

# Optimizacija ekstrakcije i biološka aktivnost ekstrakata zeleni hmeljaste vije (*Medicago lupulina* L.) u polipropilenglikolu

---

Kalvarešin, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:241483>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



**Marko Kalvarešin**

**Optimizacija ekstrakcije i biološka aktivnost  
ekstrakata zeleni hmeljaste vije (*Medicago  
lupulina* L.) u polipropilenglikolu**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmakognozija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Marijane Zovko Končić. Istraživanja provedena u ovom radu sufinancirala je Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2018-01-6504.

*Srdačno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Marijani Zovko Končić na stručnom vodstvu, Luciji Halusek na tehničkoj podršci te svojoj obitelji što su bili uz mene ovih godina.*

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. <i>Medicago lupulina</i> L.....	1
1.1.1. Polifenoli .....	2
1.1.2. Kumestrol .....	3
1.2. Starenje kože .....	4
1.2.1. Oksidacijski stres .....	4
1.2.2. Elastaza.....	5
1.3. Lipoksigenaza.....	5
1.4. Tirozinaza.....	5
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	7
3. MATERIJALI I METODE.....	8
3.1. MATERIJAL ZA ISPITIVANJE.....	8
3.1.1. Biljni materijal.....	8
3.1.2. Kemikalije .....	8
3.1.3. Uređaji.....	8
3.2. PRIPREMA EKSTRAKATA .....	9
3.3. METODE ISPITIVANJA .....	9
3.3.1. Određivanje ukupnih polifenola .....	9
3.3.2. Određivanje kumestrola .....	9
3.3.3. Eksperimentalni dizajn.....	10
3.3.4. $\beta$ -karoten linoleatna analiza.....	12
3.3.5. Ispitivanje inhibicijskog djelovanja na lipoksigenazu .....	12
3.3.6. Ispitivanje inhibicijskog djelovanja na elastazu .....	13
3.3.7. Ispitivanje inhibicijskog djelovanja na tirozinazu .....	13
3.3.8. Statistička analiza.....	14
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	15
4.1. OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE .....	15

4.1.1. Eksperimentalni dizajn.....	15
4.1.2. Analiza modela.....	17
4.1.3. Optimizacija ekstrakcijskih parametara i validacija modela.....	21
4.2. BIOLOŠKI TESTOVI.....	22
4.2.1. $\beta$ -karoten linoleatna analiza.....	22
4.2.2. Ispitivanje inhibicijskog djelovanja na lipoksigenazu.....	23
4.2.3. Ispitivanje inhibicijskog djelovanja na elastazu.....	25
4.2.4. Ispitivanje inhibicijskog djelovanja na tirozinazu.....	26
5. ZAKLJUČAK.....	28
6. LITERATURA.....	29
7. SAŽETAK / SUMMARY.....	34
7.1. SAŽETAK.....	34
7.2. SUMMARY.....	35
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD ..	36

# 1. UVOD

## 1.1. *Medicago lupulina* L.

Hmeljasta vija (*Medicago lupulina* L.) (Slika 1) je jednogodišnja, dvogodišnja ili trajna biljka iz porodice mahunarki (*Fabaceae*). Široko je rasprostanjena u područjima s umjerenom i subtropskom klimom, gdje raste samoniklo po livadnim područjima, pretežito na tlu bogatom dušikom (Grlić, 1990)

Stabljika biljke je razgranata, prilegnuta ili uzdignuta te naraste do 60 cm duljine. List izgrađuju tri liske obrnuto jajastog oblika, od kojih je srednja obično duža. Naličja liski su prekrivena dlakama, a rubovi cjeloviti ili blago nazubljeni (Turkington i Cavers, 1979). Naziv biljne vrste potječe od sličnosti njezinih cvatova s cvatovima hmelja (*Humulus lupulus*, *Cannabaceae*) (Grlić, 1990). Cvatovi su sastavljeni od 10-50 sitnih žutih cvjetića koji se s vremenom izdulje. Plodovi biljke su sitne bubrežaste mahune s uvijenim vrhom. Plod je duljne 2-3 mm te sazrijevanjem poprima crnu boju. U plodovima se nalazi po jedna izduženo jajasta do 2 mm duga jestiva sjemenka (Turkington i Cavers, 1979).



Slika 1. Hmeljasta vija (*Medicago lupulina* L., *Fabaceae*) (<https://en.wikipedia.com>)

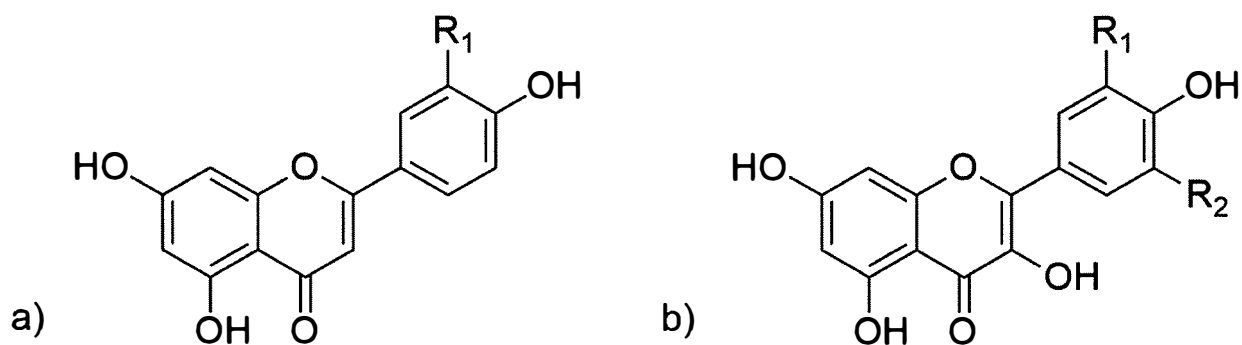
Hmeljasta vija je medonosna biljka (Bučar, 2008). Također se smatra dobrom krmnom biljkom. Zbog sposobnosti fiksacije dušika, koristi se u svrhu prirodnog obogaćivanja tla dušikom (<https://www.ars-grin.gov/>).

Iako biljka nije prepoznata kao ljekovita, *in vitro* ispitivanja pokazala su kako ekstrakt listova hmeljaste vije ima izraženo antibakterijsko, antifungalno i antitumorsko djelovanje. (Baloch i sur., 2013). Nadzemni dijelovi biljke sadrže široki spektar različitih bioaktivnih sastavnica, od kojih se ističu fenolne kiseline, flavonoli (kemferol, miricetin i kvercetin), flavoni (luteolin, apigenin), izoflavoni (biokanin A i formononetin), kumestrol, triterpenski saponini (glikozidi medikagenske kiseline i sojasapogenola B, C, D, E i F) te proantocijanidini (Kicel i Olszewska, 2015; Butkutė i sur., 2018).

### 1.1.1. Polifenoli

Polifenolni spojevi čine jednu od najvećih i najispitivanijih skupina sekundarnih metabolita biljaka. Široko su rasprostranjeni u biljnom svijetu te imaju važnu ulogu u obrani biljke od ultraljubičastog zračenja, patogena i biljojeda (Lattanzio i sur., 2006). U polifenole ubrajamo više od 8000 različitih spojeva koji se prema svojim strukturnim karakteristikama mogu klasificirati u najmanje 10 podskupina, uključujući fenolne kiseline, flavonoide i trjeslovine (Pietta i sur., 2003).

Najveći medicinski interes pobudili su flavonoidi. Flavonoide izgrađuju dva benzenska prstena povezana preko tri ugljikova atoma koja tvoje oksigenirani heterociklički prsten (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>). S obzirom na stupanj oksidacije skeleta te položaj benzenskog prstena dijele se na flavone, flavonole, flavanone, flavanole, antocijanine te izoflavone (Slika 2.) (Pandey i Rizvi, 2009).



**Slika 2.** Opće strukturne formule flavona (a) i flavonola (b) prisutnih u zeleni hmeljaste vije.

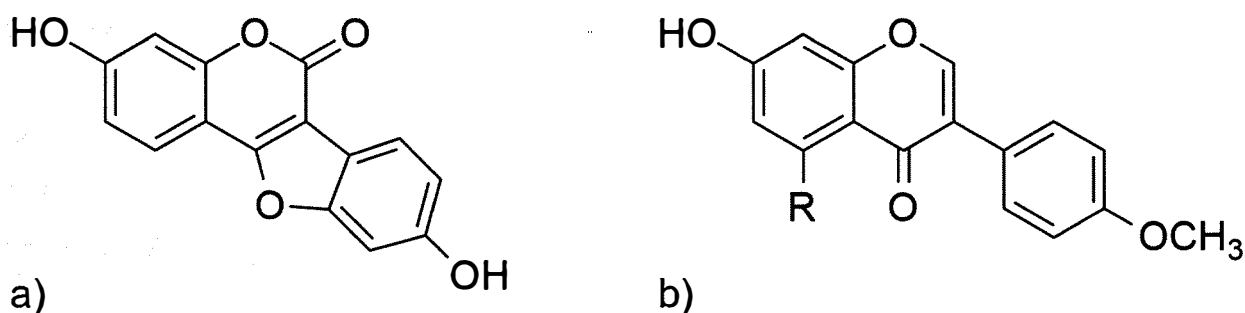
a) Apigenin: R<sub>1</sub> = H; Luteolin: R<sub>1</sub> = OH

b) Kemferol: R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H; Kvercetin: R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = H; Miricetin: R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OH

Pozitivno djelovanje polifenolnih spojeva na ljudsko zdravlje višestruko je potvrđeno brojnim epidemiološkim studijama. Pripisuje im se protuupalno, antidijabetičko, antitumorsko, neuroprotektivno te kardioprotektivno djelovanje. Pleiotropni učinci biljnih polifenola na ljudsko zdravlje nastoje se objasniti njihovim antioksidacijskim svojstvima, ali i sposobnosti moduliranja aktivnosti enzima poput ciklooksigenaze, lipoksigenaze, metaloproteinaza i dr. (Pandey i Rizvi, 2009). U slučaju topikalne primjene, polifenoli mogu povećati antioksidacijski kapacitet kože te tako djelovati preventivno na fotostarenje. Osim toga, polifenolni ekstrakti različitih biljnih vrsta pokazuju i inhibicijsko djelovanje na enzime koji mogu negativno utjecati na čvrstoću i elastičnost kože, poput kolagenaze i elastaze (Zillich i sur., 2015).

### 1.1.2. Kumestrol

Kumestrol je polifenolni spoj iz skupine kumestana. Prvobitno izoliran iz lucerne (*Medicago sativa*) i djeteline (*Trifolium sp.*) (Bickoff i sur., 1957), stekao je medicinsku pozornost zbog svojeg estrogenog djelovanja. Karakterističan je za biljne vrste iz porodice mahunarki (*Fabaceae*) te je strukturno i farmakološki sličan izoflavonima (Slika 3.).



**Slika 3.** Strukturne formule fitoestrogena prisutnih u zeleni hmeljaste vije.  
a) Kumestrol; b) Izoflavoni - Formononetin: R = H; Biokanin A: R = OH

Analogno endogenim estrogenima, kumestrol djeluje kao agonist estrogenih receptora ER $\alpha$  i ER $\beta$ . Pokazuje 30 do 100 puta veću estrogenu aktivnost u odnosu na izoflavone (Konar, 2013), a afinitet vezanja za receptore usporediv je s 17 $\beta$ -estradiolom (Kuiper i sur., 1997). Namirnice s visokim udjelom fitoestrogena poput soje i djeteline tradicionalno se primjenjuju kao prirodna metoda ublažavanja vazomotornih simptoma u postmenopauzalnih žena. Kliničke studije,



međutim, nisu pokazale učinkovitost fitoestrogena u navedenoj indikaciji (Chen i sur., 2015). Prema novijim istraživanjima, kumestrol je prepoznat kao potentan inhibitor melanogeneze s preventivnim učinkom na fotostarenje kože (Park i sur., 2015; Hwang i sur., 2017), pokazujući time potencijal za primjenu u dermatologiji i kozmetologiji.

## 1.2. Starenje kože

Starenje kože progresivan je proces u kojem dolazi do postepenog slabljenja funkcije i strukture kože te narušavanja njezinog izgleda. Iako se radi o neizbježnoj prirodnoj pojavi u čijoj pozadini leže genetski čimbenici i metaboličke promjene (tzv. intrinzično starenje), koža je izložena vanjskim štetnim čimbenicima koji isti proces mogu znatno ubrzati (ekstrinzično starenje). Zagađenje zraka, malnutricija i cigaretni dim neki su od primjera, a posebice se ističe utjecaj sunčevog ultraljubičastog (UV) zračenja (Zhang i Duan, 2018).

Klinički znakovi intrinzičnog starenja kože rijetko se manifestiraju prije 70. godine života. Koža postaje tanka, blijeda i suha s plitkim borama. Fotostarenje, s druge strane, karakterizirano je hrapavim izgledom kože, nastankom grubih, dubokih bora te poremećajima u pigmentaciji („staračke pjege“) (Newton i sur., 2015). Dugotrajno izlaganje kože UV zračenju je također jedan od glavnih uzročnika melanoma (Wang i sur., 2001). Razmatrajući fenomen starenja kože s molekularne perspektive, patološke promjene na koži uzrokovane su oksidacijskim oštećenjem staničnih struktura, promjenama u aktivnosti enzima (lipoksigenaza, elastaza, metaloproteinaze matriksa i dr.) te ostalim biokemijskim mehanizmima (Kim i Park, 2016).

### 1.2.1. Oksidacijski stres

Prema teoriji slobodnih radikala, starenje je posljedica akumulacije oštećenja uzrokovanih slobodnim radikalima i ostalim reaktivnim vrstama (Graggani i sur., 2014). Ljudski organizam, pa tako i koža, posjeduje složeni sustav enzima i antioksidansa za detoksifikaciju reaktivnih kisikovih (ROS) i dušikovih vrsta (RNS). ROS i RNS normalan su produkt staničnog metabolizma, no mogu nastati i pod utjecajem štetnih čimbenika kao što je UV zračenje (Zhang i Duan, 2018). Ukoliko proizvodnja ROS i RNS nadmaši antioksidacijski kapacitet organizma, nastupa neravnotežno redoks stanje nazvano oksidacijski stres. ROS i RNS, uključujući hidroksilni radikal ( $\cdot\text{OH}$ ),

superoksid ( $O_2^-$ ), peroksidni anion ( $O_2^{2-}$ ), peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) i dr., mogu reagirati s različitim makromolekulama, uzrokujući tako oštećenje DNA, proteina te lipida. Povećana proizvodnja ROS također dovodi do povećane ekspresije metaloproteinaza matriksa (MMP) te posljedično do povećane razgradnje kolagena u koži (Kim i Park, 2016).

### **1.2.2. Elastaza**

Elastin je vlaknasti protein izvanstaničnog matriksa koji koži daje elastična svojstva. Sintetizira se u fibroblastima u obliku topljivog prekursora, tropoelastina, koji zajedno s glikoproteinima matriksa tvori elastično vlakno. Razgradnja elastina katalizirana je pomoću enzima elastaze (Shin i sur., 2019). Enzim elastaza ima važnu ulogu u remodeliranju izvanstaničnog matriksa te zacjeljivanju rana. Povećana aktivnost elastaze te degradacija elastičnih vlakana u korelaciji su s gubitkom elastičnosti kože te nastankom bora. Elastaza je stoga prepoznata kao potencijalna meta za izradu kozmetičkih pripravaka koji usporavaju starenje kože (Imokawa i Ishida, 2015).

## **1.3. Lipoksigenaza**

Lipoksigenaze (LOX) čine skupinu enzima uključenih u metabolizam arahidonske kiseline te nastajanje različitih signalnih molekula poput leukotriena i lipoksina. U ljudi je identificirano 6 različitih izoformi koje su klasificirane prema specifičnosti položaja arahidonske kiseline na kojem se odvija oksigenacija (5-, 8-, 12- i 15-LOX). Smatra se kako LOX sudjeluju u kontroli proliferacije i diferencijacije epitela, zacjeljivanju rana, permeabilnosti kože, ali i u patofiziologiji različitih upalnih stanja kože poput psorijaze i atopijskog dermatitisa (Krieg i Fürstenberger, 2014). Različiti spojevi s inhibicijskim djelovanjem na LOX pokazuju protuupalno djelovanje te se kao takvi razmatraju kao moguća farmakološka intervencija u liječenju i kontroli upalnih bolesti (Hu i Ma, 2018).

## **1.4. Tirozinaza**

Enzim tirozinaza katalizira odlučujući korak u biosintezi melanina, prirodnog pigmenta odgovornog za pigmentaciju kože te tamnjenje prehrambenih namirnica poput voća i povrća. Sinteza melanina odvija se u melanocitima, specijaliziranim stanicama smještenim u bazalnom sloju epidermisa. Prvi korak u biosintezi je tirozinazom katalizirana hidroksilacija L-tirozina te

oksidacija u reaktivni dopakinon, koji daljnjim metaboličkim reakcijama tvori pigmente eumelanin te feomelanin. Sintetizirani melanin se pohranjuje u melanosomima te transportira prema keratinocitima (Pillaiyar i sur., 2017).

Proces melanogeneze te pigmentacija kože najvažniji su čimbenici obrane organizma od štetnog utjecaja UV zračenja. Pretjerana enzimaska aktivnost tirozinaze može, međutim, kao posljedicu imati poremećaj u pigmentaciji kože. Hiperpigmentacija kože klinički se najčešće manifestira kao melasma ili staračke pjege (Kumari i sur., 2018). Prirodni inhibitori tirozinaze poput arbutina, hidrokinaona te kojične kiseline pokazuju depigmentacijski učinak te su korišteni topikalno u liječenju poremećaja pigmentacije. Zbog mutagenih svojstava te razvoja lokalnih kožnih reakcija, njihova primjena je danas ograničena. Nova istraživanja su stoga usmjerena prema razvoju inhibitora tirozinaze s boljim sigurnosnim profilom (Pillaiyar i sur., 2017).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Prekomjerno izlaganje UV zračenju te oksidacijski stres smatraju se glavnim uzročnicima ubrzanog starenja kože. Obzirom da je koža organ od velike estetske važnosti, interes suvremene populacije usmjeren je prema usporavanju ili obrtanju procesa njezinog starenja. Polifenolni ekstrakti biljaka pokazuju širok spektar bioloških učinaka na koži, uključujući fotoprotektivno, antioksidacijsko, antikolagenazno i antielastazno djelovanje. Zahvaljujući trendu porasta primjene prirodnih kozmeceutika, njihovom blagotvornom djelovanju na kožu te dobroj podnošljivosti, biljni ekstrakti idealan su kandidat za izradu kozmetičkih pripravaka s „anti-aging“ učinkom.

Svrha ovog diplomskog rada bila je optimizirati ekstrakciju zeleni hmeljaste vije u ekološki prihvatljivom otapalu te procijeniti dermatološki i kozmetički potencijal ekstrakta na osnovu njegove biološke aktivnosti *in vitro*. Kao ekstrakcijsko sredstvo korišten je polipropilenglikol (PPG), otapalo niske toksičnosti koje posjeduje svojstva humektansa (Fowles i sur., 2013). Navedene karakteristike otapala omogućuju direktnu primjenu ekstrakta u izradi kozmetičkog pripravka bez prethodnog uklanjanja otapala, smanjenje troškova izrade te smanjenje negativnog utjecaja na okoliš.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. MATERIJALI ZA ISPITIVANJE

#### 3.1.1 Biljni materijal

Ispitivani su nadzemni dijelovi biljne vrste *Medicago lupulina* L. ubrane za vrijeme cvatnje na području jezera Jarun u okolici Zagreba. Zelen je osušena, usitnjena i pohranjena na sobnoj temperaturi zaštićena od svjetlosti i vlage.

#### 3.1.2 Kemikalije

U ispitivanjima su korištene sljedeće kemikalije: destilirana voda, 37% klorovodična kiselina, polipropilenglikol, metanol, mravlja kiselina (T.T.T., Njemačka); dimetilsulfoksid (Kemika, Zagreb), kloroform, natrij-hidrogenfosfat (bezvodni), natrij-dihidrogenfosfat monohidrat, natrij-hidroksid (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb); natrij-karbonat dekahidrat (Zorka, Šabac); linoleinska kiselina (TCI, Japan); L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) (Cayman Chemical Company, SAD); kumestrol, galna kiselina, nordihidrovajaretinska kiselina (NDGA), kojična kiselina, ursolna kiselina, butilhidroksianisol (BHA),  $\beta$ -karoten, tirozinaza, elastaza, lipoksigenaza, kolagenaza, tris(hidroksimetil)metilamin, N-sukcinil-(Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilid (SANA), Tween 40, Folin-Ciocalteu reagens (Sigma Aldrich, SAD)

#### 3.1.3 Uređaji

Korišteni su sljedeći uređaji: mlin za usitnjavanje biljnog materijala; precizna vaga (Mettler Toledo, Švicarska); ultrazvučna kupelj (Sonorex digital, Bandelin electronic, Njemačka), HPLC uređaj (Agilent 1200 serija, Agilent Technologies, USA) opremljen s diode array detektorom (DAD) i Zorbax Eclipse XDB C18 kolonom (5  $\mu$ m, 250 mm  $\times$  4,6 mm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), rotavapor (Büchi, Njemačka) i UV/Vis spektrofotometar (BMG Labtech, Njemačka).

## 3.2. PRIPREMA EKSTRAKATA

U Erlenmeyerovoj tikvici od 50 mL izvavano je 0,10 g biljne droge. Droga je neposredno prije ekstrakcije suspendirana u 10 g odgovarajućeg otapala. Ekstrakcija je provedena na ultrazvučnoj kupelji pri snazi od 360 W i frekvenciji 35 kHz. Sastav otapala, temperatura i vrijeme ekstrakcije tri su varijable čije su vrijednosti odabrane u skladu s Box-Behnkenovim dizajnom (Tablica 1.). Pri završetku ekstrakcije smjesa je filtrirana preko filter papira te pohranjena na tamnom i hladnom (+4 °C) mjestu do analize.

**Tablica 1.** Nezavisne varijable i njihove vrijednosti u Box-Behnkenovom dizajnu.

Nezavisne varijable	Kod	Razine		
		-1	0	1
Udio PPG (% m/m)	X <sub>1</sub>	10	50	90
Temperatura (°C)	X <sub>2</sub>	20	50	80
Vrijeme (min)	X <sub>3</sub>	20	40	60

## 3.3. METODE ISPITIVANJA

### 3.3.1. Određivanje ukupnih polifenola

Određivanje ukupnog sadržaja polifenola u ekstraktima provedeno je prema modificiranoj Folin-Ciocalteu kolorimetrijskoj metodi (Singleton i sur., 1999). 80 µL ekstrakta pomiješano je s 80 µL Folin-Ciocalteu reagensa (prethodno razrijeđenog vodom u omjeru 1:3) te 80 µL 10% otopine natrij-karbonata. Nakon 1 sata inkubacije u tamnoj komori pri sobnoj temperaturi izmjerena je apsorbancija na 630 nm. Ukupni sadržaj polifenola određen je pomoću baždarnog pravca galne kiseline (Tablica 2.), a rezultat je izražen kao ekvivalent galne kiseline u miligramima po mililitru ekstrakta.

**Tablica 2.** Baždarni pravac galne kiseline.

Standard	Nagib pravca	Odsječak na y osi	r <sup>2</sup>	LOD (µg)	LOQ (µg)
Galna kiselina	41.1592	0.0082	0.9986962	0.05332	0.16159

### 3.3.2. Određivanje kumestrola

Sadržaj kumestrola u ekstraktima određen je pomoću uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (*eng. high performance liquid chromatography*, HPLC) spregnutim s DAD detektorom. Uzorci ekstrakta i standardne otopine kumestrola prethodno su filtrirani kroz PFTE filter veličine pora 45  $\mu\text{m}$ . Razdvajanje je provedeno pri 40 °C na Zorbax Eclipse XDB-C18 (5  $\mu\text{m}$ , 12.5 mm  $\times$  4.6 mm, Agilent) koloni opremljenoj s odgovarajućom predkolonom, prema protokolu opisanom u tablici 3. Mobilne faze dobivene su miješanjem vode, metanola i mravlje kiseline u omjerima 93:5:2 (V:V:V) za mobilnu fazu A, odnosno 3:95:2 (V:V:V) za mobilnu fazu B. Brzina protoka mobilne faze je 1,0 mL/min. Volumen injektiranja iznosi 30  $\mu\text{L}$ .

**Tablica 3.** Protokol razdvajanja sastavnica ekstrakata.

Vrijeme (min)	Mobilna faza A (vol. %)	Mobilna faza B (vol. %)
0	80	20
10	60	40
35	50	50

Pikovi kumestrola identificirani su pri 270 nm temeljem usporedbe s vremenom zadržavanja i UV spektrom pika na kromatogramu standardne otopine kumestrola. Sadržaj kumestrola u ekstraktima kvantificiran je pomoću konstruiranog baždarnog pravca (Tablica 4.).

**Tablica 4.** Baždarni pravac kumestrola.

Standard	Nagib pravca	Odsječak na y osi	$r^2$	LOD ( $\mu\text{g}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}$ )
Kumestrol	2398.6087	0	0.9999947	0.0037901	0.011485

### 3.3.3. Eksperimentalni dizajn

Za dizajn eksperimenta te optimizaciju uvjeta ekstrakcije korišten je Box-Behnkenov dizajn. Regresijskom analizom rezultata predviđene su optimalne kombinacije tri nezavisne varijable (uvjeti ekstrakcije) s obzirom na dobivene vrijednosti zavisne varijable (sadržaj

kumestrola, odnosno polifenola). Cilj optimizacije je dobivanje ekstrakta s maksimalnim sadržajem bioaktivnih sastavnica. Dobiveni eksperimentalni podaci ukopljani su u kvadratni polinomni model prema sljedećoj jednadžbi:

$$Y=A_0+\sum_{i=1}^k A_i X_i + \sum_{i=1}^k A_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \times \sum_{j=i+1}^k A_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

gdje je Y zavisna varijabla;  $A_0$ ,  $A_i$ ,  $A_{ii}$  i  $A_{ij}$  su regresijski koeficijenti za odsječak, linearni i kvadratni faktor te interakciju;  $X_i$  i  $X_j$  su nezavisne varijable.



### 3.3.4. $\beta$ -karoten linoleatna analiza

Antioksidacijska aktivnost ekstrakata vrjednovana je  $\beta$ -karoten linoleatnom analizom. Propis je izveden iz postupka opisanog u literaturi (Rajić i sur., 2010) uz manje modifikacije. U otopinu  $\beta$ -karotena u kloroformu (1,825 mg/mL) dodano je 6 kapi Tweena 40. Nakon uklanjanja kloroforma, dodano je 20 mL linoleinske kiseline, 30 mL aerirane destilirane vode te je smjesa snažno promiješana. Alikvot (200  $\mu$ L) nastale emulzije dodan je metanolu (50  $\mu$ L; negativna kontrola) i serijski razrijeđenim otopinama ekstrakta u metanolu. Ploča je inkubirana 120 minuta na 50 °C, tijekom čega je mjerena apsorbancija na 450 nm u intervalima od 15 minuta. Antioksidacijska aktivnost (AA) izračunata je pomoću jednadžbe:

$$AA(\%) = \left( 1 - \frac{(A_{po\check{c}} - A_{kon})_{uzorak}}{(A_{po\check{c}} - A_{kon})_{negativna kontrola}} \right) * 100 \quad (2)$$

gdje je  $A_{po\check{c}}$  aporbancija na samom početku inkubacije ( $t = 0$  min), a  $A_{kon}$  apsorbancija pri završetku inkubacije ( $t = 120$  min). Svi uzorci su izrađeni u triplicatu. Izračunata je  $IC_{50}$ , odnosno koncentracija ekstrakta koja reagira s 50% slobodnih radikala prisutnih u sustavu. BHA je korišten kao pozitivna kontrola.

### 3.3.5. Ispitivanje inhibicijskog djelovanja ekstrakta na lipoksigenazu

Inhibicijsko djelovanje ekstrakta na lipoksigenazu ispitano je spektrofotometrijski (Chekir i sur., 2018). U 200  $\mu$ L otopine ekstrakta u fosfatnom puferu (0,1 M, pH 8) dodano je 30  $\mu$ L otopine lipoksigenaze. Reakcija je inicirana dodatkom otopine Na-linoleata. Nakon 10 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi izmjerena je apsorbancija na 234 nm. Kao negativna kontrola korištena je otopina koja umjesto ekstrakta sadrži ekvivalentni volumen fosfatnog pufera. Inhibicijska aktivnost ekstrakta na lipoksigenazu (InhL) izračunata je prema jednadžbi:

$$InhL (\%) = \frac{A_N - A_E}{A_N} * 100 \quad (3)$$

gdje je  $A_N$  apsorbancija negativne kontrole, a  $A_E$  apsorbancija otopine ekstrakta. Sva mjerenja su izrađena u triplikatu. Izračunata je koncentracija koja inhibira 50% aktivnosti lipoksigenaze (InhL  $IC_{50}$ ). NDGA je korištena kao pozitivna kontrola.

### 3.3.6. Ispitivanje inhibicijskog djelovanja ekstrakta na elastazu

Inhibicijsko djelovanje ekstrakta na elastazu ispitano je prema modificiranom propisu opisanom u literaturi (Ko i sur., 2011). U 100  $\mu$ L otopine ekstrakta u 0,1 M Tris-HCl puferu (pH 8,0) dodano je 100  $\mu$ L otopine N-sukcinil-(Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilida (SANA) u istom puferu. Nakon 10 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi dodano je 25  $\mu$ L otopine elastaze u Tris-HCl puferu. Nakon dodatnih 10 minuta izmjerena je apsorbancija na 410 nm. Kao negativna kontrola korištena je otopina koja umjesto ekstrakta sadrži ekvivalentni volumen Tris-HCl pufera. Inhibicijska aktivnost ekstrakta na elastazu (InhE) izračunata je prema jednadžbi:

$$InhE (\%) = \frac{A_N - A_E}{A_N} * 100 \quad (4)$$

gdje je  $A_N$  apsorbancija negativne kontrole, a  $A_E$  apsorbancija otopine ekstrakta. Sva mjerenja su izrađena u triplikatu. Izračunata je koncentracija koja inhibira 50% aktivnosti elastaze (InhE  $IC_{50}$ ). Kao pozitivna kontrola korištena je ursolna kiselina.

### 3.3.7. Ispitivanje inhibicijskog djelovanja ekstrakta na tirozinazu

Inhibicijsko djelovanje ekstrakta na tirozinazu ispitano je prema opisanom literaturnom propisu (Masuda i sur., 2005) uz manje modifikacije. U 120  $\mu$ L otopine ekstrakta u 16 mM fosfatnom puferu (pH 6,8) dodano je 40  $\mu$ L otopine tirozinaze. Nakon 10 minuta inkubacije u tamnoj komori pri sobnoj temperaturi dodano je 40  $\mu$ L otopine L-DOPA (0,52 mg/mL). Nakon dodatnih 10 minuta izmjerena je apsorbancija na 492 nm. Kao negativna kontrola korištena je otopina koja umjesto ekstrakta sadrži ekvivalentni volumen fosfatnog pufera. Inhibicijska aktivnost ekstrakta na tirozinazu (InhT) izračunata je prema jednadžbi:

$$InhT (\%) = \frac{A_N - A_E}{A_N} * 100 \quad (5)$$

gdje je  $A_N$  apsorbancija negativne kontrole, a  $A_E$  apsorbancija otopine ekstrakta.. Sva mjerenja su izrađena u triplicatu. Izračunata je koncentracija koja inhibira 50% aktivnosti tirozinaze (InhT  $IC_{50}$ ). Otopina kojične kiseline korištena je kao pozitivna kontrola.

### **3.3.8. Statistička analiza**

Za dizajn eksperimenta, provjeru modela te optimizaciju uvjeta ekstrakcije korišten je Box-Behnkenov dizajn u programu Design Expert verzije 12.0.8.0. (Stat-Ease, USA). Valjanost modela potvrđena je analizom varijance (ANOVA), pri čemu su P-vrijednosti manje od 0,05 smatrane statistički značajnima. Također je provedena usporedba predviđenih i izmjerenih vrijednosti ovisnih varijabli za optimizirane ekstrakte. Mjerenja biološke aktivnosti i ukupnih polifenola provedena su u triplicatu, a rezultati iskazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Pokusi su provedeni u različitim koncentracijama (4–7 koncentracija), a  $IC_{50}$  vrijednosti su određene regresijskom analizom u programu Microsoft Excel (Microsoft, USA).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE

#### 4.1.1. Eksperimentalni dizajn

U ovom radu implementiran je trofaktorijalni Box-Behnkenov eksperimentalni dizajn u tri razine, s ciljem da se matematički definira utjecaj odabranih ekstrakcijskih parametara na sadržaj kumestrola te polifenola u PPG ekstraktima hmeljaste vije. Kao ekstrakcijski parametri odabrani su udio PPG u otapalu, temperatura te vrijeme ekstrakcije. Rasponi ekstrakcijskih parametara navedeni su u Tablici 1. Zahvaljujući njezinoj jednostavnosti te učinkovitosti, metoda ultrazvučne ekstrakcije odabrana je za pripremu zelenih ekstrakata hmeljaste vije.

Pravilan odabir otapala jedan je od ključnih čimbenika uspješnosti ekstrakcije bioaktivnih sastavnica. U ovom radu je kao ekstrakcijsko sredstvo korištena smjesa PPG i vode. Udio PPG i vode u smjesi utječe na fizikalno-kemijska svojstva ekstrakcijskog sredstva, kao što su polarnost i viskoznost. Kako bi se ustanovio optimalan omjer vode i PPG za ekstrakciju bioaktivnih sastavnica hmeljaste vije, za ekstrakciju su korišteni 10%, 50% i 90% PPG. Drugi važan ekstrakcijski parametar jest temperatura. Porast temperature sustava povećava kinetičku energiju molekula u otopini te smanjuje viskoznost otapala, povećavajući pritom uspješnost ekstrakcije. S druge strane, povišena temperatura može dovesti do razgradnje termolabilnih spojeva, uključujući pojedine fenolne spojeve (Ciganović i sur., 2019). Duljina trajanja ekstrakcije treći je parametar koji potencijalno utječe na uspješnost ekstrakcije.

Jedna od prednosti primjene Box-Behnkenovog dizajna jest značajno smanjenje broja eksperimentalnih ispitivanja („run“) potrebnih za dizajniranje modela (Ferreira i sur., 2007). Za potrebe ovog istraživanja sveukupno je provedeno 17 ekstrakcija, uključujući 5 ponavljanja u centralnoj točki (50% PPG, 50 °C, 40 min). Rezultati ispitivanja opisani su u tablici 5.

**Tablica 5.** Box-Behnken dizajn i rezultati izračuna.

Run	PPG (%, w/w)	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Kumestrol (µg/mL)	TP (mg/mL)
1	90	80	40	0.179854	0.016
2	50	20	60	0.621193	0.0578
3	50	80	60	0.655936	0.0528
4	50	80	20	0.719862	0.0547
5	10	20	40	0	0.0498
6	10	50	60	0	0.064
7	50	50	40	0.671222	0.0515
8	90	50	60	0	0.0524
9	50	50	40	0.690678	0.0553
10	10	50	20	0	0.0725
11	50	50	40	0.77406	0.0552
12	50	20	20	0.45582	0.0451
13	90	20	40	0	0.0259
14	10	80	40	0	0.0581
15	50	50	40	0.811582	0.0596
16	90	50	20	0	0.0358
17	50	50	40	0.708744	0.0576

Rezultati ukazuju na izraženu varijabilnost sadržaja kumestrola te polifenola. Može se zaključiti kako odabrani ekstrakcijski parametri imaju značajan utjecaj na prinos ekstrakcije. Ovisno o iznosu ekstrakcijskih parametara, sadržaj kumestrola u ekstraktima kreće se u intervalu od 0 do 0,81 µg/mL. Sadržaj ukupnih polifenola veći je i do 100 puta u odnosu na sadržaj kumestrola te poprima vrijednosti od 0,016 mg/mL do 0,073 mg/mL. Odsustvo kumestrola u pojedinim ekstraktima vjerojatno je posljedica preniskog (10%) ili previsokog udjela PPG (90%), odnosno neodgovarajućih fizikalno-kemijskih svojstva otapala.

## 4.1.2. Analiza modela

Višestrukom regresijskom analizom eksperimentalnih podataka u programu Design Expert utvrđeno je da se utjecaj ekstrakcijskih parametara na sadržaj kumestrola te polifenola najbolje može opisati modelima kvadratne polinomne jednadžbe. Polinomne jednadžbe koje definiraju oba modela opisana su u tablici 6. Statistički značajni faktori označeni su podebljanim fontom.

**Tablica 6.** Opća polinomna jednadžba oba modela te vrijednosti koeficijenata za pojedine modele.

$$Y = aX_1^2 + bX_2^2 + cX_3^2 + dX_1X_2 + eX_1X_3 + fX_2X_3 + gX_1 + hX_2 + iX_3 + j$$

Y	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j
Kumestrol (µg/mL)	<b>-0.6497</b>	-0.0365	-0.0815	<b>0.0450</b>	0	-0.0573	<b>0.0225</b>	<b>0.0598</b>	0.0127	0.7313
Polifenoli (mg/mL)	<b>-0.0074</b>	<b>-0.0110</b>	<b>0.0077</b>	<b>-0.0046</b>	<b>0.0063</b>	-0.0037	<b>-0.0143</b>	0.0004	0.0024	0.0558

Y = sadržaj kumestrola (µg/mL) ili ukupnih polifenola (mg/mL);

X<sub>1</sub> = maseni udio PPG u otapalu (%); X<sub>2</sub> = temperatura ekstrakcije (°C); X<sub>3</sub> = vrijeme trajanja ekstrakcije (min).

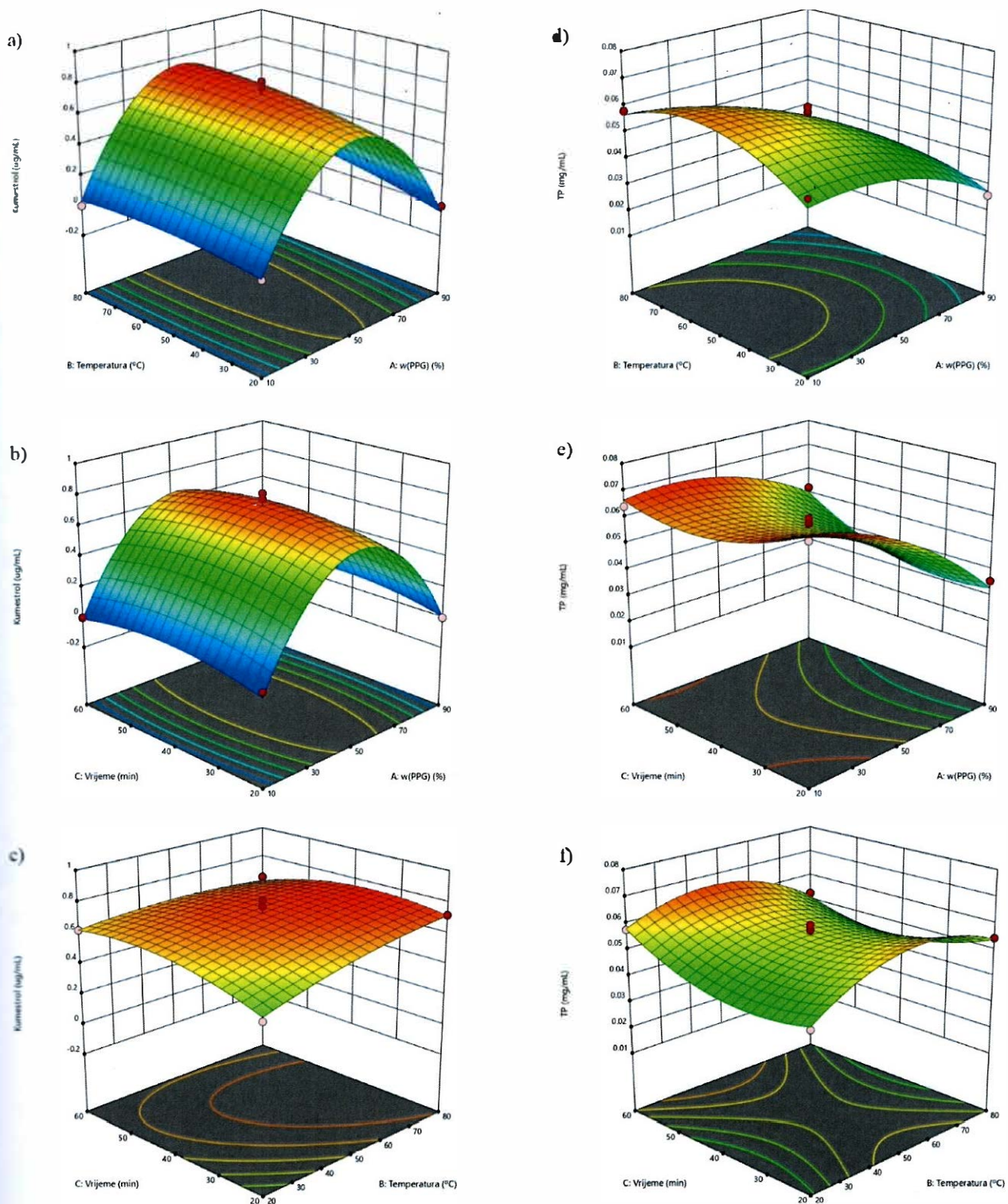
Na osnovu dobivenog matematičkog modela (kvadratnog polinoma) konstruirana je odzivna površina koja omogućava vizualni prikaz utjecaja ispitivanih parametara te njihove interakcije na iznos zavisne varijable. Grafički prikaz odzivne površine dobiven je tako da su zavisna varijabla te dvije nezavisne varijable smještene na odgovarajućim osima koordinatnog sustava (x,y,z), dok je srednja vrijednost treće nezavisne varijable uzeta kao fiksna (Slika 4).

Analizom prvog modela (ovisnost sadržaja kumestrola u ekstraktu o ekstrakcijskim uvjetima) vidljivo je kako je udio PPG najznačajniji ekstrakcijski parametar. Utjecaj udjela PPG na sadržaj kumestrola opisana je kvadratnim i linearnim faktorima u polinomnoj jednadžbi. Drugi statistički značajan ekstrakcijski parametar jest temperatura. Porast temperature ekstrakcije djelovalo je povoljno na koncentraciju kumestrola. Ovisnost sadržaja kumestrola o temperaturi opisana je linearnim faktorom. Vrijeme ekstrakcije nije pokazalo statistički značajan utjecaj na koncentraciju kumestrola. Uzimajući u obzir utjecaj obje varijable te njihovu interakciju, čini se kako je za optimalnu ekstrakciju kumestrola najpogodnija kombinacija srednje vrijednosti

masenog udjela PPG u otapalu te visoke temperature ekstrakcije. Kako se udio PPG povećavao ili smanjivao, sadržaj kumestrola bio je manji. Utjecaj obje varijable na sadržaj kumestrola jasno je prikazan na Slici 4a).

Analizom drugog modela (ovisnost sadržaja polifenola u ekstraktu o ekstrakcijskim uvjetima) vidljivo je da su sva tri ekstrakcijska parametra statistički značajna. Njihov utjecaj na iznos zavisne varijable može se opisati kvadratnim te linearnim faktorima. Udio PPG u otapalu i ovdje predstavlja najznačajniji ekstrakcijski parametar. Međutim, za razliku od prvog modela, niži maseni udio PPG pogoduje većem prinosu polifenola. Kraće vrijeme ekstrakcije također pogoduje većem prinosu polifenola, što ukazuje na mogućnost njihove razgradnje prilikom dugotrajnog izlaganja povišenoj temperaturi te ultrazvučnim valovima. To je posebice vidljivo u slučaju kombinacije visokih temperatura i dugog vremena ekstrakcije (Slika 4f).





**Slika 4.** Odzivne površine za sadržaj kumestrola (a-c) i ukupnih polifenola (d-f) u ekstraktima *M. lupulina*. a,d) Utjecaj udjela PPG i temperature pri vremenu ekstrakcije 40 min. b,e) Utjecaj udjela PPG i vremena ekstrakcije pri temperaturi 50 °C. c, f) Utjecaj temperature i vremena ekstrakcije za 50% PPG ekstrakt.



Nakon uklapanja eksperimentalnih podataka u odgovarajuće polinomne modele, valjanost modela potvrđena je analizom varijance (ANOVA). Odabrani kvadratni modeli pokazali su se statistički značajnima (P-vrijednost < 0,05). Vrijednosti koeficijenta determinacije ( $r^2$ ) relativno su blizu jediničnoj vrijednosti, što pokazuje dobru reprezentativnost modela. Odstupanje modela se niti u jednom slučaju nije pokazalo kao statistički značajno, na što ukazuju niske F-vrijednosti te visoke P-vrijednosti (Tablica 7).

**Tablica 7.** Analiza varijance (ANOVA) za kvadratne modele optimizacije ekstrakcijskih parametara.

<b>Kumestrol (<math>r^2 = 0.9891</math>)</b>					
<b>Izvor</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F-vrijednost</b>	<b>P-vrijednost</b>
Model	1.914517	9	0.212724124	70.43951	< 0.0001
Odstupanje modela*	0.007098	3	0.002365981	0.673985	0.6116
Čista pogreška	0.014042	4	0.003510435		
<b>Ukupni polifenoli (<math>r^2 = 0.9730</math>)</b>					
<b>Izvor</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F-vrijednost</b>	<b>P-vrijednost</b>
Model	0.00294	9	0.00033	28.0139	0.0001
Odstupanje modela*	$4.5 \times 10^{-5}$	3	$1.5 \times 10^{-5}$	1.62723	0.3172
Čista pogreška	$3.7 \times 10^{-5}$	4	$9.2 \times 10^{-6}$		

SS = zbroj kvadrata; df = stupnjevi slobode; MS = aritmetička sredina kvadrata

\* eng. *lack of fit*

### 4.1.3. Optimizacija ekstrakcijskih parametara i validacija modela

Svrha optimizacije ekstrakcijskih parametara jest dobivanje ekstrakta hmeljaste vije s maksimalnim sadržajem kumestrola, odnosno polifenola. Numeričkom optimizacijom ekstrakcijskog procesa u programu Design Expert dobiveno je više mogućih rješenja za oba prethodno opisana modela, pri čemu su kao najprikladnija rješenja odabrana ona kod kojih je poželjnost (eng. *desirability*) iznosila 1. Izabrane vrijednosti ekstrakcijskih parametara za oba modela opisane su u tablici 8.

**Tablica 8.** Predviđene i izmjerene vrijednosti optimalnog iznosa ovisnih varijabli.

Oznaka	Optimizirani odgovor	PPG (% (m/m))	T (°C)	t (min)	Predviđeno (µg/mL)	Izmjereno (µg/mL)	Odstupanje (%)
Kum-opt	Kumestrol	50	80	35	0,762	0,699	-8,3
TP-opt	Polifenoli	10	70	20	75,21	66,93	-11,0

Prema rješenjima kvadratnih jednadžbi, najbolji uvjeti za ekstrakciju kumestrola su otapalo s 50 % PPG, temperatura ekstrakcije 80 °C te vrijeme ekstrakcije 35 min. Ekstrakcijski parametri za optimalnu ekstrakciju ukupnih polifenola glase: 10% PPG kao otapalo za ekstrakciju, temperatura 70 °C te vrijeme ekstrakcije 20 min. Kao što je i očekivano, povišena temperatura pogoduje većem prinosu kumestrola te ukupnih polifenola. Sastav otapala se međutim značajno razlikuje među modelima. Otapalo srednje polarnosti (50% PPG) optimalno je za ekstrakciju kumestrola, dok je za ekstrakciju polifenola pogodnije polarnije otapalo s većim udjelom vode (10% PPG). Može se stoga pretpostaviti da u biljci dominiraju polifenoli polarnije strukture.

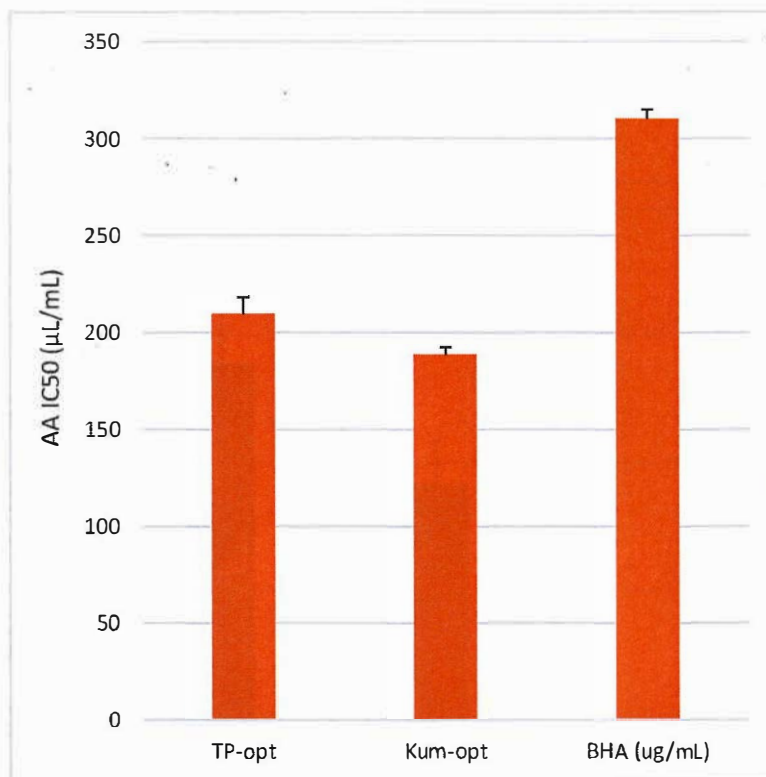
Zaključno, kako bi se dodatno potvrdila prikladnost odabranih modela, pripremljeni su ekstrakti pri uvjetima navedenim u tablici 8. Određivanjem sadržaja kumestrola te ukupnih polifenola u pripremljenim ekstraktima utvrđeno je kako su eksperimentalno dobivene vrijednosti niže od očekivanih. Pritom je primijećeno nešto značajnije odstupanje od modela u slučaju ukupnih polifenola. Iz tog bi razloga trebalo provesti dodatne analize kako bi se ustvrdio uzrok odstupanja.

## 4.2. BIOLOŠKI TESTOVI

Terapijski potencijal biljnih ekstrakata moguće je vrjednovati određivanjem njihove biološke aktivnosti u *in vitro* uvjetima. Za potrebe ovog diplomskog rada odabrana su četiri reprezentativna biološka testa:  $\beta$ -karoten linoleatna analiza, ispitivanje inhibicijskog djelovanja na lipoksigenazu, ispitivanje inhibicijskog djelovanja na elastazu te ispitivanje inhibicijskog djelovanja na tirozinazu. Kao mjera biološke aktivnosti ekstrakata uzete su vrijednosti polumaksimalnih inhibicijskih koncentracija ( $IC_{50}$ ), tj. koncentracije ekstrakata koje inhibiraju određeni kemijski ili biokemijski proces za 50%. Niža  $IC_{50}$  vrijednost stoga označava veću biološku aktivnost.

### 4.2.1. $\beta$ -karoten linoleatna analiza

Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta u  $\beta$ -karoten linoleatnoj analizi temelji se na obezbojenju  $\beta$ -karotena kao posljedica reakcije s linoleatnim radikalima. Zagrijavanjem emulzijskog sustava obogaćenog kisikom dolazi do oksidacije linoleinske kiseline te nastanka linoleatnog radikala. Reaktivni linoleatni radikal napada nezasićene ugljikove atome  $\beta$ -karotena te uzrokuje pucanje  $\pi$  veza. Obzirom da nastali produkt ne sadrži visoko konjugirani sustav  $\pi$  veza, molekula gubi karakteristično žučkasto obojenje. Ukoliko su, međutim, u sustavu prisutni antioksidansi (npr. polifenolni spojevi), dio radikala biti će „neutraliziran“ redukcijom te će se obezbojenje sustava odvijati sporije (Amarowicz i sur., 2004). Navedena reakcija može se pratiti spektrofotometrijski, stoga je moguće izračunati antioksidacijsku aktivnost uzorka (AA, jednadžba 2), a potom i odrediti koncentraciju ekstrakta pri kojoj je 50% nastalih radikala u sustavu neutralizirano (AA  $IC_{50}$ ). Što je obojenje emulzije postojanije, antioksidacijska aktivnost je veća.



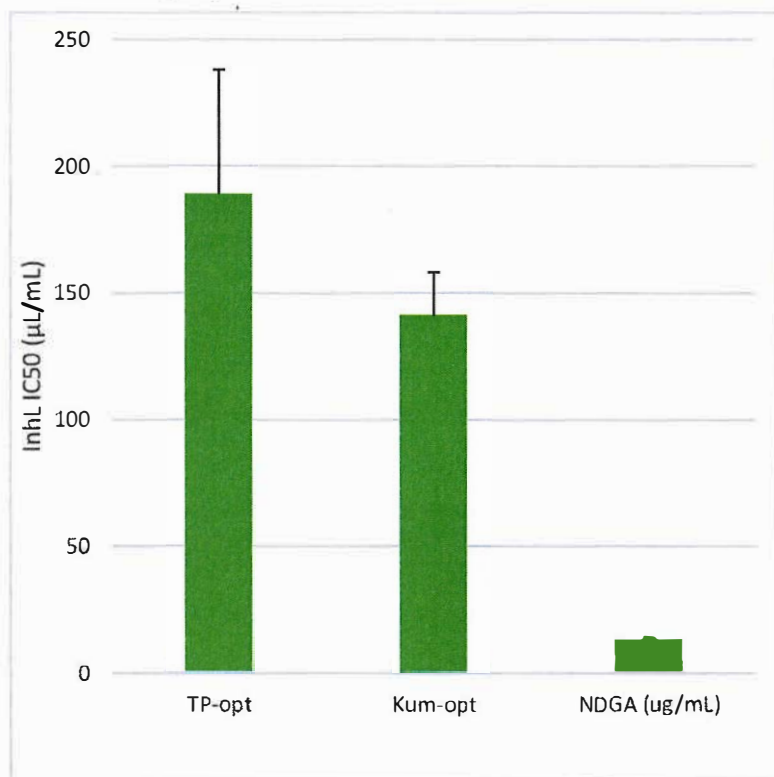
**Slika 5.** Usporedba AA IC<sub>50</sub> vrijednosti optimiziranih ekstrakata s pozitivnom kontrolom.

Rezultati analize prikazani su na Slici 5. IC<sub>50</sub> za ekstrakt optimiziran na ukupne polifenole (TP-opt) iznosi  $209.35 \pm 8.74 \mu\text{L/mL}$ , odnosno  $188.33 \pm 3.93 \mu\text{L/mL}$  za ekstrakt optimiziran na kumestrol (Kum-opt). IC<sub>50</sub> BHA, sintetskog antioksidansa koji je korišten kao pozitivna kontrola, iznosi  $310.02 \pm 4.97 \mu\text{g/mL}$ . Prema tome, oba ekstrakta pokazuju jače antioksidacijsko djelovanje u odnosu na pozitivnu kontrolu. Antioksidacijska aktivnost najveća je kod ekstrakta optimiziranog na kumestrol.

#### 4.2.2. Ispitivanje inhibicijskog djelovanja na lipoksigenazu

Enzim lipoksigenaza katalizira dioksidaciju nezasićenih masnih kiselina, pri čemu nastaju hidroperoksi-masne kiseline. Nastali hidroperoksi lipidni produkti u svojoj strukturi sadrže konjugirani dien koji snažno apsorbira zračenje valne duljine 234 nm (Anthon i Barrett, 2001). Zahvaljujući tome, tijekom enzimske reakcije moguće je pratiti spektrofotometrijski. Dodatkom inhibitora lipoksigenaze u sustav količina lipidnog produkta se smanjuje, što se

spektrofotometrijski očituje kao smanjenje apsorbancije u odnosu na kontrolu. Veće smanjenje apsorbancije korelira s većom inhibicijskom aktivnosti.

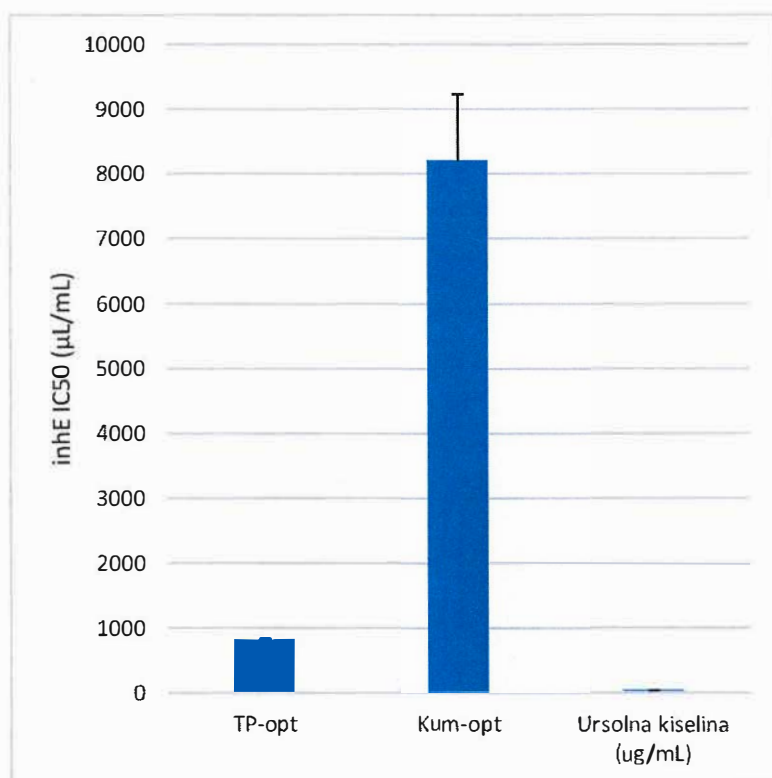


**Slika 6.** Usporedba InhL IC<sub>50</sub> vrijednosti optimiziranih ekstrakata s pozitivnom kontrolom.

Odnos između IC<sub>50</sub> vrijednosti za optimizirane ekstrakte te pozitivne kontrole (NDGA) prikazan je grafički na Slici 6. IC<sub>50</sub> vrijednosti za optimizirane ekstrakte iznose  $188.79 \pm 49.21$  µL/mL (TP-opt) te  $141.16 \pm 16.95$  µL/mL (Kum-opt). Nordihidrogvajaretinska kiselina, poznati LOX inhibitor, pokazuje znatno izraženije inhibicijsko djelovanje ( $IC_{50} = 13.106 \pm 0.899$  µg/mL). Dobiveni eksperimentalni podaci upućuju na prisutnost inhibicijskog djelovanja kod oba ekstrakta, pri čemu je ono izraženije kod ekstrakta optimiziranog na sadržaj kumestrola. Međutim, iz usporedbe IC<sub>50</sub> vrijednosti ekstrakata i pozitivne kontrole vidljivo je kako je inhibicijsko djelovanje ekstrakata na LOX 10-14 puta slabije u odnosu na NDGA.

### 4.2.3. Ispitivanje inhibicijskog djelovanja na elastazu

Metoda određivanja antielastazne aktivnosti ekstrakata temelji se na reakciji hidrolize N-sukcinil-(Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilida (SANA), kromogenog supstrata elastaze. U reakciji dolazi do cijepanja amidne veze te oslobađanja p-nitroanilina koji apsorbira zračenje valne duljine 410 nm (Bose i sur., 2017). Dodatkom inhibitora elastaze u sustav količina p-nitroanilina se smanjuje, što se spektrofotometrijski očituje kao smanjenje apsorbancije u odnosu na kontrolu. Veće smanjenje apsorbancije korelira s većom inhibicijskom aktivnosti.



**Slika 7.** Usporedba InhE IC<sub>50</sub> vrijednosti optimiziranih ekstrakata s pozitivnom kontrolom.

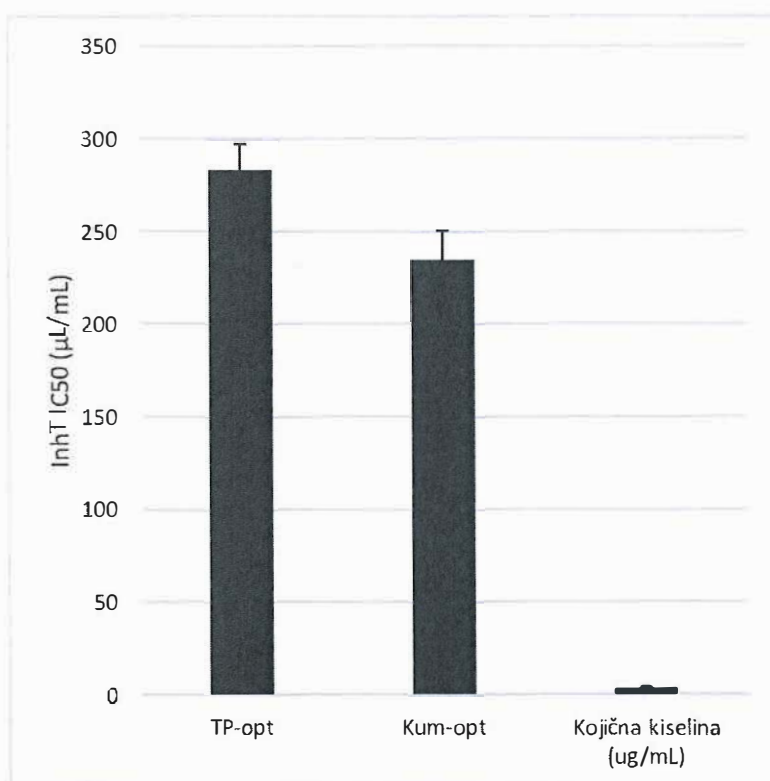
Dobivene IC<sub>50</sub> vrijednosti prikazane su grafički na Slici 7, pri čemu su ekstrakti testirani u okviru ovog diplomskog rada, a podatak o učinku ursolne kiseline je preuzet iz literaturnih podataka (Ciganović i sur. 2019). Inhibicijsko djelovanje na elastazu snažno je izraženo kod ursolne kiseline (pozitivna kontrola; IC<sub>50</sub> = 33.61 ± 2.64 μg/ml). Kod oba ekstrakata antielastazno djelovanje je relativno slabo, iako je u slučaju ekstrakta optimiziranog na sadržaj polifenola (TP-opt) primijećena nešto bolja učinkovitost (IC<sub>50</sub> = 814.12 ± 23.11 μL/mL). Iako je razlika između



učinkovitosti uzoraka i pozitivne kontrole velika, varijabilnost se djelomično može pripisati i činjenici da uzorci i pozitivna kontrola nisu testirani tijekom istog pokusa

#### 4.2.4. Ispitivanje inhibicijskog djelovanja na tirozinazu

Metoda određivanja inhibicijskog djelovanja ekstrakta na tirozinazu zasniva se na tirozinazom kataliziranoj reakciji oksidacije L-DOPA-e u reaktivni dopakinon, koji potom nizom neenzimskih reakcija polimerizira u pigmente eumelanin te feomelanin (Bose i sur., 2017). Dodatkom inhibitora tirozinaze u sustav količina produkta se smanjuje, što se spektrofotometrijski očituje kao smanjenje apsorbancije u odnosu na kontrolu. Veće smanjenje apsorbancije korelira s većom inhibicijskom aktivnosti.



**Slika 8.** Usporedba InhT IC<sub>50</sub> vrijednosti optimiziranih ekstrakata s pozitivnom kontrolom.

Statističkom obradom podataka izračunate su  $IC_{50}$  vrijednosti za oba optimizirana ekstrakata, kao i za pozitivnu kontrolu (kojična kiselina). Rezultati su grafički prikazani na Slici 8.  $IC_{50}$  vrijednost ekstrakta optimiziran na ukupne polifenole (TP-opt) iznosi  $283.13 \pm 14.31 \mu\text{L/mL}$ , dok je za ekstrakt optimiziran na kumestrol (Kum-opt) nešto niži te iznosi  $234.58 \pm 16.12 \mu\text{L/mL}$ . Kojična kiselina, poznati inhibitor tirozinaze gljivičnog porijekla, pokazuje znatno jače inhibicijsko djelovanje ( $IC_{50} = 4.43 \pm 0.39 \mu\text{g/mL}$ ). Rezultati analize sugeriraju da je inhibicijsko djelovanje ekstrakata hmeljaste vije na enzimsku aktivnost tirozinaze vrlo slabo do zanemarivo. Međutim, valja uzeti u obzir kako postoje drugi mehanizmi kojima sekundarni metaboliti biljaka mogu inhibirati melanogenezu. Antimelanogeno djelovanje kumestrola, na primjer, nije posljedica izravne inhibicije tirozinaze, već smanjenja količine enzima, vjerojatno na translacijskoj ili posttranslacijskoj razini (Hwang i sur., 2017). Iz tog bi razloga inhibicijsko djelovanje ekstrakata na melanogenezu bilo poželjno ispitati na modelu staničnih kultura.



## 5. ZAKLJUČAK

U ovome radu uspješno je provedena ultrazvučna ekstrakcija biološki aktivnih tvari iz zeleni hmeljaste vije u smjesi polipropilenglikola i vode. Također je uspješno primjenjena metodologija odzivne površine (eng. *response surface methodology*) u sklopu Box-Behnkenovog dizajna, temeljem kojeg je matematički opisan utjecaj ekstrakcijskih parametara na sadržaj kumestrola te ukupnih polifenola. Analizom modela ustanovljeno je kako su maseni udio PPG te temperatura statistički najznačajniji ekstrakcijski parametri. Također su predviđeni uvjeti za dobivanje ekstrakata s maksimalnim sadržajem kumestrola (50 % PPG, 80 °C, 35 min) te ukupnih polifenola (10% PPG, 70 °C, 20 min). Kvantitativnom analizom sadržaja ekstrakata pripremljenih u optimalnim uvjetima te statističkom obradom oba modela potvrđena je njihova vjerodostojnost. Optimizirani ekstrakti korišteni su dalje u ispitivanjima *in vitro* biološke aktivnosti. Oba ekstrakta pokazala su izraženo antioksidacijsko djelovanje. S druge strane, inhibitorni učinak ekstrakata na lipoksigenazu relativno je blag, dok je učinak prema tirozinazi bio gotovo zanemariv.

## LITERATURA

Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil JA. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem*, 2004, 84, 551–562.

Anthon GE, Barrett DM. Colorimetric Method for the Determination of Lipoxygenase Activity. *J Agr Food Chem*, 2001, 49, 32–37.

Baloch N, Nabi S, Al-Kahraman YMSA. In vitro Antimicrobial, Insecticidal, Antitumor Activities and Their Phytochemical Estimation of Methanolic Extract and its Fractions of *Medicago lupulina* Leaves. *World Appl Sci J*, 2013, 23, 500-506.

Bickoff EM, Booth AN, Lyman RL, Livingston AL, Thompson CR, Deeds F. Coumestrol, a New Estrogen Isolated from Forage Crops. *Science*, 1957, 126, 969–970.

Bose B, Choudhury H, Tandon P, Kumaria S. Studies on secondary metabolite profiling, anti-inflammatory potential, in vitro photoprotective and skin-aging related enzyme inhibitory activities of *Malaxis acuminata*, a threatened orchid of nutraceutical importance. *J Photoch Photobio B*, 2017, 173, 686–695.

Bučar M. Medonosne biljke kontinentalne Hrvatske : staništa, vrijeme cvjetanja, medonosna svojstva. Petrinja, Matica Hrvatska, 2008.

Butkutė B, Padarauskas A, Cesevičienė J, Taujenis L, Norkevičienė E. Phytochemical composition of temperate perennial legumes. *Crop Pasture Sci*, 2018, 69, 1020-1030.

Chekir S, Debbabi M, Regazzetti A, Dargère D, Laprévotte O, Ben Jannet H, Gharbi R. Design, synthesis and biological evaluation of novel 1,2,3-triazole linked coumarinopyrazole conjugates

as potent anticholinesterase, anti-5-lipoxygenase, anti-tyrosinase and anti-cancer agents. *Bioorg Chem*, 2018, 80, 189–194.

Chen MN, Lin CC, Liu CF. Efficacy of phytoestrogens for menopausal symptoms: a meta-analysis and systematic review. *Climacteric*, 2015, 18, 260-269.

Ciganović P, Jakimiuk K, Tomczyk M, Zovko Končić M. Glycerolic Licorice Extracts as Active Cosmeceutical Ingredients: Extraction Optimization, Chemical Characterization, and Biological Activity. *Antioxidants*, 2019, 8, 445.

Ferreira SLC, Bruns RE, Ferreira HS, Matos GD, David JM, Brandão GC, da Silva EGP, Portugal LA, dos Reis PS, Souza AS, dos Santos WNL. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Anal Chim Acta*, 2007, 597, 179–186.

Fowles JR, Banton MI, Pottenger L H. A toxicological review of the propylene glycols. *Crit Rev Toxicol*, 2013, 43, 363–390.

Gragnani A, Cornick S, Chominski V, Ribeiro de Noronha S, Noronha S, Ferreira L. Review of Major Theories of Skin Aging. *Adv Aging Res*, 2014, 3, 265-284.

Grlić Lj. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. Rijeka, Ex Libris, 1990, str. 205-206.

Hu C, Ma S. Recent development of lipoxygenase inhibitors as anti-inflammatory agents. *MedChemComm*, 2018, 9, 212–225.

Hwang JA, Park NH, Na YJ, Lee HK, Lee JH, Kim YJ, Lee CS. Coumestrol Down-Regulates Melanin Production in Melan-a Murine Melanocytes through Degradation of Tyrosinase. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40, 535-539.

Imokawa G, Ishida K. Biological Mechanisms Underlying the Ultraviolet Radiation-Induced Formation of Skin Wrinkling and Sagging I: Reduced Skin Elasticity, Highly Associated with

Enhanced Dermal Elastase Activity, Triggers Wrinkling and Sagging. *Int J Mol Sci*, 2015, 16, 7753–7775.

Kicel A, Olszewska M. Evaluation of Antioxidant Activity, and Quantitative Estimation of Flavonoids, Saponins and Phenols in Crude Extract and Dry Fractions of *Medicago lupulina* Aerial Parts. *Nat Prod Commun*, 2015, 10, 483-486.

Kim M, Park HJ. Molecular Mechanisms of Skin Aging and Rejuvenation. *InTech*, 2016.

Ko RK, Kim GO, Hyun CG, Jung DS, Lee NH. Compounds with Tyrosinase Inhibition, Elastase Inhibition and DPPH Radical Scavenging Activities from the Branches of *Distylium racemosum* Sieb. et Zucc. *Phytother Res*, 2011, 25, 1451–1456.

Konar N. Non-isoflavone phytoestrogenic compound contents of various legumes. *Eur Food Res Technol*, 2013, 236, 523–530.

Krieg P, Fürstenberger G. The role of lipoxygenases in epidermis. *BBA - Mol Cell Biol L*, 2014, 1841, 390-400.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JÅ. Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology*, 1997, 138, 863–870.

Kumari S, Thng S, Verma N, Gautam H. Melanogenesis Inhibitors. *Acta Derm-Venereol*, 2018, 98, 924-931.

Lattanzio V, Lattanzino VMT, Cardinali A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry*, 2006, 661, 23-67.

Masuda T, Yamashita D, Takeda Y, Yonemori S. Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Biosci Biotech Bioch*, 2005, 69, 197–201.

*Medicago lupulina*, <https://en.wikipedia.com>, pristupljeno 25.4.2020.

*Medicago lupulina* L., <https://www.ars-grin.gov/>, pristupljeno 27.6.2020.

Newton VL, Mcconnell JC, Hibbert SA, Graham HK, Watson RE. Skin aging: molecular pathology, dermal remodelling and the imaging revolution. *G Ital Dermatol Venereol*, 2015, 150, 665-674.

Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2009, 2, 270–278.

Park G, Baek S, Kim JE, Lim TG, Lee CC, Yang H, Kang YG, Park JS, Augustin M, Mrosek M, Lee CY, Dong Z, Huber R, Lee KW. Flt3 is a target of coumestrol in protecting against UVB-induced skin photoaging. *Biochem Pharmacol*, 2015, 98, 473–483.

Pietta P, Minoggio M, Bramati L. Plant Polyphenols: Structure, Occurrence and Bioactivity. *Stud Nat Prod Chem*, 2003, 257–312.

Pillaiyar T, Manickam M, Namasivayam V. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *J Enzym Inhib Med Ch*, 2017, 32, 403–425.

Rajić Z, Zovko Končić M, Miloloža K, Perković I, Butula I, Bucar F, Zorc B. Primaquine-NSAID twin drugs: Synthesis, radical scavenging, antioxidant and Fe<sup>2+</sup> chelating activity. *Acta Pharmaceut*, 2010, 60, 325–337.

Shin JW, Kwon SH, Choi JY, Na J I, Huh CH, Choi HR, Park KC. Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. *Int J Mol Sci*, 2019, 20, 2126.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol*, 1999, 152–178.

Turkington R, Cavers PB. The biology of Canadian weeds. 33. *Medicago lupulina* L. *Can J Plant Sci*, 1979, 59, 99-110.

Wang SQ, Setlow R, Berwick M, Polsky D, Marghoob AA, Kopf AW, Bart RS. Ultraviolet A and melanoma: A review. *J Am Acad Dermatol*, 2001, 44, 837–846.

Zhang S, Duan E. Fighting against Skin Aging: The Way from Bench to Bedside. *Cell Transplant*, 2018, 27, 729-738.

Zillich OV, Schweiggert-Weisz U, Eisner P, Kersch M. Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *Int J Cosmetic Sci*, 2015, 37, 455–464.

## 6. SAŽETAK / SUMMARY

### 7.1. SAŽETAK

Starenje kože progresivan je proces kojeg je moguće usporiti primjenom kozmetičkih pripravaka. Biljni polifenolni ekstrakti pokazuju širok spektar bioloških učinaka na koži, dobru podnošljivost te ekološku prihvatljivost, što ih čini idealnim kandidatom za izradu „anti-aging“ kozmetike. Cilj ovog istraživanja bio je optimizirati ultrazvučnu ekstrakciju zeleni hmeljaste vije u polipropilenglikolu, ekološki prihvatljivom otapalu niske toksičnosti sa svojstvima humektansa. Također su provedena *in vitro* biološka ispitivanja s ciljem vrjednovanja terapijskog i kozmetičkog potencijala ekstrakata. Provođenje ekstrakcije te odabir ekstrakcijskih parametara prethodno su planirani koristeći Box-Behnkenov dizajn. Kao ekstrakcijski parametri odabrani su maseni udio PPG, temperatura te vrijeme ekstrakcije. Sadržaj kumestrola u ekstraktima kvantificiran je pomoću HPLC-a, dok je sadržaj ukupnih polifenola izmjeren spektrofotometrijski. Višestrukom regresijskom analizom dobivena je polinomna jednadžba koja opisuje utjecaj ekstrakcijskih parametara na sadržaj kumestrola te ukupnih polifenola. Rješavanjem jednadžbe dobiveni su optimalni ekstrakcijski uvjeti: 50 % PPG, 80 °C, 35 min za kumestrol te 10% PPG, 70 °C, 20 min za ukupne polifenole. Naposljetku su provedena četiri biološka testa:  $\beta$ -karoten linoleatna analiza, ispitivanje inhibicijskog djelovanja na lipoksigenazu, ispitivanje inhibicijskog djelovanja na elastazu te ispitivanje inhibicijskog djelovanja na tirozinazu. Rezultati testova upućuju na izraženo antioksidacijsko te blago protuupalno djelovanje ekstrakta, pokazujući time potencijal za dermatološku i kozmetičku primjenu.

## 7.2.SUMMARY

Skin aging is a progressive process which can be delayed by applying cosmetic products. Plant polyphenolic extracts show a wide range of biological effects on the skin, good tolerability and environmental acceptability, which makes them an ideal candidate for the preparation of anti-aging cosmetics. The aim of this study was to optimize ultrasound-assisted extraction of black medick aerial parts using polypropylene glycol, an environmentally friendly low-toxicity solvent with humectant properties. Furthermore, several *in vitro* biological tests have been performed in order to evaluate therapeutic and cosmetic potential of the extracts. The extraction and selection of extraction parameters were previously planned using Box-Behnken design. Mass fraction of PPG, temperature and time were selected as extraction parameters. Coumestrol content in extracts was quantified using HPLC, while the total polyphenolic content was measured spectrophotometrically. Multiple regression analysis yielded a polynomial equation describing the influence of extraction parameters on coumestrol and total polyphenol content. By solving the equation, optimal extraction conditions were obtained: 50% PPG, 80 °C, 35 min for coumestrol and 10% PPG, 70 °C, 20 min for total polyphenols. Finally, four biological tests were performed:  $\beta$ -carotene linoleate analysis, lipoxygenase inhibition assay, elastase inhibition assay and tyrosinase inhibition assay. The test results indicate a pronounced antioxidant and mild anti-inflammatory activity of the extract, thus showing the potential for dermatological and cosmetic use.



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

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Zavod za farmakognoziju  
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE I BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKATA ZELENİ HMELJASTE VIJE (*Medicago lupulina* L.) U POLIPROPILENGLIKOLU

Marko Kalvarešin

#### SAŽETAK

Starenje kože progresivan je proces kojeg je moguće usporiti primjenom kozmetičkih pripravaka. Biljni polifenolni ekstrakti pokazuju širok spektar bioloških učinaka na koži, dobru podnošljivost te ekološku prihvatljivost, što ih čini idealnim kandidatom za izradu „*anti-aging*“ kozmetike. Cilj ovog istraživanja bio je optimizirati ultrazvučnu ekstrakciju zeleni hmeljaste vije u polipropilenglikolu, ekološki prihvatljivom otapalu niske toksičnosti sa svojstvima humektansa. Također su provedena *in vitro* biološka ispitivanja s ciljem vrjednovanja terapijskog i kozmetičkog potencijala ekstrakata. Provođenje ekstrakcije te odabir ekstrakcijskih parametara prethodno su planirani koristeći Box-Behnkenov dizajn. Kao ekstrakcijski parametri odabrani su maseni udio PPG, temperatura te vrijeme ekstrakcije. Sadržaj kumestrola u ekstraktima kvantificiran je pomoću HPLC-a, dok je sadržaj ukupnih polifenola izmjeren spektrofotometrijski. Višestrukom regresijskom analizom dobivena je polinomna jednadžba koja opisuje utjecaj ekstrakcijskih parametara na sadržaj kumestrola te ukupnih polifenola. Rješavanjem jednadžbe dobiveni su optimalni ekstrakcijski uvjeti: 50 % PPG, 80 °C, 35 min za kumestrol te 10% PPG, 70 °C, 20 min za ukupne polifenole. Naposlijetku su provedena četiri biološka testa:  $\beta$ -karoten linoleatna analiza, ispitivanje inhibicijskog djelovanja na lipoksigenazu, ispitivanje inhibicijskog djelovanja na elastazu te ispitivanje inhibicijskog djelovanja na tirozinazu. Rezultati testova upućuju na izraženo antioksidacijsko te blago protuupalno djelovanje ekstrakta, pokazujući time potencijal za dermatološku i kozmetičku primjenu.

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

Rad sadrži: 38 stranica, 8 grafičkih prikaza, 8 tablica i 40 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: hmeljasta vija, kumestrol, polifenoli, lipoksigenaza, tirozinaza, elastaza, antioksidans

Mentor: **Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Maja Bival Štefan**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Jasna Jablan**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: studeni, 2020.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of Pharmacognosy  
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### OPTIMIZATION OF EXTRACTION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF BLACK MEDICK (*Medicago lupulina* L.) POLYPROPYLENE GLYCOL EXTRACTS

Marko Kalvarešin

#### SUMMARY

Skin aging is a progressive process which can be delayed by applying cosmetic products. Plant polyphenolic extracts show a wide range of biological effects on the skin, good tolerability and environmental acceptability, which makes them an ideal candidate for the preparation of anti-aging cosmetics. The aim of this study was to optimize ultrasound-assisted extraction of black medick aerial parts using polypropylene glycol, an environmentally friendly low-toxicity solvent with humectant properties. Furthermore, several *in vitro* biological tests have been performed in order to evaluate therapeutic and cosmetic potential of the extracts. The extraction and selection of extraction parameters were previously planned using Box-Behnken design. Mass fraction of PPG, temperature and time were selected as extraction parameters. Coumestrol content in extracts was quantified using HPLC, while the total polyphenolic content was measured spectrophotometrically. Multiple regression analysis yielded a polynomial equation describing the influence of extraction parameters on coumestrol and total polyphenol content. By solving the equation, optimal extraction conditions were obtained: 50% PPG, 80 °C, 35 min for coumestrol and 10% PPG, 70 °C, 20 min for total polyphenols. Finally, four biological tests were performed:  $\beta$ -carotene linoleate analysis, lipoxygenase inhibition assay, elastase inhibition assay and tyrosinase inhibition assay. The test results indicate a pronounced antioxidant and mild anti-inflammatory activity of the extract, thus showing the potential for dermatological and cosmetic use.

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

Thesis includes: 38 pages, 8 figures, 8 tables and 40 references. Original is in Croatian language.

Keywords: black medick, coumestrol, polyphenols, lipoxygenase, tyrosinase, elastase, antioxidant

Mentor: **Marijana Zovko Končić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Marijana Zovko Končić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Maja Bival Štefan, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Jasna Jablan, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: November, 2020.