

# Izolacija fenolnih spojeva lovora primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku

---

Šeparović, Jelena

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:495703>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-15**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Jelena Šeparović**

7175/PT

**Izolacija fenolnih spojeva lovora primjenom ubrzane  
ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Začinsko i aromatsko bilje

**Mentor:** Doc. dr. sc. Ivona Elez-Garofulić

**Zagreb, srpanj 2021.**

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za kemiju i tehnologiju voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

**Izolacija fenolnih spojeva lovora primjenom  
ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku**

**Jelena Šeparović, 0058207869**

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je izolirati i odrediti udio ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost bioaktivnih spojeva lovora (*Laurus nobilis* L.) metodom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE). Kao otapalo za ekstrakciju koristio se 50% etanol, te su ispitivani sljedeći parametri: temperatura (90°C, 120°C, 150°C), statičko vrijeme (5 min, 10 min) i broj ciklusa (1,2,3). U dobivenim ekstraktima provedena je spektrofotometrijska analiza u kojoj su rezultati pokazali kako povišenje temperature i dulje statičko vrijeme pozitivno utječu na prinos ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost, dok povećanje broja ciklusa ima negativan utjecaj. Udio ukupnih fenola određen je u rasponu od  $26,4 \pm 1,31$  do  $58,55 \pm 0,15$  mg GAE/g, a antioksidacijska aktivnost u rasponima od  $107,50 \pm 2,99$  do  $168,04 \pm 6,53$   $\mu$ mol TE/g. Najveća koncentracija ukupnih fenola dobivena je pri temperaturi 150 °C, statičkom vremenu 10 min i broju ciklusa 1, dok je najviša antioksidacijska aktivnost izmjerena pri temperaturi 150°C, statičkom vremenu 10 min, i broju ciklusa 2.

**Ključne riječi:** ASE ekstrakcija, antioksidacijska aktivnost, fenolni spojevi, lovor

**Rad sadrži:** 28 stranica, 8 slika, 5 tablica, 39 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** doc.dr.sc. Ivona Elez-Garofulić

**Pomoć pri izradi:** mag.nutr. Erika Dobrosravić

**Datum obrane:** 8. srpanj, 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

### Undergraduate thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**Undergraduate study Food Technology**  
**Department of Food Technology engineering**  
**Laboratory for Chemistry and technology of fruits and vegetables**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Food Technology**

**Isolation of phenolic compounds of *Laurus nobilis* L. using accelerated solvent extraction with high pressure**

**Jelena Šeparović, 0058207869**

**Abstract:** The aim of this thesis was to isolate and to determine total phenolic content and antioxidative activity of laurel (*Laurus nobilis* L.) leaves extract using high pressure accelerated solvent extraction. Ethanol (50%) was used as solvent, and parameters examined were: temperature (90°C, 120°C, 150°C), static time (5 min, 10 min) and cycle number (1, 2, 3). Results of spectrophotometric analysis conducted on isolated extracts showed that temperature elevation and static time prolongation positively affected total phenolic content and antioxidative activity while higher cycle number had negative effect. Total phenolic content was measured in range of 26,4±1,31 do 58,55±0,15 mg GAE/g, while antioxidative activity was measured in range of 107,50±2,99 do 168,04±6,53 µmol TE/ g. The highest total phenolic content was determined in extract at 150 °C, static time 10 min, and cycle number 1. The highest antioxidative activity was determined in extract obtained at 150 °C, static time 10, and cycle number 2.

**Keywords:** ASE extraction, antioxidant activity, laurus nobilis, phenolic compounds

**Thesis contains:** 28 pages, 8 figures, 5 tables, 39 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** doc.dr.sc. Ivona Elez-Garofulić

**Technical support and assistance:** mag.nutr. Erika Dobrosłavić

**Defence date:** July 8<sup>th</sup>, 2021

***Ovo istraživanje provedeno je u okviru projekta „Bioaktivne molekule ljekovitog bilja kao prirodni antioksidansi, mikrobiocidi i konzervansi“ (KK.01.1.1.04.0093), koji je sufinanciran sredstvima Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj - Program: Ulaganje u znanost i inovacije; Operativni program Konkurentnost i kohezija 2014. -2020.***

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
<b>2.1. O Lovoru</b> .....	2
<b>2.2. Kemijski sastav lovora</b> .....	3
<b>2.3. Fenolni spojevi lovora</b> .....	5
<b>2.4. Antioksidacijska aktivnost lovora</b> .....	7
<b>2.5. Ekstrakcija</b> .....	8
<b>2.5.1. ASE ekstrakcija</b> .....	9
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	11
<b>3.1. Materijali</b> .....	11
<b>3.2. Metode</b> .....	11
<b>3.2.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku</b> .....	11
<b>3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola</b> .....	13
<b>3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom</b> .....	16
<b>4.1. Rezultati ASE ekstrakcije ukupnih fenola</b> .....	19
<b>4.2. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti</b> .....	22
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	24
<b>6. LITERATURA</b> .....	25

## 1. UVOD

Lovor je zimzelena biljka mediteranskog područja. Koristi se kao začim, eterično ulje ili u kozmetičkim proizvodima. Lovor pokazuje brojna antibakterijska, antioksidacijska i protuupalna svojstva. Bogat je bioaktivnim spojevima kao što su fenoli i flavonoidi, koji znatno doprinose njegovoj visokoj antioksidacijskoj aktivnosti.

Kod izolacije bioaktivnih spojeva sve češće se daje prednost modernim, nekonvencionalnim tehnikama ispred konvencionalnih metoda. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (eng. *Accelerated Solvent Extraction*, ASE) je nekonvencionalna metoda koja se koristi za izolaciju bioaktivnih spojeva. Prednosti ASE tehnike pred konvencionalnim metodama su te da je ekstrakcija puno brža, utrošak energije je manji, te je okolišno prihvatljivija. ASE je automatizirana metoda kod koje se ekstrakcija provodi pri povišenoj temperaturi i tlaku što omogućuje veće iskorištenje ekstrakcije, a pogodna je i za ekstrakciju spojeva koji su osjetljivi na povišenu temperaturu.

Cilj ovog rada je izolirati fenolne spojeve iz listova lovora (*Laurus nobilis* L.) i odrediti antioksidacijsku aktivnost. Izolacija je provedena pomoću ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE). Kao ekstrakcijsko otapalo korišten je 50% etanol, a parametri ekstrakcije koji su ispitivani su: temperatura (90, 120, 150), statičko vrijeme (5 i 10 min), te broj ciklusa (1, 2, 3). Dobiveno je 18 ekstrakata lista lovora u kojima je spektrofotometrijski određen udio ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. O Lovoru

Lovor (*Laurus nobilis* L.) je biljka koja pripada porodici *Lauraceae*, raste kao zimzeleno stablo ili grm na područjima Sredozemlja i južne Europe, a donesen je u Europu iz područja Male Azije. Listovi lovora su tamnozeleno boje, kožasti i zašiljenog oblika (slika 1). Životni vijek lovora je i do 100 godina (Dudaš i Venier, 2009). Lovor daje male mirisne cvjetove, zvjezdastog oblika, u kasno proljeće i rano ljeto, iza kojih slijede male, okrugle, zelene bobice koje sazrijevaju u tamnu ljubičastocrnu boju u jesen (Özcan i Chalcat, 2005). Bobice lovora su jednosjemene, jajolikog oblika, tankog i naboranog perikarpa, koji kad se rascijepi, odvaja se koštica čija je sjemena ovojnica vezana uz unutrašnjost perikarpa (Petkova i sur., 2019). Lovor je bio obožavan zbog svoje ljepote i aromatičnih listova još u doba starih Grka i Rimljana (Özcan i Chalcat, 2005). Oni su ih koristili za ovjenčavanje pobjednika krunama napravljenim od lovorovih listova. Danas se lovor proizvodi u mnogim zemljama na Mediteranu kao što su Francuska, Grčka, Portugal, Turska, Alžir, Španjolska, ali i u Meksiku, i južnom dijelu SAD-a. U Hrvatskoj, lovor raste s ostalim zimzelenim grmljem ili pojedinačno. Staništa lovora su makije, kamenjari do 300-400 m nadmorske visine (Dudaš i Venier, 2009).



**Slika 1.** Lovorov list (Anonymus, 2011)



Listovi lovora često se koriste za razne svrhe, za pripremu čajeva, kao začini ili kao lijek. U kulinarstvu se sušeni lovorov list tradicionalno koristi kao začini za variva, gulaše, juhe. Zastupljen je pri konzerviranju i pakiranju suhog voća, pogotovo smokava, radi aromatiziranja i kao repelent (Dudaš i Venier, 2009). Osim kao začini, koristi se i za ublažavanje probavnih problema, kao što su nadutost i loša probava. Ekstrakti lovorovog lista su ispitivani zbog dobrog zacjeljivanja rana, citotoksičnosti i tripanocidnih svojstava (Dall'Aqua i sur., 2009). Listovi lovora se mogu koristiti svježi ili sušeni. Miris sušenih samljevenih ili nasjeckanih listova je jači od onoga kod svježih listova lovora, međutim ne bi ih trebalo čuvati dulje od godinu dana jer će izgubiti svoju aromu (Özcan i Chalchat, 2005).

Eterično ulje lovora koristi se u kozmetičkoj industriji za proizvodnju različitih pripravaka, sapuna i parfema (Özcan i Chalchat, 2005). Prema Caredda i sur. (2002) koristi se i u pripravcima za kosu za prevenciju prhuti i kao tretman protiv psorijaze. Osim toga, eterično ulje lovora poznato je po svojim antimikrobnim i insekticidnim svojstvima, te se može koristiti kao konzervans za hranu.

## **2.2. Kemijski sastav lovora**

Eterična ulja su dobivena iz jednog ili više dijelova biljke kao što su cvijet, listovi, stabljika, kora, drvo, korijen, sjemenke ili ploda, a prinos eteričnog ulja varira među različitim dijelovima iste biljke. Količina eteričnog ulja ekstrahiranog kod biljka varira između 0,01 do 10 % (Chahal i sur., 2017).

Lovorov list sadrži od 0,08- 3 % eteričnog ulja, čiji sastav varira u ovisnosti o geografskom položaju, uvjetima rasta i razvoja biljke, okolišnim uvjetima a i samim načinima ekstrakcije. Özcan i sur. (2010) su analizirali kemijski sastav eteričnog ulja lovorovog lista i ulja sjemenke lovora s područja grada Harbiye (Turska) i identificirali 25 različitih komponenti. Glavne komponente eteričnog ulja su 1,8-cineol (44,72 %),  $\alpha$ -terpinil acetat i (12,95 %), sabien (12,82 %). U ulju sjemenki lovora prisutne su u najvećem postotku linolna masna kiselina (40,79 %) i laurinska masna kiselina (38,08 %).

Caputo i sur. (2017) su identificirali 55 spojeva eteričnog ulja dobivenog hidrodestilacijom listova ubranih u južnoj Italiji. Glavna sastavnica su monoterpeni koji čine 48,6 % udjela u eteričnom ulju a glavne su komponente 1,8-cineol (31,9 %), sabien (12,2 %) i linalol (10,2 %). Ostale komponente su  $\alpha$ -terpinil acetat (5,9 %),  $\alpha$ -pinen (5,8 %),  $\alpha$ -terpineol (3,3 %), metil-eugenol (3,3 %) i drugi. Također, eterično ulje sadrži 3,4 % seskviterpena.

Özcan i Chalchat (2005) su analizirali i usporedili eterična ulja lovora od listova ubranih s raznih dijelova Turske. Prinost eteričnih ulja varirao je od 1,40 % do 2,60 %. Analizom su utvrdili prisutnost 1,8-cineola (51,73 - 68,48 %),  $\alpha$ -terpinil acetat (4,04 - 9,98 %), sabien (4,44-7,75 %),  $\alpha$ -pinen (2,83 - 4,83 %),  $\beta$ -pinen (2,58 - 3,91 %), terpinen-4-ol (1,33 - 3,24 %) i  $\alpha$ -terpineol (0,95 - 3,05 %) kao glavne komponente eteričnog ulja lovora. Najveći postotak glavnog sastojka, 1,8-cineola pronađen je u eteričnom ulju listova lovora ubranih u pokrajini Antaliji, dok su postotci sabiena i pinena manji u Antaliji nego u nekim drugim pokrajinama. Zaključuju kako vanjski čimbenici i različite lokacije utječu na relativne količine komponenta eteričnog ulja.

Kovačević i sur. (2007) analizirali su sastojke eteričnog ulja od listova ubranih sa područja Budve (Crna Gora). Glavne komponente svih analiziranih ulja su 1,8 cineol, metileugenol,  $\alpha$ -terpinil acetat. Uz glavne komponente prisutni su i  $\alpha$ - pinen,  $\beta$ -pinen, sabien i linalol. Također, napomenuto je kako nema značajne razlike u sastavu eteričnog ulja lovora dobivenog iz mladih izdanaka i eteričnog ulja dobivenog iz lista i stabljike. Politeo i sur. (2007) analizirali su komponente eteričnog ulja lovora dobivenog iz listova ubranih u srednjoj Dalmaciji. Glavna komponenta je 1,8-cineol (45,5 %), a od ostalih tu su metil-eugenol (10 %),  $\alpha$ -terpinil acetat (9,1 %), linalol (8,5 %) i sabien (5,7 %). Eterično ulje sadržava u manjim postotcima i eugenol,  $\alpha$ -pinen, terpinen-4-ol i ostale spojeve. Patrakar i sur. (2012) su analizom eteričnog ulja lovora utvrdili da sadrži terpenoide, glukozide i antocijanine.

Sellami i sur. (2011) su usporedili kemijski sastav eteričnog ulja sušenih i svježih listova lovora. Eterično ulje dobiveno iz sušenih listova sastoji se najvećim dijelom od oksidiranih monoterpena (1,8-cineol, metil eugenol, terpinen-4-ol, eugenol). Kod eteričnog ulja iz svježih listova uočena je veća količina oksidiranih seskviterpena nego u ulju iz sušenih listova.

Dudaš i Vermier (2009) su ispitivali varijabilnost sadržaja eteričnog ulja kod muških i ženskih stabala. Iz uzoraka svježih listova ubranih u zapadnoj Istri, zaključili su da postoji značajna razlika u sadržaju eteričnih ulja kod ženskih i muških biljaka. U listovima ženskih biljaka utvrđena je veća količina eteričnog ulja, a najviši sadržaj eteričnog ulja biljka je imala u ožujku i travnju (0,56 i 0,60 ml/100 g). Kod muških biljaka sadržaj eteričnog ulja kroz godinu varira između 0,20 i 0,33 ml/100 g. Preporučuje se za dobivanje eteričnog ulja branje listova ženske biljke i to u periodu tijekom cvatnje i kratko nakon cvjetanja.

Kovačević i sur. (2007) analizom cvjetova sakupljenih na području Crne Gore, su zaključili da cvjetovi sadrže manju količinu eteričnog ulja čije su glavne komponente također 1,8 cineol, metileugenol, sabien,  $\alpha$ -terpinil acetat, ali u nižim koncentracijama nego kod ulja iz listova.

Također, ustvrdili su da eterično ulje iz cvjetova sadrži višu koncentraciju  $\beta$ -kariofilena i  $\gamma$ -murolena. Fiorini i sur. (1997) su utvrdili da je prinos kod eteričnog ulja iz cvijeta 0,18%.

Petkova i sur. (2019) su istraživali kemijske komponente plodova lovora iz područja Gruzije i Grčke. Utvrdili su da plodovi lovora sadrže polifenolne spojeve, eterično ulje, lipidne frakcije, proteine i celulozu. Masne kiseline u plodovima lovora s područja Grčke su redom oleinska, linolna, laurinska i palmitinska masna kiselina, dok je kod plodova iz Gruzije redom laurinska, oleinska, linolenska i palmitinska.

### 2.3. Fenolni spojevi lovora

Fenolni spojevi u biljkama pripadaju skupini sekundarnih metabolita. To je grupa spojeva kojima je hidroksilna skupina vezana direktno na benzenski ili aromatski prsten. Jaki su antioksidansi i nosioci karakterističnog mirisa, boje i okusa.

Jednostavni fenolni spojevi u biljkama dijele se prema sljedećim grupama:

- Fenolne kiseline koje su hidroksilirani derivati benzoične kiseline i česti su u slobodnoj formi kao i vezani u estere ili glikozide
- Fenolne kiseline nastale od cimetine kiseline (kumarinska, ferulinska) koje su široke primjene, ali rijetko se nalaze u slobodnoj formi i često su dobivene esterifikacijom
- Glikozidni fenolpropanoidni esteri (Škerget i sur., 2005)

Prema Petkova i sur. (2019) plodovi lovora sadrže dvanaest fenolnih kiselina. Dominantni spojevi plodova s područja Grčke su derivati cimetine i benzojeve kiseline, a flavonol, kamferol, apigenin i luteolin su dominantni spojevi plodova lovora iz Gruzije. Glavne fenolne kiseline plodova iz područja Grčke su *p*-kumarinska (261,6  $\mu\text{g/g}$ ) i vanilinska (253,1  $\mu\text{g/g}$ ), dok je kod plodova iz Gruzije to vanilinska (105,6  $\mu\text{g/g}$ ), kafeinska (439,2  $\mu\text{g/g}$ ) i siringinska kiselina (390,7  $\mu\text{g/g}$ ). Nađene su više koncentracije flavonoida kao što su mircetin, kvercetin, i kamferol u odnosu na druge studije provedene na plodovima lovora.

Muñiz-Márquez i sur. (2013) su najbolje uvjete za ekstrakciju fenolnih spojeva dobili ekstrakcijom 40 min pomoću 35 % etanola, 12 mL na 1 gram uzorka lovora. Ukupan prinos iznosio je  $17,32 \pm 1,52$  mg/g. Rezultati pokazuju da korištenje većih volumena otapala pridonosi većem prinosu bioaktivnih spojeva s obzirom na to da ubrzava proces difuzije, što djeluje povoljno na povećanje prinosa polifenolnih spojeva. Ukupni udio fenola u njihovom uzorku iznosi varira između  $3,52 \pm 0,52$  do  $17,32 \pm 1,52$  mg/g.

Brojna istraživanja pokazala su kako biljni ekstrakti dobiveni pomoću polarnih otapala pokazuju visoku koncentraciju fenola. Ekstrakti koji imaju najviše fenola pokazuju i najveću antioksidativnu aktivnost.

Flavonoidi su grupa polifenolnih spojeva koji se nalaze u mnogim biljkama. Najviše se nalaze u sjemenkama, kori drveća, voća, lišću i cvijeću. Nastaju kao aglikoni, glikozidi i metilirani derivati.

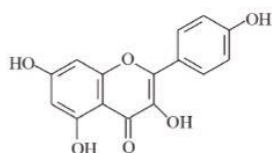
Mogu se podijeliti u grupe flavonoida i flavonoidnih spojeva s obzirom na stupanj oksidiranosti centralnog piranskog prstena na: flavone, flavonole, flavanone, izoflavone, flavane, flavanole i antocijanine (Škerget i sur., 2005).

Glavni flavonoidi lovora su kvercetin, kamferol, rutin i njihovi derivati. Kamferol (slika 2) se pojavljuje u formi četiri nepolarna glikozida. Količina flavonoida igra značajnu ulogu u antioksidacijskom kapacitetu lovora (Kaurinovic i Vastag, 2019).

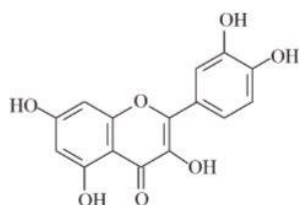
Dall Aqua i sur. (2009) su izolirali iz lovora flavonoide: kamferole, kvercetin(slika 3), katehin. Udio ukupnih fenola u njihovom uzorku iznosio je 1,03 mg/L GAE.

Škerget i sur. (2005) su koncentraciju fenolnih spojeva mjerili pomoću UV spektrometra nakon ekstrakcije fenolnih spojeva pomoću metanola. Koncentracija fenola u uzorku lovora iznosila je 99,7 g GAE/kg ekstrakta, proantocijanidina 29,9 g/kg i flavonoida 80,1 mg/kg.

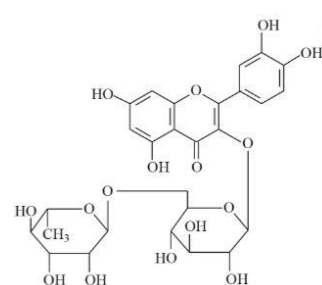
Prema Kaurinovic i Vastag (2019) količina ukupnih fenola u njihovom uzorku varirala je od 2,41 mg GAE/g do 4,53 mg GAE/g uzorka etanolnog ekstrakta. Glavne bioaktivne komponente su kamferol-3-O-glukozid, kvercetin i rutin (slika 4). Fenolne kiseline se također nalaze u lovoru u visokoj koncentraciji i to najviše kafeinska (16,18  $\mu\text{g/g}$ ), klorogenska (13,11  $\mu\text{g/g}$ ) i *p*-hidroksibenzojeve kiselina (38,46  $\mu\text{g/g}$ ).



**Slika 2.** Kamferol (Kaurinovic i Vastag, 2019)



**Slika 3.** Kvercetin (Kaurinovic i Vastag, 2019)



**Slika 4.** Rutin (Kaurinovic i Vastag, 2019)

## 2.4. Antioksidacijska aktivnost lovora

Antioksidansi su tvari koje pomoću svojih mehanizama sprječavaju oksidaciju drugih tvari, a u biološkim sustavima služe za neutralizaciju slobodnih radikala tako da stabiliziraju ravnotežu između nesparenih elektrona. Neutraliziraju potencijalno štetno djelovanje slobodnih radikala, onemogućuju stvaranje novih, te popravljaju nastala oštećenja. Antioksidansi u biljkama štite biljke od oksidativnih oštećenja.

Kaurinovic i Vastag (2019) su u svojem istraživanju ekstrakata lovorovog lista pokazali da flavonoidi u lovoru djeluju protiv DPPH radikala, te uočili povezanost ukupne količine fenola u lovoru i aktivnosti etanolnog ekstrakta lovora u neutraliziranju slobodnih radikala. Fenolni spojevi u lovoru pokazuju značajnu aktivnost u neutraliziranju slobodnih radikala. Osim fenolnih spojeva, kao dobri antioksidansi su se pokazali i terpenoidi.

Antioksidacijsku aktivnost eteričnog ulja lovora i metanolnog ekstrakta ulja sjemenke lovora mjerili su Ozcan i sur. (2010) pomoću dva komplementarna testa, DPPH uklanjanje slobodnih radikala i  $\beta$ -karoten/linolenska kiselina testa. Testovi su pokazali antioksidacijsku aktivnost kod oba uzorka. DPPH test je pokazao nestabilnu vrijednost za metanolni ekstrakt ulja sjemenki lovora, dok je za eterično ulje lovora IC<sub>50</sub> (polovina maksimalne inhibitorne koncentracije) iznosi 94,655 mg/mL. Kod  $\beta$ -karoten/linolenska kiselina testa mjeri se stopa inhibicije oksidacije linolenske kiseline koja kod metanolnog ekstrakta iznosi 88,76 %, dok kod eteričnog ulja lovora iznosi 64,28 %.

Patrakar i sur. (2012) su analizirali antioksidacijska svojstva liofiliziranog vodenog i etanolnog ekstrakta lovora. Oba ekstrakta pokazala su snažnu antioksidacijsku aktivnost u smanjenju snage radikala, njihovom uklanjanju, uklanjanju superoksidnih anionskih radikala i peroksidnih radikala. Različite koncentracije pokazale su različiti stopu inhibicije lipidne peroksidacije linolenske kiseline. Vodeni ekstrakt od 20  $\mu$ g/mL 84,9 % inhibicije, 40  $\mu$ g/mL 95,7 % inhibicije, a 60  $\mu$ g/mL 96,8 % inhibicije. Etanolni ekstrakt pokazuje još višu stopu inhibicije i to redom, 20  $\mu$ g/mL 94,2 %, 40  $\mu$ g/mL 97,7 % te 60  $\mu$ g/mL 98,6 % inhibiciju lipidne peroksidacije linolne kiseline.

Comforti i sur. (2006) su uspoređivali antioksidacijsku aktivnost kultiviranog i divljeg lovora, te su uočili višu antioksidacijsku aktivnost kod divljeg lovora nego kod kultiviranog. IC<sub>50</sub> vrijednost kod divljeg lovora iznosi 115 mg/mL, dok kod kultiviranog iznosi 378 mg/mL. Veću antioksidacijsku aktivnost divljeg lovora pripisuju višoj koncentraciji monoterpena i vitamina E.

Politeo i sur. (2009) su istraživali antioksidativna svojstva eteričnog ulja lovora i hlapljivih aglikona lovora. Tijekom istraživanja upotrebljavali su FRAP i DPPH metodu. DPPH metoda pokazala je da se smanjenjem koncentracije hlapljivih aglikona lovora i eteričnog ulja lovora smanjuje i antioksidacijska aktivnost. Uzorak hlapljivih aglikona u koncentraciji od 20 g/L pokazuje najveću antioksidacijsku aktivnost, a kod uzorka od 1 g/L najmanju. Uzorci eteričnog ulja pokazali su veću antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s hlapljivim aglikonima, te je najviša izmjerena pri koncentraciji od 20 g/L.

FRAP metoda je također pokazala da opadanjem koncentracije uzoraka opada i antioksidacijska aktivnost. Antioksidacijska aktivnost hlapljivih aglikona najviša je pri najvećoj koncentraciji uzorka od 20 g/L i iznosi 3,2 mmol/L, dok kod eteričnog ulja pri koncentraciji od 20 g/L iznosi 9,6 mmol/L. Antioksidacijska aktivnost slabija je kod hlapljivih aglikona lovora jer je dominantan sastojak benzil alkohol koji je slabiji antioksidans nego eugenol, glavni sastojak eteričnog ulja lovora.

Kaurinovic i sur. (2010) su ispitivali koncentraciju flavonoida u različitim ekstraktima lovora. Etil-acetatni ekstrakt lovora sadrži najveću koncentraciju ukupnih flavonoida (1,56 mg/g ekstrakta) dok vodeni ekstrakt lovorovog lista pokazuje najmanju koncentraciju flavonoida (0,76 mg/g ekstrakta). Količina flavonoida u ekstraktima određuje njihov antioksidacijski kapacitet. Istraživanjem učinkovitosti etil-acetatnog ekstrakta lovora ustvrdili su da on pokazuje najveću aktivnost u uklanjanju kisikovih i dušikovih radikala, te u sprječavanju lipidne peroksidacije. Svi ispitivani ekstrakti lovora su pokazali veliku učinkovitost u inhibiciji NO radikala i neutraliziranju superoksidnih anionskih radikala.

## **2.5. Ekstrakcija**

Ekstrakcija je tehnološka operacija potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topivost u različitim otapalima (Drmić i Režek-Jambrak, 2010). Tijekom ekstrakcije otapalo prodire u čvrstu tvar, otapa komponente iz čvrste tvari, a nakon toga slijedi separacija i izdvajanje tvari iz tekuće faze. Ekstrakcija tvari iz homogenih smjesa provodi se na osnovi njene različite topljivosti u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju (Blekić i sur., 2011). Glavni cilj ekstrakcije je izolacija željene tvari u visokom prinosu, sa što manjim udjelom nečistoća. Kod ekstrakcije spojeva iz čvrstih tvari potrebno je povećati brzinu gibanja faza, te povećati površinu djelovanja među fazama procesima homogenizacije i usitnjavanja kako bi se tvari učinkovito razdvojile. Viskoznost otapala mora biti dovoljno niska da otapalo može lako proći sloj krutih čestica, a veći protok otapala smanjuje granični sloj

između koncentrirane otopine i površine čestica, te time povećava brzinu ekstrakcije (Drmić i Režek-Jambrak, 2010). Kod odabira samog otapala potrebno je voditi računa da se otapalo ne smije razgrađivati, reagirati s ekstraktom, mora imati nizak viskozitet, te da bude sigurno i neškodljivo za korištenje. Kvaliteta dobivenih ekstrakata ovisi o samom procesu provedene ekstrakcije.

Za ekstrakciju se koriste različite konvencionalne metode kao što su:

- Destilacija – direktna destilacija eteričnih ulja; destilacija vodenom parom; destilacija vodom i parom
- Ekstrakcija otapalima – ekstrakcija otapalom ili otapalima; maceracija; ekstrakcija s uljima
- Hladno prešanje (Blekić i sur., 2011)

Konvencionalne tehnike ekstrakcije zahtijevaju duži vremenski period, imaju manju selektivnost, te zahtijevaju veću čistoću otapala i višu cijenu.

Nasuprot tome, sve više se koriste nove, nekonvencionalne tehnike ekstrakcije kao što su:

- Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija
- Enzimaska ekstrakcija
- Superkritična ekstrakcija fluidima
- Visokotlačna ekstrakcija fluidima (ASE) (Azmir i sur., 2013).

Nove tehnike su selektivnije, zahtijevaju manju količinu otapala, energetski učinkovitije i sigurnije za okoliš.

### **2.5.1. ASE ekstrakcija**

Ubrzana ekstrakcija otapalima (Accelerated solvent extraction, ASE) je tehnika koja koristi vodene i organske otopine za ekstrakciju pri povišenim temperaturama i tlakovima (Luthria i sur., 2004). Predstavljena je 1995. od strane tvrtke Dionex. To je u potpunosti automatizirana brza ekstrakcijska tehnika za ekstrakciju organskih spojeva iz čvrstih i polučvrstih tvari (Mottaleb i Sarker, 2012). Sama ekstrakcija pomoću ASE uređaja (slika 5) traje otprilike 15- 25 min. Otapala koja se koriste za konvencionalne ekstrakcije mogu se koristiti i za ASE ekstrakciju, ali na višim temperaturama. Povišena temperatura kod ASE ekstrakcije ubrzava kinetiku same ekstrakcije što rezultira bržom i učinkovitijom ekstrakcijom za razliku od tradicionalnih metoda (Mottaleb i Sarker, 2012). Povišena temperatura smanjuje

viskoznost otapala koje lakše prodire u sam uzorak. Temperatura se kod ekstrakcije ne može beskonačno povećavati, jer ekstrakcija neće biti izvediva zbog prevelike degradacije uzorka (Luthria i sur., 2004). Povišeni tlak omogućuje da otapalo ostane u tekućem agregatnom stanju bez obzira na značajno povišenje temperature. Također, povoljno djeluje na iskorištenje ekstrakcije jer se zbog povišenog tlaka otapalo pumpa kroz ćeliju s uzorkom što omogućava bolji kontakt uzorka s otapalom, bržu ekstrakciju, a time i bolje iskorištenje. Kombinacija povišenog tlaka i temperature omogućuje učinkovitu, brzu i uspješnu ekstrakciju (Mottaleb i Sarker, 2012). Sama ekstrakcija zahtijeva manje otapala nego kod konvencionalnih metoda (15- 45 mL) što značajno smanjuje troškove. Povećanjem volumena uzorka, korišteni volumen otapala se također povećava, ali dužina trajanja ekstrakcije ostaje nepromijenjena (Luthria i sur., 2004). ASE uređaj radi tako da se otapalo provodi kroz ekstrakcijsku ćeliju od nehrđajućeg čelika koja sadrži zadani uzorak i zagrijava se u uređaju. Uzorak se ekstrahira direktnim kontaktom vrućeg otapala i uzorka. Po završetku ekstrakcije otapalo se u potpunosti uklanja iz ekstrakcijske ćelije u bocu za uzorak pomoću komprimiranog dušika.



**Slika 5.** ASE uređaj (www.kobis.hr)



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

Za provođenje istraživanja korišten je suhi list lovora (*Laurus nobilis* L.) s područja Lovrana ubran u studenom 2020. godine, od proizvođača Šafram d.o.o. (Zagreb, Hrvatska). Prije provođenja analiza suhi listovi lovora su usitnjeni u električnom mlincu (GT11, Tefal, Rumily, Francuska).

#### 3.2. Metode

Isolacija bioaktivnih spojeva iz uzorka lovora, provedena je primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE). Kao otapalo korišten je 50 % etanol. Ekstrakcija bioaktivnih spojeva provedena je pri različitim temperaturama, vremenu ekstrakcije i različitim brojevima ciklusa. U dobivenim ekstraktima lovora spektrofotometrijski je određen udio fenolnih spojeva i antioksidacijska aktivnost lovora.

##### 3.2.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz lista lovora (*Laurus nobilis* L.) provedena je pomoću ASE ekstraktora. Kao otapalo korišten je 50% etanol, a tijekom istraživanja varirani su sljedeći parametri: statičko vrijeme (5 min i 10 min), temperatura (90 °C, 120 °C, 150 °C) i ciklusi (1, 2, 3). Prije provedbe ekstrakcije otapalo (etanol) je potrebno odzračiti u ultrazvučnoj kupelji. Zadana masa uzorka lista lovora je 1g.

**Tablica 1.** Parametri pokusa ekstrakcije fenolnih spojeva primjenom ASE tehnike

Uzorak	% EtOH	Temperatura, °C	Ciklus	Statičko vrijeme, min
1	50	90	1	5
2				10
3			2	5
4				10
5			3	5
6				10
7		120	1	5
8				10
9			2	5
10				10

11			3	5
12				10
13		150	1	5
14				10
15			2	5
16				10
17			3	5
18				10

Pribor i aparatura :

- ASE ekstraktor, ThermoScientific™ Dionex™ ASE™ 350 (Thermo Fisher Scientific, California, SAD)
- Analitička vaga ( $\pm 0,0001$  g), (OHAUS, AX224, Parsippany, SAD)
- Ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika (Thermo Scientific, 34 mL)
- Staklene boce za ekstrakciju (Thermo Scientific, 250 mL)
- Okrugli filteri za ekstrakcijske ćelije (Thermo Scientific, Dionex™ 350/150 Extraction Cell Filters)
- Posudice za vaganje
- Odmjerne tikvice od 50mL
- Metalna žličica
- Plastične epruvete od 50 mL

Reagensi:

- Dijatomejska zemlja 6/60 mesh, 26033 (Restek Corporation, SAD)
- Etanol 50 % (Lach:ner, Neratovice, Češka Republika)

Postupak:

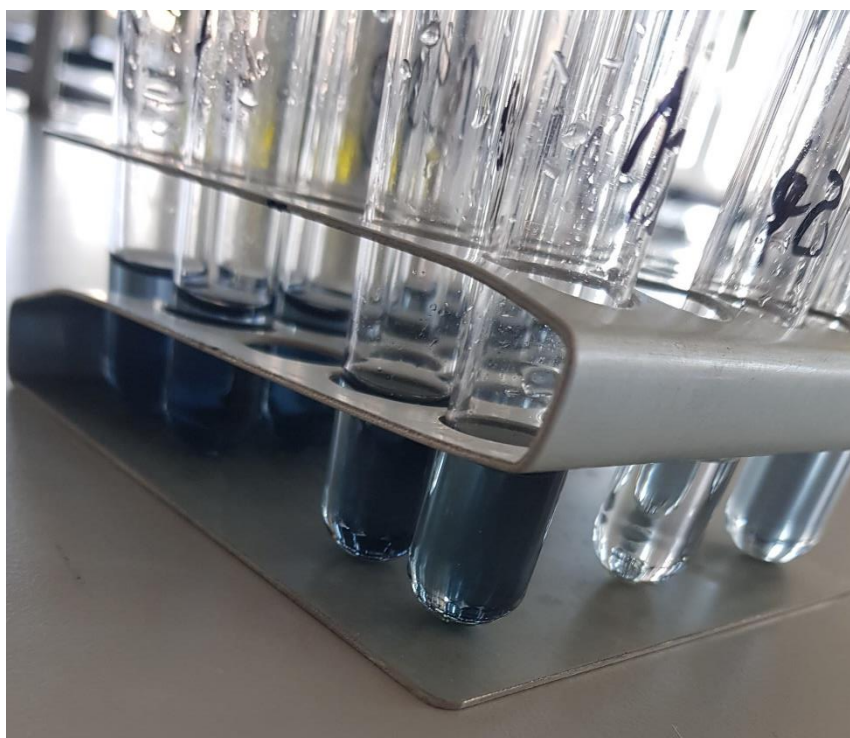
U posudicu za vaganje izvažemo približno 1 g uzorka lovora na analitičkoj vagi. Na dno ekstrakcijske ćelije postavimo dva filtera, dodamo uzorak i mjericu dijatomejske zemlje do vrha, te sve dobro izmiješamo pomoću metalne žličice. Uzorak s dijatomejskom zemljom ne smije prelaziti gornji rub ćelije (otprilike 5 mm od vrha). Na vrh ćelije postavimo dva filtera i zatvorimo. Ekstrakcijsku ćeliju i staklenu bocu za ekstrakciju postavimo u ASE uređaj na označene položaje. Za pokretanje ekstrakcije na zaslon uređaja unosimo parametre, temperaturu, broj ciklusa i vrijeme ekstrakcije. Po završetku ekstrakcije, ekstrakt je sakupljen u staklenu bocu od 50 mL. Pri vađenju staklene boce i ekstrakcijske ćelije potrebno je pripaziti

zbog visoke temperature. Nakon što se ekstrakt malo ohladi, prelijeva se u plastične epruvete od 50 mL i sprema se u hladnjak do provođenja analiza.

### 3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja:

Određivanje ukupne koncentracije fenola provodi se u etanolnom ekstraktu primjenom spektrofotometrijske metode. Temelji se na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa i polifenola koji su reducirajući reagens. Nastalo plavo obojenje (slika 6) je intenzivnije povećanjem broja hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa. Nastali intenzitet obojenja mjeri na spektrofotometru pri valnoj duljini od 765 nm (Shortle i sur., 2014).



**Slika 6.** Plavo obojenje nastalo zbog kolorimetrijske reakcije između polifenola i Folin-Ciocalteu reagensa (vlastita fotografija)

#### Pribor i aparatura:

- Spektrofotometar (VWR, UV-1600PC Spectrophotometer, Pennsylvania, SAD)
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Staklene čaše volumena 100 mL
- Vortex miješalica (IKA, MS2 Minishaker, Staufen, Njemačka)
- Mikropipete Eppendorf (100-1000  $\mu$ L, 1-5 mL)
- Kupelj rotavapora (BÜCHI Heating Bath B-490, Švicarska)

#### Reagensi:

- Folin- Ciocalteu reagens reagens (F.C. reagens) (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
- Destilirana voda
- Etanol, 50 % (Lach:ner, Neratovice, Češka Republika)
- Etanol, 96 % (Lach:ner, Neratovice, Češka Republika)
- Galna kiselina (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka)

#### Priprema otopina:

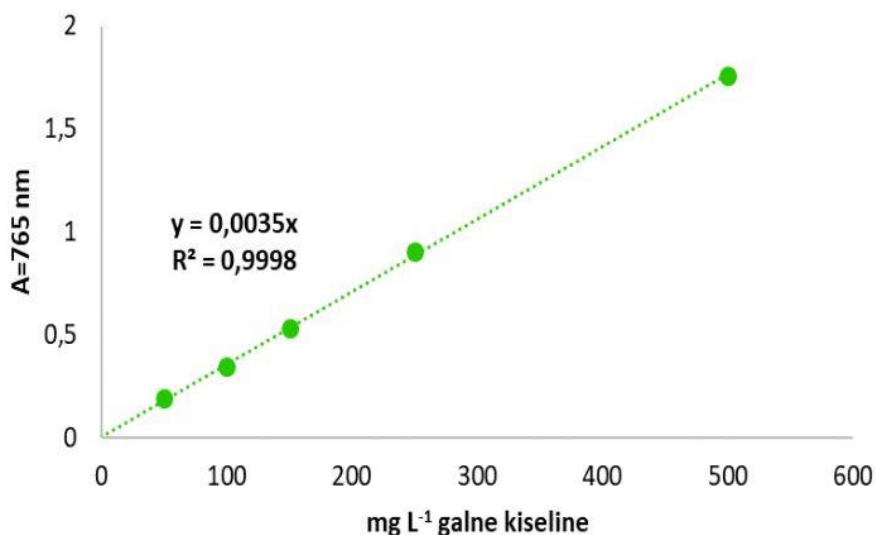
- Standard galne kiseline – odvaže se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna) – 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom se ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici do 1000 mL i nakon 24 h filtrira

#### Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100  $\mu$ L ekstrakta, 200  $\mu$ L Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Nakon toga slijedi miješanje pomoću Vortex uređaja, a potom se pripremljeni uzorci termostatiraju 25 min pri temperaturi 50 °C u kupelji rotavapora. Nakon termostatiranja uzorcima se mjeri apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini od 765 nm. Na isti način kao i uzorak priprema se slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima ekstrakcijsko otapalo (50 % EtOH).

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca odvaž se 0,5 g galne kiseline, otopi se u 10 mL 96 %- tnog etanola u odmjernoj tikvici volumena 100 mL i do oznake se nadopuni destiliranom vodom. Od pripremljene otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama volumena 100 mL tako da se otpipetira u svaku tikvicu redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline i nadopunjuju destiliranom vodom do oznake. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 100  $\mu$ L otopine standarda u staklene epruvete te se redom dodaje 200  $\mu$ L Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa i zatim se uzorci termostatiraju 25 minuta pri temperaturi 50 °C. Na isti način se pripremi slijepa proba, ali se umjesto otopine standarda uzima 100  $\mu$ L destilirane vode. Nakon termostatiranja se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrt se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisu nanose koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm (slika 7). Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



**Slika 7.** Prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0035 \times X \quad (R^2=0,9998)$$

gdje je:

Y –apsorbancija pri 765 nm

X –koncentracija galne kiseline (mg/L)

R<sup>2</sup> –koeficijent determinacije

### **3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom**

Princip određivanja:

FRAP (eng. Ferric Reducing Antioxidant Power) metoda temelji se na reakciji žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) u kiselom mediju pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridiltriazin čiji je apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Benzie, 1996; Benzie i Strain, 1996). FRAP vrijednosti se najčešće izražavaju preko FeSO<sub>4</sub> askorbinske kiseline ili trolox ekvivalenta (Benzie i Strain, 1996)

Pribor i aparatura:

- Spektrofotometar (VWR, UV-1600PC Spectrophotometer, Pennsylvania, SAD)
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Vortex miješalica (IKA, MS2 Minishaker, Staufen, Njemačka)
- Kupelj rotavapora (BÜCHI Heating Bath B-490, Švicarska)
- Mikropipete Eppendorf (100-1000 µL, 10-100 µL )
- Staklene čaše volumena 100 mL

Reagensi:

- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka)
- Željezo (III)-klorid heksahidrat (GRAM MOL, Zagreb, Hrvatska)
- Destilirana voda

- Etanol, 50 % (Lach:ner, Neratovice, Češka Republika)
- Etanol, 96 % (Lach:ner, Neratovice, Češka Republika)
- Trolox (Acros Organics, New Jersey, SAD)
- Glacijalna octena kiselina, 99-100% (CARLO ERBA Reagents, Le Vaudreuil, Francuska)

#### Priprema otopina:

- FRAP reagens – priprema se u staklenoj čaši volumena 50 mL na način da se pomiješa 25 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.
- Acetatni pufer (0,3 M, pH 3,6) – odvaži se 3,1 g natrij-acetat trihidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1 L, u koju se potom otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni se destiliranom vodom do oznake.
- Klorovodična kiselina (40 mM) – otpipetira se 330  $\mu$ L 37 %-tne klorovodične kiseline i nadopuni destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL.
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin)(10 mM) – odvaži se 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuni do oznake s 40 mM klorovodičnom kiselinom.
- Trolox (2 mM) – odvaži se 0,0501 g Troloxa. Odvaga se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom.
- Željezo (III)-klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ )(20 mM) – odvaži se 0,541 g željezo (III)-klorida heksahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake s destiliranom vodom.

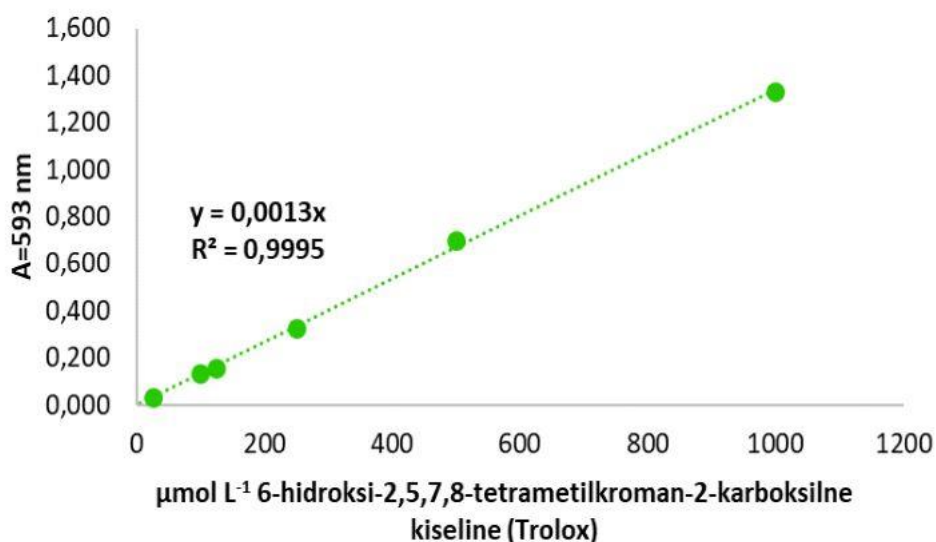
#### Postupak određivanja:

U staklene epruvete se otpipetira redom 240  $\mu$ L destilirane vode, 80  $\mu$ L uzorka i 2080  $\mu$ L FRAP reagensa. Sadržaj epruvete se dobro promiješa na Vortex uređaju, potom se termostatira 5 min na temperaturi 37 °C u kupelji rotavapora. Nakon toga mjeri se apsorbancija na spektrofotometru pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, pri čemu se umjesto uzorka dodaje ekstrakcijsko otapalo 50% EtOH.

#### Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca priprema se otopina 2 mM Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman tako da se odvaži 0,0501 g Troloxa. Odvaga se kvantitativno prenosi u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake 96 % EtOH. Od pripremljene otopine Troloxa rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da se otpipetira redom:

0,125, 0,5, 0,625 , 1,25 , 2,5 , 5 mL alikvota standardne otopine Troloxa u svaku tikvicu. Odmjerne tikvice zatim se nadopunjavaju 96 % EtOH do oznake. Koncentracije Troloxa u tim tikvicama iznose: 25, 100, 125, 250, 500 i 1000  $\mu\text{M/L}$ . Nakon toga u staklene epruvete se otpipetira 240  $\mu\text{L}$  destilirane vode, 80  $\mu\text{L}$  otopine standarda iz prethodno pripremljenih tikvica i 2080  $\mu\text{L}$  FRAP reagensa. Potom slijedi miješanje pomoću Vortexa i termostatiranje pri 37  $^{\circ}\text{C}$  u kupelji rotavapora. Apsorbancija se mjeri pri 593 nm. Slijepa proba sadrži sve osim uzorka, gdje se umjesto uzorka dodaje 96 % etanol. Iz izmjerenih vrijednosti izrađuje se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu se na apscisu nanose koncentracije troloxa ( $\mu\text{M/L}$ ), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 593 nm (slika 8). Antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom računa se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



**Slika 8.** Prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji Troloxa

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0013 \times X \quad (R^2 = 0,9995)$$

Gdje je:

Y – apsorbancija pri 593 nm

X – ekvivalent Troloxa (TE) ( $\mu\text{M/L}$ )

$R^2$  – koeficijent determinacije



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Istraživanje je provedeno u svrhu ekstrakcije i određivanja ukupnih fenola, te antioksidacijske aktivnosti lovora (*Laurus nobilis* L.) primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE). U dobivenim ekstraktima provedeno je spektrofotometrijsko mjerenje ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti. Rezultati su obrađeni u Microsoft Excel programu i prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja sa standardnom devijacijom. S obzirom na nedostatak podataka i istraživanja o ekstrakciji spojeva lovora pomoću ASE ekstraktora, rezultati su uspoređeni s drugim biljkama čija je ekstrakcija izvršena istom tehnikom.

### 4.1. Rezultati ASE ekstrakcije ukupnih fenola

Rezultati određivanja ukupnih fenola u ekstraktu lista lovora prikazani su u tablici 2. Vidljiva je promjena sadržaja ukupnih fenola s obzirom na promjenu uvjeta ekstrakcije (temperatura, statičko vrijeme, broj ciklusa).

Udio ukupnih fenola u lovorovom listu varira u rasponu od  $26,4 \pm 1,31$  do  $58,55 \pm 0,15$  mg GAE/g. Najveći udio fenola određen je u uzorku 14,  $58,55 \pm 0,15$  mg GAE/g, čiji su parametri  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ , statičko vrijeme 10 min i broj ciklusa 1. Općenito, povišenjem temperature udio fenola u ekstraktu se povećava. Kod većine uzoraka uočeno je i povećanje udjela fenola produljenjem statičkog vremena. Dužim vremenom ekstrakcije i izlaganjem uzorka otapalu povećava se udio fenola u ekstraktu.

**Tablica 2.** Rezultati analize utjecaja ekstrakcijskih parametara na udio ukupnih fenola lista lovora primjenom ubrzane ekstrakcije otapala pri povišenom tlaku

Uzorak	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	Ciklus	Statičko vrijeme min	Ukupni fenoli mg GAE/g	Stand. devijacija
1	90	1	5	28,21	0,55
2			10	34,25	0,66
3		2	5	35,20	1,51
4			10	29,33	1,82
5		3	5	29,97	1,11
6			10	26,40	1,31
7		1	5	35,10	1,87
8			10	39,79	0,56

9	120	2	5	31,33	0,40
10			10	41,60	0,50
11		3	5	41,06	1,31
12			10	48,88	1,01
13	150	1	5	48,44	1,46
14			10	58,55	0,15
15		2	5	34,82	1,21
16			10	48,20	0,10
17		3	5	48,93	1,82
18			10	52,16	0,20

**Tablica 3.** Analiza varijance utjecaja temperature, broja ciklusa i vremena ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku na koncentraciju ukupnih fenola ekstrakata lista lovora

	Ukupni fenoli, mg GAE/g	
	F	p
Temperatura, °C	749,64	0,00*
Ciklus	56,08	0,00*
Vrijeme, min	182,94	0,00*

\*statistički značajan utjecaj na 95% razini vjerojatnosti

Iz rezultata analize varijance (tablica 3) može se uočiti da su sva tri promatrana parametra ekstrakcija imala značajan utjecaj na udio ukupnih fenola ( $p > 0,05$ ). Uzorci ekstrahirani pri temperaturi 150 °C pokazuju značajno viši udio fenolnih spojeva od uzoraka ekstrahiranih pri 90 °C i 120 °C. Povećanje prinosa ukupnih fenola povišenjem temperature ekstrakcije potvrđuju i brojni literaturni podaci. Repajić i sur. (2020) su određivali količinu ukupnih fenola u listu koprive. Količina ukupnih fenola povećala se povišenjem temperature, jer se poboljšava učinkovitost ekstrakcije većom topljivosti komponenata i lakšim prodiranjem otapala u uzorak. Diaz de Cerio i sur. (2012) određivali su ukupne fenole u listovima mirte, pri čemu su zaključili da je najmanji koncentracija fenolnih spojeva pri najnižim temperaturama ekstrakcije.

Prema Howard i Pandjaitan (2008) etanol kao otapalo za ekstrakciju fenola je učinkovitiji nego voda pri temperaturama koje su više od 110 °C. U njihovom ispitivanju koncentracija ukupnih fenola u špinatu, pokazalo se da udio ukupnih fenola raste linearno u temperaturnom

rasponu od 90 do 170 °C. Ispitivani uzorak lovorovog lista slijedi tu tezu s obzirom na to da je uočljiv značajan porast koncentracije ukupnih fenola na 150 °C.

Hossain i sur. (2012) ekstrahirali su fenolne spojeve mažurana, ružmarina i origana pomoću ASE uređaja, s metanolom kao otapalom. Zaključuju da je optimalna temperatura ekstrakcije 129 °C, te je dominantan faktor pri ekstrahiranju fenola kako bi se dobio najbolji mogući prinos. Istraživanje Hossain i sur. (2012) pokazuje termalnu degradaciju uzoraka tek iznad 150 °C.

Duže statičko vrijeme povećava prinos svih komponenata pa tako i ukupnih fenola. Svi uzorci pokazuju višu koncentraciju ukupnih fenola kod dužeg statičkog vremena (10 min), osim manjih odstupanja kod uzorka 4 i uzorka 6. Duže statičko vrijeme povećava difuziju analita u ekstrakcijsku otopinu (Mottaleb i Sarker, 2012). Za razliku od fenola lovora, kod istraživanja Putnika i sur. (2017) duže statičko vrijeme pokazuje znatno opadanje koncentracije fenolnih spojeva kod lista masline, što može značajno ovisiti o primjenjenoj temperaturi kao i strukturi prisutnih spojeva.

Broj ciklusa tijekom istraživanja variran je između 1, 2 i 3 ciklusa. Za razliku od temperature i statičkog vremena, udio fenolnih spojeva nije pratio trend rasta s porastom broja ciklusa. Tako je veća koncentracija fenolnih spojeva postignuta primjenom jednog ili dva ekstrakcijska ciklusa, nego primjenom tri. Istraživanje Putnika i sur. (2017) pokazuje da broj ciklusa nije pokazao značajan utjecaj na količinu ukupnih fenola izoliranih iz lista masline.

Suprotno našim zaključcima, analiza lista koprive Repajić i sur. (2020) pokazuje pozitivan utjecaj povećanja broja ciklusa na koncentraciju ukupnih fenola. Maksimalan broj ciklusa (3) pokazao je značajno povećanje u prinosu ukupnih fenola kod lista koprive. Mottaleb i Sarker (2012) potvrdili su značajnost broja ciklusa, čija je svrha uvođenje svježeg otapala u uzorak te se time održava ekstrakcijska ravnoteža. Povećanje broja ciklusa može biti vrlo korisno za uzorke kod kojih je vrlo visoka koncentracija traženog analita ili kod kojih otapalo teže prodire u sam uzorak. Također, broj ciklusa mora biti pravilno kombiniran sa statičkim vremenom kako bi ekstrakcija bila učinkovitija (Mottaleb i Sarker, 2012).

Kao optimalni uvjeti pri kojima je prinos fenola u uzorku najveći pokazali su se temperatura 150 °C, statičko vrijeme 10 min, te broj ciklusa 1.

## 4.2. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti

Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakta lovorovog lista prikazani su u tablici 3. Vidljivo je povećanje antioksidacijske aktivnosti povišenjem temperature ekstrakcije.

Antioksidacijska aktivnost listova lovora varira od  $107,50 \pm 2,99$  do  $168,04 \pm 6,53$   $\mu\text{mol TE/ g lista}$ . Najviša antioksidacijska aktivnost utvrđena je u uzorku 16 i iznosi  $168,04 \pm 6,53$   $\mu\text{mol TE/ g lista}$ . Parametri ekstrakcije uzorka 16 su temperatura od  $150$  °C, statičko vrijeme  $10$  min, te broj ciklusa  $2$ .

**Tablica 4.** Rezultati analize utjecaja ekstrakcijskih parametara antioksidacijsku aktivnost lista lovora primjenom ubrzane ekstrakcije otapala pri povišenom tlaku

Uzorak	Temperatura °C	Ciklus	Statičko vrijeme min	Antioksidacijska aktivnost $\mu\text{mol TE/g lista}$	Stand. devijacija
1	90	1	5	111,19	0,27
2			10	107,50	2,99
3		2	5	102,66	3,26
4			10	126,80	7,06
5		3	5	141,19	2,99
6			10	114,48	1,09
7	120	1	5	117,46	1,90
8			10	159,28	5,16
9		2	5	130,27	1,09
10			10	145,99	4,35
11		3	5	141,88	1,09
12			10	151,21	6,25
13	150	1	5	122,64	0,54
14			10	146,21	2,45
15		2	5	162,32	5,70
16			10	168,04	6,53
17		3	5	152,12	0,27
18			10	137,35	8,42

**Tablica 5.** Analiza varijance utjecaja temperature, broja ciklusa i vremena ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata lista lovora

	Antioksidacijska aktivnost, $\mu\text{mol TE/g}$	
	F	p
Temperatura, $^{\circ}\text{C}$	174,27	0,00*
Ciklus	32,93	0,00*
Vrijeme, min	34,98	0,00*

\*statistički značajan utjecaj na 95% razini vjerojatnosti

Rezultati analize varijance (tablica 5) pokazuju značajan utjecaj svih promatranih ekstrakcijskih parametara na antioksidacijsku aktivnost kao i kod sadržaja ukupnih fenola. Iz dobivenih rezultata možemo uočiti da se povišenjem temperature ekstrakcije povećava antioksidacijska aktivnost. Najviša antioksidacijska aktivnost izmjerena je pri najvišoj temperaturi ekstrakcije  $150^{\circ}\text{C}$ , što je u skladu sa sadržajem ukupnih fenola.

Suprotno, istraživanje Repajić i sur. (2020) pokazuje najveću vrijednost antioksidacijske aktivnosti listova koprive pri nešto nižoj vrijednosti od  $80^{\circ}\text{C}$  i opada daljnjim povišenjem temperature na  $100^{\circ}\text{C}$ . Zaključuju da je povišenje antioksidacijske aktivnosti u drugim istraživanjima pri višim temperaturama posljedica oštećenja stanica uzorka pri čemu se sadržaj bioaktivnih spojeva u potpunosti prenosi iz uzorka u otapalo pri višim temperaturama.

Hossain i sur. (2012) svojim istraživanjem potvrđuju ovu teoriju kod uzorka mažurana, origana i ružmarina kod kojih također dolazi do povišenja antioksidacijske aktivnosti iznad optimalne temperature za njihovu ekstrakciju koja iznosi  $129^{\circ}\text{C}$ . Značajan porast FRAP vrijednosti tumače raspadom ružmarinske kiseline koja se pri višim temperaturama razgrađuje u spojeve koji imaju veću antioksidacijsku aktivnost nego ružmarinska kiselina.

Prema dobivenim rezultatima se može uočiti značaj utjecaj statičkog vremena ekstrakcije pa su ekstrakti izolirani primjenom duljeg statičkog vremena (10 min) imali višu antioksidacijsku aktivnost od onih izoliranih nakon 5 min ekstrakcije. To je u skladu sa sadržajem ukupnih fenola jer se pri duljem kontaktu otapala i uzorka ostvaruje bolja difuzija analita u ekstrakcijsko otapalo, raste koncentracija bioaktivnih spojeva te posljedično i antioksidacijska aktivnost.

Broj ciklusa tijekom ekstrakcije je povećavan (1, 2, 3 ciklusa), a rezultati analize varijance (tablica 5) pokazuju značajan utjecaj iako ne linearno pozitivan kao kod temperature i statičkog vremena ekstrakcije. Tako ekstrakti dobiveni primjenom 3 ekstrakcijska ciklusa imaju nižu antioksidacijsku aktivnost od onih dobivenih tijekom jednog ili dva ciklusa.

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku izolirani su ekstrakti lovorovog lista. Svi ekstrakti sadrže značajnu količinu fenolnih spojeva koja u ovisnosti o uvjetima ekstrakcije varira u rasponu od  $26,4 \pm 1,31$  do  $58,55 \pm 0,15$  mg GAE/g.
2. Ekstrakti lovora imaju visok antioksidacijski kapacitet koji varira u ovisnosti o uvjetima ekstrakcije od  $107,50 \pm 2,99$  do  $168,04 \pm 6,53$   $\mu\text{mol TE/g}$  lista.
3. Porast temperature i duže statičko vrijeme značajno pridonose porastu koncentracije fenola i višoj antioksidacijskoj aktivnosti zbog bolje difuzije uzorka u otapalo, te su najbolji prinosi dobiveni pri temperaturi od  $150$  °C i statičkom vremenu od 10 min. Povećanje broja ciklusa tijekom ekstrakcije nije značajnije utjecalo na povećanje prinosa fenola i antioksidacijsku aktivnost koji su bili viši pri nižem broju ekstrakcijskih ciklusa.
4. Optimalni uvjeti za ekstrakciju fenola primjenom ASE ekstrakcije su  $150$  °C, statičko vrijeme 10 min, broj ciklusa 1.
5. Uvjeti pri kojima je izmjeren najviši antioksidacijski kapacitet su  $150$  °C, statičko vrijeme 10 min, broj ciklusa 2.
6. Rezultati ovog istraživanja potvrđuju da je ASE tehnika učinkovita pri ekstrakciji bioaktivnih spojeva jer je brža i efektivnija od konvencionalnih metoda ekstrakcije.

## 6. LITERATURA

Azmir J., Zaidul I. S. M., Rahman M. M., Sharif K. M., Mohamed A., Sahena F., Omar A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* **117(4)** 426–436.

Benzie, I. F. F. (1996) An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clinical Biochemistry* **29(2)**, 111–116

Benzie I.F.F , Strain J.J (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* **239 (1)**, 70-76,

Blekić M., Režek Jambrak A., Chemat F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **3 (1)**, 32-47

Caputo L.,Nazzaro F.,Souza L.F.,Aliberti L., De Martino L.,Fratianni F.,Coppola R.,De Feo V. (2017) Laurus nobilis: Composition of Essential Oil and Its Biological Activities. *Molecules* **22 (6)**, 930

Caredda A.,Marongiu B.,Porcedda S., Soro C. (2002) Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Characterization of Laurus nobilis Essential Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 1492-1496

Conde E., Moure A., Domínguez H., Parajó, J. C. (2013). Extraction of natural antioxidants from plant foods. Separation, Extraction and Concentration Processes in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries, 506–594.

Dall'Acqua S.,Cervellati R., Speroni E., Costa S., Guerra M.C., Stella L., Greco E., Innocenti G. (2009) Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of *Laurus nobilis* L. Leaf Infusion. *Journal of medicinal food* **12 (4)**, 869–876

Dias I.M., Barros L., Dueñas M., Alves R.C., Oliveira B. P.P, Santos-Buelga C., Fererira I.C.F.R (2014) Nutritional and antioxidant contributions of *Laurus nobilis* L. leaves: Would be more suitable a wild or a cultivated sample? *Food Chemistry* **156**, 339-346

Díaz-de-Cerio E., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Ferranti P., Nicoletti R., Perrotta G. M., Gómez-Caravaca A. M. (2018). Establishment of pressurized-liquid extraction by response surface methodology approach coupled to HPLC-DAD-TOF-MS for the determination of phenolic compounds of myrtle leaves. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **410(15)**, 3547–3557.

Drmić H., Režek Jambrak A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, *Croatian Journal of Food Science and Technology* **2 (2)**, 22-33

Dudaš S., i Venier L. (2009) Varijabilnost sadržaja eteričnog ulja u listovima lovora *Laurus nobilis* L. *Glasnik zaštite bilja* **32(6)**, str. 46-54.

Djakovic S. (2017) Funkcionalne komponente hrane, Kemija i biokemija hrane, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Elmastaş M., Gülçin İ., Işildak Ö., Küfrevioğlu Ö. İ., İbaoglu K., Aboul-Enein H. Y. (2006) Radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society* **3(3)**, 258–266.

Fiorini C., Fouraste I., David B., Bessiere J.M (1997) Composition of the Flower, Leaf and Stem Essential Oils from *Laurus nobilis* L. *Flavour and Fragrance Journal* **12(2)**, 91-93

Galić L. (2020) Fenolni spojevi u biljkama, Diplomski rad, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku,

Giergielewicz-Możajska H., Dąbrowski Ł., Namieśnik J. (2001) Accelerated Solvent Extraction (ASE) in the Analysis of Environmental Solid Samples — Some Aspects of Theory and Practice. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **31 (3)**, 149-165,

Hossain M. B., Barry-Ryan C., Martin-Diana A. B., Brunton, N. P. (2011) Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. *Food Chemistry* **126(1)**, 339–346.

Howard L., Pandjaitan N. (2008) Pressurized Liquid Extraction of Flavonoids from Spinach. *Journal of Food Science* **73(3)**, C151–C157.

Kaurinovic, B., Popovic, M., Vlaisavljevic, S. (2010) In Vitro and in Vivo Effects of *Laurus nobilis* L. Leaf Extracts. *Molecules* **15(5)**, 3378–3390.

Kaurinovic B., Vastag G. (2019) Flavonoids and Phenolic Acids as Potential Natural Antioxidants. IntechOpen, str. 127 - 146.

Kovacevic N.N, Simic M.D, Ristic M.S. (2007) Essential oil of *Laurus nobilis* from Montenegro. *Chemistry of Natural Compounds* **43 (4)**, 408-411

Luthria D.L., Vinjamoori D., Noel K., Ezzell J. (2019) Accelerated solvent extraction. U: Oil extraction and analysis, 1 izd., Luthria D.L, ur., ACOS Publishing, str. 25-38



Mottaleb M. A., Sarker S. D. (2012) Accelerated Solvent Extraction for Natural Products Isolation. U: Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology, 3 izd., Sarker S., Nahar L., ur., Springer, str. 75-87

Muñiz-Márquez D.B., Martínez-Ávila G.C., Wong-Paz J.E., Belmares-Cerda R., Rodríguez-Herrera R., Aguilar C.N. (2013) Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrasonics sonochemistry* **20 (5)**, 1149–1154

Mustafa A., & Turner C. (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta* **703 (1)**, 8–18.

Ozcan B., Esen M., Sangun K., Coleri A., Caliskan M. (2010) Effective antibacterial and antioxidant properties of methanolic extract of *Laurus nobilis* seed oil, *Journal of Environmental Biology* **31 (5)**, 637-641

Özcan M., Chalchat J-C. (2005) Effect of Different Locations on the Chemical Composition of Essential Oils of Laurel (*Laurus nobilis* L.) Leaves Growing Wild in Turkey, *Journal of Medicinal Food* **8 (3)**, 408–411

Petkova Z., Stefanova G., Girova T., Antova G., Stoyanova M., Damianova S., Gochev V., Stoyaneva A., Zheljazkov V.D. (2019) Phytochemical Investigations of Laurel Fruits (*Laurus nobilis* L.) Natural Product Communications **14 (8)**, 1–10

Politeo O., Jukić M., Milo M. (2007) Chemical Composition and Antioxidant Activity of Free Volatile Aglycones from Laurel (*Laurus nobilis* L.) Compared to Its Essential Oil. *Croatica Chemica Acta* **80 (1)**, 121-126

Putnik P., Barba F. J., Španić I., Zorić Z., Dragović-Uzelac V., Bursać Kovačević, D. (2017) Green extraction approach for the recovery of polyphenols from Croatian olive leaves (*Olea europea*). *Food and Bioproducts Processing* **106**, 19–28.

Repajić M., Cegledi E., Kruk V., Pedisić S., Çınar F., Bursać Kovačević D., Žutić I., Dragović-Uzelac V. (2020) Accelerated Solvent Extraction as a Green Tool for the Recovery of Polyphenols and Pigments from Wild Nettle Leaves. *Processes* **8 (7)**, 803.

Repajić M., Ekić S., Kruk V., Dragović-Uzelac V. (2020) Effect of accelerated solvent extraction conditions on the isolation of bioactive compounds from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **15(3-4)**, 102-106

Santoyo S., Lloria R., Jaime L., Ibanez E., Senorans F.J., Reglero G. (2006) Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from *Laurus nobilis* L. Chemical and functional characterization, *European Food Research and Technology* **222 (5)**, 56

Sellami H.I., Wannes W.A., Bettaieb I., Berrima S., Chahed T., Marzouk B., Limam F. (2011) Qualitative and quantitative changes in the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves as affected by different drying methods. *Food chemistry* **126 (2)**, 691-697

Shortle E., O'Grady M.N., Gilroy D., Furey A., Quinn N., Kerr J.P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98(4)**, 828-834

Simic M., Kundakovic T., Kovacevic N. (2003) Preliminary assay on the antioxidative activity of *Laurus nobilis* extracts, *Fitoterapia* **74 (6)**, 613-616

Sun H., Ge X., Lv Y., Wang A. (2012) Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. *Journal of Chromatography* **1237**, 1-23.

Škerget M., Kotnik P., Hadolin, M., Hraš, A. R., Simonič, M., Knez, Ž. (2005) Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry* **89(2)**, 191-198.

Slika 1. Anonymus <https://www.plantea.com.hr/lovor/>, pristupljeno 11.5.2021.

Slika 5. Anonymus <https://www.kobis.hr/Prodajni-program/prodajni-program/oprema/priprema-uzoraka/accelerated-solvent-extraction-ase/>, pristupljeno 19.5.2021.

## Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

  
ime i prezime studenta