

# Hemijski sastav i antioksidativna aktivnost etarskog ulja *Thymus serpyllum* L.

Slobodan S. Petrović<sup>1</sup>, Mihailo S. Ristić<sup>2</sup>, Nada V. Petrović<sup>3</sup>, Miodrag L. Lazić<sup>4</sup>, Marina Francišković<sup>5</sup>, Slobodan D. Petrović<sup>6</sup>

<sup>1</sup>BIOSS – PS i ostali, Beograd, Srbija

<sup>2</sup>Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, Beograd, Srbija

<sup>3</sup>Fakultet za primenjenu ekologiju „Futura“, Beograd, Srbija

<sup>4</sup>Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet, Leskovac, Srbija

<sup>5</sup>Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno–matematički fakultet, Novi Sad, Srbija

<sup>6</sup>Univerzitet u Beogradu, Tehnološko–metalurški fakultet, Beograd, Srbija

## Izvod

Cilj ovog rada bio je ispitivanje hemijskog sastava i antioksidativnog potencijala etarskog ulja majčine dušice (*Thymus serpyllum* L.). Etarsko ulje majčine dušice izolovano je iz osušene herbe *T. serpyllum* postupkom hidrodestilacije. Za hidrodestilaciju etarskog ulja *T. serpyllum* korišćen je originalni poluindustrijski destilacioni uređaj SP-130 koji radi na principu destilacije vodom i vodenom parom. Gasnohromatografskom analizom određene su najzastupljenije komponente kod etarskog ulja *T. serpyllum*: *trans*-nerolidol (24,2%), germakren D (16,0%), timol (7,3%),  $\delta$ -kadinen (3,7%) i  $\beta$ -bisabolen (3,3%). Etarsko ulje je pokazalo značajno bolju sposobnost neutralizacije slobodnih DPPH radikala ( $IC_{50}$  = 0,503  $\mu$ L/ml) u poređenju sa sintetskim antioksidansima BHA i BHT.

**Ključne reči:** *Thymus serpyllum* L., hidrodestilacija, etarsko ulje, hemijski sastav, antioksidativna aktivnost.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Majčina dušica (*Thymus serpyllum*) pripada rodu *Thymus* koji u svetu obuhvata oko 300–400 vrsta, sa velikim brojem podvrsta, varijeteta, subvarijeteta i formi, a u flori Srbije zastupljena je 31 vrsta ovog roda [1]. Predstavlja omiljeni lek ne samo u narodnoj nego i naučnoj medicini. Ulazi u sastav velikog broja biljnih preparata koji se izrađuju bilo u apotekama bilo u farmaceutskoj industriji zbog svojih farmakoloških svojstava. Koristi se kao antiseptik, anthelmintik, karminativ, ekspanzorans, sedativ, tonik, konzervans, aromatik, stomahik i antispazmotik. Majčina dušica ima raznovrsnu primenu u medicini, farmaciji, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, zatim u industriji alkoholnih i bezalkoholnih napitaka i industriji boja i lakova [2,3].

Majčina dušica sadrži etarsko ulje koje pokazuje fungicidno, antiseptičko i antioksidativno dejstvo. Etarsko ulje iz herbe se koristi u parfemima, sapunima i pastama za zube. Sadržaj etarskog ulja *T. serpyllum* varira u velikoj meri u zavisnosti od porekla i načina dobijanja i kreće se u rasponu približno od 0,1 do 0,6% [4], ili između 0,1 i 1% [5,6]. Na hemijski sastav i prinos etarskog ulja herbe *T. serpyllum* utiče geografsko poreklo, faza razvoja biljke, vreme berbe, stanište i klimatski uslovi gde vrsta raste [7]. Hemijski polimorfizam

je karakterističan za biljke koje pripadaju rodu *Thymus*, i mogu se razlikovati geraniolni, germakren-D, citralni, linaloolni, (*E*)-kariofilenski,  $\alpha$ -terpinilacetatni, karvakrolni, timolni i mnogi drugi hemotipovi [8–10]. Određivanje sadržaja etarskog ulja *T. serpyllum* poreklom iz Srbije sa padina Kopaonika, pokazalo je da etarsko ulje sadrži visok procenat seskviterpena (60,5%), dok je sadržaj monoterpenih komponenti bio znatno niži (37,9%). Dominantna komponenta iz klase seskviterpena bio je *trans*-kariofilen (27,7%), a zatim i  $\gamma$ -murolen (10,5%),  $\alpha$ -humulen (7,5%),  $\beta$ -bisabolol (2,6%) i *trans*-nerolidol (2,4%) [11].

U prehrambenoj industriji koriste se sintetski i prirodni antioksidansi. Oni su prisutni u mnogim namirnicama i imaju ulogu aditiva jer štite hranu od oksidacije. Međutim, zbog toksikoloških razloga prekomerna upotreba sintetskih antioksidanasa je dovedena u pitanje, a zahtevi potrošača su usmereni ka korišćenju prirodnih [12–14]. Fenolni monoterpenoid u etarskom ulju majčine dušice, timol i karvakrol najviše doprinose prijatnom mirisu njegovog etarskog ulja, a poznato je i da inhibiraju lipidnu peroksidaciju i ispoljavaju veoma snažno antimikrobno dejstvo na različite vrste mikroorganizama. U nekoliko radova je proučavano antimikrobno i antioksidativno dejstvo etarskog ulja i ekstrakta tamjana [15–22]. U radu Lee i sar. [22] pokazano je da glavne komponente ekstrakta *T. vulgaris*, posebno eugenol, timol i karvakrol, imaju jaču antioksidativnu aktivnost od sintetskih antioksidanasa kao što su butil-

NAUČNI RAD

UDK 582.929.4:547.913:66

Hem. Ind. 68 (3) 389–397 (2014)

doi: 10.2298/HEMIND130513051P

Prepiska: : S.S. Petrović, BIOSS – PS i ostali, Bulevar oslobođenja 401j, 11000 Beograd, Srbija.

E-pošta: biossloba@gmail.com

Rad primljen: 13. maj, 2013

Rad prihvaćen: 28. jun, 2013

ovani hidroksitoluen (BHT) i  $\alpha$ -tokoferol. U radu Youdim i sar. [23] etarsko ulje *T. vulgaris* je pokazalo bolje antioksidativno dejstvo na usporavanje lipidne peroksidacije ulja žutog noćurka od askorbilpalmitata i sličnu aktivnost kao  $\alpha$ -tokoferol.

Postoji mnogo objavljenih radova o hemijskom sastavu etarskog ulja iz biljaka koje pripadaju rodu *Thymus* [24–26], međutim samo nekoliko studija se bavilo ispitivanjem hemijskog sastava etarskog ulja *T. serpyllum* [11,20,26–30]. Koliko je poznato autorima postoje dva objavljena rada o ispitivanju antioksidativne aktivnosti etarskog ulja *T. serpyllum* poreklom iz Pakistana [28] i poreklom iz Hrvatske [29]. Cilj ovog rada bio je ispitivanje potencijalne antioksidativne aktivnosti etarskog ulja *T. serpyllum* poreklom iz Srbije, kao i ispitivanje njegovog hemijskog sastava.

## EKSPERIMENTALNI DEO

### Biljni materijal

Biljni materijal *Thymus serpyllum* L. je prikupljen u fazi cvetanja tokom juna 2012. godine u centralnoj Srbiji, na planini Pasjača, u blizini naselja Žitorade. Prikupljeni biljni materijal je sušen u hladu i samleven do granulacije 0,5 mm.

### Izolacija etarskog ulja

Za potrebe ovog rada etarsko ulje majčine dušice izolovano je iz osušene herbe *T. serpyllum* postupkom hidrodestilacije. Za hidrodestilaciju etarskog ulja *T. serpyllum* korišćen je poluindustrijski destilacioni uređaj SP-130 koji radi na principu destilacije vodom i vodenom parom. Temperatura u toku hidrodestilacije u sudu SP-130 se kretala od 100–102 °C, na atmosferskom pritisku, a ceo proces hidrodestilacije je trajao 5 h.

### Gasnohromatografska karakterizacija etarskog ulja

Ispitivanje hemijskog sastava etarskog ulja izvedeno je primenom gasne hromatografije uz plameno-jonizujuću detekciju (GC/FID) i kombinacijom gasne hromatografije i masene spektrometrije (GC/MS).

Klasična analitička gasnohromatografska analiza (GC/FID) urađena je na Hewlett–Packard gasnom hromatografu, model HP-5890 Series II, opremljenom *split–splitless* injektorom povezanim sa HP-5 kolonom (25 m×0,32 mm, debljine filma 0,25  $\mu$ m) i plameno-jonizujućim detektorom (FID). Kao noseći gas korišćen je vodonik (1 ml/min). Etanolni rastvor uzorka etarskog ulja (1  $\mu$ l, 1% rastvor) injektiran je u *split*-režimu (1:30). Temperatura injektora iznosila je 250 °C, a detektora (FID) 300 °C, dok je temperatura kolone menjana u linearnom režimu temperaturnog programiranja od 40–260 °C (2 °C/min), a potom držana konstantnom na 260 °C 15 min. Za kvantifikacione svrhe procenti površina pikova dobijeni integracijom sa odgovarajućeg hromatograma (GC/FID) uzeti su kao osnova.

Isti analitički uslovi korišćeni su i za potrebe GC/MS analize rađene na HP G 1800C Series II GCD analitičkom sistemu (Hewlett–Packard, Palo Alto, CA, USA), s tim što je tu rađeno sa HP-5MS kolonom (30 m×0,25 mm×0,25  $\mu$ m) i što je kao noseći gas korišćen helijum. Temperatura transfer linije iznosila je 260 °C. Maseni spektri snimani su u EI režimu (70 eV), u opsegu  $m/z$  40–450. Uzorak 1% EtOH rastvora etarskog ulja (0,2  $\mu$ l) injektiran je u *split*-režimu (1:30).

Identifikacija pojedinačnih komponenata vršena je masenospektrometrijski i preko Kovačevih indeksa, uz korišćenje različitih baza masenih spektara (NIST/Wiley), različitih načina pretrage (PBM/NIST/AMDIS, ver. 2.1) i raspoloživih literaturnih podataka [31].

### Određivanje antioksidativne aktivnosti etarskog ulja (DPPH metoda)

Relativna antiradikalska aktivnost etarskog ulja ispitivana je pomoću stabilnog slobodnog radikala DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) koji se često koristi u proceni antioksidantne aktivnosti. DPPH radikal apsorbira na 517 nm (ljubičaste je boje), pri čemu se apsorbanacija znatno smanjuje kada je ovaj radikal izložen hvatačima slobodnih radikala jer dolazi do transfera atoma vodonika antioksidansa na DPPH. Pri tom, smanjena apsorbanacija na 517 nm ukazuje na antioksidantni potencijal ekstrakta/etarskog ulja [32].

Pri proceni antioksidantne sposobnosti etarskog ulja majčine dušice korišćene su radne koncentracije rastvora ulja u opsegu 0,052–3,333  $\mu$ L/mL. Po 10  $\mu$ L rastvora određene koncentracije etarskog ulja je mešano sa 190  $\mu$ L metanola i 100  $\mu$ L metanolnog rastvora DPPH (67,2  $\mu$ mol/L). Sve probe pripremljene su u mikropločama. Za svaku koncentraciju pripremljene su radne probe u tri ponavljanja i jedna korekcija (slepa proba, tj. apsorbanca ekstrakta bez DPPH reagensa), dok je za celu ploču rađena jedna kontrola (maksimalna količina DPPH, tj. nije dodatak ekstrakt).

Nakon 60 min inkubacije na sobnoj temperaturi, u mraku, apsorbancije dobijenih rastvora očitavane su spektrofotometrijski na 517 nm (čitač mikroploča Multiskan Spectrum, Thermo Corporation).

Kapacitet hvatanja DPPH·radikala (DPPH-RSC) računat je na osnovu sledeće jednačine:

$$\%DPPH - RSC = 100 - 100 \frac{(A_{sr} - A_{kor})}{A_{kontrola}}$$

gde je  $A_{sr}$  srednja vrednost apsorbanacija tri radne probe,  $A_{kor}$  apsorbanacija samog ekstrakta (bez reagensa) i  $A_{kontrola}$  apsorbanacija DPPH. Za dobijene vrednosti za RSC (inhibicije) nacrtane je kriva zavisnosti inhibicije od koncentracije etarskog ulja u programu Origin 8 (Origin Lab Corporation), iz kojih je određena  $IC_{50}$  vrednost (koncentracija ispitivanog ulja pri kojoj je neutralisano 50% radikala).

## REZULTATI I DISKUSIJA

### Hemijski sastav etarskog ulja *Thymus serpyllum* L.

Izolovano etarsko ulje *T. serpyllum* L. je tečnost svetlo žute boje, mirisa karakterističnog za rod *Thymus*. Težina osušene biljne mase koja je tretirana iznosila je 5,5 kg. Nakon obezvodnjavanja sa anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dobijeno je 4,1 g čistog etarskog ulja. Ostvaren prinos etarskog ulja primenom destilacionog uređaja SP-130 iznosio je ~0,1 %. U istraživanjima *T. serpyllum* poreklom iz Srbije sa padina Kopaonika, sadržaj etarskog ulja je iznosio 3 ml/kg osušene biljke (~0,3%) [11]. U radu Raal i sar. prinos etarskog ulja *T. serpyllum* poreklom iz Estonije sa 20 različitih lokaliteta kretao se u opsegu 0,6-4,4 ml/kg, pri čemu je samo prinos dobijen sa jednog lokaliteta bio u skladu sa standardima Evropske farmakopeje (3 ml/kg) [26]. Destilacijom pomoću vodene pare iz *T. serpyllum* poreklom iz Pakistana ostvaren je prinos od 0,48% [20] i od 29,0 g/kg [28]. Varijacije u prinosima etarskog ulja *T. serpyllum* mogu se objasniti različitim agroklimatskim uslovima regiona.

Hemijski sastav etarskog ulja *Thymus serpyllum* L. prikazan je u tabeli 1. Najzastupljenije komponente u etarskom ulju su: *trans*-nerolidol (24,2%), germakren D

(16,0%), timol (7,3%),  $\delta$ -kadinen (3,7%) i  $\beta$ -bisabolen (3,3%) što čini 54,5% od ukupno 65 identifikovanih komponenti. Komponente etarskog ulja su grupisane u pet grupa: monoterpeni ugljovodonici, oksidovani monoterpeni, seskviterpeni ugljovodonici, oksidovani seskviterpeni i ostala jedinjenja. Seskviterpeni ugljovodonici (19 jedinjenja, 35,1%) i oksidovani seskviterpeni (15 jedinjenja, 34,8%) predstavljaju najzastupljeniju grupu hemijskih jedinjenja. Oksidovani seskviterpen *trans*-nerolidol sa 24,2% i seskviterpeni ugljovodonik germakren D sa 16,0% su najzastupljenije komponente u ispitivanom etarskom ulju. Klasa monoterpenih ugljovodonika sadrži 10 jedinjenja (9,8%) od kojih su *p*-cimen (2,1%), mircen (1,6%), *trans*- $\beta$ -ocimen (1,5%) i  $\gamma$ -terpinen (1,5%) najzastupljeniji. Etarsko ulje takođe sadrži značajnu količinu oksidovanih monoterpena (19,4%) od kojih su timol (7,3%), *cis*-tujon (1,9%), geraniol (1,4%), 1,8-cineol (1,4%) i terpinil-acetat (1,0%) najzastupljeniji. Ostala jedinjenja među kojima se nalaze i dva jedinjenja koja nisu identifikovana su zastupljena sa 0,9%. U herbi majčine dušice ukupno je identifikovano 65 komponenti što predstavlja 99,5% ispitivanog etarskog ulja. Na slici 1 prikazan je normalizovani hromatogram ispitivanog etarskog ulja.

Tabela 1. Hemijski sastav etarskog ulja *Thymus serpyllum* L.; KIE – eksperimentalno određen Kovačev indeks, KIL – Kovačev indeks dat literaturnim podacima, RRT – relativno retenciono vreme (FID) odgovarajuće komponente u odnosu na odabranu referentnu komponentu, CI – koncentracioni indeks

Table 1. Chemical composition of essential oil of *Thymus serpyllum* L.

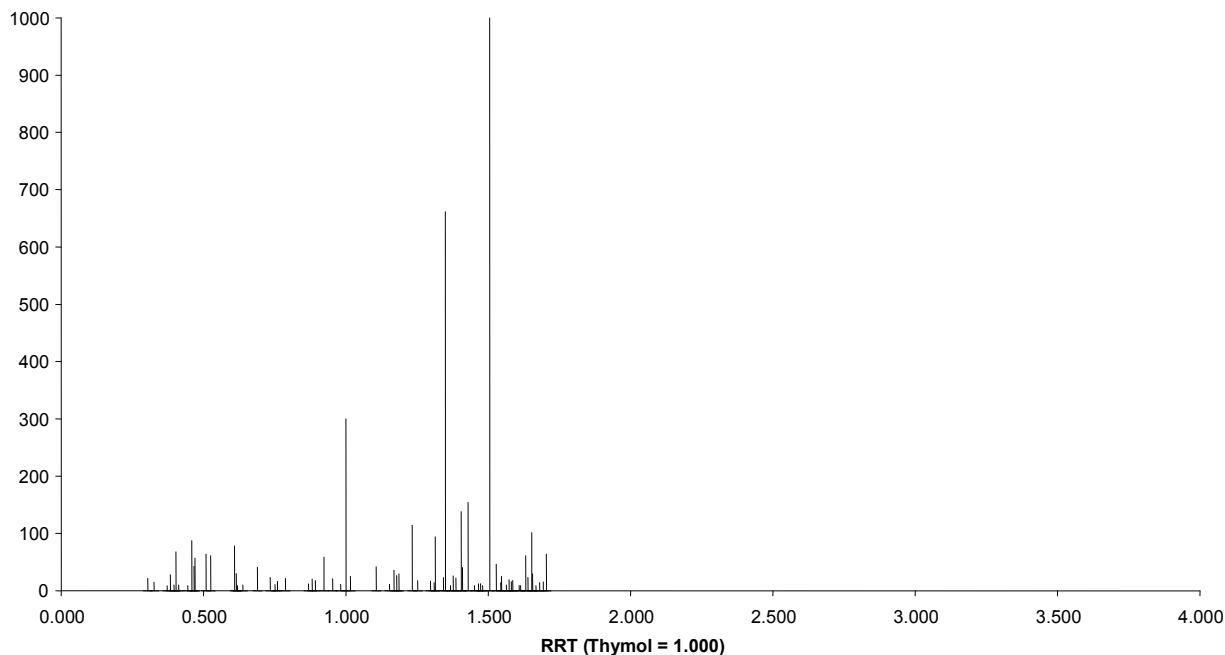
Komponenta	KIE	KIL	RRT	CI	mas.%
Monoterpeni ugljovodonici (9,76%)					
$\alpha$ -Pinen	924,9	932	0,304	21	0,51
Kamfen	938,0	946	0,326	15	0,35
Sabinen	973,1	969	0,372	9	0,21
$\beta$ -Pinen	974,0	974	0,384	28	0,67
Mircen	989,8	988	0,403	68	1,64
$\alpha$ -Terpinen	1011,1	1014	0,444	9	0,21
<i>p</i> -Cimen	1018,8	1020	0,459	87	2,11
Limonen	1021,8	1024	0,466	43	1,03
<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimen	1047,1	1044	0,509	64	1,55
$\gamma$ -Terpinen	1052,4	1054	0,525	61	1,48
Oksidovani monoterpeni (19,45%)					
1,8-Cineol	1022,7	1026	0,471	57	1,38
<i>cis</i> -Tujon	1099,8	1101	0,609	78	1,89
Linalol	1102,6	1095	0,615	30	0,72
<i>trans</i> -Tujon	1115,0	1112	0,619	9	0,21
$\alpha$ -Kamfolenal	1124,9	1122	0,638	10	0,24
Kamfor	1134,1	1141	0,690	41	0,99
Borneol	1159,6	1165	0,734	23	0,56
Mentol	1170,3	1167	0,752	11	0,26
Terpinen-4-ol	1172,4	1174	0,760	16	0,40
$\alpha$ -Terpineol	1187,9	1186	0,788	21	0,52
Timol metil etar	1232,9	1232	0,869	12	0,29

Tabela 1. Nastavak  
Table 1. Continued

Komponenta	KIE	KIL	RRT	CI	mas.%
Oksidovani monoterpeni (19,45%)					
Karvakrol metil etar	1242,8	1241	0,882	20	0,49
Timokinon	1246,7	1248	0,894	18	0,43
Geraniol	1263,0	1257	0,923	59	1,42
Geranial	1274,7	1264	0,954	21	0,50
Bornil acetat	1279,1	1287	0,981	11	0,27
Timol	1303,9	1289	1,000	300	7,26
Karvakrol	1313,3	1298	1,017	25	0,61
Terpinil acetat	1343,9	1346	1,107	42	1,01
Seskviterpenski ugljovodoni (35,07%)					
$\alpha$ -Kopaen	1363,8	1374	1,153	11	0,27
$\beta$ -Bourbonen	1371,4	1387	1,169	36	0,87
$\beta$ -Kubeben	1379,2	1387	1,179	26	0,64
$\beta$ -Elemen	1382,0	1389	1,186	29	0,71
$\beta$ -Kariofilen	1408,3	1417	1,233	114	2,76
$\beta$ -Kopaen	1415,5	1430	1,253	18	0,42
$\alpha$ -Humulen	1439,8	1452	1,297	17	0,40
Allo-aromadendren	1453,6	1458	1,310	14	0,34
(E)- $\beta$ -Farnesen	1457,7	1454	1,314	94	2,28
$\gamma$ -Murolen	1466,0	1478	1,343	22	0,54
Germakren D	1472,0	1484	1,349	662	16,02
Epi-biciklokseskvifelandren	1481,2	1493	1,367	9	0,22
Biciklogermakren	1487,1	1500	1,377	26	0,63
$\alpha$ -Murolen	1489,8	1500	1,387	22	0,52
$\beta$ -Bisabolen	1501,0	1505	1,405	138	3,33
trans-Kalamenen	1510,4	1521	1,410	40	0,97
$\delta$ -Kadinen	1512,9	1522	1,429	154	3,73
$\alpha$ -Kadinen	1525,8	1537	1,452	9	0,21
$\alpha$ -Kalakoren	1552,5	1544	1,481	9	0,21
Oksidovani seskviterpeni (34,77%)					
cis-Seskvisabinen-hidrat	1536,9	1542	1,466	12	0,29
Elemol	1543,1	1548	1,474	12	0,29
trans-Nerolidol	1560,5	1561	1,505	1000	24,20
Kariofilen-oksid	1569,6	1582	1,528	46	1,12
Tujopsan-2- $\alpha$ -ol	1575,0	1586	1,544	14	0,34
Viridiflorol	1577,8	1592	1,547	25	0,61
$\beta$ -Kopaen-4- $\alpha$ -ol	1583,4	1590	1,564	10	0,24
Humulen-epoksid II	1594,7	1608	1,574	19	0,46
$\beta$ -Oplopenon	1596,5	1607	1,581	16	0,39
1,10-Di-epi-kubenol	1602,2	1618	1,586	18	0,43
Epi- $\alpha$ -kadinol ( $\tau$ -kadinol)	1630,0	1638	1,632	61	1,47
$\alpha$ -Murolol (torejol)	1636,1	1644	1,640	23	0,57
$\alpha$ -Kadinol	1643,6	1652	1,653	101	2,45
Helifolenol A	1674,7	1674	1,693	15	0,37
Germakra-4(15),5,10(14)-trien-1- $\alpha$ -ol	1681,3	1685	1,704	64	1,54
Ostalo (0,91%)					
1-Okten-3-ol	985,7	974	0,397	10	0,24
3-Oktanol	1002,1	988	0,413	10	0,24

Tabela 1. Nastavak  
Table 1. Continued

Komponenta	KIE	KIL	RRT	CI	mas.%
Ostalo (0,91%)					
Nije identifikovana	1615,7	–	1,609	9	0,22
Nije identifikovana	1619,3	–	1,614	9	0,21
Ukupno: 99,96%					

Slika 1. Normalizovani hromatogram etarskog ulja *Thymus serpyllum* L.  
Figure 1. Normalised chromatogram of the essential oil of *Thymus serpyllum* L.

U radu koji se bavio analizom etarskog ulja *T. serpyllum* sa područja Kopaonika indentifikovano je ukupno 26 komponenti, što je predstavljalo 98,4% etarskog ulja [11]. U pomenutom radu sadržaj seskviterpenskih komponenti iznosio je 60,5% (dominantno jedinjenje je bio *trans*-kariofilen sa 27,7%), dok je sadržaj monoterpenskih komponenti iznosio 37,9% (dominantno jedinjenje je bio  $\alpha$ -pinen sa 6,9%). U ovom radu sadržaj seskviterpenskih komponenti iznosio je 69,84% (dominantna jedinjenja su *trans*-nerolidol sa 24,20% i seskviterpenski ugljovodonik germakren-D sa 16,02%), dok je sadržaj monoterpenskih komponenti iznosio 29,21% (dominantno jedinjenje je bio timol 7,26%).

Uporedna analiza rezultata hemijskog sastava etarskog ulja *T. serpyllum* dobijenih u okviru ispitivanja u ovom radu sa rezultatima iz literaturnih podataka [11,20,26–30] ukazuju na velike suprotnosti i razlike kada se govori o dominantnim jedinjenjima u etarskom ulju, što je najverovatnije posledica uticaja različitih klimatskih i drugih faktora na biosintezu ovih sekundarnih metabolita. Kako je prikazano u tabeli 2, timol i karvakrol, u literaturi pominjani kao dominantne kompo-

nente etarskog ulja *T. serpyllum* [33,34] nisu glavne komponente etarskog ulja poreklom iz Srbije, Rusije i Estonije, već samo za etarsko ulje poreklom iz Pakistana i Hrvatske. Interesantno je da je najveća podudarnost sa našim etarskim uljem *T. serpyllum* po pitanju dominantne komponente, nađena u etarskom ulju *T. serpyllum* poreklom iz Rusije, sa područja Altaja [30] (planina Kolivan, 150 m n.v.), kod koga su glavni sastojci ulja bili *trans*-nerolidol (29,8%), 1,8-cineol (14,0%), *cis*- $\beta$ -terpineol (8,2%),  $\beta$ -mircen (4,0%), kamfor (4,0%) i *p*-cimen (3,8%).

#### Antioksidativna aktivnost etarskog ulja *Thymus serpyllum* L.

Antioksidantna sposobnost etarskog ulja majčine dušice je određivana njegovom sposobnošću da neutrališe DPPH, tj. koliko su komponente etarskog ulja sposobne da doniraju atom vodonika i prevedu DPPH radikal u njegovu redukovanu formu DPPH-H.  $IC_{50}$  vrednosti su date u tabeli 3 i iz njih možemo zaključiti da je etarsko ulje majčine dušice ispoljilo znatno bolju aktivnost u odnosu na sintetske antioksidanse BHA, a naročito u odnosu na BHT.

Tabela 2. Usporedna analiza hemijskog sastava (%) etarskog ulja *Thymus serpyllum* L.Table 2. Comparative analysis of the chemical composition (%) of essential oils of *Thymus serpyllum* L.

Literatura	Rezultati istraživanja	[30]	[20]	[27]	[11]	[29]	[28]
Metoda izolovanja etarskog ulja	Destilacija vodom i vodenom parom SP-130	Destilacija vodom	Destilacija vodenom parom	Destilacija vodom -Clevenger	Destilacija vodom-Clevenger	Destilacija vodom-Clevenger	Destilacija vodom-Clevenger
Poreklo	Srbija	Rusija	Pakistan	Turska	Srbija	Hrvatska	Pakistan
Monoterpenski ugljovodonici	9,76	9,5	93,69	81,9	37,9	12,2	22,5
Oksidovani monoterpini	19,45	41,8				79,4	63,0
Seskviterpenski ugljovodonici	35,07	5,9	–	10,86	60,5	3,5	8,17
Oksidovani seskviterpini	34,77	40,6				–	2,37
Ostalo	0,91	1,9	–	6,7	–	–	–
Dominantna jedinjenja	trans-Nerolidol (24,2%), germakren D (16,02%), timol (7,26%), $\delta$ -kadinen (3,73%) i $\beta$ -bisabolen (3,33%)	trans-Nerolidol (29,8%), 1,8-cineol (14,0%), cis- $\beta$ -terpineol (8,2%), $\beta$ -mircen (4,0%), kamfor (4,0%), p-cimol (3,8%)	Timol (53,3%), karvakrol (10,4%), p-cimen (8,8%), karefor (5,1%), kamfor (4,9%)	2,4,6-Trimetil-anizol (73,41%), 3,5-dimetilbenzoeva kiselina (5,38%), $\beta$ -bisabolen (3,67%)	trans-Kariofilen (27,7%), $\gamma$ -muro-len (10,5%), $\alpha$ -humulen (7,5%), $\alpha$ -pinen (6,9%), 3-oktanon (6,6%), timol (5,6%), kamfor (3,6%)	Timol (30%), karvakrol (49,4%), $\gamma$ -terpinen (5,3%), p-cimen (5,2%), kariofilen (3,5%)	Karvakrol (44,4%), o-cimen (14,0%), $\alpha$ -terpineol (6,47%), $\alpha$ -pinen (6,06%), $\beta$ -kariofilen (5,25%), 1,8-cineol (3,44%)
Broj ukupno identifikovanih jedinjenja	65	42	20	35	26	8	35
Ukupno	99,96	96,6	93,69	99,47	98,4	95,1	96,0

Tabela 3. DPPH antiradikalna aktivnost (RSC) etarskog ulja *Thymus serpyllum* L.Table 3. DPPH radical-scavenging activity of essential oils of *Thymus serpyllum* L.

Agensi	DPPH $IC_{50}$
Etarsko ulje	0,50 $\mu$ L/mL
BHA	0,98 $\mu$ g/mL
BHT	5,58 $\mu$ g/mL

U postojećoj literaturi postoje dva objavljena rada o ispitivanju antioksidativne aktivnosti etarskog ulja *T.*

*serpyllum*. Etarsko ulje *T. serpyllum* poreklom iz Hrvatske [29] pokazalo je slabiju sposobnost da neutrališe DPPH radikale od BHA, BHT, tokoferola, askorbinske kiseline i etarskog ulja *T. vulgaris*. Takođe, etarsko ulje *T. serpyllum* poreklom iz Pakistana [28] pokazalo je slabiju sposobnost da neutrališe DPPH radikale od BHT i timola.

Kako je prikazano u tabeli 4, rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti etarskog ulja *T. serpyllum* dobijenog postupkom vode i vodene pare uređajem SP-130 je pokazalo bolju sposobnost neutralisanja

Tabela 4. Empirijsko istraživanje i literaturni pregled sposobnosti neutralisanja DPPH radikala korišćenjem etarskog ulja roda *Thymus*

Etarsko ulje i poreklo	Metoda dobijanja	Antioksidativna aktivnost	Literatura
<i>T. serpyllum</i> , Srbija	Destilacija vodom i vodenom parom uređajem SP-130	etarsko ulje <i>T. serpyllum</i> > BHA > BHT	Ovde
<i>T. serpyllum</i> ; <i>T. vulgaris</i> Hrvatska	Destilacija vodom-Clevenger	askorbinska kiselina > tokoferol > BHT > BHA > etarsko ulje <i>T. serpyllum</i> > etarsko ulje <i>T. vulgaris</i>	[29]
<i>T. serpyllum</i> ; <i>T. linearis</i> Pakistan	Destilacija vodom-Clevenger	BHT > timol > etarsko ulje <i>T. serpyllum</i> > etarsko ulje <i>T. linearis</i> > karvakrol	[28]
<i>T. vulgaris</i> , Jemen	Destilacija vodom-Clevenger	BHT > etarsko ulje <i>T. vulgaris</i>	[35]
<i>T. vulgaris</i> , Slovačka	Komercijalno etarsko ulje	BHT > askorbinska kiselina > etarsko ulje <i>T. vulgaris</i>	[36]

DPPH radikala od sintetskih antioksidanasa BHT i BHA, što nije podudarno sa rezultatima drugih istraživača. Obzirom na dobijene rezultate verovatno antioksidativna aktivnost etarskih ulja roda *Thymus* se ne može pripisati dominantnim komponentama timolu i karvakrolu kao što ističu drugi istraživači. U našem slučaju se verovatno radi o sinergizmu između većeg broja komponenti prisutnih u etarskom ulju u manjim količinama (65 komponenti). Glavne komponente u ispitivanom etarskom ulju bile su *trans*-nerolidol i germakren D. Buduća istraživanja bi trebalo usmeriti na ispitivanje antioksidativne aktivnosti *trans*-nerolidola i germakrena D kako bi se utvrdio njihov doprinos izuzetno jakoj antioksidativnoj sposobnosti etarskog ulja dobijenog postupkom vode i vodene pare uređajem SP-130.

## ZAKLJUČAK

U ispitivanom etarskom ulju indentifikovano je 65 komponenti. Za razliku od podataka iz literaturnih izvora, timol i karvakrol nisu glavne komponente u ispitivanom etarskom ulju *T. serpyllum* dobijenom metodom destilacije vodom i vodenom parom uređajem SP-130. Glavne komponente u ispitivanom ulju bile su *trans*-nerolidol, germakren D, timol,  $\delta$ -kadinen i  $\beta$ -bisabolen. Uperedna analiza rezultata hemijskog sastava etarskog ulja *T. serpyllum* dobijenog u okviru ispitivanja u ovom radu sa rezultatima iz literature je otkrila velike varijacije u hemijskom sastavu etarskih ulja. Sastav kao i antioksidativna aktivnost etarskih ulja roda *Thymus* zavisi od različitih faktora kao što su način gajenja ili sakupljanja, kvalitet obrađene biljne sirovine, geografsko poreklo, klimatski uslovi, postupci obrade i optimizacije tehnoloških postupaka dobijanja (destilacija, ekstrakcija).

Etarsko ulje *T. serpyllum* je ispoljilo značajnu sposobnost neutralizacije slobodnih DPPH radikala, snažnije od BHT i BHA i može se koristiti kao antioksidantna komponenta u obliku dijetetskih preparata za sprečavanje ili usporavanje oksidativnog stresa prouzrokovnog slobodnim radikalima ili kao potencijalni prirodni antioksidans u prehrambenoj industriji umesto sintetskih antioksidanasa BHT i BHA.

Etarsko ulje dobijeno ovim postupkom se može koristiti u prehrambenoj industriji ne samo zato što štiti potencijalni proizvod od oksidacije već i zbog potencijalne biološke i farmakološke aktivnosti, koje je neophodno detaljnije ispitati. Rezultati su pokazali da etarsko ulje *T. serpyllum* može predstavljati važan izvor za proizvodnju i primenu u prehrambenoj industriji nutritivnih suplemenata, komponenta funkcionalne hrane ili prirodnih antioksidanasa.

## LITERATURA

[1] N. Diklić, *Thymus* L., Flora SR. Srbije (ed. M. Josifović), tom VI, SANU, Odeljenje prirodno-matematičkih nauka, Beograd, 1974, str. 475–509.

- [2] J. Tucakov, Lečenje biljem, Rad, Beograd, 1984, str. 637–638.
- [3] M. Sarić, Lekovite biljke Srbije, knjiga 65, SANU, Odeljenje prirodno-matematičkih nauka, Beograd, 1989, str. 553.
- [4] M. Wichtl, Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 1994.
- [5] W.C. Evans, Trease and Evans' Pharmacognosy. 15<sup>th</sup> ed., Saunders, Edinburgh, 2000.
- [6] K.F. Blinkova, V.V. Vandyshev, M.N. Komarova, et al., editors. Справочное издание, Растения для нас, Учебная книга, Санкт-Петербург, 1996.
- [7] F. Senatore, Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a *Thyme* (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy), J. Agric. Food Chem. **44** (1996) 1327–1332.
- [8] J. Passet, *Thymus vulgaris* L. chemotaxonomie et biogenese monoterpénique, PhD Thesis, Faculte de Pharmacie, Montpellier, 1971, p. 153.
- [9] P. Vernet, P.H. Gouyon, G. Valdeyron, Genetic control of the oil content in *Thymus vulgaris* L.: a case of polymorphism in a biosynthetic chain, Genetics **69** (1986) 227–231.
- [10] J.D. Thompson, Population structure and the spatial dynamics of genetic polymorphism in thyme, In: *Thyme: The genus Thymus* (eds. Stahl- Biskup E, Sáez F), Taylor and Francis, New York, 2002, pp. 44–74.
- [11] D.M. Stanisavljević, B.P. Zlatković, M.S. Ristić, D.T. Veličković, S.M. Đorđević, M.L. Lazić, Hemijski sastav etarskog ulja (*Thymus serpyllum* L.) sa područja Kopaonika, Savremene tehnologije **1** (2012) 25–29.
- [12] N. Babović, S. Petrović, Obtaining of the antioxidants by supercritical fluid extraction, Hem. Ind. **65** (2011) 79–86.
- [13] N.V. Yanishlieva, in: J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon (Eds.), Antioxidants in food: Practical Applications, CRC Press, Cambridge, 2001, pp. 23–56.
- [14] J. Pokorny, in: J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon (Eds.), Antioxidants in food: Practical Applications, CRC Press, Cambridge, 2001, pp. 1–7.
- [15] N. Babović, S. Đilas, M. Jadranin, V. Vajs, J. Ivanović, S. Petrović, I. Žižović, Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity, Innov. Food Sci. Emerg. Technol. **11** (2010) 98–107.
- [16] N. Babović, I. Žižović, S. Saičić, J. Ivanović, S. Petrović, Oxidative stabilisation of sunflower oil by antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs, Chem. Ind. Chem. Eng. Q. **16** (2010b) 287–293.
- [17] S. Burt, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. Int. J. Food Microbiol. **94** (2004) 223–253.
- [18] M.V. Bhaskara, P. Angers, A. Gosselin, J. Arul, Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits, Phytochemistry **47** (1998) 1515–1520.
- [19] K. Ložienė, P.R. Venskutonis, A. Šipailienė, J. Labokas, Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. Chemotypes, Food Chem. **103** (2007) 546–559.

- [20] A.M. Ahmad, I. Khokhar, I. Ahmad, M.A. Kashmiri, A. Adnan, M. Ahmad, Study of antimicrobial activity and composition by GC/MS spectroscopic analysis of the essential oil of *Thymus serpyllum*, *J. Food Safety* **5** (2006) 56–60.
- [21] M.U. Rahman, G. Shereen, Antibacterial activities of *Thymus serpyllum* essential oil, *PPCSIR* **46** (2003) 135–138.
- [22] S.J. Lee, K. Umamo, T. Shibamoto, K.G. Lee, Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties, *Food Chem.* **91** (2005) 131–137.
- [23] K.A. Youdim, H.J.D. Dormanand, S.G. Deans, The antioxidant effectiveness of thyme oil,  $\alpha$ -tocopherol and ascorbyl palmitate on evening primrose oil oxidation. *J. Essent. Oil Res.* **11** (1999) 643–648.
- [24] M. Hazzit, A. Baaliouamer, M.L. Faleiro, M.G. Miguel, Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities, *J. Agr. Food Chem.* **54** (2006) 6314–6321.
- [25] M.C. Rota, A. Herrera, R.M. Martinez, J.A. Sotomayor, M.J. Jordan, Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils, *Food Control* **19** (2008) 681–687.
- [26] A. Raal, U. Paaver, E. Arak, A. Orav, Content and composition of the essential oil of *Thymus serpyllum* L. growing wild in Estonia, *Medicina (Kaunas)* **40** (2004) 795–800.
- [27] T. Ummihan, S. Mitsuru, G. Motonobu, O.Semih, Chemical compositions and antioxidant properties of essential oils from nine species of Turkish plants obtained by supercritical carbon dioxide extraction and steam distillation, *Int. J Food Sci. Nutr. International* **59** (2008) 619–634.
- [28] A.I. Hussain, F. Anwar, Shahzad S.A.S. Chatha, S. Latif, S.T.H. Sherazi, A. Ahmad, J. Worthington, S.D. Sarker, Chemical composition and bioactivity studies of the essential oils from two *Thymus* species from the Pakistani flora, *LWT - Food Sci. Technol.* **50** (2013) 185–192.
- [29] T. Kulisic, A. Radonic, M. Milos, Antioxidant properties of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) essential oils, *Ital. J. Food Sci.* **3** (2005) 315–324.
- [30] Y.A. Banaeva, L.M. Pokrovsky, A.V. Tkachev, Исследование химического состава эфирного масла представителей рода *Thymus* L., произрастающих на Алтае, *Химия растительного сырья* **3** (1999) 41–48.
- [31] R.P. Adams, Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry, 4th Ed., Allured Publishing Co., Carol Stream, IL, 2007, pp. 69–351.
- [32] C. Sánchez-Moreno, Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, *Food Sci. Technol. Int.* **8** (2002) 121–137.
- [33] S.V. Sur, F.M. Tubyupa, L.I. Sur, Gas chromatographic determination of monoterpenes in essential oil of medicinal plants. *J. Chromatogr.* **542** (1991) 451–458.
- [34] E. Guenther, The essential Oils, Vol. III, D van Nostard Company Inc., New York, 1967.
- [35] A. Maher Ali Al Maqtari, M. Saeed Alghalibi, H. Ebtesam Alhamzy, Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Thymus vulgaris* from Yemen, *Turk. J. Biochem.* **36** (2011) 342–349.
- [36] M. Kačániová, N. Vukovič, L. Hleba, A. Bobková, A. Pavelková, K. Rovná, H. Arpášová, Antimicrobial and antiradicals activity of *Origanum vulgare* L. and *Thymus vulgaris* essential oils, *JMBFS* **2** (2012) 263–271.



## SUMMARY

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF *Thymus serpyllum* L.

Slobodan S. Petrović<sup>1</sup>, Mihailo S. Ristić<sup>2</sup>, Nada V. Petr, Miodrag L. Lazić<sup>4</sup>, Marina Francišковиć<sup>5</sup>, Slobodan D. Petrović<sup>6</sup>

<sup>1</sup>BIOSS – PS and other, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup>Institute for Medicinal Plant Research “Dr Josif Pančić”, Belgrade, Serbia

<sup>3</sup>Faculty of Applied Ecology “Futura”, Belgrade, Serbia

<sup>4</sup>Faculty of Technology, University of Niš, Leskovac, Serbia

<sup>5</sup>Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Serbia

<sup>6</sup>Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Serbia

(Scientific paper)

Wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) is a popular remedy regarding both traditional and conventional medicine. It is used as the antiseptic, aromatic, expectorant, stomachic, antispasmodic, carminative and preservative substance. For the purpose of this paper, wild thyme essential oil was isolated from the dried herb *T. serpyllum* by hydrodistillation. Original semi-industrial distillation device SP-130 performing distillation by water and steam was used for the hydrodistillation of *T. serpyllum* essential oils. The temperature during the hydrodistillation in the device SP-130 ranged from 100–102 °C at atmospheric pressure, and the whole process lasted 5 hours. The isolated essential oil is a liquid of light yellow colour and the odour characteristic of the genus *Thymus*. Obtained yield of essential oil was 0.08 %, with 65 components identified in the tested essential oil. The most represented chemical groups are sesquiterpene hydrocarbons with 35.1%, and oxygenated sesquiterpenes with 34.8%. The main components of essential oil of *T. serpyllum* were: *trans*-nerolidol (24.2%), germacrene D (16.0%), thymol (7.3%),  $\delta$ -cadinene (3.7%) and  $\beta$ -bisabolene (3.3%). The essential oil showed significantly better ability to neutralize DPPH free radicals ( $IC_{50} = 0.503 \mu\text{L/mL}$ ) compared with synthetic antioxidants BHA and BHT. Synthetic chemical compounds such as BHA and BHT are used in food industry as antioxidants due to their ability to prolong the shelf-life of foodstuffs by protecting them against deterioration caused by oxidation, such as fat rancidity, colour changes, degradation of the flavor and loss of nutrient value. In recent years, there is a considerable interest in finding natural compounds that could replace synthetic antioxidants because of adverse toxicological reports on many synthetic compounds. Lamiaceae herbs and their essential oils or extracts application has proven to be the effective preservation agents for the extension shelf-life of foodstuffs, indicating their potential use in food industry as functional ingredients and food additives. The antioxidant activity of extracts from some Lamiaceae herbs is comparable to that of the most common synthetic antioxidants BHT and BHA. Free radicals are a major cause of many degenerative diseases, such as atherosclerosis, cancer, cardiovascular diseases, inflammatory bowel diseases, skin aging, old age dementia and arthritis. Epidemiological data and randomized clinical trials provide sample indications that antioxidants play a fundamental role in the prevention of cancer and cardiovascular diseases. They act as scavengers of reactive oxygen species and metal chelators that protect human cells and reduce oxidative damages. Natural antioxidants are important in the food industry because they can have a double functionality, that is, they can be useful as a food preservation agents while providing important health benefits for humans by maintaining our health and preventing disease. This investigation showed that the essential oil of *T. serpyllum* can be an important source for the production and application in the food industry as nutritional supplements, functional food components or natural food antioxidants.

**Keywords:** *Thymus serpyllum* L. • Hydrodistillation • Essential oil • Chemical composition • Antioxidative activity