

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Petra RATAJC

**VREDNOTENJE KAKOVOSTI RASTLINSKIH DROG IZ DRUŽINE
USTNATIC (*Lamiaceae*) IN OCENJEVANJE NJIHOVE
ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**QUALITY CONTROL OF HERBAL DRUGS FROM
LAMIACEAE FAMILY AND EVALUATION OF THEIR
ANTIOXIDATIVE ACTIVITY**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2012

Doktorska disertacija je zaključek doktorskega Podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti iz področja biologije. Raziskovalno delo smo opravili na Biotehniški fakulteti, Oddelku za agronomijo. Meritve in kemijske analize so bile opravljene na Katedri za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko, Katedri za sadjarstvo, vinogradništvo in vrtnarstvo ter Centru za pedologijo in varstvo okolja.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in Senata Univerze v Ljubljani z dne 12.11.2009 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata s področja biologije. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Dea Baričevič.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Kristina SEPCĀĆ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Dea BARIČEVIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Andrej UMEK
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Datum zagovora: 19. 7. 2012

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Doktorska disertacija je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Petra RATAJC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
 DK UDK 582.929.4:615.11:633.88(043.2)=163.6
 KG Ustnatic/Lamiaceae/vrednotenje kakovosti/evropska farmakopeja/antioksidanti
 AV RATAJC, Petra
 SA BARIČEVIČ, Dea (mentor)
 KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje biologija
 LI 2012
 IN VREDNOTENJE KAKOVOSTI RASTLINSKIH DROG IZ DRUŽINE USTNATIC (Lamiaceae) IN OCENJEVANJE NJIHOVE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI
 TD Doktorska disertacija
 OP XIII, 97 str., 27 pregl., 8 sl., 117 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI Vrednotili smo kakovost rastlinskih drog žajblja (*Salvia officinalis* L.), kraškega šetrja (*Satureja montana* L.), melise (*Melissa officinalis* L.) in materine dušice (*Thymus* spp.), nabrane v okolici Petrinj, Socerba, Senožec in Divače. Določili smo vsebnost tujih primesi, vode, pepela in eteričnega olja (EO). Vse rastline so ustrezale zahtevam Evropske farmakopeje. Vsebnost eteričnega olja je bila od 2,8 ml/kg pri materini dušici do 26,9 ml/kg pri žajblju. Pri žajblju se je vsebnost eteričnega olja značilno spreminjala tekom razvoja, z najvišjo vsebnostjo v fazi cvetenja. Mlajše rastline so imele značilno višje vsebnosti EO v primerjavi s starejšimi. Testi DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin(-6-žveplova kislina))) in FRAP (antioksidativna moč redukcije železa) so pokazali velik antioksidativni potencial preučevanih rastlinskih drog. Metanolni izvlečki so imeli višjo antioksidativno aktivnost kot etanolni ali vodni pri vseh rastlinah. S tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) smo določili sestavo metanolnih izvlečkov rastlinskih drog in identificirali spojine z antioksidativnim delovanjem (HPLC-DPPH). Prevladujoča spojina v vseh vzorcih je bila rožmarinska kislina, ki se je izkazala tudi za najbolj učinkovito antioksidativno spojino v izvlečkih. Pri žajblju je imela velik antioksidativni prispevek tudi karnozolna kislina, pri šetrajju pa karvakrol. Pri melisi smo določili najvišjo vsebnost celokupnih fenolov (129,83 mgGAE/gSS) in flavonoidov (1998,63 mgCE/100gSS). Ugotovljena je bila pozitivna korelacija med vsebnostjo fenolov in flavonoidov s TEAC vrednostmi določenimi z metodama ABTS in FRAP. Primerjava antioksidativnega delovanja šetrja med vzorci iz narave in gojenimi na laboratorijskem polju, je pokazala, da sta najbolj primerna za gojenje v osrednjem delu Slovenije genska vira 30 in 46.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN DD
 DC UDC 582.929.4:615.11:633.88(043.2)=163.6
 CX Mint family/Lamiaceae/quality control/European Pharmacopoeia/antioxidants
 AU RATAJC, Petra
 AA BARIČEVIČ, Dea (supervisor)
 PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Biology
 PY 2012
 TI QUALITY CONTROL OF HERBAL DRUGS FROM LAMIACEAE FAMILY AND EVALUATION OF THEIR ANTIOXIDATIVE ACTIVITY
 DT Doctoral Dissertation
 NO XIII, 97p., 27 tab., 8 fig., 117 ref.
 LA sl
 AL sl/en

 AB Quality control of herbal drugs of sage (*Salvia officinalis* L.), winter savory (*Satureja montana* L.), lemon balm (*Melissa officinalis* L.) and thyme (*Thymus* spp.) has been done. Plant material was collected near Petrinje, Socerb, Senožeče and Divača. The content of foreign matter, water, ash and essential oil (EO) were determined. All plant species met requirements of European pharmacopoeia. The content of essential oil ranged from 2,8 ml/kg (thyme) to 26,9 ml/kg (sage). Sage essential oil content was changing significantly during development with the highest content measured in the blooming period. Younger plants had significantly higher contents of EO compared to the older plants. The assays DPPH (diphenylpicrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) revealed high antioxidative potential in all investigated herbal drugs. Among tested solvents (methanol, ethanol and water) methanol extracts showed the highest antioxidant activity. The composition of methanol extracts of herbal drugs was analysed by high performance liquid chromatography (HPLC) and compounds with antioxidative potential were identified by HPLC-DPPH method. Rosmarinic acid was the dominant compound in all tested plant species and proved to be the most potent antioxidative active compound in analysed extracts. The second most efficient antioxidative compound was carnosic acid and carvacrol, extracted from sage and winter savory, respectively. The highest content of total phenols (129,83 mgGAE/gDM) and total flavonoids (1998,63 mgCE/100gDM) has been determined in lemon balm extracts. Positive correlations between the content of phenols, flavonoids and TEAC values (determined with ABTS and FRAP) were observed. Antioxidative comparison of winter savory, grown in its natural habitat or grown in the laboratory field, proved that accessions 30 and 46 have the highest antioxidative potential and are to be the most appropriate to cultivate in the central part of Slovenia.

KAZALO VSEBINE

		Str.
	Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
	Key words documentation (KWD)	IV
	Kazalo vsebine	V
	Kazalo preglednic	IX
	Kazalo slik	XII
	Okrajšave	XIII
1	UVOD.....	1
1.1	NAMEN	2
1.2	DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2	PREGLED OBJAV	4
2.1	USTNATICE (LAMIACEAE)	4
2.1.1	Razširjenost.....	4
2.1.2	Morfološke značilnosti družine	4
2.1.3	Kemijske značilnosti družine.....	4
2.1.3.1	Fenolne spojine.....	5
2.1.3.2	Terpeni.....	6
2.1.3.3	Eterična olja	7
2.1.3.4	Predstavniki ustnatic	7
2.2	SODOBNA FITOTERAPIJA.....	11
2.2.1	Rastlinska zdravila.....	11
2.2.2	Zakonodajni vidiki na področju fitoterapije	13
2.2.2.1	Rastlinska zdravila v Evropi.....	13
2.2.2.2	Zdravilne rastline v slovenski zakonodaji	15
2.2.3	Zagotavljanje in kontrola kakovosti	16
2.2.3.1	Kakovost surovin.....	16
2.2.3.2	Kakovost aktivnih sestavin	17
2.2.3.3	Kakovost končnih rastlinskih produktov	18
2.2.4	Farmacevtska kakovost.....	18

2.2.4.1	Farmakopeja	18
2.2.5	Pristojni uradi, organizacije in delovne skupine na področju fitoterapije	20
2.2.5.1	Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP)	20
2.2.5.2	Evropska znanstvena kooperativa o fitoterapiji - ESCOP	20
2.2.5.3	Evropska agencija za zdravila (EMA)	21
2.2.5.4	Svetovna zdravstvena organizacija - WHO	22
2.2.5.5	Druge organizacije	22
2.3	ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE ZDRAVILNIH RASTLIN	26
2.3.1	Oksidativni stres	26
2.3.2	Antioksidanti	27
2.3.3	Antioksidativno delovanje zdravilnih in aromatičnih rastlin	27
2.3.3.1	Antioksidativno delovanje ustnatic	28
2.3.4	Določanje antioksidativnega delovanja	30
2.3.4.1	Metoda DPPH [·]	31
2.3.4.2	TEAC test (ABTS ^{·+} prosti radikal)	31
2.3.4.3	FRAP metoda (redukcija Fe(III) v Fe(II))	32
3	MATERIALI IN METODE	33
3.1	RASTLINSKI MATERIAL	34
3.1.1	Žajbelj (<i>Salvia officinalis</i> L.)	35
3.1.2	Kraški šetraj (<i>Satureja montana</i> L.)	35
3.1.3	Melisa (<i>Melisa officinalis</i> L.)	35
3.1.4	Materina dušica (<i>Thymus</i> spp.)	36
3.2	NABIRANJE IN SUŠENJE RASTLINSKEGA MATERIALA	36
3.3	METODE VREDNOTENJA KAKOVOSTI RASTLINSKIH DROG	36
3.3.1	Določanje tujih primesi	36
3.3.2	Določanje vsebnosti vode	37
3.3.3	Določanje celokupnega pepela	38
3.3.4	Določanje v kislini netopnega pepela	39
3.3.5	Določanje vsebnosti eteričnega olja	40
3.4	DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA	42

3.4.1	Priprava vzorcev	42
3.4.2	Priprava rastlinskih izvlečkov.....	42
3.4.3	Metoda DPPH.....	42
3.4.4	Metoda ABTS.....	43
3.4.5	Metoda FRAP.....	43
3.4.6	Določanje vsebnosti celokupnih fenolov (Folin-Ciocalteu metoda).....	44
3.4.7	Določanje celokupne vsebnosti flavonoidov.....	45
3.4.8	Visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLC).....	45
3.4.9	Ocenjevanje antioksidativnega delovanja izvlečkov s HPLC.....	46
3.5	STATISTIČNA ANALIZA.....	47
4	REZULTATI.....	48
4.1	VREDNOTENJE KAKOVOSTI RASTLINSKIH DROG.....	48
4.1.1	Vsebnost tujih primesi.....	50
4.1.2	Vsebnost vode in pepela.....	51
4.1.2.1	Vsebnost vode.....	51
4.1.2.2	Vsebnost pepela.....	51
4.1.3	Vsebnost eteričnega olja.....	52
4.1.3.1	Vsebnost eteričnega olja pri žajblju.....	52
4.1.3.2	Vsebnost eteričnega olja pri šetraju.....	53
4.1.3.3	Vsebnost eteričnega olja pri materini dušici.....	54
4.2	VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA.....	55
4.2.1	Metoda DPPH.....	55
4.2.1.1	Antioksidativna aktivnost žajblja določena z metodo DPPH.....	55
4.2.1.2	Antioksidativna aktivnost šetraja določena z metodo DPPH.....	56
4.2.1.3	Antioksidativna aktivnost melise določena z metodo DPPH.....	57
4.2.2	Metoda ABTS.....	58
4.2.2.1	Antioksidativna aktivnost žajblja določena z metodo ABTS.....	58
4.2.2.2	Antioksidativna aktivnost šetraja določena z metodo ABTS.....	59
4.2.2.3	Antioksidativna aktivnost šetraja določena z metodo ABTS.....	60
4.2.3	Metoda FRAP.....	60
4.2.3.1	Antioksidativna aktivnost žajblja določena z metodo FRAP.....	60

4.2.3.2	Antioksidativna aktivnost šetraja določena z metodo FRAP	61
4.2.4	Določanje vsebnosti celokupnih fenolov	62
4.2.4.1	Vsebnost celokupnih fenolov pri žajblju	62
4.2.4.2	Vsebnost celokupnih fenolov pri šetraju	64
4.2.4.3	Vsebnost celokupnih fenolov pri melisi	65
4.2.4.4	Vsebnost celokupnih fenolov pri materini dušici	66
4.2.5	Določanje vsebnosti celokupnih flavonoidov	66
4.2.5.1	Vsebnost celokupnih flavonoidov pri žajblju	66
4.2.5.2	Vsebnost celokupnih flavonoidov pri šetraju	68
4.2.5.3	Vsebnost celokupnih flavonoidov pri melisi	69
4.2.5.4	Vsebnost celokupnih flavonoidov pri materini dušici	70
4.3	VSEBNOST SEKUNDARNIH METABOLITOV V IZVLEČKIH	
	RASTLINSKIH DROG	71
4.4	OCENA ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA Z METODO HPLC .	74
4.5	KORELACIJE MED ANALIZIRANIMI PARAMETRI	
	ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA.....	76
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	77
6	POVZETEK (SUMMARY).....	85
6.1	POVZETEK	85
6.2	SUMMARY	87
7	VIRI	89

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pravilnik zdravilne rastline razvršča v naslednje kategorije (prirejeno po Pravilnik o razvrstitvi zdravilnih rastlin; UL RS, št. 133/2003).....	15
Preglednica 2: Seznam raziskovalnih ploskev, rastlinskih vrst in oznak akcesij	34
Preglednica 3: Gradient topil za HPLC analizo fenolnih spojin	46
Preglednica 4 : Vrednotenje kakovosti droge žajblja po priporočilih Evropske farmakopeje. Določena je bila vsebnost tujih organov in tujih primesi, vsebnost vode, celokupnega pepela in eteričnega olja dveh genskih virov s Petrinjskega Krasa. Prikazane so povprečne vrednosti \pm SD (KV% - koeficient variacije).	48
Preglednica 5: Vrednotenje kakovosti droge kraškega šetrja po priporočilih ISO standarda. Določena je bila vsebnost vsebnost vode, celokupnega in v klorovodikovi kislini netopnega pepela in eteričnega olja štirih akcesij šetrja. Prikazane so povprečne vrednosti \pm SD (N-narava, BF-laboratorijsko polje Biotehniške fakultete, MV-mejne vrednosti). ...	49
Preglednica 6: Vrednotenje kakovosti droge melise po priporočilih Evropske farmakopeje: vsebnost tujih organov in tujih primesi, vode in celokupnega pepela. Prikazane so povprečne vrednosti in standardna deviacija.....	49
Preglednica 7: Antioksidativna učinkovitost metanolnih (DPPH MeOH) in etanolnih izvlečkov (DPPH EtOH) žajblja določena s testom DPPH v različnih razvojnih fazah. Prikazana so povprečja \pm SD.....	55
Preglednica 8: Antioksidativna učinkovitost metanolnih (DPPH MeOH) in etanolnih izvlečkov (DPPH EtOH) šetrja določena s testom DPPH. Prikazana so povprečja \pm SD. 57	57
Preglednica 9: Antioksidativna učinkovitost metanolnih (DPPH MeOH) in etanolnih izvlečkov (DPPH EtOH) melise določena s testom DPPH. Prikazana so povprečja \pm SD. 57	57
Preglednica 10: Antioksidativna učinkovitost metanolnih (ABTS MeOH), etanolnih (ABTS EtOH) in vodnih izvlečkov (ABTS voda) žajblja določena s testom ABTS v različnih razvojnih fazah. Prikazana so povprečja \pm SD.	58
Preglednica 11: Antioksidativna učinkovitost metanolnih (ABTS MeOH) in etanolnih izvlečkov (ABTS EtOH) šetrja določena s testom ABTS. Prikazana so povprečja \pm SD. 59	59
Preglednica 12: Antioksidativna učinkovitost metanolnih (ABTS MeOH) in etanolnih izvlečkov (ABTS EtOH) melise določena s testom ABTS. Prikazana so povprečja \pm SD. 60	60
Preglednica 13: Antioksidativna učinkovitost metanolnih (FRAP MeOH) in etanolnih izvlečkov (FRAP EtOH) žajblja določena s testom FRAP v različnih razvojnih fazah. Prikazana so povprečja \pm SD.....	61

- Preglednica 14: Antioksidativna učinkovitost metanolnih (FRAP MeOH) in etanolnih izvlečkov (FRAP EtOH) šetrja določena s testom FRAP. Prikazana so povprečja \pm SD. 62
- Preglednica 15: Vsebnost celokupnih fenolov določena s Folin-Ciocalteu metodo v metanolnih (MeOH), etanolnih (EtOH) in vodnih izvlečkih žajblja. Rezultati so podani kot ekvivalent galne kisline na g suhe snovi. Prikazana so povprečja \pm SD. 63
- Preglednica 16: Vsebnost celokupnih fenolov določena s Folin-Ciocalteu metodo v metanolnih (MeOH) in etanolnih (EtOH) izvlečkih šetrja. Rezultati so podani kot ekvivalent galne kisline (na g suhe snovi). Prikazana so povprečja \pm SD. 65
- Preglednica 17: Vsebnost celokupnih fenolov določena s Folin-Ciocalteu metodo v metanolnih (MeOH) in etanolnih (EtOH) izvlečkih melise. Rezultati so podani kot ekvivalent galne kisline na g suhe snovi (mgGAE/g SS). Prikazana so povprečja \pm SD. .. 65
- Preglednica 18: Vsebnost celokupnih fenolov določena s Folin-Ciocalteu metodo v metanolnih (MeOH) in etanolnih (EtOH) izvlečkih materine dušice. Rezultati so podani kot ekvivalent galne kisline na g suhe snovi (mgGAE/gSS). Prikazana so povprečja \pm SD. 66
- Preglednica 19: Vsebnost celokupnih flavonoidov v metanolnih (MeOH), etanolnih (EtOH) in vodnih izvlečkih žajblja. Rezultati so podani kot ekvivalent katehina na 100g suhe snovi. Prikazana so povprečja \pm SD. 67
- Preglednica 20: Vsebnost celokupnih flavonoidov v metanolnih (MeOH), etanolnih (EtOH) in vodnih izvlečkih šetrja. Rezultati so podani kot ekvivalent katehina na 100g suhe snovi. Prikazana so povprečja \pm SD. 69
- Preglednica 21: Vsebnost celokupnih flavonoidov v metanolnih (MeOH) in etanolnih (EtOH) izvlečkih melise. Rezultati so podani kot kot ekvivalent katehina na 100g suhe snovi. Prikazana so povprečja \pm SD. 69
- Preglednica 22: Vsebnost celokupnih flavonoidov v metanolnih (MeOH) in vodnih izvlečkih materine dušice. Rezultati so podani kot kot ekvivalent katehina/100g suhe snovi. Prikazana so povprečja \pm SD. 70
- Preglednica 23: Vsebnost luteolin-7-O-glukozida, rožmarinske kisline, karnozola in karnozolna kisline v metanolnih izvlečkih žajblja (določeno s HPLC). Rezultati so podani kot mg/g. Razvojne faze: 1 – pred cvetenjem, 2- med cvetenjem, 3 – po cvetenju. Prikazana so povprečja \pm SD. 71
- Preglednica 24: Vsebnost luteolin-7-O-glukozida, rožmarinske kisline in karvakrola v metanolnih izvlečkih šetrja (določeno s HPLC). Rezultati so podani kot mg/100g. Prikazana so povprečja \pm SD. 73
- Preglednica 25: Vsebnost luteolin-7-O-glukozida in rožmarinske kisline v metanolnih izvlečkih melise (določeno s HPLC). Rezultati so podani kot mg/100g. Prikazana so povprečja \pm SD. 73

Preglednica 26: Vsebnost luteolin-7-O-glukozida in rožmarinske kisline v metanolnih izvlečkih materine dušice (določeno s HPLC). Rezultati so podani kot mg/100g. Prikazana so povprečja \pm SD..... 74

Preglednica 27: Pearsonovi korelacijski koeficienti med analiziranimi parametri 76

KAZALO SLIK

Slika 1: Hodogram metod, uporabljenih v doktorskem delu.....	33
Slika 2: Clevenger aparat za določanje vsebnosti eteričnih olj v rastlinskih drogah (mere v milimetrih).....	41
Slika 3: Vsebnost eteričnega olja žajblja v različnih fazah razvoja (ml/kg)	53
Slika 4: Vsebnost eteričnega olja šetrja pri vzorcih iz narave in z laboratorijskega polja (ml/kg). N – narava, BF – laboratorijsko polje BF.....	54
Slika 5: Vsebnost sekundarnih metabolitov v metanolnih izvlečkih žajblja. Prikazana so povprečja in SD. (L – luteolin-7-O-glukozid; RK – rožmarinska kislina, K – karnozol, KK – karnozolna kislina).	72
Slika 6: Vsebnost sekundarnih metabolitov v metanolnih izvlečkih žajblja pred in po dodatku DPPH. L – luteolin-7-O-glukozid; RK – rožmarinska kislina; K – karnozol; KK – karnozolna kislina. Predstavljena so povprečja in standardna deviacija.	74
Slika 7: Vsebnost sekundarnih metabolitov v metanolnih izvlečkih šetrja pred in po dodatku DPPH. L – luteolin-7-O-glukozid; RK – rožmarinska kislina; KR – karvakrol. Predstavljena so povprečja in standardna deviacija.	75
Slika 8: Vsebnost sekundarnih metabolitov v metanolnih izvlečkih melise pred in po dodatku DPPH. L – luteolin-7-O-glukozid; RK – rožmarinska kislina. Predstavljena so povprečja in standardna deviacija.....	75

OKRAJŠAVE

ABS	absorbanca
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin(-6-žveplova kislina))
AOX	antioksidativno delovanje
BF	Biotehniška fakulteta
BHA	butiliran hidroksi anizol
BHT	butiliran hidroksi toluen
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
EO	eterično olje
ESCAP	Evropska znanstvena kooperativa o fitoterapiji
FRAP	antioksidativna moč redukcije železa (Ferric Reducing Antioxidant Power)
GAE	ekvivalent galne kisline
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IC ₅₀	koncentracija učinkovitosti
SS	suha snov
TEAC	Troloksu ekvivalentno antioksidativno delovanje
TLC	tankoplastna kromatografija (Thin Layer Chromatography)
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organization)

1 UVOD

Priljubljenost in uporaba rastlinskih zdravilnih pripravkov se je v zadnjih desetletjih močno povečala. Do tega ni prišlo samo zaradi težnje po naravnih proizvodih in kot odgovor na nezadovoljstvo s konvencionalnim načinom zdravljenja, ampak tudi kot posledica razvoja in izboljšanja metod, s katerimi se ugotavlja in zagotavlja varnost, kakovost in učinkovitost rastlinskih drog in zdravil. Varnost rastlinskih zdravil je zelo pomembna, saj je večina izdelkov namenjenih samozdravljenju in pacienti običajno o jemanju teh dodatkov ne obvestijo svojega zdravnika. Mnogi rastlinski proizvodi so na tržišču na voljo kot prehranska dopolnila, čeprav so znanstvene informacije o varnosti uporabe pomanjkljive, ker ni dovolj toksikoloških podatkov in kliničnih študij (Capasso in sod., 2000). Ideja, da so rastlinska zdravila brez stranskih učinkov, je napačna. Rastline vsebujejo na stotine spojin, sekundarnih metabolitov, med katerimi so nekateri zelo strupeni. Določeno tveganje za zdravje predstavlja tudi sočasna uporaba različnih rastlinskih proizvodov in konvencionalnih zdravil (Capasso in sod., 2000). Kljub vsemu so stranski učinki manj pogosti v primerjavi s sintetskimi zdravili (Calixto, 2000).

Namen sodobne fitoterapije je združiti tradicionalna znanja o uporabi zdravilnih rastlin s sodobnimi znanstvenimi dognanji, pri tem pa upoštevati naravovarstveni status rastlin v posamezni državi ali regiji ter ohranjati genske vire. Prekomerno izkoriščanje in nabiranje zdravilnih rastlin v naravnih okoljih je še vedno velik problem, zato se sodobna fitoterapija povezuje tudi z agronomijo, z namenom uvajanja gojenja zdravilnih rastlin, kar nam omogoča pridobivanje enotnega rastlinskega materiala in hkrati prepreči prekomerno izkoriščanje naravnih virov in s tem ohranjanje genskih virov. Poznavanje biokemijskih profilov in farmakoloških potencialov posameznih genskih virov je pomembno za določanje najprimernejšega vira za določen namen uporabe, zato ni dovolj, da ohranimo le vrsto kot tako, ampak tudi vso njeno raznolikost.

Žajbelj, rožmarin, meta, melisa, timijan, materina dušica in šetraj so dobro poznane zdravilne in aromatične rastline iz družine ustnatic (Lamiaceae) z močno tradicijo uporabe v naši kulturi kot zelišča in začimbe. Aktivne sestavine, ki dajejo ustnaticam značilno aromo in okus, so eterična olja, za biološko delovanje pa so pomembni še terpeni, fenolne kisline in flavonoidi. Čeprav so našete rastlinske vrste dobro raziskane, pa kljub dolgi uporabi v tradicionalni medicini še vedno niso natančno določeni markerji za zagotavljanje treh stebrov sodobne fitoterapije: varnosti, kakovosti in učinkovitosti.

Izpostavljenost človeka različnim fizikalno-kemijskim, okoljskim in drugim dejavnikom vodi v oksidativni stres (neravnovesje med oksidanti in antioksidanti), ki je vključen v mnoge akutne in kronične bolezni, vključno z rakom, kardiovaskularnimi in nevrodegenerativnimi boleznimi, odgovoren pa je tudi za staranje. Razvoj sintetskih spojin (BHA - butiliran hidroksi anizol, BHT - butiliran hidroksi toluen), sposobnih nevtralizacije škodljivih radikalov, je bil velik uspeh, obstaja pa čedalje več dokazov, da te spojine niso

primerne za dolgotrajno uživanje in so lahko celo povzročiteljice raka (dokazano pri podganah), zato se je povečalo zanimanje za zdravilne in aromatične rastline kot možen vir naravnih antioksidantov. Za nosilce antioksidativnega delovanja rastlinskih pripravkov veljajo fenolne kisline in flavonoidi. Ustnatice so bogate s fenolnimi spojinami in izkazujejo velik antioksidativni potencial. Najpomembnejša spojina družine, ki prispeva k antioksidativnemu delovanju je rožmarinska kislina. Žajbelj in rožmarin sta najbolj preučevani vrsti ustnatic in veljata za rastlini z najmočnejšim antioksidativnim delovanjem, v nekaterih raziskavah se na vrhu lestvice pojavi tudi melisa.

O antioksidativnem potencialu in delovanju zdravilnih in aromatičnih rastlin je bilo opravljenih veliko raziskav, vendar so načini določanja in izmerjene vrednosti tako različne, da je rezultate med različnimi metodami in študijami nemogoče primerjati in posplošiti. Slovenski genski viri zdravilnih rastlin (biokemijska sestava in delovanje) še niso raziskani.

1.1 NAMEN

Namen raziskave je bil ovrednotiti kakovost in antioksidativno delovanje drog iz družine ustnatic (Lamiaceae): žajbelj (*Salvia officinalis* L.), melisa (*Melissa officinalis* L.), materina dušica (*Thymus* spp.) in kraški šetraj (*Satureja montana* L.). Preveriti smo želeli ustreznost kakovosti rastlinskih drog glede na zahteve Evropske farmakopeje in/ali ISO standarda, določiti kemijski profil rastlin z naravnih rastišč in rastlin vzgojenih iz semen istih akcesij in gojenih na laboratorijskem polju ter ugotoviti ali gojenje rastlin vpliva na kakovost in/ali antioksidativno delovanje.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pregled literature ter zaključki predhodnih študij na področju vrednotenja kakovosti rastlinskih drog in antioksidativnega delovanja so nas privedli do sledečih zastavljenih delovnih hipotez:

- Evropska farmakopeja (Ph. Eur.) ne vsebuje monografij za določene rastlinske vrste, ki uspevajo in se tržijo v evropskem prostoru.
- Monografije Evropske farmakopeje ne nudijo ustreznega profila analiz, ki je pomemben za uporabno vrednost rastlinske droge (kar pomeni, da so glede na predpise posameznih monografij, kriteriji kakovosti drugačni kot bi jih zahtevalo področje uporabe rastlinske droge).
- Kakovost rastlinskih drog je močno odvisna od genskega vira in okolja, v katerem uspeva.

- Vse raziskovane vrste imajo visoko antioksidativno aktivnost.
- Antioksidativno delovanje je odvisno od načina priprave ekstraktov in od testnega sistema.
- Okolje, v katerem rastlina raste, vpliva na antioksidativno delovanje.
- Genski vir vpliva na antioksidativno delovanje.

2 PREGLED OBJAV

2.1 USTNATICE (LAMIACEAE)

Ustnatice (Lamiaceae) so velika družina predvsem zeli in polgrmičkov. Vključuje številne uporabne in zdravilne rastline, kot so na primer žajbelj (*Salvia officinalis* L.), rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) in meta (*Mentha* sp.). Eterična olja in ekstrakti teh rastlin imajo znano antiseptično, protivnetno, antioksidativno in protimikrobno delovanje (Skocibusic in sod., 2006; Kokkini in sod., 2003).

2.1.1 Razširjenost

Družina ustnatic z več kot 7000 vrstami je kozmopolitska. Raste na skoraj vseh tipih rastišč, na vseh geografskih širinah, od Arktike do Himalaje, od jugovzhodne Azije do Havajev in Avstralazije, po vsej Afriki in v Novem svetu od juga do severa. Nekateri rodovi, na primer *Salvia*, *Scutellaria* in *Stachis*, so razširjeni skoraj po vsem svetu. Eno od območij z največjo gostoto vrst je Sredozemlje, kjer so rodovi *Micromeria*, *Phlomis*, *Rosmarinus*, *Sideritis* in *Thymus* značilni sestavni del makije in garige. V splošnem so ustantice rastline odprtih rastišč, le nekaj vrst raste v tropskih deževnih gozdovih (npr. *Gomphostemma*) (Heywood, 1995).

2.1.2 Morfološke značilnosti družine

Večina vrst je grmičastih ali zelnatih. Stebla imajo pogosto značilno štirirobo obliko. Listi so največkrat enostavni, nasprotni ali navzkrižno nameščeni in brez prilistov. Rastline so pogosto pokrite z lasi in žlezami z eteričnimi olji, ki rastlinam dajejo značilen aromatičen vonj (Heinrich in sod., 2004; Heywood, 1995). Cvetovi ustnatic so dvospolni, somerni in v osnovi sestavljeni iz petih zraslih čašnih listov, ki oblikujejo lijakasto ali zvonasto, včasih dvoustno čašo, iz petih zraslih venčnih listov, štirih ali dveh priraslih prašnikov, ki so dveh dolžin ali so vsi bolj ali manj enaki ter nadržale plodnice iz dveh plodnih listov, ki oblikujeta štiri jasno ločene predale, vsakega z eno semensko zasnovo. Plod je sestavljen iz štirih enosemenskih, rožki podobnih oreškov, ki se ne odpirajo. V semenih je malo ali nič endosperma (Heinrich in sod., 2004; Heywood, 1995).

2.1.3 Kemijske značilnosti družine

Aktivne sestavine, ki dajejo ustnaticam značilno aromo in okus, so eterična olja; poleg eteričnega olja pa so pomembni še terpeni, fenolne kisline (hidroksibenzoati in hidroksicinamati) in flavonoidi (Kosar in sod., 2005).

2.1.3.1 Fenolne spojine

Fenolne spojine so obsežna skupina sekundarnih metabolitov s pomembnimi fiziološkimi vlogami v rastlinah. Njihove biološke funkcije so zaščita pred UV in vidno svetlobo (oksidativna in pigmentna), zaščita pred oksidativnim stresom, stimulacija nastanka nodulov in obramba pred herbivori in patogeni; zaradi obrambnih funkcij so v najvišjih koncentracijah prisotni v epidermi listov in plodov ter v semenih (Crozier in sod., 2006; Duthie in Crozier, 2000).

Višje rastline sintetizirajo nekaj tisoč različnih fenolnih spojin, število novo odkritih pa se vztrajno povečuje (Boudet, 2007). Kemijsko so sestavljene iz najmanj enega aromatskega obroča z eno ali več hidroksilnimi skupinami (-OH), vezanimi neposredno na obroč. Njihova strukturna oblika se spreminja od enostavnih fenolov do kompleksnih polimerov z visoko molsko maso. Prisotni so lahko kot prosti (aglikoni), večinoma pa so konjugirani s sladkorji (glikozilacije, pri čemer govorimo o mono-, di-, tri-, oligo- in poliglikozidih) ali pa so zaestreni med seboj ali z drugimi snovmi in tvorijo polimere in druge komplekse (Crozier in sod., 2006; Seigler, 2002).

Delimo jih na flavonoide ter neflavonoide (fenolne kisline in stilbene). Biosinteza fenolnih snovi poteka po treh glavnih poteh – šikimatni, fenilpropanoidni in malonatni poti, ki skupaj z delom fenilpropanoidne poti vodi v biosintezo flavonoidov in stilbenov (Crozier in sod., 2006).

Flavonoidi in fenolne kisline so pomembni rastlinski sekundarni metaboliti z antioksidativno učinkovitostjo *in vitro* in *in vivo* (Rice-Evans in sod., 1996). Delujejo lahko kot reducirajoči agensi, donorji vodika ali lovilci singletnega kisika (Rice-Evans in sod., 1996).

2.1.3.1.1 Flavonoidi

Flavonoidi so največja skupina fenolnih spojin s fenilbenzopiranskim jedrom, sestavljenim iz 15 ogljikovih atomov v treh obročih (A, B in C). Podskupine flavonoidov (flavoni, flavanoni, flavonoli, flavanoli in antocianidini) se razlikujejo v stopnji oksidacije in saturacije obroča C, medtem ko se individualne spojine ločijo med seboj po modifikacijah na obročih A in B (Lotito in Frej, 2006; Wojdilo in sod., 2007; Seigler, 2002; Matkowski, 2008; Rice-Evans in sod., 1996). Modifikacije so lahko hidroksilacije obročev A in B, metilacije hidroksilnih skupin, prenilacije (modifikacija z izoprenoidi) in glikozilacije (Matkowski, 2008).

2.1.3.1.2 Fenolne kisline

Fenolne kisline izvirajo iz fenilpropanoidnega metabolizma; sestavljene so iz C₆-C₁ ogrodja. Delimo jih na dve podskupini: hidroksibenzojske kisline in hidroksicimetne kisline. Med hidroksibenzojske kisline spadajo galna kislina, *p*-hidroksibenzojska, vanilinska kislina, siringična kislina; vsem je skupna C₆-C₁ struktura. Hidroksicimetne kisline so aromatske spojine s C₃ stransko verigo (C₆-C₃). Najpogostejše hidroksicimetne kisline so kavna, ferulna, *p*-kumarna (Bravo, 1998).

2.1.3.2 Terpeni

Tako kot fenolne snovi spadajo tudi terpeni med najboljše skupine sekundarnih metabolitov.

Izhodiščna snov za sintezo terpenov sta izoprenska (C₅) analoga izopentenil pirofosfat (IPP) in dimetilalil pirofosfat (DMAPP), ki nastaneta iz acetyl-koencima A, razlikujeta pa se v mestu dvojne vezi. Glede na stopnjo njune kondenzacije ločimo glavne razrede terpenov: monoterpeni (C₁₀), seskviterpeni (C₁₅), diterpeni (C₂₀), triterpeni (C₃₀), tetraterpeni (karotenoidi; C₄₀). Zaradi dolgih verig in številnih dvojnih vezi so terpeni podvrženi raznolikim izomerizacijam in ciklizacijam, kar je vzrok za njihovo pestrost (Crozier in sod., 2006; Seigler, 2002).

Njihove biološke funkcije so deloma odvisne od njihove velikosti. Mono- in seskviterpeni so zaradi majhne mase lahkohlapne snovi, pogosto z izrazitim vonjem in okusom, ki delujejo kot atraktanti za oprasovalce ali pa iz istega razloga preprečujejo objedanje oz. delujejo kot fitoaleksini, snovi, ki jih rastlina sintetizira kot odziv na infekcijo z mikrobnimi patogeni. Sintetizirajo se večinoma v smolnih kanalih (iglavci) in žleznih trihomih zeli pod kutikulo in se sproščajo ob mehanskem dražljaju. Izoliramo jih kot eterična olja, ki se industrijsko uporabljajo zlasti kot dišave. Diterpeni regulirajo nekatere pomembne ekofiziološke funkcije, saj delujejo kot rastni hormoni (giberelini), imajo pa tudi funkcijo fitoaleksinov. Med triterpeni so najbolj raziskana skupina fitosteroli, ki imajo analogno funkcijo holesterola v celičnih membranah (uravnavanje fluidnosti) in na ta način znižujejo raven holesterola. V rastlinah imajo poleg vloge vezave v membrane predvsem obrambno funkcijo in so prekursorji brasinosteroidnih hormonov. Karotenoidi so pomožni pigmenti pri absorpciji sončevega sevanja in obenem varujejo tkivo pred premočno svetlobo (ravnovesje med zeax- in violaksantinom); zaradi pigmentacije delujejo tudi kot atraktanti oprasovalcev in prenašalcev plodov in so prekursorji za abscizinsko kislino. (Crozier in sod., 2006; Seigler, 2002).

2.1.3.3 Eterična olja

Eterična olja so hlapne, naravne, kompleksne mešanice spojin sekundarnega metabolizma z močnim vonjem. Poznanih je več kot 3000 različnih eteričnih olj, od tega je 300 komercialno pomembnih predvsem v farmacevtski, prehranski, poljedelski in kozmetični industriji (Bakkali in sod., 2008). Zanimiva so predvsem zaradi antioksidativnega, protitumorskega, protibakterijskega, protiglivnega in insekticidnega delovanja (Heinrich in sod., 2004; Bakkali in sod., 2008).

V naravi imajo pomembno vlogo pri obrambi rastlin, saj delujejo protibakterijsko, protivirusno, protiglivno, insekticidno in repelentno; sodelujejo pa tudi pri privabljanju opraševalcev cvetov in prenašalcev semen. Sintetizirajo se lahko v vseh delih rastlin: cvetnih popkih, cvetovih, listih, steblih, semenih, plodovih, koreninah, lesu in lubju; shranjena so v sekretornih celicah, votlinah, kanalih, celicah povrhnjice ali žlezni trihomih (Bakkali in sod., 2008). Sinteza eteričnih olj ni odvisna le od metabolnega statusa tkiva, v katerem se sintetizirajo, ampak od fiziologije celotne rastline; velik vpliv imajo tudi ekofiziološki dejavniki in dejavniki okolja (Sangwan in sod., 2001). Sestava eteričnih olj variira glede na okolje in rastne razmere, v katerih raste rastlina, glede na genski vir, uporabljen del rastline in glede na način nabiranja in sušenja ter shranjevanja droge (Heinrich in sod., 2004; Sangwan in sod., 2001).

Eterična olja lahko vsebujejo 20 - 60 različnih spojin v nizkih koncentracijah (manj kot 1%). Prevladujejo terpenoidi (mono- in seskviterpeni), mnoga olja pa vsebujejo tudi fenilpropanoide (Sangwan in sod., 2001). Biološke lastnosti (terapevtske in/ali toksične) eteričnih olj so odvisne od glavnih 2 do 3 spojin, ki so prisotne v višjih koncentracijah (20 in 70%).

2.1.3.4 Predstavniki ustnatic

2.1.3.4.1 Žajbelj (*Salvia officinalis* L.)

Žajbelj je ena najbolj cenjenih zdravilnih rastlin, kar dokazujejo tudi latinsko ime (rodovno ime *Salvia* izhaja iz latinskega glagola *salvere*, kar pomeni zdraviti oz. biti dobrega zdravja, vrstno ime *officinalis* pa pomeni uradno priznan kot zdravilo) in mnogi pregovori. Starodaven pregovor pravi »Zakaj bi umrl nekdo, ki ima žajbelj na svojem vrtu?« (Dweck, 2000). Uporabljali so ga že Egipčani, Grki in Rimljani. Grški zdravnik Dioskorid je v 1. stoletju n.št. žajbelj priporočal za zdravljenje ran in pomirjanje kašlja. V srednjem veku je veljal za rastlino, ki lahko človeku povrne nesmrtnost. Danes je znan in uporabljan kot začimba, za izboljšanje okusa solat, juh, obar, pečenk, pa tudi za pripravo aromatiziranih olj in kisov. Pogosta je tudi njegova uporaba v kozmetični industriji (Kokkini in sod., 2003; Dweck, 2000).

Droga

- List žajblja (*Salviae folium*)
- Eterično olje žajblja (*Salviae aetheroleum*) – pridobljeno z vodno destilacijo svežih ali suhih listov

Sestava droge

Listi, bogati z eteričnim oljem, se pogosto uporabljajo v prehranski industriji, fitoterapiji in aromaterapiji (Avato in sod., 2005). Glavni sestavini eteričnega olja sta α - in β -tujon (35-50%, prevladuje α -), druge sestavine so 1,8-cineol, kafra, borneol, β -pinen, β -kariofilen in α -humulen (Mirjalili in sod., 2006, Barnes in sod., 2007). Eterično olje predstavlja le do 3% sestavin droge (Barnes in sod., 2007). Med preostalimi sestavinami najdemo diterpenske grenčini karnozol in karnozolno kislino; triterpenske kisline (ursolna in oleanolna kislina), lamiacejske čreslovine (rožmarinska kislina, 3-8%) in fenolne kisline: kavna, klogenska, elagična, ferulna in galna (Heinrich in sod., 2004).

Delovanje in uporaba

Žajbelj ima vrsto bioloških aktivnosti, kot so protibakterijska, fungistatična, virustatična, adstringenta, antispazmodična, protivnetna (Baričevič in Bartol, 2000; Lu in Foo, 1999; Dweck, 2000; Heinrich in sod., 2004; Baričevič in sod., 2001).

Stranski učinki

Stranski učinki tujona na živčni sistem in jetra niso bili klinično dokazani, pri tradicionalni uporabi vnos tujona naj ne presega 5 mg/dan, trajanje uporabe največ 2 tedna (Opinion of the Scientific Committee on Food on Thujone, 2003).

2.1.3.4.2 Materina dušica, timijan (*Thymus* spp.)

Materina dušica, močno dišeč nizek grmiček, je priljubljena zdravilna rastlina, ki se v ljudskem zdravilstvu največkrat uporablja za zdravljenje dihal. Morfološko soroden je vrtni timijan (*Thymus vulgaris* L.). Grki so timijan kot dišavnico dodajali pijačam in sirom, Egipčani so ga uporabljali za balzamiranje mrtvih. Za obe vrsti je značilen vonj, ki ga daje timol in obe se uporabljata kot zdravilna in aromatična rastlina, pri zdravljenju kašlja je timijan celo učinkovitejši od materine dušice.

Droga

- Zel materine dušice, zel timijana (*Serpylli herba*, *Thymi herba*): nabiramo v času cvetenja; od maja do septembra
- Olje materine dušice, olje timijana (*Serpylli aetheroleum*, *Thymi aetheroleum*): pridobljeno z vodno destilacijo

Sestava

Droga vsebuje eterično olje (0,1-2,6%). Glavne sestavine eteričnega olja so timol (do 30%), karvakrol (do 20%), 1,8-cineol, borneol, linalool in α -pinen. V drogi so prisotni tudi številni flavonoidi (apigenin, luteolin, timonin...), triterpenske kisline (ursolna in oleanolna), grenčine in čreslovine ustnatic (rožmarinska kislina) (Heinrich in sod., 2004; Raal in sod., 2004).

Delovanje in uporaba

Timijan oz. materina dušica - izvleček in njuno olje delujeta karminativno, antiseptično, adstringentno, antitusično, ekspektorantno, spazmolitično in se uporabljata za lajšanje prehladov, bronhitisa, sinusitisa in podobnih dihalnih bolezni. Pri glavobolu, živčnih bolečinah in revmi olje blaži bolečine. Pomaga pri katarju želodca in črevesja. Večina aktivnosti izhaja iz timola, ki deluje kot ekspektorans in antiseptik in je pogosta sestavina ustnih vodnic. Timol in karvakrol delujeta spazmolitično (Heinrich in sod., 2004; Barnes in sod., 2007; Foster in Johnson, 2006; Galle-Toplak, 2002).

2.1.3.4.3 Melisa (*Melissa officinalis* L.)

Melisa je ena najstarejših in najbolj priljubljenih dišavnic in zdravilnih rastlin, privlačna je predvsem zaradi prijetno dišečega eteričnega olja. Domovina melise je Sredozemlje, kjer jo pridelujejo že več kot 2000 let. Cenili so jo Grki in Rimljani, pozneje so jo začeli gojiti Arabci in evropski menihi po samostanskih vrtovih (Foster in Johnson, 2006; Galle-Toplak, 2002). V Sloveniji na submediteranskem območju raste divje po posekah, starih zidovih in vinogradih, sicer pa jo gojijo po vrtovih, kjer jo lahko nabiramo od maja do novembra.

Droga:

- List melise (*Melissae folium*)
- Eterično olje melise (*Melissae aetheroleum*)

Sestava

Melisa vsebuje eterično olje, v katerem prevladujejo monoterpeni citral, citronelal in geranial ter seksviterpen β -kariofilen. Vsebnost olja v drogi je med 0,02 in 0,2%, zato dosega zelo visoko ceno. Droga vsebuje tudi čreslovine usnatic (rožmarinska kislina), triterpenske kisline (ursolna in oleanolna), hidroksicimetne derivate (ferulna, kumarna, kavna kislina), flavonoide kvercetin, apigenin, kemferol (Heinrich in sod., 2004; Barnes in sod., 2007).

Delovanje in uporaba

Najbolj pogosto omenjano delovanje melise je sedativno (pomirjevalno) pri živčnosti in motnjah spanja (učinkoviteje v kombinaciji z baldrijanom in hmeljem) in antispazmodično; deluje tudi karminativno, protibakterijsko, protivirusno (*Herpes simplex*), protivnetno in antioksidativno (Barnes in sod., 2007; Foster in Johnson, 2006; Dastmalchi in sod., 2008). V tradicionalni medicini se uporablja za zdravljenje živčne napetosti, glavobolov, revmatizma in pri živčno pogojenih želodčnih in črevesnih težavah.

2.1.3.4.4 Kraški šetraj (*Satureja montana* L.)

Šetraj je dobro znan rod zdravilnih zelišč s številnimi divje rastočimi vrstami v sredozemski regiji. Kraški šetraj je za razliko od bolj poznanega in po vrtovih razširjenega enoletnega vrtnega šetraja (*S. hortensis*), zimzelen trajni grmiček, ki zraste do 60 cm visoko in ima bele ali rahlo rožnate cvetove (cveti od julija do septembra). Izvira iz južne Evrope in uspeva na skalnih in sončnih območjih sredozemske regije (Grieve, 1971; cit. po Zavatti in sod., 2011). Šetraj je prvi omenil Plinij. Ime izhaja iz latinskega izraza "satureis", ki pomeni zelišče satirov (mitološka bitja, božanstva gora in gozdov, ki so simbolizirala plodnost; ljudje so se jih bali zaradi njihove razbrzdane narave), zato je bilo gojenje šetraja v samostanih prepovedano. Aromatično olje šetraja odganja škodljivce, močno pa privlači čebele in je dobra medonosna rastlina. Zelišče se tradicionalno uporablja za zdravljenje bronhitisa. Sveži ali suhi listi dajejo rahlo pekoč okus aromatiziranemu kisu, zeliščnemu maslu, fižolovim jedem ali kremnim juham (Grieve, 1971; cit. po Zavatti in sod., 2011; Kokkini in sod., 2003).

Droga

- Zel šetraja (*Saturejae herba*)

Sestava droge

Drogo šetraja sestavljajo eterična olja, triterpeni in flavonoidi. Sestava eteričnega olja je zelo variabilna in ima lahko poleg visoke vsebnosti karvakrola, ki daje tipično aromo, prisotne še večje količine *p*-cimena, linaloola, borneola ali bornil acetata (Kokkini in sod., 2003).

2.2 SODOBNA FITOTERAPIJA

Uporaba in prodaja rastlinskih zdravil (zdravil na rastlinski osnovi) se je v zadnjih letih v industrializiranih državah zelo povečala. Svetovni fitoterapevtski trg je od leta 1985 zrasel od 5 do 18% letno (Grünwald, 1995; cit. po Calixto, 2000). K temu je prispevalo kar nekaj dejavnikov:

- težnja uporabnikov po naravni terapiji,
- zaskrbljenost glede neželenih učinkov sintetskih zdravil in splošno prepričanje, da so rastlinska zdravila brez stranskih učinkov, saj so ljudje tisočletja uporabljali rastline za zdravljenje različnih bolezni,
- veliko zanimanje za alternativno medicino,
- prepričanje, da lahko rastlinska zdravila pomagajo pri zdravljenju nekaterih bolezni, kjer ima konvencionalno zdravljenje (s sintetskimi zdravili) dokazano nezadostno učinkovitost,
- tendenca k samozdravljenju,
- izboljšanje kakovosti, dokazana učinkovitost in varnost rastlinskih zdravil,
- visoka cena sintetskih zdravil (Calixto, 2000).

Pomemben dejavnik povečanja porabe rastlinskih zdravilnih pripravkov pa je tudi napredek v pridelovanju in shranjevanju rastlinskih zdravil.

2.2.1 Rastlinska zdravila

Po definiciji WHO (Who guidelines on GMP..., 2007) zdravila rastlinskega izvora vključujejo zelišča, rastlinski material, rastlinske pripravke in končne rastlinske proizvode.

- **Zelišča** (*herbs*) vključujejo surov, neobdelan material, pridobljen iz lišajev, alg, gliv ali višjih rastlin - liste, cvetove, plodove, semena, stebila, les, lubje, korenine, rizome ali druge dele, ki so lahko celi, fragmentirani ali uprašeni.
- **Rastlinski material** (*herbal materials*) vključuje poleg zelišč svež sok, gumi, olja, eterična olja, smole in suh prašek zelišč. V nekaterih državah se ta material lahko procesira z različnimi postopki, kot so kuhanje, praženje...

- **Rastlinski pripravki** (*herbal preparation*) so osnova končnih rastlinskih proizvodov in lahko vključujejo v prah zdrobljen ali narezan rastlinski material ali ekstrakte, tinkture, maščobna olja rastlinskega materiala. Pridobivajo se z ekstrakcijo, frakcionacijo, čiščenjem, koncentriranjem ali drugimi fizikalnimi ali biološkimi procesi. Sem spadajo tudi preparati pridobljeni z namakanjem ali segrevanjem rastlinskega materiala v alkoholnih pijačah, medu ali drugem materialu.
- **Končni rastlinski pripravki** (*finished herbal products*) so rastlinski pripravki iz enega ali več zelišč. Če je bilo uporabljenih več zelišč, se uporablja tudi ime mešanica rastlinskih proizvodov. Končni rastlinski produkti ali mešanice, h katerim so bile dodane kemično definirane aktivne substance, vključno s sintetičnimi spojinami in/ali iz rastlinskega materiala izoliranimi spojinami, ne spadajo med rastlinska zdravila.

Ena osnovnih značilnosti fitoterapevtika je, da nima takojšnjega ali zelo močnega farmakološkega delovanja, zato se ne uporablja za urgentna zdravljenja. Druge lastnosti rastlinskih zdravil so široka terapevtska uporaba in dobra sprejetost med uporabniki (Calixto, 2000).

V primerjavi z dobro definiranimi sintetičnimi drogami, rastlinska zdravila kažejo nekaj izrazitih razlik:

- aktivne sestavine so pogosto neznane
- standardizacija, kontrola stabilnosti in kakovosti so izvedljive, vendar včasih težavne
- razpoložljivost in kvaliteta izhodnega materiala je pogosto problematična
- dobro nadzorovane dvojno slepe klinične ali toksikološke študije za preučevanje učinkovitosti in varnosti so redke
- empirična uporaba v ljudski medicini je zelo pomembna karakteristika
- imajo širok terapevtski obseg in so primerna za zdravljenja kroničnih bolezenskih stanj
- pojav neželenih stranskih učinkov je manj pogost, vendar so dobro nadzorovane študije pokazale prisotnost le-teh tudi pri rastlinskih zdravilih
- običajno so cenejša od sintetičnih drog (Calixto, 2000; Bandaranayake, 2006).

Ideja, da so rastlinska zdravila brez stranskih učinkov, je napačna (Capasso in sod., 2000; Bandaranayake, 2006). Rastline vsebujejo na stotine spojin in nekatere od teh so zelo strupene. Pri uporabi nekaterih zdravilnih rastlin je potrebna posebna pozornost, saj so lahko toksične za jetra (pirolizidinski alkaloidi, apiol, safrol, lignani), ledvica (terpeni, saponini), kožo (seskviterpenski laktoni, furanokumarini) in druga tkiva. Mnoge rastline tvorijo toksične substance, kot so viskotoksini, lektini, cianogeni glikozidi, ki odvrnejo herbivore. Določeno tveganje za zdravje predstavlja tudi sočasna uporaba različnih rastlinskih in konvencionalnih zdravil (Capasso in sod., 2000).

Kljub vsemu so stranski učinki manj pogosti v primerjavi s sintetičnimi drogami. Znana sta dva tipa stranskih učinkov. Prvi možni učinki izhajajo iz rastline same in so povezani s toksičnostjo, predoziranje in interakcijami s konvencionalnimi zdravili. Tako so v zvezi z uporabo rastlinskih zdravil znani mnogi primeri alergičnih reakcij. Drug tip možnih učinkov pa je posledica neprimerne, nenatančne priprave zdravil: nepravilna identifikacija rastlin, pomanjkanje standardizacije, neupoštevanje dobre proizvodne prakse, kontaminacije preparatov s pesticidi, mikroorganizmi, težkimi kovinami ali sintetičnimi drogami, zamenjave in ponarejanja rastlin, nepravilna priprava in doziranje (Calixto, 2000; Capasso in sod., 2000).

Večina rastlinskih zdravil, ki se uporabljajo v Evropi, je varnih pri uporabi v priporočenih količinah, vendar pa se pri nekaterih lahko pojavijo neželeni učinki, vključno z interakcijami pri sočasnem jemanju drugih zdravil (npr. šentjanževka reagira z digoksinom, inhibitorji HIV, teofilinom in varfarinom) (Phillipson, 2007).

2.2.2 Zakonodajni vidiki na področju fitoterapije

Proces regulative in zakonodaje glede rastlinskih zdravil se razlikuje od države do države. Glavni razlog za te razlike so kulturni aspekti in dejstvo, da so zdravilne rastline redko znanstveno preučevane in je rastlinskih preparatov, ki so testirani glede varnosti in učinkovitosti, malo (Calixto, 2000). Medtem ko v ZDA zeliščni izdelki veljajo za prehranske dodatke z malo podatki o kakovosti, velikokrat pa lahko vsebujejo tudi potencialno nevarna zelišča, je v večini evropskih držav za avtorizacijo zdravilnih rastlinskih izdelkov na tržišču potrebna obsežna dokumentacija o kakovosti, varnosti in terapevtski učinkovitosti (Busse, 2000).

2.2.2.1 Rastlinska zdravila v Evropi

Zdravilne rastline imajo znotraj držav članic Evropske unije (EU) različen status in niso urejene enotno. V Nemčiji je večina rastlinskih pripravkov zdravil, ki jih mora pred prodajo odobriti pristojni organ, to je Zvezni inštitut za zdravila in medicinske izdelke. V Angliji rastlinski pripravki ne veljajo za zdravila, temveč za prehranska dopolnila, zato spadajo pod zakon o živilih. Druge evropske države, na primer Švedska ali Danska, so zanje ustvarile posebno kategorijo »naravna zdravila«, katerih registracija je poenostavljena.

Aprila 2011 je v EU vstopila v veljavo nova zakonodaja glede kontrole rastlinskih proizvodov – Direktiva o tradicionalnih pripravkih (Direktiva 2004/24/ES). Po tej direktivi morajo države članice vse rastlinske zdravilne proizvode, ki nimajo uradne licence

zdravila, registrirati kot tradicionalna zdravila. Registrirana rastlinska zdravila morajo izpolnjevati zahteve glede kakovosti, varnosti in učinkovitosti. Zagotovljena kakovost je najpomembnejša; vsi produkti morajo biti obdelani v skladu z zahtevami dobre proizvodne prakse. Proizvajalci morajo predložiti bibliografske dokaze o kakovosti in učinkovitosti produktov pri zdravljenju bolezni, vendar so brez obveze o klinični in toksikološki evalvaciji, ki so obvezne za zdravila z licenco. Pogoj, da se tradicionalna zdravila lahko registrirajo, je njihova dolgotrajna uporaba (Direktiva 2004/24/ES; Phillips, 2007).

Tradicionalna zdravila rastlinskega izvora so rastlinski izdelki, ki so prisotni na tržišču vsaj 30 let, od tega 15 v Evropi, lahko se kombinirajo z vitamini in rudninskimi snovmi, niso primerni za hujša obolenja. Kakovost mora ustrezati zahtevam farmakopeje.

Tradicionalna uporaba rastlinskih zdravil ne pomeni le, da se uporabljajo tradicionalno (tradicionalna oblika aplikacije: čaj, tinktura, sok ali sirup), ampak da je namen uporabe tradicionalen (Kraft, 2002). Indikacije za tradicionalno uporabo zdravilnih rastlinskih pripravkov so lahko stalne, včasih pa se lahko spremenijo. Tako se kumina od Dioskorida do danes uporablja za isti namen (izboljšanje prebave). Ginko pa se na Kitajskem tradicionalno uporablja za lajšanje astmatičnih napadov, medtem ko so sodobne indikacije uporabe ekstrakta ginka vrtoglavica, šumenje v glavi, demenca; torej gre za popolnoma drugačen namen uporabe (Kraft, 2002).

Tradicionalna zdravila rastlinskega izvora morajo poleg splošnih pogojev, določenih z zakonom, ustrezati naslednjim zahtevam (Direktiva 2004/24/ES):

- imeti smejo terapevtske indikacije, primerne izključno za tradicionalna zdravila rastlinskega izvora, ki so zaradi svoje sestave in namena primerna za samozdravljenje,
- so za peroralno ali zunanjo uporabo ali za inhaliranje,
- obdobje tradicionalne uporabe zdravila je poteklo,
- podatki o tradicionalni uporabi zdravila morajo biti zadostni, da izdelek dokazano ni škodljiv v določenih pogojih uporabe, farmakološki učinki ali učinkovitost zdravila pa so verjetni na podlagi dolgotrajne uporabe in izkušenj.

Namesto popolne registracije nova direktiva omogoča poseben, poenostavljen postopek registracije za tista zdravila, katerih učinkovitosti in varnosti kljub njihovi dolgi tradiciji ni mogoče znanstveno dokazati. Tradicionalna uporaba teh zdravil je omejena na določena področja uporabe in praviloma so odmerki teh zdravil manjši. Varnost zagotavlja dolgo preizkušena uporaba, kljub temu pa lahko pristojni organi od proizvajalcev zahtevajo vse podatke o varnosti. Če bi se kljub dolgoletni uporabi pojavili doslej neznan stranski učinki, pristojni organi lahko izvedejo potrebne ukrepe (Direktiva 2004/24/ES).

2.2.2.2 Zdravilne rastline v slovenski zakonodaji

V Sloveniji je od decembra 1999 v veljavi Zakon o zdravilih in medicinskih pripomočkih (UL RS, št. 101/1999), ki določa zdravila in medicinske pripomočke za uporabo v humani in veterinarski medicini, pogoje za njihovo izdelavo in dajanje v promet ter ukrepe za zagotavljanje njihove kakovosti, varnosti in učinkovitosti. Zakon določa, da so zdravila lahko tudi rastlinskega izvora, na primer rastline, deli rastlin, rastlinski izločki in izvlečki. V tej točki se ne razlikujejo od zdravil s kemično-sintetičnimi učinkovinami. V skladu z zakonom je izdelan Pravilnik o razvrstitvi zdravilnih rastlin (UL RS, št. 133/2003), ki določa razvrstitev zdravilnih rastlin za peroralno uporabo (Preglednica 1).

Preglednica 1: Pravilnik zdravilne rastline razvršča v naslednje kategorije (prirejeno po Pravilnik o razvrstitvi zdravilnih rastlin; UL RS, št. 133/2003)

Table 1: Medicinal plants are arranged according to Rules on the classification of medical plants (UL RS, št. 133/2003) in following categories:

Kategorija	Značilnosti	Primeri
H	<ul style="list-style-type: none"> zdravilne rastline, ki se lahko uporabljajo tudi kot živila, če se uporabljajo deli rastlin v določeni stopnji rasti (dozorelosti) če izdelkom iz zdravilnih rastlin kategorije H pripisujejo zdravilne učinke v smislu preprečevanja, zdravljenja ali ozdravljenja bolezni pri ljudeh, se razvrstijo med zdravila 	ameriški slamnik, artičoka, borovnica, breza, česen, črni bezeg, hmelj, kamilica, kopriva, lipa, melisa, ognjič, ozkolistni trpotec, poprova meta, preslica, rman, rožmarin, slez, timijan, žajbelj (vodni izvlečki, začimba)
Z	<ul style="list-style-type: none"> zdravilne rastline, namenjene zdravilski uporabi tako zdravilne rastline kot izdelki za peroralno uporabo se praviloma razvrstijo med zdravila, ki se izdajajo brez recepta 	arnika, baldrijan, bela omela, boreč, divji kostanj, gabez, glog, repuh, šentjanževka, vrba, žajbelj (alkoholni izvlečki)
ZR	<ul style="list-style-type: none"> zdravilne rastline, katerih zdravilska uporaba zahteva poseben nadzor značilna je strupenost pri prekoračenih odmerkih tako zdravilne rastline kot izdelki za peroralno uporabo se praviloma razvrstijo med zdravila, ki se izdajajo le na recept 	bršljan, grenkoslad, krvavi mlečnik, šmarnica
ND	<ul style="list-style-type: none"> zdravilne rastline, katerih zdravilska uporaba zaradi škodljivosti ni dovoljena 	jesenski podlesek

2.2.3 Zagotavljanje in kontrola kakovosti

Kontrola kakovosti je večstopenjski proces, ki je vključen v faze od gojenja in/ali nabiranja rastlinskega materiala do končne kontrole rastlinskega proizvoda in spremljanja stabilnosti in kakovosti ves čas roka uporabnosti (Bandaranayake, 2006; Heinrich in sod., 2004). Na kakovost končnega proizvoda vpliva več dejavnikov: kakovost izhodnega materiala, primerno sušenje, transport in skladiščenje droge, uporaba primernih in ponovljivih ekstrakcijskih metod, primerno shranjevanje končnega proizvoda in uporaba v primernem roku uporabnosti (Heinrich in sod., 2004; Busse, 2000; Fennell in sod., 2004).

Kontrola kakovosti temelji na treh pomembnih farmakopejskih definicijah (Bandaranayake, 2006):

Istovetnost: Ali je rastlina prava?

Čistota: Ali so prisotni kontaminanti, ki jih ne bi smelo biti (npr. drugi deli rastlin ali pa druge rastline)?

Vsebnost/analiza: Ali je vsebnost aktivnih učinkovin v definiranem obsegu?

Testne metode za kontrolo kakovosti vključujejo pregled organoleptičnih lastnosti in analizo. Makroskopska in mikroskopska analiza organoleptičnih lastnosti je hiter način identifikacije droge in ocene njene čistote. Analitska preiskava vključuje tehnike kot so tankoplastna kromatografija, HPLC, plinska kromatografija, spektrofotometrija in druge.

Kljub razlikam med rastlinskimi zdravili in kemično sintetiziranimi zdravili, so osnovne zahteve po kakovosti (identiteta, čistota in določanje vsebnosti, standardi za Dobro proizvodno prakso - DAP) in označevanje enake (Busse, 2000; Xiaorui, 1998; cit. po Choi in sod., 2002).

2.2.3.1 Kakovost surovin

Vir in kakovost surovin imata osrednjo vlogo pri kakovosti in stabilnosti rastlinskih pripravkov. Stalno kakovost produktov rastlinskega izvora lahko zagotovimo le, če je izhodni material definiran zelo natančno (Heinrich in sod., 2004). Poleg botanične identifikacije rastlinskega materiala, je pomembno, da se izločijo ali omejijo nečistoče, kot so drugi rastlinski deli, tuje primesi ter mikroorganizmi in njihovi metaboliti (aflatoksini) (Busse, 2000, Heinrich in sod., 2004).

Na kakovost in terapevtsko vrednost rastlinskih pripravkov vpliva biokemija posamezne vrste, zunanji dejavniki kot so klimatske razmere, geografska lokacija in drugi ekološki dejavniki in rastni pogoji (temperatura, svetloba, razpoložljiva voda in hranila), čas

nabiranja, metoda način nabiranja, sušenja, pakiranja, shranjevanja in transporta izhodnega materiala (Calixto, 2000; Fennell in sod., 2004; Bandaranayake, 2006). Nekatere rastline imajo termolabilne substance, zato jih je treba sušiti pri nizkih temperaturah, druge imajo substance, ki so podvržene encimatskim spremembam. To razloži variabilnost rastlinskih drog (Calixto, 2000).

Poleg naštetih variabilnih dejavnikov, vplivajo na kakovost, varnost in učinkovitost še kontaminacije z mikroorganizmi, težkimi kovinami in pesticidi. Zato farmacevtske družbe preferirajo uporabo gojenih rastlin namesto divje rastočih, saj imajo manjšo variabilnost sestavin (Calixto, 2000; Busse, 2000). Z gojenjem zdravnih rastlin, včasih tudi genetsko izboljšanimi, lahko tržišču ponudimo rastline bogate z zaželenimi aktivnimi spojinami (Capasso in sod., 2000). Poleg tega je možnost pomot in ponarejanj manjša, enoznačno označevanje rastline in pretežno standardizirani pogoji rasti in žetve omogočajo proizvodnjo primerljivih serij skozi daljše obdobje (Bandaranayake, 2006). Za dosledno zagotavljanje kakovosti izdelkov, je treba uporabiti surovine z različnih geografskih virov, s čimer se kompenzirajo letne variacije, do katerih pride kljub konstantnemu geografskemu izvoru materiala (Busse, 2000).

2.2.3.2 Kakovost aktivnih sestavin

Surov rastlinski material se običajno predela v različne ekstrakte. Zaradi kompleksne sestave rastlinskih drog, je predelava odločilni korak v ohranjanju konstantne kakovosti (Busse, 2000). Pri nekaterih zdravnih rastlinah, kjer so sestavine, ki določajo učinkovitost, znane, se ugotavlja standardizirana vrednost. Cilj standardizacije je doseganje enako trajne vsebine sestavin, ki določajo učinkovitost, neodvisno od pogojev žetve in predelave. S primerjavo z referenčnimi standardi se določi minimalna koncentracija ene ali več sestavin oz. skupine sestavin (Heinrich in sod., 2004).

Sestavine rastlinskih drog lahko razdelimo v več skupin, ki so pomembne za analitske ali terapevtske namene. Z vidika terapevtske uporabe so pomembne tri skupine sestavin: aktivne sestavine, aktivni markerji in negativni markerji. Za te sestavine je potreben nadzor kakovosti. Skupina analitskih (neaktivnih) markerjev je pomembna, če za določeno drogo ni identificiranih terapevtskih markerjev (Busse, 2000).

Za nadaljnjo karakterizacijo ekstraktov se uporabljajo metode, ki so primerne za določanje kakovosti: HPLC, plinska kromatografija, TLC in druge.

2.2.3.3 Kakovost končnih rastlinskih proizvodov

Različni kontrolni preizkusi končnih proizvodov so potrebni za kvalitativno in kvantitativno določanje aktivnih sestavin, aktivnih markerjev in/ali negativnih markerjev. Te informacije morajo biti navedene na etiketah končnega proizvoda, kar omogoča primerjavo in kontrolo (Busse, 2000).

Nujni so tudi testi stabilnosti končnih proizvodov, s katerimi se ugotavlja oz. dokazuje, da sestava zeliščnega izdelka ostane konstantna do konca roka trajanja. Testi stabilnosti ne morejo biti omejeni na analizo enega samega markerja, ampak se morajo opraviti analize, ki zagotavljajo, da ne pride do sprememb v sestavi ostalih sestavin (Busse, 2000).

2.2.4 Farmaceutska kakovost

Temeljni pogoj za izdajo dovoljenja je zakonsko predpisan dokaz o kakovosti in tudi učinkovitosti in neoporečnosti zdravilnega sredstva. Zdravila lahko pridejo v promet, samo če ustrezajo splošno priznanim farmacevtskim predpisom, ki so zapisani v farmakopeji.

2.2.4.1 Farmakopeja

Farmakopeja je farmacevtska zbirka predpisov za pripravo zdravil, njihovo identifikacijo ter preizkušanje njihove kakovosti. Prve farmakopeje so bile objavljene že v 15. stoletju (npr. Ricettario Fiorentino v Firencah, 1498). Njihov namen je bil vnesti red v različne oblike pripravkov in odpraviti probleme z njihovo variabilno sestavo (Heinrich in sod., 2004). Današnje farmakopeje objavljajo pristojni državni organi ali državna farmacevtska združenja.

Prve nacionalne farmakopeje so bile objavljene v različnih obdobjih 19. stoletja. Zaradi globalizacije farmacevtskega tržišča, so farmakopeje držav Evropske unije pod okriljem Evropske farmakopeje (European Pharmacopoeia, Ph. Eur.), od devetdesetih let prejšnjega stoletja pa v okviru ICH (International Harmonisation Conference) poteka usklajevanje evropske, ameriške in japonske farmakopeje (Görög, 2008).

Poslanstvo farmakopeje je ohranjati in izboljšati zdravje s širjenjem veljavnih standardov za zdravila. Hiter razvoj analitskih metod omogoča analitikom učinkovitejši prispevek naraščajočim zahtevam glede varnosti zdravil v primerjavi s časi klasičnih analiz (Görög, 2008).

2.2.4.1.1 *Evropska farmakopeja*

Evropska farmakopeja (European pharmacopoeia, Phr. Eu.), ki jo pripravlja in izdaja Evropski direktorat za kakovost zdravil, določa skupne in obvezne standarde (monografije) za zagotavljanje kakovosti zdravil v vseh državah članicah. Standardizacija je bila opravljena za vse snovi, uporabljene v zdravilih za humano uporabo ali za uporabo v veterini, kakor tudi za analitične metode, s katerimi je zagotovljena optimalna kakovost za zdravje potrošnikov. Vpliv Evropske farmakopeje sega daleč prek meja držav članic, saj se tudi številne druge države v svoji zakonodaji sklicujejo na njene standarde (Heinrich in sod., 2004).

Standardi posameznih držav se postopoma usklajujejo in objavljenih je bilo že več kot 1500 obveznih evropskih standardov za nova zdravila, vsako leto se pripravi približno 100 novih monografij (Artiges, 2001). Zaradi široke uporabe zeliščnih pripravkov je bilo potrebno dopolniti in posodobiti monografije, tako Evropska farmakopeja vsebuje 125 monografij specifičnih zdravilnih rastlin, 84 pa jih je še v pripravi. Priprava takšnih monografij zahteva poglobljeno znanje o rastlinski kemiji, da se lahko definira kemijski profil rastlin, in razumevanje analitskih testov za identifikacijo rastlin ter za kvantitativno oceno znanih aktivnih sestavin (Phillipson, 2007).

Ustrezni predpisi, katere preizkuse je treba izvesti in dokumentirati na poti od surovine do končnega zdravila, so sestavni del preizkusnih smernic za zdravila. S tem je droga dobro opredeljena, potrebne pa so še druge raziskave. Poleg preizkusa droge je predviden še preizkus končnega zdravila. Z njim je treba preveriti fizikalne in kemične lastnosti končnega izdelka, na primer tablete ali kapsule. Na splošno so preizkusi zastavljeni tako, da je mogoče slediti pot od zdravilne rastline do končnega zdravila kot rdečo nit (Heinrich in sod., 2004).

Ker farmakopeja ne vsebuje monografij za vse droge, se v določenih primerih proizvajalca izhodiščne snovi navaja k temu, da poda dodatne podatke neposredno pristojnemu organu oziroma, da predloži lastne monografije.

Slovenija je leta 1993 pristopila h Konvenciji o izdelavi Evropske farmakopeje ter se s tem zavezala, da jo bo sprejela in uveljavila na svojem ozemlju. Zaradi usklajevanja evropske farmacevtske zakonodaje s slovensko Zavod za farmacijo in preizkušanje zdravil izdaja redne nacionalne dodatke k Evropski farmakopeji, imenovane *Formularium Slovenicum*. Pripravlja jih Komisija za pripravo dodatka k Evropski farmakopeji, ki deluje v okviru Javne agencije Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke (<http://www.jazmp.si/zacetna-stran/farmakopeja/evropska-farmakopeja/>).

2.2.5 Pristojni uradi, organizacije in delovne skupine na področju fitoterapije

Za oblikovanje in izdajanje smernic glede pridelave, predelave, uporabe in trženja rastlinskih drog in njihovih produktov, za nadzor nad kakovostjo posameznih stopenj v procesu pridelave in predelave zdravih rastlin ter za sprejem in registracijo končnih produktov, so pristojne različne delovne skupine ali organizacije na državni, evropski ali mednarodni ravni.

2.2.5.1 Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP)

Agencija je organ v sestavi ministrstva za zdravje in opravlja upravne, strokovne, inšpekcijske in razvojne naloge na področju zdravil in medicinskih pripomočkov za uporabo v humani in veterinarski medicini, ureja razmerja in koordinira strokovne naloge z uradnim kontrolnim laboratorijem in drugimi upravnimi, strokovnimi in znanstvenimi institucijami, opravlja izvršilne naloge in odloča v nacionalnih in evropskih harmoniziranih upravnih in strokovnih postopkih vrednotenja kakovosti, varnosti in učinkovitosti zdravil in medicinskih pripomočkov, naloge dograjevanja in obnove regulatornega informacijskega sistema, zagotavlja mednarodno prepoznaven sistem kakovosti poslovanja v okviru dobre regulatorne prakse in strokovno podporo pri uveljavljanju sistemskih usmeritev na področju zdravil in medicinskih pripomočkov (<http://www.jazmp.si/>).

Pri svojem delu sodeluje v upravnem odboru, v znanstvenih odborih in drugih delovnih telesih Evropske agencije za zdravila (EMA).

2.2.5.2 Evropska znanstvena kooperativa o fitoterapiji - ESCOP

Evropska znanstvena kooperativa o fitoterapiji (European Scientific Cooperative on Phytotherapy) je bila ustanovljena leta 1989 z namenom izdelave usklajenih meril za ocenjevanje rastlinskih zdravil v Evropi in koordinacije in izboljšanja znanstvenega pristopa k rastlinskim zdravilnim pripravkom. Drugi cilji vključujejo razvoj koordiniranega znanstvenega okvira za ocenjevanje rastlinskih zdravil, spodbujanje sprejetost rastlinskih zdravil, še posebej v splošni medicinski praksi, podpiranje in spodbujanje kliničnih in eksperimentalnih raziskav v fitoterapiji, izboljšanje in razširjanje znanstvenega in eksperimentalnega znanja o fitoterapiji, podpiranje primernih meritev, ki zagotavljajo optimalno zaščito za uporabnike rastlinskih zdravil, pripravljane referenčnih monografij o terapevtski uporabi rastlinskih drog (www.escop.com).

Različne delovne skupine držav članic EU so do zdaj skupno izdelale 80 pozitivnih monografij. Leta 2003 je izšla že njihova druga, prenovljena izdaja, leta 2009 pa dodatek k drugi izdaji. Pod naslovom Razvrstitev in znanstveno potrjena uporabnost je v rastlinskih kartotekah navedena ocena vsake opisane zdravilne rastline. Monografije vsebujejo najnovejša znanstvena dognanja o terapevtski uporabi rastlinskih pripravkov, vključno z indikacijami, doziranjem, kontraindikacijami, interakcijami in neželenimi učinki ter povzetke farmakoloških, kliničnih in toksikoloških podatkov (www.escop.com).

2.2.5.3 Evropska agencija za zdravila (EMA)

Evropska agencija za zdravila (The European Medicines Agency - EMA) je decentralizirano telo Evropske unije s sedežem v Londonu. Združuje znanstvene vire več kot 40 nacionalnih pristojnih organov iz 30 držav članic EGP-EFTA v mrežo več kot 4.000 evropskih ekspertov. Njena glavna odgovornost je varovanje in promocija zdravja ljudi in živali na podlagi vrednotenja in nadzora zdravil za humano in veterinarsko uporabo. Agencija se ukvarja z znanstvenim vrednotenjem prijav za dovoljenje za promet z zdravili v Evropi (centralizirani postopek), stalno nadzoruje varnost zdravil s pomočjo mreže farmakovigilance. Če poročila o neželenih učinkih predlagajo spremembe razmerja med koristmi in tveganji nekega zdravila, agencija izvaja ustrezne ukrepe. Aktivna je tudi pri promociji inovacij in raziskav v farmacevtski industriji. EMA daje znanstvene nasvete in pomoč pri protokolu pridobivanja dovoljenja za nova zdravila. Objavlja smernice o kvaliteti, varnosti in učinkovitosti zahtev za testiranje (http://europa.eu/agencies/community_agencies).

Odbor za zdravila rastlinskega izvora (Committee on Herbal Medicinal Products, HMPC) je strokovni organ Evropske agencije za zdravila (EMA), ki pripravlja monografije Evropske unije o zdravilih rastlinskega izvora in tradicionalnih zdravilih rastlinskega izvora, osnutek seznama Evropske unije o rastlinskih snoveh, pripravkih rastlinskega izvora in kombinacijah iz njih ter opravlja druge naloge v skladu z Direktivo 2004/24/EC (http://europa.eu/agencies/community_agencies).

EMA sodeluje tudi z Evropsko farmakopejo, s Svetovno zdravstveno organizacijo (World Health Organization, WHO), mednarodno konferenco za harmonizacijo (International Conference of Harmonization, ICH) in v okviru tristranskega mednarodnega sodelovanja na harmonizaciji tehničnih zahtev za prijavo zdravil za uporabo v veterinarski medicini (International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Veterinary Medicinal Products), v katerem sodelujejo EU, Japonska in ZDA (http://europa.eu/agencies/community_agencies).

2.2.5.4 Svetovna zdravstvena organizacija - WHO

Svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organisation) od devetdesetih let prejšnjega stoletja izdaja monografije o zdravilnih rastlinah, ki se uporabljajo po vsem svetu. Namenjene so predvsem državam, ki nimajo lastnih meril za vrednotenje zdravilnih rastlin, kot pomoč pri oceni zdravilnih rastlin v tradicionalni medicini, saj podajajo znanstvene informacije o varnosti, kakovosti in učinkovitosti. Vsaka monografija je sestavljena iz dveh delov. Prvi del je farmakopejski povzetek in priporoča kakovostne parametre in teste (botanične značilnosti, razširjenost, identifikacijske teste, zahteve čistote droge, kemične teste in aktivne ali glavne kemijske spojine). V drugem delu so zbrani klinične aplikacije, farmakološki podatki, kontraindikacije, opozorila, možni neželeni učinki in pozologija. V štirih izdanih serijah so izdali že 117 monografij. Leta 2000 je WHO objavil tudi posebno publikacijo z natančno opredeljenimi protokoli za določanje varnosti, kakovosti in učinkovitosti (Who guidelines on GMP..., 2007).

2.2.5.5 Druge organizacije

Kadar za določeno rastlino farmakopejska ali WHO monografija ne obstajata, je potrebno najti druge smernice oz. standarde za ocenjevanje kakovosti, varnosti in učinkovitosti, npr. ISO standarde. Standarde pa lahko objavljajo tudi posamezni proizvajalci ali naročniki, v skladu s svojimi zahtevami in željami. V vsakem primeru so potrebna dokazila o analizah in podatki o ustreznosti rastlinskih drog ali pripravkov.

2.2.5.5.1 Mednarodna organizacija za standardizacijo - ISO

Mednarodna organizacija za standardizacijo (International Organization for Standardization – ISO) je mednarodno združenje organizacij za standardizacijo iz 157 držav s sedežem v Ženevi. Je nevladna organizacija, ki tvori most med javnim in zasebnim sektorjem. ISO pripravlja in izdaja mednarodne standarde za vsa področja, razen za elektrotehniko in elektroniko (www.iso.org).

2.3 POMEN OHRANJANJA NARAVNIH GENSKIH VIROV ZDRAVILNIH RASTLIN

Vedno večje zanimanje za rastlinske pripravke in rastlinska zdravila povzroča povečan pritisk na naravne populacije zdravilnih rastlin (Kala in sod., 2006; Canter in sod., 2005; Hamilton, 2004), saj večina surovin izvira iz naravnih rastlišč. V Evropi gojijo le 10% zdravilnih rastlin, ki se uporabljajo komercialno (Canter in sod., 2005;). Na kritični meji ogroženosti na lokalni, nacionalni, regionalni ali globalni ravni je med 4000 in 10000 vrst zdravilnih rastlin (Hamilton, 2004). Prekomerno nabiranje zdravilnih rastlin v naravi povzroča izgubo genetske raznolikosti, lokalno izumiranje vrst in uničenje habitatov (Canter in sod., 2005). Razlogi za zmanjšanje populacij zdravilnih rastlin pa niso le antropogenega izvora, ampak so tudi posledica počasne rasti nekaterih vrst, majhne gostote populacij, specifičnosti habitatov, nizke plodnosti in velike umrljivosti nekaterih vrst (Kala, 2009). Za zaščito ogroženih vrst zdravilnih rastlin ni dovolj le strožja zakonodaja in uvajanje trajnostnega načina nabiranja, ampak je treba razviti dolgoročne rešitve, kamor spada tudi gojenje zdravilnih rastlin (Canter in sod., 2005).

Uporaba divjih rastlin je pomembna komponenta lokalnega tradicionalnega ekološkega znanja in ga je potrebno obravnavati kot kompleksen fenomen, ki pokriva zgodovinske, geografske, kulturne, ekonomske in socialne vidike (Soukand in Kalle, 2010). Tradicionalno znanje, ki se prenaša iz roda v rod, je v zadnjih desetletjih močno upadlo (Hamilton, 2004; Kala in Ratajc, 2012; Kala, 2006). Etnobotanika in etnofarmakologija sta pomembni orodji za ohranjanje tradicionalnega znanja o uporabi zdravilnih rastlin in z raziskovanjem tradicionalnih navad in splošnih etnografskih posebnosti lokalnih območij dajeta strokovno podlago za odkrivanje tistih divje rastočih genskih virov, ki so potencialno uporabni v prehrani in/ali zdravilstvu lokalnega prebivalstva (Heinrich in sod., 2005, Heinrich in sod., 2006; Gurib-Fakim, 2006). Vedno pomembnejšo vlogo pa ima etnobotanika tudi pri ohranjanju ogroženih vrst in razvoju zaupanja med avtohtonimi prebivalci, nosilci znanja, in raziskovalci. Avtohtoni prebivalci in lokalne skupnosti poznajo okolje in zahteve posameznih vrst, uporaba zdravilnih rastlin je globoko zakoreninjena v njihovi zavesti, skozi stoletja uporabe pa so razvili tudi trajnostni način nabiranja in izkoriščanja rastlin (Kala, 2009).

Raziskave v različnih regijah kažejo, da je raba naravnih virov, ki temelji na lokalnem tradicionalnem znanju in izkušnjah, pogosto bolj trajnostno naravnana kot večina globalnih in komercialno usmerjenih načinov. Zato je tradicionalno ekološko znanje pomembno in močno orodje pri ohranjanju in upravljanju naravnih virov (Kala, 2005; Kala, 2009).

Za ohranitev zdravilnih rastlin je pomemben pravilen pristop. Ekološke informacije o statusu populacije, njena razširjenost in značilnosti habitata so nujne za oceno stopnje ogroženosti in najprimernejšega načina ohranjanja vrste. Leta 2001 je bila v okviru

ECPGR (The European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources) ustanovljena delovna skupina za zdravilne in aromatične rastline. Glavni namen skupine, ki jo trenutno sestavlja 41 držav, je preprečiti izkoriščanje samoniklih zdravilnih in aromatičnih rastlin za potrebe fitoterapije in razviti mehanizme ohranjanja genskih virov (*in-situ*, *ex-situ*) na območju Evrope. V okviru skupine je bil narejen seznam prednostnih vrst, ki potrebujejo posebno pozornost: *Achillea millefolium* agg., *Artemisia absinthium*, *Carum carvi*, *Gentiana lutea*, *Hypericum perforatum*, *Melissa officinalis*, *Mentha piperita* in *M. spicata*, *Origanum* spp., *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris* in *T. serpyllum*. Pristop skupine k naravovarstvu je sodoben in interdisciplinaren. Razvili so sistem deskriptorjev, ki poleg opisovanja stopnje ogroženosti rastlinske vrste in fitoceleloških opazovanj vsebuje tudi etnobotanične podatke (etnična skupina, historični podatki o rabi rastlinske vrste, uporabnost vrste) (Baričević in sod., 2008; [www.ecpgr.cgiar.org/...](http://www.ecpgr.cgiar.org/)). Skupina je poenotila metodologijo vrednotenja naravnih habitatov in avtohtonih populacij v evropskem prostoru in skupaj nastopa v dolgoročnem ohranjanju genskih virov.

Gojenje zdravilnih rastlin se zdi edini pravi način preprečevanja prekomernega nabiranja in zavarovanja ogroženih vrst, hkrati pa je spodbujanje gojenja zdravilnih in aromatičnih rastlin ena od pomembnih strategij zagotavljanja zadostne količine kakovostnih surovin. Z gojenjem je zagotovljena stalna količina uniformne in visoko kakovostne surovine, možna je optimizacija vsebnosti učinkovin, izognemo se tudi napakam v botanični identifikaciji rastlin, genetski in fenotipski variabilnosti, variabilnosti in nestabilnosti izvlečkov, toksičnim komponentam in kontaminantom (Canter in sod., 2005; Schippmann in sod., 2002). Vzrokov za nizek delež gojenih zdravilnih vrst je več. Nekatere rastline imajo zelo specifične zahteve za rast in je njihovo gojenje težavno in neekonomično. Trg zdravilnih rastlin je nepredvidljiv, zato se pridelovalci težko odločijo za pridelavo določenih vrst, ki so danes popularne, čez nekaj let pa pozabljene. Velik problem predstavlja tudi mnenje nekaterih tradicionalnih zdravilcev, da gojene rastline nimajo enake moči in enakih zdravilnih učinkov kot divje in so zato neprimerne za zdravljenje (Schippmann in sod., 2002; Fennell in sod., 2004). Nekatere znanstvene raziskave potrjujejo navedene trditve, saj so aktivne učinkovine sekundarni metaboliti, na katere vplivajo razmere v okolju in se tvorijo v prisotnosti stresa ali pod določenimi pogoji (temperatura, svetloba, voda, pH, okužbe, herbivorija), zato se v monokulturnih nasadih ne izrazijo v tolikšni meri. Sinteza sekundarnih metabolitov je tudi manjša pri hitreje rastočih rastlinah v primerjavi s počasi rastočimi večletnimi rastlinami z naravnih rastišč. Vendar pa lahko na vsebnost sekundarnih metabolitov in s tem na moč zdravilnih rastlin vplivamo z načinom gojenja (Schippmann in sod., 2002; Canter in sod., 2005; Fennell in sod., 2004) in izbiro primerne genskega vira, zato se sodobna fitoterapija nujno povezuje z agronomijo in biotehnologijo.

Gojenje pa ne more biti edini način ohranjanja zdravilnih rastlin, saj ni pomembno ohraniti le posamezne vrste, temveč tudi vso njeno raznolikost. Pri ohranjanju ogroženih vrst je pomembno tudi poznavanje biokemijskih profilov in farmakoloških potencialov (Kala in

Ratajc, 2012) posameznih genskih virov. Tako lahko iz nabora genskih virov določene vrste izberemo tistega, ki je najprimernejši za določen namen uporabe in optimiziramo gojenje v smeri najvišje vsebnosti željene učinkovine. Kljub vsemu se moramo zavedati, da bo tudi v prihodnje večina surovin prišla z naravnih rastišč, zato se usmerja pozornost tudi v trajnostne načine nabiranja, pri čemer se vključuje lokalne skupnosti in se glede na etnobotanične podatke in vrsto zdravilne rastline oblikuje protokol nabiranja, ki določa kdaj, kaj in kako nabirati (Schippmann in sod., 2002).

Genske vire lahko ohranjamo *in situ* (v naravnih ekosistemih) ter *ex situ* (v okviru genskih bank, botaničnih vrtov in drugih kolekcijskih nasadov). V okviru Slovenske rastlinske genske banke (ustanovljena leta 1995) deluje tudi Genska banka zdravilnih in aromatičnih rastlin (ZAR), v katero je vključenih okrog 700 avtohtonih in tujih primerkov zdravilnih in aromatičnih rastlin. Poleg ohranjanja semenskega materiala, razmnoževanja in priprave semena na dolgotrajno hranjenje v zbirki (<http://www.furs.si/svn/sem/RastlGenViri.asp>), je pomembna naloga genske banke ZAR tudi harmonizacija metodologij v sistemu vrednotenja naravnih populacij rastlinskih vrst in njihovih habitatov, ki je osnovana na sistemu deskriptorjev, ter ocenjevanje morfoloških in kemičnih komponent različnih genskih virov (Baričevič in sod., 2002). S pomočjo terenskih vzorčenj zdravilnih in aromatičnih rastlin ter obdelave zbranih podatkov s pomočjo informacijskega sistema MEDPLANT se gradi baza, s pomočjo katere bo mogoče na izbranih območjih ugotoviti potencialen nabor komercialno uporabnih rastlinskih genskih virov in poiskati potencialna rastišča za njihovo gojenje za potrebe farmacevtske in drugih predelovalnih industrij (Baričevič in sod., 2010).

2.4 ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE ZDRAVILNIH RASTLIN

2.4.1 Oksidativni stres

Oksidativni stres je neravnovesje med oksidanti in antioksidanti - v škodo antioksidantov (Sies, 1985; Sies, 1986), ki vodi v poškodbe zunajceličnih in celičnih komponent. Oksidativni stres je vključen v mnoge akutne in kronične bolezni, vključno z rakom ter kardiovaskularnimi in nevrodegenerativnimi boleznimi (Bouayed in sod., 2007; Katalinic in sod., 2006; Aruoma, 1998). Oksidativni stres je tudi eden glavnih vzrokov za staranje celic in organizma.

Prosti radikali v telesu nastajajo neprestano, reaktivne kisikove spojine (ROS) in reaktivne dušikove spojine (RNS) so produkti normalnega celičnega metabolizma in imajo pri nizkih do srednjih koncentracijah različne fiziološke funkcije, od signalne transdukcije, detoksifikacije do imunskega odziva (Valko in sod., 2007, Dastmalchi in sod., 2008). Prosti radikali lahko nastajajo tudi kot posledica dejavnikov okolja: UV in žarkov gama, toplote, kajenja, onesnaženega okolja ali zaradi izpostavljenosti nekaterim snovem in zdravilom (aflatoksini, alkohol, analgetiki, anestetiki, citostatiki itd.) Njihova razpolovna doba je v mili-, mikro- ali nanosekundah (Devasagayam in sod., 2004), količina pa je odvisna od starosti človeka, od načina prehrane in načina življenja.

Koncept pro-oksidativno-antioksidativnega ravnovesja je osnova za razumevanje oksidativnega stresa. Do motenj ravnovesja lahko pride na eni ali drugi strani zaradi nenormalno visokega nastajanja ROS ali zaradi nezadostne antioksidativne obrambe. Glede na dejansko stanje v celicah lahko pričakujemo različen odziv: pri manjših motnjah ravnovesja pride do homeostatskih adaptacij v neposredni bližini izvora stresa, medtem ko obsežne motnje ravnovesja vodijo v nepopravljivo škodo in celično smrt. Meja med normalnimi fiziološkimi in patološkimi spremembami je tako pogosto nejasna (Burton in Jauniaux, 2011).

Definicija oksidativnega stresa je zelo široka, saj je del izida odvisen od celičnega kompartenta, v katerem pride do tvorbe ROS. Reakcije z ROS so pogosto difuzijsko omejene, zato je vpliv na celice v veliki meri odvisen od molekul v neposredni bližini (Burton in Jauniaux, 2011). Znano je, da lahko pride do interakcij med oksidativnim stresom in drugimi oblikami celičnega stresa, kot je npr. stres endoplazmatskega retikula. Klinična manifestacija je tako odvisna od ravnovesja metabolnih aktivnosti v točno določenem celičnem tipu ali organu in lahko variira od sistema do sistema (Burton in Jauniaux, 2011).

2.4.2 Antioksidanti

V človeškem telesu je oksidativno-antioksidativno ravnovesje pomembno, saj vzdržuje integriteto in funkcionalnost celične membrane, proteinov in nukleinskih kislin. Pri zdravem človeku je nivo prostih radikalov reguliran z encimsko obrambo, ki vključuje katalazo, glutation peroksidazo in superoksid dismutazo (SOD) in neencimsko obrambo preko askorbata (vitamin C) in vitamina E (Arouma, 1998). Drugi neencimatski antioksidanti vključujejo še karotenoide, flavonoide in druge polifenole (Devasagayam in sod., 2004).

Čeprav je termin »antioksidant« pogosto uporabljan, je malokrat definiran, definicije pa se razlikujejo glede na področje obravnave in je za kemika drugačna kot za živilskega tehnologa ali zdravnika.

Definicije antioksidantov:

- Antioksidant je spojina, ki ščiti biološki sistem pred potencialno škodljivimi vplivi procesov ali reakcij, ki lahko povzročijo obsežno oksidacijo (Krinsky, 1989).
- Antioksidanti so substance, ki nevtralizirajo proste radikale ali njihove posledice (Sies, 1986).
- Antioksidant je vsaka snov (encimatska ali neencimatska), ki v nizki koncentraciji (v primerjavi z oksidacijskim substratom) upočasni, prepreči ali odstrani oksidativno poškodbo tarčne molekule (Halliwell in Gutteridge, 1989).

Antioksidanti preprečujejo oksidativni stres na različne načine: z lovljenjem prostih radikalov, s keliranjem kovinskih ionov, z odstranjevanjem in/ali popravitom oksidativno poškodovanih biomolekul.

2.4.3 Antioksidativno delovanje zdravilnih in aromatičnih rastlin

Mnoge raziskave kažejo negativno povezavo med uživanjem sadja in zelenjave ter pojavnostjo (tudi smrtnostjo) vrste različnih bolezni kot so rak, kardiovaskularne in nevrološke bolezni, katarakta in disfunkcije oksidativnega stresa (Sies, 1993; Arnao et. al, 2001). Naravni rastlinski antioksidanti lahko predstavljajo del preventive v boju proti oksidativnemu stresu (Dorman in sod., 2003; Kosar in sod., 2005).

Antioksidativno delovanje zelišč in začimb je večinoma povezano s prisotnostjo fenolnih spojin, kot so flavonoidi, fenolne kisline in fenolni monoterpini (Rice-Evans in sod., 1996, Zheng in Wang, 2001; Capecka in sod., 2005; Ribeiro in sod., 2001). Antioksidativna aktivnost fenolov v rastlinah je posledica njihovih redukcijsko oksidacijskih lastnosti in kemijske strukture, ki ima pomembno vlogo v nevtralizaciji prostih radikalov, kelaciji

prehodnih kovin, inaktivaciji reaktivnih kisikovih spojin (ROS) (Chun in sod., 2005; Rice-Evans in sod., 1996). Antioksidativno delovanje zelišč na viabilne celice lahko razložimo z dvema mehanizmoma: z neposrednim antioksidativnim delovanjem z lovljenjem radikalov in s posrednim antioksidativnim delovanjem preko indukcije antioksidativnih encimov ter zaščito medceličnih komunikacij (Chun in sod., 2005).

Čeprav so za antioksidativno delovanje rastlin pogosto odgovorni fenoli, pa povezava med vsebnostjo fenolnih spojin in antioksidativno aktivnostjo ni vedno jasna: nekatere raziskave so pokazale močno linearno odvisnost med obema spremenljivkama (npr. Katalinic in sod., 2006), medtem ko pri drugih povezava ni bila očitna (Capecka in sod., 2005). V raziskavi Wojdila in sod. (2007) je bila močna linearna povezava prisotna le pri eni (Lamiaceae) od 19 raziskovanih družin.

2.4.3.1 Antioksidativno delovanje ustnatic

Mnoge raziskave zdravilnih rastlin in začimb so pokazale, da imajo zelo velik antioksidativni potencial nekatera zelišča in začimbe iz družine ustnatic (Lamiaceae), ki se stoletja uporabljajo v zdravilstvu in prehrani. Najbolj raziskana sta žajbelj (*Salvia officinalis* L.) in rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.), ki tudi veljata za zelišči z najvišjo antioksidativno aktivnostjo, nekatere njune fenolne spojine so pokazale veliko sposobnost lovljenja različnih prostih radikalov (Santos-Gomes in sod., 2002). Veliko raziskav je opravljenih tudi na meti (*Mentha x piperita* L.) in melisi (*Melissa officinalis* L.) ter materini dušici (*Thymus* spp.) in navadni dobri misli (*Origanum vulgare* L.), manj pa na šetraju (*Satureja* spp.), še posebej na kraškem (*Satureja montana* L.).

Najpomembnejše spojine, ki prispevajo k antioksidativni aktivnosti ustnatic so: karnozol, rožmarinska, karnozolna in kavna kislina pri žajblju (Cuvelier in sod., 1996), timol in karvakrol pri materini dušici in navadni dobri misli (Yanishlieva in sod., 1999; Fecka in Turek, 2008), rožmarinska kislina pri melisi (Dastmalchi in sod., 2008).

Rožmarinska kislina (ester kavne kisline in α -hidroksi dihidrokavne kisline) je najpomembnejša spojina z antioksidativnim delovanjem pri zeliščih in začimbah iz družine ustnatic (Lamiaceae). Zeng in Wang (2001) sta ugotovila, da je rožmarinska kislina najpogostejša fenolna kislina v acetonskih ekstraktih žajblja, navadne dobre misli in materine dušice, medtem ko so v ekstraktih rožmarina najbolj pogosti diterpenski derivati karnozolna kislina in rozmanol ter še nato rožmarinska kislina. Chen in Ho (1997) sta pokazala, da so poleg rožmarinske kisline za nevtralizacijo prostih radikalov pomembne tudi druge fenolne kisline, kot so kavna, klogenska in ferulna.

Dokazano je, da je antioksidativno delovanje rastlin (rastlinskih drog) odvisno od mnogih dejavnikov: od rastišča in razmer, v katerih je rasla rastlina, od razvojne faze rastline, časa

nabiranja, načina sušenja in shranjevanja (Cuvelier in sod., 1996) ter od priprave ekstraktov (uporaba specifičnih topil, čas ekstrakcije, temperatura ekstrakcije) in lastnosti testnega sistema (Li in sod., 2007).

Večina raziskav antioksidativne aktivnosti ali kemijske sestave ustnatic poteka na ekstraktih rastlin, pridobljenih z organskimi topili (najpogosteje metanol ali aceton). Takšni ekstrakti vsebujejo tudi nekaj eteričnega olja, torej tudi derivate monoterpenov, kot sta npr. timol in karvakrol, ki sta znani spojini z antioksidativnim delovanjem in dajeta tem vrstam značilno aromo (Dorman in sod., 2003). Rezultati vodnih ali etanolnih ekstraktov (ki se uporabljajo za industrijske namene, ker so morebitni ostanki topila manj strupeni kot metanolni) lahko dajo povsem drugačne rezultate, saj je sestava ekstrakta odvisna od izbranega topila in polarnosti učinkovin. Raziskovanje vodnih ekstraktov je primernejše kadar preučujemo vpliv antioksidantov v vsakdanji prehrani ljudi (Rodriguez-Meizoso in sod., 2006).

Pogosto nejasno (dvoumno) povezavo med vsebnostjo določenega antioksidanta in antioksidativno aktivnostjo je težko pojasniti samo na osnovi kvantitativnih analiz. Na razlike v antioksidativni aktivnosti rastlinskih ekstraktov ne vpliva samo vsebnost določenega antioksidanta, temveč tudi sinergistični vplivi med njimi in drugimi rastlinskimi spojinami (Capecka in sod., 2005).

2.4.3.1.1 Raziskave antioksidativnega delovanja ustnatic

V testu DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), ki so ga opravili Erkan in sodelavci (2008), je imel metanolni ekstrakt rožmarina nižji antioksidativni potencial (IC_{50} 54 μ M) od standarda rožmarinske kisline (IC_{50} 72.3 μ M) in večji od standarda karnozolne kisline (IC_{50} 33 μ M), medtem ko je imel v isti raziskavi pri testu ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin(-6-žveplova kislina)) metanolni ekstrakt rožmarina večji antioksidativni potencial od obeh standardov (IC_{50} 15 μ M), aktivnost karnozolne kisline pa je bila večja (IC_{50} 5.9 μ M) od aktivnosti rožmarinske kisline (IC_{50} 3.7 μ M).

Wojdilo in sod. (2007) so raziskovali 80% metanolne ekstrakte 32 izbranih rastlin iz različnih družin s testi FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), DPPH in ABTS. Pri testu FRAP sta imela največjo redukcijsko moč izmed vseh 32 rastlin ekstrakta materine dušice in rožmarina. Melisa v tej raziskavi ni imela tako visoke aktivnosti, medtem ko je imel v raziskavi Katalinica in sod. (2006) vodni ekstrakt v enakem testu med 70 rastlinami daleč največjo redukcijsko moč.

Capecka in sod. (2005) so raziskovali antioksidativno delovanje 80% metanolnih ekstraktov svežega in suhega materiala mete, melise in navadne dobre misli. Sposobnost lovljenja DPPH radikala je bila pri vseh ekstraktih visoka (presejala 90% učinkovitost po

5 minutah), razen pri suhem vzorcu navadne dobre misli, kjer je bila aktivnost manjša (84% v 5 minutah). Tako ekstrakti posušenih kot svežih vzorcev melise in mete so dosegli maksimum delovanja po 1 minuti, pri navadni dobri misli pa je bila aktivnost nižja pri ekstraktih iz suhega materiala. Med sušenjem pride pri navadni dobri misli in meti do povečanja celokupnih fenolov, medtem ko pri melisi ni bilo značilnih razlik med svežim in suhim rastlinskim materialom.

Dorman in sod. (2003) so raziskovali antioksidativno aktivnost vodnih ekstraktov (brez hlapne frakcije z monoterpeni) štirih najpogosteje uporabljanih vrst ustnatic: rožmarina, žajblja, navadne dobre misli in materine dušice s testi FRAP, DPPH, ABTS in OH (hidroksilni radikal). Pri testih DPPH in ABTS sta največje protiradikalno delovanje imela rožmarin in žajbelj, ki sta imela največjo celokupno vsebnost fenolov, sledila je navadna dobra misel in šele nato materina dušica z najmanjšo celokupno vsebnostjo fenolov. Pri testu z OH radikalom pa sta imela rožmarin in materina dušica primerljivo delovanje, zato avtorji zaključujejo, da učinkovitost ni odvisna samo od celokupne vsebnosti fenolov, čeprav so imeli ekstrakti z višjo celokupno vsebnostjo fenolov boljše protiradikalno delovanje.

2.4.4 Določanje antioksidativnega delovanja

Antioksidativna aktivnost je lahko inducirana z mnogimi faktorji, ki ne morejo biti razloženi le z eno metodo evalvacije, zato je potrebno izvesti več različnih testov za določanje antioksidativne aktivnosti, da zajamemo vse možne mehanizme (Li in sod., 2007; Dastmalchi in sod., 2007).

Teste za ugotavljanje antioksidativnega potenciala lahko razdelimo na teste sposobnosti lovljenja prostih radikalov (posredne metode) in teste sposobnosti inhibicije lipidne oksidacije pod posebnimi pogoji (neposredne metode). Pri posrednih (indirektnih) metodah raziskujemo sposobnost antioksidantov za lovljenje prostih radikalov, ki niso povezani z oksidacijsko razgradnjo. V ta namen so uporabni stabilni obarvani prosti radikali z intenzivno absorpcijo v vidnem delu spektra, s katerimi določamo sposobnost antioksidanta, da odda vodikov atom. S tem ne določimo neposredne antioksidativne aktivnosti, čeprav včasih sposobnost oddajanja vodika korelira s pravo antioksidativno aktivnostjo. Neposredne (direktne) metode pa temeljijo na preučevanju vpliva dodanega antioksidanta na potek verižne oksidacije določenega substrata (lipidi, proteini, DNK) s prostimi radikali (Roginsky in Lissi, 2005).

V uporabi je več kot 20 metod za določanje antioksidativne kapacitete, vendar so izmerjene vrednosti različne, nezmožnost primerjave rezultatov med različnimi metodami pa velika pomanjkljivost (Stratil in sod., 2007). Določene razlike v antioksidativni aktivnosti med primerljivimi študijami lahko pripišemo genotipskim in okoljskim razlikam

med vrstami/podvrstami rastlin, delu rastline, ki jo raziskujemo, času/sezoni pobiranja (Kaefer in Milner, 2008).

Najbolj pogosto se uporablja spektrofotometrično spremljanje zmanjšanja vsebnosti naravnih ali sintetičnih prostih radikalov v rastlinskih ekstraktih (Samarth in sod., 2008). Čeprav ima vsaka metoda svoje prednosti in slabosti, med najbolj pogosto uporabljani in zanesljivi spadata metodi DPPH in ABTS (Krisnaiah in sod., 2011). V hidrofilnem mediju pa so najpogosteje uporabljane metode TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), FRAP in DPPH (Stratil in sod., 2007).

2.4.4.1 Metoda DPPH[·]

DPPH[·] (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) je relativno stabilen organski radikal, ki je široko uporaben za determinacijo antioksidativne aktivnosti posamezne komponente ali različnih rastlinskih ekstraktov (Kurosumia in sod., 2007). Deluje lahko kot oksidirajoč substrat in je hkrati indikatorska molekula reakcije (Dastmalchi in sod., 2007), saj po redukciji alkoholne raztopine DPPH[·] ob prisotnosti H-donorskega antioksidanta, spremeni barvo iz vijolične v rumeno (Kurosumia in sod., 2007). Aktivnost lovljenja radikalov se določi spektrofotometrično glede na spremembo absorbance zaradi zmanjšanja DPPH[·] v primerjavi s kontrolnim vzorcem (Kurosumia in sod., 2007). Raztopina DPPH[·] je rožnato obarvana in ima visok absorpcijski vrh pri 515/517 nm. Razbarvanje je stehiometrično povezano s stopnjo redukcije (Lu in Yeap Foo, 2001).

Metoda DPPH[·] prostega radikala je bila prvič opisana leta 1958 (Blois), kasneje pa so jo modificirali mnogi raziskovalci in je danes najbolj pogosto uporabljana metoda za ocenjevanje aktivnosti lovljenja prostih radikalov naravnih produktih (Lu in Yeap Foo, 2001; Dastmalchi in sod., 2007; Capecka in sod., 2005). Test z DPPH[·] je hiter, natančen in preprost, lahko se uporablja za trdne in tekoče vzorce in ni specifičen za določene antioksidante. Za testiranje zadostujejo že majhne količine vzorca, test ne zahteva posebnih predpriprav, dragih reagentov in posebne opreme.

Ker je DPPH[·] eksogeni radikal, determinacija AA s tem testom le malo odraža biološko stanje. DPPH[·] se lahko topi le v organskih medijih, posebno v etanolu, kar je lahko pomembna ovira pri interpretaciji vloge hidrofilnih antioksidantov.

2.4.4.2 TEAC test (ABTS^{·+} prosti radikal)

Določanje antioksidativne aktivnosti z ABTS^{·+} radikalom je alternativna metoda DPPH[·]. ABTS^{·+} (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin(-6-žveplova kislina))) je srednje stabilen radikal z

dušikom v centru. Dobro je topen v vodnem in organskem mediju in lahko meri hidrofilne in lipofilne komponente vzorcev. Tvori se pri oksidaciji ABTS s kalijevim persulfatom ali manganovim dioksidom, reducira pa v prisotnosti H-donorskega antioksidanta (Rice-Evans in Miller, 1994).

ABTS test premaga omejitve prejšnje metode (topnost in problemi s spektralno interferenco). $ABTS^{\cdot+}$ model je primeren tako za polarne kot nepolarne vzorce, spektralna interferenca je zmanjšana, saj valovna dolžina absorpcijskega maksimuma pri 760 nm ne interagira z naravnimi produkti (Re in sod., 1999). S pomočjo te metode je tudi mogoče spremljati aktivnost vzorca preko določenega časovnega obdobja.

Metoda temelji na redukciji $ABTS^{\cdot+}$ v ABTS po dodatku antoksidanta. Obseg razbarvanja kot procent inhibicije $ABTS^{\cdot+}$ radikala ustreza koncentraciji antioksidanta, ki je določen relativno glede na reaktivnost standarda Troloksa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametikroman-2-karboksilna kislina), ki je vodotopni analog vitamina E in se uporablja kot referenčna spojina v testih antioksidativnega delovanja. Antioksidativna aktivnost je izražena kot TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) (Ivanova in sod., 2005). TEAC je milimolarna koncentracija Troloksa z enako antioksidativno aktivnostjo, kot jo ima 1.0 mM raztopina substrata, ki ga raziskujemo (Rice Evans in Miller, 1994).

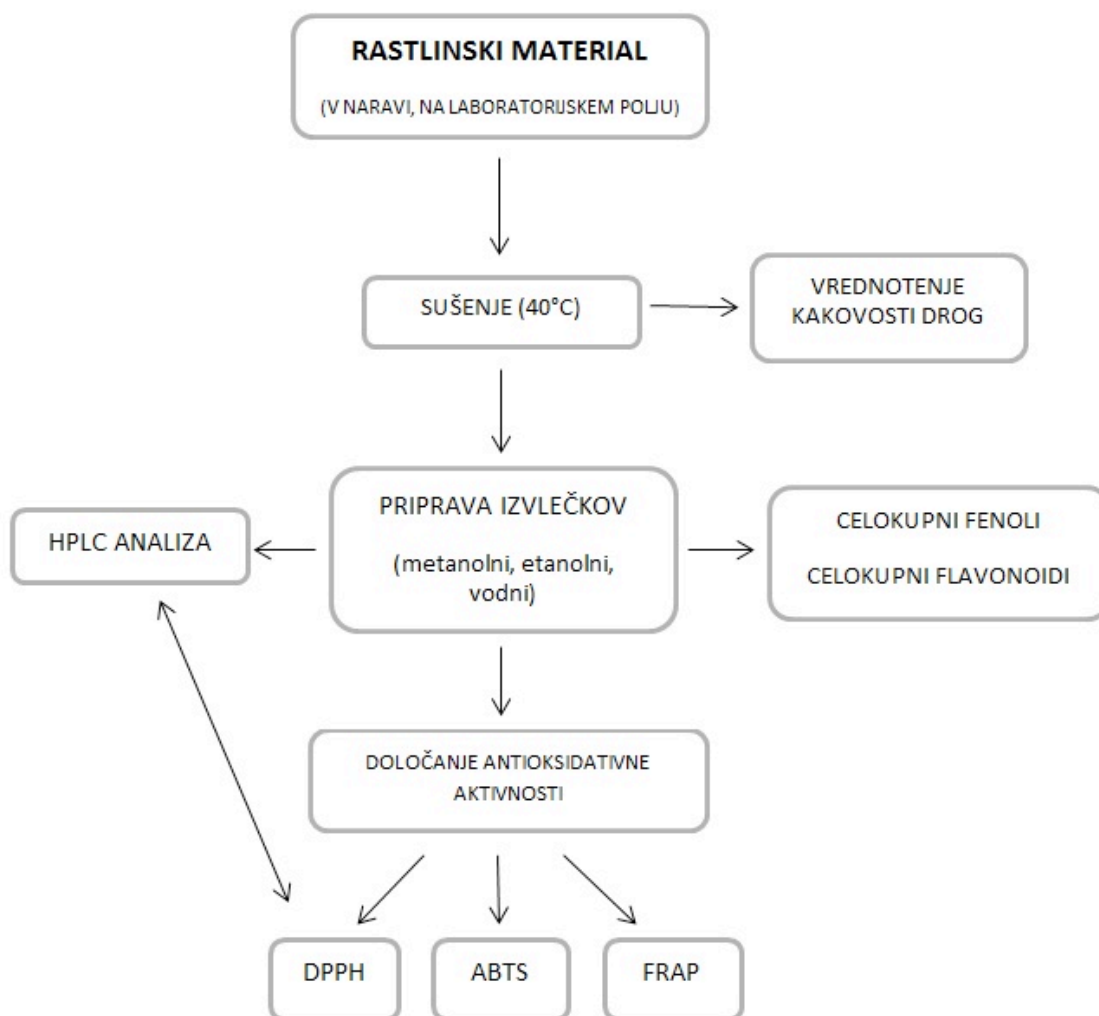
Slabost te metode je, da razbarvanje ni linerarno odvisno od koncentracije določenega antioksidanta (npr. kvercetin), poleg tega tudi druge komponente lahko prispevajo del antioksidativne kapacitete določene s TEAC metodo, hkrati pa verjetno nimajo vse polifenolne spojine $ABTS^{\cdot+}$ lovilne aktivnosti (Ivanova in sod., 2005).

2.4.4.3 FRAP metoda (redukcija Fe(III) v Fe(II))

Antioksidativna aktivnost je povezana z redukcijsko močjo. Metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) temelji na redukciji feroinskega analoga Fe^{3+} kompleksa tripiridiltriazin $Fe(TPTZ)^{3+}$ v intenzivno modro obarvan Fe^{2+} kompleks $Fe(TPTZ)^{2+}$ z antioksidanti v kislem mediju. Redukcijska aktivnost se določi spektrofotometrično z meritvijo absorbance reakcijske mešanice (Dastmalchi in sod., 2007; Li in sod., 2007). Metoda je preprosta in daje hitre rezultate, lahko se uporablja tako v vodnih kot alkoholnih ekstraktih rastlin (Li in sod., 2007). Rezultat redukcije je predstavljen različno glede na uporabljen protokol. Metoda po Oyaizu (1986, cit. Dastmalchi in sod., 2007) meri absorbanco pri 700 nm in poda rezultat kot mmol ekvivalenta askorbinske kisline (AscE)/g vzorca. Višja je AscE vrednosti, večja je moč doniranja elektronov. Metoda po Benzie (1996, cit. Li in sod., 2007) pa meri absorbanco pri 593 nm in poda rezultat kot μ mol FE(II)/g suhe teže rastlinskega materiala.

3 MATERIALI IN METODE

Doktorsko delo ima dva sklopa raziskav. Prvi obsega vrednotenje kakovosti rastlinskih drog, drugi pa se osredotoča na določanje antioksidativnega potenciala teh drog.



Slika 1: Hodogram metod, uporabljenih v doktorskem delu

Figure 1: The hodogram of methods used in doctoral dissertation

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

V raziskavo so bile vključene 4 vrste iz družine ustnatic: žajbelj (*Salvia officinalis* L.), kraški šetraj (*Satureja montana* L.), melisa (*Melissa officinalis* L.) in materina dušica (*Thymus* spp.). Rastlinski material je bil nabran v okolici Socerba, Divače in Petrinj poleti 2009 in 2010 (Preglednica 2).

Preglednica 2: Seznam raziskovalnih ploskev, rastlinskih vrst in oznak akcesij

Table 2: List of sampling localities, plant species and accession numbers

Oznaka ploskve	Kraj	Koordinate	Raziskovana vrsta
N 25	Socerb	E 411996 N 5050126 415 m.n.v.	<i>Satureja montana</i>
N 27	Socerb, severovzhodno od gradu	E 412310 N 5050780 430 m.n.v.	<i>Satureja montana</i>
N 30	Socerb, vrh Kras, južno od pokopališča	E 411537 N 5049460 339 m.n.v.	<i>Satureja montana</i>
N 46	Škrljevica pri Senožečah	E 424080 N 5046310 554 m.n.v.	<i>Satureja montana</i>
N 36	Petrinjski kras, Petrinje, zahodno od ceste proti Črnotičam, proti vrhu Gavnik	E 414575 N 5048140 450 m.n.v.	<i>Salvia officinalis</i>
N 50	Petrinjski kras: cca. 1 km južno od Petrinj (Soligrad)	E 414930 N 5047500 464 m.n.v.	<i>Salvia officinalis</i>
N 32	Gorenje pri Divači: cca. 500 m severno od vasi	E 418375 N 5061810 395 m.n.v.	<i>Thymus</i> spp.
N 48	Divaški Gabrk: cca. 1 km severovzhodno od kraja Divača in 200 m vzhodno od avtoceste	E 421000 N 5061230 435 m.n.v.	<i>Thymus</i> spp.
BF EXP	Laboratorijsko polje, Ljubljana, Jamnikarjeva 101	S: 46°2'54" V: 14°28'30,37" 292 m.n.v.	<i>Satureja montana</i> (25, 27, 30, 46), <i>Thymus</i> spp. (32, 48), <i>Melisa officinalis</i> (BF29; <i>Citronella</i>)

Rastline istih genskih virov so bile vzgojene iz semen, ki so bila nabrana leta 2006 in 2007. Posejane in vzgojene so bile v rastlinjaku BF, nato pa presajene na laboratorijsko polje BF oziroma v gensko banko zdravilnih rastlin pri BF.

3.1.1 Žajbelj (*Salvia officinalis* L.)

Vzorci žajblja smo nabrali v okolici Petrinj, kjer je večje naturalizirano rastišče žajblja. Izbrali smo dve rastišči (po namembnosti sta obe rastišči pašnik): rastline na ploskvi 36 so bile mlajše, grmički so bili nizki, stebela niso bila olesenela; rastline na ploskvi 50 pa so bile starejše, z večjimi grmički, olesenelimi stebelci, listi so bili manjši, tudi njihovo število na rastlini je bilo manjše.

Material smo nabrali leta 2009 in 2010, pred, med in po cvetenju. Nabrali smo tudi semena za gensko banko, vendar nam kljub večkratnemu poskušanju ni uspelo vzgojiti žajblja istih akcesij za gojenje na eksperimentalnem polju Biotehniške fakultete na Jamnikarjevi 101. Semena so zelo slabo kalila ali pa sploh ne; sejanci pa so bili neodporni in so propadli že pred sajenjem na prosto.

3.1.2 Kraški šetraj (*Satureja montana* L.)

Vzorci kraškega šetraja smo nabrali 6.8. 2009 na 3 ploskvah v okolici Socerba (travniki oz pašniki) in na eni v okolici Senožec (travnik). Rastline so bile v fazi cvetenja. Iz nabranih semen smo vzgojili rastline za gojenje na eksperimentalnem polju BF. Material z laboratorijskega polja je bil nabran julija 2009, ko so bile rastline v polnem razcvetu.

3.1.3 Melisa (*Melisa officinalis* L.)

Ruderalno rastišče melise je bilo opisano v okviru popisovanja zdravilnih in aromatičnih rastlin, in sicer v okolici Socerba (E 411390, N5050173, 374 m.n.v) leta 2006. Nabrana semena so shranjena v genski banki zdravilnih in aromatičnih rastlin BF pod oznako BFL 29-001/2006. Meliso smo vzgojili in posadili na laboratorijsko polje PF, vendar pa smo izgubili vir v naravi, saj je bilo rastišče v vmesnem času uničeno (zazidano). Vzorci, ki so bili nabrani na eksperimentalnem polju, smo primerjali s standardnim kultivarjem *Melissa officinalis* 'Citronella', ki prav tako raste na eksperimentalnem polju.

3.1.4 Materina dušica (*Thymus spp.*)

Materino dušico smo nabrali na dveh ploskvah v okolici Divače, in sicer 6.8.2009 in 25.5.2010.

3.2 NABIRANJE IN SUŠENJE RASTLINSKEGA MATERIALA

Material smo nabirali v lepem, suhem in sončnem vremenu v papirnate vrečke. Sveže vzorce smo stehali, nato pa jih sušili v sušilniku na maksimalni temperaturi 40°C do konstantne mase. Do analiz smo jih shranili na temnem, suhem in hladnem mestu, zaščitenem pred vlago in žuželkami.

3.3 METODE VREDNOTENJA KAKOVOSTI RASTLINSKIH DROG

Na materialu zdravilnih rastlin ne sme biti vidnih znakov kontaminacije s plesnijo, žuželkami in drugimi živalskimi kontaminanti, vključno z živalskimi iztrebki. Kakovost rastlinskih drog smo vrednotili po predpisih Evropske farmakopeje, ki natančno predpisuje teste in mejne vrednosti različnih parametrov, ki so odvisni od rastlinske vrste. Za drogo žajblja (*Salviae folium*), melise (*Melissae folium*), materine dušice (*Serphylli herba*) so pripravljene monografije v Ph Eur, droge šetraja pa Evropska farmakopeja ne vsebuje, zato smo poiskali druge vire (ISO standard). Podobno smo si tudi pri določenih testih pomagali še z drugimi monografijami (ISO, WHO).

Pri vrednotenju kakovosti rastlinskih drog določamo vsebnost vode, vsebnost pepela, vsebnost eteričnega olja in izvedemo predpisane teste.

3.3.1 Določanje tujih primesi

Tuje primesi so lahko tuji organi (deli rastlin, ki ne ustrezajo defciniji droge) ali tuji elementi (snovi, ki niso del preiskovane rastline; lahko so rastlinskega, živalskega ali mineralnega izvora – pesek, zemlja, prah). Za določanje tujih primesi v celi ali rezani drogi je primerna makroskopska determinacija, medtem ko je pri uprašenem materialu nujna mikroskopska determinacija.

Postopek

Vsebnost tujih primesi smo določali makroskopsko. Vzorce droge smo razprostrli v tanki plasti, ga pregledali in izločili tuje primesi in organe. Njihov delež smo določili glede na celotno maso suhega vzorca (Ph Eur 6).

Formula za izračun vsebnosti tujih primesi, podane kot masni delež(%)

$$100 * m_x / m_0 \quad \dots (1)$$

kjer je:

m_x - masa tujih primesi (g)

m_0 - masa suhega rastlinskega vzorca (g)

3.3.2 Določanje vsebnosti vode

Presežek vode v rastlinskem materialu spodbudi rast mikroorganizmov, prisotnost gliv in žuželk ter kvarjenje zaradi hidrolize. Mejne vsebnosti vode naj bi bile podane za vsak rastlinski material, kar je posebej pomembno pri materialu, ki zlahka absorbira vlago ali se hitro pokvari ob prisotnosti vode.

Azeotropna metoda je neposredna meritev vode prisotne v preiskovanem vzorcu. Če vzorec destiliramo skupaj s topilom, ki se ne meša z vodo, kot je npr. toluen ali ksilen, topilo absorbira vodo prisotno v vzorcu. Voda in topilo se destilirata skupaj in se, ko se ohladita, ločita v sprejemni cevki, kjer odčitamo vsebnost vode. Če je topilo brezvodno, voda lahko ostane vezana nanj in dobimo napačne rezultate, zato je priporočljivo topilo pred uporabo nasičiti z vodo.

Farmakopeja predpisuje določanje vsebnosti vode z azeotropsko metodo pri drogi žajblja, za šetraj to metodo določa ISO standard (ISO 7928-1), medtem ko se pri melisi in materini dušici določa vlago z metodo izgube vode pri sušenju (Ph Eur 6).

Zaradi velike porabe toksičnih organskih topil (200 ml toluena na vzorec), smo se odločili, da vsebnost vode pri vseh vzorcih določimo z metodo izgube vode pri sušenju. Pri tej metodi sušimo zmlet rastlinski material na 105°C, pri čemer hlapijo poleg vode tudi morebiti prisotna hlapna olja, vendar smo predpostavili, da je prispevek mase izhlapelega eteričnega olja zanemarljiv in ne vpliva bistveno na končni rezultat.

Postopek

Vzorci smo sušili v tehtičih, ki smo jih predhodno oprali, posušili in stehtali. V vsakega smo dali približno 2 g zmlatega vzorca in jih ponovno stehtali. Odprte smo sušili v sušilniku na 105 °C čez noč do konstantne mase. Po sušenju smo tehtiče zaprli, jih prestavili v eksikator, da so se ohladili in hladne ponovno stehtali.

Izračun izgube vode pri sušenju, podane kot masni delež (5):

$$100 * (m_0 - m_1) / (m_0 - m_T) \quad \dots (2)$$

kjer je:

m_0 - masa tehtiča in vzorca (g)

m_1 - masa tehtiča in osušenega vzorca (g)

m_T - masa tehtiča (g)

3.3.3 Določanje celokupnega pepela

Metoda celokupnega pepela determinira celokupno količino materiala, ki ostane po žganju. Vključuje fiziološki pepel, ki izhaja iz rastlinskega tkiva, in nefiziološki pepel, ki je ostanek tujih primesi (npr. peska ali zemlje) na površini rastlinskega materiala.

Silikatni ali platinast talilni lonček smo segrevali do rdečega žarenja v peči pri temperaturi 550°C, pustili, da se ohladi v eksikatorju in stehtali. Zatehtali smo 2-4 g osušenega vzorca in ponovno stehtali. Sledil je sežig na sežigalniku, dokler se ni pojavilo rdeče žarenje. Potem smo lončke postavili v peč na 550°C in jih čez noč žarili do konstantne mase. Po končanem žarenju smo vzorce ponovno ohladili v eksikatorju in jih stehtali. Pazili smo, da v nobeni fazi ni prišlo do tvorbe plamenov.

Izračun vsebnosti pepela, podan kot masni delež (%):

$$100 * (m_1 - m_{TL}) / (m_0 - m_{TL}) \quad \dots (3)$$

kjer je:

m_0 - masa talilnega lončka in osušenega vzorca (g)

m_1 - masa talilnega lončka in ostanka po žarenju (g)

m_{TL} - masa pripravljene talilnega lončka (g)

3.3.4 Določanje v kislini netopnega pepela

V kislini netopni pepel je ostanek, ki ga dobimo po vrenju celokupnega pepela v razredčeni klorovodikovi kislini in zažigu preostalih netopnih snovi. Metoda določa prisotnost kremenca.

V talilni lonček s celokupnim pepelom smo dodali 15 ml 10% HCl, pokrili z urnim steklom in pustili mešanico vreti v peščeni kopeli 10 minut. Nato smo jo ohladili. Ohlajeno vsebino smo prefiltrirali preko brezprašnega filtra v erlenmajerice, ostanek smo spirali s segreto deionizirano vodo, dokler filtrat ni bil brezbarven. Po spiranju smo brezprašne filtre zložili v talilne lončke, jih ponovno postavili na sežigalnik in vsebino zažgali. Čez noč smo jih žarili v peči na 550°C, jih ohladili v eksikatorju in stehali.

Izračun vsebnosti v HCl netopnega pepela, podane kot masni delež (%):

$$(m_1 - m_{TL}) / (m_0 - m_{TL}) * 100 \quad \dots (4)$$

kjer je:

m_0 - masa talilnega lončka in absolutno suhega vzorca (g)

m_1 - masa talilnega lončka in ostanka po determinaciji pepela (g)

m_{TL} - masa pripravljene talilnega lončka (g)

3.3.5 Določanje vsebnosti eteričnega olja

Vsebnost eteričnih olj rastlinskih drog se določi z vodno destilacijo v posebni aparaturi (Clevenger) in pod določenimi pogoji. Destilat se zbere v graduirani cevki, organsko topilo ksilen privzame eterično olje (EO), vodna faza pa se avtomatsko vrne v destilacijsko posodo.

Pred uporabo smo aparature temeljito očistili z zaporednim spiranjem z acetonom ali primernim detergentom, potem sprali z vodo, posušili in shranili na primerno mesto.

Priprava vzorca

Priprava vzorcev je bila odvisna od teksture materiala in mesta zbiranja hlapnih olj. Debele liste žajblja smo tik pred destilacijo grobo narezali in zmečkali, drogo materine dušice in šetraja (oboje *herba*) smo grobo narezali. Pri kraškem šetrajju smo dele zeli, kjer je bil premer stebela večji od 5 mm zavrgli.

Določanje vsebnosti eteričnega olja

Aparatura za določanje vsebnosti eteričnih olj je sestavljena iz:

- a. primerne bučke s kratkim vratom in notranjim premerom na širšem delu približno 29 mm
- b. kondenzorja, ki se prilega bučki (različni deli so spojeni skupaj, uporabljeno steklo ima nizek koeficient raztezanja):
 - cev K ima odprtino premera približno 1 mm, kar ustreza čepu K' (ki je ventil); širok del cevi K je iz motnega stekla in ima notranji premer 10 mm
 - razširitev hruškaste oblike J ima kapaciteto 3 ml
 - graduirana cev JL (kalibrirana na 0,01 ml)
 - razširitev žarničaste oblike L ima kapaciteto približno 2 ml
 - tristranski ventil M
 - povezava B je 20 mm višje kot najvišja stopnja graduirne cevke
- c. primerne vira toplote, ki omogoča natančno kontrolo

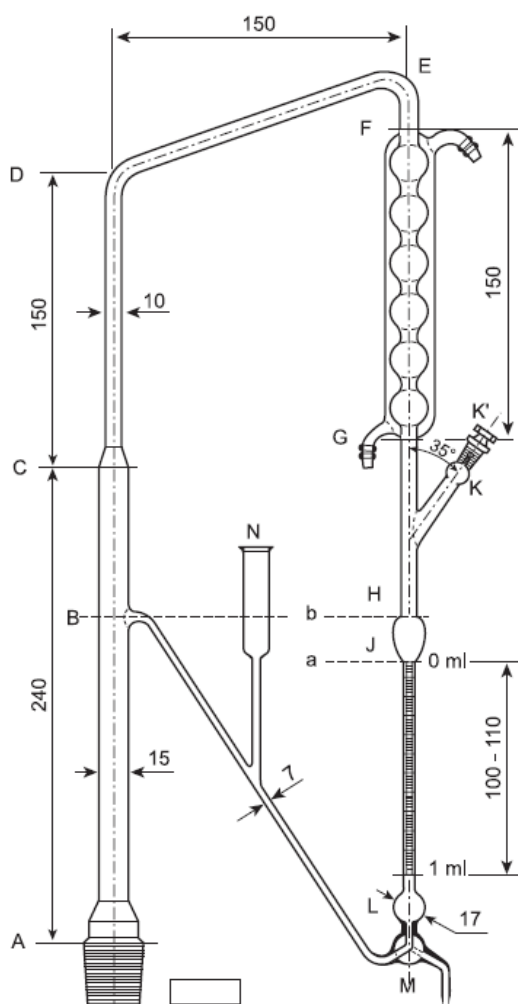
Metoda

Osnovno metodo, ki je predpisana v farmakopeji, smo modificirali, tako da smo izpustili uporabo ksilena, saj smo želeli pridobiti čista eterična olja primerna za nadaljnje analize. Ksilen je nepolarno organsko topilo, ki prevzame vse hlapne frakcije, tudi tiste, ki bi se nabrale na steklu.

V destilacijsko bučko smo dali ustrezno maso predpripravljenega vzorca in dolili destilacijsko tekočino (destilirana voda). Bučko smo pripeli na Clevengerjev aparat in namestili nad grelec. Skozi odprtino N (glej sliko 2) smo nalili destilirano vodo, da je bil

nivo na obeh delih aparature uravnan. Kondenzor smo priklopili na vodo. Bučko smo segrevali, ko je vsebina zavrela in smo opazili prvo kapljico v kondenzorju, smo začeli šteti čas destilacije, ki je predpisan za posamezno drogo. Hitrost destilacije smo uravnavali tako, da se droga ni pregrevala. Po končani destilaciji, smo grelec ugasnili in po desetih minutah odčitali volumen eteričnega olja v graduirani cevki. Rezultat smo izrazili v ml/kg droge. Eterična olja smo shranili v temnih vialah v hladilniku.

Drogo žajblja smo destilirali v 500 ml bučki, dodali smo 20 g vzorca, 250 ml destilirane vode in destilirali 2 uri. Drogo materine dušice smo destilirali v 1000 ml bučki, in sicer 50 g vzorca smo dodali 500 ml destilirane vode, 2 uri. Drogo šetraja smo destilirali po priporočilih ISO standarda v 1000 ml bučki; 40 g vzorca smo dodali 600 ml destilirane vode in destilirali 5 oz. 3 ure.



Slika 2: Clevenger aparat za določanje vsebnosti eteričnih olj v rastlinskih drogah (mere v milimetrih)

Figure 2: Clevenger apparatus for determination of essential oil content in herbal drugs (dimensions in millimeters)

3.4 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA

3.4.1 Priprava vzorcev

Posušene vzorce smo zmleli v vodno hlajenem analiznem mlinčku in jih do uporabe shranili v temnih stekleničkah pri sobni temperaturi.

3.4.2 Priprava rastlinskih izvlečkov

Pripravili smo etanolne (40-, 70- in 96%), metanolne (40-, 80- in 100%) in vodne izvlečke. Ekstrakcija je potekala v zatemnjenem laboratoriju pri sobni temperaturi. V centrifugirke smo zatehtali 500 mg zmlete droge, dodali 5 ml topila, centrifugirke zatesnili s parafilmom, jih za 15 minut postavili v ultrazvočno kopel (Iskra) ter jih nato 15 minut centrifugirali na 4200 obratov/minuto. Supernatant smo odpipetirali v temne stekleničke, ki smo jih takoj zaprli in prekrili, da so bile v temi, ekstrakcijo pa ponovili z enakim volumnom topila. Oba supernatanta smo združili, prefiltrirali preko membranskega filtra (0,45 µm membranski filter; cellulose acetate filter, Sartorius AG) in shranili v več temnih vial za vsak test posebej, tako da smo vedno imeli na razpolago svež vzorec, ki še ni bil izpostavljen svetlobi, sobni temperaturi in drugim dejavnikom, ki bi vplivali na stabilnost spojin v izvlečku. Do analiz so bili izvlečki shranjeni pri -20°C.

3.4.3 Metoda DPPH

Test z DPPH temelji na redukciji redukcijskega alkohola raztopine radikala DPPH[•] v prisotnosti H-donirajočega antioksidanta.

Priprava raztopine DPPH

Pripravili smo 1 mM raztopino DPPH, ki mora biti sveže pripravljena vsak dan, med analizami pa shranjena v temi in na ledu. Tik pred analizami smo vzorce primerno redčili z ustreznim topilom. Test smo izvajali na 96-luknjičastih mikrotitrskih ploščah. V vsako luknjico smo dali vzorec (50 µl, če je bil vzorec metanolni in 100 µl, če je bil vzorec etanolni ali vodni) in 100 µl 1 mM DPPH raztopine. Nanesli smo tudi pozitivno kontrolo (Troloks) in slepi vzorec (topilo, v katerem je bil pripravljen vzorec). Ploščice smo inkubirali v temi, pri sobni temperaturi in po 30 minutah pomerili absorbcijo pri 520 nm (spektrofotometer MRX; Dynex Technologies, Virginia, ZDA).

Rezultate smo izrazili kot TEAC vrednost (mM Troloks/g suhe snovi) s pomočjo standardne krivulje s Troloksom. Vse meritve so bile narejene v triplikatih.

3.4.4 Metoda ABTS

Analizo sposobnosti lovljenja prostega radikala ABTS^{•+} smo povzeli po metodi, ki jo je opisal Re s sodelavci (1999).

Priprava raztopine /radikala ABTS^{•+}

Raztopino ABTS^{•+} smo pripravili 12-16 ur pred analizami tako, da smo najprej pripravili 0,7 mM vodno raztopino ABTS^{•+}. Ko se je ABTS^{•+} raztopil, smo dodali kalijev persulfat, da je bila končna koncentracija 2,45 mM. Raztopino smo inkubirali v temi in pri sobni temperaturi do analiz. Pred analizami smo raztopino ABTS^{•+} redčili z absolutnim etanolom in umerili absorbanco pri 734 nm na vrednost 0,7 +/- 0,02.

Meritve vzorcev

Test smo izvedli v 4 ml kivetah (spektrofotometer Lambda Bio 20 UV-visible spectrophotometer, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Vzorce smo tik pred analizo redčili, da je bila inhibicija med 20 in 80%. V našem primeru smo vzorce redčili 4x (1:3). V kiveto smo dali 10 µl redčenega vzorca in dodali 1 ml umerjene ABTS^{•+}, absorbanco smo pomerili po 6-ih minutah glede na slepo probo (namesto vzorca ustrezno topilo in ABTS^{•+})

Pripravili smo umeritveno krivuljo za Troloks, rezultate popravili s faktorjem redčenja in jih izrazili kot TEAC (mM Troloksa/g suhega rastlinskega materiala).

3.4.5 Metoda FRAP

FRAP analizo smo izvedli po metodi, kot sta jo opisala Benzie in Strain (1996). Metoda temelji na sposobnosti fenolov, da reducirajo Fe³⁺ v Fe²⁺. Če se to zgodi ob prisotnosti reagenta TPTZ, je redukcija opazna s spremembo barve.

Reagenti:

- 300 mM acetatni pufer, pH 3,6
- 10 mM TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin)
- 40 mM HCl
- 20 mM železov klorid (FeCl₃ x 6H₂O)
- 20 mM železov sulfat (FeSO₄ x 7H₂O)
- Destilirana voda
- Troloks

Priprava FRAP reagenta

Frap reagent je pripravljen iz acetatnega pufru (pH 3.6), TPTZ reagenta v HCl in raztopine železovega klorida v volumskem razmerju 10:1:1 (V/V/V). FRAP reagent smo vedno pripravili tik pred analizo.

- TPTZ reagent: 31,0 mg TPTZ dodamo 10 ml 40 mM HCl, raztopimo
- Acetatni pufer, pH 3.6: 3,1g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ raztopimo v destilirani vodi, dodamo 16 ml CH_3COOH in dopolnimo do 1L

Analiza vzorcev

Test smo izvajali na 96-luknjičastih mikrotitrirnih ploščah. V vsako luknjico smo dali 300 μl FRAP reagenta in 10 μl primerno redčenega vzorca, Troloksa ali slepe probe (ekstrakcijsko topilo). Po 10 minutah inkubacije smo pomerili absorbanco pri 593 nm. Analize so bile opravljene v triplikatih.

Standardno krivuljo smo naredili s Troloksom. Rezultate smo popravili za redčenje in jih izrazili kot μM Troloksa/100 g suhega rastlinskega materiala.

3.4.6 Določanje vsebnosti celokupnih fenolov (Folin-Ciocalteu metoda)

Folin-Ciocalteu metoda temelji na oksidaciji fenolnih spojin v alkalnem mediju ob pomoči reagenta (fosfomolibdenske kisline) v modro obarvan kompleks, ki absorbira svetlobo pri 765 nm.

Postopek

200 μl primerno redčenega vzorca smo dodali k 1 ml Folin-Ciocalteujevega reagenta (predhodno 10x redčen z destilirano vodo) in inkubirali 4 minute. Nato smo dodali 800 μl saturiranega Na_2CO_3 (75 g/L) in inkubirali 2 uri v temi pri sobni temperaturi. Absorbanco smo v triplikatih izmerili pri 765 nm.

Pripravili smo umeritveno krivuljo s pomočjo galne kisline, in sicer v koncentracijah med 0 in 500 mg/L. Rezultate smo izrazili kot ekvivalent galne kisline/g suhega rastlinskega materiala (mgGAE/g SS).

3.4.7 Določanje celokupne vsebnosti flavonoidov

Vsebnost celokupnih flavonoidov smo določali po metodi, ki so jo opisali Zhishen in sod., 1999.

Reagenti:

- 10% aluminijev klorid (AlCl_3)
- 1 M natrijev hidroksid (NaOH)
- 5% natrijev nitrit (NaNO_2)
- katehin (standard)
- destilirana voda

Postopek določanja

V 10 ml bučke smo dali 4 ml destilirane vode, 1 ml primerno redčenega vzorca in 0.3 ml NaNO_2 ter inkubirali 6 minut. Potem smo dodali 0.3 ml AlCl_3 in spet inkubirali 6 minut. Po 6. minutah smo dodali 2 ml 1M NaOH , z vodo dopolnili do 10 ml in inkubirali 15 minut. Absorbanco rahlo rožnato obarvanih vzorcev smo izmerili pri valovni dolžini 510 nm.

Pripravili smo umeritveno krivuljo s katehinom, in sicer v koncentracijskem območju med 20 in 100 mg/L. Rezultate smo izrazili kot ekvivalent katehina/100g suhe snovi (mgCAE/100g SS).

3.4.8 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

S HPLC smo analizirali 80% metanolne izvlečke žajblja, šetraja, melise in materine dušice. Vzorci so bili pripravljani, kot je opisano v razdelku 3.4.2, do analiz so bili shranjeni pri -20°C . Kemijsko sestavo smo analizirali pod spodaj navedenimi pogoji po modificirani metodi, ki sta jo opisala Zheng in Wang (2001).

Kromatografski pogoji

HPLC sistem: Thermo Electron Corporation: Finnigan Autosampler, IC črpalka

Detektor: PDA detektor (photo diode array)

Programska oprema: Chrom Quest

Kolona: Discovery C18, 5 μm , 150x4.6mm, 100A (Supelco)

Predkolona: Discovery C18, 5 μm , 2 cm x 4,0 mm (Supelguard)

Volumen injiciranja: 10 μ l

Mobilna faza:

- A: 100% acetonitril
- B: 2,5% mravljična kislina

Detekcija: 290, 360 nm

Temperatura kolone: 25°C

Preglednica 3: Gradient topil za HPLC analizo fenolnih spojin

Table 3: The solvent gradient for HPLC analysis of phenolic compounds

Čas (min)	A (%)	B (%)	Pretok (ml/min)
10	85	15	1
20	65	35	1
25	10	90	1
28	10	90	1
28,01	95	5	1,2
35	95	5	1,2

Vsebnost sekundarnih metabolitov smo določili po metodi zunanjega standarda, istovetnost standarda smo določili s pomočjo retencijskega časa in spiking tehnike. Uporabili smo standarde: kavna kislina, rožmarinska kislina, karvakrol, karnozol, citral, citronelal (vsi Sigma-Aldrich), luteolin-7-O-glukozid in karnozolna kislina (Fluka).

3.4.9 Ocenjevanje antioksidativnega delovanja izvlečkov s HPLC

V prvem sklopu smo analizirali kemijsko sestavo primerno redčenih izvlečkov drog. Za določanje antioksidativnega delovanja smo primerno redčenim vzorcem dodali 1 mM DPPH (v razmerju 1:4), mešanico dobro premešali, filtrirali v vialo in inkubirali pol ure v temi pri sobni temperaturi. Nato smo izvedli analizo pod enakimi pogoji kot v prvem primeru. S primerjavo kromatogramov in iz zmanjšanja površine določenih vrhov smo sklepali o antioksidativnem delovanju izvlečkov.

3.5 STATISTIČNA ANALIZA

Podatke smo analizirali s standardnimi statističnimi metodami (enosmerna analiza variance). Razlike med posameznimi obravnavanji smo testirali z Duncanovim testom ($p < 0,05$). V primerih, ko pogoj enakosti variance ni bil izpolnjen, smo izvedli neparametrični Kruskal-Wallis test ($p < 0,05$). Za statistične analize podatkov smo uporabili programski paket Statgraphics Plus 4.0.

4 REZULTATI

4.1 VREDNOTENJE KAKOVOSTI RASTLINSKIH DROG

Kakovost rastlinskih drog smo vrednotili po priporočilih Evropske farmakopeje, ki predpisuje teste in analize tako za čiste spojine, mešanice kot zdravilne rastline. Evropska farmakopeja vsebuje monografije za določanje kakovosti droge žajblja, melise in materine dušice, ne pa tudi za drogo šetraja (kraškega ali vrtnega). Parametre kakovosti za šetraja smo našli med ISO standardi (ISO 7928-1:1991).

Določali smo prisotnost tujih primesi (tujih organov in tujih primesi), vsebnost celokupnega pepela in v klorovodikovi kislini netopnega pepela, vsebnost vode v drogi ter vsebnost eteričnega olja. Rezultati vrednotenja kakovosti za posamezne rastline so podani v preglednicah 4,5 in 6. Vse rastlinske droge so ustrezale farmakopejskim zahtevam, v primeru vsebnosti eteričnega olja pa so najnižjo mejno vrednost močno presegle.

Preglednica 4 : Vrednotenje kakovosti droge žajblja po priporočilih Evropske farmakopeje. Določena je bila vsebnost tujih organov in tujih primesi, vsebnost vode, celokupnega pepela in eteričnega olja dveh genskih virov s Petrinjskega Krasa. Prikazane so povprečne vrednosti \pm SD (KV% - koeficient variacije).

Table 4: Quality control determination of two accession of *Salvia officinalis* drug from Petrinjski Kras according to European Pharmacopoeia. The content of foreign matter, water, ash and essential oils were determined. Averages \pm SD are presented. (KV% - coefficient of variation).

	Mejne vrednosti	Genski vir 36	KV%	Genski vir 50	KV%
Tuji organi (%)	3	0,26 \pm 0,42	162,12	0,23 \pm 0,27	117,20
Tuje primesi (%)	2	0,18 \pm 0,15	80,67	0,04 \pm 0,06	147,87
Voda (ml/kg)	100	89,24 \pm 4,64 a*	5,2	83,95 \pm 3,09 b	3,69
Celokupni pepel (%)	10	7,86 \pm 1,04 a	13,24	6,9 \pm 0,63 b	9,22
Eterično olje (ml/kg)	15/10	21,92 \pm 3,15 a	14,36	19,8 \pm 3,39 b	17,13

*a: Enaka črka v vrstici označuje obravnavanja, med katerimi ni statistično značilnih razlik (Duncanov test, $p \leq 0,05$).

Preglednica 5: Vrednotenje kakovosti droge kraškega šetraja po priporočilih ISO standarda. Določena je bila vsebnost vsebnost vode, celokupnega in v klorovodikovi kislini netopnega pepela in eteričnega olja štirih akcesij šetraja. Prikazane so povprečne vrednosti \pm SD (N-narava, BF-laboratorijsko polje Biotehniške fakultete, MV-mejne vrednosti).

Table 5: Quality control determination of four accession of *Satureja montana* from natural habitat and laboratory site according to ISO standard. The content of water, total ash, in HCL insoluble ash and essential oils were determined. Averages \pm SD are presented. (N-natural habitats, BF-experimental field; MV- treshold values)

Genski vir		Voda	Pepel	Pepel HCL	EO
		ml/kg	%	%	ml/kg
	MV	130	13	1	5/7
25	N	86,13 \pm 2,68 a*	7,36 \pm 0,66	0,42 \pm 0,1	9,55 \pm 0,31
	BF	88,60 \pm 1,73 b	8,73 \pm 0,61	0,63 \pm 0,07	9,75 \pm 1,79
27	N	86,10 \pm 1,17 a	6,8 \pm 1,15	0,54 \pm 0,07	12,56 \pm 1,23
	BF	89,17 \pm 1,66 a	7,4 \pm 1,99	0,42 \pm 0,14	8,33 \pm 1,04
30	N	86,03 \pm 2,37 a	7,7 \pm 1,6	0,45 \pm 0,10	11,27 \pm 1,02
	BF	87,60 \pm 0,7	7,56 \pm 0,75	0,37 \pm 0,26	8,37 \pm 0,52
46	N	86,23 \pm 0,7	6,9 \pm 0,65	0,37 \pm 0,26	6,75
	BF	89,00 \pm 1,82	8,23 \pm 1,15	0,53 \pm 0,11	8,85 \pm 3,38

*a-b: Enaka črka v stolpcu označuje obravnavanja, med katerimi ni statistično značilnih razlik (Duncanov test, $p \leq 0,05$).

Preglednica 6: Vrednotenje kakovosti droge melise po priporočilih Evropske farmakopeje: vsebnost tujih organov in tujih primesi, vode in celokupnega pepela. Prikazane so povprečne vrednosti in standardna deviacija.

Table 6: Quality control determination of *Melissa officinalis* drug according to European Pharmacopoeia. The content of foreign matter, water and ash were determined. Averages \pm SD are presented.

	Mejne vrednosti	Melisa BF29
Tuji organi (%)	10	Pod mejo
Tuje primesi (%)	2	Pod mejo
Voda (%)	10%	8,65 \pm 0,13
Celokupni pepel (%)	10	8,9 \pm 0,76

4.1.1 Vsebnost tujih primesi

Tuje primesi se določa na večji masi vzorca, ki ga v tanki plasti razprostremo po delovni površini in ga natančno pregledamo. Določene so mejne vrednosti za tuje organe in tuje primesi, ki so različne glede na drogo. Ugotovili smo, da prisotnost tako tujih organov kot primesi ni problematična pri ročnem nabiranju vzorcev za osebne ali analitske namene, saj je vzorec, ki ga nabereмо običajno manjši in smo pri nabiranju hote ali nehote bolj pozorni, da ne nabiramo neprimernih delov. Pri vseh rastlinskih vrstah in vseh vzorcih je bila prisotnost tujih organov in tujih primesi pod zahtevano mejo, zanemarljiva in težko natančno določljiva.

Pri žajblju smo ugotovili, da se delež tujih organov med genskima viroma z mlajšimi in starejšimi rastlinami ne razlikuje med seboj, delež tujih primesi pa je bil značilno višji pri vzorcih mlajših rastlin (Preglednica 4). Glavni razlog za to razliko je v morfologiji ene in druge populacije rastlin. Mlajša populacija je bila v obliki majhnih grmičkov, zato smo pri nabiranju lahko zgrabili večji šop listov in ga odrezali skupaj z morebiti prisotnimi drugimi rastlinami ali rastlinskimi deli, medtem ko smo bili pri starejših rastlinah, ki so bile višje in manj košate, bolj pozorni na same skupke listov na koncih vejic (na višini približno 50 cm) in ni bilo možnosti naključnega nabiranja drugih rastlin ali primesi.

Mejna vrednost za tuje organe pri drogi šetraja je 5%, za tuje primesi pa 1%. Pri večini vzorcev nismo našli tujih organov in primesi. Deleži tujih organov so bili med 0,0 in 2,57% pri vzorcih iz narave ter med 0,0 in 7,3% pri vzorcih z laboratorijskega polja; tuje primesi smo našli samo pri 4 vzorcih iz narave, najvišja vrednost je bila 1,8% in ni presegala mejne vrednosti (Preglednica 5).

Droga melise je list, nabira pa se cele poganjke in se liste loči od stebel tik pred analizami. Teh stebel ne moremo obravnavati kot tuje organe; tujih primesi pa prav tako nismo našli, saj so rastline rastle na vrtnarski foliji in je bila podlaga čista in brez zeli, zemlje ali peska.

Rastline materine dušice so nizki polegli grmički, zato pri nabiranju lahko nabereмо še druge rastline, vendar v našem primeru razen nekaj trave v vzorcih nismo našli drugih tujih organov ali primesi, ki bi vplivale na kakovost droge in presegale farmakopejske mejne vrednosti.

4.1.2 Vsebnost vode in pepela

Vsebnost vode in pepela se določa na zmletih suhih vzorcih. Tudi pri teh parametrih kakovosti so bile preučevane rastlinske droge znotraj mejnih vrednosti po farmakopejskih zahtevah in priporočilih ISO standarda za drogo šetraja.

4.1.2.1 Vsebnost vode

Pri analizi vsebnosti vode (Preglednice 4,5 in 6) smo ugotovili, da so vsi vzorci v skladu s farmakopejskimi zahtevami in ne presegajo določenih mej, ki je za drogo žajblja, melise in materine dušice 10% oz 100 ml/kg, za drogo šetraja pa 13%.

Primerjava genskih virov žajblja je pokazala, da je vsebnost vode v drogi višja pri mlajših rastlinah ($89,24 \pm 4,64$ ml/kg), razlika je značilna ($p=0,0000$). Pri šetraju so bile povprečne vsebnosti vode v drogi med 86,03 in 89,17 ml/kg; značilno se je razlikovala povprečna vsebnost vode pri vzorcih akcesije 25 z laboratorijskega polja ($p=0,0397$). Povprečna vsebnost vode pri vzorcu melise (melisa BF29) je bila $8,65 \pm 0,13$ in ni presegala mejne vrednosti določene v farmakopeji. Pri materini dušici vsebnosti vode in pepela nismo določali zaradi premajhne količine vzorca.

4.1.2.2 Vsebnost pepela

Analize vsebnosti pepela so pokazale ustrezno kakovost preiskovanih drog, saj mejne vrednosti nikjer niso bile presežene. Mejna vrednost vsebnosti pepela za drogo žajblja, melise in materine dušice je 10%, za drogo šetraja pa 13% (ISO). Rezultati so podani v preglednicah 4, 5 in 6.

Tako kot pri vsebnosti vode smo tudi pri vsebnosti celokupnega pepela pri žajblju ugotovili značilno razliko med mlajšimi in starejšimi rastlinami, povprečna vsebnost celokupnega pepela je bila nižja pri starejših rastlinah ($p=0,0001$). Pri šetraju so se povprečne vrednosti gibale med 6,8 in 8,73%, med vzorci iz narave in vzorci z laboratorijskega polja ni bilo značilnih razlik, prav tako ne med posameznimi obravnavanji ($p=0,4269$). Povprečna vsebnost celokupnega pepela pri vzorcih melise je bila $8,9 \pm 0,76\%$ in prav tako ni presegala farmakopejsko določene meje 10%.

Pri drogi šetraja in materine dušice je kot kakovostni parameter določena še mejna vsebnost v klorovodikovi kislini topnega pepela, ki znaša 1% za šetraja in 3% za materino dušico. Pri materini dušici vsebnosti pepela in v HCl topnega pepela nismo določali, pri šetraju pa so vrednosti znotraj določenih mej.

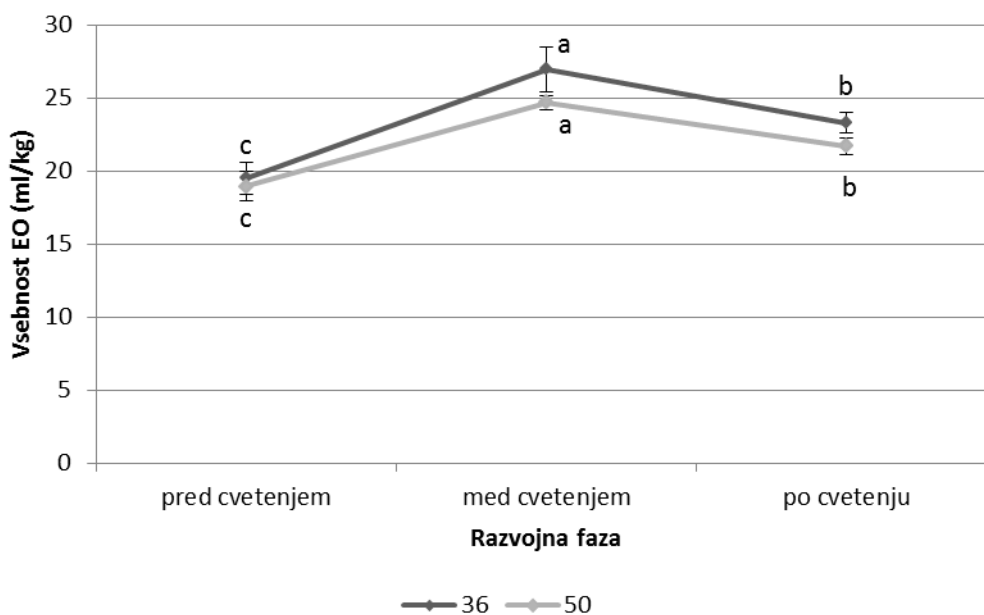
4.1.3 Vsebnost eteričnega olja

Eterično olje smo določali z vodno destilacijo s pomočjo Clevengerjevega aparata. Vse rastline so zadostile farmakopejskim zahtevam in tudi presegle predpisano najnižjo mejo vsebnosti.

4.1.3.1 Vsebnost eteričnega olja pri žajblju

Pri žajblju smo določili vsebnost eteričnega olja v dveh letih: leta 2009 (Preglednica 4) smo vrednotili vsebnost v sklopu vrednotenja kakovosti rastlinskih drog; v letu 2010 pa smo poskušali ugotoviti spreminjanje vsebnosti eteričnih olj med rastjo (Slika 3). Vzorčili smo pred cvetenjem, med cvetenjem in po cvetenju. V sklopu vrednotenja kakovosti smo ugotovili, da je povprečna vsebnost eteričnega olja značilno višja pri genskem viru mlajših rastlin ($p=0,0264$). Najnižjo farmakopejsko določeno mejo (15 ml/kg) presega za 31,5%, pri genskem viru s starejšimi rastlinami pa je najnižja meja presežena za 25%.

Analiza vsebnosti eteričnih olj v različnih razvojnih fazah žajblja je pokazala naslednjo dinamiko: vsebnost eteričnega olja je najnižja v začetku rasti oz. v fazi pred cvetenjem (še vedno nad mejno vrednostjo), doseže najvišjo vsebnost med cvetenjem, po cvetenju vsebnost spet upade, vendar ne pod nivo pred cvetenjem (Slika 3). Dinamika je bila pri obeh genskih virih enaka; vsebnost olja pa je bila višja pri mlajših rastlinah. Tako v fazi cvetenja kot v fazi po cvetenju je bila povprečna vsebnost eteričnega olja pri genskem viru mlajših rastlin značilno višja ($p=0,0000$), v vsebnosti eteričnega olja pred cvetenjem pa med genskima viroma ni bilo značilnih razlik.



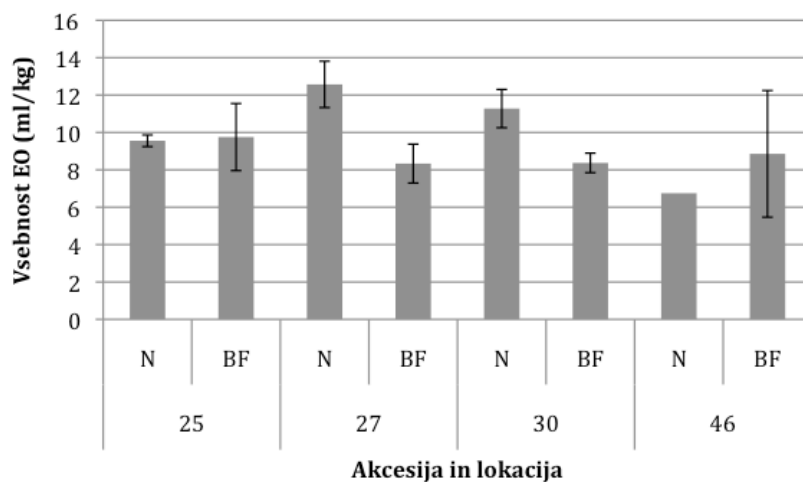
Slika 3: Vsebnost eteričnega olja žajblja v različnih fazah razvoja (ml/kg)

Figure 3: The content of essential oil in different development stages of *Salvia officinalis* (ml/kg)

4.1.3.2 Vsebnost eteričnega olja pri šetrajju

Vsebnost eteričnega olja pri šetrajju je bila pri vseh vzorcih nad najnižjo mejo (ISO standard), ki je 5 ml/kg za poganjke oz. 7 ml/kg za liste. Ker je droga šetrajja nadzemni del (*herba*), velja meja 5 ml/kg.

Povprečne vsebnosti eteričnega olja so bile med 6,75 in 12,57 ml/kg pri vzorcih iz narave in med 8,3 in 9,7 ml/kg pri vzorcih z laboratorijskega polja. Zahteva po enakosti varianc med obravnavanji ni bila izpolnjena, zato nismo izvedli analize variance (ANOVA), neparametrični Kruskal-Wallisov test pa med obravnavanji ni pokazal značilnih razlik v medianah ($p=0,2374$). Primerjava parov vzorcev iste akcesije (npr. N25 in BF25), je pokazala značilno razliko le pri akcesiji 27, kjer je povprečna vsebnost EO v vzorcih iz narave značilno višja ($p=0,0105$).



Slika 4: Vsebnost eteričnega olja šetrja pri vzorcih iz narave in z laboratorijskega polja (ml/kg). N – narava, BF – laboratorijsko polje BF

Figure 4: The content of essential oil in samples of *Satureja montana* from natural habitats and laboratory site (ml/kg). N – natural habitat, BF – laboratory site BF

4.1.3.3 Vsebnost eteričnega olja pri materini dušici

Mejna vrednost vsebnosti EO pri materini dušici je 3 ml/kg (Ph Eur). Vzorec BFL 32 je ustrezal tem zahtevam s povprečno vsebnostjo $8,9 \pm 2,76$ ml/kg. Vzorec N48 pa je vseboval 2,78 ml/kg, kar je ravno malo pod mejo. Vrednost je nizka verjetno predvsem zato, ker droga ni bila cvetoča, ampak so prevladovali lističi.

4.2 VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA

Antioksidativno delovanje rastlinskih drog smo določali v metanolnih, etanolnih in vodnih izvlečkih s tremi različnimi metodami: DPPH, ABTS in FRAP.

4.2.1 Metoda DPPH

4.2.1.1 Antioksidativna aktivnost žajblja določena z metodo DPPH

Pri žajblju smo določali antioksidativno delovanje v treh različnih razvojnih fazah rastlin: pred, med in po cvetenju (Preglednica 7). Pri metanolnih izvlečkih smo določili značilno višje vrednosti TEAC kot pri etanolnih izvlečkih ($p=0,0000$).

Preglednica 7: Antioksidativna učinkovitost metanolnih (DPPH MeOH) in etanolnih izvlečkov (DPPH EtOH) žajblja določena s testom DPPH v različnih razvojnih fazah. Prikazana so povprečja \pm SD.

Table 7: Antioxidant activity of sage methanol (DPPH MeOH) and ethanol (DPPH EtOH) extracts determined with DPPH assay in different developmental stages. Averages \pm SD are presented.

Genski vir	Razvojna faza	DPPH MeOH (mM TEAC/g SS)	DPPH EtOH (mM TEAC/g SS)
36	Pred cvetenjem	11,48 \pm 1,81 a*	8,06 \pm 1,55 a
	Med cvetenjem	12,31 \pm 1,96 a	7,97 \pm 0,63 a
	Po cvetenju	13,54 \pm 1,86 a	8,11 \pm 2,3 a
50	Pred cvetenjem	12,92 \pm 1,21 a	8,26 \pm 1,01 a
	Med cvetenjem	13,31 \pm 1,60 a	9,03 \pm 2,01 a
	Po cvetenju	12,62 \pm 1,44 a	8,05 \pm 0,55 a

*a: Enaka črka v stolpcu označuje obravnavanja, med katerimi ni statistično značilnih razlik (Duncanov test, $p \leq 0,05$).

Pri genskem viru 36 je bila antioksidativna aktivnost metanolnih izvlečkov najvišja v fazi po cvetenju (13,54 \pm 1,86 mM TEAC/g SS), in sicer za 17,9% višja od faze pred cvetenjem in za 9,9% višja kot med cvetenjem. Pri etanolnih izvlečkih je bila najvišja aktivnost določena prav tako v fazi po cvetenju (8,11 \pm 2,3 mM TEAC/g SS), najnižja pa v fazi cvetenja (7,97 \pm 0,63 mM TEAC/g SS).

Genski vir s starejšimi rastlinami žajblja (50) je imel najvišje antioksidativno delovanje metanolnih izvlečkov v fazi cvetenja (13,31 \pm 1,60 mM TEAC/g SS), sledila je faza pred cvetenjem, najnižja antioksidativna aktivnost pa je bila v fazi po cvetenju. Enak vzorec razporeditve antioksidativne aktivnosti je bil tudi pri etanolnih izvlečkih.

Razlik med genskima viroma nismo dokazali niti pri metanolnih niti etanolnih izvlečkih. Prav tako ni bilo značilnih razlik v antioksidativnem delovanju med različnimi razvojnimi fazami rastlin. Pri obeh genskih virih in v vseh razvojnih fazah pa je bila antioksidativna aktivnost metanolnih izvlečkov značilno višja od etanolnih ($p=0,0000$).

4.2.1.2 Antioksidativna aktivnost šetraja določena z metodo DPPH

Najvišje antioksidativno delovanje metanolnih izvlečkov šetraja je bilo določeno pri vzorcu N30 $14,66 \pm 0,21$ mM TEAC/g SS in najnižja antioksidativna aktivnost pri vzorcu BF27 $13,32 \pm 0,32$ mM TEAC/g SS (Preglednica 8). Med vzorci iz narave sicer ni značilnih razlik, med vzorci z laboratorijskega polja pa izstopata vzorca BF25 in BF27, ki imata značilno nižjo antioksidativno delovanje od preostalih dveh akcesij gojenih na laboratorijskem polju. Vzorca BF25 in BF27 sta imela tudi značilno nižje antioksidativno delovanje od istih akcesij iz narave N25 in N27 ($p=0,0000$).

Razlike med etanolnimi izvlečki niso bile značilne, razen pri vzorcu BF25, kjer je bila antioksidativna učinkovitost značilno najnižja ($9,07 \pm 0,80$ mM TEAC/g SS). Pri ostalih vzorcih nismo opazili razlik niti med vzorci iz narave niti pri vzorcih iste akcesije v naravi in na laboratorijskem polju, razen pri že omenjeni akcesiji 25, kjer je bila aktivnost v naravi (N25) 40% višja od vzorca z laboratorijskega polja (BF25).

Antioksidativne aktivnosti metanolnih in etanolnih izvlečkov nismo mogli primerjati med seboj, saj variance niso enake (Levenov test; $p=0,0042$). Uporabili smo neparametrični Kruskal-Wallisov test, ki je pokazal značilno višje antioksidativno delovanje metanolnih izvlečkov ($p=0,0000$). Pri vzorcih iz narave je antioksidativno delovanje metanolnih ekstraktov večje od delovanja etanolnih za 18,8%, pri vzorcih z laboratorijskega polja pa za 24,2%.

Preglednica 8: Antioksidativna učinkovitost metanolnih (DPPH MeOH) in etanolnih izvlečkov (DPPH EtOH) šetraja določena s testom DPPH. Prikazana so povprečja \pm SD.

Table 8: Antioxidant activity of *Satureja montana* methanol (DPPH MeOH) and ethanol (DPPH EtOH) extracts determined with DPPH assay. Averages \pm SD are presented.

Genski vir	DPPH MeOH (mM TEAC/g SS)		DPPH EtOH (mM TEAC/g SS)	
	Narava	BF	Narava	BF
25	14,42 \pm 0,45 a*	13,59 \pm 0,22 b	12,69 \pm 0,49 a	9,07 \pm 0,80 b
27	14,28 \pm 0,17 a	13,32 \pm 0,32 b	12,05 \pm 0,83 a	12,24 \pm 0,18 a
30	14,66 \pm 0,21 a	14,38 \pm 0,48 a	12,15 \pm 0,87 a	12,52 \pm 0,77 a
46	14,53 \pm 0,33 a	14,79 \pm 0,33 a	12,06 \pm 0,89 a	11,98 \pm 0,85 a

*a: Enaka črka v stolpcu označuje obravnavanja, med katerimi ni statistično značilnih razlik (Duncanov test, $p \leq 0,05$).

4.2.1.3 Antioksidativna aktivnost melise določena z metodo DPPH

Antioksidativno aktivnost melise smo določali pri genskem viru, ki je bil popisani v naravi, iz semen pa smo vzgojili rastline, ki so bile gojene na laboratorijskem polju. Vzorce teh rastlin smo primerjali z vzorcem kultivarja *Melissa officinalis* 'Citronella'. Antioksidativna aktivnost metanolnih izvlečkov določena z DPPH (Preglednica 9) je bila značilno višja pri cv. 'Citronella' ($p=0,0056$), tudi aktivnost etanolnih izvlečkov je bila višja pri cv. 'Citronella' ($p=0,0415$). Med topiloma obstaja značilna razlika v prid metanolu ($p=0,0000$).

Preglednica 9: Antioksidativna učinkovitost metanolnih (DPPH MeOH) in etanolnih izvlečkov (DPPH EtOH) melise določena s testom DPPH. Prikazana so povprečja \pm SD.

Table 9: Antioxidant activity of *Melissa officinalis* methanol (DPPH MeOH) and ethanol (DPPH EtOH) extracts determined with DPPH assay. Averages \pm SD are presented.

Genski vir	DPPH MeOH (mM TEAC/g SS)	DPPH EtOH (mM TEAC/g SS)
BF29	9,72 \pm 0,007 a*	9,63 \pm 0,02 a
<i>Melisa officinalis</i> 'Citronella'	9,74 \pm 0,004 b	9,65 \pm 0,02 b

*a: Enaka črka v stolpcu označuje obravnavanja, med katerimi ni statistično značilnih razlik (Duncanov test, $p \leq 0,05$).

4.2.2 Metoda ABTS

4.2.2.1 Antioksidativna aktivnost žajblja določena z metodo ABTS

V Preglednici 10 so predstavljeni rezultati antioksidativnega delovanja žajblja v metanolnih, etanolnih in vodnih izvlečkih. Najnižje vrednosti smo določili pri vodnih izvlečkih, povprečne vrednosti so bile med 7,89 in 14,33 mM TEAC/g SS. Antioksidativna aktivnost metanolnih izvlečkov je bila statistično značilno najvišja pri genskem viru mlajših rastlin v fazi po cvetenju ($46,52 \pm 1,17318$ mM TEAC/g SS), pri etanolnih izvlečkih pa smo največjo aktivnost določili pri genskem viru starejših rastlin v fazi pred cvetenjem ($39,34 \pm 4,34$ mM TEAC/g SS). Če primerjamo med seboj metanolne in etanolne izvlečke v posameznih razvojnih fazah, so se statistično razlikovali izvlečki mlajše populacije (36) v fazi po cvetenju, kjer je bila aktivnost pri metanolnih izvlečkih 51% višja kot pri etanolnih. Značilno razliko smo določili tudi v fazi cvetenja pri starejših rastlinah (50); aktivnost metanolnih izvlečkov je bila za 28% višja od aktivnosti etanolnih izvlečkov. Pri vodnih izvlečkih ni bilo statistično značilnih razlik med genskima viroma in med različnimi fazami rasti. Po neparametričnem testu primerjave median (Kruskal-Wallis test) so bile mediane vzorcev vodnih izvlečkov značilno nižje od median metanolnih ali etanolnih izvlečkov ($p=0,0007$).

Preglednica 10: Antioksidativna učinkovitost metanolnih (ABTS MeOH), etanolnih (ABTS EtOH) in vodnih izvlečkov (ABTS voda) žajblja določena s testom ABTS v različnih razvojnih fazah. Prikazana so povprečja \pm SD.

Table 10: Antioxidant activity of *Salvia officinalis* methanol (ABTS MeOH), ethanol (ABTS EtOH) and water extracts (ABTS voda) determined with ABTS assay in different developmental stages. Averages \pm SD are presented.

Genski vir	Razvojna faza	ABTS MeOH (mM TEAC/g SS)	ABTS EtOH (mM TEAC/g SS)	ABTS voda (mM TEAC/g SS)
36	Pred cvetenjem	$34,92 \pm 3,65183$ ab*	$34,03 \pm 3,20$ a	$7,89 \pm 1,85$ a
	Med cvetenjem	$29,51 \pm 2,3155$ a	$33,93 \pm 2,78$ a	$14,33 \pm 3,20$ a
	Po cvetenju	$46,52 \pm 1,17318$ e	$30,79 \pm 3,20$ a	$12,90 \pm 2,49$ a
50	Pred cvetenjem	$39,08 \pm 1,07493$ bc	$39,34 \pm 4,34$ b	$7,93 \pm 1,58$ a
	Med cvetenjem	$41,79 \pm 2,09701$ dc	$32,57 \pm 3,77$ a	$11,14 \pm 2,09$ a
	Po cvetenju	$31,74 \pm 1,96052$ a	$29,94 \pm 2,69$ a	$13,40 \pm 5,76$ a

*a-e: Enaka črka v stolpcu označuje obravnavanja, med katerimi ni statistično značilnih razlik (Duncanov test, $p \leq 0,05$).

4.2.2.2 Antioksidativna aktivnost šetraja določena z metodo ABTS

Najvišja antioksidativna aktivnost metanolnih izvlečkov je bila določena pri akcesiji N27 ($42,79 \pm 4,37$ mM TEAC/g SS), najnižja pa pri vzorcih iste akcesije z laboratorijskega polja (BF27). Razlika med najnižjo in najvišjo vrednostjo je 26,3%, vzorca se med seboj značilno razlikujeta ($p=0,0009$). Pri vzorcih iz narave je imela najnižjo antioksidativno aktivnost akcesija 30 ($37,43 \pm 2,73$ mM TEAC/gSS), ki se značilno razlikuje od preostalih vzorcev iz narave (Preglednica 11).

Preglednica 11: Antioksidativna učinkovitost metanolnih (ABTS MeOH) in etanolnih izvlečkov (ABTS EtOH) šetraja določena s testom ABTS. Prikazana so povprečja \pm SD.

Table 11: Antioxidant activity of *Satureja montana* methanol (ABTS MeOH) and ethanol extracts (ABTS EtOH) determined with ABTS assay. Averages \pm SD are presented.

Genski vir	ABTS MeOH (mM TEAC/g SS)		ABTS EtOH (mM TEAC/g SS)	
	Narava	BF	Narava	BF
25	$40,95 \pm 3,27$ a	$34,57 \pm 4,10$ a	$48,04 \pm 3,92$ a	$42,77 \pm 5,26$ a
27	$42,79 \pm 4,37$ a	$31,53 \pm 1,08$ a	$41,95 \pm 5,72$ a	$45,15 \pm 3,09$ a
30	$37,43 \pm 2,73$ b	N.D.	$44,54 \pm 6,05$ a	$36,97 \pm 7,57$ a
46	$42,76 \pm 4,78$ a	$41,33 \pm 2,68$ b	$44,43 \pm 4,80$ a	$40,39 \pm 7,47$ a

*a-b: Enaka črka v stolpcu označuje obravnavanja, med katerimi ni statistično značilnih razlik (Duncanov test, $p \leq 0,05$).

Pri metanolnih izvlečkih akcesij, ki so rastle na laboratorijskem polju, je bila najvišja določena antioksidativna aktivnost pri akcesiji 46 ($41,33 \pm 2,68$ mM TEAC/gSS). Vzorec je značilno različen od preostalih dveh akcesij.

Najvišjo antioksidativno aktivnost etanolnih izvlečkov smo določili pri vzorcu N25 ($48,04 \pm 3,92$ mM TEAC/gSS), najnižjo pa pri vzorcu BF 30 ($36,97 \pm 7,57$ mM TEAC/gSS). Kljub velikemu razponu vrednosti, med vzorci iz narave ali vzorci z laboratorijskega polja ni značilnih razlik, prav tako nismo opazili značilnih razlik med vzorci istih akcesij primerjalno iz narave in z laboratorijskega polja.

Etanolni izvlečki imajo značilno višjo antioksidativno aktivnost v primerjavi z metanolnimi izvlečki ($p=0,0272$).

4.2.2.3 Antioksidativna aktivnost melise določena z metodo ABTS

Pri testu ABTS med vzorcema melise (Preglednica 12) ni bilo značilnih razlik niti pri metanolnih ($p=0,93$) niti pri etanolnih izvlečkih ($p=0,51$). Antioksidativna aktivnost metanolnih izvlečkov je bila pri obeh akcesijah identična; pri etanolnih izvlečkih pa je bila višja pri naši akcesiji BF29 ($130,65 \pm 12,97$ mM TEAC/g SS). Tudi med topiloma niso obstajale značilne razlike ($p=0,2014$).

Preglednica 12: Antioksidativna učinkovitost metanolnih (ABTS MeOH) in etanolnih izvlečkov (ABTS EtOH) melise določena s testom ABTS. Prikazana so povprečja \pm SD.

Table 12: Antioxidant activity of *Melissa officinalis* methanol (ABTS MeOH) and ethanol extracts (ABTS EtOH) determined with ABTS assay. Averages \pm SD are presented.

Genski vir	ABTS MeOH (mM TEAC/g SS)	ABTS EtOH (mM TEAC/g SS)
BF29	$135,61 \pm 5,16$ a*	$130,65 \pm 12,97$ a
<i>Melisa officinalis</i> 'Citronella'	$135,19 \pm 7,59$ a	$120,84 \pm 25,53$ a

*a: Enaka črka v stolpcu označuje obravnavanja, med katerimi ni statistično značilnih razlik (Duncanov test, $p \leq 0,05$).

4.2.3 Metoda FRAP

4.2.3.1 Antioksidativna aktivnost žajblja določena z metodo FRAP

Pri metanolnih izvlečkih je bila antioksidativna aktivnost določena z metodo FRAP najvišja v fazi po cvetenju pri genskem viru z mlajšimi rastlinami žajblja (36) (Preglednica 13). Pri isti akcesiji je bila najnižja aktivnost metanolnih izvlečkov določena pred cvetenjem (nižja 43,3% v primerjavi s fazo po cvetenju), sledila pa je aktivnost v fazi cvetenja (nižja 26,3%). Pri starejših rastlinah (50) je bila najvišja antioksidativna aktivnost določena v fazi cvetenja ($6,17 \pm 2,00$ μ M TEAC/g SS), medtem ko je bila pri preostalih fazah razvoja nižja, vendar ne značilno.

Pri etanolnih izvlečkih smo določili najvišjo antioksidativno aktivnost v fazi cvetenja pri mlajših rastlinah ($5,49 \pm 0,93$ μ M TEAC/g SS). Drugo najvišjo vrednost smo določili pri isti populaciji, vendar v fazi pred cvetenjem ($5,04 \pm 0,66$ μ M TEAC/g SS), obe vrednosti sta se značilno razlikovali od antioksidativne aktivnosti v fazi po cvetenju, pa tudi od antioksidativne aktivnosti starejše populacije ne glede na razvojno fazo.

Preglednica 13: Antioksidativna učinkovitost metanolnih (FRAP MeOH) in etanolnih izvlečkov (FRAP EtOH) žajblja določena s testom FRAP v različnih razvojnih fazah. Prikazana so povprečja \pm SD.

Table 13: Antioxidant activity of *Salvia officinalis* methanol (FRAP MeOH) and ethanol extracts (FRAP EtOH) determined with ABTS assay in different developmental stages. Averages \pm SD are presented.

Genski vir	Razvojna faza	FRAP MeOH (μ M TEAC/g SS)	FRAP EtOH (μ M TEAC/g SS)
36	Pred cvetenjem	4,01 \pm 1,70 a*	5,04 \pm 0,66 a
	Med cvetenjem	5,22 \pm 1,49 ab	5,49 \pm 0,93 a
	Po cvetenju	7,08 \pm 1,76 c	4,13 \pm 0,83 b
50	Pred cvetenjem	4,48 \pm 0,98 ab	3,71 \pm 0,84 b
	Med cvetenjem	6,17 \pm 2,00 bc	3,73 \pm 0,15 b
	Po cvetenju	4,79 \pm 0,75 ab	3,69 \pm 0,50 b

*a-c: Enaka črka v stolpcu označuje obravnavanja, med katerimi ni statistično značilnih razlik (Duncanov test, $p \leq 0,05$).

4.2.3.2 Antioksidativna aktivnost šetraja določena z metodo FRAP

Antioksidativna aktivnost določena z metodo FRAP je bila značilno višja pri vzorcih z naravnih rastišč ($p=0,01639$) (Preglednica 14). Med genskimi viri z naravnih rastišč ni bilo značilnih razlik v TEAC vrednostih, medtem ko so bile pri vzorcih z laboratorijskega polja razlike značilne. Najvišjo vrednost smo določili pri vzorcu BF30, ki se je značilno razlikoval od vzorca z drugo najvišjo antioksidativno aktivnostjo (BF46), oba pa sta imela značilno višjo aktivnost v primerjavi z vzorcema BF25 in BF27 ($p=0,0000$). Antioksidativna aktivnost vzorcev N25 in N27 so značilno višje od vzorcev istih akcesij z laboratorijskega polja ($p=0,000$). Pri akcesiji 30 smo določili značilno višjo antioksidativno aktivnost (za 21%) pri vzorcih z laboratorijskega polja. Pri akcesiji 46 ni značilnih razlik v antioksidativni aktivnostji med vzorci iz narave ali z laboratorijskega polja ($p=0,0673$).

Preglednica 14: Antioksidativna učinkovitost metanolnih (FRAP MeOH) in etanolnih izvlečkov (FRAP EtOH) šetraja določena s testom FRAP. Prikazana so povprečja \pm SD.

Table 14: Antioxidant activity of *Satureja montana* methanol (FRAP MeOH) and ethanol extracts (FRAP EtOH) determined with FRAP assay. Averages \pm SD are presented.

Genski vir	FRAP MeOH (μ M TEAC/g SS)		FRAP EtOH (μ M TEAC/g SS)	
	Narava	BF	Narava	BF
25	7,09 \pm 1,02 a	5,19 \pm 0,89 a	8,10 \pm 0,68 a	4,68 \pm 0,21 a
27	7,01 \pm 1,21 a	5,23 \pm 0,64 a	5,60 \pm 0,45 b	5,00 \pm 0,89 ab
30	6,31 \pm 0,17 a	8,02 \pm 0,55 c	5,99 \pm 0,95 b	5,75 \pm 0,62 b
46	8,21 \pm 1,19 a	7,04 \pm 0,73 b	5,30 \pm 0,92 b	7,36 \pm 0,77 c

*a-c: Enaka črka v stolpcu označuje obravnavanja, med katerimi ni statistično značilnih razlik (Duncanov test, $p \leq 0,05$).

Pri etanolnih izvlečkih je pri vzorcih iz narave imela značilno višjo aktivnost akcesija N25, pri vzorcih z laboratorijskega polja pa je značilno odstopala antioksidativna aktivnost akcesije BF46 ($p=0,0000$). Pri istih akcesijah smo značilno razliko v delovanju ugotovili pri akcesiji 25, kjer je bila aktivnost vzorca N25 42% višja od aktivnosti vzorca BF25. Do razlik je prišlo tudi pri akcesiji 46, kjer pa je bila aktivnost vzorca BF46 višja za 27,9% od aktivnosti vzorca N46 ($p=0,000$).

Vzorci iz narave so imeli značilno višjo antioksidativno aktivnost v primeru metanolnih izvlečkov v primerjavi z etanolnimi ($p=0,0158$). Pri vzorcih z laboratorijskega polja razlik med aktivnostjo pri različnih topilih ni bilo ($p=0,1164$).

4.2.4 Določanje vsebnosti celokupnih fenolov

Celokupne fenole smo določali po Folin-Ciocalteu metodi, rezultati so izraženi kot mg ekvivalenta galne kisline/g suhe snovi (mgGAE/g SS).

4.2.4.1 Vsebnost celokupnih fenolov pri žajblju

Celokupne fenole žajblja smo določali v metanolnih, etanolnih in vodnih izvlečkih. Metanolni in etanolni izvlečki so imeli višje vsebnosti celokupnih fenolov od vodnih izvlečkov, etanol pa je imel višje vsebnosti celokupnih fenolov od metanola, vendar razlika ni bila značilna (neparametrični Kruskal-Wallis test, $p=0,0000$).

Preglednica 15: Vsebnost celokupnih fenolov določena s Folin-Ciocalteu metodo v metanolnih (MeOH), etanolnih (EtOH) in vodnih izvlečkih žajblja. Rezultati so podani kot ekvivalent galne kisline na g suhe snovi. Prikazana so povprečja \pm SD.

Table 15: Total phenolic content determined with Folin-Ciocalteu method in methanol (MeOH), ethanol (EtOH) and water (voda) extracts of *Salvia officinalis*. Results are expressed as gallic acid equivalent (GAE)/g DW. Averages \pm SD are presented.

Genski vir	Razvojna faza	MeOH (mgGAE/g SS)	EtOH (mgGAE/g SS)	Voda (mgGAE/g SS)
36	Pred cvetenjem	27,39 \pm 7,84 a*	32,92 \pm 5,55 a*	9,00 \pm 1,89 e**
	Med cvetenjem	28,78 \pm 7,67 a	39,09 \pm 5,69 a	26,20 \pm 11,12 c
	Po cvetenju	44,81 \pm 2,10 c	32,31 \pm 10,26 a	20,28 \pm 13,50 d
50	Pred cvetenjem	31,41 \pm 3,93 ab	32,13 \pm 11,07 a	13,08 \pm 5,71 d
	Med cvetenjem	40,27 \pm 6,36 bc	34,21 \pm 7,02 a	30,02 \pm 17,19 b
	Po cvetenju	32,73 \pm 5,95 ab	37,83 \pm 8,98 a	35,28 \pm 16,01 a

*a-c: Enaka črka v stolpcu označuje obravnavanja, med katerimi ni statistično značilnih razlik (Duncanov test, $p \leq 0,05$).

**a-c: Enaka črka v stolpcu označuje obravnavanja, med katerimi ni statistično značilnih razlik v mediani (Kruskal-Wallis test; $p < 0,05$).

Pri metanolnih izvlečkih smo najvišjo povprečno vsebnost celokupnih fenolov določili pri genskem viru z mlajšimi rastlinami žajblja po fazi cvetenja ($44,81 \pm 2,10$ mgGAE/g SS), vsebnost je bila značilno višja od preostalih faz (pred- in med cvetenjem) pri tej akcesiji. Pri genskem viru s starejšimi rastlinami smo najvišjo vsebnost celokupnih fenolov določili v fazi cvetenja ($40,27 \pm 6,36$ mgGAE/g SS). Vsebnost fenolov se je značilno razlikovala od izvlečkov faze pred cvetenjem in po cvetenju. Vsebnost celokupnih fenolov v različnih razvojnih fazah je bila pri žajblju v primeru metanola kot topila torej skladna z antioksidativno učinkovitostjo (pri akcesiji 36 najvišja v fazi po cvetenju in pri akcesiji 50 v fazi cvetenja).

Pri etanolnih izvlečkih je bila vsebnost celokupnih fenolov najvišja pri mlajši akcesiji v fazi cvetenja ($39,09 \pm 5,69$ mgGAE/g SS). Najvišjo vsebnost celokupnih fenolov pri starejši akcesiji pa smo določili v fazi po cvetenju ($37,83 \pm 8,98$ mgGAE/g SS). Med posameznimi fazami nismo opazili značilnih razlik niti pri mlajši niti pri starejši akcesiji, prav tako med populacijama ni bilo značilnih razlik v vsebnosti celokupnih fenolov. Etanol se torej razlikuje od metanola glede na vsebnost celokupnih fenolov v fenofazah.

Pri vodnih izvlečkih ni bil izpolnjen pogoj enakosti varianc, zato smo izvedli neparametrični Kruskal-Wallis test, ki je pokazal značilne razlike med medianami

posameznih vzorcev ($p=0,0048$). Pri mlajših rastlinah je bila vsebnost celokupnih fenolov najvišja v fazi cvetenja ($26,20 \pm 11,12$ mgGAE/g SS) in se je značilno razlikovala od faze pred cvetenjem, kjer je bila vsebnost najnižja ($9,00 \pm 1,89$ mgGAE/g SS) in od faze po cvetenju, ki se je tudi značilno razlikovala od preostalih dveh faz. Pri starejših rastlinah pa je bila najvišja vsebnost celokupnih fenolov v fazi po cvetenju ($35,28 \pm 16,01$ mgGAE/g SS), pred cvetenjem je bila značilno najnižja ($13,08 \pm 5,71$ mgGAE/g SS), faza po cvetenju pa se je tudi značilno razlikovala od preostalih dveh ($p=0,0048$).

4.2.4.2 Vsebnost celokupnih fenolov pri šetrajju

Najvišjo vsebnost fenolov pri metanolnih izvlečkih smo dobili pri vzorcu N25, ki se je po vsebnosti značilno razlikoval od preostalih vzorcev iz narave ($p=0,0086$) (Preglednica 16). Pri vzorcih z laboratorijskega polja je bila največja vsebnost fenolov v vzorcu BF30 ($48,03 \pm 2,28$ mgGAE/g SS), sledila je vsebnost v vzorcu BF46 ($47,88 \pm 4,42$ mgGAE/g SS). Obe vrednosti sta bili značilno višji od preostalih dveh, ki pa sta se po vsebnosti fenolov tudi značilno razlikovala med seboj. Vzorec BF27 je imel najnižjo vsebnost fenolov med vsemi vzorci ($32,64 \pm 1,18$ mgGAE/g SS).

Če primerjamo iste akcesije iz narave in z laboratorijskega polja, opazimo značilne razlike v dveh primerih, in sicer pri akcesiji 25, kjer je vsebnost celokupnih fenolov v vzorcih iz narave 23,2% višja od vsebnosti iste akcesije z laboratorijskega polja ($p=0,0008$). Značilno višja pa je tudi vsebnost celokupnih fenolov pri akcesiji 27 iz narave, in sicer za 31,2% v primerjavi z vzorcem BF27 ($p=0,0000$).

Pri etanolnih izvlečkih smo najvišjo vsebnost celokupnih fenolov določili pri vzorcu N25 ($60,57 \pm 2,10$ mgGAE/g SS). Potem so si v padajočem vrstnem redu sledili vzorci N46, N30 in N27, kjer je bila vsebnost fenolov najnižja. Pri vzorcih z laboratorijskega polja je bila najvišja vsebnost celokupnih fenolov pri vzorcu BF46, v padajočem vrstnem redu so si sledili vzorci BF27, BF30 in BF25, ki je imel najnižjo vsebnost in se je značilno razlikoval od preostalih treh vzorcev. Primerjalno med akcesijami iz narave in z laboratorijskega polja sta se značilno razlikovala le vzorca akcesije 25 ($p=0,0000$). Akcesija v naravi (N25) je vsebovala 38,3% več celokupnih fenolov kot BF25. Med ostalimi pari ni bilo značilnih razlik.

Preglednica 16: Vsebnost celokupnih fenolov določena s Folin-Ciocalteu metodo v metanolnih (MeOH) in etanolnih (EtOH) izvlečkih šetraja. Rezultati so podani kot ekvivalent galne kisline (na g suhe snovi). Prikazana so povprečja \pm SD.

Table 16: Total phenolic content determined with Folin-Ciocalteu method in methanol (MeOH) and ethanol (EtOH) extracts of *Satureja montana*. Results are expressed as gallic acid equivalent (GAE)/g DW. Averages \pm SD are presented.

Genski vir	MeOH fenoli (mgGAE/g SS)		EtOH fenoli (mgGAE/g SS)	
	Narava	BF	Narava	BF
25	54,17 \pm 6,03 a	41,59 \pm 2,56 b	60,57 \pm 2,10 b	37,37 \pm 4,10 a
27	47,41 \pm 3,09 b	32,64 \pm 1,18 a	50,38 \pm 6,00 a	56,18 \pm 2,16 b
30	45,65 \pm 0,28 b	48,03 \pm 2,28 c	55,74 \pm 4,05 ab	50,15 \pm 5,19 b
46	46,52 \pm 4,42 b	47,88 \pm 4,42 c	57,29 \pm 4,25 b	56,29 \pm 3,34 b

*a-c: Enaka črka v stolpcu označuje obravnavanja, med katerimi ni statistično značilnih razlik (Duncanov test, $p \leq 0,05$).

4.2.4.3 Vsebnost celokupnih fenolov pri melisi

Vsebnost celokupnih fenolov se je pri metanolnih izvlečkih značilno razlikovala med akcesijama ($p=0,0015$). Naša akcesija je imela značilno višjo vsebnost fenolov od kultivarja '*Citronella*'. Pri etanolnih izvlečkih razlik v vsebnosti celokupnih fenolov med akcesijama ni bilo ($p=0,5189$) (Preglednica 17).

Preglednica 17: Vsebnost celokupnih fenolov določena s Folin-Ciocalteu metodo v metanolnih (MeOH) in etanolnih (EtOH) izvlečkih melise. Rezultati so podani kot ekvivalent galne kisline na g suhe snovi (mgGAE/g SS). Prikazana so povprečja \pm SD.

Table 17: Total phenolic content determined with Folin-Ciocalteu method in methanol (MeOH) and ethanol (EtOH) extracts of *Melissa officinalis*. Results are expressed as gallic acid equivalent (GAE)/g DW. Averages \pm SD are presented.

Genski vir	MeOH (mgGAE/gSS)	EtOH (mgGAE/gSS)
BF29	129,83 \pm 1,04 a	130,65 \pm 12,97 a
<i>Melisa officinalis</i> ' <i>Citronella</i> '	125,94 \pm 0,94 b	120,84 \pm 25,53 a

*a-b: Enaka črka v stolpcu označuje obravnavanja, med katerimi ni statistično značilnih razlik (Duncanov test, $p \leq 0,05$).

4.2.4.4 Vsebnost celokupnih fenolov pri materini dušici

Preglednica 18: Vsebnost celokupnih fenolov določena s Folin-Ciocalteu metodo v metanolnih (MeOH) in vodnih izvlečkih materine dušice. Rezultati so podani kot ekvivalent galne kisline na g suhe snovi (mgGAE/gSS). Prikazana so povprečja \pm SD.

Table 18: Total phenolic content determined with Folin-Ciocalteu method in methanol (MeOH) and water extracts of *Thymus* spp. Results are expressed as gallic acid equivalent (GAE)/g DW. Averages \pm SD are presented.

Vzorec	MeOH (mgGAE/gSS)	Voda (mgGAE/gSS)
BF32 3.6.2010	55,68 \pm 1,27 c*	50,69 \pm 1,06
N32 25.5.2010	57,92 \pm 0,69 d	21,56 \pm 0,03
N32 6.8.2009	39,37 \pm 1,3 b	45,51 \pm 1,06
N48 6.8.2009	31,97 \pm 1,6 a	11,47 \pm 0,55
N48 25.5.2010	54,99 \pm 0,65 c	14,78 \pm 0,06

*a-b: Enaka črka v stolpcu označuje obravnavanja, med katerimi ni statistično značilnih razlik (Duncanov test, $p \leq 0,05$).

4.2.5 Določanje vsebnosti celokupnih flavonoidov

4.2.5.1 Vsebnost celokupnih flavonoidov pri žajblju

Pri določanju vsebnosti celokupnih flavonoidov smo opazili značilne razlike med metanolnimi, etanolnimi in vodnimi izvlečki. Najvišje vsebnosti smo zabeležili pri metanolnih izvlečkih, malo nižje pri etanolnih, pri vodnih pa je bila vsebnost najnižja (Preglednica 19).

Metanolni izvlečki so vsebovali med 190,45 \pm 55,01 in 355,63 \pm 69,29 mg CE/100g SS. Pri genskem viru 36 (mlajše rastline žajblja) smo določili značilno največjo vsebnost flavonoidov v fazi po cvetenju, v razvojni fazi pred cvetenjem je bila vsebnost flavonoidov nižja za 38,5%, v fazi med cvetenjem pa za 46,4%. Pri genskem viru 50 (starejše rastline) značilnih razlik med razvojnimi fazami ni bilo, najvišje vsebnosti flavonoidov smo določili pri izvlečkih cvetočih rastlin (276,9 \pm 74,22 mg CE/100g SS), potem so v padajočem vrstnem redu sledili izvlečki vzorcev po cvetenju (258,94 \pm 57,10 mg CE/100g SS) in izvlečki materiala v fazi pred cvetenjem (244,78 \pm 48,32 mg CE/100g SS).

Preglednica 19: Vsebnost celokupnih flavonoidov v metanolnih (MeOH), etanolnih (EtOH) in vodnih izvlečkih žajblja. Rezultati so podani kot ekvivalent katehina na 100g suhe snovi. Prikazana so povprečja \pm SD.

Table 19: Total flavonoid content in methanol (MeOH), ethanol (EtOH) and water (voda) extracts of *Salvia officinalis*. Results are expressed as catechin equivalent (CE)/100g DW. Averages \pm SD are presented.

Genski vir	Razvojna faza	Metanol (mg CE/100g SS)	Etanol (mg CE/100g SS)	Voda (mg CE/100g SS)
36	Pred cvetenjem	218,53 \pm 66,9 ab*	247,52 \pm 31,91 a*	33,26 \pm 10,45 a**
	Med cvetenjem	190,45 \pm 55,01 a	220,28 \pm 22,14 ab	70,79 \pm 11,68 b
	Po cvetenju	355,63 \pm 69,29 c	189,67 \pm 21,66 b	71,13 \pm 4,49 b
50	Pred cvetenjem	244,78 \pm 48,32 ab	215,75 \pm 26,68 ab	27,26 \pm 18,00 a
	Med cvetenjem	276,9 \pm 74,22 b	222,06 \pm 26,16 ab	55,13 \pm 24,01 b
	Po cvetenju	258,94 \pm 57,10 ab	211,78 \pm 11,19 b	204,65 \pm 17,75 c

*a-e: Enaka črka v stolpcu označuje obravnavanja, med katerimi ni statistično značilnih razlik (Duncanov test, $p \leq 0,05$).

**a-e: Enaka črka v stolpcu označuje obravnavanja, med katerimi ni statistično značilnih razlik v medianah (Kruskall-Wallis test; $p < 0,05$).

Pri etanolnih izvlečkih smo določili najvišjo vsebnost flavonoidov pri mlajših rastlinah v fazi pred cvetenjem (247,52 \pm 31,91 mg CE/100g SS), najnižjo pa pri isti akcesiji (36) v fazi po cvetenju (189,67 \pm 21,66 mg CE/100g SS), razlika med obema razvojnima fazama je bila značilna. Pri starejših rastlinah je bil razpon vrednosti manjši, med posameznimi razvojnimi fazami pa ni bilo značilnih razlik.

Vodni izvlečki so vsebovali značilno manj flavonoidov. Močno je odstopala vsebnost flavonoidov pri izvlečkih starejših rastlin v fazi po cvetenju (204,65 \pm 17,75 mg CE/100g SS). Najnižja vsebnost flavonoidov v tej akcesiji je bila v fazi pred cvetenjem, značilno se je razlikovala od faze med cvetenjem in faze po cvetenju. Pri mlajših rastlinah je bila najnižja vsebnost flavonoidov določena v fazi pred cvetenjem (33,26 \pm 10,45 mg CE/100g SS) in se je statistično značilno razlikovala od faze med in po cvetenju.

4.2.5.2 Vsebnost celokupnih flavonoidov pri šetrajju

Tudi pri vsebnosti celokupnih flavonoidov pri šetrajju (Preglednica 20) je bila vsebnost v metanolnih izvlečkih višja kot v etanolnih ($p=0,0175$).

Celokupna vsebnost flavonoidov v metanolnih izvlečkih je bila najvišja pri vzorcu N27 ($494,638 \pm 6,94$ mg CE/100g SS) in se je značilno razlikovala od preostalih vzorcev iz narave ($p=0,002$). Po vsebnosti flavonoidov je sledil vzorec N25, nato N46, najmanjšo vsebnost pa smo določili v vzorcu N30, vendar razlika ni bila značilna.

Metanolni izvlečki vzorcev z laboratorijskega polja so imeli nižje vsebnosti flavonoidov in jih lahko razdelimo v dve skupini. Vzorca BF25 in BF27 sta imela značilno nižjo vsebnost od vzorcev BF30 in BF46 ($p=0,0000$). Najvišja vsebnost je bila določena v vzorcu BF46 ($489,57 \pm 20,61$ mg CE/100g SS, najnižja pa pri vzorcu BF27 ($328,874 \pm 17,99$ mg CE/100g SS), skupna razlika je znašala 32,95%.

Pri etanolnih izvlečkih je bila najvišja vsebnost flavonoidov v vzorcu N30 ($417,757 \pm 135,25$ mg CE/100g SS), najnižja pa pri N46. Levenov test analize variance, ki je predpogoj za test analize variance (ANOVA) v tem sklopu ni bil izpolnjen, zato smo naredili le neparametrični Kruskal-Wallis test, ki pa ni pokazal razlik med medianami posameznih vzorcev ($p=0,2824$).

Tudi pri vodnih izvlečkih ni bil izpolnjen pogoj enakosti varianc, zato smo izvedli neparametrični Kruskal-Wallis test, ki je pokazal značilne razlike med medianami posameznih vzorcev ($p=0,0000$). S 95% gotovostjo lahko trdimo, da je vsebnost flavonoidov pri vseh štirih akcesijah višja pri vzorcih iz narave ($N25 > BF25$; $N27 > BF27$; $N30 > BF30$; $N46 > BF46$).

Preglednica 20: Vsebnost celokupnih flavonoidov v metanolnih (MeOH), etanolnih (EtOH) in vodnih izvlečkih šetrja. Rezultati so podani kot ekvivalent katehina na 100g suhe snovi. Prikazana so povprečja \pm SD.

Table 20: Total flavonoid content in methanol (MeOH), ethanol (EtOH) and water (voda) extracts of *Satureja montana*. Results are expressed as catechin equivalent (CE)/100g DW. Averages \pm SD are presented.

Genski vir	MeOH (mg CE/100g SS)		EtOH (mg CE/100g SS)		Voda (mg CE/100g SS)	
	Narava	BF	Narava	BF	Narava	BF
25	466,41 \pm 9,96 a	347,97 \pm 30,12 a	292,91 \pm 80,04	236,97 \pm 22,14	38,12 \pm 3,57	30,66 \pm 2,03
27	494,64 \pm 6,94 b	328,87 \pm 17,99 a	301,63 \pm 32,87	269,65 \pm 1,18	55,46 \pm 4,71	22,79 \pm 1,48
30	458,87 \pm 6,89 a	453,27 \pm 63,67 b	417,76 \pm 135,25	265,93 \pm 25,04	31,55 \pm 6,95	19,64 \pm 6,74
46	462,93 \pm 7,14 a	489,57 \pm 20,61 b	243,84 \pm 80,33	255,17 \pm 62,43	69,36 \pm 5,25	18,82 \pm 4,93

*a-b: Enaka črka v stolpcu označuje obravnavanja, med katerimi ni statistično značilnih razlik (Duncanov test, $p \leq 0,05$).

4.2.5.3 Vsebnost celokupnih flavonoidov pri melisi

Pri melisi smo določili najvišjo vsebnost celokupnih flavonoidov, ki je močno presegala povprečno vsebnost flavonoidov pri vzorcih žajblja ali šetrja. Vsebnost celokupnih flavonoidov je bila pri metanolnih izvlečkih značilno višja pri naši akcesiji melise BF29 ($p=0,0017$), medtem ko pri etanolnih izvlečkih med akcesijama razlik ni bilo (Preglednica 21).

Preglednica 21: Vsebnost celokupnih flavonoidov v metanolnih (MeOH) in etanolnih (EtOH) izvlečkih melise. Rezultati so podani kot kot ekvivalent katehina na 100g suhe snovi. Prikazana so povprečja \pm SD.

Table 21: Total flavonoid content in methanol (MeOH) and ethanol (EtOH) extracts of *Melissa officinalis*. Results are expressed as catechin equivalent (CE)/100g DW. Averages \pm SD are presented.

Genski vir	MeOH mg CE/100g SS	EtOH mg CE/100g SS
BF29	1998,63 \pm 90,83 a*	1954,82 \pm 202,33 a
Melisa officinalis Citronella	1678,84 \pm 50,12 b	2016,9 \pm 381,14 a

*a-b: Enaka črka v stolpcu označuje obravnavanja, med katerimi ni statistično značilnih razlik (Duncanov test, $p \leq 0,05$).

4.2.5.4 Vsebnost celokupnih flavonoidov pri materini dušici

Celokupna vsebnost flavonoidov pri materini dušici je bila med 318,8 in 761,1 mgCE/100gSS pri metanolnih izvlečkih in med 197,4 in 472,5 mgCE/100g SS pri etanolnih izvlečkih (Preglednica 22). Pri akcesiji 32 vidimo, da je vsebnost flavonoidov najvišja pri metanolnem izvlečku vzorca iz narave, ki je bil nabran maja v fazi polnega razcveta, pri vzorcu iz avgusta, ko smo nabrali večinoma odcvetele poganjke, pa je vsebnost fenolov najnižja (metanolni izvleček), medtem ko ima pri tem vzorcu vodni izvleček najvišjo vsebnost flavonoidov (primerjalno v okviru iste akcesije). Tudi pri akcesiji 48 so rezultati raznoliki in pri metanolnih in etanolnih izvlečkih ravno obratni. Metanolni izvleček N48 v fazi polnega razcveta (N48 25.5.2010) ima najvišjo vsebnost celokupnih flavonoidov, medtem ko je pri vodnih izvlečkih najvišja vsebnost določena pri vzorcu (N48 6.8.2009). Zaradi velike variabilnosti podatkov in neenakosti varianc med vzorci podatkov nismo mogli statistično ovrednotiti (ANOVA), neparametrični Kruskal-Wallis test pa ni pokazal razlik med vzorci.

Preglednica 22: Vsebnost celokupnih flavonoidov v metanolnih (MeOH) in vodnih izvlečkih materine dušice. Rezultati so podani kot kot ekvivalent katehina/100g suhe snovi. Prikazana so povprečja \pm SD.

Table 22: Total flavonoid content in methanol (MeOH) and water extracts of *Thymus* spp. Results are expressed as catechin equivalent (CE)/100g DW. Averages \pm SD are presented.

Vzorec	MeOH (mgCE/100gSS)	Voda (mgCE/100gSS)
BF32 3.6.2010	562,5 \pm 4,0	197,4 \pm 4,8
N32 25.5.2010	761,1 \pm 3,5	310,6 \pm 6,3
N32 6.8.2009	425,1 \pm 4,8	406,6 \pm 156,8
N48 6.8.2009	318,8 \pm 36,2	472,5 \pm 213,9
N48 25.5.2010	576,1 \pm 5,2	317,4 \pm 14,5

4.3 VSEBNOST SEKUNDARNIH METABOLITOV V IZVLEČKIH RASTLINSKIH DROG

Vsebnost sekundarnih metabolitov smo določali v 80% metanolnih izvlečkih posameznih drog. Rezultati so podani v preglednicah 23, 24 in 25.

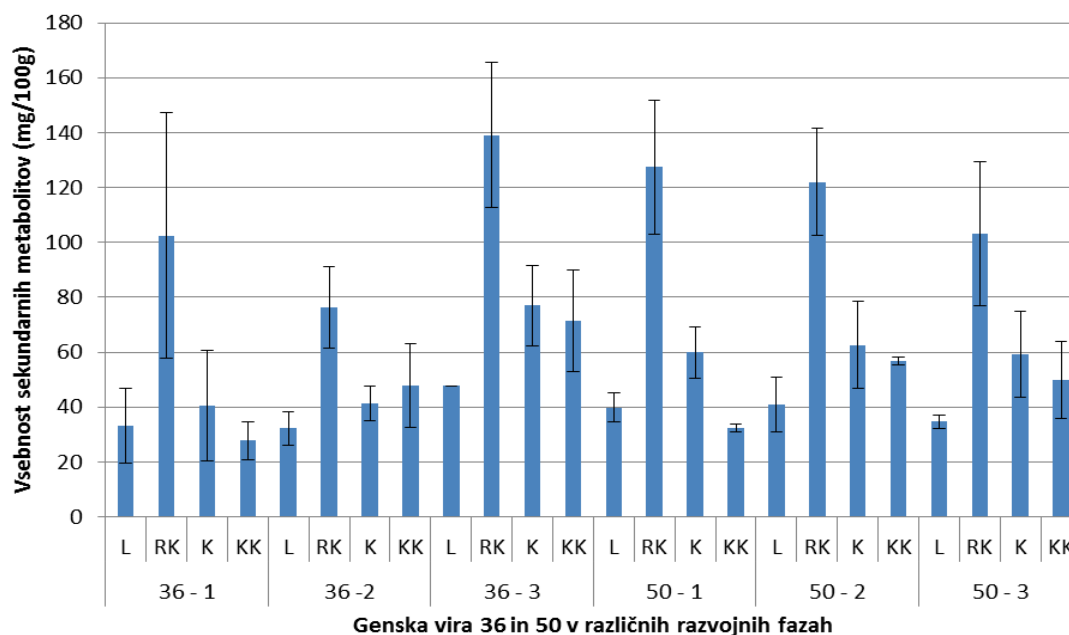
Preglednica 23: Vsebnost luteolin-7-O-glukoziida, rožmarinske kisline, karnozola in karnozolne kisline v metanolnih izvlečkih žajblja (določeno s HPLC). Rezultati so podani kot mg/g. Razvojne faze: 1 – pred cvetenjem, 2- med cvetenjem, 3 – po cvetenju. Prikazana so povprečja \pm SD.

Table 23: The content of luteolin-7-o-glucoside, rosmarinic acid, carnosol and carnosic acid in methanol extracts of *Salvia officinalis* (determined with HPLC). Developmental stages: 1 – before blooming, 2 – blooming, 3 – after blooming. Results are expressed as mg/g. Averages \pm SD are presented.

Genski vir	Razvojna faza	luteolin-7-O-glukozid mg/100g	rožmarinska kislina mg/100g	karnozol mg/100g	karnozolna kislina mg/100g
36	1	33,3 \pm 13,5 a*	102,5 \pm 44,5 a	40,4 \pm 20,15 a	27,7 \pm 6,9 a
	2	32,2 \pm 6,1 a	76,3 \pm 14,8 a	41,3 \pm 6,12 a	47,9 \pm 15,3 abc
	3	47,7 a	139,1 \pm 26,5 a	76,9 \pm 14,5 a	71,4 \pm 18,6 c
50	1	39,8 \pm 5,4 a	127,5 \pm 24,4 a	59,88 \pm 9,24 a	32,3 \pm 1,5 ab
	2	34,6 \pm 2,5 a	122,0 \pm 19,6 a	62,6 \pm 16,0 a	56,8 \pm 1,4 bc
	3	37,1 \pm 8,5 a	103,2 \pm 26,1 a	59,3 \pm 15,7 a	49,8 \pm 13,9 abc

*a-c: Enaka črka v stolpcu označuje obravnavanja, med katerimi ni statistično značilnih razlik (Duncanov test, $p \leq 0,05$).

V drogi žajblja smo določili prisotnost in vsebnost luteolin-7-O-glukoziida, rožmarinske kisline, karnozola in karnozolne kisline. Prevladujoča spojina v vseh vzorcih je bila rožmarinska kislina, vendar med vzorci iste akcesije ni bilo značilnih razlik, med akcesijama tudi ne. Najvišjo vsebnost rožmarinske kisline smo zabeležili v fazi po cvetenju pri genskem viru 36 (139,1 \pm 26,5 mg/100g). Pri tem genskem viru so si sledili (padajoče): faza po cvetenju > faza med cvetenjem > faza pred cvetenjem, medtem ko je bila pri genskem viru najvišja vsebnost rožmarinske kisline v fazi pred cvetenjem, malo nižja v fazi cvetenja, najnižja pa v fazi po cvetenju. Največja razlika v vsebnosti rožmarinske kisline je bila v fazi cvetenja; pri akcesiji 36 je bila značilna višja od akcesije 50 cvetenja ($p=0,0318$).



Slika 5: Vsebnost sekundarnih metabolitov v metanolnih izvlečkih žajblja. Prikazana so povprečja in SD. (L – luteolin-7-O-glukozid; RK – rožmarinska kislina, K – karnozol, KK – karnozolna kislina).

Figure 5: The content of secondary metabolites in methanol extracts of *Salvia officinalis*. Averages and SD are presented. (L – luteolin-7-O-glucoside, RK – rosmarinic acid, K – carnosol, K – carnosic acid).

Vsebnost luteolina je bila med $33,3 \pm 13,5$ in $48,0$ mg/100g. Med akcesijama in med različnimi fazami ni bilo značilnih razlik. V vseh vzorcih sta bila prisotna karnozol in karnozolna kislina, v večini vzorcev je bila vsebnost karnozola višja od vsebnosti karnozolne kisline, razen pri vzorcu akcesije 36 v fazi po cvetenju, kjer je bilo karnozolne kisline več. Karnozolna kislina je nestabilna spojina, eden izmed razgradnih produktov je tudi karnozol.

Preglednica 24: Vsebnost luteolin-7-O-glukoziida, rožmarinske kisline in karvakrola v metanolnih izvlečkih šetrja (določeno s HPLC). Rezultati so podani kot mg/100g. Prikazana so povprečja \pm SD.

Table 24: The content of luteolin-7-o-glucoside, rosmarinic acid and carvacrol in methanol extracts of *Satureja montana* (determined with HPLC). Results are expressed as mg/g. Averages \pm SD are presented.

Genski vir	Luteolin-7-O-gluko- zid (mg/100g)	Rožmarinska kislina (mg/100g)	Karvakrol (mg/100g)
N25	0,188 \pm 0,013	66,81 \pm 6,26	17,41 \pm 4,73
N27	0,110 \pm 0,006	63,69 \pm 1,08	44,42 \pm 2,15
N30	0,180 \pm 0,027	77,33 \pm 5,05	11,42 \pm 2,83
N46	0,170 \pm 0,058	67,16 \pm 1,51	22,44 \pm 18,09
BF25	0,124 \pm 0,003	66,92 \pm 11,23	23,41 \pm 3,47
BF27	0,131 \pm 0,008	38,48 \pm 13,89	8,49 \pm 6,24
BF30	0,189 \pm 0,003	75,82 \pm 7,41	30,32 \pm 7,06
BF46	0,199 \pm 0,008	74,39 \pm 7,04	15,62 \pm 1,67

V vzorcih šetrja smo določili vsebnost luteolin-7-O-glukoziida, rožmarinske kisline in karvakrola. Variabilnost podatkov je bila velika, zahteve o enakosti varianc pri nobeni spojini niso bile izpolnjene, neparametrični Kruskal-Wallis test pa med obravnavanji ni pokazal razlik. Prevladujoča spojina je bila tudi tukaj rožmarinska kislina, z vsebnostjo med 38,48 \pm 13,89 in 75,82 \pm 7,41 mg/100g. Po vsebnosti je sledil karvakrol, z razponom koncentracij med 8,49 \pm 6,24 in 44,42 \pm 2,15 mg/100g. Najmanj pa je bilo luteolin-7-O-glukoziida.

Preglednica 25: Vsebnost luteolin-7-O-glukoziida in rožmarinske kisline v metanolnih izvlečkih melise (določeno s HPLC). Rezultati so podani kot mg/100g. Prikazana so povprečja \pm SD.

Table 25: The content of luteolin-7-o-glucoside and rosmarinic acid in methanol extracts of *Melissa officinalis* (determined with HPLC). Results are expressed as mg/g. Averages \pm SD are presented.

Genski vir	Luteolin-7-O-gluko- zid (mg/100g)	Rožmarinska kislina (mg/100g)
BF29	34,39 \pm 0,56	467,637 \pm 47,71
<i>Melisa officinalis</i> Citronella	32,75 \pm 1,75	424,79 \pm 27,05

Pri melisi smo identificirali luteolin-7-O-gluko-
zid in rožmarinsko kislino. Vsebnost obeh
spojin je bila pri melisi med vsemi preučevanimi vrstami najvišja. Med akcesijama ni bilo
značilnih razlik.

Preglednica 26: Vsebnost luteolin-7-O-glukoziida in rožmarinske kisline v metanolnih izvlečkih materine dušice (določeno s HPLC). Rezultati so podani kot mg/100g. Prikazana so povprečja \pm SD.

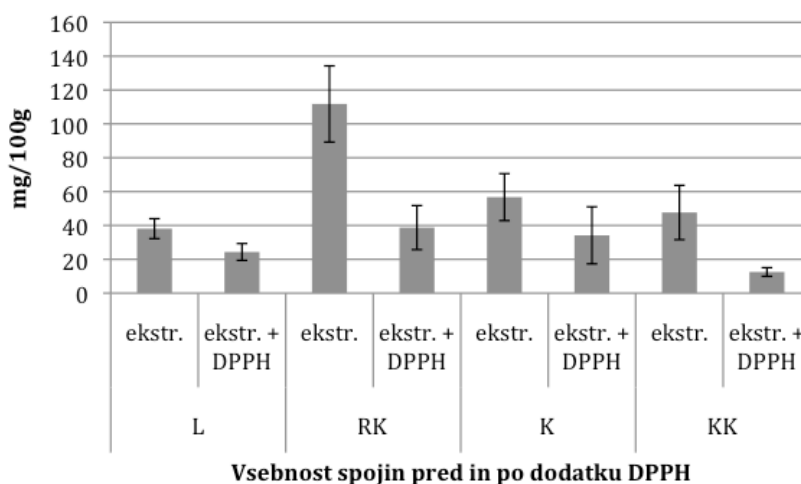
Table 26: The content of luteolin-7-o-glucoside and rosmarinic acid in methanol extracts of *Thymus* spp. (determined with HPLC). Results are expressed as mg/100g. Averages \pm SD are presented.

Vzorec	Luteolin-7-O-gluko- zid (mg/100g)	Rožmarinska kislina(mg/100g)
BF32	1,107 \pm 0,026	114,92 \pm 2,56
N32	1,416 \pm 0,002	174,81 \pm 0,35
N46	0,491 \pm 0,002	112,82 \pm 0,27

Pri materini dušici smo identificirali in ovrednotili luteolin-7-O-gluko-
zid in rožmarinsko kislino. Vsebnost rožmarinske kisline je bila med $112,82 \pm 0,27$ in $174,81 \pm 0,35$ mg/100g. luteolin-7-O-gluko-
zida pa je bilo med $0,491 \pm 0,002$ in $1,416 \pm 0,002$ mg/100g.

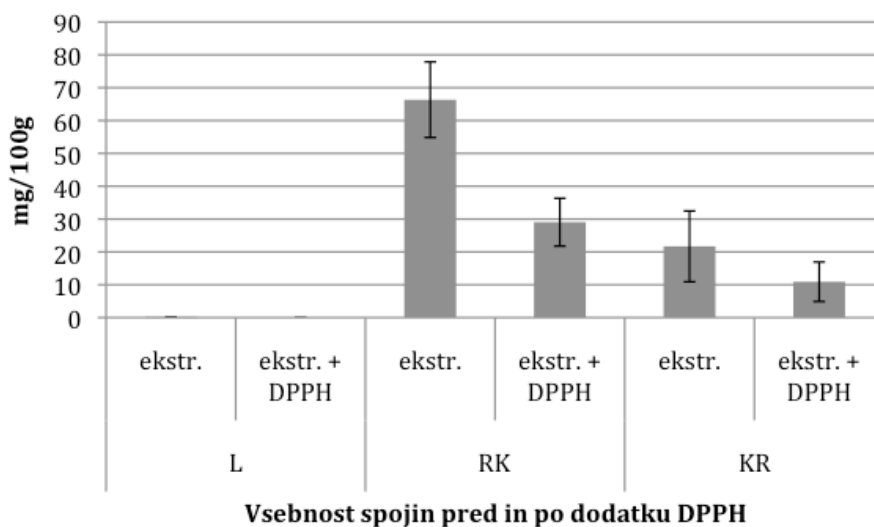
4.4 OCENA ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA Z METODO HPLC

S HPLC metodo smo želeli ugotoviti sestavo izvlečkov drog in identificirati spojine, ki sodelujejo pri antioksidativni aktivnosti izvlečkov. Na slikah 6, 7 in 8 so predstavljene vsebnosti fenolnih spojin pred in po dodatku DPPH.



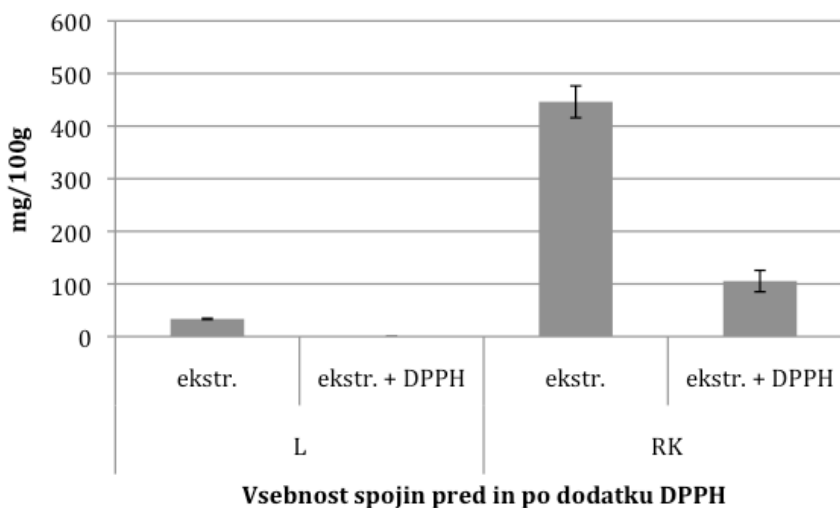
Slika 6: Vsebnost sekundarnih metabolitov v metanolnih izvlečkih žajblja pred in po dodatku DPPH. L – luteolin-7-O-gluko-
zid; RK – rožmarinska kislina; K – karnozol; KK – karnozolna kislina. Predstavljena so povprečja in standardna deviacija.

Figure 6: The content of secondary metabolites in methanol extracts of *Salvia officinalis* before and after addition of DPPH. L – luteolin-7-O-glucoside, RK – rosmarinic acid, K – carnosol, K – carnosic acid . Averages and SD are presented.



Slika 7: Vsebnost sekundarnih metabolitov v metanolnih izvlečkih šetraja pred in po dodatku DPPH. L – luteolin-7-O-glukozid; RK – rožmarinska kislina; KR – karvakrol. Predstavljena so povprečja in standardna deviacija.

Figure 7: The content of secondary metabolites in methanol extracts of *Satureja montana* before and after addition of DPPH. L – luteolin-7-O-glucoside, RK – rosmarinic acid, KR – carvacrol. Averages and SD are presented



Slika 8: Vsebnost sekundarnih metabolitov v metanolnih izvlečkih melise pred in po dodatku DPPH. L – luteolin-7-O-glukozid; RK – rožmarinska kislina. Predstavljena so povprečja in standardna deviacija.

Figure 8: The content of secondary metabolites in methanol extracts of *Melissa officinalis* before and after addition of DPPH. L – luteolin-7-O-glucoside, RK – rosmarinic acid. Averages and SD are presented.

4.5 KORELACIJE MED ANALIZIRANIMI PARAMETRI ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA

V Preglednici 27 so predstavljeni Pearsonovi koeficienti korelacije (r) med nekaterimi preiskovanimi parametri. Odebeljeno so označene močne ($r > 0,7$) in statistično značilne korelacije ($p < 0,05$). Ugotovili smo, da med posameznimi testi antioksidativnega delovanja (DPPH, ABTS in FRAP) obstaja močna povezava samo med DPPH in FRAP ($r = 0,7282$). Močno povezava je tudi med vsebnostjo rožmarinske kisline in DPPH ($r = -0,7028$), vsebnostjo flavonoidov in DPPH ($r = -0,6689$), vsebnostjo flavonoidov in FRAP ($r = 0,7297$) ter vsebnostjo fenolov in FRAP ($r = 0,6977$). Opazili pa smo nekaj zelo močnih povezav, kjer je bil Pearsonov koeficient nad 0,9. To so povezave ABTS in celokupni fenoli ($r = 0,9552$), ABTS in celokupni flavonoidi ($r = 0,9663$), ABTS in rožmarinska kislina ($0,9579$), celokupni fenoli in celokupni flavonoidi ($r = 0,9859$), celokupni fenoli in rožmarinska kislina ($r = 0,9094$) in celokupni flavonoidi in rožmarinska kislina ($r = 0,9220$).

Preglednica 27: Pearsonovi korelacijski koeficienti med analiziranimi parametri

Table 27: Pearson correlation matrix between analysed parameters

	DPPH	ABTS	FRAP	FENOLI	FLAVONOIDI	ROŽM. KISL.	L-7-O-GLUK.
DPPH							
ABTS	-0,66 0,0000						
FRAP	0,7282 0,0000	0,4581 0,0073					
FENOLI	-0,603 0,0001	0,9552 0,0000	0,6977 0,0000				
FLAVONOIDI	-0,6689 0,0000	0,9663 0,0000	0,7297 0,0000	0,9859 0,0000			
ROŽM. KISL.	-0,7028 0,0000	0,9579 0,0000	-0,0072 0,9684	0,9094 0,0000	0,9220 0,0000		
L-7-O-GLUK.	-0,3122 0,06	0,2397 0,1530	-0,3612 0,0389	0,0815 0,6315	0,0923 0,5868	0,4268 0,0084	

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 OCENA ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA Z METODO HPLC

Rastlinski zdravilni pripravki v različnih oblikah so že stoletja na voljo za uporabo pri lažšanju in zdravljenju mnogih bolezenskih stanj in velik del Zemljanov je še vedno odvisen od tradicionalnih zdravilnih sistemov. V zadnjem desetletju pa se je povečala uporaba rastlinskih pripravkov tudi v zahodni kulturi, kot odgovor na stranske učinke konvencionalnih (sintetskih) zdravil in v smislu »vračanja k naravi«. Pojavila se je potreba po združitvi tradicionalnih znanj z znanstvenimi dognanji o botaničnih, biokemijskih, farmakoloških in toksikoloških vidikih uporabe zdravilnih rastlin (Petrovick in sod., 1997). Temu sledi težnja po standardizaciji rastlinskih pripravkov ter zagotavljanju primerne kakovosti in varnosti naravnih proizvodov (Júnior in sod., 2011). Naravni pripravki so kompleksne mešanice spojin s pogosto neznanimi bioaktivnimi spojinami, podatki o stabilnosti spojin so pomanjkljivi, mehanizmi delovanja nepojasneni, podatkov o kliničnih testiranjih skoraj ni (Chan, 2003), večina pa je namenjena samozdravljenju. Znanstveniki in strokovnjaki z različnih področij so upravičeno zaskrbljeni nad povečano uporabo rastlinskih vrst, ki nimajo ovrednotene in dokazane biološke aktivnosti, navedb o potencialni toksičnosti, stranskih učinkih, varnosti in učinkovitosti (Júnior in sod., 2011).

Evropska farmakopeja izdaja priporočila in monografije za vrednotenje kakovosti in varnosti rastlinskih drog. V farmakopeji smo našli monografije za drogo žajblja, melise in materine dušice (posebej obstaja tudi za timijan), monografijo kraškega šetraja pa smo našli v ISO standardih. V ISO standardih obstaja tudi monografija za drogo žajblja. Zahteve farmakopeje in ISO standardov so podobne, predpisani testi so enaki, večinoma je enak tudi protokol, obstajajo pa razlike v mejnih vrednostih za tuje primesi in vsebnost vode, ki so v farmakopeji strožje.

Ovrednotili smo droge 2 akcesij žajblja, 4 akcesij šetraja iz narave in istih z laboratorijskega polja, 1 akcesijo melise, ki je bila prisotna samo na laboratorijskem polju, saj je bil genski vir na naravnem rastišču uničen, ter 2 akcesiji materine dušice. Vse droge v vsebnosti vode in pepela ustrezajo predpisanim zahtevam evropske farmakopeje, šetraj pa ISO standardu. Kakovost žajblja ustreza tudi zahtevam ISO standarda. Pri vrednotenju tujih primesi so bili vsi vzorci v predpisanih mejah. Ugotovili smo, da pri gojenih rastlinah tuje primesi niso problematične zaradi načina gojenja rastlin na foliji, pri nabiranju v naravi pa je čistota vzorca odvisna od nabiralca in njegove pozornosti. Za analitske in osebne namene vsebnost tujih primesi po našem mnenju ni problematična in težko presega najnižje zahtevane meje, je pa lahko problematična pri večjih nasadih in strojni žetvi.

Vsebnost eteričnih olj je povsod presegala predpisane najnižje vrednosti, razen akcesija materine dušice z naravnega rastišča N48, kjer je bila vsebnost malo pod mejo (2,78 ml/kg, določena meja pa 3,0 ml/kg). Razlog je v obliki vzorca, saj je bil sestavljen večinoma iz odcvetelih poganjkov, zato je vsebnost olja pričakovano nižja.

Pri žajblju smo vsebnost eteričnega olja vrednotili dvakrat. V sklopu vrednotenja kakovosti drog smo ugotovili, da se mlajše in starejše rastline značilno razlikujejo po vsebnosti eteričnih olj. Pri mlajših rastlinah smo določili 21,9 ml/kg olja, pri starejših pa 19,8 ml/kg. Rezultat ni presenetljiv, tudi Putievsky s sod. (1986) poroča o obratnosorazmernem odnosu med produkcijo olja in biomaso. V letu 2010 smo vzorce nabrali trikrat: maja v fazi pred cvetenjem, junija v fazi cvetenja in julija, ko so rastline že imele semena. Najvišjo vsebnost pri obeh akcesijah smo opazili v fazi cvetenja, potem pa je produkcija upadla.

Če primerjamo vsebnost eteričnega olja obeh genskih virov žajblja v letu 2009 in 2010, ugotovimo, da je bila v fazi cvetenja v letu 2010 višja produkcija olja pri obeh genskih virih. Pri mlajših rastlinah je bila vsebnost eteričnega olja večja od minimalno zahtevane za 18%, pri starejših pa za 19,8%. Razlogov za višjo vsebnost v letu 2010 je lahko več, saj produkcija eteričnih olj ni odvisna le od ekofizioloških in okoljskih dejavnikov, ampak je močno odvisna tudi od fiziologije cele rastline (Sangwan in sod., 2001). Perry in sod. (1999) so raziskovali vsebnost in sestavo eteričnega olja različnih akcesij žajblja s celega sveta, ki so jih gojili na Novi Zelandiji. Rezultati so pokazali, da na vsebnost in sestavo eteričnega olja vplivajo dejavniki, kot so genski vir, kemotip, čas nabiranja, rastlinski organ. Vsebnost olja je značilno variirala v odvisnosti od časa nabiranja in lokacije gojenja. Najvišja vsebnost eteričnega olja je bila ugotovljena v cvetovih, medtem ko je bila vsebnost v listih pri cvetočih rastlinah nižja.

Eterično olje šetrja smo določali po protokolu, ki je priporočen v ISO standardu za določanje hlapnih olj (ISO 6571:1984). Protokol predpisuje čas destilacije 5 ur (prav tako za žajbelj in timijan, ki se sicer po Evropski farmakopeji destilirata 2 uri). Naredili smo nekaj poskusnih destilacij in primerjali volumen eteričnega olja po 3 in 5 urah destilacije. Med volumnoma ni bilo razlik, zato smo preostale vzorce destilirali 3 ure. Italijanska farmakopeja, ki vsebuje monografijo za kraški šetrja, predpisuje čas destilacije 2 uri (Prieto in sod., 2007).

Eterično olje šetrja smo določali pri 4 akcesijah in primerjali vsebnost med naravnimi populacijami in gojenimi rastlinami. Barva eteričnega olja je bila od svetlo rumene, živo rumene, do oranžne in rjave. Višjo vsebnost eteričnih olj smo pričakovali pri vzorcih iz narave, kar se je zgodilo le pri dveh akcesijah, 27 in 30. Pri akcesiji 25 je bila vsebnost eteričnega olja enaka med obema lokacijama, pri akcesiji 46 pa je bila višja na laboratorijskem polju. Kljub temu, da pri akcesiji 25 ni bilo pričakovanih razlik med naravno populacijo in gojenimi rastlinami, je bila vsebnost olja na laboratorijskem polju najvišja, torej bi za namene izkoriščanja eteričnega olja lahko priporočili gojenje akcesije 25 (BF 25).

Predpisi Evropske farmakopeje se nanašajo predvsem na identifikacijo in ekonomsko vrednost drog, ne pa tudi na uporabno vrednost drog. Tako npr. pri žajblju predpisuje preverjanje prisotnosti tujona in 1,8-cineola, ki vplivata na osrednji živčni sistem. Kronični

vnos tujonov, ki so sicer glavna sestavina eteričnega olja, lahko privede do trajnih poškodb osrednjega živčnega sistema in povzroča epileptične napade in demenco (Bernotienė in sod., 2008). Raziskave pa kažejo, da sta vsebnost eteričnega olja in tujona obratno sorazmerni (Perry in sod., 1999; Putievsky in sod., 1986). Perry in sod. (1999) so v raziskavi spreminjanja vsebnosti eteričnega olja in njegove sestave tekom rastne dobe ugotovili, da vsebnost tujona od marca, ko predstavlja 40% eteričnega olja, drastično upade in doseže decembra 25%. Tako je med cvetenjem vsebnost tujona minimalna in povsem nenevarna, tako da predpis v farmakopeji nima posebnega praktičnega pomena. Bolj primerno bi bilo vpeljati dodatne teste, ki bi ne samo ovrednotili kakovost droge, ampak tudi pokazali njen najprimernejši način uporabe. Pri drogah ustnatic, ki bi jih uporabili za pridobivanje naravnih antioksidantov, bi tako bilo bolj primerno določanje vsebnosti rožmarinske kisline, ki se je izkazala kot vodilna spojina z antioksidativnim delovanjem. V primeru žajblja bi bil lahko vključen test ursolne kisline, ki je glavna nosilka protivnetnega delovanja (Baričevič in sod., 2001; Baričevič in Bartol, 2000).

Problematična je tudi izvedba nekaterih metod in uporaba toksičnih topil. Za določanje vode je predpisana azeotropska metoda, ki za vsak vzorec zahteva porabo 200 ml toluena. Z zavedanjem napake, smo namesto azeotropske metode, za določanje vode v drogi uporabili metodo sušenja pri 105°C. Vsebnost vode je pomemben parameter kakovosti droge, vendar menimo, da so odstopanja rezultatov med eno in drugo metodo manjša kot pa je verjetnost, da bomo zaradi uporabe druge metode potrdili neprimerno drogo za kakovostno. V primeru mejnih vrednosti, bi lahko vsebnost preverili še po predpisani metodi.

Uporaba tankoplastne kromatografije (TLC) je hitra in preprosta, vendar v današnjih časih primerna zgolj za hiter pregled vzorcev. HPLC metoda je veliko bolj natančna in poda več informacij. S primerno HPLC metodo bi tako lahko v krajšem času in naenkrat dobili informacije o sestavi in kakovosti droge ter o njeni najprimernejši uporabi.

5.1.2 Vrednotenje antioksidativne aktivnosti rastlinskih drog

Znanstveno zanimanje za naravne antioksidante za uporabo v prehrani in medicini se je v zadnjih letih močno povečalo (Kranl in sod., 2005), predvsem zaradi strožjih varnostnih direktiv v nekaterih državah in omejevanja ali prepovedi uporabe umetnih antioksidantov (Michielin in sod., 2011). Za ocenjevanje antioksidativne aktivnosti spojin in kompleksnih mešanic kot so rastlinski izvlečki, je na voljo mnogo metod (Antolovich in sod., 2002), za razlago mehanizmov delovanja pa uporaba ene same metode ni dovolj, saj ne omogoča natančnih in zanesljivih zaključkov o mehanizmih delovanja (Michielin in sod., 2011; Dorman in sod., 2003). Mehanizme antioksidativnega delovanja lahko določimo le z uporabo več komplementarnih metod (Michelin in sod., 2011, Kranl in sod., 2005).

Najpogosteje uporabljane metode so DPPH, ABTS in FRAP, ki zaradi preproste in hitre izvedbe velikokrat predstavljajo prvi test pri iskanju novih naravnih antioksidantov in pridobivanju osnovnih informacij o sposobnosti lovljenja prostih radikalov posamezne spojine ali mešanice spojin. Prosta radikala DPPH[•] in ABTS^{•+} sta sintetična in nista biološko relevantna, uporabljata se kot indikatorja pri testiranju sposobnosti oddajanja vodika in s tem antioksidativnega potenciala. Rezultati testov lovljenja prostih radikalov pokažejo sposobnost ekstraktov, da preprečijo delovanje reaktivnih radikalskih spojin s tem, da oddajo svoje elektrone ali vodikove atome (Halliwell, 1994).

V večini raziskav antioksidativnega delovanja ustnatic sta kot topilo uporabljena metanol ali aceton. Takšni ekstrakti vsebujejo tudi nekaj eteričnega olja (Peltoketo in sod., 2001; cit. Dorman in sod., 2003). V naši raziskavi smo izvedli vse tri metode na metanolnih (80%), etanolnih (70%) in vodnih izvlečkih. Pred pričetkom analiz smo opravili preliminarne teste DPPH z različnimi koncentracijami metanola (100%, 80%, 40%), etanola (96%, 70%, 40%) in vode. Najboljše rezultate in razlike med vzorci smo dobili pri 80% metanolu in 70% etanolu, zato smo nadaljnje raziskave izvedli na teh koncentracijah topil. Voda se ni vedno izkazala kot primerno topilo, sploh pri šetrju, kjer so bili pridobljeni rezultati zaradi njihove neponovljivosti popolnoma neprimerni za kakršnokoli zanesljivo statistično analizo. V primeru testiranja vodnih izvlečkov bi bilo na podlagi naših izkušenj najprimerneje standardizirati postopek ekstrakcije s pomočjo Soxhletovega aparata.

Testa DPPH in FRAP smo izvedli na 96-luknjičastih mikrotitrskih ploščah, ABTS pa v 4 ml kivetah. Pri vseh testih smo kot standardno spojino uporabili Troloks, ekvivalent vitamina E, in rezultate izrazili kot TEAC vrednost. Pri DPPH testu se večinoma izrazi rezultate kot % inhibicije DPPH radikala ali kot vrednost IC₅₀, vendar se nam je TEAC vrednost zdela primernejša in lažja za primerjavo med vzorci in drugimi študijami. Različno izražanje rezultatov je eden večjih problemov interpretacije antioksidativnega delovanja različnih vrst, saj raziskovalne skupine uporabljajo različne standardne spojine (npr. askorbinsko kislino) kot ekvivalente antioksidativnega potenciala. Rezultatov ni mogoče primerjati tudi zaradi nepoenotnih protokolov nabiranja rastlin, sušenja, shranjevanja, priprave izvlečkov (način ekstrakcije, uporabljena topila, temperatura in svetloba v procesu ekstrakcije itd.) ter nato izvedbe testa.

Vse preiskovane vrste so imele visok antioksidativni potencial, kar je bilo pričakovano, saj so ustnatice znane kot dober vir naravnih antioksidantov. Pri DPPH testu je pokazal najvišji antioksidativni potencial šetrja (13,59 – 14,79 mM TEAC/g SS), sledil je žajbelj (11,48 – 13,54 mM TEAC/g SS) in nato melisa z 9,74 mM TEAC/g SS. Pri žajblju ni bilo razlik v antioksidativnem potencialu med razvojnimi fazami. Vse tri rastlinske vrste pa so imele značilno višje izraženo antioksidativno aktivnost pri metanolnih izvlečkih v primerjavi z etanolnimi.

ABTS test je ena najpogosteje uporabljenih metod za ocenjevanje sposobnosti lovljenja prostih radikalov. Tako kot DPPH je metoda hitra in preprosta, njena slabost pa je odvisnost rezultatov od testnih pogojev, zato prihaja do razlik v TEAC vrednostih preiskovanih antioksidantov (npr. kvercetin) celo pri enakih eksperimentalnih pogojih in isti koncentraciji antioksidanta (Berg van den in sod., 1999). Razlog za variabilnost rezultatov je nepopolna reakcija antioksidanta z ABTS^{•+} v običajno priporočenih 6 minutah inkubacije, kar večinoma vodi v podcenjevanje pravega potenciala antioksidantov. Referenčna spojina TEAC testa je troloks, ki reagira z ABTS zelo hitro (prej kot v 6. minutah); 1.9 μmol ABTS^{•+} reagira z 1 μmol troloksa (Arts in sod., 2004).

Pri testu ABTS smo ugotovili zelo podobno sposobnost lovljenja radikalov pri žajblju in šetraju, melisa pa je močno izstopala s 135 mM TEAC/gSS. Najnižjo antioksidativno aktivnost, merjeno s testom ABTS pri šetraju smo določili pri akcesiji N30, ki je imela pri testu DPPH najvišjo aktivnost. Primerjava testov DPPH in ABTS včasih pokaže ravno obratne rezultate; to je ugotovil tudi Erkan s sod. (2008) pri primerjavi standardnih spojin karnozolne in rožmarinske kisline, ki sta imeli pri obeh testih ravno obraten rezultat. Razlike verjetno izvirajo iz specifičnih interakcij spojin z enim ali drugim prostim radikalom, vzrok pa je pogosto nepojasnen.

Primerjava ekstrakcijskih topil pri testu ABTS je pokazala značilno višjo aktivnost pri metanolnih in etanolnih izvlečkih v primerjavi z vodnimi, med etanolnimi in metanolnimi pa ni bilo razlik. Pri šetraju je bila značilno višja antioksidativna aktivnost prisotna pri etanolnih izvlečkih, medtem ko pri melisi razlik med topili ni bilo. Antioksidativna aktivnost metanolnih izvlečkov je najverjetneje posledica prisotnosti fenolnih spojin, kot je rožmarinska kislina, drugih fenolnih kislin in flavonoidov ali terpenov. Vodni ekstrakti na drugi strani vsebujejo večinoma polarne spojine, kot so flavonoidi in glikozidi (Robinson, 1963; cit. po Kintzios in sod., 2010).

FRAP test je test redukcijske sposobnosti ekstraktov, ki kaže na pomemben mehanizem delovanja fenolnih antioksidantov. Izvlečki so sposobni oddati elektrone, torej jih lahko oddajo reaktivnim radikalom in jih spremenijo v stabilno ali manj reaktivno obliko (Dorman in sod., 2003). Lahko se uporablja tako pri vodnih kot alkoholnih izvlečkih rastlin (Li in sod., 2008).

S testom FRAP smo ocenjevali samo potencial šetraja in žajblja. Metanolni ekstrakti šetraja so imeli značilno višjo redukcijsko sposobnost. Podobno kot pri DPPH testu smo opazili, da je imel par akcesij 25 in 27 boljše antioksidativno delovanje pri vzorcih iz narave (N25, N27) kot pri vzorcih z laboratorijskega polja (BF25, BF27). Par 30 in 46 pa je imel značilno višjo antioksidativno aktivnost pri vzorcih z laboratorijskega polja v primerjavi s prej omenjenima vzorcema BF25 in BF27. Tako lahko na osnovi rezultatov pridobljenih z metodama DPPH in FRAP zaključimo, da sta genska vira šetraja 30 in 46 najbolj primerna za gojenje v osrednjem delu Slovenije, saj imata primerljivo/enako

aktivnost kot izvorne rastline z naravnega rastišča, medtem ko je pri paru akcesij 25 in 27 aktivnost na laboratorijskem polju v obeh metodah značilno nižja od aktivnosti z naravnih rastišč in nižja tudi od para BF30 in BF46.

Celokupne fenole smo določili s Folin – Ciocalteu reagentom. Najvišjo vsebnost celokupnih fenolov smo določili pri etanolnih izvlečkih melise (125,94 – 129,83 mgGAE/gSS), sledila sta žajbelj in materina dušica, najmanj fenolov pa je bilo v ekstraktih kraškega šetraja. Pri žajblju, šetraju in melisi so bili rezultati pri metanolnih izvlečkih značilno višji od etanolnih ali vodnih. Ekstrakcija fenolnih spojin iz rastlinskega materiala je odvisna od različnih dejavnikov, kot so polarnost topila, velikost delcev, načina ekstrakcije in pogojev ekstrakcije (Luthria in sod., 2006). Po mnenju Pinela in sod. (2006) je najprimernejša temperatura za ekstrakcijo fenolnih spojin 50°C in ne višje zaradi njihove termolabilnosti. Mnogi avtorji navajajo, da so nekateri najbolj učinkoviti antioksidanti zelo nestabilni in odvisni od temperature, svetlobe, kisika in uporabljenega ekstrakcijskega topila (Santos-Gomes in sod., 2002). Strukturna raznolikost fenolnih spojin, različna pojavnost (fenoli se lahko nahajajo v različnih oblikah: konjugirani, polimerni, tvorijo komplekse s proteini ali drugimi rastlinskimi komponentami) skupaj z neenakomerno porazdelitvijo v rastlinskih tkivih, otežuje razvoj enotne metode ekstrakcije fenolov (Luthria in sod., 2006).

Vsebnost flavonoidov je najvišja pri melisi (1998,63 mgCA/100gSS pri metanolnih izvlečkih in 1954 mgCA/100gSS pri etanolnih), sledil je žajbelj, pri katerem je bila najvišja vsebnost flavonoidov določena pri mlajših rastlinah v fazi po cvetenju (355,63 mgCE/100gSS) in nato šetraj.

Analiza korelacij med določenimi parametri kakovosti je pokazala zelo močno korelacijo med vsebnostjo fenolnih spojin in ABTS testi antioksidativne aktivnosti, korelacijo med flavonoidi ter celokupnimi fenoli in ABTS testi antioksidativne aktivnosti; korelacijo med rožmarinsko kislino in ABTS testi antioksidativne aktivnosti in korelacijo med vsebnostjo fenolov in flavonoidov. Šibkejšje korelacije pa so bile med DPPH testi antioksidativne aktivnosti in flavonoidi, med DPPH testi antioksidativne aktivnosti in rožmarinsko kislino, testi antioksidativne aktivnosti DPPH in FRAP testi antioksidativne aktivnosti ter med vsebnostjo fenolov in FRAP testi antioksidativne aktivnosti.

Korelacije med DPPH in FRAP testov antioksidativne aktivnosti nakazujejo, da so antioksidanti v teh rastlinah sposobni loviti proste radikale (DPPH) in reducirati oksidante (FRAP). Korelacije med vsebnostjo fenolov ter flavonoidov in testnimi metodami so bile pričakovane, saj so fenoli odgovorni za antioksidativno aktivnost ustnatic. Tudi Dorman in sod. (2003) navajajo, da so bili najbolj aktivni v testiranju antioksidativnega potenciala izvlečki žajblja in rožmarina, ki so imeli tudi najvišjo vsebnost celokupnih fenolov. Najnižjo vsebnost fenolov je imel timijan, ki je imel tudi najmanjši antioksidativni potencial (Dorman in sod., 2003).

5.1.3 Vsebnost sekundarnih metabolitov v izvlečkih rastlinskih drog

S HPLC metodo smo analizirali sestavo izvlečkov rastlinskih drog. Identificirali in ovrednotili smo 5 spojin: luteolin-7-O-glukozid, rožmarinsko kislino, karnozolno kislino in karnozol ter karvakrol. Pri žajblju smo identificirali luteolin-7-O-glukozid, rožmarinsko kislino, karnozolno kislino in karnozol; pri šetrajju luteolin-7-O-glukozid, rožmarinsko kislino in karvakrol, pri melisi pa luteolin-7-O-glukozid in rožmarinsko kislino. Kromatogram je razkril tudi prisotnost drugih spojin, ki pa niso ustrezale razpoložljivim standardom in jih nismo mogli identificirati.

Pri vseh rastlinah je prevladovala rožmarinska kislina. Enako sta ugotovila Zgórká in Główniak (2001) na Poljskem pri raziskavi fenolnih spojin pri ustnaticah, v katero so bili vključeni tudi žajbelj, melisa, timijan (*Thymus vulgaris*) in vrtni šetraj (*Satureja hortensis*). Tudi Kosar s sodelavci (2005) poroča o enakem rezultatu pri ekstraktih bazilike (*Ocimum basilicum* L.), navadne dobre misli (*Origanum vulgare* L.), žajblja, šetraja, timijana in rožmarina.

Največ rožmarinske kisline je bilo v ekstraktih melise (467,64 mg/100g), žajbelj in materina dušica sta imela podobno vsebnost rožmarinske kisline, najmanj pa je vseboval šetraj. V raziskavi Zgórká in Główniak (2001) je bil vrstni red enak, le da je imel najvišjo vsebnost vrtni šetraj. V raziskavi Kosar in sod. (2005) pa je imel najvišjo vsebnost rožmarinske kisline vrtni timijan, šetraj in žajbelj pa sta imela podobno vsebnost rožmarinske kisline. Rožmarinska kislina ima v rastlinah vlogo obrambne spojine pred patogeni in herbivori, njena prisotnost v zdravilnih rastlinah in začimbah pa ima koristne in blagodejne učinke tudi za človeka (Petersen in Simmonds, 2003).

Pri žajblju smo identificirali in ovrednotili vsebnost 4 spojin. Najvišjo vsebnost je imela rožmarinska kislina, in sicer med 76,3 in 139,1 mg/100g. Podobne rezultate sta dobila tudi Zheng in Wang (2001), ki sta določila povprečno vsebnost rožmarinske kisline 117,8 mg/100g.

V nadaljevanju smo želeli ugotoviti, katere spojine prispevajo k antioksidativnemu delovanju. Koleva in sodelavci (2000) so razvili on-line HPLC-DPPH presejalno metodo za določanje antioksidativnega potenciala kompleksnih mešanic spojin. Največja prednost te metode je hitra identifikacija spojin, ki delujejo kot lovilci prostih radikalov. Vzorec se najprej loči na posamezne spojine, potem se dovede metanolna raztopina DPPH[·] in spere skupaj z ločenim vzorcem preko dodatne kolone. Antioksidanti reagirajo z DPPH[·] v sklopljeni koloni. Absorpcija DPPH se spremlja pri 517 nm; po redukciji z antioksidanti absorbanca upade. Hitrejši kot je upad absorbance, večjo sposobnost oddajanja vodikov ima spojina. Na mestu spojin, ki so udeležene v lovljenju prostih radikalov, dobimo negativne vrhove (Koleva in sod., 2000; Sarker in sod., 2004; Kosar in sod., 2003). Metoda je hitra in zanesljiva, zahteva pa prilagojeno opremo.

V naši raziskavi smo uporabili kombinacijo klasične HPLC in online HPLC-DPPH analize. Najprej smo posneli kromatogram izvlečkov, nato dodali raztopino DPPH radikala in po polurni inkubaciji posneli kromatogram mešanice. Kromatograma pred in po dodatku DPPH smo primerjali in ugotovili, da je bila najbolj antioksidativno aktivna spojina rožmarinska kislina. Pri žajblju se je njena vsebnost zmanjšala za 65%, pri šetrajju za 56%, pri melisi pa kar za 76%. Visoko protiradikalno aktivnost je imela tudi karnozolna kislina pri žajblju (- 74%) in karvakrol pri šetrajju (- 49%). Luteolin-7-O-glukozida pri šetrajju in melisi po dodatku DPPH radikala nismo detektirali, pri žajblju pa je bila vsebnost po inkubaciji z DPPH radikalom manjša za 36%.

Erkan in sod. (2008) so primerjali antioksidativno aktivnost čistih spojin (rožmarinska kislina in karnozolna kislina) ter izvlečke rožmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) in črne kumine (*Nigella sativa* L.). Ugotovili so, da je imela v testu DPPH najvišjo antioksidativno aktivnost standardna spojina karnozolna kislina, rožmarinska kislina pa je imela celo nižjo aktivnost kot izvleček rožmarina. Primerjava aktivnosti med čistima spojinama je dala nepričakovan rezultat, saj je bila pričakovana višja aktivnost pri rožmarinski kislini, ki ima 4 hidroksilne skupine, karnozolna kislina pa le 2. Podobne nepričakovane rezultate so dobili tudi drugi raziskovalci, kar nakazuje, da število hidroksilnih skupin in struktura molekule nista edina faktorja, ki prispevata k antioksidativnemu delovanju (Erkan in sod., 2008). Pomembno vlogo imajo tudi druge prisotne funkcionalne skupine v molekuli ter njihove konjugacije z OH- in ketonskimi skupinami (Rice-Evans in sod., 1996). Zaradi raznolikosti in kompleksnosti mešanic fenolnih spojin v rastlinskih ekstraktih, je težko določiti vse komponente ekstrakta in njihovo antioksidativno aktivnost ter jo primerjati med seboj (Zhen in Wang, 2001).

Kranl in sod. (2005) so testirali antioksidativno delovanje 12 živilskih aditivov (med njimi BHA in BHT) ter 6 naravnih antioksidantov, ki so imeli do 16x boljše antioksidativno delovanje v primerjavi z že uveljavljenimi aditivi. Najboljše delovanje sta imela rožmarinska kislina in galna kislina, ki sta obe zelo primerni alternativni umetnim antioksidantnim aditivom.

Na podlagi vseh pridobljenih rezultatov lahko zaključimo, da so analizirane rastline dober in perspektiven vir naravnih antioksidantov. Za njihovo uporabo v prehrani bi bilo potrebno optimizirati ekstrakcijske pogoje z etanolom, saj metanol za prehranske izdelke ni primeren. Zavedamo se, da so *in vitro* testi le pokazatelj potenciala, ne dajejo pa biološko relevantnih informacij. Za določanje *in vivo* delovanja antioksidantov ni dovolj raziskati le reaktivnosti naravnih produktov na specifične radikale, upoštevati je treba tudi razpoložljivost, distribucijo, farmakodinamiko in farmakokinetiko potencialnih antioksidantov in nenazadnje, njihove interakcije s celičnimi elementi (Kosar in sod., 2005).

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Ustnatice (Lamiaceae) so velika družina zdravilnih in aromatičnih rastlin, kamor spadajo med drugim tudi rožmarin, žajbelj, meta, melisa, materina dušica, navadna dobra misel in šetraj, ki so v slovenskem prostoru dobro poznane vrste in pogosto uporabljane v kulinariki in pri lažšanju blažjih bolezenskih stanj. Družina je znana po visoki produkciji eteričnih olj, ki dajejo rastlinam značilen vonj in okus ter prispevajo k njihovemu terapevtskemu delovanju.

Čeprav so ustnatice dobro raziskane z različnih vidikov, pa o slovenskih genskih virih, njihovi biokemijski sestavi in potencialni uporabi v različne namene ni dosti znanega. V naši raziskavi smo preučili slovenske genske vire štirih vrst ustnatic: žajblja (*Salvia officinalis* L.), kraškega šetraja (*Satureja montana* L.), melise (*Melissa officinalis* L.) in materine dušice (*Thymus* spp.). Raziskava je obsegala dva sklopa: vrednotenje kakovosti drog po priporočilih Evropske farmakopeje in ocenjevanje antioksidativnega delovanja rastlinskih drog. Genski viri so bili popisani v okolici Petrinj, Socerba, Senožec in Divače. Iz nabranih semen smo vzgojili sadike in jih gojili na eksperimentalnem polju Biotehniške fakultete v Ljubljani, saj smo želeli primerjati kakovost in antioksidativno učinkovitost gojenih rastlin in rastlin z naravnih rastišč.

Pri vrednotenju kakovosti rastlinskih drog smo sledili priporočilom in metodam, ki jih predpisuje Evropska farmakopeja. Za šetraj smo priporočila poiskali med ISO standardi, ker monografije za drogo šetraja (še) ni v farmakopeji. Določili smo vsebnost vode, celokupnega pepela in v klorovodikovi kislini netopnega pepela in vsebnost eteričnih olj. Vse rastlinske vrste so po kakovosti ustrezale farmakopejskim zahtevam. Eterična olja so v vseh primerih presegala najnižjo priporočeno vsebnost. Pri žajblju smo ugotovili, da je vsebnost eteričnega olja višja pri mlajših rastlinah. Te presegajo najnižjo zahtevano farmakopejsko določeno mejo (15 ml/kg) za 31,5%, pri starejših rastlinah pa je meja presežena za 25%. Preučevanje spreminjanja vsebnosti eteričnega olja žajblja skozi različne fenološke faze je pokazalo, da je vsebnost eteričnega olja droge najvišja v fazi cvetenja. V tej fazi razvoja je pri mlajših rastlinah farmakopejska meja presežena za 44%, pri starejših pa za 39%. Če želimo imeti kakovostno drogo z visoko vsebnostjo eteričnih olj, moramo torej nabrati liste žajblja mlajših rastlin v juniju, ko so rastline v polnem razcvetu. Za gojenje šetraja z visoko vsebnostjo eteričnega olja pa je najbolj primerna akcesija 25.

Antioksidativno delovanje drog smo vrednotili na metanolnih, etanolnih in vodnih izvlečkih s testi DPPH, ABTS in FRAP. Določili smo tudi vsebnost celokupnih fenolov in celokupnih flavonoidov. Melisa je imela najvišjo antioksidativno aktivnost pri testih ABTS

in FRAP ter najvišje vsebnosti celokupnih fenolov (125,94 – 129,86 mgGAE/gSS) in flavonoidov (1678,84 – 1998,63 mgCE/100gSS). Antioksidativni potencial žajblja in šetraja je bil približno enak. Metanolni izvlečki so bili bolj učinkoviti od etanolnih ali vodnih, tudi izkupiček ekstrakcije fenolov in flavonoidov je bil boljši pri metanolnih izvlečkih. Kot najbolj primerni akcesiji šetraja za gojenje v osrednji Sloveniji sta se izkazali akcesiji 30 in 46, ki sta imeli najboljšo antioksidativno delovanje izmed vseh 4 akcesij, antioksidativna aktivnost pa se ni razlikovala med vzorci iz narave in vzorci z laboratorijskega polja.

Z visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo (HPLC) smo preučili sestavo 80% metanolnih izvlečkov. Vodilna spojina v vseh izvlečkih je bila rožmarinska kislina, v vseh vzorcih je bil prisoten tudi luteolin-7-O-glukozid, pri žajblju še karnozol in karnozolna kislina, pri šetrajju pa karvakrol. Z metodo HPLC-DPPH smo identificirali spojine, ki prispevajo k antioksidativni aktivnosti izvlečkov. Primerjali smo kromatograme izvlečkov pred in po dodatku DPPH in ugotovili, da je bila najbolj aktivna spojina rožmarinska kislina. Pri žajblju se je njena vsebnost zmanjšala za 65%, pri šetrajju za 56%, pri melisi pa kar za 76%. Visoko protiradikalno aktivnost je imela tudi karnozolna kislina pri žajblju (-74%) in karvakrol pri šetrajju (-49%).

Pri raziskavi smo odkrili nekaj zelo močnih statistično značilnih medsebojnih zvez: ABTS in celokupni fenoli ($r = 0,9552$), ABTS in celokupni flavonoidi ($r = 0,9663$), ABTS in rožmarinska kislina ($r = 0,9579$), celokupni fenoli in celokupni flavonoidi ($r = 0,9859$), celokupni fenoli in rožmarinska kislina ($r = 0,9094$) in celokupni flavonoidi in rožmarinska kislina ($r = 0,9220$).

6.2 SUMMARY

Lamiaceae is a large family of medicinal and aromatic plants, including rosemary, sage, mint, lemon balm, thyme, oregano and winter savory. In Slovenia these are well known species and are often used for cooking and for the relief of mild health disorders. Family is known for high production of essential oil of specific odour and taste which is often used for therapeutic purposes.

Although the Lamiaceae family has been well researched from different perspectives, there are not many publications on Slovene accessions, their biochemical composition and their various usage potential. Our research has been focused on four slovene accessions of Lamiaceae family: sage (*Salvia officinalis* L.), winter savory (*Satureja montana* L.), lemon balm (*Melissa officinalis* L.) and wild thyme (*Thymus* spp.). The research has been divided into two sections: evaluation of drug quality following European Pharmacopoeia recommendations and assessment of antioxidative activity of herbal medicines. Different accessions were identified in the area around localities of Petrinje, Socerb, Senožeče and Divača. Seeds were harvested from plants in their natural habitats and were cultivated on the experimental field of the Biotechnical Faculty in Ljubljana because we wanted to compare the quality and antioxidative potential of cultivated plants with those from natural habitats.

When evaluating the quality of herbal medicines, we followed the recommendations and methods, described by the European Pharmacopoeia. For savory, we sought for the recommendations in the ISO standards, because the drug monograph has not (yet) been included in the European pharmacopoeia. The water content, the content of total ash and in the hydrochloric acid insoluble ash, as well as the essential oil content, were determined. All plant species met pharmacopoeial quality requirements. Essential oils exceeded minimum pharmacopoeia's recommended level in all cases. In sage, essential oil content was higher in younger plants population. The values exceeded the limit, determined by the European pharmacopoeia (15 ml / kg) by 31.5% in younger plants and by 25% in older plants. The analysis of essential oil content during different phenological phases showed the highest content of essential oil in the blooming phase. In younger sage plants, the pharmacopoeial limit was exceeded by 44% whereas in elderly plants by 39%. For a good quality drug with a high content of essential oils, we therefore recommend to collect the young leaves of plants in June, when the plants are in full bloom. For the cultivation of savory with the highest essential oil content accession 25 appeared to be the most suitable.

Antioxidant activity of drugs was evaluated in methanol, ethanol and water extracts with DPPH test, ABTS and FRAP. The content of total phenols and total flavonoids has been determined. Lemon balm had the highest antioxidant activity in ABTS and FRAP assays, and the highest content of total phenols (from 125.94 to 129.86 mgGAE/gDW) and flavonoids (from 1678.84 to 1998.63 mgCE/100gDW). Antioxidant potentials of sage and

winter savory were about the same range. Methanolic extracts were more effective with regards to ethanol or water extracts. Extraction yields of phenols and flavonoids were the highest in methanolic extracts. The most suitable accessions of winter savory for cultivation in central Slovenia are 30 and 46, having the highest antioxidant activity among all four accessions. Antioxidant activity did not differ between samples from the natural habitat and samples from the experimental field.

The composition of 80% methanol extracts has been examined by high performance liquid chromatography (HPLC). The leading compound in all extracts was rosmarinic acid. In all samples also luteoline-7-O-glucoside was detected, carnosol and carnosic acid were detected only in sage extracts and carvacrol only in winter savory extracts. With DPPH-HPLC method, we have identified compounds contributing to the antioxidant capacity of extracts. The chromatograms of extracts before and after the addition of DPPH radical were compared and the most active compound was found to be rosmarinic acid. After addition of DPPH, the content of rosmarinic acid in sage decreased by 65%, in winter savory by 56%, and in lemon balm by as much as 76%. Carnosic acid in sage extract (-74%) and carvacrol in winter savory extract (-49%) also showed significant radical scavenging activity.

Our research study revealed some very strong, statistically significant correlations: ABTS antioxidative activity and total phenols content ($r = 0.9552$), ABTS antioxidative activity and total flavonoids content ($r = 0.9663$), antioxidative activity and rosmarinic acid content (0.9579), total phenols and total flavonoids contents ($r = 0.9859$), total phenols and rosmarinic acid contents ($r = 0.9094$) and total flavonoids and rosmarinic acid contents ($r = 0.9220$).

VIRI

- Antolovich M., Prenzler P. D., Patsalides E., Mc Donald S., Robards K. 2002. Methods for testing antioxidants activity. *Analyst*, 127: 183-198
- Artiges A. 2001. The role of pharmacopoeias in international harmonisation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24 (5-6): 769-772
- Arts M.J.T.J., Dallinga J.S., Voss H.-P., Haenen G.R.M.M., Bast A. 2004. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chemistry*, 88: 567-570
- Aruoma, O.L. 1998. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem*, 75: 199-212
- Avato P., Fortunato I.M., Ruta C., D'Elia R. 2005. Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L. *Plant Science*, 169: 29-36
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475
- Bandaranayake WM. 2006. Quality control, screening, toxicity and regulations of herbal drugs. V: Ahmad I, Aquil F and Owais M (eds) *Modern Phytomedicine: Turning medicinal plants into drugs*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co: 25-57
- Baričević D. 2008. Measures for conservation on MAPs and their habitats in Europe. V: *5th Conference on medicinal and aromatic plants of southeast European countries, 2.-5.9. 2008, Brno, Czech Republic : proceedings*. Brno: Mendel University of Agriculture and Forestry, 2008, str. 1-5.
- Baričević D., Bartol T. 2000. The biological and pharmacological activity of the *Salvia* genus. V: Sage: the genus *Salvia*. Kint-zios, S. E. (ed.). Harwood Academic Publishers, Amsterdam, p. 143-184
- Baričević D., Bernáth J., Maggioni L., Lipman E. 2004. Report of a Working Group on Medicinal and Aromatic Plants. First meeting, 12-14 September 2002, Gozd Martuljek, Slovenia.
- Baričević D., Ratajc P., Zupan M., Turk B., Hodnik A., Vreš B., Seliškar A., Seliškar T. 2010. Ohranjanje in vrednotenje genskih virov zdravilnih rastlin. V: Slovenska rastlinska genska banka v mednarodnem letu biodiverzitete : knjiga povzetkov, [Ljubljana, 19. oktobra 2010]. Vladimir Meglič (ur) Ljubljana.Kmetijski inštitut Slovenije. 41 str.
- Baričević D., Sosa S., Della Loggia R., Tubaro A., Simonovska B., Krasna A in Zupančič A. 2001. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology* 75: 125-132

- Barnes J, Anderson L.A., Phillipson J.D. 2007. Herbal Medicines. A Guide for Healthcare Professionals. Third Edition. London, Pharmaceutical Press: 710 str.
- Benzie I.F.F., Strain J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239:70-76
- Berg van den R., Haenen G. R. M. M., Berg van den H., Bast A. 1999. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, 66: 511–517
- Bouayed J., Piri K., Rammal H., Dicko A., Desor F., Younos C. in Soulimani R. 2007. Comparative evaluation of the antioxidant potential of some Iranian medicinal plants. *Food Chemistry* 104: 364–368
- Boudet A.M. 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. Review. *Phytochemistry*, 68: 2722–2735
- Bravo L. 1998. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56: 317–333
- Busse W. 2000. The significance of quality for efficacy and safety of herbal medicinal products. *Drug Information Journal*, 34: 15–23
- Calixto J.B. 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Microbiology*, 33: 179-189
- Canter P.H., Thomas H., Ernst E. 2005. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *Trends in Biotechnology* 23(4): 180-185
- Capasso R., Angelo A. Izzo A. A., Pinto L., Bifulco T., Vitobello C., Mascolo N. 2000. Phytotherapy and quality of herbal Medicines. *Fitoterapia*, 71: S58-S65
- Capecka E., Mareczek A., Leja M. 2005. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. *Food Chemistry* 93 (2): 223-226
- Carnat, AP, Carnat, A, Fraisse, D, and Lamaison, JL. 1998. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L, subsp *officinalis*) tea. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 72(5): 301-305
- Choi D.W, Kim J.H., Cho S.Y., Kim D.H., Chang S.Y. 2002. Regulation and quality control of herbal drugs in Korea. *Toxicology*, 181-/182: 581-586
- Chun S-S., Vatter D., Lin Y-T, Shetty K. 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry* 40: 809-816

- Chung K., Wong T., Wei C., Huang Y., Lin Y. 1998. Tannins and human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38: 421-464
- Crozier A. 2006. *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in human diet*. Oxford, Ames, Carlton, Blackwell: 372 str.
- Cuvelier, M. E., Berset, H., in Richard, H. 1996. Antioxidative activity of phenolic compounds of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of American Oil Chemical Society* 73: 645–652
- Dastmalchi, K.; Damien Dorman, H.J.; Oinonen, P.P.; Darwis, Y.; Laakso, I.; Hiltunen, R. 2008. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT - Food Science and Technology*, 41(3): 391-400
- Direktiva 2004/24/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 31. marca 2004 o spremembi Direktive 2001/83/ES o Kodeksu Skupnosti o zdravilih za uporabo v humani medicini glede tradicionalnih zdravil rastlinskega izvora. (ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol-1/dir_2004_24/dir_2004_24_sl.pdf)
- Dorman H. J. D., Peltoketo A., Hiltunen R., Tikkanen M. J. 2003. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*, 83: 255–262
- Duthie G., Crozier A. 2000. Plant derived phenolic antioxidants. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 3: 447-451
- Dweck AC, 2000. The folklore and cosmetic use of various *Salvia* species. V: Kintzios SE (Ed.), *SAGE - The Genus Salvia*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 1-25
- Erkan N., Ayranci G., Ayranci E. 2008. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110: 76–82
- ESCOP monographs on the medicinal uses of plant drugs. 1997. Exeter, ESCOP (the European Scientific Cooperative on Phytotherapy): 570 str.
- European pharmacopoeia 5.0. 2004. 5. izdaja. Strassbourg, Council of Europe: 2416 str.
- Fecka I., Turek S. 2008. Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chemistry* 108: 1039–1053
- Fennell C.W., Light M.E., Sparg S.G., Stafford G.I., J. van Staden. 2004. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: agricultural and storage practices. *Review. Journal of Ethnopharmacology*, 95: 113–121

- Foster S. in Johnson R.L. 2006. Desk Reference to Nature's Medicine. Washington, D.C.: National Geographic. 416 str.
- Galle- Toplak K. 2002. Zdravilne rastline na Slovenskem. 2. Izd. Ljubljana, Mladinska knjiga: 310 str.
- Görög S. 2008. Drug safety, drug quality, drug analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(2): 247-253
- Gurib-Fakim A. 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Review. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 1–93
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1989. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: *Free Radical in Biology and medicine*, 2nd edition. Oxford: Clarendon Press: Oxford, UK, pp. 189-267
- Halliwell B. 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*, 52: 253–265
- Hamilton AC. 2004. Medicinal plants, conservation and livelihoods. *Biodiversity and Conservation* 13: 1477-1517.
- Heinrich M., Leonti M., Nebel S., Peschel W. 2005. Local Food – Nutraceutical!: An Example of a Multidisciplinary Research Project on Local Knowledge. *Journal of Pharmacology and Physiology* 56 Suppl 1: 5-22
- Heinrich M., Pardo-de-Santayana M., Kufer J., Leonti M. 2006. Ethnobotany and ethnopharmacology – Interdisciplinary links with the historical sciences. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 157-160
- Heinrich, M., Bames, J., Gibbons, S., Williamson, E.M. 2004. *Phytotherapy and pharmacognosy*. V *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Churchill Livingstone. Edinburgh, VB. 320 str.
- Heywood V. H., 1995. *Cvetnice, kritosemenke sveta*. Ljubljana, DZS: 211-212
- http://europa.eu/agencies/community_agencies (april 2011)
- ISO 7928-1. Savory -- Specification -- Part 1: Winter savory (*Satureja montana* Linnaeus). 1991: 7 str.
- Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T. In Yankova t. 2005. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 96: 145-150
- Júnior J.O.C.S., Ribeiro Costa R.M., Teixeira F.M., Barbosa W.L.R. 2011. Processing and Quality Control of Herbal Drugs and Their Derivatives. V: *Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas*. Yukihiro Shoyama (ed). InTech: 282 str.

- Kaefer C.M., Milner J.A. 2008. The role of herbs and spices in cancer prevention. *J Nutr Biochem*, 19: 347-61
- Kala CP, Ratajc P. 2012. High altitude biodiversity of the Alps and the Himalayas: ethnobotany, plant distribution and conservation perspective. *Biodiversity & Conservation* 21(4): 1115-1125
- Kala CP. 2005. Ethnomedicinal botany of the Apatani in the Eastern Himalayan region of India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 1(11): 1-12
- Kala CP. 2009. Ethnobotanical and Ecological Approaches for Conservation of Medicinal and Aromatic Plants. V: Proceedings of the IVth International Symposium on Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants (ISBMAP 2009). Ljubljana, Junij 17-21, 2009; str. 19-26.
- Katalinic V., Milos M., Kulisic T., Jukic M. 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry* 94: 550–557
- Kintzios S., Papageorgiou K., Yiakoumettis I., Baričević D., Kušar A. 2010. Evaluation of the antioxidants activities of four Slovene medicinal plant species by traditional and novel biosensory assays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53: 773 – 776
- Kokkini, S., Karousou, R., Hanlidou, E. 2003. Herbs of the Labiatae. V: Cabarello, B. Trugo, L. & Finglas, P. (eds.), *Encyclopaedia of Food Sciences and Nutrition*. Academic Press, London. 3082-3090
- Kosar M., Dorman H.J.D., Hiltunen R. 2005. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chemistry*, 91: 525–533
- Kosar, M., Dorman, H.J.D., Bachmayer, O., Baser, K.H.C., Hiltunen, R. 2003. An improved on-line HPLC-DPPH* method for the screening of free radical scavenging compounds in water extracts on Lamiaceae plants. *Chem Nat. Compd.* 39, 161–166
- Kraft K. 2002. What is „traditional use“ evidence? ESCOP – The European Phytojournal, 5: 1 – 9
- Kranl K., Schlesier K., Bitsch R., Hermann H., Rohe M., Boehm V. 2005. Comparing antioxidative food additives and secondary plant products – use of different assays. *Food Chemistry*, 93: 171–175
- Krinsky, N. I. 1998. The Antioxidant and Biological Properties of the Carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854:443-447

- Kurosumia A., Sasakia C., Kumadab K., Kobayashib F., Mtuic G., Nakamura Y. 2007. Novelextractionmethod of antioxidantcompounds from Sasapalmata (Bean) Nakai using steamexplosion. *Process Biochemistry*, 42(10): 1449–1453
- Li H.B., Jiang Y., Wong C.C., Cheng K.W. in Chen F. 2007. Evaluation of two methods for the extraction of antioxidants from medicinal plants. *Anal Bioanal Chem* 388: 483-488
- Li H.B., Wong C.C., Cheng K.W., Chen F. 2008. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT-Food Science and Technology*, 41: 385-390
- Lotito S.B. in Frei B. 2006. Review Article. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology & Medicine*, 41: 1727–1746
- Lu Y. in Yeap Foo L. 2001. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry* 75: 197–202
- Luthria D.L., Mukhopadhyay S., Kwansa A.L. 2006. A systematic approach for extraction of phenolic compounds using parsley (*Petroselinum crispum*) flakes as a model Substrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86:1350–1358
- Matkowski A. 2008. Plant in vitro culture for the production of antioxidants — A review. *Biotechnology Advances*, 26: 548–560
- Michielin E.M.Z., Wiese L.P.L., Fereira E.A., Pedrosa R.C., Fereira S.R.S. 2011. Radical-scavenging activity of extracts from *Cordia verbenacea* DC obtained by different methods. *The Journal of Supercritical Fluids*, 56(1): 89-96
- Mirjalili M.H., Salehi P., Sonboli A., Vala M.M. 2006. Essential oil variation of *Salvia officinalis* aerial parts during its phenological cycle. *Chemistry of Natural Compounds*, 42(1): 19-23
- Opinion of the Scientific Committee on Food on Thujone, 2003
- Perry N. B., Anderson R. E., Brennan N. J., Douglas M. H., Heaney A. J., McGimpsey J. A., Smallfield B. M. 1999. Essential Oils from Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.): Variations among Individuals, Plant Parts, Seasons, and Sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (5): 2048-2054
- Petersen M., Simmonds M.S.J. 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62(2): 121 – 125
- Petrovick P.R., Gonzalez Ortega G., Bassani V.L. 1997. From a medicinal plant to a pharmaceutical dosage form. A (still) long way for the Brazilian medicinal plants. *Ciência e Cultura*, 49 (5/6): 364-369
- Phillipson J. D. 2007. Phytochemistry and pharmacognosy. Review. *Phytochemistry*, 68: 2960–2972

- Pinelo M., Sineiro J., Núñez M.J., 2006. Mass transfer during continuous solid–liquid extraction of antioxidants from grape by products, *Journal of Food Engineering*, 77: 57–63
- Pravilnik o razvrstitvi zdravilnih rastlin. Ur.l. RS, št. 103/2008
- Prieto J.M., Iacopini P., Cioni P., Chericoni S. 2007. In vitro activity of the essential oils of *Origanum vulgare*, *Satureja montana* and their main constituents in peroxy-nitrite-induced oxidative processes. *Food Chemistry*, 104: 889–895
- Putievsky E., Ravid U., Dudai N. 1986. The influence of season and harvest frequency on essential oil and herbal yield from a pure clone of sage (*Salvia officinalis*) grown under cultivated conditions. *Journal of Natural Products*, 49: 326–339
- Raal A., Paaver U., Arak E., Orav A. 2004. Content and composition of the essential oil of *Thymus serpyllum* L. growing wild in Estonia. *Medicina (Kaunas)*, 40(8): 795 – 800
- Re R., Pellegrini, N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. 1998. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9/10): 1231–1237
- Ribeiro M.A., Bernardo-Gil M.G., Esquivel M.M. 2001. *Melissa officinalis*, L.: study of antioxidant activity in supercritical residues. *Journal of Supercritical Fluids*, 21: 51–60
- Rice-Evans C.A., Miller N. J., 1994. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Met. Enzym.*, 234: 279-293
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Papanga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 21(3): 417
- Robbins R.J. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51: 2866–2887
- Rodriguez-Meizoso, I., Marin, F.R., Herrero, M., Senorans, F.J., Reglero, G., Cifuentes, A. Ibanez, E. 2006. Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5): 1560-1565
- Roginsky V., Lissi EA (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.*, 92: 235-254
- Samarth R.M, Panwar M, Kumar M, Soni A, Kumar M, Kumar A. 2008. Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extracts. *Food Chemistry* 106: 868–873
- Sangwan N.S., Farooqi AHA, Shabih F., Sangwan RS. 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*, 34: 3-21

- Santos-Gomes P.C., Seabra R.M., Andrade P.B., Fernandes-Ferreira M. 2002. Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.) Plant Science, 162: 981-987
- Schippmann U., Leaman D.J., Cunningham A.B. 2002. Impact of cultivation and gathering of medicinal plants on biodiversity. Global trends and issues. – V: FAO (Ed.): Biodiversity and the ecosystem approach in agriculture, forestry and fisheries. FAO, Rim: 142-167
- Seigler D.S. 2002. Plant secondary metabolism. 2nd printing. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers: 759 str.
- Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defense. European Journal of Biochemistry 215, 213-219
- Sies, H., 1986. Biochemistry of oxidative stress. Angew. Chem., Int. Ed. 25, 1058– 1071
- Silvina B. Lotito, Balz Frei. 2006. Review Article. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? Free Radical Biology & Medicine, 41: 1727–1746
- Skocibusic M., Bezic N., Dunkic V. 2006. Phytochemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. Growing in Croatia. Food Chemistry, 96: 20-28
- Sõukand R., Kalle R. 2010. Plant as Object within Herbal Landscape: Different. Kinds of Perception. Biosemiotics 3(3): 299-313
- Stefanović O. in Comić L. 2012. Synergistic antibacterial interaction between *Melissa officinalis* extracts and antibiotics. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 02 (01): 01-05
- Stratil P, Klejdus B. in Kuban V. 2007. Determination of phenolic compound and their antioxidant activity in fruits and cereals. Talanta 71: 1741-1751
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin, MTD, Mazur M, Tesler J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. International Journal of Biochemistry and Cellular Biology 39, 44-84
- WHO guidelines on good manufacturing practices (GMP) for herbal medicines. 2007. WHO, Geneva. 92 str.
- Wojdyło A., Oszmian'ski J., Czemerys R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry 105: 940–949.
- www.ecpgr.cgiar.org/networks/sugar_starch_fibre_crops/medicinal_plants/ecpgr_medicinal_and_aromatic_plants_working_group_documents.html (september, 2011)
- www.escop.com (maj, 2010)

www.furs.si/svn/sem/RastlGenViri.asp (september, 2011)

www.iso.org (september, 2008)

www.jazmp.si/zacetna-stran/farmakopeja/evropska-farmakopeja/ (julij, 2011)

Yanishlieva N.V., Marinova E.M., Gordon M.H., Raneva V.G. 1999. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry* 64: 59-66

Zavatti M., Zanolini P., Benelli A., Rivasi M., Baraldi C., Baraldi M. 2011. Experimental study on *Satureja montana* as a treatment for premature ejaculation. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2): 629-633

Zgórka G. in Glowniak K. 2006. Variation of free phenolics acid in medicinal plants belongin to the Lamiaceae family. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26: 79-87

Zheng W. in Wang S.Y. 2001. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *J. Agric. Food Chem*, 49 (11): 5165-5170

Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W. 1999. Research on antioxidant activity of flavonoids from natural materials. *Food Chemistry*, 64:555-559

ZAHVALA

Ob zaključku doktorskega študija se iskreno zahvaljujem mentorici, prof. dr. Dei Baričević, ki me je usmerjala, svetovala, spodbujala, zaupala in me razumela.

Prof. dr. Kristini Sepčič in doc. dr. Andreju Umeku se zahvaljujem za hiter pregled naloge in strokovne nasvete.

Doc. dr. Borisu Turku gre zahvala za vse terene, pomoč pri nabiranju rastlin, debate o botaničnem svetu in reševanje ugank, ki so se pojavile pri določanju antioksidativnega delovanja.

Dr. Mitji Križmanu s Kemijskega inštituta se zahvaljujem za hiter tečaj HPLC ter za nasvete in pomoč pri reševanju težav, s katerimi sem se srečala, ko sem se spopadala z razvojem nove metode.

Velika zahvala gre tudi Kseniji Škornik za oskrbo mojih rastlin na laboratorijskem polju in za vse nasvete, s katerimi mi je olajšala poljedelski del naloge. Zahvaljujem se tudi Vasji Progarju, Janu Munda, Jasmini Kebe in Almi Čeligoj za pomoč pri nabiranju rastlin in analizah materiala.

Janji Zdešar se zahvaljujem za družbo pri laboratorijskem delu, za potrpežljivost pri skupnem odkrivanju skrivnosti antioksidantov ter za trezno glavo, kadar je šlo vse narobe.

Nataši Šibanc hvala za čajanke in sprehode, ko je bilo treba zbistriti misli, predvsem pa sem ji hvaležna za spodbujanje, ko se je zdel cilj oddaljen kilometre in kilometre, in nesebično pomoč pri urejanju naloge do končne podobe.

Hvala prijateljem in družini, ker so mi stali ob strani.

Matej, meni je uspelo, zdaj pa še ti! ☺