Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva u ekstraktima lista lovora (Laurus nobilis L.)

Šimac, Andrea

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:159:877748

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Andrea Šimac

6918/PT

SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE FENOLNIH SPOJEVA U EKSTRAKTIMA LISTA LOVORA

(*Laurus nobilis* L.)

ZAVRŠNI RAD

Modul: Analitička kemija

Mentor: Doc.dr.sc. Maja Dent

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je u okviru projekta˝Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane" (IP-PE-FF) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorija za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva u ekstraktima lista lovora (*Laurus nobilis* L.)

Andrea Šimac, 00582047293

Sažetak: Fenolni spojevi iznimno su važni zbog svog antioksidativnog djelovanja i pozitivnog učinka na ljudsko zdravlje. Istraživan je utjecaj otapala postupkom ekstrakcije refluksiranjem na temperaturi ključanja otapala kroz 1 h na izolaciju fenolnih spojeva iz lovora primjenom otapala: voda, etanol, etanol-voda, metanol, metanol-voda, aceton, aceton-voda, etanol-metanol-aceton i etanol-metanol-aceton-voda. Na temelju dobivenih rezultata spektrofotometrijskog određivanja masenih udjela ukupnih fenola (59,89 mg/g), flavonoida (66,12 mg/g), hidroksicimetnih kiselina (35,00 mg/g) i flavonola (61,46 mg/g), list lovora sadrži značajne masene udjele fenolnih spojeva. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da se primjenom otapala metanol postiže najveći ekstrakcijski kapacitet izolacije fenolnih spojeva iz lista lovora. Vodena otopina metanola se pokazala najpogodnijim otapalom za ekstrakciju ukupnih fenolnih spojeva iz lista lovora (*Laurus nobilis* L.), dok se čisti metanol pokazao najboljim u ekstrakciji flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola.

Ključne riječi: fenolni spojevi, lovor, ekstrakcija, otapalo
Rad sadrži: 31 stranica, 10 slika, 9 tablica, 39 literaturnih navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Mentor i pomoć pri izradi: Doc.dr.sc. Maja Dent
Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Datum obrane: 14. rujna 2018.

BASIC DOCUMENT CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Analitical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Spectrophotometric determination of phenolic compounds from bay laurel leaves extracts (*Laurus nobilis* L.)

Andrea Šimac, 00582047293

Abstract: Phenols are secondary plant metabolites of very diverse structures, which are extremely important because of their antioxidant activity and positive effects on human health. In order to investigate the effects of different solvent on extraction of phenols, using ectraction by reflux at time of 1 h, were used water, ethanol (ethanol-water), methanol (methanol-water), acetone (acetone-water), ethanol-methanol-acetone (ethanol-methanol-acetone-water). Based on the obtained values of mass fractions of phenols (59,89 mg/g) , flavonoids (66,12 mg/g), hydroxycinnamic acids (35,00 mg/g) and flavonols (61,46 mg/g) determined by UV/VIS spectrophotometry, the bay laurel leaf contains the high mass fraction of phenolic compounds. On the basis of the obtained results it can be concluded that using the solvent methanol achives the highest extraction capacity on isolation of phenolic compounds from the bay laurel leaf. An aqueous solution of methanol was found to be the most suitable solvent for extraction of the total phenolic compaunds, while pure methanol showed the best in extraction of flavonoids, hydroxycinnamic acids and flavonols.

Keywords: polyphenols, laurel, extraction, solvents
Thesis contains: 31 pages, 10 figures, 9 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 and assistance: Doc.dr.sc. Maja Dent
Defence date: September 14th 2018

SADRŽAJ

1. UVOD.....1

2. TEORIJSKI DIO.....2

2.1. Opće karakteristike i botanička obilježja.....2

2.2 Kemijski sastav lovora.....4

2.3 Fenolni spojevi.....4

2.3.1. Flavonoidi.....5

2.3.2. Fenolne kiseline 6

2.4. Metode ekstrakcije 6

2.5. UV/VIS spektrofotometrija 8

3. EKSPERIMENTALNI DIO.....9

3.1. Materijal.....9

3.2. Kemikalije.....9

3.3. Aparatura i pribor.....10

3.4. Metode rada.....11

3.4.1. Ekstrakcija refluksiranjem.....11

3.4.2. Određivanje ukupnih fenola.....12

3.4.3. Određivanje ukupnih flavonoida 13

3.4.4. Određivanje hidroksicimetnih kiselina i flavonola.....15

4. REZULTATI I RASPRAVA.....17

4.1. Ukupni fenoli.....17

4.2. Ukupni flavonoidi.....19

4.3. Ukupne hidroksicimetne kiseline i ukupni flavonoli.....21

5. ZAKLJUČAK.....26

6. LITERATURA.....27

1. UVOD

Lovor (*Laurus nobilis* L.) zimzeleno je grmoliko stablo karakteristično za mediteransko područje koje se od davnina koristi kao začin, ali i u medicinske svrhe zbog svojih protuupalnih, antioksidacijskih i antimikrobnih svojstava (Sayyah i sur., 2003). Lovor je bogat biološki aktivnim spojevima koji se većim djelom nalaze u listu. Najveći postotak zastupljenosti čine fenolni spojevi, točnije flavonoidi (kvercetin, luteolin, apigenin, kempferol, rutin i naringenin) i fenolne kiseline (vanilinska, klorogenska i siringična kiselina) (Karabegović i sur., 2014). Na sastav i koncentraciju fenolnih spojeva lovora utječu brojni faktori kao što su metoda ekstrakcije, vrsta i polarnost otapala, temperatura i vrijeme ekstrakcije, veličina čestica, omjer volumena otapala i uzorka.

Cilj ovog istraživanja bilo je spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva (ukupnih fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola) u ekstraktima lista lovora koji su dobiveni ekstrakcijom refluksiranjem primjenom različitih kombinacija otapala. Ispitivan je utjecaj upotrebe čistih otapala (voda, etanol, metanol, aceton), binarne smjese otapala (etanol-voda, metanol-voda, aceton-voda), te smjesa etanol-metanol-aceton i etanol-metanol-aceton-voda na učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva iz lista lovora.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Opće karakteristike biljke i botanička obilježja

Biljke iz roda lovora su drvenaste, vazdazelene biljke koje rastu kao drveće ili grmovi. Listovi su jednostavni, izmjenično poredani, aromatični zbog prisutnih žlijezda s eteričnim uljem. Biljke su dvodomne, a cvjetovi aktinomorfni, jednospolni, s 4 četiri pri dnu međusobno sraslih listića perigona, 8-12 prašnika poredanih po četiri u dva ili tri kruga i jednim tučkom. Prašnice se otvaraju s dva zaklopca prema unutrašnjosti cvijeta. Pri osnovici svih ili većine prašnika nalaze se po dvije žlijezde koje izlučuju nektar (medonosna vrsta). Plodnica tučka je nadrasla, s jednim sjemenim zametkom. Plod je jednosjemena, kuglasta boba promjera 1-1,5 cm koja dozrijeva u kasnu jesen (Grdinić i Kremer, 2009).

Lovor je višegodišnji, vazdazeleni mediteranski grm ili srednje visoko stablo (10-15 m) s prsnim promjerom debla do 60 cm. U mladosti je kora debela, glatka i siva, a kasnije hrapava i crna. Listovi su zavojito raspoređeni, naizmjenični, na kratkoj peteljci, jednostavni, bez palistića, eliptični do duguljasti, šiljata ili ušiljena vrha, cijela i često valovita ruba, dugi 7-12 cm, široki 2,5-4,5 cm, korasti, s gornje strani tamnozeleni i sjajni, s donje strane zeleni bez sjaja, goli i vrlo aromatični (Grdinić i Kremer, 2009).



LOVOR *(Laurus nobilis)*
1. grančica s listovima i s muškim cvjetovima, 2. grančica s listovima i plodovima, 3. muški cvijet (2×), 4. ženski cvijet (2×), 5. plod (nar. vel.)

Slika 1. Detaljni prikaz nadzemnog dijela biljke (foto: S. Maslo, Flora Croatica baza podataka)

Okus listova je pomalo opor, gorak i ljut, a miris jak i ugodan. Cvjetovi su jednospolni (biljke su dvodomne: muški i ženski cvjetovi razvijaju se na različitim stablima), sitni, žućkasto bijeli, široki oko 1 cm, s četiri listića perigona koji su pri dnu srasli, skupljeni u postrane paštitaste cvatove, a razvijaju se od ožujka do svibnja. Muški cvjetovi imaju 8-12 prašnika raspoređenih po četiri u dva ili tri kruga, a prašnice se otvaraju s dva zaklopca prema unutrašnjosti cvijeta. Pri osnovici svih ili većine prašnika nalaze se po dvije žlijezde koje izlučuju nektar. U ženskim cvjetovima je jedan tučak i 2-4 zakržljala prašnika. Iz ženskog se cvijeta razvija plod koji je tamnoplava, jednosjemena, jajolika koštunica promjera 1-1,5 cm koja dozrijeva u kasnu jesen. Mesnati dio ploda sadrži eterično ulje. Listovi se beru u kasnu jesen, suše u hladu u tankom sloju, u prozračnom i toplom prostoru oko mjesec dana (Grdinić i Kremer, 2009).



Slika 2. *Laurus nobilis* L. (foto: S. Maslo, Flora Croatica baza podataka).

2.2. Kemijski sastav lovora

Lovorov list sadrži 1-3% eteričnog ulja s glavnom sastavnicom 1,8-cineolom (do 45%), monoterpenolima (do 15% linalola, do 5% α-terpineola) te malom količinom vrlo aktivnih seskviterpenskih laktona (do 2% kostunolida, dehidrokostuslakton, artemorin, verlotorin, santamarin i reynosin). U listu su prisutne i trjeslovine u velikom postotku te malo gorkih tvari. Plod sadrži 1% eteričnog ulja, 30-40% masnih ulja te šećera i škroba (Marković, 2015).
List i plod lovora su bogati fenolnim spojevima, u najvećoj mjeri su prisutni flavonoidi i fenolne kiseline (Karabegović i sur., 2014).

2.3. Fenolni spojevi

Fenoli su jedna od najzastupljenijih i najbrojnijih skupina biljnih tvari. U skupinu fenola ubraja se više od 8000 spojeva različite kemijske strukture. Osnovna strukturna formula fenola je konjugirani oblik benzenskog ili aromatskog prstena na koji je direktno vezana hidroksilna skupina. Osnovno je obilježje fenola prisutnost jedne ili više hidroksiliranih aromatskih prstenova.
U prirodi se polifenoli uglavnom nalaze u konjugiranom obliku, tj. u obliku glikozida, s jednom ili više šećernih jedinica koje su vezane na hidroksilne skupine (premda postoje i oblici u kojima su šećerne jedinice vezane izravno na aromatski ugljikov atom). Vezani šećeri mogu biti u obliku monosaharida, disaharida pa čak i oligosaharida,a najzastupljenija šećerna jedinica je glukoza. Šećerna komponenta može sadržavati i mnoge druge šećere, poput galaktoze, ramnoze, ksiloze i arabinoze, kao i glukoronsku te galakturonsku kiselinu (Bravo, 1998). Polifenolni spojevi se mogu podijeliti u različite grupe ovisno o broju fenolnih prstena koje sadrže te na temelju strukturnih elemenata koji međusobno povezuju fenolne prstenove. Glavne grupe spojeva su fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni i lignani (Cavalcanti i sur., 2013).
Podjela fenolnih spojeva prema broju ugljikovih atoma u molekuli :

Tablica 1. Podjela fenolnih spojeva (Balasundram i sur., 2006).

C6	• jednostavni fenoli
C6-C1	• hidroksibenzojeve kiseline
C6-C2	• acetofenoni i fenilacetatne kiseline
C6-C3	• hidroksicimetne kiseline, fenilpropanoidi
C6-C4	• naftokinoni
C6-C1-C6	• ksantori
C6-C2-C6	• stilbeni i antrakinoni
C6-C3-C6	• flavonoidi, izoflavonoidi
$(C6-C3)_2$	• lignani i neolignani
$(C6-C3-C6)_2$	• biflavonoidi
(C6-C3)n	• lignin
$(C6-C3-C6)_n$	• kondenzirani tanini

2.3.1. Flavonoidi

Flavonoidi su skupina polifenolnih spojeva koji se nalaze u mnogim biljkama, koncentrirani u sjemenkama, koži ili kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću. Velik broj ljekovitih biljaka sadržava flavonoide koji imaju izraženu antioksidacijsku i antiradikalsku aktivnost.

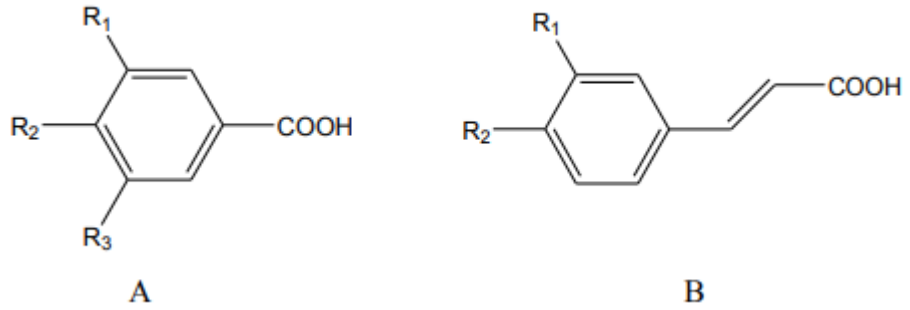
Osnovnu strukturu flavonoida čini difenilpropan (C_6-C_3-C_6) odnosno 1-fenil-3-(2-hidroksifenil)propan1-ol iz kojeg gubitkom vode i zatvaranjem C-prstena rezultira flavan od kojeg se odvodi određeni broj osnovnih struktura, flavanoni, flavan-3-oli (katehini), flavoni, flavon-3-oli, antocijanidini i izoflavoni.

U samim biljkama flavonoidi djeluju antioksidacijski, antimikrobno, kao fotoreceptori te kao agensi za privlačenje pozornosti, odbijanje od prehrane i za zaštitu od UV zračenja (Harborne, 2000). Zaštitna uloga flavonoida u biološkim sustavima pripisuje se njihovoj sposobnosti sparivanja („hvatanja") elektrona slobodnog radikala, kelatnog vezanja iona prijelaznih kovina (Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} i Mg^{2+}) (Ferrali i sur., 1997), aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiranja oksidaza (Boulila i sur., 2015). Razlike između pojedinih flavonoidnih podgrupa proizlaze iz

varijacija u broju i rasporedu hidroksilnih skupina, kao i iz prirode i stupnja njihove alkilacije i/ili glikozidacije (Kazazić, 2004).

2.3.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su široko rasprostranjeni biljni sekundarni metaboliti. Pripadaju skupini polifenola s više od 8000 prirodnih spojeva kojima je fenolna struktura, odnosno aromatski prsten s najmanje jednom hidroksilnom skupinom, zajedničko svojstvo (Robbins, 2003).
Prema osnovnoj strukturi dijele se na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline.



Slika 3. Osnovne strukture hidroksibezojevih (A) i hidroksicimetnih (B) kiselina

Najzastupljeniji derivati hidroksibenzojeve kiseline su galna, protokatehinska, vanilinska, siringinska, gentistinska i elaginska kiselina. Hidroksibenzojeve kiseline mogu nastati izravno iz međuprodukata puta šikiminske kiseline, no u biljkama i degradacijom derivata cimetne kiseline (Murković, 2003).
Najzastupljeniji derivati hidroksicimetne kiseline su kafeinska, kumarinska, ferulična i sinapinska kiselina. Predstavljaju važne građevne jedinice mnogih drugih prirodnih spojeva te često dolaze u obliku specifičnih estera, kao npr. klorogenska kiselina i ružmarinska kiselina (Ralph i sur.,1994; Russell i sur., 1999).

2.4. Metode ekstrakcije

Ekstrakcija fenolnih spojeva najčešće se provodi klasičnim metodama ekstrakcije, koje uključuju razna organska otapala. Metode ekstrakcije temelje se na miješanju uzorka s prikladnim otapalom ili se uzorak miješa sa sustavom koji je sastavljen od dva ili više otapala (Dai i Mumper, 2010). Za ekstrakciju raznih fenolnih spojeva koriste se različite metode s obzirom na velik broj različitih skupina polifenolnih spojeva s različitom strukturom i svojstvima.

Ne postoji jedinstvena metoda za ekstrakciju svih polifenolnih spojeva, već se odabire metoda ovisno o željenoj skupini polifenola ili pak o svojstvima materijala iz kojeg se izoliraju (Pintać i sur., 2017). Čimbenici koji utječu na ekstrakciju su: otapalo, temperatura, omjer otapala i otopljene tvari, veličina čestica te pH.

Kod odabira najpogodnijeg otapala treba uzeti u obzir polarnost polifenola te samog otapala. Najčešće korištena otapala pri ekstrakciji fenolnih spojeva iz biljnog materijala su alkoholi (metanol, etanol i njihove vodene otopine), a zatim aceton i etil acetat. Za ekstrakciju fenolnih kiselina prisutnih u netopljivom obliku (vezane, esteri ili glikozidni kompleksi) osim primjene organskih otapala često se primjenjuje i kiselinska/bazna) hidroliza. Dodatkom baze, kiseline ili oboje dolazi do hidrolize i oslobađanja vezanih fenolnih kiselina, ali i do hidrolize nekih nestabilnih spojeva kao što su ostaci šećera ili acilnih skupina (Rostagno i Prado, 2013). Polifenoli manje molekulske mase kao što su fenolne kiseline, antocijani i flavanol monomeri i oligomeri se bolje ekstrahiraju s metanolom, dok se flavonoli veće molekulske mase bolje ekstrahiraju u acetonu. Dokazano je da metanol, etanol te aceton u kombinaciji s vodom daju veće priraste ukupnih fenola u usporedbi s etil acetatom. Također kombinacije ovih otapala s vodom ekstrahiraju i veliku količinu drugih polarnih spojeva te tako smanjuju ukupnu koncentraciju fenolnih spojeva. Voda i etanol najčešće su korištena otapala zbog svoje niske toksičnosti i visokog učinka ekstrakcije s mogućnošću podešavanja polarnosti otapala miješanjem etanola i vode u različitim omjerima (Dai i Mumper, 2010., Spigno i DeFaveri, 2007).

Kod ekstrakcije trebamo uzeti u obzir utjecaj temperature i vrijeme trajanja. Suprotno općem utjecaju povećanja temperature i trajanja reakcije na povećanje topljivosti tvari, kod polifenola dolazi do degradacije i odvijanja nepoželjnih reakcija kao što je enzimska oksidacija (Upadhyay i sur., 2012). Povećanje omjera otapala i uzorka potiče ekstrakciju, ali poželjno je odrediti optimalni odnos kako bi se smanjilo zasićenje otopine polifenolima te utrošak otapala (Khoddami i sur., 2013).

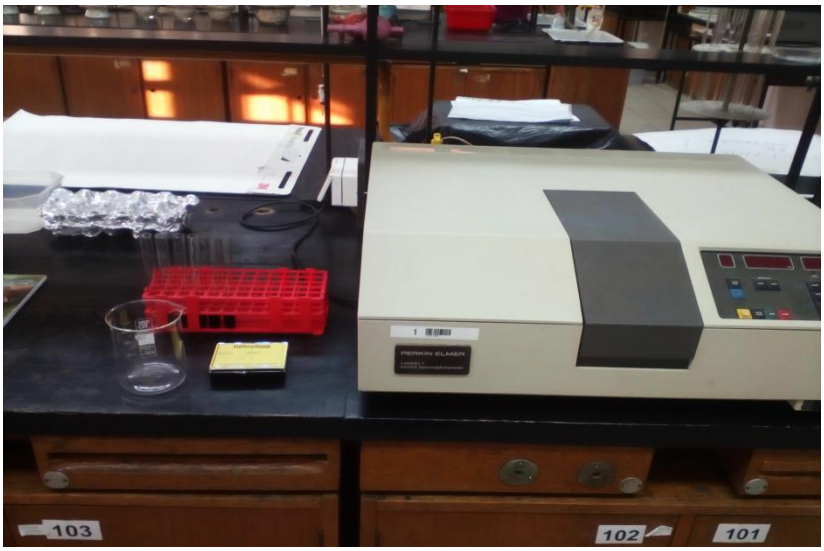
Vrijeme potrebno za ekstrakciju ovisi o topljivosti komponente u otapalu, temperaturi ekstrakcije, površini namirnice izloženom otapalu, viskoznosti otapala te volumnom protoku otapala. Iz tih razloga, pogodno je provođenje ekstrakcije pri višim temperaturama zbog ubrzavanja procesa ekstrakcije, jer dolazi do povećanja brzine otapanja komponente, kao i brzine difuzije komponente u volumen otapala (Spigno i De Faveri, 2007).

2.5. UV i VIS spektrofotometrija

Spektrofotometrija je kvantitativno mjerenje refleksijskih ili transmisijskih svojstava nekog materijala kao funkcija valne duljine. Spektrofotometrija može mjeriti u vidljivoj svjetlosti, u ultraljubičastom području ili infracrvenom području elektromagnetskog spektra.
UV/VIS spektroskopija se najčešće koristi za određivanje koncentracija onih tvari koje apsorbiraju ultraljubičasto (UV) ili vidljivo (VIS) elektromagnetsko zračenje na valnim duljinama od 100–380 nm za UV i te 380–800 nm za VIS (Penner, 2010). Metoda se temelji na propuštanju zrake svjetlosti kroz uzorak i mjerenju intenziteta svjetla koje je prošlo kroz uzorak te uspoređivanju tog intenziteta s intenzitetom ulaznog svjetla. Funkcijski odnos apsorbancije uzorka i njegove koncentracije daje Lambert-Beerov zakon:

$$A = \log (I_0/I) = \varepsilon\, b\, c$$

gdje je **A** apsorbancija, $\mathbf{I_0}$ intenzitet ulaznog svjetla, **I** intenzitet svjetla propuštenog kroz uzorak, **ε** molarni apsorpcijski koeficijent, **c** množinska koncentracija i **b** debljina sloja otopine. Za mjerenje apsorbancije koristi se spektrofotometar, a sastoji od izvora svjetla, monokromatora, zaslona za odabir valne duljine, kivete, detektora i procesora signala.



Slika 4. Spektrofotometar (vlastita fotografija)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijal

Korišteni su listići lovora (*Laurus nobilis* L.), ubrani na području Dalmacije (Pirovac) u kolovozu 2017. godine. Listići su osušeni te skladišteni, a neposredno prije provođenja analize i usitnjeni.



Slika 5. Usitnjeni lovor (vlastita fotografija)

3.2. Kemikalije

- Aceton (GRAM MOL; Hrvatska)
- Aluminijev klorid (ACROS ORGANICS ; USA)
- Etanol (KEFO; Slovenija)
- Folin –Ciocalteu reagens (GRAM MOL; Hrvatska)
- Galna kiselina (Merck KgaA; Njemačka)
- Kalijev acetat (ACROS ORGANICS; USA)
- Klorovodična kiselina (Panreac; Španjolska)
- Kvercetin (ACROS ORGANICS; USA)
- Metanol (J.T. Baker; Nizozemska)
- Natrijev karbonat (GRAM MOL; Hrvatska)
- 3,4-dihydroxycinnamin acid, 99+%, predominantly trans (ACROS ORGANIC; USA)

3.3. Aparatura i pribor

- Analitička vaga (A & D INSTRUMENTS LTD.; GR -200-EC; UK)
- Automatska pipeta volumena 40-200 µL (KemoLab, Hrvatska)
- Falcon kivete za čuvanje uzorka, 50 mL
- Filter papir (Papir crna vrpca Munktell 125 mm/388, Filtrak; Germany)
- Graduirane pipete od 1, 2, 5, 10 mL
- Menzure od 12, 20, 30 mL
- Odmjerne tikvice od 25, 50, 100, 1000 mL
- Liebigovo hladilo
- Propipete
- Spektrofotometar (PERKIN-ELMER; Lamba 1; U.S. Patent)
- Staklene čaše
- Staklene epruvete
- Stakleni lijevci
- Vortex (Metron; Hrvatska)

3.4. Metode rada

Iz suhog lista lovora su postupkom ekstrakcije refluksiranjem na temperaturi ključanja otapala kroz 1 h dobiveni ekstrakti u kojima se potom spektrofotometrijski određivao maseni udio fenolnih spojeva (ukupni fenoli, flavonoidi, hidroksicimetne kiseline i flavonoli).

3.4.1. Ekstrakcija refluksiranjem

Ekstrakcija refluksiranjem provodi se zagrijavanjem uzorka (1 g usitnjenog lista lovora) s otapalom (25 mL) u aparaturi s Liebigovim hladilom pri temperaturi ključanja otapala u trajanju od 1h. Korištena otapala za ekstrakciju su: voda, etanol (96%-tni), metanol (100%-tni), aceton (100%-tni) te njihove kombinacije: etanol-voda (1:1), metanol-voda (1:1), aceton-voda (1:1), etanol-metanol-voda (1:1:1) te etanol-metanol-aceton-voda (1:1:1:1). Po završetku ekstrakcije sadržaj tikvice se ohladi pod mlazom hladne vode te se dobiveni ekstrakt profiltrira preko lijevka i filter papira (Papir crna vrpca Munktell 125 mm/388, Filtrak, Germany) u odmjernu tikvicu od 25 mL, a nakon toga sadržaj tikvice nadopuni se do oznake otapalom korištenim za ekstrakciju. Ekstrakt se prebaci u plastičnu kivetu, i ekstrakti se čuvaju na hladnom i tamnom mjestu, pri temperaturi -18°C do provođenja analiza.



Slika 6. Ekstrakcija refluksiranjem (vlastita fotografija)

3.4.2. Određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja

Metoda se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin–Chiocalteu reagensom, te mjerenjem nastalog plavog obojenja pri 765 nm. Folin –Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline, a pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u volframov oksid i molibdenov oksid koji su plave boje. Redukcija ovih kiselina odnosno tvorba relativno stabilnog plavog obojenog kompleksa bit će intenzivnija što je prisutan veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima.

Na_2WO_4/Na_2MoO_4 + Fenol ---> (fenol-$MoW_{11}O_{40})^{4-}$

Mo (VI) + e^- ---> Mo (V)

Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar
2. Staklene kivete
3. Analitička vaga
4. Pipete volumena 1, 2 i 5 mL
5. Odmjerne tikvice volumena 25, 100 i 1000 mL
6. Vortex

Reagensi:

- **Folin –Ciocalteu reagens (F.C. reagens)**
  FC reagens se razrijedi deioniziranom vodom u omjeru 1:2
- **Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)**
  Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata se otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.

Izrada baždarnog pravca galne kiseline

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se standardna otopina galne kiseline, masene koncentracije 5 g/L. Od standardne otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da koncentracije standardnih otopina galne kiseline iznose 50, 100, 150, 250, 500 mg/L. Otpipetira se redom 250 µL otopine standarda, 15 mL destilirane vode i

1,25 mL FC reagensa u odmjernu tikvicu od 25 mL. Nakon 3 minute doda se 3,75 mL zasićene otopine natrijevog karbonata. Uzorci se ostave stajati 2h u mraku. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrta se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri 765 nm o masenoj koncentraciji galne kiseline (mg L^{-1}).

Postupak određivanja ukupnih fenola

U odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetira se redom 250 µL ekstrakta lovora (prethodno razrijeđenog) zatim se doda 15 mL deionizirane vode, 1,25 mL FC reagensa. Nakon 3 minute doda se 3,75 mL zasićene otopine natrijevog karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci ostave 2h u mraku. Nakon toga se apsorbancija mjeri pri 765 nm. Maseni udjeli ukupnih fenola izraženi su kao ekvivalent galne kiseline mg GAE g^{-1} suhog lista lovora.

3.4.3. Određivanje ukupnih flavonoida

Određivanje flavonoida provodi se spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na kolornoj reakciji flavonoida s aluminijevim kloridom i kalijevim acetatom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenje pri 415 nm.

Aparatura i pribor

1. Spektrofotometar
2. Staklene epruvete
3. Pipete,volumena 1, 2 i 5 mL
4. Analitička vaga
5. Odmjerne tikvice volumena

Reagensi:

- **Aluminije klorid,10%-tni**
  1 g aluminijevog klorida (aluminij-klorid-heksahidrat, p.a.) otopi se sa 5 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.
- **Kalijev acetat, 1M**
  9,845 g kalijevog acetata otopi se u 10 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu 100 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

Izrada baždarnog pravca kvercetina

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se standardna otopina kvecetina, masene koncentracije 100 mg/L. Od standardne otopine kvercetina rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da koncentracije standardnih otopina kvercetina iznose 10, 25, 50, 75, 100 mg/L. Iz svake tikvice se otpipetira redom 0,5 mL otopine standarda, 1,5 mL 96 %-tnog etanola , 0,1 ml 10 %-tnog aluminijevog klorida , 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti se način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100 %-tni metanol te se umjesto 10 %-tnog aluminijevog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega se izmjeri apsorbancija pri valnoj duljini 415 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrta se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri 415 nm o masenoj koncentraciji kvercetina (mg /L).

Postupak određivanja ukupnih flavonoida

U staklenu epruvetu se otpipetira redom 0,5 mL ekstrakta, 1,5 mL 96%-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL deionizirane vode. Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega se izmjeri apsorbancija pri valnoj duljini 415 nm. Maseni udjeli ukupnih flavonoida izraženi su kao ekvivalent kvercetina mg QE g^{-1} suhog lista lovora.

3.4.4. Određivanje hidroksicimetnih kiselina i flavonola

Određivanje hidroksicimetnih kiselina i flavonola provodi se spektrofotometrijskom metodom pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 320 nm za hidroksicimetne kiseline dok se flavonoli određuju na 360 nm.

Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar
2. Staklene epruvete
3. Analitička vaga
4. Pipete volumena 1, 2 i 5 mL
5. Odmjerne tikvice od 10 i 100 mL

Priprema otopina

- **Koncentrirana klorovodična kiselina, 37 %**
- Etanol, 96 %
- **Klorovodična otopina masene koncentracije 1 g/L HCl**
  0,227 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37%) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni etanolom (96 %) do oznake.
- **Klorovodična otopina masene koncentracije 2 g/L HCl**
  2,27 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37%) se otpipetira u odmjernu tikvicu od 500 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL ekstrakta lovora (prethodno razrijeđen), 250 µL 1 g/L HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina i ukupnih flavanola, apsorbancija se mjeri na 320 i 360 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju. Maseni udjeli hidroksicimetnih kiselina izražavaju se kao ekvivalent kafeinske kiseline (mg CAE g^{-1} suhog lista lovora). Maseni udjeli flavonola izražavaju se kao ekvivalent kvercetina (mg QE g^{-1} suhog lista lovora).

A) HIDROKSICIMETNE KISELINE

Izrada baždarnog pravca kafeinska kiseline

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se standardna otopina kafeinske kiseline, masene koncentracije 100 mg/L. Od te standardne otopine kafeinske kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da koncentracije standardnih otopina kvercetina iznose 10, 25, 50, 66,7 i 100 mg/L. U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL otopine standarda, 250 µL 1 g/L HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrta se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri 320 nm o masenoj koncentraciji kafeinske kiseline (mg L^{-1}).

B) FLAVONOLI

Izrada baždarnog pravca kvercetina

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se standardna otopina kvercetina, masene koncentracije 100 mg/L. Od standardne otopine kvercetina rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da koncentracije standardnih otopina kvercetina iznose 2, 5, 5, 10, 25, 50 i 100 mg/L. U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL otopine standarda ,250 µL 1 g/L HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrta se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri 360 nm o masenoj koncentraciji kvercetina (mgL^{-1}).

4. REZULTATI I RASPRAVA

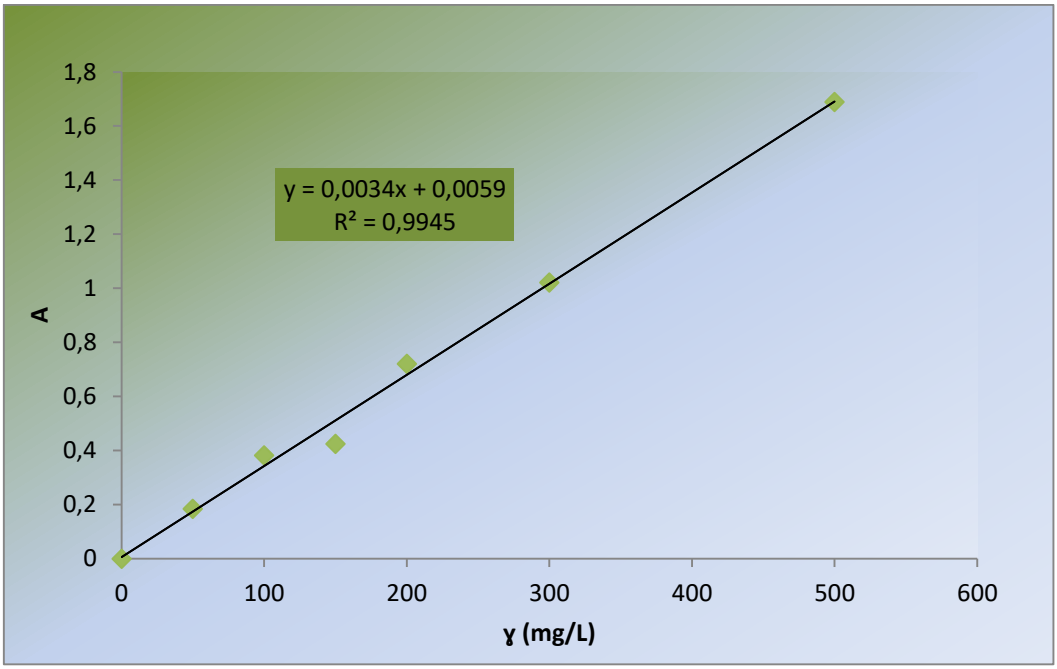
U ovom radu prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola u pripremljenim ekstraktima suhog lista lovora ekstrakcijom refluksiranjem pri temperaturi ključanja otapala kroz 1 h. Otapala kojima je provedena ekstrakcija su: voda, etanol (96%), etanol-voda (1:1), aceton (100%), aceton-voda (1:1), metanol (100%), metanol-voda (1:1), etanol-metanol-aceton (1:1:1) i etanol-metanol-aceton-voda (1:1:1:1).

4.1. Ukupni fenoli

Za određivanje ukupnih fenola u ekstraktima lista lovora prvo je bilo potrebno napraviti baždarni dijagram. Tablica 2. pokazuje vrijednosti masenih koncentracija galne kiseline u ovisnosti o njihovim izmjerenim vrijednostima apsorbancija.

Tablica 2. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina galne kiseline i pripadajuće vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 765 nm.

ɣ (mg/L)	**A**
0	0
50	0,184
100	0,382
150	0,425
200	0,721
300	1,021
500	1,689



Slika 7. Baždarni pravac galne kiseline

Tablica 3. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u ekstraktima lovora.

OTAPALO	A (765 nm)	SD	*w* (mg/g)	SD
VODA	0,243	0,0438	35,1539	6,5825
ETANOL	0,344	0,0163	50,0812	2,7252
ETANOL-VODA	0,374	0,0042	54,5465	0,2209
ACETON-VODA	0,330	0,0071	47,0161	0,6705
ACETON	0,131	0,0085	18,4316	0,1939
METANOL	0,316	0,0007	45,4485	0,9116
METANOL-VODA	0,409	0,0092	59,8906	1,5339
ET/MET/ACE	0,335	0,0042	48,6179	0,0322
ET/MET/ACE/VOD	0,408	0,0134	59,0372	1,3914

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u ekstraktima lista lovora prikazani u Tablici 3. pokazuju da se rezultati kreću u rasponu od 18,43 do 59,89 mg GAE/g uzorka lista lovora za 14 uzoraka ekstrahiranih s devet vrsta otapala.

Najveći prinos ekstrahiranih fenolnih spojeva je zabilježen kod otapala metanol-voda (59,89 mg GAE/g), dok je najmanja količina fenolnih spojeva ekstrahirana acetonom (18,43 mg GAE/g). Također, ekstrakcijom smjese ekstrakcijskih otapala (etanol-metanol-aceton-voda) su ekstrahirani visoki maseni udjeli ukupnih fenola (59,04 mg GAE/g), dok primjenom otapala etanola i etanol-metanol-aceton samo nešto niži maseni udjeli ukupnih fenola (48,61 i 50,08

mg GAE/g). Iz dobivenih rezultata masenih udjela ukupnih fenola uočavamo da se dodatkom vode čistim otapalima povećava maseni udio ukupnih fenolnih spojeva, to je najviše vidljivo kod acetona kojem se dodatkom vode maseni udio ekstrahiranih fenolnih spojeva povećava s 18,43 na 47,02 mg GAE/g.

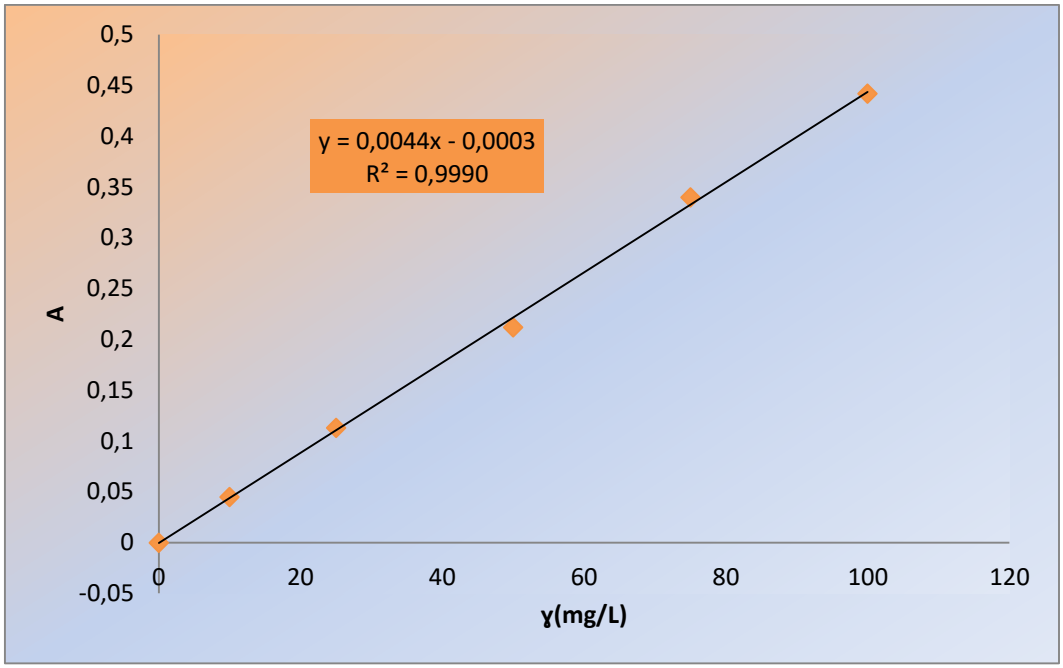
Kod sustava s četiri otapala (etanol-metanol-aceton-voda) također je vidljivo značajno povećanje ekstrakcijske moći u odnosu na čista otapala, ali ne više od binarnog sustava otapala metanol-voda.

4.2. Ukupni flavonoidi

Za određivanje nepoznate masene koncentracije flavonoida u ekstraktima lista lovora bilo je potrebno izraditi baždarni dijagram. Tablica 4. prikazuje vrijednosti masenih koncentracija rutina s pripadajućim izmjerenim vrijednostima apsorbancija na temelju kojih je izrađen baždarni dijagram (Slika 8). Iz baždarnog pravca izračunate su vrijednosti nepoznatih masenih koncentracija, a potom i maseni udjeli ukupnih flavonoida u ekstrahiranim uzorcima (Tablica 5).

Tablica 4. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina kvercetina i pripadajuće vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 415 nm.

ɣ (mg/L)	**A**
0	0
10	0,045
25	0,113
50	0,212
75	0,340
100	0,442



Slika 8. Baždarni pravac kvercetina

Tablica 5. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida u ekstraktima lista lovora dobivenih refluksiranjem.

OTAPALO	A (415 nm)	SD	*w* (mg/g)	SD
VODA	0,153	0,0035	17,0928	0,1188
ETANOL	0,289	0,0008	32,5536	0,2305
ETANOL-VODA	0,221	0,0052	24,9076	0,1817
ACETON-VODA	0,222	0,0030	24,4499	0,8724
ACETON	0,293	0,0079	31,9117	1,7319
METANOL	0,594	0,0047	66,1216	1,4744
METANOL-VODA	0,178	0,0091	20,1157	0,0637
ET/MET/ACE	0,545	0,0039	61,1233	0,7336
ET/MET/ACE/VOD	0,285	0,0085	31,9107	0,3001

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida u ekstraktima lista lovora prikazanih u Tablici 5. pokazuju da je najviše ukupnih flavonoida ekstrahirano metanolom (66,12 mg QE/g), a najmanja količina navedenih spojeva ekstrahirana je vodom (17,09 mg QE/g). Metanol se pokazao kao najbolje otapalo za ekstrakciju ukupnih flavonoida. Uz metanol, sustav s tri otapala etanol-metanol-aceton također je pokazao visoke masene udjele ukupnih flavonoida 61,12 mg QE/g. Prilikom ekstrakcije flavonoida iz lista lovora može se zaključiti da

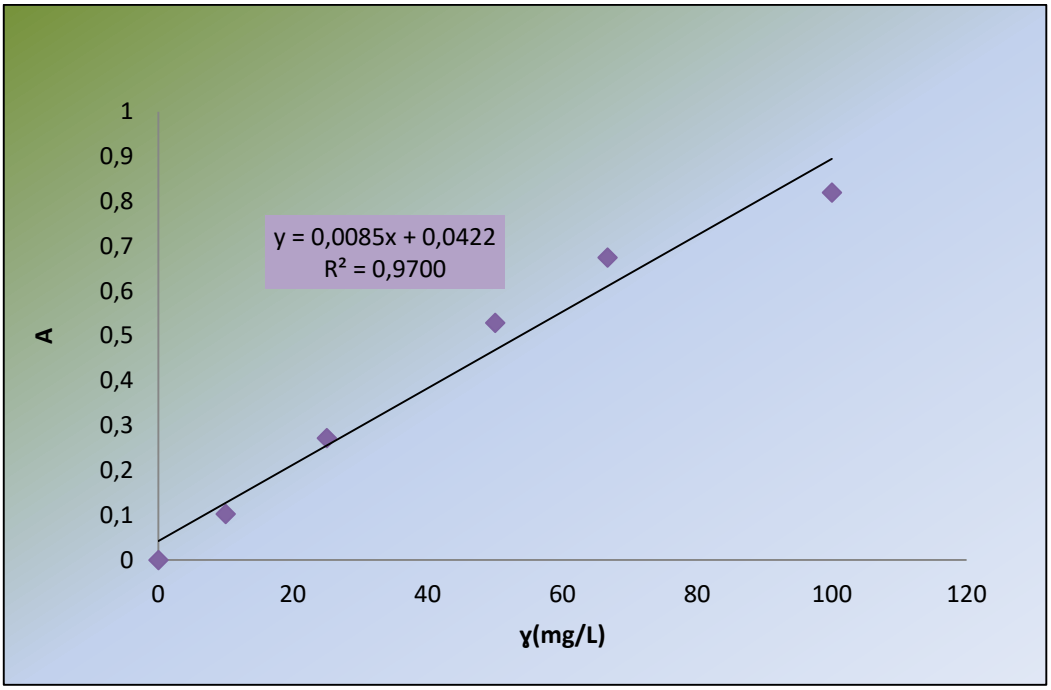
veći ekstrakcijski kapacitet je postignut primjenom čistih otapala, dodatak vode u otapalo nije doprinio povećanju ekstrakcijskog kapaciteta.

4.3. Ukupne hidroksicimetne kiseline i ukupni flavonoli

Za određivanje masenih udjela hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima lišća lovora bilo je potrebno izraditi baždarni dijagram. Tablica 6. prikazuje vrijednosti masenih koncentracija kafeinske kiseline s pripadajućim izmjerenim vrijednostima apsorbancija na temelju kojih je izrađen baždarni dijagram (Slika 9). Iz baždarnog pravca izračunate su vrijednosti nepoznatih masenih koncentracija, a potom i maseni udjeli hidroksicimetnih kiselina u ekstrahiranim uzorcima (Tablica 7).

Tablica 6. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina kafeinske kiseline i pripadajućih vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 320 nm.

ɣ (mg/L)	**A**
0	0
10	0,103
25	0,272
50	0,529
66,7	0,675
100	0,820



Slika 9. Baždarni pravac kafeinske kiseline

Tablica 7. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima lista lovora.

OTAPALO	A (320 nm)	SD	*w* (mg/L)	SD
VODA	0,140	0,0141	8,0991	0,8741
ETANOL	0,523	0,1831	30,4286	10,4631
ETANOL-VODA	0,301	0,1195	17,5569	7,0997
ACETON-VODA	0,297	0,0064	16,8973	0,2404
ACETON	0,375	0,0106	21,0977	0,5479
METANOL	0,607	0,0453	35,0058	3,3876
METANOL-VODA	0,266	0,0834	15,5685	4,9303
ET/MET/ACE	0,586	0,0276	34,0012	2,0080
ET/MET/ACE/VOD	0,365	0,0255	21,1622	1,6743

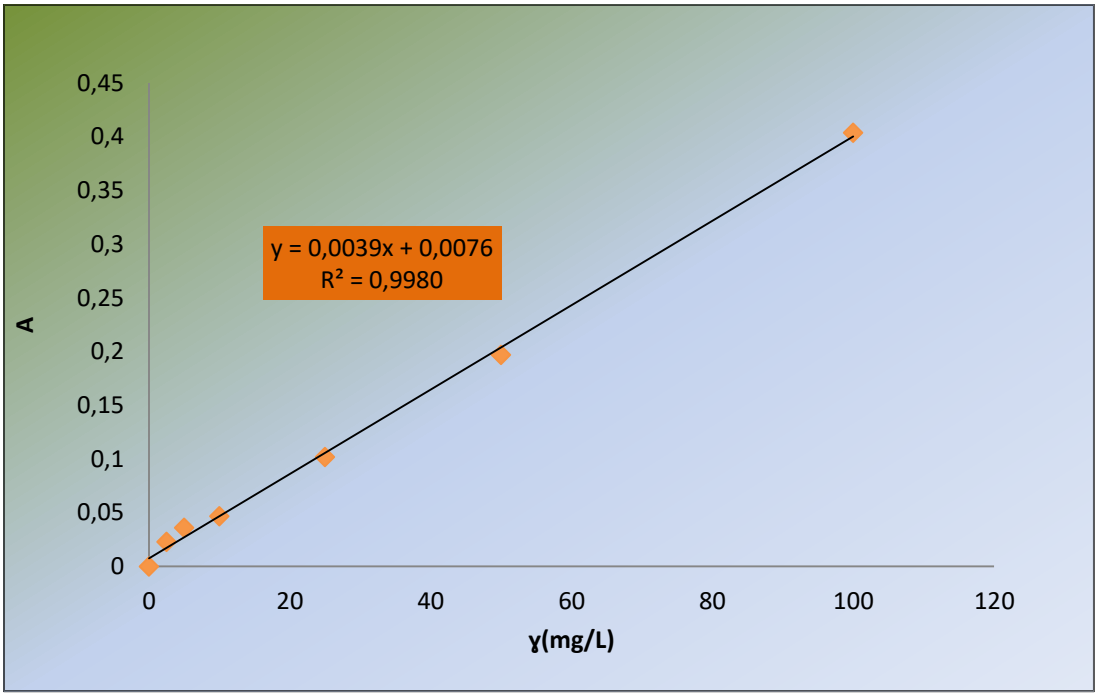
Rezultati spektrofotometrijskog određivanja hidroksicimetnih kiselina u uzorcima ekstrakta lovora pokazuju raspon vrijednosti od 8,10 do 35,01 mg CAE/g. Najveći maseni udio hidroksicimetnih kiselina (35,01 mg CAE/g) dobiven je primjenom metanola kao otapala za ekstrakciju refluksiranjem, dok je najmanja vrijednost (8,10 mg CAE/g) zabilježena primjenom vode kao otapala. Također, primjenom etanola (30,43 mg CAE/g) i smjese otapala etanol-metanol-aceton (34,00 mg CAE/g) su ekstrahirani visoki maseni udjeli hidroksicimetnih

kiselina. Dodatkom vode čistim otapalima nije se povećao ekstrakcijski kapacitet izolacije hidroksicimetnih kiselina iz lista lovora. Primjenom acetona kao i vodene otopine acetona kao ekstrakcijskog otapala dobiveni su niski maseni udjeli hidroksicimetnih kiselina iz lista lovora.

Za određivanje nepoznate masene koncentracije flavonola u ekstraktima lišća lovora bilo je potrebno izraditi baždarni dijagram. Tablica 8. prikazuje vrijednosti masenih koncentracija kvercetina s pripadajućim izmjerenim vrijednostima apsorbancija na temelju kojih je izrađen baždarni dijagram (Slika 10). Iz baždarnog pravca izračunate su vrijednosti nepoznatih masenih koncentracija, a potom i maseni udjeli flavonola u ekstrahiranim uzorcima (Tablica 9).

Tablica 8. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina kvercetina i pripadajućih vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 360 nm.

ɣ (mg/L)	**A**
0	0
2,5	0,023
5	0,036
10	0,047
25	0,102
50	0,197
100	0,404



Slika 10. Baždarni pravac kvercetina

Tablica 9. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonola u ekstraktima lista lovora dobivenih refluksiranjem

OTAPALO	A (360 nm)	SD	*w* (mg/g)	SD
VODA	0,116	0,0120	14,5629	1,6163
ETANOL	0,405	0,1563	51,3350	19,4955
ETANOL-VODA	0,212	0,0813	26,9306	10,5359
ACETON-VODA	0,196	0,0050	24,2808	0,2518
ACETON	0,267	0,0085	32,7799	0,7380
METANOL	0,489	0,0368	61,4636	5,9872
METANOL-VODA	0,179	0,0516	22,7688	6,6533
ET/MET/ACE	0,447	0,0255	56,5402	2,5421
ET/MET/ACE/VOD	0,278	0,0240	35,1319	3,3673

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonola u ekstraktima lista lovora pokazuju kako se vrijednosti za flavonole kreću od 14,56 do 61,46 mg QE/g, najbolje otapalo za ekstrakciju refluksiranjem je metanol, dok je najmanji prinos kod uzoraka ekstrahiranih vodom.

Dodatak vode čistim otapalima nije utjecao na povećanje ekstrakcijske moći otapala. Kao i kod ekstrakcije ukupnih flavonoida, primjenom etanola (51,34 mg QE/g) te otapala etanol-metanol-aceton (56,54 mg QE/g) su ekstrahirani visoki udjeli flavonola iz lista lovora.

U provedenome istraživanju ispitivan je utjecaj različitih otapala na ekstrakciju fenolnih spojeva iz sušenog lista lovora (*Laurus nobilis* L.). Klasična ekstrakcija refluksiranjem fenolnih spojeva provedena je primjenom otapala različite polarnosti: voda, etanol (96%), etanol-voda (1:1), aceton (100%), aceton-voda (1:1), metanol (100%), metanol-voda (1:1), etanol-metanol-aceton (1:1:1) i etanol-metanol-aceton-voda (1:1:1:1). Općenito, svi dobiveni ekstrakti lista lovora bogat su izvor fenolnih spojeva, ali njihova koncentracija značajno ovisi o polarnosti otapala ali i o kemijskom sastavu uzorka. Također, prisustvo i udio vode u organskoj fazi otapala ima značajnu ulogu naročito kod ekstrakcije ukupnih fenolnih spojeva, jer voda pojačava proces difuzije i olakšava ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala. Upotrebom vode uz alkoholnu otopinu doprinosi bubrenju biljnog materijala što doprinosi jačem prodiranju otapala u biljni materijal (Rafiie i sur., 2011). Najveći maseni udio ukupnih fenola (59,89 mg GAE/g) dobiven je postupkom ekstrakcije refluksiranjem prilikom korištenja vodene otopine metanola, dok najveći maseni udjeli hidroksicimetnih kiselina (66,12 mg CAE/g), flavonoida (35,01 mg QE/g) i flavonola (61,46 mg QE/g) primjenom čiste otopine metanola. Mnoga istraživanja pokazuju utjecaj različitih otapala na ekstrakciju fenolnih spojeva. Boulila i sur. (2015) su proveli istraživanje u kojem su ispitivali utjecaj metanola (80-100%) na ekstrakciju fenolnih spojeva iz lista lovora, najveće vrijednosti koncentracije fenolnih spojeva su postignute primjenom čistog metanola u odnosu na vodene otopine. U našem slučaju dodatak vode čistim otapalima bio je 50%-tni pa je i to jedan od razloga zašto nije došlo do povećanja ekstrakcijske moći prilikom ekstrakcije hidroksicimetnih kiselina, flavonoida i flavonola. Kod upotrebe vode kao ekstrakcijskog otapala dobiveni su naniži maseni udjeli fenolnih spojeva, jer ekstrakt koji se dobije sadrži nečistoće kao što su šećeri, topljivi proteini te drugi organski spojevi, a sve to može utjecati na količinu i identifikaciju fenolnih spojeva (Rafiee i sur., 2011). Iz navedenih rezultata može se zaključiti da se binarnim sustavom otapala postiže učinkovitija ekstrakcija ukupnih fenolnih spojeva nego s mono sustavima (voda ili čisti etanol/metanol/aceton) te da udio vodene faze u otapalu ima značajni utjecaj, dok kod ekstrakcije hidroksicimetnih kiselina, flavonoida i flavonola je učinkovitije otapalo bez dodatka vode. Dobiveni rezultati u ovom istraživanju pokazuju da maseni udjeli fenolnih spojeva značajno variraju ovisno o koncentraciji otapala za ekstrakciju, što je u skladu s istraživanjima drugih autora prema kojima ekstrakcijski kapacitet fenolnih spojeva u raznim biljnim vrstama ovisi o vrsti otapala (Akowuah i sur., 2005; Turkmen, Sari, i Velioglu, 2006).

5. ZAKLJUČAK

U okviru ovog rada provedena je spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva (ukupni fenoli, ukupni flavonoidi, hidroksicimetne kiseline te flavonoli) u ekstraktima lista lovora (*Laurus nobilis* L.)
Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti:

Ekstrakti lista lovora (*Laurus nobilis* L.) bogat su izvor polifenolnih spojeva, spektrofotometrijski su određeni visoki maseni udjeli ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina, flavonola i flavonoida te potencijalno predstavljaju dobar izvor fenolnih spojeva u prehrambenoj industriji.

Najbolje otapalo za ekstrakciju flavonoidnih spojeva, hidroksicimetnih kiselina i flavonola iz lista lovora postupkom ekstrakcije refluksiranjem pri temperaturi ključanja otapala kroz 1 h je otapalo metanol.

Vodenom otopinom metanola je ekstrahiran najveći maseni udio ukupnih fenolnih spojeva iz lista lovora.

Smjesa od tri otapala (etanol-metanol-aceton) pokazala je visoke masene udjele ekstrakcije flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola, a smjesa od četiri otapala (etanol-metanol-aceton-voda) kod ekstrakcije ukupnih fenola.

Povećanje prinosa fenolnih spojeva dodatkom vode čistim otapalima pokazalo se učinkovitim samo kod određivanja ukupnih fenolnih spojeva. Možemo zaključiti kako su čista otapala pokazala veću ekstrakcijsku moć od sustava s dva, tri i četiri otapala.

6. LITERATURA

<**https://hirc.botanic.hr/fcd/Galerija/Slika.aspx?IdPicture=30664**>, pristupljeno 12.8.2018.

<**https://hirc.botanic.hr/fcd/Galerija/Slika.aspx?IdPicture=110885**>, pristupljeno 12.8.2018.

< **https://www.agroklub.com/sortna-lista/ljekovito-bilje/lovor-361/**> pristupljeno 13.8.2018

Arceus, A., Wesolowski M., Konieczynski P. (2013) Methods for extraction and determination of phenolic acids inmedicinal plants: a review. Nat. Prod. Commun. **8**: 1821- 1829.

Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutrition Reviews **56**: 317-333.

Cavalcanti R.N., Forster-Carneiro T., Gomes M.T.M.S., Rostagno M.A., Prado J.M., Meireles M.A.A. (2013) Uses and Applications of Extracts from Natural Sources. U: Natural Product Extraction: Principles and Applications (Rostagno M.A., Prado J.M., ured.), The Royal Society of Chemistry, Cambrige, str. 1 – 46.

Chen Y, Xiao H, Zhen J, Liang G. (2015) Structure-ThermodynamicsAntioxidant Activity Relationships of Selected Natural Phenolic Acids and Derivatives: An Experimental and Theoretical Evaluation, PLoS One. **24**: 10(3)

d'Alessandro L.G., Kriaa K., Nikov I., Dimitrov K. (2013) Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. Separation and Purification Technology **93**: 42–47.

Dai J., Mumper R.J. (2010) Plant phenolic: extraction,analysis and their antioxidsnt and anticancer properties.Molecules **15**: 7313-7352.

El S.B., Karagozlu N., Karakaya S., Sahn S. (2014) Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils extracted from Laurus nobilis L. leaves by using solvent-free microwave and hydrodistillation. *Food Nutr sci,* str. 5.

Fecka I., Turek S. (2008) Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chemistry* **108:** 1039-1053.

Ferrali M., Signorini C., Caciotti B., Sugherini L., Ciccoli L., Giachetti D., Comporti M. (1997) Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. FEBS Lett **416**: 123-9.

Giada M., (2013) Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases—A Role for Antioxidants InTech., str. 87–112.

Grdinić V., Kremer D. (2009) Ljekovito bilje i ljekovite droge: farmakoterapijski, botanički i farmaceutski podaci.Hrvatska ljekarnička komora, str. 19, 178, 349-350.

Harborne J.B., Williams C.A. Advances in flavonoid research since 1992. (2000) Phytochemistry **55**: 481-504.

Helena Drmić i Anet Režek Jambrek (2010),Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva , Croat. J. Food Sci. Technol. **2**, 22-33.

Khoddami A., Wilkes M.A., Roberts T.H. (2013) Techniques for analysis of plant phenolic compounds. Molecules **18**: 2328-2375.

Liu, H.W. (2011) Extraction and Isolation of Compounds from Herbal Medicines. U: Traditional Herbal Medicine Research Methods: Identification, Analysis, Bioassay, and Pharmaceutical and Clinical Studies (Liu, W.J.H., ured.), John Wiley & Sons, New Jersey, str. 81-138.

Marković S. (2015) Fitoaromaterapija: monografije esencijalnih ulja i ljekovitih biljaka, temelji fitoaromaterapije. Zagreb, Centar Cedrus, str. 78, 286-287.

Merken H.M. & Beecher G.R. (2000) Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review, Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**: 577–599.

Murković M. Phenolic compaunds (2003), Elsevier Science Ltd **112**: 4501-4511

Nigam M.C, Ahamad A. i Mishra L.N. (1992) *Laurus nobilis* : An essential oil of potential value, Parfume and Kosmetic , **73**: 854-9.

Sayyah, M., Saroukhani, G., Peirovi, A., Kamalinejad, M. (2003) Analgesic and anti-inflammatory activity of the leaf essential oil of Laurus nobilis Linn. Phytother.Res. **17**: 733-736.

Sharma A.,Singh j and S. Kumar (2012) Handbook of herbs and spices U: Bay leaves , 2.izdanje,Volume 1, Woodhead Publishing Limited, str. 79-80.

Pacifico S., Gallicchio M., Lorenz P., Duckstein S.M., Potenza N., Galasso S., Marciano S., Fiorentino A., Stintzing F.C., Monaco P. (2014) Neuroprotective potential of Laurus nobilis antioxidant polyphenol-enriched leaf extracts. *Chem Res Toxicol*, str. 611-626.

Panja P. (2017) Green extraction methods of food polyphenols from vegetablematerials *COFS* – accepted manuscript, str. 1 -21.

Penner, M.H. (2010) Basic Principles of Spectroscopy. U: Food analysis, (Nielsen, S., ured.), Springer cience+Business Media, LLC, str. 375-385.

Rafiee, Z.,Jafari, S. M.,Alami, M.,Khomeiri, M. (2011) Microwave - assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *J. Anim. Plant Sci.* **21**: 738-745.

Ralph J., Quideau S., Grabber JH., Hatfield R.D. (1994) Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell-walls. J Chem Soc Perkin Trans **1**: 3485- 3498.

Raso J., Manas P., Pagan R., Sala F.J. (1999) Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound, *Ultrason. Sonochem.* **5**: 157 - 162.

Robbins R.J. (2003) Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology, J. Agric Food Chem **51**: 2866-2887.

Rostagno M.A., Prado J.M., (2013) Natural Product Extraction - Principles and Applications. RSC, Cambridge, UK.

Vergara-Salinas J.R., Pérez-Jiménez J., Lluís Torres J., Agosin E., Pérez-Correa J.R. (2012) Effects of temperature and time on polyphenolic content and antioxidant activity in the pressurized hot water extraction of deodorized thyme (Thymus vulgaris), J. Agric. Food Chem. **60**: 10920-10929.

Russell W.R., Burkitt MJ, Provan GJ, Chesson A. (1999) Structure specific functionality of plant cell wall hydroxycinnamates. J Sci Food Agri **79**: 408-410.

Snježana P.Kazazić (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida, Arh. Hig. Rada Toksikol. **55**: 279-290.

Spigno G., De Faveri D.M. (2007) Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. J. Food Eng. **78**: 793–801.

Tahirović, A., Bašić, N. (2014) Phenolic content and antioxidant activity of crataegus monogyna l. Fruit extracts. Works of the Faculty of Forestry University of Sarajevo No.2, 29-40.

Trabelsi N., Megdiche W., Ksouri R., Falleh H., Oueslati S., Soumaya B., Hajlaoui H., Abdelly C. (2010) Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limuniastrum monopetalum* leaves **43**: 632-639.

Yanardag S. i Can S. (1994) Effect of *Laurus nobilis* L. Leaves on blood glucose levels in normal and alloxan-diabetic rabbits, Chemica Acta Turcica **22**: 169-75.

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.

Andrea Šimac

ime i prezime studenta