

# Biološka aktivnost glicerolnih ekstrakata zeleni hmeljaste vije (*Medicago lupulina* L.)

---

**Horvat, Mateja**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:827309>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-14**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Mateja Horvat**

**Biološka aktivnost glicerolnih ekstrakata zeleni  
hmeljaste vije (*Medicago lupulina* L.)**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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 .

*Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Marijani Zovko Končić i asistentici Lejsi Jakupović na stručnoj pomoći, savjetima, strpljenju i susretljivosti tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Hvala svim prijateljima i kolegama koji su studentske dane učinili lakšima i veselijima.*

*Zahvaljujem i cijeloj mojoj obitelji što su bili uz mene svih ovih godina, posebice mojoj sestri Ines.*

## SADRŽAJ

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.     | Uvod.....   | 1  |
| 1.1.   | Hmeljasta vija.....   | 1  |
| 1.2.   | Polifenoli.....   | 2  |
| 1.2.1. | Fenolne kiseline .....  | 3  |
| 1.2.2. | Flavonoidi.....   | 3  |
| 1.3.   | Oksidativni stres .....   | 4  |
| 1.4.   | Polifenoli kao antioksidansi .....                              | 5  |
| 1.5.   | Starenje kože .....   | 6  |
| 1.6.   | Tirozinaza .....  | 6  |
| 2.     | Obrazloženje teme.....  | 8  |
| 3.     | Materijali i metode .....                                       | 9  |
| 3.1.   | Materijali za ispitivanje .....                                 | 9  |
| 3.1.1. | Biljni materijal .....  | 9  |
| 3.1.2. | Kemikalije .....  | 9  |
| 3.1.3. | Uređaji.....  | 9  |
| 3.2.   | Metode ispitivanja .....  | 9  |
| 3.2.1. | Priprema ekstrakata.....  | 9  |
| 3.2.2. | Određivanje ukupnih polifenola .....                            | 10 |
| 3.2.3. | Određivanje ukupnih fenolnih kiselina .....                     | 10 |
| 3.2.4. | Određivanje flavonoida .....                                    | 11 |
| 3.2.5. | Određivanje antiradikalne aktivnosti .....                      | 11 |
| 3.2.6. | Određivanje kelirajuće aktivnosti .....                         | 11 |
| 3.2.7. | Određivanje aktivnosti ekstrakta na inhibiciju tirozinaze ..... | 12 |

|  |    |
|--|----|
| 3.2.8. Statistička obrada podataka .....                     | 12 |
| 4. Rezultati i rasprava.....                                 | 13 |
| 4.1. Određivanje ukupnih polifenola .....                    | 13 |
| 4.2. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina.....              | 15 |
| 4.3. Određivanje ukupnih flavonoida .....                    | 16 |
| 4.4. Određivanje antiradikalne aktivnosti.....               | 17 |
| 4.5. Određivanje kelirajuće aktivnosti.....                  | 19 |
| 4.6. Određivanje inhibicijske aktivnosti na tirozinazu ..... | 20 |
| 5. Zaključak .....   | 22 |
| 6. Literatura .....  | 23 |
| 7. Sažetak/summary .....                                     | 26 |
| Temeljna dokumentacijska kartica.....                        | 28 |

# 1. UVOD

## 1.1. HMELJASTA VIJA

Hmeljasta vija (*Medicago lupulina* L., Fabaceae), poznata i pod nazivom crna vija, jednogodišnja je ili višegodišnja zeljasta biljka prisutna u područjima umjerene i suptropske klime. Spada u porodicu mahunarki, a rod *Medicago* sadrži oko 83 vrsta koje su široko rasprostranjene po svijetu. Nalazi se na različitim staništima poput pašnjaka, travnjaka i riječnih obala. Hmeljasta vija ima tanak i vretenast korijen. Stabljika može biti položena uz tlo ili uspravna, razgranata ili nerazgranata te duga do 80 cm. Stabljike i listovi prekriveni su dlakama. List se sastoji od tri liski, gdje je srednja liska duža od dviju sporednih te su obrnuto jajastog oblika. Cvjetovi su žuti, mali, skupljeni u cvat koji sadrži od 20 do 50 cvjetova. Vrsta ploda je mahuna crne boje, hrapava te duljine oko 3 mm. Sadrži jednu sjemenku ovalnog do bubrežastog oblika (Turkington i Cavers, 1979). Razmnožava se sjemenom te je medonosna biljka koju pčele često posjećuju. S obzirom da ima sposobnost vezanja dušika, koristi se u poljoprivredi u svrhu obogaćivanja tla dušikom (Kicel i Olszewska, 2015).



Slika 1. Hmeljasta vija ([https://en.wikipedia.org/wiki/Medicago\\_lupulina](https://en.wikipedia.org/wiki/Medicago_lupulina))

*M. lupulina* sadrži različite fitokemijske komponente poput flavonoida, fenolnih spojeva, alkaloida, saponinskih triterpena i tanina (Baloch i sur., 2013). Od flavonoida uglavnom sadrži flavonole (mircetin, kvercetin i kemferol) i flavone (luteolin i apigenin). Najviše je luteolina i mircetina, a nešto manje kvercetina, kemferola i apigenina (Kicel i Olszewska, 2015). Sadrži izoflavone i druge fitoestrogene poput genisteina, formononetina, biokanina A i kumestrola zahvaljujući kojima ima estrogeno djelovanje. Od fenolnih kiselina poznato je da sadrži feruličnu te kavenu kiselinu (Jakupović i sur., 2021). Dokazano je da ima antibakterijsko djelovanje, inhibirajući rast raznih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, pogotovo vrste *Staphylococcus aureus*. Također ima antifungalno, insekticidno, antitumorsko te antioksidativno djelovanje (Baloch i sur., 2013).

## **1.2.POLIFENOLI**

Polifenoli su široko rasprostranjeni spojevi u svijetu biljaka te su njihovi glavni sekundarni metaboliti. Zaslužni su za zaštitu biljaka od UV zračenja, patogena, parazita, predatora te pridonose tome kakve će boje biti biljka. Sastojci su biljne hrane (voća, povrća, žitarica, maslina, mahunarki, čokolade) i pića (čaj, kava, pivo, vino), te su djelomično odgovorni za cjelokupna organoleptička svojstva biljaka. Poznato je više od 8 tisuća fenolnih spojeva, od najjednostavnijih fenolnih kiselina do visokopolimeriziranih spojeva poput tanina. Sadrže najmanje jedan aromatski prsten te jednu ili više hidroksilnih skupina. Mogu se razvrstati na flavonoide i ne-flavonoide, gdje spadaju fenolne kiseline, lignani, tanini te stilbeni (Dai i Mumper, 2010). To su spojevi različitih fizioloških svojstava. Djeluju antialergeno, antiaterogeno (sprječavaju stvaranje aterosklerotskih plakova), protuupalno, antimikrobno, antitrombotski, antioksidativno, kardioprotektivno te imaju vazodilatatorni učinak (Balasundrum i sur., 2016). Imaju ulogu u prevenciji karcinoma, osteoporoze, dijabetesa mellitusa te neurodegenerativnih bolesti. Inhibiraju oksidaciju LDL kolesterola smanjujući razvoj ateroskleroze, inhibiraju ili reduciraju enzime poput telomeraze, ciklooksigenaze, lipooksigenaze. Kao antioksidansi polifenoli mogu zaštititi stanice od oksidativnog oštećenja te smanjiti rizik od razvoja različitih bolesti koji su povezani sa oksidativnim stresom (D'Archivio i sur., 2007).

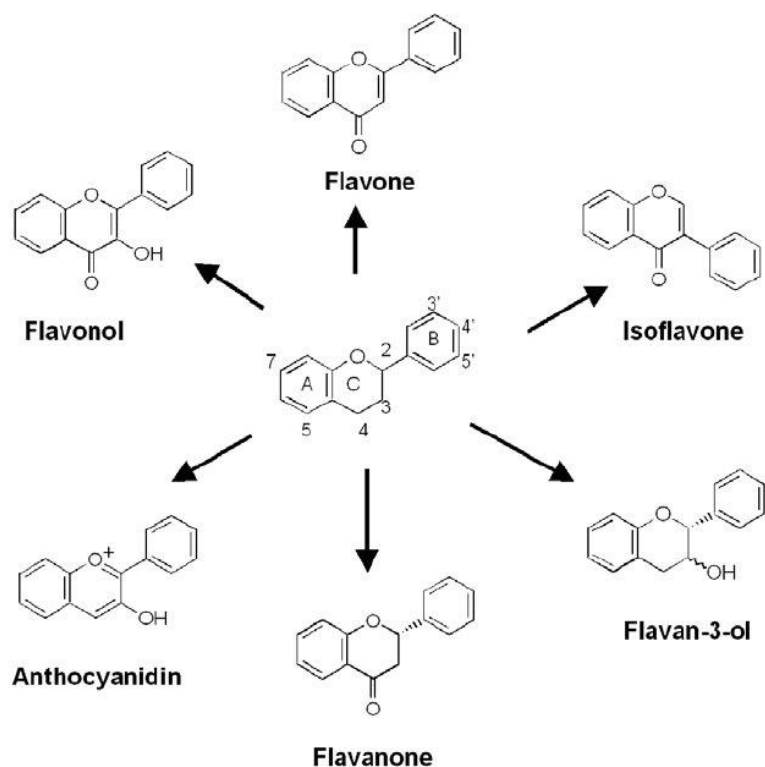
### **1.2.1. Fenolne kiseline**

Fenolne kiseline dijele se na derivate hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. U hidroksicimetne kiseline spadaju kavena, ferulična i p-kumarinska kiselina koje se uglavnom pojavljuju u obliku estera s glukozom ili kininskom kiselinom. Hidroksibenzojeve kiseline se nalaze u biljkama uglavnom u obliku glikozida (vanilinska kiselina). Nalaze se u brusnici, vaniliji, jagodama, borovnicama i kavi. Slobodne fenolne kiseline pronađene su u žitaricama. Za kavenu kiselinu poznato je da blokira biosintezu leukotriena koji su bitni u imunoregulaciji bolesti, astme i alergijskih reakcija. Neke studije navode kako bi kavena kiselina i njeni esteri mogli imati protutumorsko djelovanje i prevenirati karcinogenezu debelog crijeva (Shahidi i Ambigaipalan, 2015; Lattanzio, 2013). Njihova antioksidativna aktivnost povezana je s kiselom sredinom te brojem i položajem hidroksilnih skupina na benzenskom prstenu. Derivati hidroksicimetne kiseline učinkovitiji su antioksidansi od derivata hidroksibenzojeve kiseline zbog povećane mogućnosti delokalizacije elektrona fenoksi radikala (De Beer i sur., 2002).

### **1.2.2. Flavonoidi**

Flavonoidi u osnovnoj strukturi sadrže 15 ugljikovih atoma, gdje su dva benzenska prstena (A i B) povezana preko heterocikličkog piranskog prstena (C), kao što je prikazano na Slici 2. Dijele se na flavone, flavonole, izoflavone, antocijanidine, flavanole (katehini) te flavanone, ovisno o stupnju oksidacije na heterocikličkom prstenu, dok se spojevi unutar podskupina razlikuju po stupnjevima hidroksilacije, metoksilacije i glikozilacije na benzenskih prstenu. U prirodi se javljaju u obliku aglikona, glikozida i metiliranih derivata (Kumar i Pandey, 2013). Najviše prisutni flavonoidi su kvercetin, flavonol prisutan u luku, brokuli, jabukama; katehin, flavanol prisutan u čaju i voću; naringenin, flavanon prisutan u grejpu; cijanidin-glikozid, antocijanin prisutan u bobičastom voću te daidzein, genistein i glicitein, izoflavoni prisutni u soji (Dai i Mumper, 2010). Njihovu antioksidativnu aktivnost određuje raspored i vrsta supstancija, planarnost molekule te vrste i broj vezanih šećera (Sandhar i sur., 2011).

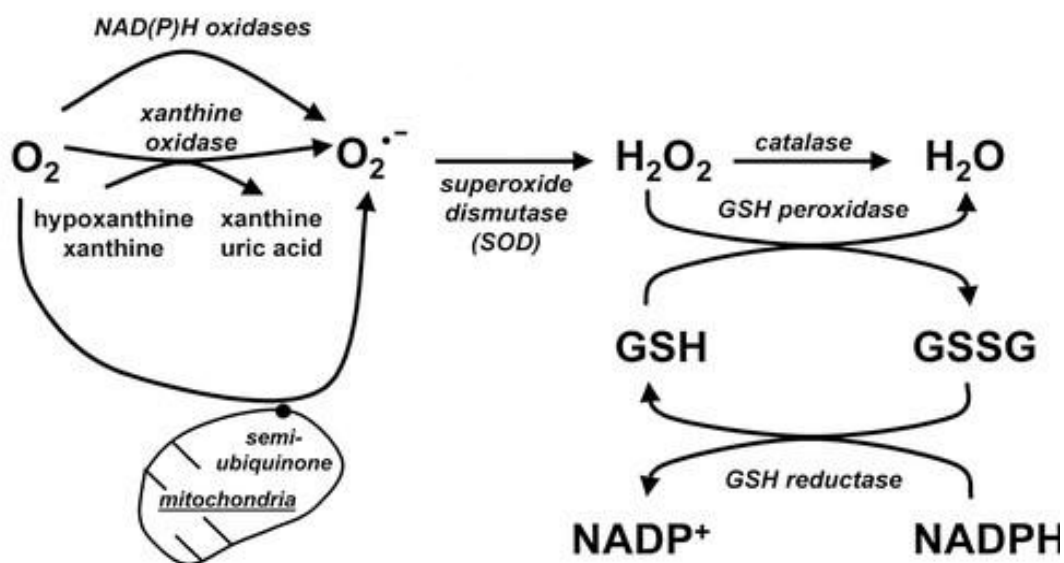




**Slika 2.** Strukturna podjela flavonoida (Nishiumi i sur., 2011)

### 1.3. OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres javlja se kad dolazi do neravnoteže između stvaranja reaktivnih kisikovih i/ili dušikovih vrsta (ROS/RNS) i antioksidativne obrane. Ta neravnoteža dovodi do oštećenja bioloških molekula i tkiva te može imati negativan utjecaj na cijeli organizam. ROS uključuju slobodne radikale poput superoksidnog aniona ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksilnog radikala ( $\cdot OH$ ) te neradikalne molekule poput vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) i singletnog kisika ( $^1O_2$ ). Stvaranje ROS ovisi o enzimatskim i neenzimatskim reakcijama. Enzimatske reakcije uglavnom uključuju NADPH oksidazu, ksantin oksidazu, peroksidazu, citokromski P450 sustav, a neenzimatske reakcije, odnosno curenje elektrona iz mitohondrijskog respiratornog lanca, glavni su izvor ROS. Kako bi izbjegle oksidativni stres, stanice imaju antioksidativni obrambeni sustav. U neenzimatske antioksidanse spadaju flavonoidi, vitamini C i E, beta karoten (prekursor vitamina A), glutation (GSH), dok u enzimatske antioksidanse spadaju superoksid dismutaza (SOD), katalaza, glutation peroksidaza i glutation reduktaza.



**Slika 3.** Načini stvaranja te uklanjanja reaktivnih kisikovih vrsta (Dröge, 2002)

U normalnim okolnostima ROS su nusprodukti staničnog metabolizma, sudjeluju u različitim signalnim putevima te ih antioksidansi uklone prije nego naprave štetu. No, mnogi endogeni (stres, upala) i egzogeni faktori (UV zračenje, ionsko zračenje, zagađenje zraka) mogu potaknuti njihovo povećano stvaranje u stanicama te ih antioksidansi nisu u stanju ukloniti. Tada dolazi do oksidativnog stresa te oštećenja bioloških molekula poput proteina, lipida i nukleinskih kiselina (Ding i sur., 2021). ROS sudjeluju u mutagenezi, karcinogenezi, oštećenju membrana, lipidnoj peroksidaciji što uglavnom posreduje hidroksilni radikal. Važni su u patogenezi različitih kroničnih bolesti, uključujući karcinom, kardiovaskularne bolesti, Parkinsonove bolesti, Alzheimerove bolesti i starenju (Datta i sur., 2000).

#### 1.4.POLIFENOLI KAO ANTIOKSIDANSI

Polifenoli su zahvaljujući svojoj strukturi izvrsni hvatači slobodnih radikala. Imaju hidroksilne skupine koje su dobri donori vodika ili elektrona reaktivnim kisikovim ili dušikovim vrstama te imaju prošireni konjugirani aromatski sustav za delokalizaciju nesparenog elektrona. Time smanjuju reaktivnost ROS/RNS te njihovo štetno djelovanje na naš organizam. Kao alternativno antioksidativno svojstvo, neki fenolni spojevi s dihidroksi skupinama mogu kelirati metalne ione uključene u sintezu slobodnih radikala. Metali poput željeza i bakra stupaju u interakciju s  $H_2O_2$  tvoreći hidroksilne radikale, najreaktivnije poznate radikale. Polifenoli još mogu ulaziti u interakciju s proteinima zahvaljujući hidrofobnim

aromatskim prstenovima te mogućnosti vezanja vodika. To im daje sposobnost inhibicije enzima uključenih u stvaranje radikala: lipooksigenaze, ciklooksigenaze i ksantin oksigenaze (Dai i Mumper, 2010; Pereira i sur., 2009).

Antioksidativni kapacitet biljnih ekstrakata povezan je s udjelom fenola, flavonoida, izoflavonoida i antocijana. Brojne studije pokazale su povezanost između sadržaja fenolnih komponenti u biljkama i antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata. Biljni ekstrakti koriste se u kozmetici kako bi poboljšali kvalitetu i funkcionalnost. Pokazano je da ekstrakti djeluju puno efikasnije nego pojedine komponente s obzirom na sinergističke interakcije svih komponenata u biljci (Zagórska-Dziok i sur., 2020).

## **1.5.STARENJE KOŽE**

Starenje je biološki proces koji uzrokuje progresivno propadanje strukture i fizioloških funkcija organa. S obzirom da je koža najveći organ i barijera je organizma prema okolini, njezine promjene najvidljiviji su znakovi starenja organizma (Petruk i sur., 2018). Razlikujemo kronološko starenje kože uzrokovano intrinzičnim faktorima poput genetske predispozicije i metaboličkih promjena. Nastaju fine bore, koža je tanka, suha te dolazi do seboroične keratoze i nastanka angioma. No, zbog različitih vanjskih faktora poput zagađenog zraka, pušenja, loših prehrambenih navika te posebice izlaganja suncu i UV zrakama dolazi do takozvanog ekstrinzičnog starenja kože ili fotostarenja. Fotostarenje je uzrokovano izlaganjem UV zrakama i količini melanina u koži te je karakterizirano dubokim borama, mrljastom pigmentacijom (hipo- ili hiperpigmentacija), grubom kožom, dubokim brazdama, a u težim slučajevima dolazi do nastanka melanoma. Unutarnji i vanjski čimbenici zajedno pridonose povećanom stvaranju slobodnih radikala u koži rezultirajući oksidativnim stresom. Dolazi do oštećenja DNA i povećane sinteze matriksnih metaloproteinaza (kolegenaze, elastaze) koje degradiraju kolagen i elastin (Pandel i sur., 2013; Poljšak i sur., 2012).

## **1.6.TIROZINAZA**

Tirozinaza je enzim smješten u melanosomima, organelima specifičnima za melanocyte. Djeluje kao katalizator u sintezi melanina, odnosno melanogenezi. Katalizira dva ključna koraka u melanogenezi: oksidaciju L-tirozina u L-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) i oksidaciju

L-DOPA-e u dopakinon koji na posljertku prelazi u pigmente feomelanin i eumelanin. Iako melanin igra ključnu ulogu u zaštiti kože od UV zračenja, povećana sinteza i akumulacija melanina u koži dovodi do poremećaja izgleda kože poput solarnog lentiga, melazme te hiperpigmentacije kože (Lei i sur., 2002). Kako UV zračenje potiče sintezu ROS u koži te time melanogenezu i antioksidansi mogu suprimirati melanogenezu. (Hanamura i sur., 2008).

Postoje različite molekule koje djeluju inhibirajuće na tirozinazu. U dermalnim proizvodima koriste se hidrokinon, arbutin, kojična kiselina, azelaična kiselina i vitamin C koji posvjetljuju kožu. Iako imaju vrlo dobro izbjeljujuće djelovanje, imaju različite štetne učinke te nuspojave. Tako je hidrokinon potencijalni mutagen i uzrokuje različite nuspojave uključujući kontaktni dermatitis, iritaciju, eritem, pečenje i svrbež kože. Arbutin, kao prolijek hidrokinona, prirodni je produkt ali je kemijski nestabilan i može doći do razgradnje u hidrokinon. Uporaba kojične kiseline također je ograničena s obzirom na potencijalno karcinogeno djelovanje te nestabilnost prilikom skladištenja. Vitamin C je osjetljiv na temperaturu i lako se razgrađuje. Stoga se farmaceutske i kozmetičke tvrtke okreću stvaranju proizvoda s novim inhibitorima tirozinaze i antioksidansima kao izbjeljujućim agensima koji bi bili manje štetni za kožu. Pri tome istaknuto mjesto pripada prirodnim spojevima (Pillaiyar i sur., 2017).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Štetno UV zračenje uvelike pridonosi nastanku oksidacijskog stresa te dovodi do starenja kože. Kako bi izbjegli posljedice starenja kože, ljudi često posežu za različitim dermalnim proizvodima koji imaju anti-aging učinak. U današnje vrijeme popularni su pripravci bazirani na prirodnim sastojcima, s obzirom da se smatraju netoksičnim i sigurnim za primjenu. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti antioksidativni učinak glicerolnih ekstrakta hmeljaste vije te njihovo inhibicijsko djelovanje na aktivnost enzima tirozinaze. Kao otapalo za ekstrakciju koristio se glicerol, često prisutan u proizvodima za kožu kao humektans (Chemat i sur., 2012). Antioksidativna aktivnost ispitivana je određivanjem antiradikalne i kelirajuće aktivnosti. Spektrofotometrijski se odredio sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida te fenolnih kiselina priređenih ekstrakata.

## **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. MATERIJALI ZA ISPITIVANJE**

#### **3.1.1. Biljni materijal**

Za ispitivanje su korišteni nadzemni dijelovi biljke hmeljaste vije, *Medicago lupulina* L., ubrane u blizini jezera Jarun (Zagreb, 45°48'N 15°90'E).

#### **3.1.2. Kemikalije**

Korištene su sljedeće kemikalije: glicerol (Kemig, Hrvatska), destilirana voda, metanol, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), *tert*-butil-4-hidroksianisol (BHA), kavena kiselina, (Sigma Aldrich, SAD), Folin-Ciocalteu reagens (Scharlab S.L., Spain), galna kiselina, levo-dopa (L-DOPA), tirozinaza iz gljiva, kojična kiselina (Acros Organics), fosfatni pufer, kvercetin dihidrat, aluminijev klorid heksahidrat ( $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ), nitrit-molibdat reagens, natrijev karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), klorovodična kiselina (HCl), željezov (II) sulfat ( $\text{FeSO}_4$ ), ferozin, etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), natrijev hidroksid (NaOH).

#### **3.1.3. Uređaji**

U ispitivanjima su korišteni sljedeći uređaji: mlin za usitnjavanje (UD Corporation, SAD), analitička vaga (Mettler Toledo, Švicarska), ultrazvučna kupelj (Sonorex digital, Bandelin electronic, Njemačka), UV/Vis spektrofotometar (BMG Labtech, Njemačka).

### **3.2. METODE ISPITIVANJA**

#### **3.2.1. Priprema ekstrakata**

Osušeni biljni materijal usitnjen je pomoću mlina za mljevenje u prašak. U Erlenmeyerove tikvice izvagano je 0,2 g biljne droge te pomiješano s 20 g vodene otopine glicerola različitih masenih udjela. Ultrazvučna ekstrakcija provedena je prema literaturnom propisu (Jakupović i sur., 2021). Ekstrakcijski uvjeti prikazani su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Optimalni uvjeti za ekstrakciju polifenola u vodenoj otopini glicerola.

| Naziv ekstrakta | Udio glicerola (% m/m) | Temperatura (°C) | Trajanje ekstrakcije (min) | Snaga ultrazvuka (W) |
|-----------------|------------------------|------------------|----------------------------|----------------------|
| 60%-GL          | 60                     | 80               | 30                         | 360                  |
| 90%-GL          | 90                     | 80               | 60                         |                      |

### 3.2.2. Određivanje ukupnih polifenola

Ukupni polifenoli određeni su spektrofotometrijski pomoću UV/Vis spektrofotometra korištenjem modificirane Folin-Ciocalteu kolorimetrijske metode (Singleton i sur., 1999). U jažice mikrotitarske pločice dodano je 80  $\mu\text{L}$  ekstrakta te 80  $\mu\text{L}$  vode. Ekstrakti su serijski razrijeđeni te je koncentracija ekstrakata u svakom sljedećem redu bila upola manja. Zatim, dodano je 80  $\mu\text{L}$  10% -tne otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i 80  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđenog vodom u omjeru 1:3). Nakon inkubacije od sat vremena u mračnoj komori izmjerena je apsorbancija na 700 nm. Količina ukupnih polifenola određena je iz baždarnog pravca galne kiseline. Rezultati su prikazani kao ekvivalenti galne kiseline (EGK), u miligramima po gramu suhe tvari ekstrakta (mg EGK/g).

### 3.2.3. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina

Određivanje fenolnih kiselina provedeno je prema modificiranom literaturnom propisu (Nicolle i sur., 2004). Pripremljena je vodena otopina 0,5 M HCl, 8,5% -tna vodena otopina NaOH te nitrit-molibdat. Na mikrotitarsku pločicu dodano je 100  $\mu\text{L}$  ekstrakta a zatim 50  $\mu\text{L}$  HCl-a, 50  $\mu\text{L}$  nitrit-molibdat reagensa te 50  $\mu\text{L}$  NaOH. Nakon 10 minuta izmjerena je apsorbancija na 492 nm pomoću UV/Vis spektrofotometra.

Ukupne fenolne kiseline određene su pomoću baždarnog pravca kavene kiseline (0,2 mg/mL) te je sadržaj izražen kao miligram ekvivalenta kavene kiseline (EKK) po gramu suhe tvari ekstrakta (mg EKK/g).

### 3.2.4. Određivanje flavonoida

Određivanje flavonoida provedeno je prema modificiranom literaturnom propisu (Kumazawa i sur., 2004). Na mikrotitarsku pločicu dodano je 120  $\mu\text{L}$  ekstrakta i 120  $\mu\text{L}$  metanola te su uzorci serijski razrijeđeni. Reakcija je pokrenuta dodavanjem 120  $\mu\text{L}$  0,2 %-tne metanolne otopine  $\text{AlCl}_3$ . Mikrotitarska pločica ostavljena je jedan sat na tamnom mjestu te je izmjerena apsorbanacija na 405 nm pomoću UV/Vis spektrofotometra. Sadržaj flavonoida određen je pomoću baždarnog pravca standarda kvercetin dihidrata (0,2 mg/mL) te je izražen kao mg ekvivalenta kvercetina (EK) po gramu suhe tvari ekstrakta (mg EK/g).

### 3.2.5. Određivanje antiradikalne aktivnosti

Za određivanje antiradikalne aktivnosti biljnog materijala pripremljena je metanolna otopina DPPH (0,22 mg/mL). Kao pozitivna kontrola koristila se metanolna otopina BHA (0,1 mg/mL). Na mikrotitarsku pločicu dodano je 130  $\mu\text{L}$  ekstrakta koji se serijski razrijedio s metanolom te 70  $\mu\text{L}$  DPPH. Mikrotitarska pločica stavljena je u mračnu komoru na jedan sat te je izmjerena apsorbanacija na valnoj duljini od 517 nm. Moć hvatanja slobodnih radikala (engl. Radical scavenging activity, RSA) definirana je prema formuli:

$$\text{RSA (\%)} = \frac{A_N - A_{\text{EKS}}}{A_N} \times 100,$$

pri čemu je  $A_N$  apsorbanacija negativne kontrole, a  $A_{\text{EKS}}$  apsorbanacija ekstrakta. Rezultati su prikazani kao  $\text{IC}_{50}$ , koncentracija ekstrakta koja hvata 50 % slobodnih radikala DPPH.

### 3.2.6. Određivanje kelirajuće aktivnosti

Kelirajuća aktivnost ekstrakta određena je spektrofotometrijski prema modificiranom propisu (Decker i Welch, 1990). Pripremljene su vodene otopine EDTA (0,1 mg/mL),  $\text{FeSO}_4$  (0,7 mg/mL) i ferozina (4,93 mg/mL). U svaku jažicu dodano je 130  $\mu\text{L}$  ekstrakta koji su serijski razrijeđeni te je dodano 50  $\mu\text{L}$   $\text{FeSO}_4$ , a nakon inkubacije od 5 minuta dodano je 50  $\mu\text{L}$  ferozina. Nakon 30 minuta inkubacije u mračnoj komori izmjerena je apsorbanacija na 562 nm. Kao pozitivna kontrola korištena je vodena otopina EDTA. Negativna kontrola sadržavala je sve osim ekstrakta. Kelirajuća aktivnost (KA) definirana je prema formuli:

$$\text{KA} = \frac{A_N - A_{\text{EKS}}}{A_N} \times 100,$$



pri čemu je  $A_N$  apsorbancija negativne kontrole, a  $A_{EKS}$  apsorbancija ekstrakata. Kelirajuća aktivnost izražena je kao  $IC_{50}$ , odnosno količina ekstrakta potrebna za keliranje 50 % iona željeza.

### 3.2.7. Određivanje aktivnosti ekstrakta na inhibiciju tirozinaze

Određivanje inhibicijskog djelovanja ekstrakta na tirozinazu provedeno je prema modificiranom literaturnom propisu (Biswajit i sur., 2017). Pripremljen je fosfatni pufer (16 mM, pH=6,8), vodena otopina kojične kiseline (0,1 mg/mL) i vodena otopina L-DOPA-e (0,805 mg/mL). Tirozinaza je ekstrahirana iz šampinjona (*Agaricus bisporus* J. E. Lange, Agaricaceae). U jažice je dodano 120  $\mu$ L ekstrakta, 120  $\mu$ L fosfatnog pufera te su ekstrakti serijski razrjeđeni. Nakon serijskog razrjeđenja u jažice s ekstraktima dodano je 40  $\mu$ L tirozinaze. Pločica je ostavljena 10 minuta na tamnom mjestu za inkubaciju. Nakon 10 minuta dodana je vodena otopina L-DOPA-e (40  $\mu$ L) i pločica je stavljena na inkubaciju još 10 minuta. Nakon inkubacije mikrotitarska pločica stavljena je u spektrofotometar gdje se mjerila apsorbancija na 492 nm. Kao pozitivna kontrola korištena je vodena otopina kojične kiseline. Negativna kontrola sastojala se od smjese koja je umjesto ekstrakta sadržavala istu količinu pufera. Inhibicija enzima tirozinaze (engl. Tyrosinase Inhibition, TyInh) ekstraktom definirana je prema jednadžbi:

$$\text{TyInh (\%)} = \frac{A_N - A_{EKS}}{A_N} \times 100,$$

gdje je  $A_N$  izmjerena apsorbancija negativne kontrole, a  $A_{EKS}$  apsorbancija otopine ekstrakta. Rezultati su izraženi kao  $IC_{50}$ , definirani kao koncentracija ekstrakta koja inhibira 50 % aktivnosti tirozinaze.

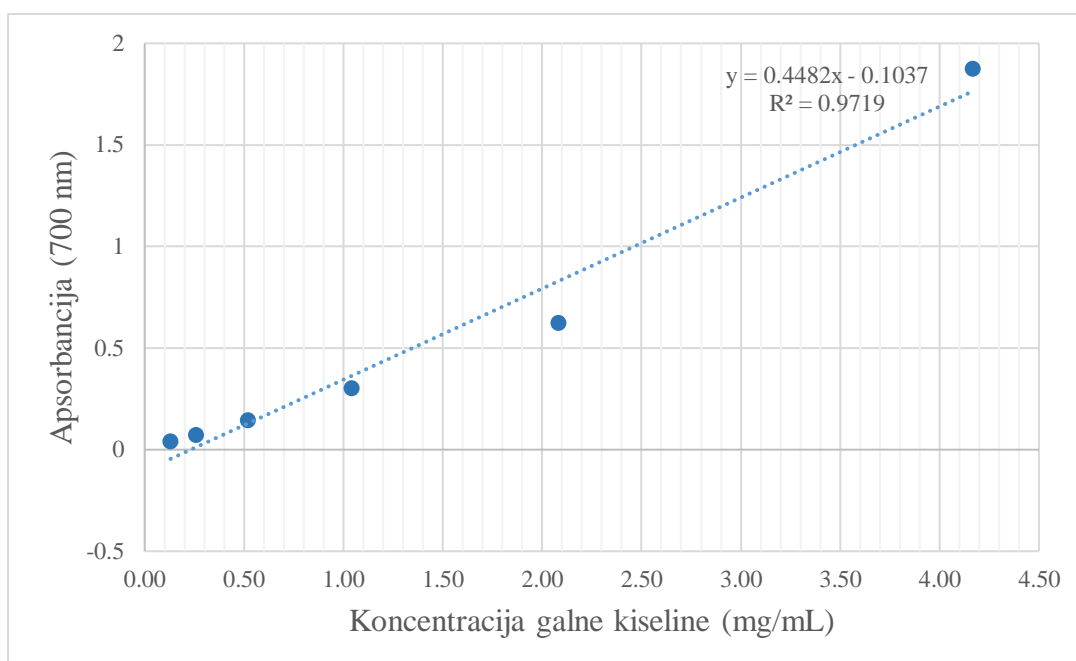
### 3.2.8. Statistička obrada podataka

Sva ispitivanja na ekstraktima provedena su u triplikatu. Dobiveni podaci obrađeni su u programu Microsoft Excel (Microsoft, USA), a rezultati su iskazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLA

Količina ukupnih polifenola određena je spektrofotometrijski pomoću Folin-Ciocalteu reagensa, koji se sastoji od fosfomolibdenske i fosfovolframske kiseline. Pri dodiru s fenolnim spojevima, koji djeluju reducirajuće, dolazi do redukcije  $\text{Mo}^{6+}$  u  $\text{Mo}^{5+}$  pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks s fenolima s apsorpcijskim maksimumom na 765 nm. Intenzitet obojenja proporcionalan je koncentraciji polifenola u ekstraktu. Dodatkom  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  nastaju alkalni uvjeti, dolazi do disocijacije vodikovih iona te nastaje fenolatni ion koji ulazi u redoks reakciju s reagensom (Agbor i sur., 2014). Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima određen je na temelju vrijednosti apsorbanacija ekstrakata koristeći baždarni pravac standarda galne kiseline (Slika 4).



**Slika 4.** Baždarni pravac za određivanje ukupnih polifenola.

Rezultati su prikazani kao EGK u miligramima po gramu suhe tvari ekstrakta (mg EGK/g) te su prikazani u Tablici 2.

**Tablica 2.** Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima zeleni hmeljaste vije. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD).

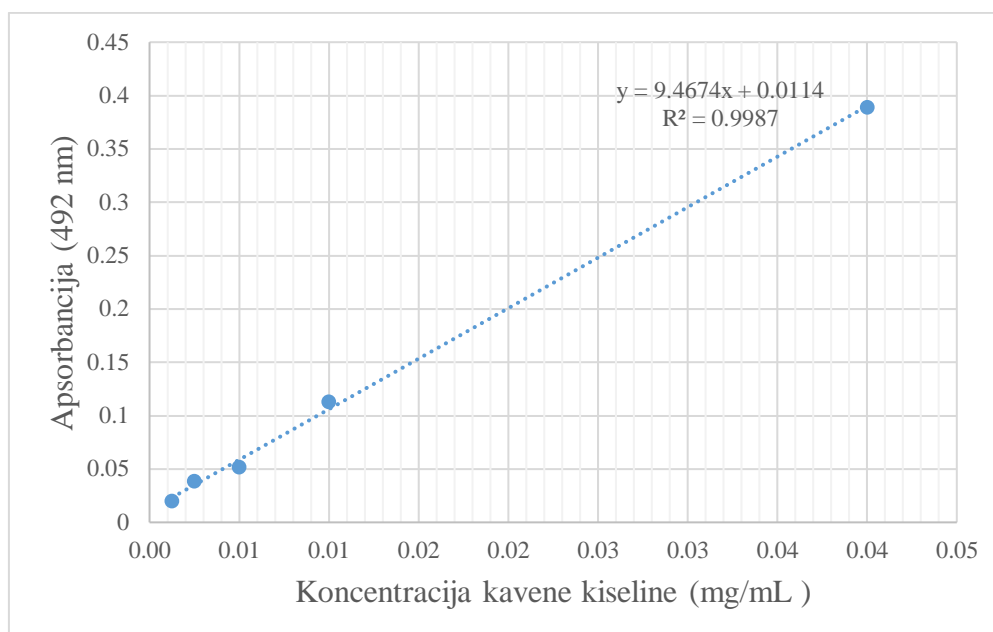
| Ekstrakt | Sadržaj ukupnih polifenola<br>(mg EGK/g) | SD<br>(%) |
|----------|--|-----------|
| 60%-GL   | 0,22 $\pm$ 0,01                          | 4,55      |
| 90%-GL   | 0,18 $\pm$ 0,02                          | 11,11     |

Iz prikazanih rezultata uočeno je da ekstrakt 60%-GL sadrži veću količinu ukupnih polifenola naspram ekstrakta 90%-GL. No, ekstrakti imaju vrlo malu količinu ukupnih polifenola u odnosu na druga istraživanja provedena na navedenoj biljci. U istraživanju (Jakupović i sur., 2021), gdje je korišten 45 %-tni glicerol kao otapalo za ekstrakciju, određen je sadržaj ukupnih polifenola u iznosu od 1,28 mg EGK/g. Kako se u ovom radu koristio veći udio glicerola, dobiveni niži rezultati koncentracije mogu se prepisati tome što je tako priređeno ekstrakcijsko sredstvo manje efikasno za ekstrakciju polifenola. To potvrđuje opažanja iz spomenutog istraživanja da je ekstrakcija polifenola uspješnija pri nižem masenom udjelu glicerola.

U drugom istraživanju (Kicel i Olszewska, 2015) količina ukupnih polifenola u metanolnim ekstraktima zeleni biljke *M. lupulina* iznosila je 12,9 mg EGK/g, pa je moguće da se polifenoli ekstrahiraju bolje pomoću metanola nego pomoću smjese glicerola i vode. Slični rezultati dobiveni su i u istraživanju (Baloch i sur., 2013), gdje je pokazano da metanolni ekstrakti hmeljaste vije sadrže 20,20 mg EGK/g. S obzirom da su fenolni spojevi u hmeljastoj viji srednje polarnosti (Kicel i Olszewska, 2015), za otapanje su bolja manje polarna organska otapala. Iako mnogi fenolni spojevi lako hidroliziraju i oksidiraju, posebice pri višoj temperaturi (Dai i Mumper, 2010), postoji mogućnost da je došlo do oksidacije dijela fenolnih spojeva pa je izmjeren sadržaj ukupnih polifenola ispao nizak. Također valja napomenuti kako je biljni materijal korišten u ovom radu bio duže vrijeme skladišten, pa moguće da je došlo do smanjenja udjela polifenola i ostalih sastavnica.

## 4.2. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLNIH KISELINA

Određivanje fenolnih kiselina temelji se na prisustvu o-dihidroksifenolne skupine u strukturi hidroksicimetnih derivata koji s nitrit-molibdat reagensom daju žuto obojene komplekse. Zaluživanjem otopine dolazi do prelaska žute boje u narančasto-crvenu s maksimumom apsorpcije na 492 nm (Eur. Ph. 5,0, 2004). Ukupne fenolne kiseline u ekstraktima određene su koristeći baždarni pravac kavene kiselina (Slika 5).



**Slika 5.** Baždarni pravac za određivanje fenolnih kiselina.

**Tablica 3.** Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD).

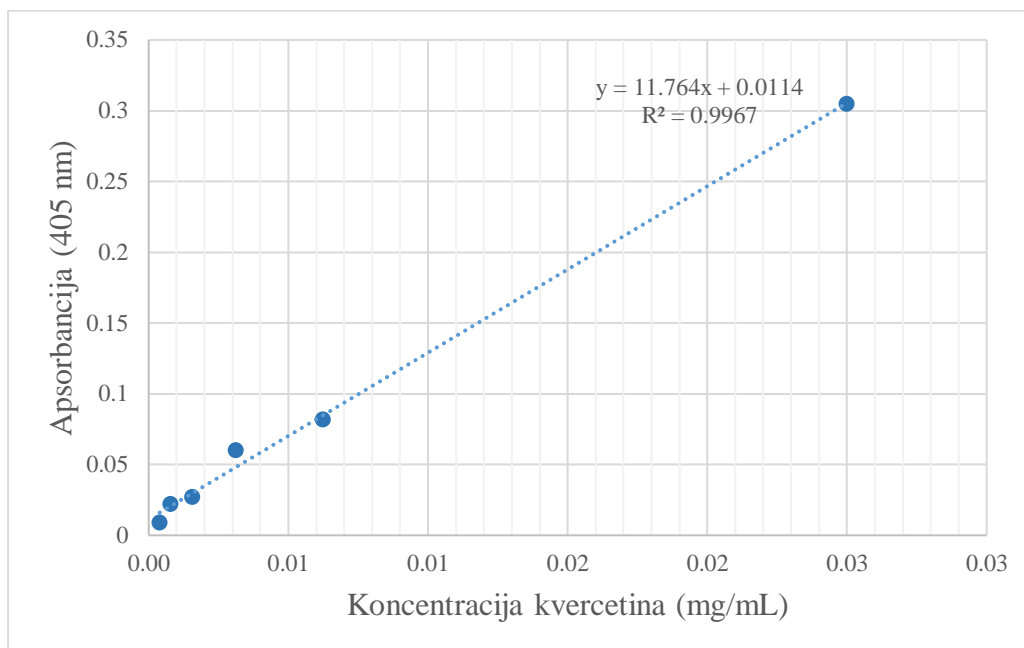
| Ekstrakt | Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina<br>(mg EKK/g) | SD<br>(%) |
|----------|---|-----------|
| 60%-GL   | 64,46 $\pm$ 4,78                                | 7,42      |
| 90%-GL   | 31,40 $\pm$ 2,50                                | 7,96      |

Rezultati prikazani u Tablici 3. pokazuju da ekstrakt 60%-GL sadrži dvostruko više fenolnih kiselina od ekstrakta 90%-GL. Budući oba ekstrakta imaju usporedivu količinu polifenola, a ekstrakt 60%-GL ima duplo veću količinu fenolnih kiselina, proizlazi da se fenolne kiseline ekstrahiraju bolje u manjenom udjelu glicerola i pri kraćem vremenu ultrazvučne

ekstrakcije. U literaturi (Jakupović i sur., 2021) dobiven je sadržaj ukupnih fenolnih kiselina od 0,205 mg EKK/g pri udjelu glicerola od 45 % što bi moglo poduprijeti ovu tvrdnju.

### 4.3. ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA

Određivanje ukupnih flavonoida temelji se na stvaranju stabilnih kompleksa između  $Al^{3+}$  i C4 keto skupine i C3 ili C5 hidroksilne skupine flavona i flavonola, te na stvaranju nestabilnih kompleksa s ortodihidroksilnim grupama u A ili B prstenu u strukturi flavonoida. Prilikom stvaranja kompleksa dolazi do obojenja otopine u žutu (Chang i sur., 2002). Za potrebe ovog eksperimenta napravljen je baždarni pravac (Slika 6.) prema kojem je određen sadržaj flavonoida izražen kao ekvivalent kvercetina (EK) u miligramima po gramu suhe tvari ekstrakta (mg EK/g).



**Slika 6.** Baždarni pravac za određivanje flavonoida.

Dobiveni rezultati prikazani u Tablici 4. pokazuju da oba ekstrakta sadrže značajnu količinu flavonoida, što bi značilo da su se flavonoidi dobro ekstrahirali iako je iz mjerenja dobiveno da ekstrakti sadrže malo polifenola. Ekstrakt 90%-GL sadrži veću količinu flavonoida, što može značiti da u *M. lupulina* prevladavaju flavonoidi polarnije strukture. Prema istraživanju (Jakupović i sur., 2021) količina flavonoida u 45 %-tnom glicerolu iznosila je 0,4731 mg EK/g, pri čemu je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) utvrđeno da ekstrakti hmeljaste vije sadrže luteolin, kvercetin, kemferol te apigenin. Također

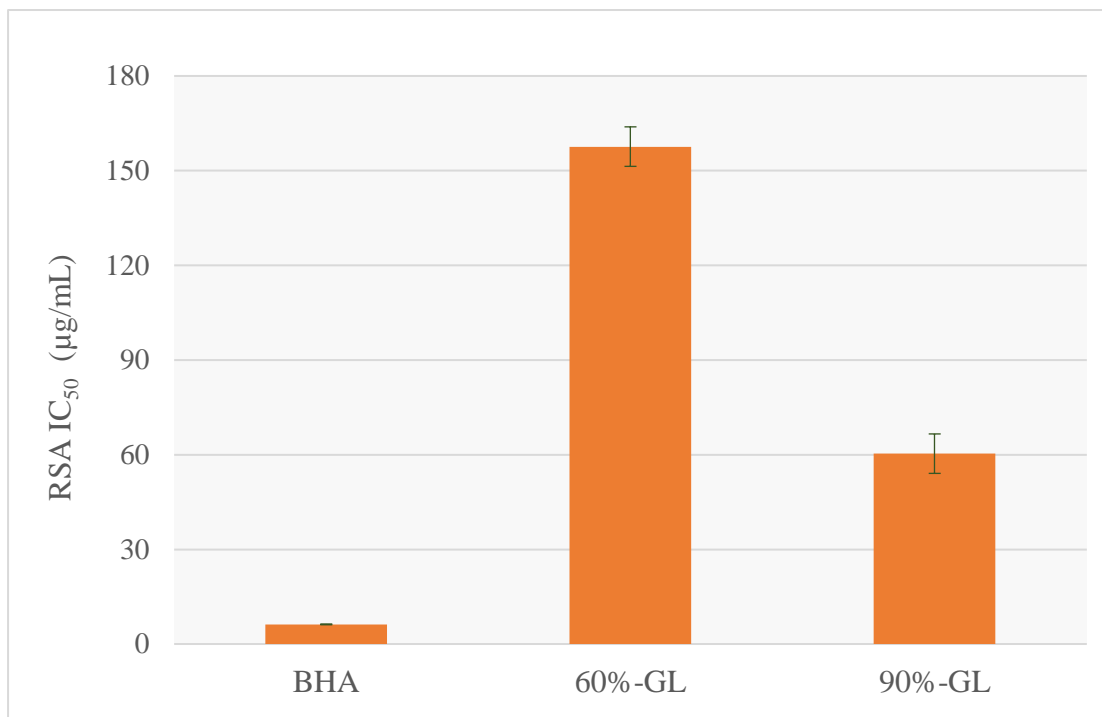
je zanimljivo da prema rezultatima u tom istraživanju glicerolni ekstrakti sadrže veću količinu apigenina i luteolina naspram polipropilenglikolnih ekstrakata.

**Tablica 4.** Sadržaj flavonoida u ekstraktima. Rezultati su prikazano kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD).

| Ekstrakt | Sadržaj flavonoida<br>(mg EK/g) | SD<br>(%) |
|----------|---------------------------------|-----------|
| 60%-GL   | 115,03 $\pm$ 61,79              | 53,72     |
| 90%-GL   | 127,70 $\pm$ 14,42              | 11,30     |

#### 4.4. ODREĐIVANJE ANTIRADIKALNE AKTIVNOSTI

Određivanje antiradikalne aktivnosti temeljeno je na prenošenju elektrona od strane antioksidansa DPPH radikalu kako bi došlo do njegove redukcije. Antioksidativno djelovanje ekstrakta pokazuje se kao promjena boje DPPH iz ljubičastog u žuto obojenje. Time dolazi do smanjenja apsorbancije koja je proporcionalna aktivnosti antioksidansa. Antiradikalna aktivnost izražena je kao IC<sub>50</sub>, odnosno koncentracija ekstrakta koja hvata 50 % slobodnih DPPH radikala u otopini (Shadidi i Zhong, 2015). Što je IC<sub>50</sub> vrijednost manja, antiradikalna aktivnost ekstrakta je veća. Rezultati su prikazani na Slici 7.



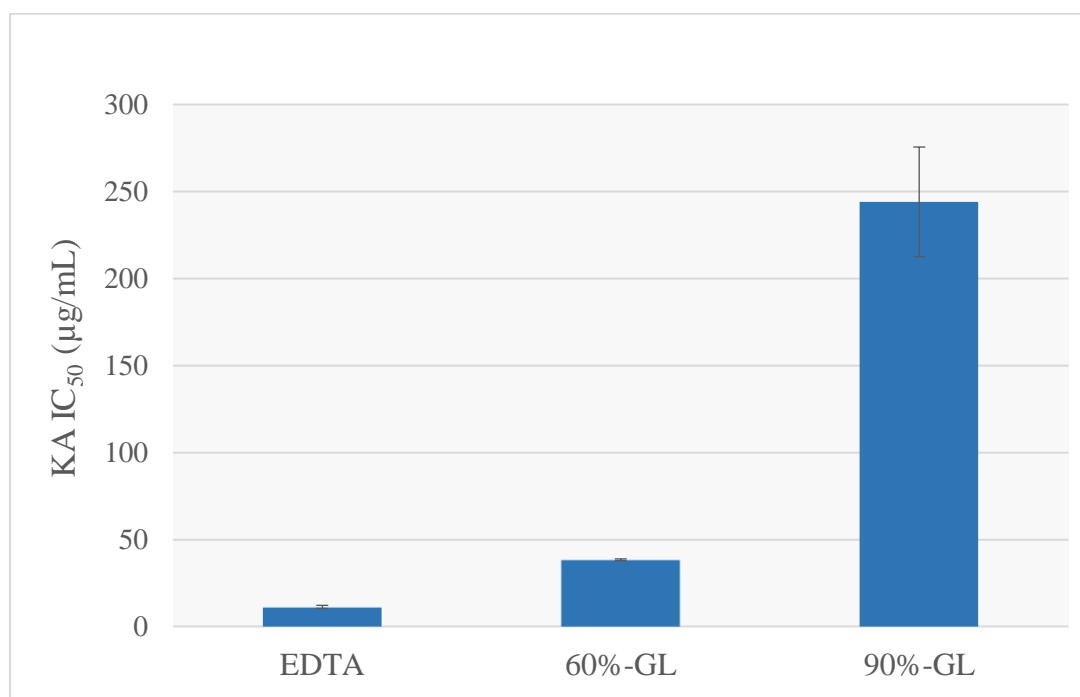
**Slika 7.** Antiradikalna aktivnost ekstrakata u usporedbi s BHA kao standardom.

Prema rezultatima ekstrakti imaju slabiju antiradikalnu aktivnost naspram pozitivne kontrole BHA. Ekstrakt 90%-GL pokazao je bolju antiradikalnu aktivnost, što upućuje na to da se antiradikalna aktivnost više temelji na prisustvu flavonoida nego fenolnih kiselina kojih ima znatno manje nego ekstrakt 60%-GL. Iako fenolne kiseline djeluju kao dobri antioksidansi, u ovom istraživanju nema pozitivne korelacije između sadržaja fenolnih kiselina i antiradikalne aktivnosti. No, moguće je da fenolne kiseline sadržane u hmeljastoj viji svoj antioksidativni učinak ispoljavaju pomoću drugih mehanizama. Isto tako moguće je da neke druge sastavnice prisutne u *M. lupulina* imaju bolje antiradikalno djelovanje, no potrebna su daljna istraživanja kako bi se to utvrdilo.

Uspoređujući s ostalim istraživanjima na biljci *M. lupulina*, glicerolni ekstrakti ispitivani u ovom radu imaju znatno višu antiradikalnu aktivnost nego metanolni ekstrakti ispitivani u Poljskoj (Kicel i Olszewska, 2015). U istraživanju (Jakupović i sur., 2021) također je dobivena slabija antiradikalna aktivnost naspram pozitivne kontrole BHA, no pokazano je da ekstrakt pripremljen sa 45 %-tnom otopinom glicerola ima bolju aktivnost od polipropilenglikolnog ekstrakta.

## 4.5. ODREĐIVANJE KELIRAJUĆE AKTIVNOSTI

Kelirajuća aktivnost temelji se na mjerenju apsorbanije  $\text{Fe}^{2+}$ -ferozin kompleksa. U prisutnosti ekstrakta koji ima mogućnost keliranja  $\text{Fe}^{2+}$ , smanjuje se njegova koncentracija u otopini, nakon toga dodaje se ferozin koji reagira s preostalim  $\text{Fe}^{2+}$  kationima. Prema tome može se reći da je apsorbanija, a samim time i koncentracija kompleksa  $\text{Fe}^{2+}$ -ferozin obrnuto proporcionalna kelirajućoj moći ekstrakta (Abdelhakim i sur., 2019). Sposobnost keliranja metala koristi se kao indikator za antioksidativnu aktivnost. EDTA se koristi kao pozitivna kontrola obzirom da djeluje kao jaki kelator. Rezultati su prikazani na Slici 8. kao  $\text{IC}_{50}$  vrijednost, koncentracija ekstrakta koja hvata 50 %  $\text{Fe}^{2+}$  iz kompleksa s ferozinom te uzrokuje smanjenje apsorbanije za polovicu vrijednosti.



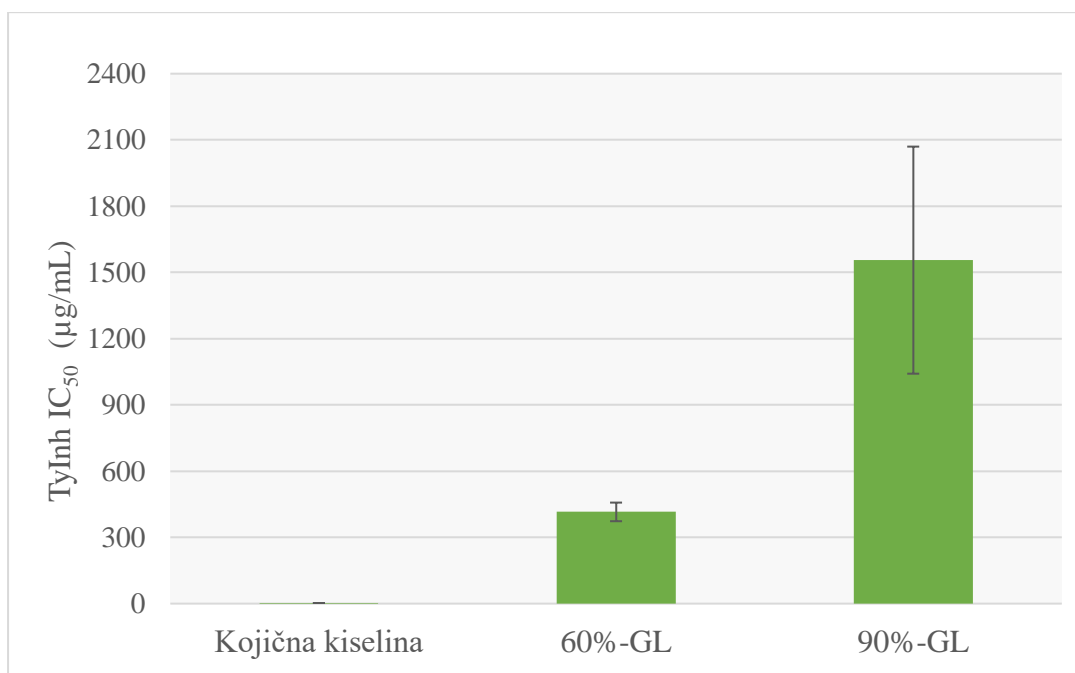
**Slika 8.** Kelirajuća aktivnost ekstrakata u usporedbi s pozitivnom kontrolom EDTA.

S obzirom da ekstrakt 60%-GL ima značajno jaču kelirajuću aktivnost, a sadrži i veću količinu fenolnih kiselina, ukupnih polifenola te veliku količinu flavonoida, može se zaključiti da navedeni spojevi u ekstraktu hmeljaste vije doprinose njegovom antioksidativnom učinku keliranjem metalnih iona ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ). Uspoređujući rezultate s drugim istraživanjem (Jakupović i sur., 2021), dobivene vrijednosti za kelirajuću aktivnost ekstrakta zeleni hmeljaste vije priređenog pomoću 45 %-tnog glicerola također su manje od pozitivne kontrole EDTA.



#### 4.6. ODREĐIVANJE INHIBICIJSKE AKTIVNOSTI NA TIROZINAZU

Metoda se temelji na enzimatskoj reakciji gdje je supstrat otopina L-DOPA-e. Tirozinaza djeluje tako da katalizira reakciju oksidacije L-DOPA-e u dopakinon (smeđe obojenje) koji neenzimskim reakcijama polimerizira u pigment melanin. Ispitivanje inhibicijskog svojstva ekstrakta provodi se dodavanjem enzima tirozinaze i supstrata L-DOPA-e u reakcijsku smjesu. Dodatkom ekstrakta kao inhibitora u reakcijsku otopinu tirozinaze i supstrata L-DOPA-e usporava se razgradnja L-DOPA-e u dopakinon. Smanjena količina dopakinona vidljiva je kao smanjenje intenziteta smeđeg obojenja koje je proporcionalno koncentraciji inhibiranog enzima tirozinaze (Khodaei i sur., 2019). Rezultati su prikazani kao  $IC_{50}$  vrijednost, odnosno kao koncentracija ekstrakta (ili pozitivne kontrole) koja inhibira 50 % aktivnosti tirozinaze. Što je  $IC_{50}$  vrijednost manja, to je sposobnost inhibicije tirozinaze veća. Rezultati su prikazani na Slici 9.



**Slika 9.** Sposobnost inhibicije tirozinaze prikazano kao  $IC_{50}$  vrijednost u usporedbi s pozitivnom kontrolom.

S obzirom da *M. lupulina* sadrži fenolne spojeve koji imaju dobro inhibirajuće djelovanje na tirozinazu, u literaturi (Jakupović i sur., 2021) dobiveno je da ima slabo inhibirajuće djelovanje, pa se pokus u ovom diplomskom radu ponovio. No, iz rezultata je vidljivo da kojična kiselina kao pozitivna kontrola ima znatno jače inhibicijsko djelovanje na tirozinazu. Iako ekstrakt 60%-GL ima dosta jače inhibicijsko djelovanje naspram ekstrakta

90%-GL, to su svejedno zanemarivo male vrijednosti. S obzirom da postoje i drugi mehanizmi kojim fenolni spojevi, odnosno antioksidansi inhibiraju melanogenezu i hiperpigmentaciju, potrebna su daljna istraživanja da bi se vidjelo potencijalno korištenje biljke i njenih sastavnica u dermatološkim pripravcima.

## 5. ZAKLJUČAK

Ekstrakti dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom pri različitim glicerolnim udjelima korišteni su u ispitivanju bioloških učinaka zeleni hmeljaste vije. Spektrofotometrijskim metodama odredio se ukupan sadržaj polifenola, flavonoida te fenolnih kiselina. Pokazano je da ekstrakti imaju mali sadržaj ukupnih polifenola, no određivanjem flavonoida i fenolnih kiselina pokazano je da su ekstrakti bogati flavonoidima i fenolnim kiselinama. Također, pokazano je da ekstrakt 60%-GL ima dvostruko veću količinu fenolnih kiselina nego ekstrakt 90%-GL. Nadalje, određivanjem antiradikalne aktivnosti pokazano je da ekstrakt 90%-GL djeluje kao dobar čistač slobodnih radikala, što se može pripisati velikoj količini flavonoida koju ekstrakt sadrži. Ekstrakt 60%-GL pokazao je slabu antiradikalnu aktivnost, ali je imao dobro svojstvo keliranja  $Fe^{2+}$  iona, što bi se moglo prepisati većoj količini polifenola i fenolnih kiselina u odnosu na ekstrakt 90%-GL. Prema tome *M. lupulina*, s obzirom na relativno dobru antioksidativnu aktivnost, ima potencijal za korištenje u dermatološkim pripravcima protiv starenja kože. Ispitivanje inhibicijskog djelovanja na tirozinazu pokazalo je da biljka nema inhibirajuće djelovanje, no kako je u jednom istraživanju dokazano da biljka sadrži kumestrol koji djeluje kao inhibitor sinteze melanina, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se pokazao potencijal biljke za primjenu u dermatološke svrhe.

## 6. LITERATURA

- Abdelhakim S, Rima B, Abdelouahab B. Heavy metals chelating ability and antioxidant activity of phragmites Australis stems extracts. *J Ecol Eng*, 2019, 20, 116–123.
- Agbor G, Vinson J, Donnelly PE. Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *Int J Food Sci Nutr Diet*, 2014, 147-156.
- Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agroindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*, 2006, 99, 191–203.
- Baloch N, Nabi S. 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.
- 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 Photobio B*, 2017, 173, 686-695.
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal*, 2002, 10, 178-182.
- Chemat F, Vian MA, Cravotto G. Green extraction of natural products: Concept and principles. *Int J Mol Sci*, 2012, 13, 8615–8627.
- Dai J, Mumper RJ. Plantphenolics: extraction, analysis and the antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 2010, 15, 7313-7352.
- D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*, 2007, 43, 348–361.
- Datta K, Sinha S, Chattopadhyay P. Reactive oxygen species in health and disease. *Natl Med J India*, 2000, 13, 304-310.
- De Beer D, Joubert E, Gelderblom W.C.A, Manley M. Phenolic Compounds: A Review of Their Possible Roles as In Vivo Antioxidants of Wine. *S Afr J Enol Vitic*, 2002, 23, 48-61.
- Decker EA, Welch B. Role of Ferritin as a Lipid Oxidation Catalyst in Muscle Food. *J Agric Food Chem*, 1990, 38, 674-677.

- Ding DN, Xie LZ, Shen Y, Li J, Guo Y, Fu Y, Liu FY, Han FJ. Insights into the Role of Oxidative Stress in Ovarian Cancer. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 8388258.
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002, 82, 47–95.
- European Pharmacopeia, Fifth Edition (Eur.Ph. 5,0), Council of Europe, Strasbourg Cedex, 2004, Vol. 1, 222.
- Hanamura T, Uchida E, Aoki H. Skin-lightening effect of a polyphenol extract from Acerola (Malpighia emarginata DC.) fruit on UV-induced pigmentation. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 71, 3211-3218.
- Jakupović L, Kalvarešin M, Bukovina K, Poljak V, Vujić L, Zovko KM. Optimization of Two Eco-Friendly Extractions of Black Medick (*Medicago lupulina* L.) Phenols and Their Antioxidant, Cosmeceutical,  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase Inhibitory Properties. *Molecules*, 2021, 26, 1610.
- Khodaei M, Amanzadeh Y, Faramarzi M, Pirali-Hamedani M, Adhami H, Cholinesterase Inhibitory, Anti-oxidant and Anti-tyrosinase Activities of Three Iranian Species of Dracocephalum, *Research Journal of Pharmacognosy*, 2019, 6, 25-31.
- 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.
- Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *Sci World J*, 2013, 2013, 162750.
- Kumazawa S, Hasamaka T, Nakayama T. Antioxidant Activity of Propolis of Various Geographic Origins. *Food Chem*, 2004, 84, 329-339.
- Lattanzio V. Phenolic Compounds: Introduction. U: Natural Products. Ramawat KG, Mérillon JM, urednici, Berlin, *Springer Berlin Heidelberg*, 2013, 1543–1580.
- Lei TC, Virador VM, Vieira WD, Hearing VJ. A Melanocyte–Keratinocyte Coculture Model to Assess Regulators of Pigmentation in Vitro. *Anal Biochem*, 2002, 305, 260-268.
- Medicago lupulina*, [https://en.wikipedia.org/wiki/Medicago\\_lupulina](https://en.wikipedia.org/wiki/Medicago_lupulina), pristupljeno 29.10.2021.

- Nicolle C, Carnat A, Fraisse D, Lamaison JL, Rock E, Michel H, Amouroux P, Remesy C. Characterisation and Variation of Antioxidant Micronutrients in Lettuce (*Lactuca Sativa* Folium). *J Sci Food Agric*, 2004, 84, 2061–2069.
- Nishiumi S, Miyamoto S, Kawabata K, Ohnishi K, Mukai R, Murakami A, Ashida H, Terao J. Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2011, 3, 1332-1362.
- Pandel R, Poljšak B, Godić A, Dahmane R. Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention. *ISRN Dermatol*, 2013, 2013, 930164.
- Pereira D, Valentao P, Pereira, Andrade P. Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*, 2009, 14, 2202-2211.
- Petruk G, Del Giudice Rita, Rigano MM, Monti DM. Antioxidants from Plants Protect against Skin Photoaging. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 1454936.
- Pillaiyar T, Manickam M, Namasivayam V. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2017, 32(1), 403-425.
- Poljšak B, Dahmane RG, Godić A. Intrinsic skin aging: The role of oxidative stress. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*, 2012, 21, 33-36.
- Sandhar KH, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Int Pharm Sci*, 2011, 1, 25-41.
- Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in food, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects-A review. *J funct foods*, 2015, 18, 820-897.
- Shadidi F, Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. *J funct foods*, 2015, 18, 757-781.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Meth Enzymol*, 1999, 299, 152-178.
- Turkington R, Cavers PB. The biology of Canadian weeds. 33. *Medicago lupulina* L. *Can J Plant Sci*, 1979, 59, 99-110.
- Zagórska-Dziok M, Ziemiańska A, Nizioł-Łukaszewska Z, Bujak T. Antioxidant Activity and Cytotoxicity of *Medicago sativa* L. Seeds and Herb Extract on Skin Cells. *Biores Open Access*, 2020, 9, 229-242.

## 7. SAŽETAK

Oksidativni stres ima važnu ulogu u procesu starenja kože i razvoju kroničnih bolesti povezanih sa starenjem. S obzirom da polifenoli imaju snažno antioksidativno djelovanje te smanjuju učinak oksidativnog stresa na starenje kože, česti su sastojci dermatoloških i kozmetičkih proizvoda. Cilj istraživanja bio je spektrofotometrijski odrediti sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida te fenolnih kiselina u glicerolnim ekstraktima zeleni hmeljaste vije. Kako bi se utvrdilo potencijalno korištenje ekstrakata u topičkim pripravcima, korištene su metode za određivanje antioksidativne aktivnosti. Ispitana je antiradikalna aktivnost korištenjem DPPH reagensa te kelirajuća aktivnost prema  $Fe^{2+}$  ionima. Biološka aktivnost inhibicije tirozinaze u svrhu potencijalnog korištenja biljke protiv poremećaja pigmentacije na koži ispitana je enzimskom metodom. Istraživanje je pokazalo da ekstrakt pripremljen u 60 %-tnom glicerolu kao ekstrakcijskom otapalu ima bolju kelirajuću aktivnost te je bogatiji fenolnim kiselinama u odnosu na ekstrakt pripremljen u 90 %-tnom glicerolu. Ekstrakt pripremljen u 90 %-tnom glicerolu nešto je bogatiji flavonoidima te ima bolje antiradikalno djelovanje. Ekstrakti su pokazali zanemarivo inhibirajuće djelovanje na tirozinazu. S obzirom na relativno dobru antioksidativnu aktivnost, *M. lupulina* ima potencijal za korištenje u dermatološke i kozmetičke svrhe, no potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdile njezine značajke u odnosu na druge biljne vrste koje se koriste u kozmetičke svrhe.

## SUMMARY

Oxidative stress plays an important role in the aging process of the skin and the development of chronic diseases associated with aging. Since polyphenols have a strong antioxidant effect and reduce the effect of oxidative stress on skin aging, they are common ingredients in dermatological and cosmetic products. The aim of the study was to spectrophotometrically determine the content of total polyphenols, flavonoids, and phenolic acids in glycerol extracts of black medick aerial parts. Methods for determining antioxidant activity were used to determine the potential use of extracts in skin products. Antiradical activity using DPPH reagent and chelating activity against  $\text{Fe}^{2+}$  ions were investigated. The biological activity of tyrosinase inhibition for the potential use of plant against skin pigmentation disorders was investigated by an enzymatic method. The study showed that the extract prepared in 60 % glycerol as an extraction solvent has better chelating activity and is richer in phenolic acids compared to the extract prepared in 90 % glycerol. The extract prepared in 90 % glycerol is slightly richer in flavonoids and has better antiradical effect. The extracts showed negligible inhibitory activity on tyrosinase. Due to its relatively good antioxidant activity, *M. lupulina* has the potential to be used for dermatological and cosmetic purposes, but further research is needed to assess its activity in comparison with other species that are used for cosmetic purposes.



## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### BIOLOŠKA AKTIVNOST GLICEROLNIH EKSTRAKATA ZELENH HMEJASTE VIJE (*Medicago lupulina* L.)

Mateja Horvat

#### SAŽETAK

Oksidativni stres ima važnu ulogu u procesu starenja kože i razvoju kroničnih bolesti povezanih sa starenjem. S obzirom da polifenoli imaju snažno antioksidativno djelovanje te smanjuju učinak oksidativnog stresa na starenje kože, česti su sastojci dermatoloških i kozmetičkih proizvoda. Cilj istraživanja bio je spektrofotometrijski odrediti sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida te fenolnih kiselina u glicerolnim ekstraktima zelenih hmeljaste vije. Kako bi se utvrdilo potencijalno korištenje ekstrakata u topičkim pripravcima, korištene su metode za određivanje antioksidativne aktivnosti. Ispitana je antiradikalna aktivnost korištenjem DPPH reagensa te kelirajuća aktivnost prema  $Fe^{2+}$  ionima. Biološka aktivnost inhibicije tirozinaze u svrhu potencijalnog korištenja biljke protiv poremećaja pigmentacije na koži ispitana je enzimskom metodom. Istraživanje je pokazalo da ekstrakt pripremljen u 60 %-tnom glicerolu kao ekstrakcijskom otapalu ima bolju kelirajuću aktivnost te je bogatiji fenolnim kiselinama u odnosu na ekstrakt pripremljen u 90 %-tnom glicerolu. Ekstrakt pripremljen u 90 %-tnom glicerolu nešto je bogatiji flavonoidima te ima bolje antiradikalno djelovanje. Ekstrakti su pokazali zanemarivo inhibirajuće djelovanje na tirozinazu. S obzirom na relativno dobru antioksidativnu aktivnost, *M. lupulina* ima potencijal za korištenje u dermatološke i kozmetičke svrhe, no potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdile njezine značajke u odnosu na druge biljne vrste koje se koriste u kozmetičke svrhe.

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

Rad sadrži: 29 stranica, 6 grafičkih prikaza, 4 tablica i 37 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Hmeljasta vija, Glicerol, Polifenoli, Flavonoidi, Fenolne kiseline, Antioksidativna aktivnost, Tirozinaza

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. Maja Bival Štefan**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: travanj 2022.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### **BIOLOGICAL ACTIVITY OF BLACK MEDICK (*Medicago lupulina* L.) GLYCEROL EXTRACTS**

**Mateja Horvat**

#### **SUMMARY**

Oxidative stress plays an important role in the aging process of the skin and the development of chronic diseases associated with aging. Since polyphenols have a strong antioxidant effect and reduce the effect of oxidative stress on skin aging, they are common ingredients in dermatological and cosmetic products. The aim of the study was to spectrophotometrically determine the content of total polyphenols, flavonoids, and phenolic acids in glycerol extracts of black medick aerial parts. Methods for determining antioxidant activity were used to determine the potential use of extracts in skin products. Antiradical activity using DPPH reagent and chelating activity against  $\text{Fe}^{2+}$  ions were investigated. The biological activity of tyrosinase inhibition for the potential use of plant against skin pigmentation disorders was investigated by an enzymatic method. The study showed that the extract prepared in 60 % glycerol as an extraction solvent has better chelating activity and is richer in phenolic acids compared to the extract prepared in 90 % glycerol. The extract prepared in 90 % glycerol is slightly richer in flavonoids and has better antiradical effect. The extracts showed negligible inhibitory activity on tyrosinase. Due to its relatively good antioxidant activity, *M. lupulina* has the potential to be used for dermatological and cosmetic purposes, but further research is needed to assess its activity in comparison with other species that are used for cosmetic purposes.

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

Thesis includes: 29 pages, 6 figures, 4 tables and 37 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Black Medick, Glycerol, Polyphenols, Flavonoids, Phenolic acids, Antioxidant activity, Tyrosinase

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  
**Gordana Maravić Vlahoviček, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April 2022.