

Inhibicijski učinak odabranih biljnih ekstrakata na aktivnost enzima α -glukozidaza

Miletić, Vicenzia

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:750004>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET U SPLITU

INHIBICIJSKI UČINAK ODABRANIH BILJNIH EKSTRAKATA NA
AKTIVNOST ENZIMA α -GLUKOZIDAZA

DIPLOMSKI RAD

VICENZIA MILETIĆ

Matični broj: 86

Split, listopad 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE
ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

INHIBICIJSKI UČINAK ODABRANIH BILJNIH EKSTRAKATA NA
AKTIVNOST ENZIMA α -GLUKOZIDAZA

DIPLOMSKI RAD

VICENZIA MILETIĆ

Matični broj: 86

Split, listopad 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY
ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

INHIBITORY EFFECT OF SELECTED PLANT EXTRACTS ON
 α -GLUCOSIDASE ACTIVITY
DIPLOMA THESIS

VICENZIA MILETIĆ

Parent number: 86

Split, October 2019.

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 19. Sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

Mentor: izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo

INHIBICIJSKI UČINAK ODABRANIH BILJNIH EKSTRAKATA NA AKTIVNOST ENZIMA α -GLUKOZIDAZA

Vicenzia Miletić, 86

Sažetak: Šećerna bolest je rastući javnozdravstveni problem. Mnoga provedena istraživanja potvrdila su dobiti ljekovitih biljaka s hipoglikemijskim učinkom u liječenju dijabetesa. Učinak ovih biljaka može odgoditi razvoj komplikacija šećerne bolesti te ispraviti metaboličke nepravilnosti. Cilj ovog rada bio je testirati sposobnost eteričnih ulja i hidrolata odabranih biljnih vrsta da inhibiraju enzim α -glukozidazu, metodom po Sigma-Aldrichu. Za uzorke hidrolata je određen i sadržaj ukupnih fenola metodom po Folin-Ciocalteu. Rezultati su pokazali da je najučinkovitiji inhibitor među testiranim uzorcima hidrolat biljke *Juniperus communis spp. nana* ($IC_{50}=47,89$ mg/L). Ostali uzorci biljaka za sve testirane koncentracije slabo inhibiraju enzim α -glukozidazu. Među eteričnim uljima najbolji inhibitor enzima α -glukozidaze je ulje biljke *Hymenocarpus circinnatus* koje u koncentraciji 1 g/L inhibira enzim s $52,16\pm 3,82$ %. Nešto lošiji učinak kod iste koncentracije imaju *Centaurea scabiosa* s $38,72\pm 11,05$ % i *Mantisalca salmantica* $32,2\pm 12,72$ %, dok eterično ulje biljke *Campanula rapunculus* nije pokazalo inhibicijski učinak na ispitivani enzim. Najučinkovitiji inhibitor, hidrolat biljke *Juniperus communis spp. nana* sadrži i najviše fenolnih spojeva (196 mg GAE/g hidrolata), dok za ostale testirane hidrolate nema značajne povezanosti između sadržaja ukupnih fenola i inhibicije enzima.

Ključne riječi: hidrolati, eterična ulja, α -glukozidaza, ukupni fenoli

Rad sadrži: 38 stranica, 25 slika, 6 tablica, 45 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Josipa Giljanović – predsjednik
2. doc. Dr. sc. Mila Radan – član
3. izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo – član-mentor

Datum obrane: (15. listopada 2019.)

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Graduate study of chemistry

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 19.

Mentor: Olivera Politeo – PhD, associate prof.

INHIBITORY EFFECT OF SELECTED PLANT EXTRACTS ON α -GLUCOSIDASE ACTIVITY

Vicenzia Miletić, 86

Abstract: Diabetes is a growing public health problem. Many studies have confirmed the benefits of medicinal plants with a hypoglycemic effect in the treatment of diabetes. The effect of these herbs can delay the development of diabetes complications and correct metabolic abnormalities. The aim of this study was to test the ability of essential oils and hydrolats of selected plant species to inhibit the α -glucosidase enzyme, using the Sigma-Aldrich method. The content of total phenolics was determined by the Folin-Ciocalteu method for the hydrolate samples. The results showed that the most effective inhibitor among the tested hydrolats was that of the *Juniperus communis spp. nana* plant ($IC_{50}=47.89$ mg/L). Other samples at all tested concentrations weakly inhibit the enzyme. Among essential oils, the best inhibitor of α -glucosidase enzyme is the oil of the plant *Hymenocarpus circinnatus*, which at a concentration of 1 g/L inhibits the enzyme by 52.16 ± 3.82 %. *Centaurea scabiosa* with 38.72 ± 11.05 % and *Mantisalca salmantica* with 32.2 ± 12.72 % had a slightly lower inhibitory effect at the same concentration, while the essential oil of *Campanula rapunculus* showed no inhibitory effect on this enzyme. The highest total phenolics content was found in most effective inhibitor; hydrolate of the plant *Juniperus communis spp. nana* (196 mg GAE/g hydrolate), while for the other tested hydrolats there is no significant correlation between total phenolics content and enzyme inhibition.

Keywords: hydrolats, essential oils, α -glucosidase, total phenolics

Thesis contains: 38 pages, 25 figures, 6 tables, 45 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Josipa Giljanović – PhD, associate prof. – chair person
2. Mila Radan – PhD, assistant prof. – member
3. Olivera Politeo – PhD, associate prof. – supervisor

Defence date: (October 15 2019.)

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Olivere Politeo, u razdoblju od svibnja do srpnja 2019. godine.

Zahvaljujem se članovima Zavoda za biokemiju, a posebno mentorici izv. prof. dr. sc. Oliveri Politeo što mi je omogućila izradu ovog rada, na stručnim savjetima i strpljenju.

Zahvaljujem se i cijeloj obitelji na pruženoj podršci, ljubavi i razumijevanju. Također se zahvaljujem i svojim kolegama studentima na pomoći i nezaboravnim iskustvima.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Odrediti inhibicijski učinak hidrolata odabranih biljnih vrsta na enzim α -glukozidazu, novopostavljenom metodom po Sigma-Aldrichu
- Odrediti inhibicijski učinak eteričnih ulja odabranih biljnih vrsta na enzim α -glukozidazu, novopostavljenom metodom po Sigma-Aldrichu
- Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih spojeva u hidrolatima odabranih biljnih vrsta
- Zaključiti o tome da li je udio fenolnih spojeva hidrolata biljaka u svezi s antidijabetičkim učinkom

SAŽETAK

Šećerna bolest je rastući javnozdravstveni problem. Mnoga provedena istraživanja potvrdila su dobrobiti ljekovitih biljaka s hipoglikemijskim učinkom u liječenju dijabetesa. Učinak ovih biljaka može odgoditi razvoj komplikacija šećerne bolesti te ispraviti metaboličke nepravilnosti.

Cilj ovog rada bio je testirati sposobnost eteričnih ulja i hidrolata odabranih biljnih vrsta da inhibiraju enzim α -glukozidazu, metodom po Sigma-Aldrichu. Za uzorke hidrolata je određen i sadržaj ukupnih fenola metodom po Folin-Ciocalteu. Rezultati su pokazali da je najučinkovitiji inhibitor među testiranim uzorcima hidrolat biljke *Juniperus communis* spp. *nana* ($IC_{50}=47,89$ mg/L). Ostali uzorci biljaka za sve testirane koncentracije slabo inhibiraju enzim α -glukozidazu.

Među eteričnim uljima najbolji inhibitor enzima α -glukozidaze je ulje biljke *Hymenocarpus circinnatus* koje u koncentraciji od 1 g/L inhibira enzim s $52,16\pm 3,82$ %. Nešto lošiji učinak kod iste koncentracije imaju *Centaurea scabiosa* sa $38,72\pm 11,05$ % i *Mantisalca salmantica* sa $32,2\pm 12,72$ %, dok eterično ulje biljke *Campanula rapunculus* nije pokazalo inhibicijski učinak na ispitivani enzim.

Najučinkovitiji inhibitor, hidrolat biljke *Juniperus communis* spp. *nana* sadrži i najviše fenolnih spojeva (196 mg GAE/g hidrolata), dok za ostale testirane hidrolate nema značajne povezanosti između sadržaja ukupnih fenola i inhibicije enzima.

Ključne riječi: hidrolati, eterična ulja, α -glukozidaza, ukupni fenoli

SUMMARY

Diabetes is a growing public health problem. Many studies have confirmed the benefits of medicinal plants with a hypoglycemic effect in the treatment of diabetes. The effect of these herbs can delay the development of diabetes complications and correct metabolic abnormalities.

The aim of this study was to test the ability of essential oils and hydrolats of selected plant species to inhibit the α -glucosidase enzyme, using the Sigma-Aldrich method. The content of total phenolics was determined by the Folin-Ciocalteu method for the hydrolate samples. The results showed that the most effective inhibitor among the tested hydrolats was that of the *Juniperus communis* spp. *nana* plant ($IC_{50}=47.89$ mg/L). Other samples at all tested concentrations weakly inhibit the enzyme.

Among essential oils, the best inhibitor of α -glucosidase enzyme is the oil of the plant *Hymenocarpus circinnatus*, which at a concentration of 1 g/L inhibits the enzyme by 52.16 ± 3.82 %. *Centaurea scabiosa* with 38.72 ± 11.05 % and *Mantisalca salmantica* with 32.2 ± 12.72 % had a slightly lower inhibitory effect at the same concentration, while the essential oil of *Campanula rapunculus* showed no inhibitory effect on this enzyme.

The highest total phenolics content was found in most effective inhibitor; hydrolate of the plant *Juniperus communis* spp. *nana* (196 mg GAE/g hydrolate), while for the other tested hydrolats there is no significant correlation between total phenolics content and enzyme inhibition.

Keywords: hydrolats, essential oils, α -glucosidase, total phenolics

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Šećerna bolest.....	2
1.2. Ljekovite biljke i njihove sastavnice u terapiji šećerne bolesti.....	3
1.2.1. Polifenoli.....	4
1.2.2. Eterična ulja.....	5
1.3. Hidrolati.....	6
1.4. α -glukozidaza.....	6
1.5. Ispitivane biljne vrste.....	10
1.6. Određivanje inhibicijskog učinka hidrolata odabranih biljnih vrsta na enzim α -glukozidazu.....	18
1.7. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenola.....	19
1.8. Spektrofotometrija.....	19
2. EKSPERIMENTALNI DIO	21
2.1. Biljni materijal.....	21
2.2. Metoda izolacije hlapljivih spojeva iz biljnog materijala.....	21
2.3. Priprava hidrodestilata odabranih biljnih vrsta.....	22
2.4. Kemikalije.....	23
2.5. Određivanje inhibicijskog učinka hidrolata odabranih biljnih vrsta na enzim α -glukozidazu.....	23
2.5.1. Priprema kemikalija.....	23
2.5.2. Postupak.....	24
2.6. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenola.....	27
3. REZULTATI I RASPRAVA	28
3.1. Određivanje inhibicijskog učinka eteričnih ulja i hidrolata odabranih biljnih vrsta na enzim α -glukozidazu.....	28
3.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih spojeva u hidrolatima odabranih biljnih vrsta.....	31
4. ZAKLJUČAK	34

5. LITERATURA.....	35
---------------------------	-----------

UVOD

Šećerna bolest je rastući javnozdravstveni problem suvremenog društva, najviše u zemljama srednjeg dohotka. Dijabetes je prepoznat kao važan uzrok prerane smrti i invaliditeta.⁽¹⁾

Ljekovito bilje i njihove sastavnice koriste se tradicionalno u liječenju raznih bolesti i zdravstvenih tegoba, te su izvor mnogih suvremenih lijekova. Svjetska zdravstvena organizacija potvrdila je da 80 posto svjetske populacije koristi biljne lijekove za svoje zdravstvene potrebe, posebno zemlje u razvoju. U međuvremenu, potrošači u razvijenim zemljama postaju razočarani modernom zdravstvenom zaštitom te traže alternative.⁽²⁾ Mnoga su istraživanja potvrdila dobrobiti ljekovitih biljaka s hipoglikemijskim učinkom u liječenju dijabetesa. Učinak ovih biljaka može odgoditi razvoj komplikacija šećerne bolesti te ispraviti metaboličke nepravilnosti.⁽³⁾

Postoje tri glavna tipa dijabetesa: tip 1, tip 2 i gestacijski dijabetes. Dijabetes tipa 1 – može se pojaviti u bilo kojoj dobi, najčešće u djetinjstvu i adolescenciji. Kod dijabetesa tipa 1 tijelo proizvodi vrlo malo ili uopće ne proizvodi inzulin, te je za regulaciju glukoze u krvi potrebno primati injekcije inzulina. Dijabetes tipa 2 – češći je u odraslih i broji oko 90 posto svih oboljelih. Kod dijabetesa tipa 2 tijelo ne može iskoristiti proizvedeni inzulin. Liječenje dijabetesa tipa 2 uključuje pojačanu fizičku aktivnost i zdravu prehranu. Međutim, s vremenom će većina ljudi s dijabetesom tipa 2 trebati lijekove i/ili inzulin da bi razinu glukoze držali pod kontrolom. Gestacijski dijabetes – tip dijabetesa koji uključuje visoke razine glukoze u krvi tijekom trudnoće a povezan je sa komplikacijama za majku i dijete.⁽⁴⁾

Biljke su izvori mnogih biološki aktivnih tvari – fitokemikalija koje imaju antidijabetička svojstva i tradicionalno se koriste u liječenju dijabetesa. Ljekovito bilje može biti korišteno kao alternativa ili zajedno s konvencionalnim lijekovima, posebno kada potonji imaju ograničene poželjne učinke. Razni lijekovi koji se danas koriste u liječenju dijabetesa tipa 2 potječu od biljaka.⁽⁵⁾ Inhibitori enzima (α -glukozidaze i α -amilaze) koji hidroliziraju ugljikohidrate nude učinkovitu strategiju za sprječavanje hiperglikemije kontrolirajući razgradnju škroba. Prirodni inhibitori α -glukozidaze i α -amilaze, kao i antioksidansi iz prirodnih izvora nude nutritivne sastojke koji utječu na ljudske fiziološke funkcije u cilju liječenja dijabetesa.⁽⁶⁾

1. OPĆI DIO

1.1. Šećerna bolest

Dijabetes (lat. *diabetes mellitus*) ili šećerna bolest je kronična bolest koja se javlja kada gušterača više nije u mogućnosti stvarati inzulin, ili kada tijelo proizvedeni inzulin ne može iskoristiti.

Inzulin je hormon koji proizvodi gušterača, a koji regulira razinu glukoze u krvi tako da omogućava ulazak glukoze iz krvi u stanice gdje se pretvara u energiju. Nedostatak inzulina ili nemogućnost njegovog korištenja dovodi do povišene razine glukoze u krvi – hiperglikemije. Dugotrajno povišena razina glukoze u krvi uzrokuje oštećenje i propadanje raznih organa i tkiva u tijelu.⁽⁴⁾

Dijabetes se javlja u svakoj populaciji na svijetu, uključujući i ruralne dijelove zemalja niskog i srednjeg dohotka. Broj oboljelih od dijabetesa neprestano raste, Svjetska zdravstvena organizacija procjenjuje da je 2014. bilo 422 milijuna odraslih osoba oboljelih od dijabetesa. Rasprostranjenost kod odraslih je porasla od 4,7 posto u 1980. na 8,5 posto u 2014., sa najvećim porastom u zemljama niskog i srednjeg dohotka. Prema procjenama Međunarodne dijabetičke federacije (IDF) 1,1 milijun djece i adolescenata u dobi od 14-19 godina ima dijabetes tipa 1. Bez intervencija kako bi se zaustavio dijabetes, do 2045. biti će, pretpostavlja se, najmanje 629 milijuna oboljelih od dijabetesa. Visoka razina glukoze u krvi uzrokuje skoro 4 milijuna smrtnih slučajeva godišnje.⁽⁷⁾

Oboljeli od dijabetesa imaju povećan rizik za razvoj brojnih zdravstvenih problema. Konstantno visoke razine glukoze u krvi vode do ozbiljnih bolesti koje obuhvaćaju srce i krvne žile, oči, bubrege, živce i zube. Također oboljeli imaju veći rizik od razvoja infekcija. U skoro svim zemljama visokog dohotka, dijabetes je vodeći uzrok kardiovaskularnih bolesti, sljepoće, zatajenja bubrega i amputacije donjih ekstremiteta.⁽⁸⁾

Dijabetes melitus tipa 1 – definira se nedostatkom inzulina sa ili bez naznake autoimune destrukcije beta-stanica Langerhansovih otočića, a može nastati u bilo kojoj životnoj dobi. Temelj intolerancije glukoze i šećerne bolesti su: nedostatak inzulina i neosjetljivost (rezistencija) na inzulin. Do nedostatka inzulina dolazi zbog propadanja beta-stanica, uz odgovarajuću genetsku predispoziciju pod utjecajem provokacije iz okoline, pokrene se autoimuni proces koji posljedični nedostatak inzulina može ubrzati. Liječenje se provodi inzulinom te dodatnim mjerama ovisno o stanju bolesnika i pratećim poremećajima.⁽⁹⁾

Diabetes melitus tipa 2 – heterogena skupina oboljenja karakterizirana različitim stupnjevima inzulinske rezistencije, poremećenim djelovanjem i/ili lučenjem inzulina uz uvećanje proizvodnje glukoze u jetri procesom glukoneogeneze. Dijabetesu tipa 2 prethodi predijabetes koji karakteriziraju tri oblika poremećaja homeostaze glukoze: oštećenje tolerancije glukoze natašte (OTG-NT), oštećenje tolerancije glukoze postprandijalno (OTG-PP) i kombinacija oštećenja glukoze postprandijalno i natašte (OTG-kombinirana). Važno je što je god moguće ranije dijagnosticirati oboljenje i odmah započeti liječenje. Ukoliko se liječenje započne u stanju predijabetesa terapija je uspješnija. Osobe s predijabetesom imaju veliku prevalenciju nastanka koronarnog srčanog oboljenja, perifernih vaskularnih oboljenja i moždanog udara, tj. makrovaskularne komplikacije dijabetesa. Liječenje dijabetesa tipa 2 započinje dijabetičkom prehranom i tjelovježbom, a potom se uvodi farmakoterapija. Koriste se kombinacije oralnih hipoglikemika kako bi se djelovalo na sve dijelove poremećenog metabolizma u dijabetesu tipa 2: lučenje inzulina iz β -stanica gušterače, inzulinsku rezistenciju mišićnih i masnih stanica, pojačana proizvodnja glukoze u jetri procesom glukoneogeneze. Lijekovi koji se preporučuju: nebetacitotropni lijekovi (metformin i akarboza), betacitotropni lijekovi (preparati sulfonilureje novije generacije, preparati gliklazida i glimepirida), preparati migletidina (repaglinid) i tiazolidindion (roziglitazon), te inkretinomimetici. Šećerna bolest tipa 2 je progresivna bolest, zbog čega će praktički 50 posto bolesnika morati prihvatiti terapiju inzulinom.⁽¹⁰⁾

1.2. Ljekovite biljke i njihove sastavnice u terapiji šećerne bolesti

Osim konvencionalnih oralnih i injekcijskih lijekova, tretmani za dijabetes uključuju izmjenu prehrane, redovito vježbanje, promjene načina života, regulaciju težine i druge alternative ili biljnu terapiju. Biljni lijekovi se propisuju kao lijekovi izbora zbog svoje učinkovitosti, malo nuspojava i relativno niske cijene. Mehanizam djelovanja biljnih lijekova uključuje reguliranje metabolizma glukoze, snižavanje razine kolesterola, eliminaciju slobodnih radikala, povećavanje izlučivanja inzulina i poboljšavanje mikrocirkulacije.⁽¹¹⁾

Više od 400 biljaka sa hipoglikemijskim učinkom dostupno je u literaturi, međutim potraga za novim prirodnim lijekovima još je atraktivna jer biljke sadrže spojeve koji pokazuju alternativni i sigurni učinak na dijabetes melitus. Biljke sadrže kemijske spojeve

koji uključuju glikozide, alkaloide, aminokiseline, amine i derivate karboksilnih kiselina, antranoide, ugljikohidrate, terpenoide, karotenoide, minerale, vitamine i anorganske spojeve, flavonoide, peptidoglikane, polifenole i njihove derivate, saponine i.t.d.^(3,11)

Budući da polifenoli posjeduju višestruke biološke aktivnosti i čine važan dio ljudske prehrane, nedavno su se pojavili kao kritične fitokemikalije u prevenciji i tretmanu dijabetesa tipa 2. Njihovo hipoglikemijsko djelovanje rezultat je njihovog antioksidacijskog učinka uključenog u oporavak izmijenjene antioksidacijske obrane i obnavljanje mehanizma za izlučivanje inzulina u stanicama gušterače, ili sposobnosti da inhibiraju aktivnost enzima koji hidroliziraju ugljikohidrate – α -amilaze i α -glukozidaze. Stoga je otkrivanje inhibitora α -glukozidaze iz tradicionalnih biljaka vrlo korisno u razvoju novih antidijabetika.⁽¹²⁾

Znanstvena istraživanja pokazala su da i eterična ulja pokazuju antidijabetički učinak. Rezultati ispitivanja inhibicijskog učinka biljke *Salvia schimperi* i *Marrubium vulgare* na α -glukozidazu pokazala su IC₅₀ vrijednost od 14,26 μ L i 35,47 μ L. GC-MS analiza eteričnog ulja biljke *Salvia schimperi* pokazala je prisutnost sljedećih kemijskih spojeva: 4,8- α -epoksikariofilen (26,06 %), kariofilen oksid (20,7 %), bisabolol (11,67 %), kadinen eter (7,46 %) i kubenol (5,35 %), dok je za eterično ulje biljke *Marrubium vulgare* pokazana najveća prisutnost za: kariofilen (10,95 %), oktadekanol (10,44 %), α -bisabolen (9,72 %), β -farnezan (6,91 %), geranil-linalol (5,86 %) i oktadekanol acetat (5,36 %).⁽¹³⁾

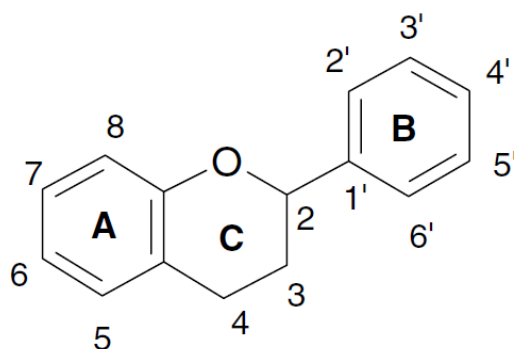
Eterična ulja biljaka *Pyrola calliantha*, *Senecio scandens* i *Schisandra chinensis* pokazala su IC₅₀ vrijednost od 0,02211 mg/mL, 0,13040 mg/mL i 0,01925 mg/mL.⁽¹⁴⁾

1.2.1. Polifenoli

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti biljaka nastali u biosintetskim putevima šikiminske kiseline, fenilpropanoide i pentoza fosfata. Sadrže aromatski prsten koji ima jedan ili više hidroksilnih supstituenata a mogu biti jednostavne fenolne molekule do visoko polimerizirani spojevi. U prirodi se javljaju kao konjugati mono i polisaharida, vezani na jednu ili više fenolnih grupa, te kao funkcionalni derivati, esteri i metil esteri. Dijele se u nekoliko skupina: flavonoide, fenolne kiseline, lignane, stilbene i tanine. Fenolne kiseline sastoje se od dvije podskupine: hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Hidroksibenzojeve kiseline imaju C₆-C₁ strukturu a čine ih: galna, *p*-

hidroksibenzojeva, protokatehinska, vanilinska i siringinska kiselina. Hidroksicimetne kiselina sadrže pobočni lanac od tri ugljika (C₆-C₃), a najčešće su kafeinska, ferulinska, *p*-kumarinska i sinapinska kiselina.

Flavonoidi čine najveću skupinu biljnih fenola, više od polovice od 8000 prirodnih fenolnih spojeva. To su spojevi niske molekulske mase, koji se sastoje od 15 ugljikovih atoma, raspoređenih u C₆-C₃-C₆ konfiguraciji. Struktura sadrži 2 aromatska prstena A i B povezanih sa mostom od 3 ugljika, obično u obliku heterocikličkog prstena C (Slika 2). Aromatski prsten A nastaje acetat/malonatnim biosintetskim putem, a prsten B nastaje putem šikiminske kiseline. Modifikacije u strukturi C prstena rezultiraju glavnim skupinama flavonoida: flavonoli, flavoni, flavanoni, flavanoli (katehini), izoflavoni, flavanonoli, antocijanini. Modifikacije na prstenovima A i B dovode do različitih spojeva unutar svake skupine flavonoida. Te modifikacije mogu uključivati oksidaciju, alkilaciju, glikozilaciju, acilaciju i sulfataciju.



Slika 1. Osnovna struktura flavonoida⁽¹⁵⁾

Tanini, spojevi s relativno visokom molekulskom masom, čine treću važnu skupinu fenolnih spojeva, a mogu se podijeliti u hidrolizirajuće i kondenzirane tanine. Prvi su esteri galne kiseline a drugi (poznati kao proantocijanidi) su polimeri polihidroksiflavan-3-ol monomera.⁽¹⁵⁾

1.2.2. Eterična ulja

Eterična ulja su hlapljivi, prirodni, složeni spojevi karakterizirani jakim mirisom; sekundarni metaboliti aromatičnih biljaka. Obično su dobivena destilacijom vodenom parom ili vodom. Poznata su po svom ljekovitom djelovanju i mirisu, stoga se koriste u kozmetici, pri konzerviranju hrane, kao antimikrobni, analgetski, sedativni, protuupalni,

spazmolitički lijekovi i lokalni anestetici. Eterična ulja su vrlo kompleksne prirodne smjese koje mogu sadržavati oko 20-60 komponenti u različitim koncentracijama. Karakterizirana su s dvije ili tri glavne komponente u vrlo visokim koncentracijama (20-70%) u usporedbi s drugim komponentama prisutnim u tragovima. U pravilu ove glavne komponente određuju biološka svojstva eteričnog ulja. Komponente spadaju u dvije skupine različitog biosintetskog podrijetla. Prvu skupinu čine oksidirani i neoksidirani terpeni, a drugu alifatski i aromatski spojevi male molekulske mase. Trenutno je poznato 3000 eteričnih ulja, od kojih 300 imaju posebnu komercijalnu vrijednost u farmaceutskoj, poljoprivrednoj, prehrambenoj, kozmetičkoj i industriji parfema.⁽¹⁶⁾

1.3. Hidrolati

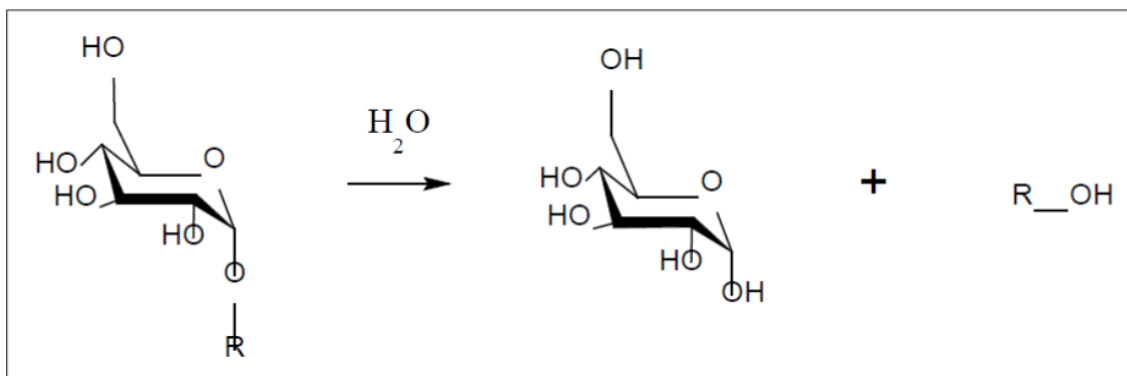
Tijekom procesa destilacije destilat se razdvaja u polarnu ili hidrofilnu fazu – hidrolat i nepolarnu hidrofobnu fazu – eterično ulje. Polarnost velikim dijelom određuje u kojoj mjeri će se pojedini spojevi distribuirati u određenu fazu. Usporedba sastava eteričnog ulja i hidrolata dobivenih iz iste destilacije pokazuje da su to neovisni proizvodi. Neki spojevi su prisutni u oba proizvoda ali u različitim koncentracijama, a neke možemo pronaći samo u eteričnom ulju ili hidrolatu. Hidrolat sadrži hlapljive organske spojeve iz biljke kao što su derivati masnih kiselina, aminokiselina i drugih metabolita neterpenskog podrijetla: alkoholi, aldehidi, ketoni, esteri, kiseline i fenoli.⁽¹⁷⁾

1.4. α -glukozidaza

α -glukozidaza je važan enzim pronađen u ljudskom tijelu.⁽¹⁸⁾

Hidroliza ugljikohidrata glavni je izvor glukoze u krvi. Enterociti tankog crijeva mogu apsorbirati samo monosaharide poput glukoze i fruktoze. Polisaharidi moraju biti razgrađeni do monosaharida prije nego mogu biti apsorbirani.

α -amilaza hidrolizira α -1,4-glikozidnu vezu škroba, glikogena i raznih oligosaharida, a α -glukozidaza dalje razgrađuje disaharide na jednostavne šećere. Enzim α -glukozidaza katalizira cijepanje glikozidne veze i istovremeno oslobađa glukozu sa nereducirajućeg kraja lanca oligosaharida.⁽⁶⁾



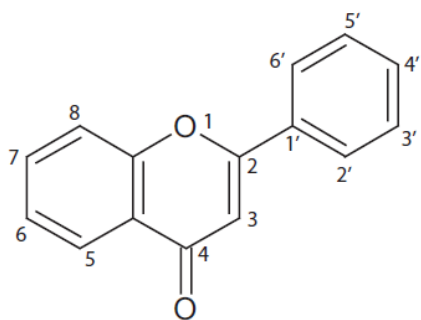
Slika 2. Razgradnja oligosaharida do glukoze ⁽¹⁹⁾

Inhibicijom α -glukozidaze u crijevima odgađa se razgradnja ugljikohidrata što rezultira smanjenjem razine glukoze u krvi nakon obroka.⁽¹⁸⁾ Ovo se pokazalo kao jedna od najboljih strategija za smanjenje postprandijalnog porasta glukoze u krvi i za izbjegavanje kasnijih dijabetičkih komplikacija.⁽¹⁹⁾ Inhibitori α -glukozidaze kao što su akarboza, miglitol i vogliboza koriste se kao terapijska sredstva u liječenju dijabetesa. Ovi lijekovi mogu uzrokovati zdravstvene probleme kao što su proljev, grčevi u trbuhu i nadimanje.⁽²⁰⁾ Liječenje životinja oboljelih od dijabetesa s inhibitorima α -glukozidaze poboljšava metaboličko stanje i sprječava pojavu dijabetičkih komplikacija.⁽¹⁸⁾

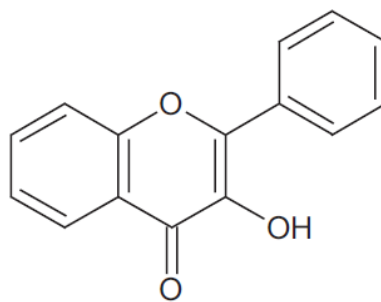
Tablica 1. Inhibitori α -glukozidaze pronađeni u biljkama ^(11,18,19)

Kemijski spoj	Biljka	IC ₅₀
3,5-di-O-kafeoilkvinska kiselina	<i>Ipomoea aquatica</i>	18,7±0,17 μ M
4,5-di-O-kafeoilkvinska kiselina	<i>Ipomoea aquatica</i>	14,5±0,19 μ M
Piperumbelaktam	<i>Piper umbellatum</i>	29,64±0,46 μ M
Anakardinska kiselina	<i>Anacardium occidentale</i>	1,1-6,1 μ M
Hebulininska kiselina	<i>Terminalia chebula</i>	36 μ M
2,4,6-tribromofenol	<i>Grateloupia elliptica</i>	60,3 μ M
Bisdemetoksikurkumin	<i>Curcuma longa</i>	23,0 μ M
Segetalna kiselina	<i>Gypsophila olhamiana</i>	23,1±1,8 μ M

Galna kiselina	<i>Terminalia chebula</i>	5,2±0,2 µM
Mangiferin	<i>Salacia reticulate</i>	87 µg/mL
Epigalokatehin-3-galat	<i>Camellia sinesis</i>	10,2±2,02 µg/mL
Kvercetin	<i>Red pepper</i>	1,59 µg/mL
Kvercetin	<i>Hovenia dulcis</i>	32 µg/mL
Kvercetin-3-O-β-D-glukozid	<i>Ipomoea aquatica</i>	20,5±0,21 µM
Miricetin	<i>Hovenia dulcis</i>	3 µg/mL
Apigenin	<i>Crataegus oxyacantha</i>	21,85 µM
Luteolin	<i>Crataegus oxyacantha</i>	13,07 µM
Viteksin	<i>Crataegus oxyacantha</i>	25,11 µM



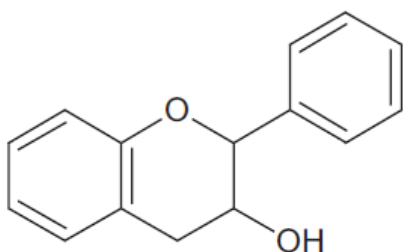
Luteolin: 5,7,3',4'=OH



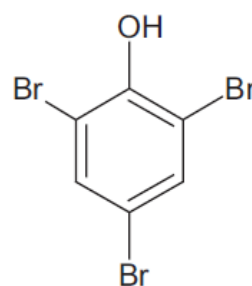
Miricetin: 5,7,3',4',5'

Apigenin: 5,7,4'=OH

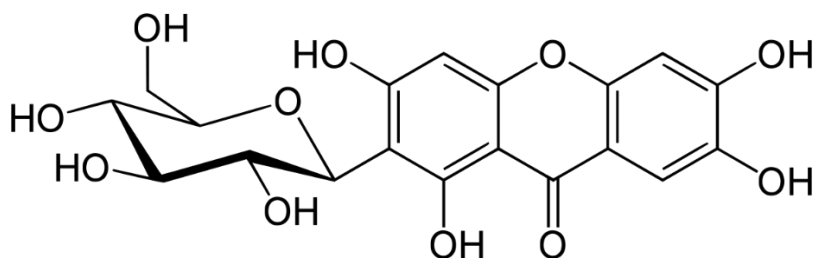
Kvercetin: 5,7,3',4'=OH



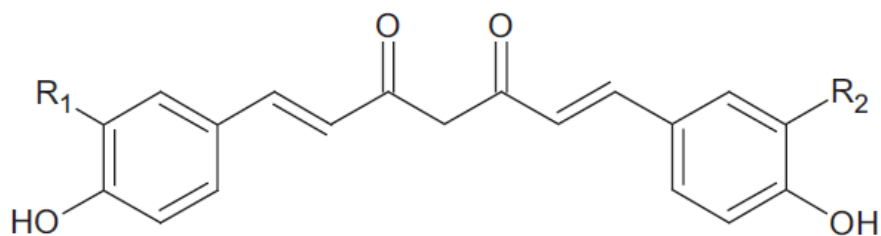
(-)-Epigalokatehin-galat (2R, 3R): 5,7,3',4',5'=OH



2,4,6-tribromofenol



Mangiferin

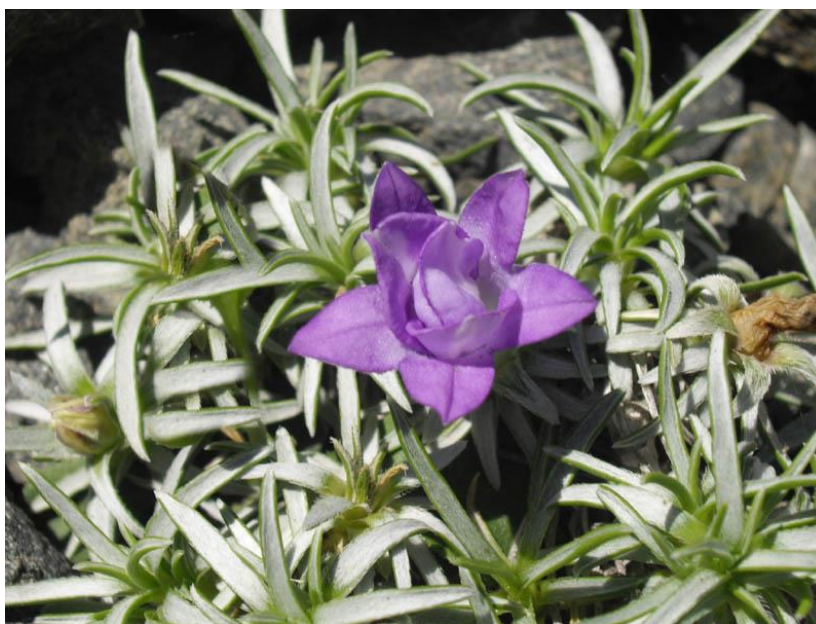


Bisdemetoksikurkumin, R1,R2=H

Slika 3. Kemijske strukture nekih spojeva s inhibitorskim učinkom na α -glukozidazu^(18,19,20)

1.5. Ispitivane biljne vrste

Biokovsko zvonce (lat. *Edraianthus pumilio*) – reliktna i stenoendemična vrsta, prvi put zabilježena na Biokovu pod nazivom *Campanula pumilio* (Slika 4), pripada porodici zvončiča (*Campanulaceae*). Raste u gorskom i pretplaninskom području, a mjestimično i u prigorskom području u pukotinama stijena. Izrazito je heliofilna, termofilna i kserofilna vrsta, a podnosi i velike oscilacije temperature i vlažnosti. Trajnica je s niskim 1-3 cm dugim jednocvjetnim stabljikama koje tvore zbijene i guste uz tlo prilegle polukuglaste jastučice. Listovi su linearni (5-) 8-20 (25) mm dugi i 1-2 mm široki, u čupercima. S gornje strane su presvučeni s dlačicama dok su s donje strane goli. Čaška je oko 6-8 mm duga, s golom cijevi, a zubci čaške su dlakavi i s uvinutim rubom. Vjenčić je plavoljubičast, (11-) 14-18 (-24) mm dug i 10-15 mm širok, zvončast, s vanjske strane uz žile dlakav. Plod je tobolac sa spljoštenim svijetlosmeđim sjemenkama. Cvijeta u lipnju i srpnju i strogo je zaštićen.⁽²²⁾



Slika 4. Biokovsko zvonce (lat. *Edraianthus pumilio*)⁽²³⁾

Modro lasinje (lat. *Moltkia petraea*) – gust poluzimzeleni grm ili polugrm visine 20 do 40 cm, ponekad do 50 cm (Slika 5), pripada porodici oštrolisti (*Boraginaceae*). Stabljike su uspravne sivo dlakave. Listovi su naizmjenični, jednostavni, sjedeći, 1 do 5 cm dugi i 1 do 6 mm široki, podvinuta ruba i s obje strane poleglo dlakavi. Cvijeta u svibnju i lipnju ljubičasto-plavim cvjetovima, u vršnim cvastima imaju dvostruko ocvjeće sastavljeno iz

čašice i krunice. Plod je bjeličasti, glatki i sjajni oraščić, 2,5-3 mm dug. Raste na suncu izloženim pukotinama vapnenačkih stijena. Endemična je, litofilna i kserotermna vrsta, rasprostranjena duž Jadranske obale, u mediteranskom i sub-mediteranskom području do 2000 m visine. Strogo je zaštićena vrsta u Hrvatskoj.^(24, 25)



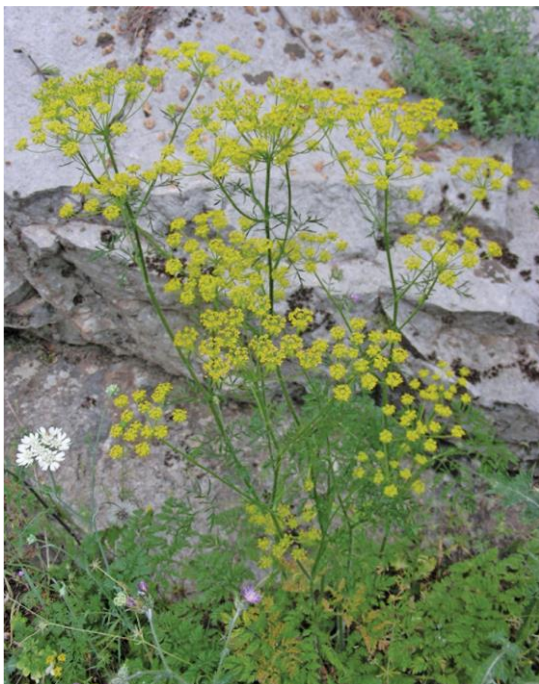
Slika 5. Modro lasinje (lat. *Moltkia petraea*)⁽²⁶⁾

Patuljasta kleka, klečica (lat. *Juniperus communis* L. ssp. *nana* Syme) – varijetet **obične borovice**, spada u porodicu čempresovki (*Cupressaceae*) (Slika 6). Veoma je polegao, 20-50 cm visok grm, grane su gusto smještene, grančice su kratke debele, trobridne, pršljeni su gusto smješteni, iglice prema gore, 4-8 mm duge, 1-2 mm široke. Plod je jajolik do okruglast, 7-10 mm debeo, plavičasto crn s peteljkom. Cvate u travnju i svibnju. Raste u Alpskom i sub-alpskom području, često na tresetištima, u sjevernoj Aziji i sjevernoj Americi, u visokoplaninskim predjelima Alpa, Dinarida i drugdje.⁽²⁷⁾



Slika 6. Patuljsta kleka (lat. *Juniperus communis* L. ssp. *nana* Syme) ⁽²⁸⁾

Obojena krabljica (*Chaerophyllum coloratum* L.) – jednogodišnja ili dvogodišnja biljka s vretenastim korijenom, pripada porodici štitarki (*Umbelliferae*) (Slika 7). Stabljika je 70 - 80 (-100) cm visoka, uspravna, izbrazdana, čekinjasto dlakava, u gornjem dijelu razgranata. Listovi su naizmjenični, trostruko rasperani. Cvjetovi su dvospolni i muški, složeni u široke štitice. Latice su na vrhu uvijene, obrnuto sroljike, žute. Plod je 10-12 cm dug, linearan, bočno spljošten, smeđ. Cvijeta od svibnja do srpnja. Raste na pretežito vrlo kamenitim, skeletnim, ekstremno degradiranim staništima s oskudnim tlom, na kamenjarskim pašnjacima submediteranske i eumediteranske zone. Endemska biljka geografski ograničena na Dinarske Alpe (Hrvatsku, Bosnu i Hercegovinu, Crnu Goru, Kosovo i Albaniju).^(29, 30)



Slika 7. Obojena krabljica

(*Chaerophyllum coloratum* L.)⁽³¹⁾



Slika 8. Zavojita bubreška

(lat. *Hymenocarpus circinnatus*)⁽³²⁾

Zavojita bubreška (lat. *Hymenocarpus circinnatus*) – spada u porodicu mahunarki (*Fabaceae*) (Slika 8). Jednogodišnja biljka, nisko rasprostranjena i vrlo razgranata. Stabljika je visoka do 30 cm, prekrivena s gustim dlačicama. Listovi su različiti, donji je sam, dok su gornji sa 5-7 listića s tim da je krajnji najveći. Cvjetovi su narančasti ili žuti, vijenac je 5-7 mm dug, u čaški na dugoj stabljici nalazi se 2-5 cvjetova. Plod je mahuna, spljoštena, uvijena u bubrežni oblik i nalik na disk (10-15 mm), vanjski je rub membranski i obično sitno nazubljen. Nastanjuje otvorene travnjake, suha grmovita područja i napuštene terase. Cvijeta u travnju i svibnju. Uobičajena je u većem dijelu Grčke, rasprostranjena je na Mediteranskom području i preko Anatolije do Sirije i Irana, te na Kreti.⁽³¹⁾

Zrakasta žutilovka (lat. *Genista radiata*) – listopadni je grm iz porodice mahunarki (*Fabaceae*) (Slika 9). Grane su guste, jako razgranate, uspravne i zrakasto raširene, u početku su zelene i dlakave, a kasnije posmeđe i kora postane naborana, duge su do 100 cm. Pupovi su sitni, zelenkasti, prekriveni s dvije ljuške dlakave na rubovima. Listovi su nasuprotni, trodijelni, sa kratkom peteljkom, čine ih linearne i ušiljene liske duge 1-2,5

cm, široke 2-4 mm, brzo otpadnu, na licu su zelene i gole, dok je naličje svjetlije i dlakavo. Cvjetovi su dvospolni, a nalaze se na dlakavim stapkama, skupljeni su po 2 do 7 u glavičaste cvatove u pazušcima gornjih listova. Cvate u svibnju i lipnju. Plodovi su uspravne, svilenasto dlakave mahune dužine 5 mm, sadrže 1-2 svijetlo smeđe sjemenke. Raste na livadama i travnjacima gorskih i pretplaninskih krajeva, u južnoj i srednjoj Europi.⁽³²⁾



Slika 9. Zrakasta žutovilka (lat. *Genista radiata*)⁽³²⁾

Velika zečina (lat. *Centaurea scabiosa*) – trajna zeljasta biljka iz porodice glavočika (*Asteraceae*) (Slika 10). Stabljika je uspravna, uglasta, izbrazdano hrapava, u gornjem dijelu jako razgranata, visoka 50-130 cm. Podanak je čvrst i skoro odrvenjeo. Listovi su perasto razdijeljeni na lancelaste režnjeve, čekinjasto hrapavi, cjeloviti, donji imaju peteljke a gornji su sjedeći. Cvjetovi su purpurni, skupljeni u glavice promjera 3-5 cm koje su pojedinačno na vrhovima stabljika. Cvate u srpnju i kolovozu. Involukrum je jajast, listići su mu dlakavi, smeđezeleni. Plod je spljoštena roška duga oko 5 mm, papus je ljubičast iste dužine kao roška. Rasprostranjena je u Europi, raste na suhim livadama i pašnjacima, na rahlom tlu do pretplaninskog pojasa.⁽³³⁾



Slika 10. Velika zečina (lat. *Centaurea scabiosa*)⁽³³⁾

Dugopetiljna zečina (lat. *Mantisalca salmantica*) – spada u porodicu glavočika (*Asteraceae*) (Slika 11). Višegodišnja je biljka, stabljike su joj ravne ili strše, zaobljene, rebraste i dlakave, do 150 cm visine. Prizemni listovi su u obliku rozete, dužine do 35 cm i širine 10 cm s 2-10 trokutastih, zubastih režnja. Listovi srednje stabljike su manji, jednostavniji, najviši su linearni. Glavice rastu pojedinačno na stabljici duljine do 15 cm. Involukrum je jajolik (1-) 1.2-2.2 cm dužine i 0.7-1.3 (-1.7) cm širine. Priperci su na vrhu, 5-7 redova, izvana ovalni, sužavaju se prema sredini, zelene su boje s tamnijim obrubom, na vrhu su 3-5 mm duge bodlje. Cvjetovi su ružičasti, purpurni do ljubičasti, rubne latice cvjetova su sterilne, unutarne su bipolarne, svi su dugi, ljevkasti, dužine 1,8-2,8 cm s bjelkastom cijevi. Zaklopci su duguljasti, 3,2-4,7 mm dužine, pahulja je dvoredna, vanjski red je dulji, čekinjast, unutarnji prilično ljuskav. Raste na području Mediterana uz rubove putova i na ruderaliziranim staništima do 2000 m visine.⁽³⁴⁾



Slika 11. Dugopetiljna zečina (lat. *Mantisalca salmantica*)⁽³⁴⁾

Repasti zvončić (lat. *Campanula rapunculus*) – dvogodišnja je biljka koja pripada porodici zvončica (*Campanulaceae*) (Slika11). Stabljika joj je u gornjem dijelu je razgranata, lagano dlakava, visine do 90 cm. Prizemni listovi su lancetasti, pri bazi suženi u peteljku, nazubljenog i valovitog ruba. Gornji listovi su duguljasti i sjedeći. Cvjetovi su blijedoljubičasti, dugi 2 cm, na dugim stapkama u rahlom cvatu. Cvijeta od svibnja do kolovoza. Raste u zapadnoj Aziji, sjevernoj Africi i većini Europe po šumama, uz grmlje, po krčevinama, do preplaninskog područja.^(35, 36)

Biokovska runjika (lat. *Hieracium waldsteinii* spp. *biokovense*) – spada u glavočike ježičnjače (*Cichoriaceae*), podvrsta je Valdštajnovne runjike (Slika 13). Dalmatinski endem najotporniji na sušu i vjetar. Donji listovi su veliki i zbijeni u obliku rozete. Značajni su plavkasto-sivi i na rubu valovito-narovašeni listovi, glavice i gornji dio stabljike su tamniji, crnozeleni od žljezdastih dlaka. Glavice su velike 10-17 mm, njihove ovojne brakteje su žljezdaste i trokutasto šiljate, prekrivene u redovima poput crijepa. Biljka je visine do 30 cm, iznad koje su 1-3 cvjeta žute boje. Cvijeta u svibnju i lipnju. Raste na olujnim burištima po submediteranskim stijenama obalnih dinarida od južnog Velebita do Biokova.^(37, 38)



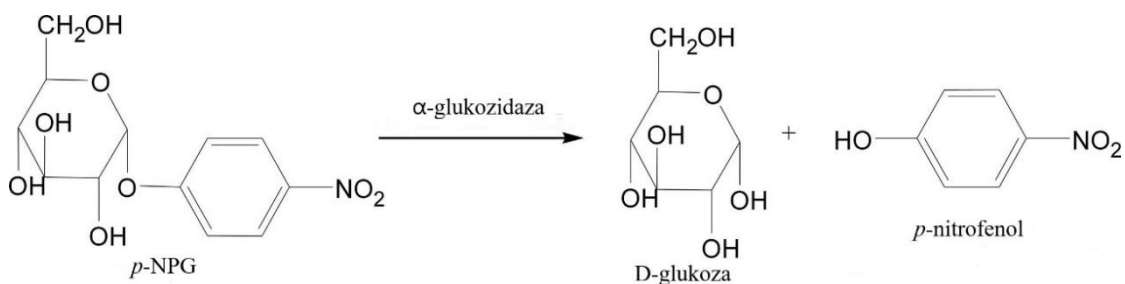
Slika 12. Repasti zvončić (lat. *Campanula rapunculus*)⁽³⁶⁾



Slika 13. Biokovska runjika (lat. *Hieracium waldsteinii* spp. *biokovense*)⁽³⁶⁾

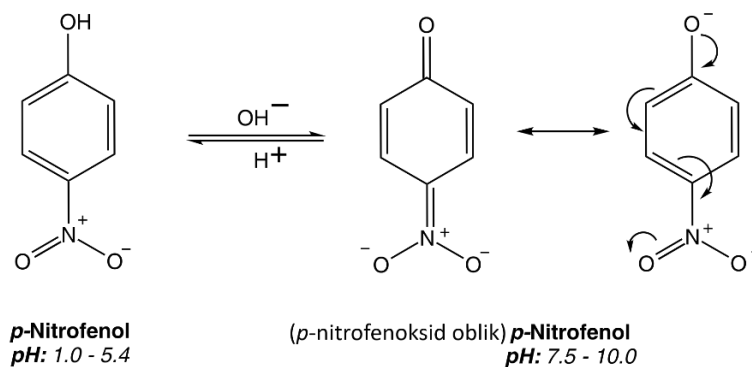
1.6. Određivanje inhibicijskog učinka hidrolata odabranih biljnih vrsta na enzim α -glukozidazu

Određivanje inhibicijskog učinka hidrolata odabranih biljnih vrsta na enzim α -glukozidazu provedeno je metodom po Sigma-Aldrichu ⁽³⁹⁾ uz modifikacije. Metoda se temelji na detekciji *p*-nitrofenoksida dobivenog iz *p*-nitrofenola u bazičnom mediju (otopina postaje žuto obojena), *p*-nitrofenol oslobađa se iz *p*-NGP-a (4-nitrofenil- α -D-glukopiranozid) djelovanjem enzima α -glukozidaze.



Slika 14. Mehanizam hidrolize 4-nitrofenil- α -D-glukopiranozida djelovanjem enzima α -glukozidaze ⁽⁴⁰⁾

Otpuštanje *p*-nitrofenola mjereno je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 405 nm. ⁽⁴¹⁾



Slika 15. *p*-nitrofenol u bazičnom mediju (žuto obojenje) ⁽⁴²⁾

Apsorbancija je mjerena u odsustvu inhibitora (negativna kontrola, 100 % enzimske aktivnosti) i u prisustvu inhibitora.

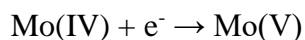
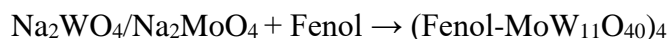
$$\% \text{inhibicije} = 100 \times \left(\frac{A-B}{A} \right)$$

A – apsorbancija negativne kontrole, B – apsorbancija u prisustvu inhibitora

Kao pozitivna kontrola (standard), korišten je 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glukoza.

1.7. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola u biljnim ekstraktima određen je Folin-Ciocalteu metodom opisanom u radu Singleton i Rossi (1965)⁽⁴³⁾ koja se temelji na kemijskoj reakciji oksidacije fenolnih spojeva u lužnatoj sredini smjesom fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline i redukcije istih u smjesu volframovog i molibdenovog oksida.



Uslijed redukcije Folin-Ciocalteu otopine i stvaranja kompleksa s fenolnim spojevima, otopina analita postaje plavo obojena, a njen intenzitet ovisi o koncentraciji fenolnih spojeva u uzorku. Intenzitet boje točnije apsorbancija mjeri se kod valne duljine od 765 nm.⁽⁴²⁾

1.8. Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je tehnika koja mjeri apsorpciju emitiranog elektromagnetskog zračenja do koje dolazi kada se određeni uzorak podvrgne samom zračenju. Osnovni pojmovi u spektroskopiji su transmitancija i apsorbancija.

Transmitancija otopine (**T**) definira se kao udio upadnog zračenja koji je prošao kroz otopinu:

$$T = P/P_0$$

Gdje je **P**₀ ulazna snaga zračenja, a **P** snaga zračenja nakon apsorpcije.

Apsorbancija otopine (**A**) definira se kao logaritamski odnos zračenja koje je prošlo kroz otopinu **P**₀ i upadnog zračenja **P**:

$$A = \log(P_0/P)$$

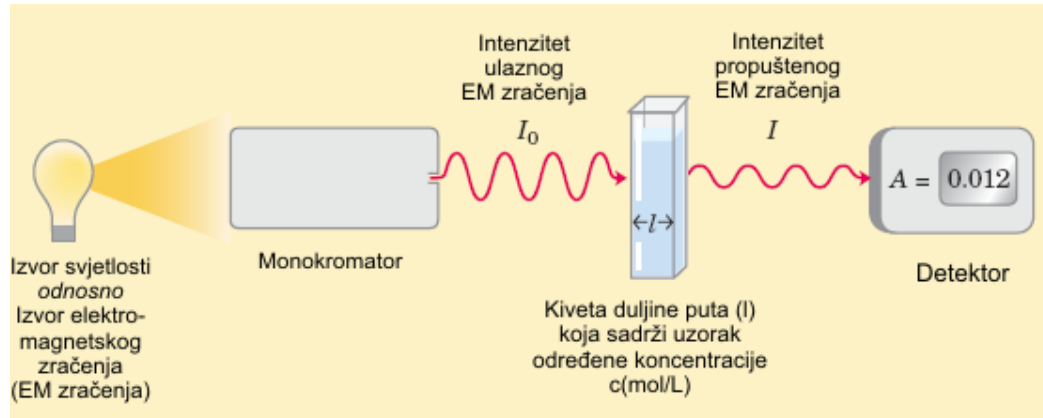
Beerov zakon predstavlja funkcijski odnos između veličine mjerene apsorpcijom metodom (**A**) i one koja se određuje (koncentracija **c**):

$$A = \log(P_0/P) = abc$$

Gdje je **a** konstanta proporcionalnosti, apsorptivnost (apsorpcijski koeficijent), **b** duljina puta zračenja kroz uzorak, a **c** koncentracija apsorbirajuće vrste.

Koncentraciju analita možemo izračunati iz izmjerene apsorbancije ako raspolažemo baždarnim dijagramom ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standarda.

Uređaj za mjerenje apsorbancije naziva se spektrofotometar.



Slika 16. Princip rada spektrofotometra ⁽⁴⁵⁾

Većina spektroskopskih uređaja sastavljena je od 5 osnovnih dijelova:

- stabilnog izvora energije zračenja
- selektora valnih duljina koji omogućuje izdvajanje određenoga valnoga područja
- jednoga ili više spremnika za uzorke
- detektora zračenja ili pretvornika energije zračenja u mjerljiv signal
- procesora signala i uređaja za njegovo očitavanje. ⁽⁴⁴⁾

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal

Biljka ubrana na Marjanu, Split u svibnju 2019:

- *Mantisalca salmantica*

Biljka ubrana na otoku Drvenik Mali u lipnju 2018:

- *Hymenocarpus circinnatus*

Biljke ubrane na planini Biokovo u srpnju 2017:

- *Hieracium waldsteinii subsp. biokovense*
- *Edraianthus pumilio*
- *Moltkia petraea*
- *Genista radiata*
- *Centaurea scabiosa*
- *Juniperus communis spp. nana*
- *Chaerophyllum coloratum*
- *Campanula rapunculus*

2.2. Metoda izolacije hlapljivih spojeva iz biljnog materijala

Izolacija eteričnog ulja iz biljnog materijala provedena je u aparaturi tipa Clevenger (Slika 17). U okruglu tikvicu dodan je svježi, grubo usitnjen biljni materijal i destilirana voda. Tijekom hidrodestilacije koja je trajala 150 min, hlapljive komponente eteričnog ulja i vodena para prolaze kroz cijevi aparature i kondenziraju u hladilo. U cijevi aparature stavlja se 'trap' (smjesa organskih otapala pentana i dietiletera u omjeru 1:1) koji služi za zadržavanje hlapljivih komponenti iznad vode. Nakon završene hidrodestilacije trap sa eteričnim uljem se prebaci iz graduirane cijevi u suhu bočicu. Ostatak vode iz eteričnog ulja uklanja se sušenjem bezvodnim natrijevim-sulfatom. Nakon sušenja eterično ulje se prebaci u suhu, izvaganu bočicu, koja je hermetički zatvorena i čuvana u zamrzivaču na -20°C do daljnje analize.

Za mjerenje inhibicije α -glukozidaze, eterična ulja su otopljena u 85 %-tnom etanolu kako bi se pripremile otopine ulja poznatih koncentracija.

2.3. Priprava hidrodestilata odabranih biljnih vrsta

Nakon završene hidrodestilacije zaostali vodeni dio (hidrolat) je profiltriran, a potom liofiliziran (Slika 18). Liofilizirani uzorci čuvani su na suhom i tamnom mjestu do analiza.



Slika 17. Aparatura po Clevengeru



Slika 18. Liofilizator

2.4. Kemikalije

- α -glukozidaza iz *Saccharomyces cerevisiae*, liofilizirani prah ≥ 10 U/mg, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- 1,2,3,4,6-Penta-O-galoil- β -D-gluokopiranoza, Cayman Chemical Company, SAD
- 4-Nitrofenil- α -D-glukopiranozid 98+%, ThermoFischer, GmbH, Germany
- 3,4,5-Trihidroksi benzojeva kiselina monohidrat, 99%, ThermoFisher, GmbH, Germany
- Natrijev karbonat, bezvodni, kemika, Zagreb
- Natrijev dihidrogenfosfat monohidrat, T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja
- Natrijev hidrogen-fosfat dihidrat, T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja
- Folin-Ciocalteu reagens, kemika, Zagreb
- Etanol 96%, Gram-mol, Zagreb

2.5. Određivanje inhibicijskog učinka hidrolata odabranih biljnih vrsta na enzim α -glukozidazu

Za određivanje inhibicijskog učinka hidrolata odabranih biljnih vrsta na enzim α -glukozidazu korištena je spektrofotometrijska metoda po Sigma-Aldrichu ⁽³⁹⁾ opisana u radu Granados-Guzman i sur. (2018) ⁽⁴¹⁾ uz modifikacije. Kao izvor enzima korištena je α -glukozidaza iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, a kao supstrat 4-nitrofenil- α -D-glukopiranozid. Enzimskom razgradnjom supstrata oslobađa se *p*-nitrofenol koji u bazičnom mediju prelazi u *p*-nitrofenoksid oblik (daje otopini žuto obojenje) što se detektira pri valnoj duljini od 405 nm.

2.5.1. Priprema kemikalija

Za potrebe mjerenja pripremljene su sljedeće otopine:

- Fosfatni pufer; pH=7 (0,1 i 0,01 M)
- Enzim α -glukozidaza; 0,1 U/mL – pripremljena je otopina masene koncentracije 1 mg/mL (10 U/mL) u fosfatnom puferu (0,01 M), te razrijeđena u istom puferu na 0,015 U/mL (uz dodatak BSA masene koncentracije 1 mg/L)

- 4-nitrofenil- α -D-glukopiranozid (p-NGP); 0,5 mM – otopljeno je 0,1506 g u 100 mL 0,1 M fosfatnog pufera
- Natrijev karbonat; 0,2 M – otopljeno je 2,12 g bezvodnog natrijevog karbonata u 100 mL destilirane vode
- 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glukoza; 0,5 mg/mL – otopljeno je 0,5 mg krutine u 1 mL 0,1 M fosfatnog pufera
- Etanol; 85%

Tablica 2. Koncentracije pripremljenih otopina

<i>Kemikalije</i>	<i>Koncentracija</i>
<i>Fosfatni pufer</i>	pH=7 (0,1 i 0,01 M)
<i>Enzim α-glukozidaza</i>	0,015 Unit/mL
<i>4-nitrofenil-α-D-glukopiranozid (p-NGP)</i>	0,5 mM
<i>Natrijev karbonat</i>	0,2 M
<i>1,2,3,4,6-penta-O-galoil-β-D-glukoza</i>	0,5 mg/mL
<i>Etanol</i>	85%

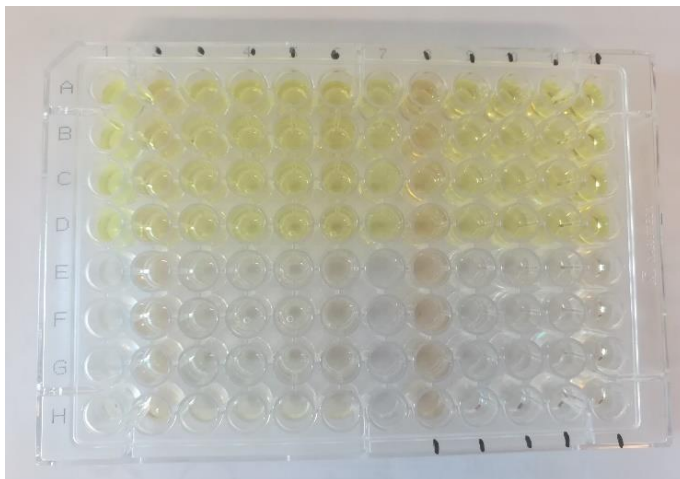
2.5.2. Postupak

Reakcijska smjesa:

- 50 μ L 0,1 M fosfatnog pufera
- 25 μ L 0,5 mM pNGP
- 25 μ L otopine α -glukozidaze (0,015 U/mL)
- 10 μ L uzorka (pufera ili etanola)
- 100 μ L Na₂CO₃ (nakon 30 min na 37°C)

Tablica 3. Shema otopina u eksperimentu

	Slijepa proba (EtOH)	Slijepa proba (H ₂ O)	Uzorak
Pufer	50	60	50
Supstrat	25	25	25
EtOH	10	-	-
Uzorak	-	-	10
Enzim	25	25	25
Pufer	75	85	75
Supstrat	25	25	25
EtOH	10	-	-
Uzorak	-	-	10
Enzim	-	-	-



Slika 19. Mikrotitarska pločica nakon mjerenja

Za mjerenje su korištene mikrotitarske pločice (Slika 19) (svaka ima 96 jažica). Uzorci se otpipetiraju u jažice prema shemi u Tablici 3. Slijepa proba je negativna kontrola (umjesto uzorka otpipetira se pufer, odnosno etanol za uzorke koji su pripremljeni u etanolu). Uzorci se zatim inkubiraju 30 min na 37°C, nakon čega se reakcija prekine sa dodatkom 100 µL 0,2 M otopine natrijeva karbonata.

Za svako mjerenje napravljena je istovremeno i kontrola bez enzima, kako bi se odredila ne-enzimska razgradnja supstrata (umjesto enzima otpipetiran je jednak volumen pufera). Ukupni volumen jažice iznosi 210 µL. Apsorbancija je izmjerena na višekanalnom čitaču mikrotitarskih pločica 'Sunrise' (Tecan, GmbH, Austrija) pri valnoj duljini od 405 nm uz automatsko miješanje i pohranjivanje podataka na računalo (Slika 20).



Slika 20. Višekanalni spektrofotometrijski čitač mikrotitarskih pločica 'Sunrise'

Inhibitorski učinak enzima (postotak inhibicije) izračunat je prema sljedećoj formuli:

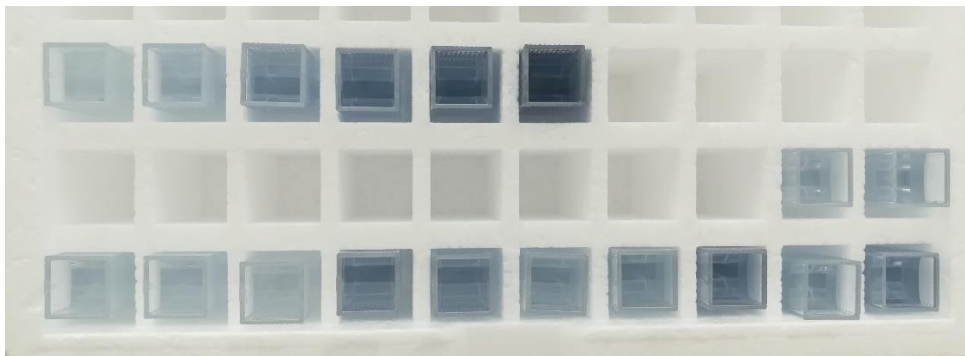
$$\% \text{inhibicije} = 100 \times \left(\frac{A-B}{A} \right)$$

A – apsorbancija negativne kontrole

B – apsorbancija u prisustvu inhibitora

2.6. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola određen je metodom po Folin-Ciocalteu.⁽⁴³⁾ U svaku odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetirano je 0,25 mL uzorka, zatim 15 mL destilirane vode i 1,25 mL Folin-Ciocalteu reagensa prethodno razrijeđenog s destiliranom vodom u omjeru 1:2. Nakon što su pripravljene otopine dobro promiješane, u vremenskom intervalu od 3-8 min dodano je 3,75 mL 20% otopine Na₂CO₃. Odmjerne tikvice su nadopunjene destiliranom vodom do oznake i inkubirane na sobnoj temperaturi 2 sata. Istovremeno su pripravljene otopine galne kiseline, kao standarda za izradu baždarnog pravca, u slijedećim koncentracijama: 25, 50, 100, 175, 250 i 500 mg/L.



Slika 21. Uzorci i standardne otopine galne kiseline pripremljeni za mjerenje apsorbancije. Apsorbancija je izmjerena na UV-VIS spektrofotometru Perkin-Elmer, Lambda, EZ 201 (Slika 22). Na temelju baždarnog pravca očitane su vrijednosti ukupnih fenola u uzorcima, izražene kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po 1 g hidrolata.



Slika 22. UV-VIS spektrofotometar Lambda

3. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitana je sposobnost inhibicije eteričnih ulja i hidrolata odabranih biljnih vrsta na enzim α -glukozidazu. Za testiranje je načinjen uzorak eteričnog ulja u 85 %-tnom etanolu koncentracije 1 mg/mL, dok je za testiranje hidrolata liofilizirani uzorak otopljen u vodi te su načinjene koncentracije 1, 5 i 10 mg/mL. Za određivanje sadržaja ukupnih fenolnih komponenti u uzorku korišten je uzorak otopine hidrolata koncentracije 1 mg/mL.

3.1. Određivanje inhibicijskog učinka eteričnih ulja i hidrolata odabranih biljnih vrsta na enzim α -glukozidazu

Rezultati inhibicijskog djelovanja različitih koncentracija biljnih hidrolata na enzim α -glukozidazu prikazani su u Tablici 4. Testiranja su provedena u tri ili više ponavljanja i predstavljeni kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD).

Tablica 4. Postotci inhibicije za različite koncentracije vodenih ekstrakata

Hidrolati / koncentracija (mg/mL)	% inhibicije		
	1	5	10
<i>Moltkia petraea</i>	2,50 \pm 0,00	8,5 \pm 0,00	13 \pm 0,00
<i>Genista radiata</i>	7,50 \pm 0,57	26,6 \pm 0,00	41 \pm 0,00
<i>Edraianthus pumillio</i>	3 \pm 3,25	0,9 \pm 0,00	5,2 \pm 0,00
<i>Campanula rapunculus</i>	4,5 \pm 0,00	np	4,3 \pm 0,00
<i>Juniperus communis spp. nana</i>	92,99 \pm 1,75	95,30 \pm 1,27	91,31 \pm 6,10
<i>Chaerophyllum coloratum</i>	0,4 \pm 0,00	np	np
<i>Hieracium waldsteinii spp. Biokovense</i>	2,7 \pm 0,00	np	11,8 \pm 0,00
<i>Centaurea scabiosa</i>	np	5,3 \pm 0,00	18 \pm 0,00

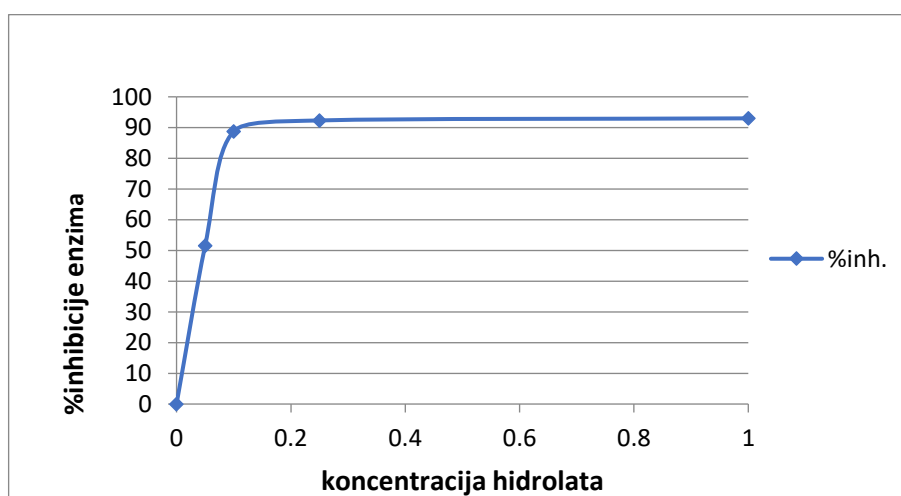
<i>Hymenocarpos circinnatus</i>	np	0,47±0,00	9,3±0,00
<i>Mantisalca salmantica</i>	np	np	np
1,2,3,4,6-penta-O-galoil-β-D-glukoza	98,15±0,15	-	-

np = nije pokazalo inhibiciju, - = nije testirano

Dobiveni rezultati pokazuju da je najučinkovitiji inhibitor enzima α-glukozidaze među testiranim hidrolatima onaj biljke *Juniperus communis spp. nana* koji u koncentraciji 1 mg/mL inhibira enzim s 92,99±1,75 %, u koncentraciji 5 mg/mL inhibira enzim s 95,30±1,27 %, dok u koncentraciji od 10 mg/mL inhibira enzim s 91,31±6,10 %. Za hidrolat ove biljke testirane su i niže koncentracije hidrolata te je izračunata i koncentracija hidrolata koja s 50 %-tnim učinkom inhibira enzim (IC₅₀). IC₅₀ za hidrolat biljke *Juniperus communis spp. nana* iznosi 47,89 mg/L (Tablica 5, slika 22).

Tablica 5. Postotci inhibicije za niže koncentracije hidrolata biljke *Juniperus communis spp. nana*

Koncentracija (g/L)	% inhibicije
0,25	92,31±0,00
0,10	88,77±0,00
0,05	51,57±0,00



Slika 23. Graf ovisnosti % inhibicije enzima o koncentraciji hidrolata

Ostali hidrolati u svim testiranim koncentracijama slabo inhibiraju enzim α -glukozidazu. Među njima, hidrolat biljke *Genista radiata* nešto bolje inhibira ovaj enzima (u koncentraciji 10 mg/mL s 41%-tnim učinkom), dok biljka *Mantisalca salmantica* nije pokazala inhibicijski učinak na testirani enzim.

Rezultati su uspoređeni s onim za poznato dobar inhibitor ovog enzima 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glukoza koji u koncentraciji 1 mg/mL s 98,15 \pm 0,15 %-tnim učinkom inhibiraju enzim α -glukozidazu.

Rezultati inhibicijskog djelovanja eteričnih ulja odabranih biljnih vrsta na enzim α -glukozidazu prikazani su u Tablici 5. Testirana koncentracija ulja u 85 %-tnom etanolu je bila 1 mg/mL. Mjerenja su provedena u tri ili više ponavljanja i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD).

Tablica 5. Postotci inhibicije za eterična ulja koncentracije 1mg/mL

Eterična ulja	% inhibicije
<i>Moltkia petraea</i>	16,8 \pm 0,00
<i>Genista radiata</i>	18,7 \pm 0,00
<i>Edraianthus pumillio</i>	30,1 \pm 0,00
<i>Campanula rapunculus</i>	np
<i>Juniperus communis spp. nana</i>	20,82 \pm 3,55
<i>Chaerophyllum coloratum</i>	21,3 \pm 0,00
<i>Hieracium waldsteinii spp. Biokovense</i>	37,63 \pm 7,00
<i>Centaurea scabiosa</i>	38,72 \pm 11,05
<i>Hymenocarpos circinnatus</i>	52,16 \pm 3,82
<i>Mantisalca salmantica</i>	32,2 \pm 12,72
<i>1,2,3,4,6-penta-O-galoil-β-D-glukoza</i>	98,15 \pm 0,15

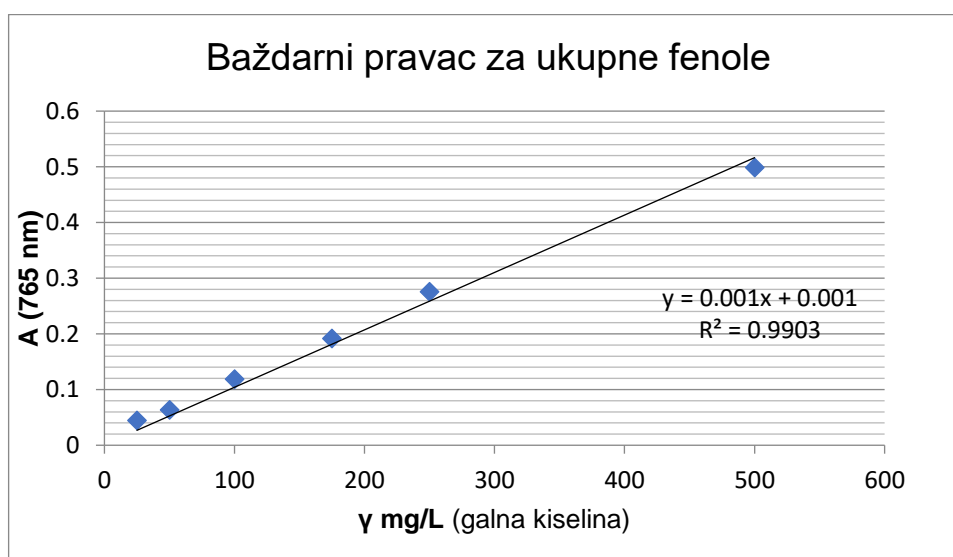
np = nije pokazalo inhibiciju

Iz dobivenih rezultata je vidljivo da među testiranim eteričnim uljima najbolji inhibicijski učinak na enzim α -glukozidazu ima eterično ulje biljke *Hymenocarpos circinnatus* ($52,16 \pm 3,82$ %); nešto lošiji učinak imaju *Centaurea scabiosa* sa $38,72 \pm 11,05$ % i *Mantisalca salmantica* sa $32,2 \pm 12,72$ % dok eterično ulje biljke *Campanula rapunculus* nije pokazalo inhibicijski učinak na ispitivani enzim.

Rezultati su uspoređeni s onim za poznato dobar inhibitor ovog enzima 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glukoza koji u koncentraciji 1 mg/mL s $98,15 \pm 0,15$ %-tnim učinkom inhibira enzim α -glukozidazu.

3.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih spojeva u hidrolatima odabranih biljnih vrsta

Kako bi odredili sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u hidrolatima odabranih biljnih vrsta prethodno je potrebno načiniti kalibracijski pravac ovisnosti koncentracije fenolnih spojeva o apsorbanciji. Iz dobivenog pravca, odnosno jednačbe pravca izračunat je sadržaj ukupnih fenolnih spojeva za nepoznate uzorke, uzorke hidrolata. Na Slici 23. prikazan je dobiveni baždarni pravac galne kiseline.



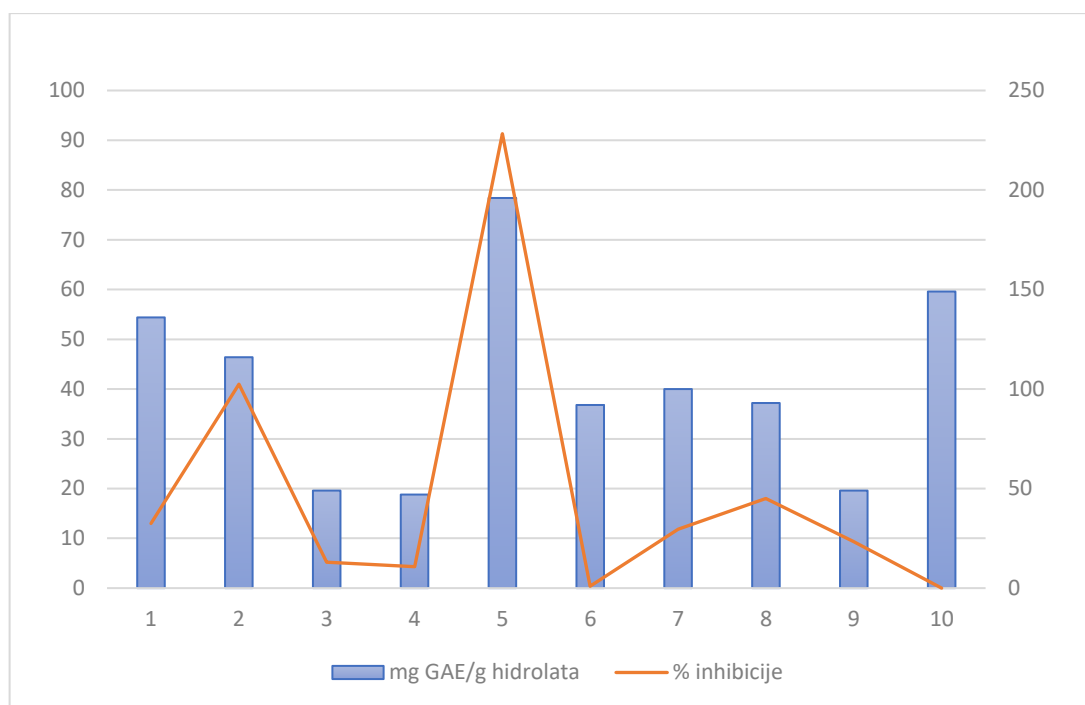
Slika 24. Baždarni pravac galne kiseline kao standardnog fenolnog spoja

Rezultati određivanja sadržaja ukupnih fenola u biljnim hidrolatima prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Sadržaj ukupnih fenola u biljnim ekstraktima

<i>Biljni ekstrakti</i>	<i>Ukupni fenoli (mg GAE/g hidrolata)</i>
<i>Moltkia petraea</i>	136
<i>Genista radiata</i>	116
<i>Edraianthus pumillio</i>	49
<i>Campanula rapunculus</i>	47
<i>Juniperus communis spp. nana</i>	196
<i>Chaerophyllum coloratum</i>	92
<i>Hieracium waldsteinii spp. biokovense</i>	100
<i>Centaurea scabiosa</i>	93
<i>Hymenocarpos circinnatus</i>	49
<i>Mantisalca salmantica</i>	149

Iz rezultata je vidljivo da najveći udio ukupnih fenola sadrži hidrolat biljke *Juniperus communis spp. nana* (196 mg GAE/g hidrolata). Nešto niži sadržaj ukupnih fenola imaju hidrolati biljaka *Mantisalca salmantica* 149 mg GAE/g hidrolata), *Moltkia petraea* (136 mg GAE/g hidrolata), *Genista radiata* (116 mg GAE/g hidrolata) i *Hieracium waldsteinii spp. biokovense* (100 mg GAE/g hidrolata). Ostali hidrolati imaju sadržaj ukupnih fenola niži od 100 mg GAE/g hidrolata.



Slika 25. Usporedba sadržaja ukupnih fenola i % inhibicije hidrolata: 1-*Moltkia petraea*, 2-*Genista radiata*, 3-*Edraianthus pumillio*, 4-*Campanula rapunculus*, 5-*Juniperus communis spp. nana*, 6-*Chaerophyllum coloratum*, 7-*Hieracium waldsteinii spp. biokovense*, 8-*Centaurea scabiosa*, 9-*Hymenocarpos circinnatus*, 10-*Mantisalca salmantica*

Uspoređujući postotak inhibicije za pojedini hidrolat i sadržaj ukupnih fenola (Slika 25) vidljivo je da najučinkovitiji inhibitor, hidrolat biljke *Juniperus communis spp. nana* ($IC_{50}=47,89$ mg/L) sadrži najveći udio fenola (196 mg GAE/g hidrolata), zatim hidrolat biljke *Genista radiata* s 41%-tnim učinkom (u koncentraciji 10 mg/mL) sadrži 116 mg GAE/g hidrolata. Kod drugih hidrolata nema povezanosti sadržaja fenola s inhibicijskim učinkom, čak je vidljivo da hidrolat biljke *Mantisalca salmantica* koji nije pokazao inhibicijski učinak, sadrži vrlo visok udio fenola u usporedbi s ostalim ispitivanim hidrolatima.

4. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je testirati sposobnost eteričnih ulja i hidrolata odabranih biljnih vrsta da inhibiraju enzim α -glukozidazu, metodom po Sigma-Aldrichu. Za uzorke hidrolata je određen i sadržaj ukupnih fenola metodom po Folin-Ciocalteu.

Rezultati mjerenja sposobnosti hidrolata različitih biljaka na inhibiciju enzima α -glukozidaze općenito su pokazali slabi inhibicijski učinak. Najučinkovitiji inhibitor među testiranim hidrolatima je hidrolat biljke *Juniperus communis spp. nana* s $IC_{50}=47,89$ mg/L. Pored biljke *Juniperus communis spp. nana* jedino hidrolat biljke *Genista radiata* pokazuje nešto značajniji inhibicijski učinak na enzim (u koncentraciji 10 mg/mL s 41%-tnim učinkom). Ostali hidrolati za sve testirane koncentracije pokazuju slabu inhibiciju enzima. Hidrolat biljke *Mantisalca salmantica* nije pokazao inhibicijski učinak na testirani enzim.

Rezultati testiranja sposobnosti eteričnih ulja odabranih biljaka da inhibiraju enzim α -glukozidazu pokazali su da najbolji inhibicijski učinak na enzim α -glukozidazu ima eterično ulje biljke *Hymenocarpos circinnatus* ($52,16\pm 3,82$ %); nešto lošiji učinak imaju *Centaurea scabiosa* sa $38,72\pm 11,05$ % i *Mantisalca salmantica* sa $32,2\pm 12,72$ % dok eterično ulje biljke *Campanula rapunculus* nije pokazalo inhibicijski učinak na ovaj enzim.

Najveći sadržaj ukupnih fenolnih spojeva ima hidrolat biljke *Juniperus communis spp. nana* (196 mg GAE/g hidrolata), slijede hidrolati *Mantisalca salmantica*, *Moltkia petraea*, *Genista radiata* i *Hieracium waldsteinii spp. biokovense*. Ostali hidrolati imaju sadržaj ukupnih fenola niži od 100 mg GAE/g hidrolata.

Iz odnosa ukupnih fenola i postotka inhibicije enzima možemo zaključiti da sadržaj ukupnih fenola hidrolata pojedinih biljnih vrsta utječe na inhibiciju enzima α -glukozidaze, te je potrebno napraviti HPLC analizu hidrolata da bi se odredilo koje fenolne spojeve sadrži, posebno za hidrolat biljke *Juniperus communis spp. nana* koji je pokazao najbolji inhibicijski učinak.

Visoki udio fenolnih spojeva te izvrstan inhibicijski učinak na enzim α -glukozidazu čine hidrolat biljne vrste *Juniperus communis spp. nana* potencijalno korisnim u komplementarnoj terapiji dijabetesa.

5. LITERATURA

1. WHO Global report on diabetes, (2016), <https://www.who.int/diabetes/global-report/en/>, pristupljeno 16.08.2019.
2. Hosseinzadeh S, Jafarikukhdan A, Hosseini A, Armand R. The Application of Medicinal Plants in Traditional and Modern Medicine: A Review of *Thymus vulgaris*. *Int. J. Clin. Med.* 2015;6:635-642.
3. Malviya N, Jain S, Malviya S. Antidiabetic potential of medicinal plants. *Acta Pol. Pharm.* 2010;67:113-118.
4. What is diabetes, (2019), <https://www.idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes.html>, pristupljeno 07.08.2019.
5. Seetaloo AD, Aumeeruddy MZ, R Kannan RR, Mahomoodally MF. Potential of traditionally consumed medicinal herbs, spices, and food plants to inhibit key digestive enzymes geared towards diabetes mellitus management. *South African Journal of Botany.* 2019;120:3-24.
6. Shori AB. Screening of antidiabetic and antioxidant activities of medicinal plants. *J Integr Med.* 2015;13(5):297-305.
7. WHO Classification of diabetes mellitus, (2019), <https://www.who.int/health-topics/diabetes>, pristupljeno 07.08.2019.
8. Diabetes complications, (2019), <https://www.idf.org/aboutdiabetes/complications.html>, pristupljeno 21.08.2019.
9. Pavlić Renar I. Dijagnostika i liječenje šećerne bolesti tipa 1. *Medix.* 2009;80/81:100-106.
10. Kokić S. Dijagnostika i liječenje šećerne bolesti tipa 2. *Medix.* 2009;80/81:90-98.
11. Bharti SK, Krishnan S, Kumar A, Kumar A. Antidiabetic phytoconstituents and their mode of action on metabolic pathways. *Ther Adv Endocrinol Metab.* 2018;9(3):81-100.
12. Hamza AA, Ksiksi TS, Shamsi OAAI, Balfaqh SA. α -Glucosidase Inhibitory Activity of Common Traditional Medicinal Plants Used for Diabetes Mellitus. *J. Develop Drugs.* 2015;4(5):144
13. Ya'ni AA, Eldahshan OA, Hassan SA, Elwan ZA, Ibrahim HM. Antidiabetic Effects of Essential Oils of some Selected Medicinal Lamiaceae Plants from Yemen against α -Glucosidase Enzyme. *J Phytochemistry Biochem.* 2018;2:106.

14. Lin M, Qirong L, Dandan L, Shan L, Xiaomei W, Yuanyuan Z. Alpha-glucosidase inhibitory activities of essential oils extracted from three chinese herbal medicines. *Chemical Engineering Transactions*. 2018;64,61-66
15. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Polyphenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 2006;99:191-203.
16. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46:446-475.
17. Hydrolats: Demystifying the mystical waters, <https://phytovolatilome.com/hydrolats-demystifying-mystical-waters/>, pristupljeno 03.10.2019.
18. Alam F, Shafiqe Z, Ajmad ST, Bin Asad MHH. Enzymes inhibitors from natural sources with antidiabetic activity: A review. *Phytotherapy Research*. 2019;33:41-54.
19. Kumar S, Narwal S, Kumar V, Prakash O. α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy reviews*. 2011;5(9):19-29.
20. Mangiferin, <https://en.wikipedia.org/wiki/Mangiferin>, pristupljeno 10.10.2019.
21. Akyurt B, Basyigit B, Cam M. Phenolic compounds content, antioxidant and antidiabetic potentials of seven edible leaves. *GIDA*. 2018;43(5):876-885.
22. Franjić J. Popularizacija hrvatske flore. *Endemi Biokova – Biokovsko zvonce i Puzavo zvonce. Šumarski list*. 2015;9-10:474-475.
23. Biokovsko zvonce, https://hr.wikipedia.org/wiki/Biokovsko_zvonce, pristupljeno 28.08.2019.
24. Zrnčić H, Zrnčić V. *Bilje Hrvatskih gora i planina*, Hinus, Zagreb, 2017.
25. Šilić Č. *Endemične biljke*, Svjetlost, Beograd, 1984.
26. Modro lasinje, <https://www.plantea.com.hr/modro-lasinje/>, pristupljeno 29.08.2019.
27. Vidaković M. *Četinjače: morfologija i varijabilnost*, SNL, Zagreb, 1982.
28. *Juniperus communis* L. ssp. *nana* Syme, <https://images.app.goo.gl/NbyZkVkjh14oxWTZ7>, pristupljeno 29.08.2019.
29. Nikolić T, Milović M, Bogdanović S, Jasprica N. *Endemi u Hrvatskoj flori*, ALFA, Zagreb, 2014.

30. Mačukanović-Jocić M, Stešević D, Rančić D, Dajić Stevanović Z. Pollen morphology and the flower visitors of *Chaerophyllum coloratum* L. (Apiaceae), *Acta Bot. Croat.* 2017;76(1):1-8.
31. *Hymenocarpos circinnatus*,
http://www.cretanflora.com/hymenocarpos_circinnatus.html, pristupljeno 29.08.2019.
32. Zrakasta žutovilka, <https://www.plantea.com.hr/zrakasta-zutilovka/>, pristupljeno 29.08.2019.
33. Velika zečina, <https://www.plantea.com.hr/velika-zecina/>, pristupljeno 29.08.2019.
34. *Mantisalca salmantica*, <https://botany.cz/cs/mantisalca-salmantica/>, pristupljeno 30.08.2019.
35. Savković D. Enciklopedija ljekovitog, korisnog i medonosnog bilja: više od 1100 domaćih i egzotičnih biljnih vrsta, voća i povrća i šumskih plodina, Begon, Zagreb, 2017.
36. Flora Croatica Database, <https://hirc.botanic.hr/fcd/>, pristupljeno 2.09.2019.
37. Hrvatsko-dinarski *Hieracium*, https://hr.metapedia.org/wiki/Hrvatsko-dinarski_Hieracium#H._waldsteinii_.28H._lanifolium.29, pristupljeno 2.09.2019.
38. *Hieracium walsteini* spp. *biokovense*, <https://www.nahuby.sk/atlas-rastlin/Hieracium-waldsteinii-subsp--biokovense/jastrabnik/jestrabnik-Waldsteinuv-biokovsky/ID15680>, pristupljeno 2.09.2019.
39. Kapustka LA, Annala AE, Swanson WC. The peroxidase-glucose oxidase system: A new method of determine glucose liberrated by carbohydrate degrading soil enzymes. *Plant Soil.* 1981;63(3):487-490.
40. Qurrat-ul-Ain, Ashiq U, Jamal RA, Saleem M, Mahroof-Tahir M. Alpha-glucosidase and carbonic anhydrase inhibition studies of Pd(II)-hydrazide complexes. *Arabian Journal of Chemistry* 2017;10:488-499.
41. Granados-Guzman G, Castro-Rios R, Waksman de Torres N, Salazar-Aranda R. Optimization and Validation of a Microscale In vitro Method to Assess α -glucosidase Inhibition Activity. *Current Analytical Chemistry* 2018;14:458-464.
42. 4-nitrofenol, <https://es.wikipedia.org/wiki/4-nitrofenol>, pristupljeno 7.09.2019.
43. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 1965;16:144-158.

44. Skoog DA, West DM, James Holler F. Osnove analitičke kemije, Školska Knjiga, Zagreb, 1999.

45. Praktikum iz biokemije,

https://bib.irb.hr/datoteka/432061.PRAKTIKUM_2009.pdf, pristupljeno

14.09.2019.