

# Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije polifenola i biološki učinci ekstrakta zeleni hmeljaste vije (Medicago lupulina L.)

---

**Bukovina, Karla**

**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:163:441230>

*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](#)



**Karla Bukovina**

**Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije polifenola  
i biološki učinci ekstrakta zeleni hmeljaste vije  
(*Medicago lupulina* L.)**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmakognozija 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.

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. <i>Medicago lupulina</i> L.</b> .....	1
<b>1.2. OKSIDATIVNI STRES</b> .....	2
<b>1.3. POLIFENOLI</b> .....	4
<b>1.4. LIPOKSIKENAZA</b> .....	6
<b>1.5. TIROZINAZA</b> .....	7
<b>1.6. ELASTAZA</b> .....	8
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	9
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	10
<b>3.1. BILJNI MATERIJALI I KEMIKALIJE</b> .....	10
<b>3.2. UREĐAJI</b> .....	10
<b>3.3. BOX-BEHNKEN DESIGN</b> .....	10
<b>3.4. ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA</b> .....	11
<b>3.5. ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLA</b> .....	11
<b>3.6. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI INHIBICIJE LIPOKSIKENAZE</b> .....	11
<b>3.7. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI INHIBICIJE TIROZINAZE</b> .....	12
<b>3.8. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI INHIBICIJE ELASTAZE</b> .....	12
<b>3.9. β-KAROTEN LINOLEATNA ANALIZA</b> .....	13
<b>3.10. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA</b> .....	13
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	14
<b>4.1. KONCENTRACIJA UKUPNIH POLIFENOLA U EKSTRAKTIMA</b> .....	14
<b>4.2. EKSPERIMENTALN DIZAJN</b> .....	15
<b>4.3. OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE</b> .....	19
<b>4.4. BIOLOŠKI TESTOVI</b> .....	19
<b>4.4.1. Određivanje aktivnosti inhibicije lipoksigenaze</b> .....	19
<b>4.4.2. Određivanje aktivnosti inhibicije tirozinaze</b> .....	20

4.4.3. Određivanje aktivnosti inhibicije elastaze .....	21
4.4.4. $\beta$ -karoten linoleatna analiza .....	21
5. ZAKLJUČCI .....	23
6. LITERATURA .....	24
7. SAŽETAK/SUMMARY .....	27
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD .....	

# 1. UVOD

## 1.1. *Medicago lupulina* L.

Rod Fabaceae ili mahunarke treća je najveća porodica među kritosjemenjačama (Angiospermae) te obuhvaća više od 20 000 biljnih vrsta. *Medicago lupulina* L., Fabaceae (hmeljasta vija) je jednogodišnja ili višegodišnja zeljasta biljka koju se često može naći na poljima, livadama i tratinama diljem Europe, Azije i sjeverne Afrike. To je niska biljka visine do 60 cm sa jako razgranatom stabljikom te vretenastim korijenom koji se nalazi blizu površine zemlje. Na korijen su vezane bakterije roda *Rhizobium* koje vežu dušik te je zbog toga hmeljasta vija korisna u poljoprivredi jer povećava kvalitetu tla. Listovi se sastoje od tri lisice s dlakavim naličjem, od kojih je srednja obično duža od ostale dvije. Lisice su obrnuto jajastog oblika. Biljka ima žute cvjetove koji se pojavljuju početkom ljeta. Oni su sitni, skupljeni u okrugle cvatove koje se sastoje od 10 do 50 cvjetova. Plod je malena crna mahuna koja sadrži jednu izduženu glatku sjemenku (www.plantea.com; www.britannica.com/plant/Fabaceae).



Slika 1. Hmeljasta vija (preuzeto s pfaf.org).

Hmeljasta vija se smatra odličnom krmnom biljkom te je upravo iz tog razloga uvezena iz Europe u Sjevernu Ameriku. Njeno stanište je u nekim djelovima svijeta prošireno namjerno, a u nekim slučajno jer je tamo pristigla kao kontaminant u sjemenu drugih biljaka. U određenim djelovima svijeta, poput Filipina i Novog Zelanda, hmeljasta vija je stavljena na listu invazivnih vrsta (cabi.org).

Hmeljasta vija je bliski srodnik lucerne (*M. sativa* L.), iznimno ljekovite biljne vrste. Lucerna sadrži razne fitokemijske komponente koje imaju povoljan učinak na ljudsko tijelo, poput polifenola, saponina, alkaloida i fitoestrogena. Izvrstan je izvor raznih vitamina, a sadrži i razne enzime i neproteinsku aminokiselinu L-kanaverin. Ona ima antimikrobno, protuupalno, antikancerogeno i antioksidativno djelovanje. Zbog velikog udjela antioksidativnih komponenti prevenira srčane bolesti i odgađa proces starenja (Caunii i sur., 2012).

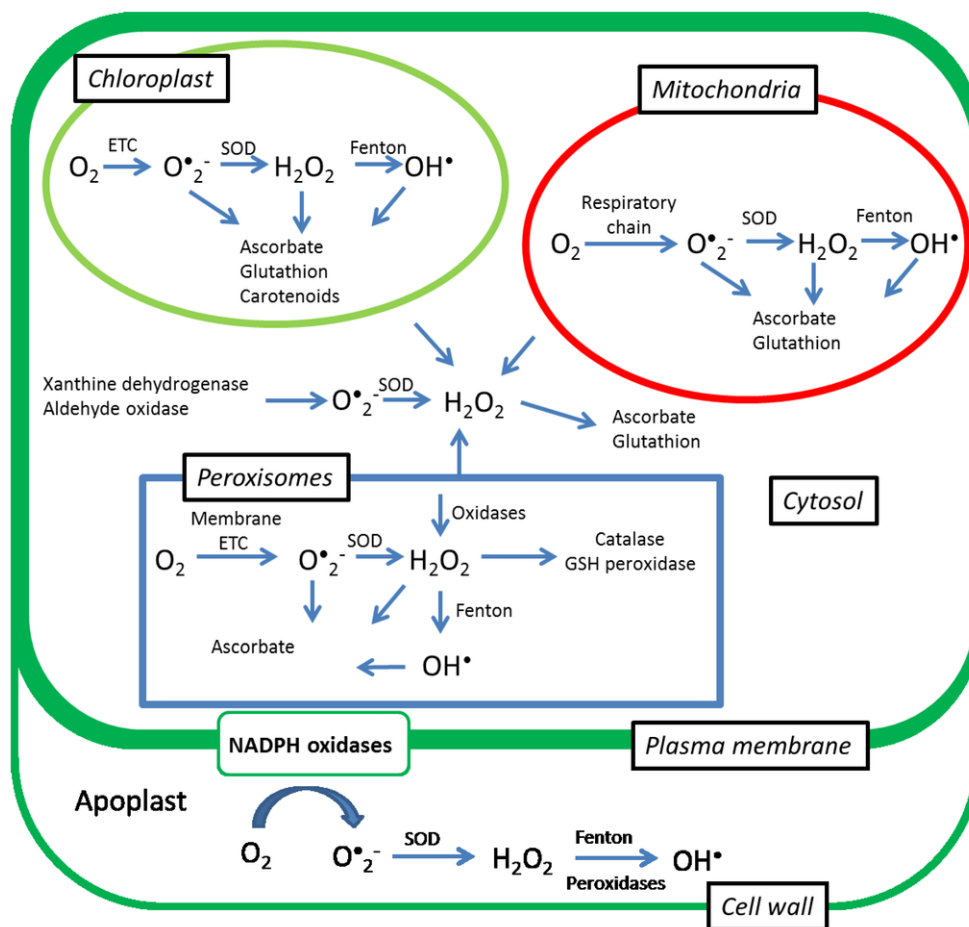
Istraživanja pokazuju da nadzemni dijelovi hmeljaste vije sadrže mnoge flavonoide, od kojih najviše luteolina i miricetina. Neki radovi su dokazali prisutnost saponina i fitoestrogena u nadzemnim djelovima biljke. Takav fitokemijski sastav zaslužan je za antioksidativnu aktivnost biljke, po kojoj je rod *Medicago* poznat (Butkute i sur., 2017; Kicel i Olszewska, 2014).

## 1.2. OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres se javlja zbog neravnoteže između nastanka i potrošnje reaktivnih kisikovih spojeva (engl. ROS – *reactive oxygen species*) u stanicama i tkivima. ROS imaju važnu fiziološku ulogu u staničnoj signalizaciji te su uključeni u mnoge bitne procese u ljudskom tijelu, poput transkripcije i proliferacije stanica, ali njihova prevelika akumulacija može dovesti do oštećenja stanica i tkiva što dovodi do patofizioloških procesa i stanja te pojave raznih bolesti poput dijabetesa, ateroskleroze, hipertenzije, neurodegenerativnih bolesti te raka. Razni egzogeni čimbenici, poput UV zračenja i teških metala, mogu doprinjeti produkciji ROS (Pizzino i sur., 2017).

Primjeri ROS su superoksid anion ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), hidroksilni radikal ( $\cdot\text{OH}$ ), vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), i drugi (Slika 2). Superoksidni radikal nastaje u mitohodriju tijekom staničnog disanja, djelovanjem lipoksigenaza (LOX) i cikloksigenaza (COX) u metabolizmu

arahidonske kiseline. Nakon što nastane, superoksidni radikal je uključen u razne reakcije u kojima nastaju vodikov peroksid, hidroksilni radikal i drugi ROS. U stanju oksidativnog stresa, slobodni radikali negativno utječu na stanične makromolekule poput lipida, proteina i molekule DNA. Na napad slobodnih radikala su posebice osjetljive polinezasićene masne kiseline koje se nalaze u membranama stanica pa se zato toksični učinak slobodnih radikala očituje oštećenjem membrana i inaktivacijom enzima. Od svih radikala, najreaktivniji je hidroksilni radikal. On u reakciji sa staničnim molekulama oduzima vodikov atom te dovodi do nastanka sekundarnih radikala (Bojić, 2016; Pizzino i sur., 2017).



Slika 2. Prikaz nastanka reaktivnih kisikovih vrsta u biljnoj stanici (preuzeto iz Jajic i sur., 2015).

U obrani organizma od štetnog djelovanja slobodnih radikala tijelo koristi antioksidanse. Antioksidansi su molekule koje mogu donirati elektron slobodnom radikal i na taj ga način neutralizirati. Tijelo proizvodi vlastite antioksidanse, poput glutationa, ali u stanjima

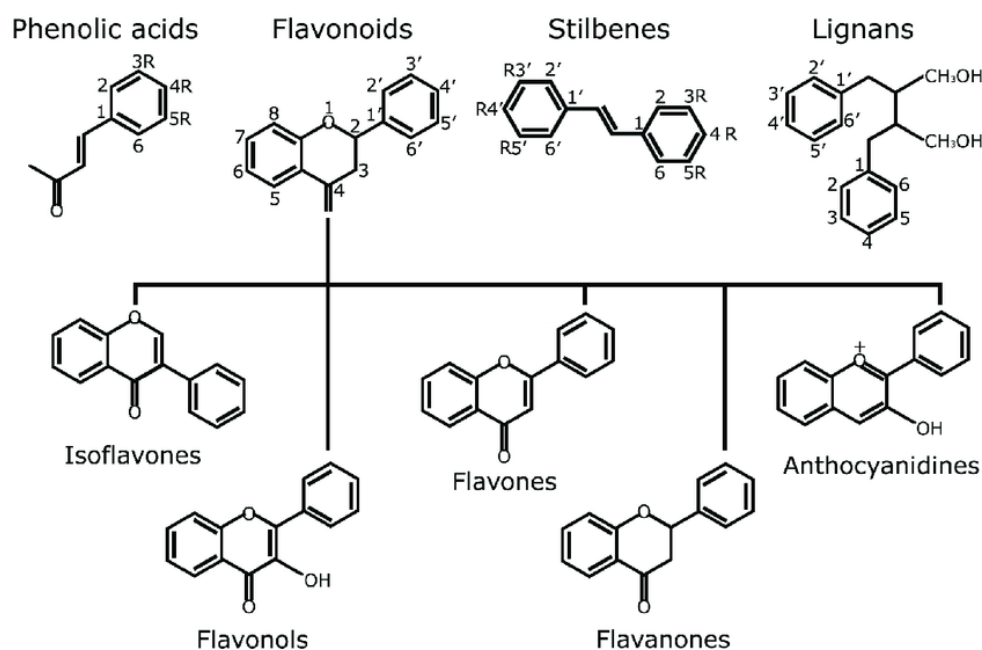


oksidativnog stresa prirodno proizvedeni antioksidansi nisu dovoljni za neutralizaciju velikog suviška slobodnih radikala. Zato je bitno prehranom unositi spojeve sa antioksidativnom aktivnošću. Primjeri mikronutrijenata za koje je odavno poznato da posjeduju antioksidativna svojstva su vitamin E, vitamin C i  $\beta$ -karoten kao prekursor vitamina A. Novija istraživanja pokazuju da polifenoli, koji su česta sastavnica voća i povrća, imaju antioksidativno djelovanje te su zbog toga oni čest subjekt znanstvenih istraživanja (Bojić, 2016; Lobo i sur., 2010; Li i sur., 2014).

### **1.3. POLIFENOLI**

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti čija je glavna uloga u biljnom organizmu zaštita od UV zračenja i mikroorganizama. Oni su često prisutni u biljkama, i to najviše u listovima, cvjetovima, plodovima i drvenastim dijelovima biljaka. Izraz „polifenoli“ podrazumijeva veliku skupinu spojeva sa različitom strukturom, ali ono što im je zajedničko je da svi sadrže više od jedne fenolne skupine koje mogu biti vezane na jedan ili više benzenskih prstena. Postoje četiri glavne kategorije polifenola: flavonoidi, stilbeni, lignani i fenolne kiseline (Slika 3). Flavonoidi su najveća i najznačajnija skupina polifenola koja se može naći u velikom broju voća i povrća te u zelenom čaju i crnom vinu. Oni se dalje dijele na flavone, flavonole, flavanone, flavanonole, izoflavone, antocijane, kalkone i katehine. Stilbeni se mogu naći u crnom vinu i kikirikiju, a najpoznatiji predstavnik je resveratrol. Lignani se nalaze u sjemenkama poput lanenih sjemenki ili žitarica, zatim u algama i određenom povrću. Fenolne kiseline se javljaju u kavi, čaju, cimetu, borovnicama i jabukama, a dijele se na dvije skupine, derivate hidroksibenzojeve kiseline i hidroksicimetne kiseline. (Ganesan i Xu, 2017).

## Polyphenols



Slika 3. Strukturna podjela polifenola (preuzeto iz Echeberria i sur., 2017).

U prirodi se polifenoli uglavnom nalaze u obliku glikozida, s jednim ili više šećera vezanih na hidroksilne skupine aglikona, odnosno nešećernog djela. Šećeri uglavnom dolaze u obliku monosaharida i disaharida, ali mogu biti i oligosaharidi. Najčešći šećer u strukturi glikozida je glukoza. Njihov biološki učinak ovisi o strukturi aglikona (nešećerni dio), ali i o šećerima koji su vezani na aglikon i mjestu vezanja tih šećera (Tsao, 2010).

Zbog svog antioksidativnog učinka, polifenoli su subjekt mnogobrojnih istraživanja jer je poznato da je oksidativni stres podloga mnogih kroničnih bolesti, uključujući dijabetes tipa II, kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativne bolesti i rak. Istraživanja pokazuju da konzumacija polifenola smanjuje koncentraciju oksidiranog LDL-a u plazmi. Oksidirani LDL zaslužan je za nastanak aterosklerotskih plakova koji se mogu dezintegrirati te tako uzrokovati akutnu trombozu ili infarkt (Parthasarathy i sur., 2012).

Polifenoli pokazuju i antikancerogenu aktivnost. Jedno istraživanje provedeno na stanicama raka dojke je pokazalo da proantocijani, skupina polifenola, značajno inhibiraju staničnu proliferaciju te induciraju apoptozu stanica raka. U drugom istraživanju dokazano je da galna kiselina sprječava karcinogenezu debelog crijeva inhibicijom oštećenja DNA. Drugim riječima, polifenoli pokazuju antikancerogena svojstva sa različitim mehanizmima

djelovanja (Ganesan i Xu, 2017; Li i sur., 2014). Osim toga, znanstvena istraživanja pokazuju da neki polifenoli pokazuju i protuupalni učinak smanjenjem produkcije proupalnih citokina i prostaglandina. Primjerice, hidrosiferulična kiselina inhibira više od 50% produkcije prostaglandina E-2, a postoje naznake i da smanjuju ekspresiju proupalnih citokina poput IL-1, IL-8 i TNF- $\alpha$  (Li i sur., 2014).

Prirodna uloga polifenola je zaštita biljaka od mikroorganizama. Zbog toga se može pretpostaviti da će polifenoli i u ljudskom organizmu pokazivati određene antimikrobne učinke. Istraživanja pokazuju da određeni polifenoli djeluju na različite Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije. Isto tako, polifenoli iz zelenog čaja djeluju na bakterijske spore tako da im smanjuju osjetljivost na toplinu. Razna istraživanja pokazuju da polifenoli djeluju sinergistički s antibioticima – smanjuju dozu antibiotika koju je potrebno primjeniti te na taj način smanjuju nuspojave antibiotika. Zbog antimikrobne aktivnosti koju pokazuju, predloženo je da se polifenoli koriste kao konzervansi u hrani kako bi se izbjeglo korištenje sintetskih konzervansa (Li i sur., 2014).

## **1.4. LIPOKSIKENAZA**

Lipoksigenaze (LOX) su enzimi koji kataliziraju reakcije oksidacije u kojima nastaju hidroperoksidi iz polinezasićenih masnih kiselina poput linolenske i arahidonske kiseline. One imaju mnoge fiziološke i patofiziološke funkcije pa tako sudjeluju u upali, dermatološkim poremećajima, aterosklerozi, tumorigenezi i astmi. Poznato je šest ljudskih izoformi lipoksigenaza. 5-LOX je ključni enzim u biosintezi leukotriena koji su jaki medijatori upale i alergijskih reakcija. Zbog opisanog patofiziološkog djelovanja lipoksigenaze mnoga su istraživanja usmjerena na otkrivanje sintetskih i prirodnih inhibitora. Primjer sintetskog inhibitora lipoksigenaze je zileuton, inhibitor 5-LOX koji se koristi u liječenju astme (Mashima i sur., 2015; Schneider i sur., 2005).

U ciklusu arahidonske kiseline sudjeluju dvije vrste enzima – lipoksigenaze i ciklooksigenaze (COX). Nesteroidni antiinflamatorni lijekovi (NSAIL) djeluju na COX te na taj način pokazuju protuupalni učinak. Nedavno je predloženo da je djelovanje inhibitora ciklooksigenaza ograničeno jer svejedno dolazi do reakcije pretvorbe arahidonske kiseline u leukotriene pomoću LOX. Zato se smatra da su lijekovi koji inhibiraju i ciklooksigenaze i

lipoksigenaze djelotvorniji od COX-inhibitora jer bi oni mogli imati sinergistički učinak i postići optimalni protuupalni učinak zaustavljanjem produkcije i leukotriena i prostaglandina (Chung i sur., 2008).

## 1.5. TIROZINAZA

Tirozinaza je enzim koji je široko rasprostranjen u mnogim organizmima i ima važnu ulogu u melanogenezi te enzimatskom tamnjenju voća, povrća i gljiva. S obzirom da su ti fenomeni nepoželjni, provedena su mnoga istraživanja kako bi se našli adekvatni inhibitori tirozinaze. Tirozinaza katalizira limitirajući korak u sintezi melanina, a to je pretvorba L-tirozina u L-DOPA-u u melanosomima. Melanin ima važnu ulogu u ljudskom tijelu – štiti ga od štetnog utjecaja UV zračenja. Ipak, prevelike količine melanina mogu imati negativan utjecaj na ljudsko tijelo pa je višak melanina povezan sa raznim dermatološkim poremećajima poput hiperpigmentacije, ali i sa patogenezom Parkinsonove i drugih neurodegenerativnih bolesti. Poremećaji koji nastaju zbog povećanih razina tirozinaze mogu se liječiti pomoću inhibitora tirozinaze. Inhibitori tirozinaze su našli primjenu i u kozmetičkoj industriji jer postoji sve veća potražnja za proizvodima za izbjeljivanje kože (Nokinsee i sur., 2015). Tirozinaze su izolirane iz mnogih izvora, različitih biljaka, životinja i mikroorganizama, no ona koja se pokazala kao najsličnija ljudskoj je tirozinaza izolirana iz gljive *Agaricus bisporus*. Ipak, najnovija istraživanja pokazuju da postoje značajne razlike između učinkovitosti inhibitora na ljudsku tirozinazu i tirozinazu izoliranu iz gljiva te se zbog toga traže alternativni modeli (Zolghardi i sur., 2019; Nokinsee i sur., 2015).

Postoje mnogi sintetski i prirodni inhibitori tirozinaze. Mnogi od njih djeluju inhibitorno na tirozinazu iz gljiva, ali malo ih je pokazalo svojstva inhibicije melanogeneze u staničnim modelima. Jedan od sintetskih inhibitora koji se prije često koristio za izbjeljivanje kože je 1,4-dihidrokinon, ali se pokazalo da on ima mutagena svojstva. Zbog takvih slučajeva se istraživanja sve više okreću prema prirodnim izvorima inhibitora tirozinaze poput raznih biljaka i mikroorganizama. Zanimljivo je da većina prirodnih spojeva koja pokazuje svojstva inhibicije tirozinaze spada u skupinu polifenola (Lee i sur., 2014).

## 1.6. ELASTAZA

Elastaza je enzim koji spada u porodicu proteaza. Osnovna funkcija elastaze je da razgrađuje elastin, ključni protein ekstracelularnog matriksa koji je nužan za mehanička svojstva mnogih tkiva poput arterija, pluća, ligamenata i kože. Određeni endogeni i egzogeni utjecaji uzrokuju povećanu produkciju elastaze u koži te zbog toga dolazi do neželjenog gubitka elasticiteta kože što uzrokuje nastanak simptoma poput bora i obješenosti kože koji su povezani sa starenjem. Dokazano je da izlaganje UV zrakama uzrokuje značajno povećanje aktivnosti elastaze. Izlaganje UV-A zrakama izaziva 90-120%-tno povećanje aktivnosti elastaze, a izlaganje UV-B zrakama 72%-tno povećanje aktivnosti (Labat-Robert i sur., 2000).

Zbog negativnog učinka pretjerane aktivnosti elastaze na stanje kože postoji zanimanje za pronalaskom kvalitetnih inhibitora elastaze. Istraživanja pokazuju da određeni biljni ekstrakti koji pokazuju sposobnost inhibicije elastaze mogu spriječiti nastanak bora induciran kroničnim izlaganjem UV-B zračenju (Labat-Robert i sur., 2000; Tsuji i sur., 2001).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

U ljudskom tijelu neprestano se odvijaju razni fiziološki i patofiziološki procesi vezani uz starenje i upalu. U tim procesima sudjeluju razni enzimi i medijatori poput slobodnih kisikovih radikala. Zbog odvijanja tih procesa dolazi do raznih pojava u ljudskom tijelu, poput starenja kože, tumorigeneze te pojave bolesti. Starenje kože događa se zbog gubitka elasticiteta kože što je uzrokovano endogenim i egzogenim čimbenicima. Monogobrojna istraživanja pokazuju da je glavni egzogeni čimbenik starenja kože UV zračenje koje uzrokuje nastanak kisikovih radikala te može dovesti do aktivacije enzima povezanih sa starenjem kože, poput tirozinaze i elastaze.

Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka koji štite njihov organizam od UV zračenja i mikroorganizama. Upravo zbog te prirodne uloge polifenola njima se pridaje sve veća pozornost u istraživanjima novih sastavnica prirodne kozmetike.

Cilj ovog rada bio je odrediti optimalne uvjete za ultrazvučnu ekstrakciju polifenola iz zeleni hmeljaste vije u biokompatibilnom otapalu glicerolu te odrediti antioksidativni učinak priređenog ekstrakta kao i njihov utjecaj na aktivnosti inhibicije tirozinaze, lipoksigenaze i elastaze. Time se htjelo utvrditi posjeduje li ekstrakt biološke učinke koji bi bili korisni za izradu različitih kozmetičkih pripravaka protiv starenja kože.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. BILJNI MATERIJALI I KEMIKALIJE

Za ispitivanja je korištena osušena zelen hmeljaste vije (*Medicago lupulina* L., Fabaceae). Korištene su sljedeće kemikalije: butilirani hidroksianisol (BHA), elastaza, fosfatni pufer, glicerol, kojična kiselina, lipoksigenaza, natrijev linoleat, nordihidrogvajaretinska kiselina (NDGA), N-sukcinil-(Ala)<sub>3</sub>-nitroanilid (SANA), tirozinaza, Tris-HCl pufer, Tween 40, kloroform te ursolna kiselina (Sigma Aldrich, US).

#### 3.2. UREĐAJI

U ispitivanjima su korišteni sljedeći uređaji: mlin za usitnjavanje biljnog materijala, precizna vaga (Mettler Toledo, Švicarska), ultrazvučna kupelj (Sonorex digital, Bandelin electronic, Njemačka), rotavapor (Buchi, Njemačka) i UV/Vis spektrofotometar (BMG Labtech, Njemačka).

#### 3.3. BOX-BEHNKEN DESIGN

Neovisne ekstrakcijske varijable bile su maseni udio glicerola u ekstrakcijskom otapalu, ( $X_1$ ), temperatura ( $X_2$ ) i vrijeme ( $X_3$ ) te su bili varirani na način opisan u Tablici 1. Uvjeti za postizanje najveće količine polifenola u ekstraktu određeni su pomoću kvadratnog modela.

Tablica 1. Neovisne varijable i njihove vrijednosti u Box-Behnken-ovom dizajnu.

		Razine		
Neovisne varijable	Kod	-1	0	1
Udio glicerola (% , m/m)	$X_1$	10	50	90
Temperatura (°C)	$X_2$	20	50	80
Vrijeme (minute)	$X_3$	20	40	60

### **3.4. ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA**

Usitnjeni biljni materijal u količini od 0,1 g suspendiran je u 10 g odgovarajućeg otapala u Erlenmeyerovoj tikvici volumena 50 mL. Ekstrakcije su bile provedene u ultrazvučnoj kupelji pri 360 W te prikladnoj temperaturi i odgovarajućem vremenu (Tablica 2) u skladu s Box- Behnken dizajnom (Tablica 1).

### **3.5. ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLA**

Ukupni polifenoli su kvantificirani korištenjem UV/Vis uređaja. Određeni su prema modificiranoj Folin-Ciocalteu kolorimetrijskoj metodi (Singleton i sur., 1999). 80  $\mu$ L ekstrakta pomiješano je s 80  $\mu$ L Folin-Ciocalteu reagensa (smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline) prethodno razrijeđenog vodom u omjeru 1:3 te s 80  $\mu$ L 10% otopine natrij-karbonata. Smjesa je inkubirana u tamnoj komori na sobnoj temperaturi tijekom sat vremena. Po završetku inkubacije, izmjerena je apsorbancija na 700 nm. Ukupni sadržaj polifenola određen je preko baždarnog pravca galne kiseline. Rezultat je izražen kao ekvivalent galne kiseline u mg/mL ekstrakta.

### **3.6. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI INHIBICIJE LIPOKSIGENAZE**

Aktivnost inhibicije lipoksigenaze (LOX) određena je spektrofotometrijski. U 200  $\mu$ L otopine ekstrakta ili nordihidrogvajaretinske kiseline (NDGA) u fosfatnom puferu (pH 8, 100mM) dodano je 30  $\mu$ L otopine lipoksigenaze u puferu (0,03 mg/mL). Reakcija je inicirana dodatkom 60  $\mu$ L otopine natrijevog linoleata. Negativna kontrola bila je smjesa pufera, natrijevog linoleata i enzima. Smjesa je držana 10 minuta na temperaturi od 25 °C te je potom izmjerena apsorbancija na 234 nm. Aktivnost inhibicije lipoksigenaze izračunata je prema jednadžbi:



$$\text{Aktivnost inhibicije lipoksigenaze (\%)} = (A_{\text{neg}} - A_{\text{eks}}) / A_{\text{neg}} \times 100,$$

pri čemu je  $A_{\text{neg}}$  apsorbancija negativne kontrole, a  $A_{\text{eks}}$  apsorbancija otopine ekstrakta. Rezultati su izraženi kao  $IC_{50}$ , odnosno koncentracija ekstrakta koja inhibira 50% aktivnosti lipoksigenaze.

### **3.7. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI INHIBICIJE TIROZINAZE**

Ispitivanje je provedeno prema modificiranom literaturnom propisu (Biswajit i sur., 2017). U 240  $\mu\text{L}$  otopine ekstrakta ili kojične kiseline u fosfatnom puferu (pH 6,8, 16 mM) i dodano je 40  $\mu\text{L}$  tirozinaze otopljene u puferu te je mikrotitarska pločica stavljena u tamnu komoru na inkubaciju pri sobnoj temperaturi. Nakon 10 minuta dodano je još 40  $\mu\text{L}$  otopine supstrata L-DOPA-e (0,52 mg/mL). Negativna kontrola bila je smjesa pufera, otopine tirozinaze i L-DOPA-e. Izmjerena je apsorbancija na 492 nm nakon inkubacije od 10 min za ekstrakt, odnosno 17 minuta za pozitivnu kontrolu. Aktivnost inhibicije tirozinaze izračunata je prema jednadžbi:

$$\text{Aktivnost inhibicije tirozinaze (\%)} = (A_{\text{neg}} - A_{\text{eks}}) / A_{\text{neg}} \times 100,$$

pri čemu je  $A_{\text{neg}}$  apsorbancija negativne kontrole, a  $A_{\text{eks}}$  apsorbancija otopine ekstrakta. Rezultati su izraženi kao  $IC_{50}$ , odnosno koncentracija ekstrakta koja inhibira 50% aktivnosti tirozinaze.

### **3.8. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI INHIBICIJE ELASTAZE**

U 200  $\mu\text{L}$  otopine ekstrakta ili ursolne kiseline (0.6 mg/mL) u Tris-Hcl puferu (pH 8, 0,1 M) dodano je 100  $\mu\text{L}$  otopine N-sukcinil-(Ala)<sub>3</sub>-nitroanilida – SANA. Mikrotitarska pločica ostavljena je 10 minuta na sobnoj temperaturi te je nakon tog vremena dodano 25  $\mu\text{L}$  otopine elastaze u puferu. Smjesa je inkubirana još 10 minuta pri sobnoj temperaturi te je izmjerena apsorbancija na 410 nm. Aktivnost inhibicije elastaze izračunata je prema formuli:

$$\text{Aktivnost inhibicije elastaze (\%)} = (A_{\text{neg}} - A_{\text{eks}}) / A_{\text{neg}} \times 100,$$

pri čemu je  $A_{\text{neg}}$  apsorbancija negativne kontrole, a  $A_{\text{eks}}$  apsorbancija otopine ekstrakta. Rezultati su izraženi kao  $IC_{50}$ , odnosno koncentracija ekstrakta koja inhibira 50% aktivnosti elastaze.

### 3.9. $\beta$ -KAROTEN LINOLEATNA ANALIZA

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti (ANA) provedeno je prema modificiranom literaturnom propisu po Amarowiczu i sur. Antioksidativna aktivnost uzorka određena je spektrofotometrijski uz pomoć mikrotitarske pločice. U 50  $\mu\text{L}$  otopine ekstrakta ili BHA dodano je 200  $\mu\text{L}$  emulzije  $\beta$ -karotena i Tween 40. Odmah je izmjerena apsorbancija na 415 nm ( $t = 0$ ). Smjesa je inkubirana na 45  $^{\circ}\text{C}$ , a apsorbancija je ponovno mjerena nakon 119 minuta ( $t = 119$ ). Antioksidativna aktivnost izračunata je prema formuli:

$$\text{ANA(\%)} = \left( 1 - \frac{(A_{\text{poč}} - A_{\text{kon}})_{\text{uzorak}}}{(A_{\text{poč}} - A_{\text{kon}})_{\text{negativna kontrola}}} \right) \times 100,$$

pri čemu je  $A_{\text{poč}}$  apsorbancija u  $t = 0$ , a  $A_{\text{kon}}$  apsorbancija u  $t = 119$ . Kao negativna kontrola je korišten metanol. Rezultati su izraženi kao  $IC_{50}$ , odnosno koncentracija ekstrakta koja ima 50% antioksidativne aktivnosti.

### 3.10. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

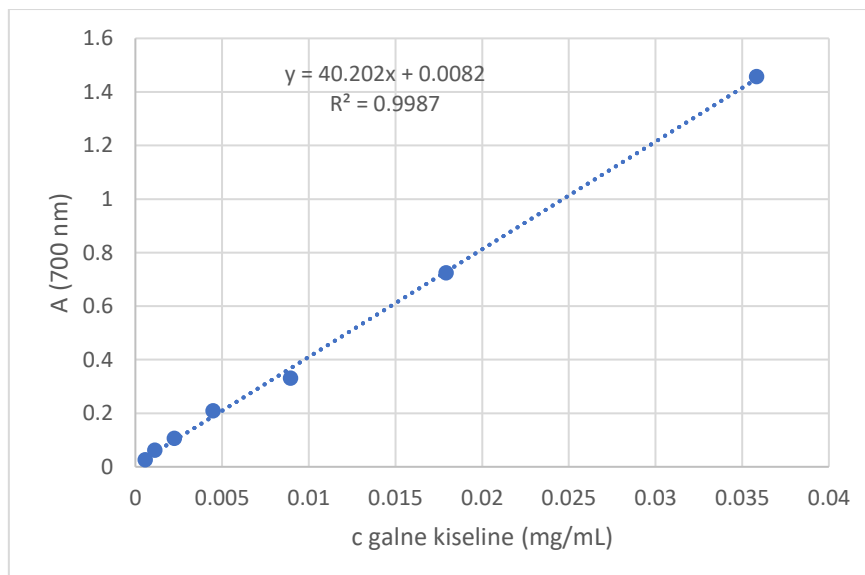
Sva ispitivanja provedena su u triplikatu. Dobiveni podaci su obrađeni u programu Microsoft Excel (Microsoft, USA). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). Za design eksperimenata korišten je software Design Expert v. 8.0.7.1. (Stat Ease, USA)

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. KONCENTRACIJA UKUPNIH POLIFENOLA U EKSTRAKTIMA

Za učinkovitu ekstrakciju ukupnih polifenola iz osušene zeleni hmeljaste vije korištena je ultrazvučna ekstrakcija. Koncentracija ukupnih polifenola u dobivenim ekstraktima određivana je spektrofotometrijski uz pomoć Folin-Ciocalteu reagensa. Reagens se sastoji od fosfovolframske i fosfomolibdenske kiseline koje su žute boje, a u reakciji s fenolima se reduciraju u plavo obojene spojeve. Nedostatak metode je da reagens tvori plave okside i u reakciji sa drugim reducirajućim spojevima koji zbog toga pridonose ukupnoj određenoj koncentraciji polifenola, no, s obzirom na jednostavnost primjene te metode, ona se i dalje često koristi (Singleton, 1999).

Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima određen je na temelju vrijednosti apsorbancija koristeći baždarni pravac galne kiseline (Slika 4).



Slika 4. Baždarni pravac galne kiseline.

S obzirom da su se dobiveni ekstrakti koristili za daljnje biološke testove, korišten je glicerol kao otapalo koje je biokompatibilno i često se koristi u kozmetici. Da bi se dobio što bolji uvid u uspješnost ekstrakcije, nezavisne varijable su imale širok raspon. Tablica 2 prikazuje zavisne i nezavisne eksperimentalne varijable 17 ekstrakata priređenih prema Box-Behnken dizajnu (Tablica 1). Koncentracija ukupnih polifenola značajno je varirala ovisno o ekstrakcijskim uvjetima od 0,036 mg/mL (Run 13) do 0,114 mg/mL (Run 4).

Tablica 2. Prikaz korištenog Box-Behnken dizajna eksperimenta i pripadajuće količine polifenola u ekstraktima.

Run	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	TP (mg/mL)
1	90	80	40	0,105
2	50	20	60	0,088
3	50	80	60	0,098
4	50	80	20	0,114
5	10	20	40	0,095
6	10	50	60	0,084
7	50	50	40	0,106
8	90	50	60	0,067
9	50	50	40	0,098
10	10	50	20	0,079
11	50	50	40	0,098
12	50	20	20	0,084
13	90	20	40	0,036
14	10	80	40	0,08
15	50	50	40	0,099
16	90	50	20	0,07
17	50	50	40	0,087

X<sub>1</sub> =koncentracija glicerola (% , m/m), X<sub>2</sub>= temperatura (°C) i X<sub>3</sub>= vrijeme (min); TP – ukupni polifenoli.

## 4.2. EKSPERIMENTALNI DIZAJN

Ekperiment je izveden prema Box-Behnkenovom dizajnu temeljenom na metodi odzivne površine (eng. Response Surface Methodology, RSM). RSM je skup statističkih i matematičkih modela kojima se analiziraju utjecaji nekoliko nezavisnih varijabli na promatrani odziv, u ovom slučaju utjecaji odabranih parametara masenog udjela glicerola u vodi (X<sub>1</sub>), temperature (X<sub>2</sub>) i vremena ekstrakcije (X<sub>3</sub>) na koncentraciju ukupnih polifenola.

Cilj korištenja Box-Behnken dizajna bio je određivanje najvažnijih ekstrakcijskih varijabli te optimalnih uvjeta ekstrakcije za ekstrakciju ukupnih polifenola.

Utvrđeno je da se odnos između zavisnih i nezavisnih varijabli najbolje može izraziti kvadratnom polinomnom jednadžbom. Dobivena jednadžba prikazuje utjecaj nezavisnih varijabli i njihovih međusobnih interakcija na koncentraciju ukupnih polifenola u ekstraktu. Značajni faktori označeni su zvjezdicom:

$$\text{TP (mg/mL)} = -0,0198 \times X_1^2(*) + 0,0012 \times X_2^2 - 0,0028 \times X_3^2 - 0,0075 \times X_1(*) \\ + 0,01175 \times X_2(*) - 0,0013 \times X_3 + 0,021 \times X_1 \times X_2(*) - 0,002 \times X_1 \times X_3 - 0,005 \times X_2 \times X_3 + 0,0976$$

Rezultati pokazuju da sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima najviše ovisi o linearnom i kvadratnom faktoru koncentracije glicerola i o linearnom faktoru temperature te o faktoru koji predstavlja njihovu međusobnu interakciju.

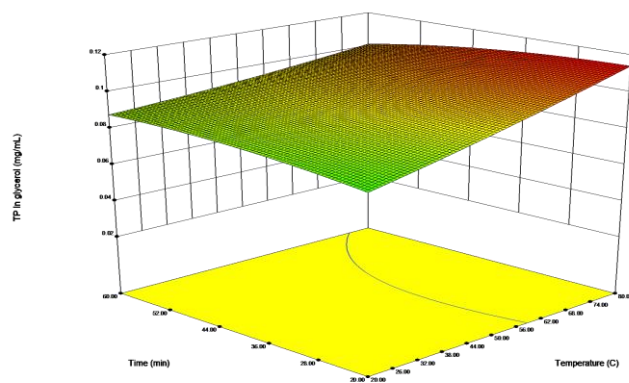
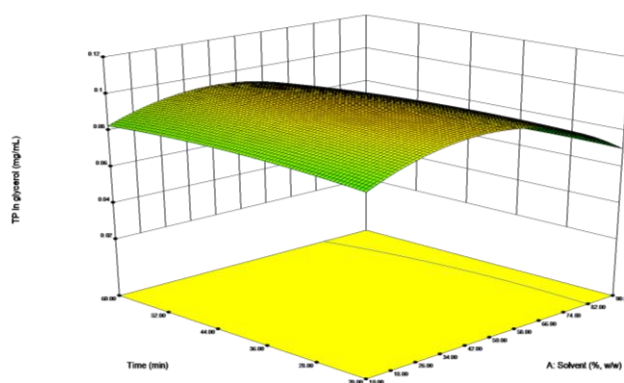
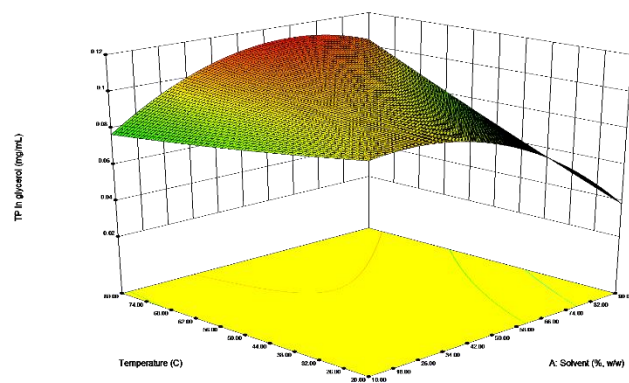
Analiza varijance (Tablica 3) pokazuje *F*-vrijednost koja je iznosila 28,1 i *P*-vrijednost nižu od 0,0001 što dokazuje da je model visoko signifikantan. Vrijednost prikladnosti podudaranja (“lack of fit”) iznosila je 0,41 što ukazuje da nije bila značajna u odnosu na čistu pogrešku. Koeficijent determinacije je bio visok ( $r^2 > 0,97$ ) što nam pokazuje da je model reprezentativan.

Tablica 3. Analiza varijance (ANOVA) za kvadratni model optimizacije ekstrakcijskih parametara.

Izvor	SS	df	MS	<i>F</i> -vrijednost	<i>P</i> -vrijednost
Model	0,00516	9	0,00057	16,570	0,0006
Prikladnost podudaranja	0,000057	3	0,000019	0,410	0,7549
Čista pogreška	0,00019	4	0,0000463		

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

Grafički prikaz površine odgovora odličan je za promatranje učinaka nezavisnih varijabli na odabrani odgovor. U njemu prikazujemo utjecaj dvije nezavisne varijable na zavisnu (koncentracija ukupnih polifenola), dok se treća varijabla drži fiksnom. Stoga su nam za prikaz utjecaja svih nezavisnih varijabli na koncentraciju ukupnih polifenola potrebna ukupno tri grafička prikaza. Tako ćemo na jednostavan način prikazati utjecaj i međusobne interakcije nezavisnih varijabli na zavisnu. Slika 4 prikazuje površine odgovora koje prikazuju utjecaj ispitivanih parametara na koncentraciju ukupnih polifenola u ekstraktu.



Slika 5. Površine odgovora za koncentraciju ukupnih polifenola (a-c) prilikom ekstrakcije zeleni hmeljaste vije a) utjecaj temperature i koncentracije glicerola tijekom 40 min ekstrakcije; b) utjecaj vremena ekstrakcije i koncentracije glicerola uz temperaturu od 50 °C; c) utjecaj vremena i temperature ekstrakcije uz koncentraciju glicerola 50%.

Kao što je prikazano na Slici 5, kombinacija visoke temperature i srednje koncentracije glicerola najbolje su pogodovale ekstrakciji polifenolnih spojeva. Slika isto tako pokazuje da vrijeme ekstrakcije ima zanemarivu ulogu naspram ostala dva faktora, koncentracije glicerola i temperature ekstrakcije.

### **4.3. OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE**

Cilj rada bio je dobiti glicerolni ekstrakt hmeljaste vije s najvećom koncentracijom ukupnih polifenola kako bi se taj ekstrakt mogao iskoristiti za daljnje biološke testove. Nezavisne varijable imale su veliki raspon pa su tako provedeni eksperimenti sa koncentracijom glicerola od 10% do 90%, temperaturom od 20 °C do 80 °C te vremenom ekstrakcije od 20 min do 60 min. Eksperimentalni rezultati i analiza pokazuju da su najbolji ekstrakcijski uvjeti za ekstrakciju polifenola bili pri koncentraciji glicerola od 60%, temperaturi od 80 °C te vremenu ekstrakcije od 20 minuta. Priređeni ekstrakt korišten je u analizi biološke aktivnosti.

### **4.4. BIOLOŠKI TESTOVI**

#### **4.4.1. Određivanje aktivnosti inhibicije lipoksigenaze**

Lipoksigenaza je enzim koji katalizira reakciju dioksigenacije supstrata linolenske kiseline pri čemu nastaju konjugirane hidroperoksi dien masne kiseline. Pri određivanju aktivnosti inhibicije lipoksigenaze, reakcijskoj smjesi s ekstraktom i enzimom dodaje se linolenska kiselina kao supstrat za enzim te se mjeri apsorbancija nakon 10 minuta inkubacije pri sobnoj temperaturi. Inhibitornim djelovanjem ekstrakta na lipoksigenazu sprječava se reakcija između enzima i supstrata što se očituje povećanjem apsorbancije (Chung, 2009).

Rezultati određivanja aktivnosti inhibicije lipoksigenaze prikazani su kao  $IC_{50}$ , odnosno koncentracija ekstrakta koja inhibira 50% aktivnosti lipoksigenaze. Vrijednost  $IC_{50}$  je obrnuto proporcionalna sa sposobnošću inhibicije ekstrakta, odnosno, što je  $IC_{50}$  manja, to je sposobnost inhibicije veća. Kao pozitivna kontrola korištena je NDGA koja ima veliku sposobnost inhibicije enzima lipoksigenaze.



Uzorak pokazuje određenu aktivnost inhibicije lipoksigenaze, ali je ona čak deset puta manja od sposobnosti inhibicije lipoksigenaze koju pokazuje NDGA (Tablica 4).

Tablica 4. Rezultati mjerenja aktivnosti inhibicije lipoksigenaze.

	IC <sub>50</sub> (μL/mL)	SD	SD (%)
Ekstrakt	133,46	18,14	13,59
NDGA	13,106	0,899	6,86

IC<sub>50</sub> – koncentracija koja inhibira 50% aktivnosti LOX; SD – standardna devijacija

#### 4.4.2. Određivanje aktivnosti inhibicije tirozinaze

Tirozinaza je enzim koji katalizira reakciju oksidacije supstrata L-DOPA-e u dopakinon što se očituje pojavom smeđeg obojenja. Kod određivanja aktivnosti inhibicije tirozinaze, reakcijska smjesa s ekstraktom i enzimom tirozinazom stavlja se na inkubaciju tijekom koje dolazi do inhibicije tirozinaze, a zatim se u smjesu dodaje L-DOPA. Inhibicijom tirozinaze ne dolazi do reakcije tirozinaze i L-DOPA-e te ne nastaje smeđe obojenje, što se očituje smanjenjem apsorbancije (Biswajit i sur., 2017). Rezultati određivanja prikazani su kao IC<sub>50</sub>, odnosno koncentracija ekstrakta koja inhibira 50% aktivnosti tirozinaze. Kao pozitivna kontrola korištena je kojična kiselina koja ima veliku sposobnost inhibicije enzima tirozinaze.

Uzorak pokazuje određenu aktivnost inhibicije tirozinaze, ali je u usporedbi sa pozitivnom kontrolom ta aktivnost značajno manja (Tablica 5). Prema literaturi, za smanjivanje aktivnosti tirozinaze najvjerojatnije su odgovorni polifenoli koji se mogu ponašati kao pravi inhibitori tirozinaze ili mogu biti zamjenski supstrati za tirozinazu (Solimine, 2016).

Tablica 5. Rezultati mjerenja aktivnosti inhibicije tirozinaze.

	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	SD	SD (%)
Ekstrakt	225,13	14,48	6,43
Kojična kiselina	4,43	0,39	8,8

IC<sub>50</sub> – koncentracija koja inhibira 50% aktivnosti tirozinaze; SD – standardna devijacija

Rezultati za kojičnu kiselinu dobiveni su nakon 17 minuta inkubacije reakcijske smjese, a rezultati za uzorak nakon 10 minuta inkubacije, što utječe na dobivene rezultate i njihovu usporedbu. Ipak, unatoč tomu možemo zaključiti da je ispitivani ekstrakt značajno slabiji inhibitor od pozitivne kontrole.

#### 4.4.3. Određivanje aktivnosti inhibicije elastaze

U reakciji hidrolize kataliziranoj enzimom elastazom iz supstrata SANA-e nastaje žuto obojeni spoj *p*-nitroanilin. Dodatkom inhibitora elastaze u reakcijsku smjesu nastaje manje produkta te dolazi do smanjenja obojenja, odnosno smanjenja apsorbancije (Wittenauer, 2015).

Rezultati određivanja prikazani su kao IC<sub>50</sub>, odnosno koncentracija ekstrakta koja inhibira 50% aktivnosti enzima elastaze. Kao pozitivna kontrola korištena je ursolna kiselina otopljena u puferu i dimetil sulfoksidu (DMSO).

Uzorak pokazuje određenu aktivnost inhibicije elastaze, no ta aktivnost je značajno manja od one koju pokazuje pozitivna kontrola (Tablica 6). Prema literaturi, polifenolni spojevi su zaslužni za kompetitivnu inhibiciju enzima elastaze (Wittenauer, 2015).

Tablica 6. Rezultati mjerenja aktivnosti inhibicije elastaze.

	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	SD	SD(%)
Ekstrakt	524,38	122,09	23,28
Ursolna kiselina	33,61	2,64	7,85

IC<sub>50</sub> – koncentracija koja inhibira 50% aktivnosti elastaze; SD – standardna devijacija

#### 4.4.4. β-karoten linoleatna analiza

β-karoten linoleatna analiza je jedan od najbržih načina za određivanje antioksidativne aktivnosti. Oksidacijom linolenske kiseline reaktivnim kisikovim vrstama nastalim u vodi bogatoj kisikom nastaju slobodni lipidni radikali koji uzrokuju oksidaciju β-karotena te dolazi do gubitka specifične narančaste boje. Spojevi sa antioksidativnom aktivnošću, poput fenola, mogu neutralizirati nastale linoleatne radikale i na taj način odgoditi obezbojenje emulzije. To znači da se antioksidativna aktivnost očituje povećanjem apsorbancije u odnosu na kontrolu (Amarowicz, 2004).

Rezultati određivanja prikazani su kao  $IC_{50}$ , odnosno koncentracija ekstrakta koja ima 50% antioksidativne aktivnosti. Kao pozitivna kontrola korišten je BHA otopljen u metanolu.

Uzorak pokazuje antioksidativnu aktivnost, koja je skoro dvostruko jača od pozitivne kontrole (Tablica 7). Prema literaturi, polifenolni spojevi su odgovorni za to što ekstrakt pokazuje antioksidativnu aktivnost jer doniraju svoj atom vodika te na taj način neutraliziraju nastale lipidne radikale (Pandey, 2009).

Tablica 7. Rezultati mjerenja antioksidativne aktivnosti.

	$IC_{50}$	SD	SD (%)
Ekstrakt	168,79	3,16	1,87
Pozitivna kontrola (BHA)	310,02	4,97	1,6

$IC_{50}$  – koncentracija koja ima 50% antioksidativne aktivnosti; SD – standardna devijacija

## 5. ZAKLJUČCI

Cilj ovog rada bio je optimizirati ekstrakciju za izolaciju polifenola iz osušene zeleni hmeljaste vije korištenjem Box-Behnkenovog dizajna. Određeni su optimalni uvjeti ekstrakcije koji uključuju optimalnu koncentraciju glicerola, temperaturu i vrijeme ekstrakcije. Rezultati su pokazali da su koncentracija glicerola i temperatura bitne varijable za optimalnu ekstrakciju ukupnih polifenola, dok se vrijeme nije pokazalo kao bitan faktor. Optimizirani ekstrakt zatim se koristio u četiri različita biološka ispitivanja. U testovima inhibicije tirozinaze, lipoksigenaze i elastaze ekstrakt je pokazao određenu aktivnost, ali je ona bila značajno manja od inhibitorne aktivnosti pozitivnih kontrola. Kod  $\beta$ -karoten linoleatne analize, ekstrakt je pokazao veću aktivnost od pozitivne kontrole, što znači da ekstrakt ima dobra antioksidativna svojstva. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je ekstrakt zeleni hmeljaste vije ima određeni potencijal kao aktivna sastavnica kozmetičkih proizvoda protiv starenja kože.

## 6. 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.

Biswajit B, Hiranjit C, Pramod T, Suman K. Studies on secondary metabolite profiling, anti inflammatory potential, in vitro photoprotective and skin-aging related enzyme inhibitory activities of *Malaxis accuminata*, a threatened orchid of nutraceutical importance. *J Photochem Photobiol B*, 2017, 173, 686-695.

Black medic, <https://www.nazinvasiveplants.org/black-medic>, pristupljeno 23.06.2020.

Bojić M. Peroksidaze i molibden oksidaza. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2016.

Butkute B, Benetis R, Padarauskas A, Cesevičiene J, Daglyte A, Taujenis L, Rodovičius H, Lemežiene N. Young herbaceous legumes – a natural reserve of bioactive compounds and antioxidants for healthy food and supplements. *J Appl Bot Food Qual*, 2017, 90, 346 – 353.

Caunii A, Pribac G, Grozea I, Gaitin D, Samfira I. Design of optimal solvent for extraction of bio-active ingredients from six varieties of *Medicago sativa*. *Chem Cent J*, 2012, 6, 123.

Chung LY, Soo WK, Chan KY, Mustafa MR, Goh SH, Imiyabir Z. Lipoxygenase inhibiting activity of some Malaysian plants. *Pharm Biol*, 2009, 47, 1142-1148.

Fabaceae, 2019., <https://www.britannica.com/plant/Fabaceae>, pristupljeno 23.06.2020.

Ganesan K, Xu B. A Critical Review on Polyphenols and Health Benefits of Black Soybeans. *Nutrients*, 2017, 9, 455.

Hmeljasta vija, <https://www.plantea.com.hr/hmeljasta-vija/>, pristupljeno 23.06.2020.

Kicel A, Olszewska MA. 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.

- Labat-Robert J, Fourtanier A, Boyer-Lafargue B, Robert L. Age dependent increase of elastase type protease activity in mouse skin. Effect of UV-irradiation. *J Photochem Photobiol B*, 2000, 57, 113-118.
- Lee SY, Baek N, Nam TG. Natural, semisynthetic and synthetic tyrosinase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2016, 31, 1-13.
- Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li HB. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 2014, 6, 6020-6047.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, 2010, 4, 118-126.
- Mashima R, Okuyama T. The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives. *Redox Biol*, 2015, 6, 297-310.
- Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2009, 2, 270-278.
- Parthasarathy S, Raghavamenon A, Garelnabi MO, Santanam N. Oxidized low-density lipoprotein. *Methods Mol Biol*, 2010, 610, 403-417.
- Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017, 8416763.
- Singelton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol*, 1999, 299, 152-178.
- Solimine J, Garo E, Wedler J, et al. Tyrosinase inhibitory constituents from a polyphenol enriched fraction of rose oil distillation wastewater. *Fitoterapia*, 2016, 108, 13-19.
- Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2010, 2, 1231-1246.
- Tsuji N, Moriwaki S, Suzuki Y, Takema Y, Imokawa G. The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity. *Photochem Photobiol*, 2001, 74, 283-290.
- Wittenauer J, Mäcke S, Sußmann D, Schweiggert-Weisz U, Carle R. Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. *Fitoterapia*, 2015, 101, 179-187.

Zolghadri S, Bahrami A, Hassan Khan MT, et al. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2019, 34, 279-309.

## 7. SAŽETAK

Biljni polifenoli su predmetom mnogobrojnih istraživanja zbog svojih pozitivnih učinaka na ljudski organizam. U ovom diplomskom radu određeni su uvjeti optimalne ekstrakcije ukupnih polifenola iz hmeljaste vije pomoću Bex-Behnken dizajna. Uvjeti su određivani s obzirom na maseni udio glicerola u otapalu, temperaturu i vrijeme ekstrakcije, a sadržaj polifenola određivan je spektrofotometrijski. Zaključeno je da su optimalni uvjeti 60%-tni udio glicerola, temperatura od 80 °C te vrijeme ekstrakcije od 20 min. Dobiveni optimalni ekstrakt dalje je korišten u biološkim testovima ispitivanja aktivnosti inhibicije enzima tirozinaze, lipoksigenaze i elastaze te u  $\beta$ -karoten linoleatnoj analizi za određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakta. Ekstrakt pokazuje određenu sposobnost inhibicije tirozinaze, lipoksigenaze i elastaze, a njegova antioksidativna aktivnost nadmašuje onu butilhidroksianisola koji je korišten kao pozitivna kontrola.



## SUMMARY

Plant polyphenols have been the subject of numerous studies due to their positive effects on the human body. In this diploma thesis, the conditions of optimal extraction for total polyphenols from black medic were determined using Bex-Behnken design. Conditions were determined with respect to glycerol concentration in the solvent, temperature and extraction time, and polyphenol content was determined spectrophotometrically. It was concluded that the optimal conditions were a 60% glycerol concentration, a temperature of 80 °C and an extraction time of 20 min. The obtained optimal extract was further used in biological assays to test the inhibition activity of the enzymes tyrosinase, lipoxygenase and elastase and in  $\beta$ -carotene linoleate analysis to determine the antioxidant activity of the extract. The extract shows a certain ability to inhibit tyrosinase, lipoxygenase and elastase, and its antioxidant activity surpasses that of butylhydroxyanisole which was used as a positive control.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### OPTIMIZACIJA ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE POLIFENOLA I BIOLOŠKI UČINCI EKSTRAKTA ZELENİ HMELJASTE VIJE (*Medicago lupulina* L.)

**Karla Bukovina**

#### SAŽETAK

Biljni polifenoli su predmetom mnogobrojnih istraživanja zbog svojih pozitivnih učinaka na ljudski organizam. U ovom diplomskom radu određeni su uvjeti optimalne ekstrakcije ukupnih polifenola iz hmeljaste vije pomoću Bex-Behnken dizajna. Uvjeti su određivani s obzirom na maseni udio glicerola u otapalu, temperaturu i vrijeme ekstrakcije, a sadržaj polifenola određivan je spektrofotometrijski. Zaključeno je da su optimalni uvjeti 60%-tni udio glicerola, temperatura od 80 °C te vrijeme ekstrakcije od 20 min. Dobiveni optimalni ekstrakt dalje je korišten u biološkim testovima ispitivanja aktivnosti inhibicije enzima tirozinaze, lipoksigenaze i elastaze te u  $\beta$ -karoten linoleatnoj analizi za određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakta. Ekstrakt pokazuje određenu sposobnost inhibicije tirozinaze, lipoksigenaze i elastaze, a njegova antioksidativna aktivnost nadmašuje onu butil-hidroksianisola koji je korišten kao pozitivna kontrola.

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

Rad sadrži: 30 stranica, 5 grafičkih prikaza, 7 tablica i 25 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: hmeljasta vija, Box-Behnken, tirozinaza, lipoksigenaza, elastaza, antioksidativna aktivnost

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Jasna Jablan**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Maja Bival Štefan**, viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2020.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OPTIMISATION AND BIOLOGICAL EFFECTS OF BLACK MEDIC EXTRACT (*Medicago lupulina* L.)

**Karla Bukovina**

#### SUMMARY

Plant polyphenols have been the subject of numerous studies due to their positive effects on the human body. In this diploma thesis, the conditions of optimal extraction for total polyphenols from black medic were determined using Bex-Behnken design. Conditions were determined with respect to glycerol concentration in the solvent, temperature and extraction time, and polyphenol content was determined spectrophotometrically. It was concluded that the optimal conditions were a 60% glycerol concentration, a temperature of 80 °C and an extraction time of 20 min. The obtained optimal extract was further used in biological assays to test the inhibition activity of the enzymes tyrosinase, lipoxygenase and elastase and in  $\beta$ -carotene linoleate analysis to determine the antioxidant activity of the extract. The extract shows a certain ability to inhibit tyrosinase, lipoxygenase and elastase, and its antioxidant activity surpasses that of butylhydroxyanisole which was used as a positive control.

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

Thesis includes: 30 pages, 5 figures, 7 tables and 25 references. Original is in Croatian language.

Keywords: black medic, Box-Behnken, tyrosinase, lipoxygenase, elastase, antioxidant activity

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  
**Jasna Jablan, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Maja Bival Štefan, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2020.