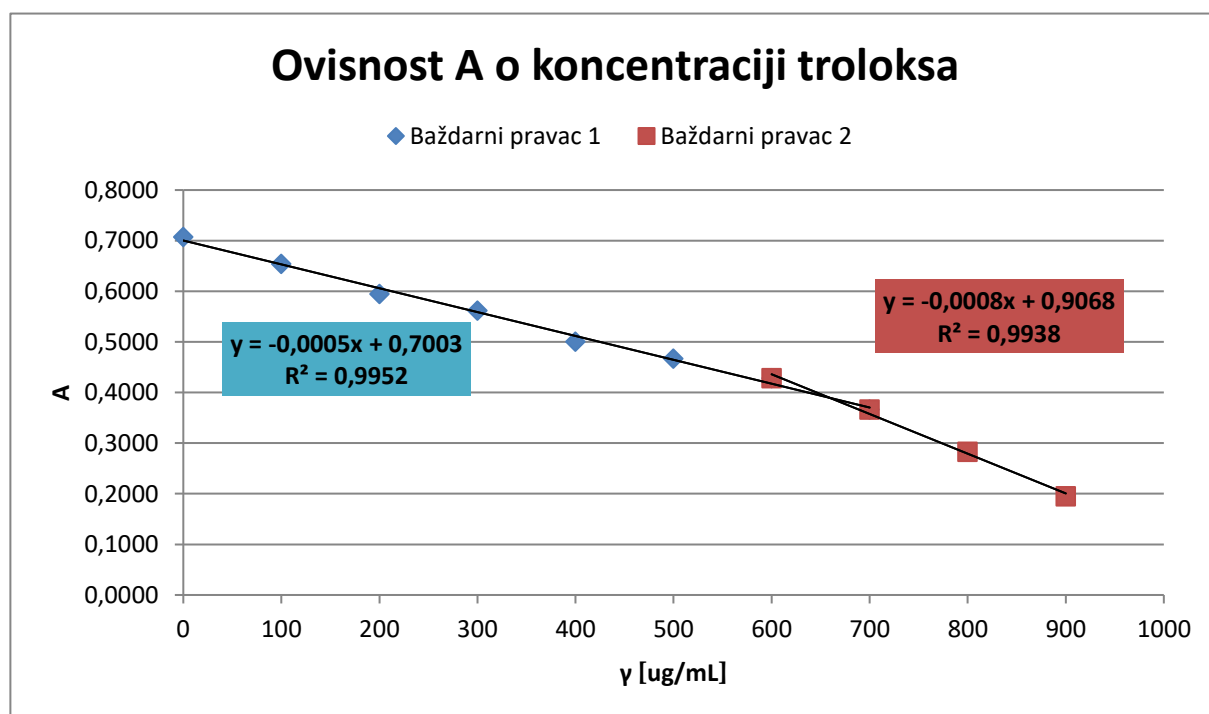
Rodríguez-Pérez i sur. (2018) su istraživali dvije vrste roda *Globularia*, *G. orientalis* i *G. trichosantha*, te su određivali antioksidativnu aktivnost njihovih metanolnih, vodenih i etil acetatnih ekstrakata pomoću ABTS testa. Oba metanolna ekstrakta imala su slabiju antioksidativnu aktivnost (*G. orientalis*: $132,09 \pm 4,95$ mg ET/g SE; *G. trichosantha*: $134,22 \pm 5,50$ mg ET/g SE) od ekstrakta vrste *G. alypum*, a veću od ostalih vrsta uključenih u ovom istraživanju.

4.6. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI *IN VITRO* DPPH TESTOM

4.6.1. Baždarni pravac troloksa u DPPH testu

Kao standard za određivanje antioksidativne aktivnosti *in vitro* DPPH testom korišten je troloks.

Na temelju rezultata dobivenih za prvih osam otopina standarda troloksa u programu Microsoft Excel dobiven je baždarni pravac 1 (Slika 8). Jednadžba pravca je $y = -0,0005x + 0,7003$ gdje je y = srednja apsorbancija pri 517 nm dobivena na temelju tri uzastopna mjerenja, a x = koncentracija troloksa. Za procjenu antioksidativne aktivnosti uzoraka korišten je baždarni pravac 2 (Slika 8) koji je izrađen na temelju vrijednosti izmjerenih za zadnje četiri ispitane otopine standarda troloksa. Jednadžba pravca je $y = -0,0008x + 0,9068$ gdje je y = srednja apsorbancija pri 517 nm dobivena na temelju tri uzastopna mjerenja, a x = koncentracija troloksa.



Slika 8: Baždarni pravac troloksa u DPPH testu

4.6.2. Antioksidativna aktivnost uzoraka u DPPH testu

Sva mjerenja uzoraka provedena su u triplikatu. Izmjerene su apsorbancije uzoraka na 517 nm (Tablica 20).

Tablica 20: ApSORBANCija ispitivanih razrijeđenih uzoraka u reakciji s DPPH radikalom

Uzorak	A ₁	A ₂	A ₃
<i>G. alypum</i>	0,2620	0,2567	0,2191
<i>G. cordifolia</i>	0,4175	0,4205	0,4206
<i>G. meridionalis</i>	0,3484	0,3487	0,3488
<i>G. punctata</i>	0,3314	0,3389	0,3705

Antioksidativna aktivnost se izražava u miligramima ekvivalenta troloksa po gramu suhog ekstrakta (mg EGK/g SE; [Tablica 21](#)).

Tablica 21: Antioksidativna aktivnost uzoraka u DPPH testu (srednja vrijednost ± standardna devijacija, n = 3)

<i>G. alypum</i> [mg ET/g SE]	<i>G. cordifolia</i> [mg ET/g SE]	<i>G. meridionalis</i> [mg ET/g SE]	<i>G. punctata</i> [mg ET/g SE]
204,48 ± 7,24 ^a	152,27 ± 0,55 ^c	171,85 ± 0,06 ^b	174,09 ± 6,45 ^b

ET – ekvivalent troloksa, SE – suhi ekstrakt. Vrijednosti naznačene različitim slovima u eksponentu se međusobno statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$): $a > b > c$

Najveći antioksidativni učinak imao je metanolni ekstrakt vrste *G. alypum* ($204,48 \pm 7,24$ mg ET/g SE), a najmanji metanolni ekstrakt vrste *G. cordifolia* ($152,27 \pm 0,55$ mg ET/g SE). Metanolni ekstrakt vrste *G. meridionalis* pokazao je antioksidativnu aktivnost od $171,85 \pm 0,06$ mg ET/g SE, a metanolni ekstrakt vrste *G. punctata* od $174,09 \pm 6,45$ mg ET/g SE.

Prema istraživanju Friščić i sur. (2022), metanolni ekstrakt nadzemnih dijelova vrste *G. alypum* je također imao najveću antioksidativnu aktivnost (IC_{50} : $17,25 \mu\text{g/mL}$) u usporedbi s vrstama *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata*.

Rodríguez-Pérez i sur. (2018) su istraživali dvije vrste roda *Globularia*, *G. orientalis* i *G. trichosantha*, te su određivali antioksidativnu aktivnost njihovih metanolnih, vodenih i etil acetatnih ekstrakata pomoću DPPH testa. Oba metanolna ekstrakta su imala slabiju antioksidativnu aktivnost (*G. orientalis*: $95,95 \pm 1,42$ mg ET/g SE; *G. trichosantha*: $95,70 \pm 1,55$ mg ET/g SE) od ekstrakata svih vrsta roda *Globularia* ispitanih u ovom radu.

4.7. KORELACIJA IZMEĐU IZMJERENIH PARAMETARA

Povezanosti između izmjerenih parametara procijenjene su pomoću Pearsonovog koeficijenta korelacije (r) i prikazane u [Tablici 22](#). Vrlo dobra pozitivna povezanost ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti utvrđene pomoću ABTS testa pokazala se statistički značajnom ($r = 0,96$, $P = 0,041$). Također, uočene su vrlo dobre pozitivne povezanosti između antioksidativne aktivnosti utvrđene FRAP testom i antioksidativne aktivnosti utvrđene ABTS te DPPH testom koje su bile statistički značajne ($r = 0,95$, $P = 0,048$; $r = 0,96$, $P = 0,035$).

*Tablica 22: Povezanost između izmjerenih parametara (sadržaja ukupnih polifenola, sadržaja flavonoida te antioksidativne aktivnosti procijenjene testom keliranja metala, FRAP, ABTS i DPPH testovima) metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova vrsta *Globularia alypum*, *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata**

	Ukupni polifenoli	Flavonoidi	Keliranje metala	FRAP	ABTS	DPPH
Ukupni polifenoli	1	-0,64 ($P = 0,356$)	-0,49 ($P = 0,514$)	0,93 ($P = 0,069$)	0,96* ($P = 0,041$)	0,93 ($P = 0,071$)
Flavonoidi		1	-0,09 ($P = 0,910$)	-0,39 ($P = 0,613$)	-0,64 ($P = 0,36$)	-0,56 ($P = 0,436$)
Keliranje metala			1	-0,43 ($P = 0,566$)	-0,25 ($P = 0,745$)	-0,22 ($P = 0,78$)
FRAP				1	0,95* ($P = 0,048$)	0,96* ($P = 0,035$)
ABTS					1	0,99* ($P = 0,007$)
DPPH						1

* – statistički značajna povezanost ($P < 0,05$)

Uočena je i izvrsna pozitivna povezanost između antioksidativne aktivnosti utvrđene u ABTS testu i antioksidativne aktivnosti utvrđene pomoću DPPH testa koja je bila statistički značajna ($r = 0,99$, $P = 0,007$).

Frišić i sur. (2022) su pomoću DPPH testa proučavali antioksidativnu aktivnost metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova vrsta *G. alypum*, *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* te su odredili njihov sadržaj ukupnih polifenola i sadržaj flavonoida. Uočili su izvrsnu

negativna korelacija između antioksidativne aktivnosti koja je bila izražena kao IC_{50} i ukupnog sadržaja polifenola ($r = -0,96$, $P < 0,05$). Također, Friščić i sur. (2018) ispitali su i antioksidativnu aktivnost metanolnih ekstrakata različitih biljnih dijelova vrsta *G. alypum*, *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata* pomoću DPPH i ABTS testova te su i njima odredili ukupni sadržaj polifenola i sadržaj flavonoida. Kao i u ovom radu, uočili su korelaciju između sadržaja polifenola i kapaciteta hvatanja ABTS radikala ($r = 0,83$, $P < 0,001$). Uočili su i dodatnu korelaciju između sadržaja ukupnih polifenola i kapaciteta hvatanja DPPH radikala ($r = 0,86$, $P < 0,001$) te slabu korelaciju između sadržaja flavonoida i kapaciteta hvatanja DPPH radikala ($r = 0,32$, $P < 0,05$). U ovom radu uočene su vrlo dobre korelacije između sadržaja ukupnih polifenola i rezultata DPPH i FRAP testova, no one nisu bile statistički značajne ($r = 0,93$, $P = 0,071$; $r = 0,93$, $P = 0,069$).

Rodríguez-Pérez i sur. (2018) su odredili sadržaj ukupnih polifenola i sadržaj flavonoida u etil acetatnim, metanolnim i vodenim ekstraktima vrsta *G. trichosantha* i *G. orientalis* te su njihovu antioksidativnu aktivnost odredili pomoću testa keliranja metala, ABTS, DPPH i FRAP testova. Kao i u ovom radu, uočili su vrlo dobru korelaciju između sadržaja ukupnih polifenola i kapaciteta hvatanja ABTS radikala ($r = 0,907$, $P < 0,05$), ali i između sadržaja ukupnih polifenola i rezultata FRAP testa ($r = 0,876$, $P < 0,05$).

Korelacije slične našima dobili su Duka i sur. (2020), koji su proučavali antioksidativni kapacitet metanolnih ekstrakata rizoma sedam svojiti roda *Iris* pomoću testa keliranja metala, ABTS, DPPH i FRAP testova te su odredili ukupni sadržaj polifenola. Oni su, kao i mi, također uočili vrlo dobru statistički značajnu korelaciju između rezultata FRAP i ABTS testova ($r = 0,828$, $P < 0,01$), rezultata FRAP i DPPH testova ($r = 0,784$, $P < 0,01$) te između sadržaja ukupnih polifenola i rezultata ABTS testa ($r = 0,864$, $P < 0,01$). Za razliku od nas, uočili su i statistički značajnu korelaciju između sadržaja ukupnih polifenola i rezultata FRAP testa ($r = 0,728$, $P < 0,05$).

El Jemli i sur. (2016) su usporedili antioksidativna svojstva određena DPPH, ABTS i FRAP testovima te sadržaj polifenola vodenih ekstrakata listova *Juniperus thurifera* L., *J. oxycedrus* L., *J. phoenicea* L. i *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast. Kao i u ovom radu, uočili su korelaciju između vrijednosti DPPH i ABTS testova ($r = 0,951$, $P < 0,01$), vrijednosti DPPH i FRAP testova ($r = 0,957$, $P < 0,01$), vrijednosti ABTS i FRAP testova ($r = 0,848$) te povezanost vrijednosti ABTS testa sa sadržajem ukupnih polifenola ($r = 0,967$, $P < 0,01$). Za razliku od ovog rada, uočili su visoku korelaciju antioksidativne aktivnosti utvrđene DPPH testom sa

sadržajem ukupnih polifenola ($r = 0,986$, $P < 0,01$) i sadržajem flavonoida ($r = 0,986$, $P < 0,01$). Uz to, sadržaj flavonoida bio je u izvrsnoj korelaciji s vrijednostima ABTS testa ($r = 0,981$), a sadržaji ukupnih polifenola i flavonoida s vrijednostima FRAP testa ($r = 0,911$, $P < 0,01$; $r = 0,929$, $P < 0,01$).

Katalinic i sur. (2005) su proučavali razlike u antioksidativnom kapacitetu tkiva štakora (*Rattus norvegicus*) ovisno o razlici u spolu pomoću ABTS i FRAP testova. Kao i u ovom radu, uočili su značajnu pozitivnu korelaciju između rezultata primijenjenih testova ($r = 0,815$, $P < 0,0001$).

Ukupna antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakata može se pripisati sadržaju polifenola, kao što su flavonoidi, fenolne kiseline, kondenzirani tanini itd. Tome u prilog idu uočene korelacije između sadržaja ukupnih polifenola i rezultata ABTS testa (Duka i sur., 2020; Friščić i sur., 2018; Rodríguez-Pérez i sur., 2018; El Jemli i sur., 2016), sadržaja ukupnih polifenola i rezultata DPPH testa (Friščić i sur., 2022; Friščić i sur., 2018; El Jemli i sur., 2016), odnosno između sadržaja ukupnih polifenola i rezultata FRAP testa (Duka i sur., 2020; Rodríguez-Pérez i sur., 2018; El Jemli i sur., 2016).

Uočene visoke korelacije između ABTS i DPPH testova (El Jemli i sur., 2016), ABTS i FRAP testova (Duka i sur., 2020; El Jemli i sur., 2016; Katalinic i sur., 2005) te između DPPH i FRAP testova (Duka i sur., 2020; El Jemli i sur., 2016) mogu se objasniti time da se svi navedeni testovi oslanjaju u prvom redu na isti mehanizam, a to je SET (Zhong i Shahidi, 2015).

Osim polifenola, sposobnost keliranja metala mogu imati i neki drugi spojevi, poput limunske kiseline, polisaharida, peptida i proteina (Rodríguez-Pérez i sur., 2018) što bi mogao biti razlog tome da nismo uočili nikakve korelacije s testom keliranja metala.

5. ZAKLJUČCI

U ovom radu istražen je sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida te antioksidativni učinak *in vitro* metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova vrsta *Globularia alypum* L., *Globularia cordifolia* L., *Globularia meridionalis* (Podp.) O. Schwarz. i *Globularia punctata* Lapeyr. Korištene su četiri *in vitro* metode određivanja antioksidativne aktivnosti: test keliranja metala, te FRAP, ABTS i DPPH testovi.

Uzorak vrste *G. alypum* sadržavao je najveću količinu polifenola ($109,39 \pm 5,94$ mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog ekstrakta). Uzorak vrste *G. punctata* sadržavao je najveću količinu flavonoida ($31,80 \pm 0,10$ mg ekvivalenta kvercetina/g suhog ekstrakta).

Antioksidativni učinak procijenjen testom keliranja metala bio je najveći za uzorak vrste *G. meridionalis* ($2,73 \pm 0,04$ mg ekvivalenta EDTA/g suhog ekstrakta), a najmanji za uzorak vrste *G. alypum* ($1,10 \pm 0,04$ mg ekvivalenta EDTA/g suhog ekstrakta). Prema rezultatima dobivenim FRAP testom, najveću redukcijsku moć imao je uzorak vrste *G. alypum* ($247,45 \pm 26,84$ mg ekvivalenta troloksa/g suhog ekstrakta). Antioksidativni učinak procijenjen ABTS testom bio je također najveći za uzorak vrste *G. alypum* ($152,45 \pm 3,56$ mg ekvivalenta troloksa/g suhog ekstrakta), a najmanji za vrstu *G. cordifolia* ($112,81 \pm 2,19$ mg ekvivalenta troloksa/g suhog ekstrakta). Prema DPPH testu, najveći antioksidativni učinak imao je uzorak vrste *G. alypum* ($204,48 \pm 7,24$ mg ekvivalenta troloksa/g suhog ekstrakta), a najmanji za uzorak vrste *G. cordifolia* ($152,27 \pm 0,55$ mg ekvivalenta troloksa/g suhog ekstrakta).

Test keliranja metala i FRAP test po prvi put su primijenjeni za procjenu antioksidativne aktivnosti vrsta *G. cordifolia*, *G. meridionalis* i *G. punctata*. Zabilježeni antioksidativni učinci mogli bi biti povezani sa sadržajem ukupnih polifenola. Naime, uočena je jaka pozitivna povezanost između sadržaja ukupnih polifenola i rezultata ABTS testa ($r = 0,96$, $P = 0,041$).

6. LITERATURA

Affenzeller M, Kadereit JW, Comes HP. Parallel bursts of recent and rapid radiation in the Mediterranean and Eritreo-Arabian biodiversity hotspots as revealed by *Globularia* and *Campylanthus* (Plantaginaceae). *J Biogeogr*, 2018, 45(3), 552–566.

Ahmad RS, Hameed A, Sameen A, Imran A, Ahmad MH, Yasmin A, Saima H, Nadeem M, Mushtaq Z, Imran M, Hussain M. Polyphenols; biosynthesis, classification and pharmacological utilization. U: Food and nutrition, Harbans L, urednik, Delhi, Avid Science, 2019, str. 2–31.

Airin P, Islam S. Measurement of total phenolics using modified Folin-Ciocalteu method processing. *J Agric Environ Consum Sci*, 2022, 22, 24–30.

Alsarayreh AZ, Oran SA, Shakhanbeh JM, Khleifat KM, Al Qaisi YT, Alfarrayeh II, Alkaramseh AM. Efficacy of methanolic extracts of some medicinal plants on wound healing in diabetic rats. *Heliyon*, 2022, 8(8), 10071.

Amessis-Ouchemoukh N, Abu-Reidah IM, Quirantes-Piné R, Rodríguez-Pérez C, Madani K, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A. Tentative characterisation of iridoids, phenylethanoid glycosides and flavonoid derivatives from *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) leaves by LC-ESI-QTOF-MS. *Phytochem Anal*, 2014a, 25(5), 389–398.

Amessis-Ouchemoukh N, Madani K, Falé PLV, Serralheiro ML, Araújo MEM. Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. *Ind Crops Prod*, 2014b, 53, 6–15.

Amri H, Hamadouche M, Alsafra Z, Eppe G, El Abed D. Chemical composition and antioxidant activity of *Globularia alypum* L. leaves essential oil from Ain-Defla (Algeria). *Chem Chem Technol*, 2018, 12(2), 213–220.

Asraoui F, Kounoun A, Cadi HE, Cacciola F, Majdoub YOE, Alibrando F, Mandolino F, Dugo P, Mondello L, Louajr A. Phytochemical investigation and antioxidant activity of *Globularia alypum* L. *Molecules*, 2021, 26(3), 759.

Barhouchi B, Aouadi S, Abdi A. Determination of eugenol and its derivative isoeugenol in *Globularia alypum* using solvent system extraction and comparative study of their antioxidant activities with various oxidation conditions. *J Chem Pharm Res*, 2014, 6(12), 776–784.

Beghalia M, Ghalem S, Allali H. Role *Globularia* in the inhibition of calcium oxalate crystallization *in vitro* study. *J Fundam Appl Sci*, 2020, 12(2), 845–851.

Bello R, Moreno L, Primo-Yúfera E, Esplugues J. *Globularia alypum* L. extracts reduced histamine and serotonin contraction *in vitro*. *Phytother Res*, 2002, 16(4), 389–392.

Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power“: The FRAP assay. *Anal Biochem*, 1996, 239(1), 70–76.

Berker KI, Güçlü K, Demirata B, Apak R. A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent. *Anal Methods*, 2010, 2(11), 1770–1778.

Bouriche H, Kada S, Senator A, Demirtaş I, Ozen T, Toptanci BÇ, Kizil G, Kizil M. Phenolic content and biomolecule oxidation protective activity of *Globularia alypum* extracts. *Braz Arch Biol Technol*, 2017, 60, e17160409.

Boutiti A, Benguerba A, Kitouni R, Bouhroum M, Benayache S, Benayache F. Secondary metabolites from *Globularia alypum*. *Chem Nat Compd*, 2008, 44, 543–544.

Caldes G, Prescott B, King J. A potential antileukemic substance present in *Globularia alypum*. *Planta Med*, 1975, 27(01), 72–76.

Cano A, Maestre AB, Hernández-Ruiz J, Arnao MB. ABTS/TAC methodology: main milestones and recent applications. *Processes*, 2023, 11(1), 185.

Chograni H, Riahi L, Zaouali Y, Boussaid M. Polyphenols, flavonoids, antioxidant activity in leaves and flowers of Tunisian *Globularia alypum* L. (Globulariaceae). *Afr J Ecol*, 2012, 51(2), 343–347.

Christ B, Müller KH. Zur serienmaessigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol-Derivaten in Drogen. *Arch Pharm*, 1960, 293(65), 1033–1042.

Crkvenčić M, Dudaš S, Jerković I, Marijanović Z, Poljuha D, Hazler Pilepić K. Essential oil composition of three *Globularia* species. *Chem Biodiversity*, 2016, 13, 219–223.

Danilewicz JC. Folin-Ciocalteu, FRAP, and DPPH• assays for measuring polyphenol concentration in white wine. *Am J Enol Vitic*, 2015, 66(4), 463–471.

Dinis TC, Maderia VM, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys*, 1994, 315(1), 161–169.

Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem*, 2006, 97(4), 654–660.

Dominguez-López I, Pérez M, Lamuela-Raventós RM. Total (poly)phenol analysis by the Folin-Ciocalteu assay as an anti-inflammatory biomarker in biological samples. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2023, 1–7.

Duka I, Maleš Ž, Bojić M, Hruševar D, Mitić B. Chemical fingerprinting, total phenolics and antioxidant activity of some *Iris* taxa. *Croat Chem Acta*, 2020, 93(1), 49–56.

El Jemli, M, Kamal R, Marmouzi I, Zerrouki A, Cherrah Y, Alaoui K. Radical-scavenging activity, and ferric reducing ability of *Juniperus thurifera* (L.), *J. oxycedrus* (L.), *J. phoenicea* (L.) and *Tetraclinis articulata* (L.). *Adv Pharmacol Sci*, 2016, 6392656.

El-Mernissi Y, Zouhri A, Labhar A, Zeouk I, M'hamed A, Soufian EB, Salhi A, Hajji L, Hassan A. Ethnobotanical use, phytochemical study, and antioxidant activity of *Globularia alypum* L. *Arab J Med Aromat Plants*, 2023, 9(1), 115–127.

Es-Safi NE, Khlifi S, Kerhoas L, Kollmann A, El Abbouyi A, Ducrot PH. Antioxidant constituents of the aerial parts of *Globularia alypum* growing in Morocco. *J Nat Prod*, 2005, 68(8), 1293–1296.

Es-Safi NE, Kollmann A, Khlifi S, Ducrot PH. Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L. structure–activity relationship. *LWT - Food Sci Technol*, 2007, 40, 1246–1252.

Faisal H, Handayani S. Comparison of antioxidant activity of ethanol extract of fruit and okra leaves (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) with DPPH and ABTS methods. *Indones J Pharm Clin Res*, 2019, 2(2), 6–13.

Famurewa O. Antioxidant activities of different solvent extracts of *Moringa oleifera* seeds using DPPH assay. *Asian J Chem Sci*, 2023, 13(5), 78–85.

Fatehi N, Benmehdi H, Allali H, Oulednecir N, Adegoke KA, Ogunleye KY. Phytochemical and antioxidant screening of some folkloric medicinal plants from Bechar region, Southwest Algeria. *Agric Conspec Sci*, 2023, 88(4), 289–299.

Fawwaz M, Pratama M, Latu S, Rahayu R, Nurkamilah A. The potential of bitter leaf (*Vernonia amygdalina*) in herbal medicine as anti-inflammatory agent. *Ind J Teknol dan Manaj Agroindustri*, 2023, 12(1), 36–44.

Friščić M, Bucar F, Hazler Pilepić K. LC-PDA-ESI-MSⁿ analysis of phenolic and iridoid compounds from *Globularia* spp. *J Mass Spectrom*, 2016, 51(12), 1211–1236.

Friščić M, Maslo S, Garić R, Maleš Ž, Hazler Pilepić K. Comparative analysis of specialized metabolites and antioxidant capacity *in vitro* of different natural populations of *Globularia* spp. *Acta Bot Croat*, 2018, 77(1), 1–9.

Friščić M, Petlevski R, Kosalec I, Madunić J, Matulić M, Bucar F, Hazler Pilepić K, Maleš Ž. *Globularia alypum* L. and related species: LC-MS profiles and antidiabetic, antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial and anticancer potential. *Pharmaceuticals*, 2022, 15(5), 506.

Ghliissi Z, Kallel R, Sila A, Harrabi B, Atheymen R, Zeghal K, Bougatef A, Sahnoun Z. *Globularia alypum* methanolic extract improves burn wound healing process and inflammation in rats and possesses antibacterial and antioxidant activities. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84, 1488–1495.

Ghliissi Z, Krichen F, Kallel R, Amor IB, Boudawara T, Gargouri J, Zeghal K, Hakim A, Bougatef A, Sahnoun Z. Sulfated polysaccharide isolated from *Globularia alypum* L.: Structural characterization, *in vivo* and *in vitro* anticoagulant activity, and toxicological profile. *Int J Biol Macromol*, 2019, 123, 335–342.

Grabska-Kobyłecka I, Szpakowski P, Król A, Książek-Winiarek D, Kobyłecki A, Głabiński A, Nowak D. Polyphenols and their impact on the prevention of neurodegenerative diseases and development. *Nutrients*, 2023, 15(15), 3454.

Grochowski DM, Uysal S, Aktumsek A, Granica S, Zengin G, Ceylan R, Locatelli M, Tomczyk M. *In vitro* enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phytochemical profile of *Potentilla thuringiaca*. *Phytochem Lett*, 2017, 20, 365–372.

Gulcin İ, Alwasel SH. DPPH radical scavenging assay. *Processes*, 2023, 11 (8), 2248.

Gulcin İ, Alwasel SH. Metal ions, metal chelators and metal chelating assay as antioxidant method. *Processes*, 2022, 10(1), 132.

Hajji N, Hudik E, Iovino P, Zouari N, Sebai H, Nusse O, Ciacci C. *Globularia alypum* L. modulates inflammatory markers in human colon and shows a potential antioxidant role in myeloid leukemic cells. *Transl Med UniSa*, 2021, 24(1), 13–23.

Hajji N, Russo I, Bianco J, Piazza O, Iovino P, Santonicola A, Ciacci C. The role of *Globularia alypum* explored *ex vivo in vitro* on human colon biopsies from ulcerative colitis patients. *Nutrients*, 2023, 15(6), 1457.

Hajji N, Wannas D, Jabri MA, Rtibi K, Tounsi H, Abdellaoui A, Sebai H. Purgative/laxative actions of *Globularia alypum* aqueous extract on gastrointestinal-physiological function and against loperamide-induced constipation coupled to oxidative stress and inflammation in rats. *Neurogastroenterol Motil*, 2020, 32(8), e13858.

Harzallah H, Neffati A, Skandrani I, Maaloul E, Chekir-Ghedira L, Mahjoub T. Antioxidant and antigenotoxic activities of *Globularia alypum* leaves extracts. *J Med Plants Res*, 2010, 4(19), 2048–2053.

Hong SY, Qin B. The protective role of dietary polyphenols in urolithiasis: Insights into antioxidant effects and mechanisms of action. *Nutrients*, 2023, 15(17), 3753.

Im J, Lee J, Löffler FE. Interference of ferric ions with ferrous iron quantification using the ferrozine assay. *J Microbiol Methods*, 2013, 95(3), 366–367.

Innangi M, Friščić M, Hazler Pilepić K, Danise T, Conti F, Bartolucci F, Fioretto A, Peruzzi, L. Explaining intricate morphometric variability with environmental predictors: The case of *Globularia cordifolia* species complex. *Plants*, 2020, 9(3), 314.

Iqbal I, Wilairatana P, Saqib F, Nasir B, Wahid M, Latif MF, Iqbal A, Naz R, Mubarak MS. Plant polyphenols and their potential benefits on cardiovascular health: A review. *Molecules*, 2023, 28(17), 6403.

Ji M, Gong X, Li X, Wang C, Li M. Advanced research on the antioxidant activity and mechanism of polyphenols from *Hippophae* species—A review. *Molecules*, 2020, 25(4), 917.

Katalinic V, Modun D, Music I, Boban M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2005, 140(1), 47–52.

Khantouche L, Fatma G, Motri S, Mejri M, Abderrabba M. Nutritional composition, analysis of secondary metabolites and antioxidative effects of the leaves of *Globularia alypum* L. *Indian J Pharm Sci*, 2018, 80(2), 274–281.

Khantouche L, Motri S, Mejri M, Abderrabba M. Evaluation of polyphenols and antioxidant properties of extracts *Globularia alypum* leaves. *IOSR J Agric Vet Sci*, 2015, 24(1), 20.

Khlifi D, Hamdi M, Hayouni AE, Cazaux S, Souchard JP, Couderc F, Bouajila J. Global chemical composition and antioxidant and anti-tuberculosis activities of various extracts of *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) leaves. *Molecules*, 2011, 16(12), 10592–10603.

Khlifi D, Sghaier R, Laouni D, Hayouni EA, Hamdi M, Bouajila J. Anti-inflammatory and acetylcholinesterase inhibition activities of *Globularia alypum*. *J Med Bioeng*, 2013, 2(4), 232–237.

Kirby AJ, Schmidt RJ. The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of placebo herbs — I. *J Ethnopharmacol*, 1997, 56(2), 103–108.

Kosakowska O, Bączek K, Przybył JL, Pióro-Jabrucka E, Czupa W, Synowiec A, Gniewosz M, Costa R, Mondello L, Węglarz Z. Antioxidant and antibacterial activity of roseroot (*Rhodiola rosea* L.) dry extracts. *Molecules*, 2018, 23(7), 1767.

Kraujalytė V, Venskutonis PR, Pukalskas A, Česonienė L, Daubaras R. Antioxidant properties and polyphenolic compositions of fruits from different European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) genotypes. *Food Chem*, 2013, 141(4), 3695–3702.

Kraza L, Mourad S, Halis Y. *In vitro* investigation of the antioxidant and antimicrobial effects of hydro-alcoholic and aqueous extracts of *Globularia alypum* L. *Acta Sci Nat*, 2020, 7(1), 46–58.

Kusumorini N, Nugroho AK, Pramono S, Martien R. Determination of the potential antioxidant activity of isolated piperine from white pepper using DPPH, ABTS, and FRAP methods. *Majalah Farmaseutik*, 2022, 18(4), 454.

Kušan F. Folia Alypi i vrste roda *Globularia* u Hrvatskoj. *Vjestnik Ljekarnika*, 1943, 25, 29–32; 43–46.

Kut K, Cieniek B, Stefaniuk I, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I. A modification of the ABTS decolorization method and an insight into its mechanism. *Processes*, 2022, 10(7), 1288.

Kwon HY, Choi SI, Lee H, Choi SH, Sim WS, Yeo JF, Ju SC, Lee OH. Comparative analysis of the nutritional components and antioxidant activities of different *Brassica juncea* cultivars. *Foods*, 2020, 9(6), 840.

Massinissa Y, Afaf B, Souhila B, Loucif L. Study of the biological activities of the methanolic extract of *Globularia alypum* L. from Algeria. *Pak J Med Health Sci*, 2022, 16(3), 501–503.

Merghache S, Zerriouh M, Merghache D, Tabti B, Djaziri R, Ghalem S. Evaluation of hypoglycaemic and hypolipidemic activities of globularin isolated from *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Appl Pharm Sci*, 2013, 3(4), 1–7.

Nefzi K, Charfi K, Maaroufi A, Hosni K, Msaâda K, Baraket K, Nasr Z. Biological activities and determination of the mode of action of Tunisian *Globularia alypum* and *Cistus monspeliensis* ethanolic extracts. *Int J Environ Health Res*, 2022, 34(1), 127–137.

Nikolić T. Flora Croatica 3: Vaskularna flora Republike Hrvatske. Zagreb, Alfa, 2020, str. 35–37.

Nour S, Dbeibia A, Bouhajeb R, Haddad H, Khélifa A, Achour L, Ghardallou M, Zaïri A. Phytochemical analysis and evaluation of the antioxidant, antiproliferative, antibacterial, and antibiofilm effects of *Globularia alypum* (L.) leaves. *Molecules*, 2023a, 28(10), 4019.

Nour S, Laouani A, Loghmari A, Bouassida K, Slim R, Bouhajeb R, Hasni Y, Saguem K, Ouni B, Zaïri A. HPLC-DAD Analysis and investigation of biological properties of the leaves of *Globularia alypum* (L.), infusion extract. *Pharmaceuticals*, 2023b, 16(12), 1726.

Ouffai K, Azzi R, Abboou F, Lahfa FB. Antihemolytic and antioxidant activities of aerial parts extracts of *Zygophyllum album* L. and *Globularia alypum* L. from Algeria. *J Nat Prod Res Appl*, 2022, 1(03), 41–55.

Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Anal Methods*, 2014, 7(9), 1776–1782.

Pisoschi AM, Pop A, Cimpeanu C, Predoi G. Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016, 9130976.

Platzer M, Kiese S, Herfellner T, Schweiggert-Weisz U, Eisner P. How Does the phenol structure influence the results of the Folin-Ciocalteu assay? *Antioxidants*, 2021, 10(5), 811.

Rahim MA, Ayub H, Sehrish A, Khan F, Ambreen S, Hussain I, Rocha, J. Functional polyphenols: an overview, classification and health benefits. U: Plant and food phenolics – chemistry, functionality, and practical applications. Khan MK, Hassan S, urednici, SAD, Scientific Knowledge Publisher, 2023, str. 1–20.

Rodríguez-Arce E, Saldías M. Antioxidant properties of flavonoid metal complexes and their potential inclusion in the development of novel strategies for the treatment against neurodegenerative diseases. *Biomed Pharmacother*, 2021, 143, 112236.

Rodríguez-Pérez C, Zengin G, Segura-Carretero A, Lobine D, Mahomoodally MF. Chemical fingerprint and bioactivity evaluation of *Globularia orientalis* L. and *Globularia trichosantha* Fisch. & C. A. Mey. using non-targeted HPLC-ESI-QTOF-MS approach. *Phytochem Anal*, 2018, 30(2), 237–252.

Shraim AM, Ahmed TA, Rahman MM, Hijji YM. Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT – Food Sci Technol*, 2021, 150, 111932.

Singla RK, Dubey AK, Garg A, Sharma RK, Fiorino M, Ameen SM, Haddad MA, Al-Hiary M. Natural polyphenols: Chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. *J AOAC Int*, 2019, 102(5), 1397–1400.

Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, 1965, 16(3), 144–158.

Šugar I. Crvena knjiga biljnih vrsta Republike Hrvatske. Zagreb, Ministarstvo graditeljstva i zaštite okoliša, 1994, str. 231–232.

Taghzouti O, Balouiri M, Ouedrhiri W, Abderrahmane R, Abdellah E. *In vitro* evaluation of the antioxidant and antimicrobial effects of *Globularia alypum* L. extracts. *J Mater Environ Sci*, 2016, 7(6), 1988–1995.

Tiss M, Hamden K. *Globularia alypum* extracts attenuate hyperglycemia and protect against various organ toxicities in alloxan-induced experimental diabetic rats. *J Evid Based Complement Altern Med*, 2022, 2022, 6816942.

Touaibia M, Chaouch FZ. Global chemical composition and antioxidative effect of the ethanol extracts prepared from *Globularia alypum* leaves. *Nat Technol*, 2016, 14, 2–6.

Tundis R, Bonesi M, Menichini F, Loizzo MR, Conforti F, Statti G, Pirisi FM, Menichini F. Antioxidant and anti-cholinesterase activity of *Globularia meridionalis* extracts and isolated constituents. *Nat Prod Commun*, 2012, 7(8), 1015–1020.

Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentina DH, Walters SM, Webb DA. *Flora Europaea Vol.3* Cambridge, Cambridge University Press, 1972, 282–283.

Wang SS, Wang DM, Pu WJ, Li DW. Phytochemical profiles, antioxidant and antimicrobial activities of three *Potentilla* species. *BMC Complement Altern Med*, 2013, 13(1), 321.

Zagoskina NV, Zubova MY, Nechaeva TL, Kazantseva VV, Goncharuk EA, Katanskaya VM, Baranova EN, Aksenova MA. Polyphenols in plants: structure, biosynthesis, abiotic stress regulation, and practical applications (review). *Intl J Mol Sci*, 2023, 24(18), 13874.

Zhong Y, Shahidi F. Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. *Handbook of antioxidants for food preservation*, Woodhead Publishing, 2015, 287–333.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. SAŽETAK

Najviše istražena vrsta roda *Globularia* L. (Plantaginaceae Juss.) je *Globularia alypum* L., aromatična i ljekovita biljka koja se uvelike koristi zbog svojih terapijskih učinaka te ima široku tradicionalnu primjenu u liječenju mnogih bolesti.

U ovom radu istražen je sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida te antioksidativni učinak metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova vrsta *G. alypum*, *G. cordifolia* L., *G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz i *G. punctata* Lapeyr. Korištene su četiri *in vitro* metode određivanja antioksidativne aktivnosti: test keliranja metala te FRAP, ABTS i DPPH testovi.

Vrsta *G. alypum* sadržavala je najveću količinu polifenola ($109,39 \pm 5,94$ mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog ekstrakta), a vrsta *G. punctata* najveću količinu flavonoida ($31,80 \pm 0,10$ mg ekvivalenta kvercetina/g suhog ekstrakta). Sve istražene vrste pokazale su antioksidativnu aktivnost u provedenim testovima. Antioksidativni učinak procijenjen testom keliranja metala bio je najveći za vrstu *G. meridionalis* ($2,73 \pm 0,04$ mg ekvivalenta EDTA/g suhog ekstrakta), a najmanji za vrstu *G. alypum* ($1,10 \pm 0,04$ mg ekvivalenta EDTA/g suhog ekstrakta). U svim ostalim testovima navedena je vrsta pokazala najveću antioksidativnu aktivnost (FRAP: $247,45 \pm 26,84$ mg ekvivalenta troloksa (ET)/g suhog ekstrakta (SE); ABTS: $152,45 \pm 3,56$ mg ET/g SE; DPPH: $204,48 \pm 7,24$ mg ET/g SE). Dobiveni rezultati upućuju na to da vrsta *G. alypum* može poslužiti kao potencijalni izvor prirodnih antioksidansa što promiče njenu medicinsku uporabu.

7.2. SUMMARY

The most researched species of the genus *Globularia* L. (Plantaginaceae Juss.) is *Globularia alypum* L., an aromatic and medicinal plant that is widely utilized for its therapeutic effects and has a broad range of traditional uses in the treatment of various diseases.

In this work the content of total polyphenols and flavonoids, as well as the antioxidant effect of methanolic extracts from aerial parts of *G. alypum*, *G. cordifolia* L., *G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz, and *G. punctata* Lapeyr. were investigated. Four *in vitro* methods were used to determine the antioxidant activity: metal chelating assay as well as FRAP, ABTS, and DPPH assays.

Globularia alypum had the highest amount of polyphenols (109.39 ± 5.94 mg gallic acid equivalent/g dry extract), while *G. punctata* had the highest amount of flavonoids (31.80 ± 0.10 mg quercetin equivalent/g dry extract). All studied species showed antioxidant activity in the conducted assays. The antioxidant effect assessed by the metal chelating assay was highest for *G. meridionalis* (2.73 ± 0.04 mg EDTA equivalent/g dry extract) and lowest for *G. alypum* (1.10 ± 0.04 mg EDTA equivalent/g dry extract). In all other assays the latter species showed the highest antioxidant activity (FRAP: 247.45 ± 26.84 mg Trolox equivalent (TE)/g dry extract (DE); ABTS: 152.45 ± 3.56 mg TE/g DE; DPPH: 204.48 ± 7.24 mg TE/g DE). Obtained results indicate that *G. alypum* could serve as a potential source of natural antioxidants, which promotes its medicinal use.

**8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION
CARD**

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku botaniku
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

SADRŽAJ UKUPNIH POLIFENOLA, FLAVONOIDA I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST VRSTA *GLOBULARIA ALYPUM* L., *G. CORDIFOLIA* L., *G. MERIDIONALIS* (PODP.) O. SCHWARZ I *G. PUNCTATA* LAPEYR.

Stella Skorup

SAŽETAK

Najviše istražena vrsta roda *Globularia* L. (Plantaginaceae Juss.) je *Globularia alypum* L., aromatična i ljekovita biljka koja se uvelike koristi zbog svojih terapijskih učinaka te ima široku tradicionalnu primjenu u liječenju mnogih bolesti. U ovom radu istražen je sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida te antioksidativni učinak metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova vrsta *G. alypum*, *G. cordifolia* L., *G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz i *G. punctata* Lapeyr. Korištene su četiri *in vitro* metode određivanja antioksidativne aktivnosti: test keliranja metala te FRAP, ABTS i DPPH testovi. Vrsta *G. alypum* sadržavala je najveću količinu polifenola ($109,39 \pm 5,94$ mg ekvivalenta galne kiseline/g suhog ekstrakta), a vrsta *G. punctata* najveću količinu flavonoida ($31,80 \pm 0,10$ mg ekvivalenta kvercetina/g suhog ekstrakta). Sve istražene vrste pokazale su antioksidativnu aktivnost u provedenim testovima. Antioksidativni učinak procijenjen testom keliranja metala bio je najveći za vrstu *G. meridionalis* ($2,73 \pm 0,04$ mg ekvivalenta EDTA/g suhog ekstrakta), a najmanji za vrstu *G. alypum* ($1,10 \pm 0,04$ mg ekvivalenta EDTA/g suhog ekstrakta). U svim ostalim testovima navedena je vrsta pokazala najveću antioksidativnu aktivnost (FRAP: $247,45 \pm 26,84$ mg ekvivalenta troloksa (ET)/g suhog ekstrakta (SE); ABTS: $152,45 \pm 3,56$ mg ET/g SE; DPPH: $204,48 \pm 7,24$ mg ET/g SE). Dobiveni rezultati upućuju na to da vrsta *G. alypum* može poslužiti kao potencijalni izvor prirodnih antioksidansa što promiče njenu medicinsku uporabu.

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

Rad sadrži: 77 stranica, 8 grafičkih prikaza, 22 tablice i 89 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Globularia alypum*, *Globularia cordifolia*, *Globularia meridionalis*, *Globularia punctata*, sadržaj ukupnih polifenola, sadržaj flavonoida, test keliranja metala, FRAP, ABTS, DPPH

Mentor: **Dr. sc. Maja Friščić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Friščić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Biljana Blažeković, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Željko Maleš, redoviti profesor u trajnom zvanju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: veljača 2024.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Botany
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

CONTENT OF TOTAL POLYPHENOLS, FLAVONOIDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *GLOBULARIA ALYPUM* L., *G. CORDIFOLIA* L., *G. MERIDIONALIS* (PODP.) O. SCHWARZ AND *G. PUNCTATA* LAPEYR.

Stella Skorup

SUMMARY

The most researched species of the genus *Globularia* L. (Plantaginaceae Juss.) is *Globularia alypum* L., an aromatic and medicinal plant that is widely utilized for its therapeutic effects and has a broad range of traditional uses in the treatment of various diseases. In this work the content of total polyphenols and flavonoids, as well as the antioxidant effect of methanolic extracts from aerial parts of *G. alypum*, *G. cordifolia* L., *G. meridionalis* (Podp.) O. Schwarz, and *G. punctata* Lapeyr. were investigated. Four *in vitro* methods were used to determine the antioxidant activity: metal chelating assay as well as FRAP, ABTS, and DPPH assays. *Globularia alypum* had the highest amount of polyphenols (109.39 ± 5.94 mg gallic acid equivalent/g dry extract), while *G. punctata* had the highest amount of flavonoids (31.80 ± 0.10 mg quercetin equivalent/g dry extract). All studied species showed antioxidant activity in the conducted assays. The antioxidant effect assessed by the metal chelating assay was highest for *G. meridionalis* (2.73 ± 0.04 mg EDTA equivalent/g dry extract) and lowest for *G. alypum* (1.10 ± 0.04 mg EDTA equivalent/g dry extract). In all other assays the latter species showed the highest antioxidant activity (FRAP: 247.45 ± 26.84 mg Trolox equivalent (TE)/g dry extract (DE); ABTS: 152.45 ± 3.56 mg TE/g DE; DPPH: 204.48 ± 7.24 mg TE/g DE). Obtained results indicate that *G. alypum* could serve as a potential source of natural antioxidants, which promotes its medicinal use.

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

Thesis includes: 77 pages, 8 figures, 22 tables and 89 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Globularia alypum*, *Globularia cordifolia*, *Globularia meridionalis*, *Globularia punctata*, total polyphenolic content, flavonoid content, metal chelating assay, FRAP, ABTS, DPPH

Mentor: **Maja Friščić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Maja Friščić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Biljana Blažeković, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željko Maleš, Ph.D. Full Professor with tenure, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: February 2024