

Primjena ekstrakcije potpomognute ultrazvukom za izolaciju fenolnih spojeva lovora

Brezjan, Petra

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:159:720825>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-02**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Petra Brezjan

7563/ PT

**PRIMJENA EKSTRAKCIJE POTPOMOŽNE
ULTRAZVUKOM ZA IZOLACIJU FENOLNIH SPOJEVA
LOVORA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Začinsko i aromatsko bilje

Mentor: Doc. dr. sc. Ivona Elez Garofulić

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

**Primjena ekstrakcije potpomognute ultrazvukom za izolaciju fenolnih spojeva
lovora**

Petra Brezjan, 0058212395

Sažetak: Lovor je mediteranska biljka bogata biološki aktivnim spojevima, a posebice fenolnim spojevima koji značajno doprinose njegovom antioksidacijskom kapacitetu. Biološki aktivni spojevi se iz biljnog materijala izoliraju različitim postupcima ekstrakcije među kojima nove tehnike poput primjene ultrazvuka zauzimaju značajno mjesto. Cilj ovog rada bio je izolirati i odrediti ukupan udio fenolnih spojeva u ekstraktima lovorovog lista dobivenima ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom pri različitim uvjetima. Ekstrakcija je provedena uz 50%-tnu, 70%-tnu ili 100%-tnu amplitudu ultrazvuka kroz 5, 10 ili 15 minuta. Otapala koja su korištena za ekstrakciju su 50%-tni i 70%-tni etanol. Udio fenolnih spojeva određen je spektrofotometrijski te se ovisno o uvjetima ekstrakcije i primijenjenom otapalu kretao u rasponu od $7,90 \pm 0,40$ do $26,69 \pm 1,01$ mg GAE/ g uzorka. U dobivenim ekstraktima lovorovog lista FRAP metodom određen je i njihov antioksidacijski kapacitet u rasponu od $111,80 \pm 5,41$ do $263,16 \pm 3,26$ μ mol TE/ g suhog uzorka. Najveća koncentracija fenolnih spojeva ($26,69 \pm 1,01$ mg GAE/ g uzorka) postignuta je ekstrakcijom pri amplitudi ultrazvuka od 50% tijekom 10 minuta uz 70%-tni etanol kao otapalo.

Ključne riječi: ekstrakcija, ultrazvuk, fenolni spojevi, antioksidacijska aktivnost, lovor

Rad sadrži: 32 stranice, 6 slika, 7 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: Ivona Elez Garofulić, doc.dr.sc.

Pomoć pri izradi: Erika Dobrosravić, mag.ing.

Datum obrane: lipanj 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Food Engineering
Laboratory for Chemistry and Technology of Fruits and Vegetables

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Application of ultrasound assisted extraction to isolate phenolic compounds from laurel

Petra Brezjan, 0058212395

Abstract: Laurel is a Mediterranean plant rich in biologically active compounds, specifically in phenolic compounds which significantly contribute to its antioxidant capacity. The biologically active compounds can be isolated from the plant material by various extraction methods, among which new techniques such as the application of ultrasound occupy a significant place. This study aimed to isolate and determine the total proportion of phenolic compounds in bay leaf extracts obtained by ultrasound assisted extraction with different parameters. Extraction was performed at 50%, 70% or 100% ultrasound amplitude for 5, 10 or 15 minutes. Solvents used for the extraction were 50% and 70% ethanol. The total proportion of phenolic compounds was determined spectrophotometrically and depending on the extraction conditions and the solvent used it ranged from 7.90 ± 0.40 to 26.69 ± 1.01 mg GAE / g sample. The antioxidant capacity of bay leaf extracts was determined by the FRAP method and it ranged from 111.80 ± 5.41 to 263.16 ± 3.26 $\mu\text{mol TE/ g dry sample}$. The highest concentration of phenolic compounds (26.69 ± 1.01 mg GAE / g sample) was achieved at an amplitude of 50% for 10 minutes with 70% ethanol as solvent.

Keywords: extraction, ultrasound, phenolic compounds, antioxidant activity, laurel

Thesis contains: 32 pages, 6 figures, 7 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: Ivona Elez Garofulić, doc.dr.sc.

Technical support and assistance: Erika Dobrosravić, mag.ing.

Defence date: June 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

| | |
|--|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO..... | 2 |
| 2.1. Lovor | 2 |
| 2.1.1. Botanička obilježja i opće karakteristike..... | 2 |
| 2.1.2. Upotreba lovora..... | 3 |
| 2.1.3. Kemijski sastav lovora | 3 |
| 2.1.4. Antioksidacijska aktivnost..... | 5 |
| 2.2. Fenolni spojevi | 5 |
| 2.2.1. Flavonoidi..... | 6 |
| 2.2.2. Fenolne kiseline | 7 |
| 2.2.3. Tanini..... | 8 |
| 2.3. Metode ekstrakcije fenolnih spojeva..... | 8 |
| 2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom | 10 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 13 |
| 3.1. Materijali..... | 13 |
| 3.1.1. Uzorci lista lovora..... | 13 |
| 3.1.2. Kemikalije..... | 13 |
| 3.1.3. Otopine | 13 |
| 3.1.4. Instrumenti i pribor..... | 14 |
| 3.2. Metode rada | 15 |
| 3.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom | 15 |
| 3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola | 16 |
| 3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom | 18 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA..... | 21 |
| 4.1. Određivanje masenog udjela ukupnih fenola..... | 21 |
| 4.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom | 24 |
| 5. ZAKLJUČAK | 28 |
| 6. POPIS LITERATURE | 29 |

1. UVOD

Lovor je aromatična biljka s područja Mediterana čiji se listovi od davnina primjenjuju kao začini u kulinarstvu, ali i u narodnoj medicini zahvaljujući svojim antioksidacijskim, antibakterijskim, protuupalnim i analgetičkim svojstvima. Lovorov list je bogat biološki aktivnim spojevima, posebice fenolnim spojevima, točnije flavonoidima, fenolnim kiselinama i taninima. Biološki aktivni spojevi lovora značajno doprinose antioksidacijskom djelovanju njegovih ekstrakta. Prisutni antioksidansi stupaju u reakcije sa slobodnim radikalima pri čemu zaustavljaju nepoželjne oksidacijske reakcije i pomažu u očuvanju zdravlja organizma, stoga interes za njihovu upotrebu sve više raste.

Bioaktivne tvari se iz biljnog materijala uglavnom ekstrahiraju konvencionalnim metodama, no u zadnje vrijeme sve se više istražuju i primjenjuju suvremene metode ekstrakcije poput ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Primjena ekstrakcije potpomognute ultrazvukom se pokazala kao iznimno učinkovita i ekonomična. Temelji se na fenomenu kavitacije koja olakšava prijenos bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala u otapalo. Primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom povećava se udio izoliranih tvari u ekstraktima uz upotrebu manje količine otapala, nižu temperaturu i u kraćem vremenu.

Cilj ovog rada bio je izolirati i odrediti ukupan udio fenolnih spojeva u ekstraktima lovorovog lista dobivenih ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom uz 50%-tni i 70%-tni etanol kao otapalo, pri različitim amplitudama (50%, 75% i 100%) kroz 5, 10 i 15 minuta. Osim toga, u dobivenim ekstraktima određen je antioksidacijski kapacitet.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Lovor

2.1.1. Botanička obilježja i opće karakteristike

Lovor (*Laurus nobilis* L.) je začinska i aromatična biljka koja pripada porodici Lauraceae. Višegodišnja je, drvenasta i zimzelena biljka, a može rasti kao grm ili nisko stablo visine do 6 ili 8 metara. Raste pojedinačno ili u skupinama, pretežito u listopadnoj hrastovoj šumi, a rjeđe u makiji (Batool i sur., 2020; Kuštrak, 2005). Potječe iz Male Azije, otkuda se proširio na obalu Sredozemnog mora te diljem svijeta, a danas se zbog aromatičnosti listova kultivira u zemljama s umjerenom i subtropskom klimom, kao što su Turska, Algeria, Maroko, Portugal, Španjolska, Italija, Francuska i Meksiko (Peris i Blázquez, 2015). U Hrvatskoj je rasprostranjen duž obale Jadranskog mora i na otocima, a posebice na obroncima Učke (Kuštrak, 2005). Optimalni klimatski uvjeti za rast lovora su pjeskovito tlo s velikom količinom vode ili vlažnom atmosferom u blizini obale mora ili oceana, a raste od morske obale do 300 ili 400 m nadmorske visine (Batool i sur., 2020; Kuštrak, 2005). Tijekom toplog vremena lišće može izgorjeti pa je uz dobro drenirano pjeskovito tlo s malo vlage poželjna i djelomična zaštita od sunca u vidu sjene. Osjetljiv je na niske temperature i smrzavanje (Batool i sur., 2020). Kora lovora je smeđa, tanka i glatka. Na granama se naizmjenično na kratkim peteljka nalaze kožasti i kopljasti listići s valovitim rubovima dužine od 5 do 10 cm i širine od 2 do 5 cm. Listići su tamnozeleni i sjajni s gornje strane, a zeleni bez sjaja s donje strane (slika 1) (Batool i sur., 2020; Peris i Blázquez, 2015).



Slika 1. Listovi i plodovi lovora (plantea.com.hr)

Lovor je dvodomna biljka, odnosno cvjetovi s prašnicima i cvjetovi s tučcima rastu na različitim stablima. Žućkasto-bijeli, četverolisni, maleni i mirisni cvjetovi se razvijaju u pazušcima listova, a cvatu u proljeće, od ožujka do svibnja (Kuštrak, 2005; Batool i sur., 2020).

Plodovi lovora su izdužene bobe veličine 10-15 mm smještene u malim grozdovima. Dozrijevaju u kasnu jesen, a sadrže sjemenku obavijenu jajastim, tankim, crnim i nabranim perikarpom (Batool i sur., 2020).

2.1.2. Upotreba lovora

Lovor je poznat još iz doba starog vijeka, Grci su ga posvetili bogu Apolonu te su ga sadili uz njegove hramove, a Rimljanima su lovorove grančice predstavljale simbol pobjede i časti (Kuštrak, 2005). Danas je lovorov list zbog svog jakog i ugodnog mirisa i specifične trpke i gorke arome važan dio mediteranske prehrane, a najčešće se koristi kao začín u raznim juhama, umacima, prilikom pripreme mesa, ribe, octa i pića. Zbog oporog, gorkog i ljutog okusa često se prije konzumacije uklanja iz jela (Peris i Blázquez, 2015; Kuštrak 2005). Uz poželjnu aromu dodatkom lovora, zbog njegovih antimikrobnih i antioksidacijskih svojstava, hrani se produljuje rok trajanja. Berba lovorovog lista može se vršiti tijekom cijele godine, a nakon branja lišće se treba osušiti. Sušenje se tradicionalno provodi na otvorenom na suncu 10-12 dana, no bolja se kvaliteta osušenog lišća postiže sušenjem na vrućem zraku pri temperaturi od 60°C (Batool i sur., 2020).

Osim kao začín list lovora se koristi i u narodnoj medicini. Bogat je esencijalnim uljima i fenolnim spojevima koji doprinose njegovim antioksidacijskim, antibakterijskim, protuupalnim i analgetičkim svojstvima pa se često koristi za poboljšavanje imuniteta (Boulila i sur., 2015). Potiče probavne funkcije, ima gastroprotektivna i antidijarejska svojstva, utječe na smanjenje lipida, glukoze, ukupnog kolesterola, LDL kolesterola i triglicerida (Peris i Blázquez, 2015).

Eterično ulje iz lovorovog lista se dobiva destilacijom vodom ili vodenom parom, a koristi se u prehrambenoj industriji za proizvodnju alkoholnih pića i voćnih sokova i u farmaceutskoj industriji za izradu sapuna, krema, losiona, parfema i deterdženata (Peris i Blázquez, 2015; Kuštrak, 2005). Eterično ulje sadrži visok udio 1,8-cineola i metil-eugenola koji pokazuju dobra antibakterijska svojstva protiv patogenih bakterija kao što su *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* i *Salmonella typhimurium* (Peris i Blázquez, 2015).

2.1.3. Kemijski sastav lovora

Za oštar i gorak okus lovorovog lista zaslužan je njegov kemijski sastav. U lovorom listu prisutni su flavonoidi, tanini, limunska kiselina, ugljikohidrati, steroidi, alkaloidi, triterpenoidi, eterična ulja, vitamini A i C, mnogi minerali i hlapljivi spojevi. Za karakterističnu aromu lovorovog lista odgovorni su terpeni (cineol, terpineol, α - i β -pinen, citral) te eugenol,

metil eugenol i elemicin prisutni u rasponu od 1% do 12% te se prema njima određuje i kvaliteta lovorovog lišća (Kaurinović i Vastag, 2019; Kaurinovic i sur., 2010).

Lovorov list sadrži 1-3% eteričnog ulja lokaliziranog u mezofilu lista u posebnim okruglim stanicama - uljenicama. Eterično ulje je svijetle zelenkasto-žute boje, aromatičnog okusa i intenzivnog mirisa (Kuštrak, 2005). Eterično ulje lovora uglavnom se sastoji od hlapljivih spojeva monoterpenskih i seskviterpenskih ugljikovodika i njihovih oksigeniranih derivata te fenilpropanoida. Najzastupljeniji oksigenirani monoterpeni su 1,8-cineol, linalool, α -terpinil acetat i α -terpineol. Najzastupljeniji monoterpenski ugljikovodici su α i β -pinen i sabinen, dok su najzastupljeniji fenilpropanoidi eugenol i metil eugenol (Kilic i sur., 2004; Peris i Blázquez, 2015). Udjeli glavnih komponenti prisutnih u eteričnom ulju lovorovog lista razlikuju se ovisno o klimatskim i pedološkim uvjetima. U tablici 1 prikazani su udjeli komponenti eteričnih ulja lovora s različitih područja obale Hrvatske.

Iz lista lovora izolirani su i flavoni (apigenin i luteolin), flavonoli (kaempferol, miricetin i kvercetin), seskviterpenski laktoni, alkaloidi, glikozilirani flavonoidi i monoterpenski alkoholi (Kaurinovic i sur., 2010). Lišće lovora sadrži i do 25 masnih kiselina, od koji su najzastupljenije palmitinska i linolenska kiselina. Također sadrži šećere (fruktozu, saharozu, glukozu i trehalozu), polisaharide (alginat, fukoidan i laminaran) i organske kiseline (oksalnu, jabučnu i askorbinsku kiselinu). Prisutni su i norisoprenoidi, α , β , γ i δ -tokoferoli, jednostavni fenolni spojevi i proantocijanidini (Alejo-Armijo i sur., 2017).

Tablica 1. Kemijski sastav i sadržaj eteričnog ulja lovora (Kuštrak, 2005)

| Glavne komponente (%) | Nalazišta | | |
|--------------------------|-----------|----------------|-----------------|
| | Opatija | Rijeka (Pulac) | Otok Krk (Kras) |
| α -pinen | 3,6 | 3,8 | 4,7 |
| sabinen | 8,7 | 10,2 | 10,7 |
| 1,8-cineol | 32,8 | 30,9 | 33,6 |
| linalol | 7,3 | 8,8 | 4,7 |
| terpinen-4-ol | 3,5 | 2,7 | 4,6 |
| β -kariofilen | 1,6 | 2,2 | 0,7 |
| α -terpineol | 3,5 | 4,6 | 3,7 |
| α -terpinilacetat | 10,2 | 8,6 | 9,1 |
| metil-eugenol | 4,8 | 5,6 | 8,8 |

| | | | |
|--|------|------|------|
| eugenol | 3,4 | 3,9 | 2,8 |
| Postotak eteričnog ulja u listovima | 0,87 | 1,36 | 1,53 |

2.1.4. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidansi su bioaktivni spojevi koji sprječavaju ili smanjuju nepoželjne oksidacijske reakcije. Mnogi začini pokazuju značajnu antioksidacijsku aktivnost koja se povezuje s prisutnošću fenolnih spojeva, posebice flavonoida i tokoferola (Altemimi i sur., 2017). Batool i sur. (2020) određivali su antioksidacijsku aktivnost u ekstraktima lovora mjerenjem sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala, vodikovog peroksida i superoksidnog anionskog radikala, smanjenjem snage i mjerenjem sposobnosti vezanja metala. Značajna antioksidacijska aktivnost u lovorovom listu primijećena je kod emulzije linolne kiseline, gdje je pri koncentracijama od 20, 40 i 60 mg/mL inhibicija lipidne peroksidacije iznosila 94,2%, 97,7% i 98,6% (Batool i sur., 2020).

2.2. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti biljaka koji sadrže jedan ili više aromatskih prstena na koje su vezane jedna ili više hidroksilnih grupa (-OH). Topljivi su u vodi, a u biljkama su često vezani na šećerne jedinice u obliku glikozida. U biljnim organizmima imaju ulogu zaštite biljke i sudjeluju u njenom rastu. Smatra se da je upravo prisutnost fenolnih spojeva u začinima zaslužna za aromu, okus, boju i oporost (Muchuweti i sur., 2007). Fenoli imaju brojne učinke na ljudski organizam, sprječavaju bolesti srca, smanjuju razne upale, smanjuju učestalost pojave karcinoma i dijabetesa te smanjuju broj mutageneza (Khoddami i sur., 2013). Nadalje, fenolni spojevi imaju značajno antioksidacijsko djelovanje zahvaljujući sposobnosti da uklanjaju slobodne radikale, doniraju atome vodika ili elektrone i vežu katione metala. Prema broju C atoma dijele se kako je prikazano u tablici 2 (Balasundram i sur., 2006).

Tablica 2. Podjela fenolnih spojeva u biljkama prema broju C atoma (Balasundram i sur., 2006)

| | |
|---|-------------------|
| jednostavni fenoli, benzokinoni | C_6 |
| hidroksibenzojeve kiseline | C_6-C_1 |
| acetofenoni i fenilacetatne kiseline | C_6-C_2 |
| hidroksicimetne kiseline, fenilpropanoidi | C_6-C_3 |
| naftokinoni | C_6-C_4 |
| ksantoni | $C_6-C_1-C_6$ |
| stilbeni i antrakinoni | $C_6-C_2-C_6$ |
| flavonoidi, izoflavonoidi | $C_6-C_3-C_6$ |
| lignani i neolignani | $(C_6-C_3)_2$ |
| biflavonoidi | $(C_6-C_3-C_6)_2$ |
| lignini | $(C_6-C_3)_m$ |
| kondenzirani tanini | $(C_6-C_3-C_6)_n$ |

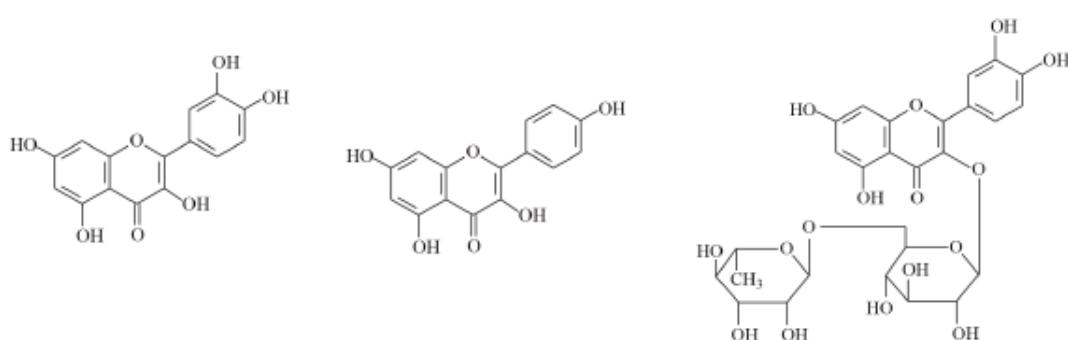
Sadržaj fenola u lovorovom listu ovisi o podrijetlu biljke, klimatskim uvjetima, uvjetima uzgoja i o vremenu berbe, a udio fenola u ekstraktima ovisi o metodi i uvjetima ekstrakcije. Ukupne fenolne sastojke ekstrakta lovorovog lista Kaurinovic i Vastag (2019) određivali su u ekstraktima etanola, etil-acetata i n-butanola. Najmanja koncentracija prisutna je u ekstraktu etanola (2,41 mg GAE/g suhe tvar), potom slijedi ekstrakt n-butanola (3,96 mg GAE/g suhe tvari), a najveća je koncentracija određena u ekstraktu etil-acetata (4,53 mg GAE/g suhe tvari). Škerget i sur. (2005) su provodeći ekstrakciju uz metanol kao otapalo određivali ukupne fenolne spojeve prisutne u začinskom mediteranskom bilju te su iz lovorovog lista ekstrahirali 99,7 g GAE/ kg ukupnih fenola, 29,9 g/kg proantocijanidina i 80,1 mg/ kg flavonoida.

2.2.1. Flavonoidi

Flavonoidi su biljni pigmenti koji se sastoje od dva benzenova prstena povezana preko jedinice C_3 , kemijske formule $C_6-C_3-C_6$ (Kaurinović i Vastag, 2019). Derivati su aromatskih amino kiselina, fenilalanina i tirozina (Khoddami i sur., 2013). U skupinu flavonoida pripadaju flavoni, flavonoli, izoflavonoli, antocijani, antocijanidini, proantocijanidini i katehini, a odgovorni su za žutu, narančastu, crvenu, plavu i ljubičastu boju biljaka. Uloga flavonoida je zaštita biljke od UV zračenja i oksidacijskog stresa, djelujući tako da uklanjaju slobodne radikale poput reaktivnih kisikovih čestica (ROS – reactive oxygen species) i ketalnih metala

koji stvaraju ROS. Antioksidacijska aktivnost povezuje se sa strukturom flavonoida odnosno prisutnošću konjugiranih dvostrukih veza i pojavom funkcionalnih skupina u aromatskim prstenima (Galić, 2020).

Kaurinović i Vastag (2019) ekstrahirali su bioaktivne spojeve iz lovorovog lista pomoću metanola te su kao najzastupljenije flavonoide detektirali kaempferol-3-O-glukozid (56,15 $\mu\text{g/g}$), kvercetin-3-O-glukozid (31,18 $\mu\text{g/g}$), kvercetin (21,62 $\mu\text{g/g}$), rutin (17,44 $\mu\text{g/g}$) kaempferol (11,97 $\mu\text{g/g}$), kvercetin (7,14 $\mu\text{g/g}$) i luteolin (5,19 $\mu\text{g/g}$) (slika 2). Visoki udjeli ukupnih flavonoida određeni su u ekstraktima etil-acetata i n-butanola, dok je najmanji udio određen u ekstraktu etanola i vodenom ekstraktu. Škerget i sur. (2005) su iz lovorova lista kao najzastupljenije flavonoide metanolom ekstrahirali 31,90 mg/kg kvercetina i 48,22 mg/kg kaempferola.

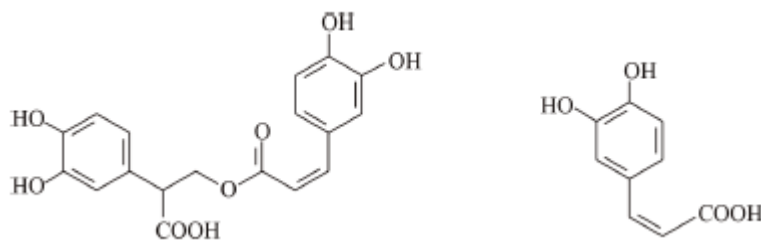


Slika 2. Kvercetin (lijevo), kaempferol (sredina) i rutin (desno) (Kaurinović i Vastag, 2019)

2.2.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su derivati benzojeve ($\text{C}_6\text{-C}_1$) i cimetine ($\text{C}_6\text{-C}_3$) kiseline. Derivati cimetine kiseline, posebice hidroksicimetine kiseline su prekursori u biokemijskim reakcijama sinteze fenolnih spojeva u biljkama (Kaurinović i Vastag, 2019). Fenolne kiseline također doprinose antioksidacijskom kapacitetu zahvaljujući mogućnosti da djeluju kao reducirajuća sredstva, donatori vodika i u neutralizaciji reaktivnog kisika (Galić, 2020).

Kaurinović i Vastag (2019) ekstrahirali su bioaktivne spojeve iz lovorovog lista pomoću metanola te su od fenolnih kiselina u visokom udjelu detektirali *p*-hidroksibenzojevu (38,46 $\mu\text{g/g}$), kafeinsku (16,18 $\mu\text{g/g}$), klorogensku (13,11 $\mu\text{g/g}$) i ružmarinsku kiselinu (slika 3). Muchuweti i sur. (2007) su upotrebom HPLC analize određivali sastav fenola u začinskom bilju. U lovorovom listu detektirali su prisutnost tri fenolne kiseline: vanilinske, kafeinske i ferulinske.



Slika 3. Ružmarinska kiselina (lijevo) i kafeinska kiselina (desno) (Kaurinović i Vastag, 2019)

2.2.3. Tanini

Tanini su fenolni spojevi koji se dijele na kondenzirane tanine i tanine koji se mogu hidrolizirati. Kondenzirani tanini nastaju povezivanjem flavonoidnih jedinica, a uglavnom su prisutni u drvenastim biljkama. Tanini koji se mogu hidrolizirati su heterogeni polimeri koji sadrže fenolne kiseline i jednostavne šećere. Glavna uloga tanina u biljkama je obrambena, djeluju kao otrov koji reducira rast i preživljavanje mnogih herbivora, a prilikom konzumacije uzrokuju oštar i trpak okus u ustima (Galić, 2020).

Muchuweti i sur. (2007) su tijekom istraživanja sastava fenola u začinskom bilju, u lovorovom listu odredili ukupnu koncentraciju fenola koja je iznosila 12,09 mg GAE/g uzorka te koncentraciju tanina koja je iznosila 9,44 mg GAE/g uzorka.

2.3. Metode ekstrakcije fenolnih spojeva

Ekstrakcija je specifična metoda djelomičnog ili potpunog izdvajanja biološki aktivnih spojeva iz homogenih smjesa kod koje se topljive komponente odvajaju od netopljivih ili manje topljivih komponenata otapanjem u prikladnom otapalu. Otapala koja se najčešće primjenjuju za ekstrakciju bioaktivnih spojeva su voda, organska otapala poput metanola, etanola, acetona i etera ili superkritični ugljikov dioksid (Herceg, 2011; Shirsath i sur., 2012). Izbor otapala za ekstrakciju ovisi o svojstvima tvari koje se žele ekstrahirati (površinskoj napetosti, viskoznosti, tlaku isparavanja i polarnosti otapala) (Shirsath i sur., 2012).

Ekstrakcija se odvija u tri faze: miješanje smjese iz koje se ekstrahiraju tvari i otapala u jednom ili više stupnjeva, zadržavanje smjese u otapalu kroz određeno vrijeme i odvajanje otapala s otopljenim tvarima (Herceg, 2011). Pročišćavanje ekstrakta od smjese može se provesti filtracijom, centrifugiranjem ili kromatografijom na koloni. Izolirani biološki aktivni spojevi u ekstraktima određuju se pomoću raznih metoda analiza: nuklearnom magnetskom rezonancijom, infracrvenim zračenjem, kromatografskim metodama, masenom

spektrometrijom, UV/Vis spektrofotometrijom ili kristalografijom X-zrakama (Altemimi i sur., 2017).

Tijekom perioda zadržavanja smjese s otapalom odvija se prijenos mase topljivih tvari iz uzorka u otapalo. Ekstrakcija je najučinkovitija ako je vrijeme zadržavanja dovoljno da otapalo efikasno otopi topljivu tvar (Herceg, 2011). Koliko će ekstrakcija trajati ovisi o:

- Topljivosti tvari koje ekstrahiramo u odabranom otapalu; što je topljivost tvari veća, vrijeme potrebno za ekstrakciju će biti kraće.
- Temperaturi ekstrakcije; viša temperatura pospješuje otapanje topljive tvari i brzinu njezine difuzije u otapalu, a samim time pospješuje i ekstrakciju, no uslijed osjetljivosti bioaktivnih spojeva na visoku temperaturu, ekstrakcije neželjenih sastojaka pri višim temperaturama i ekonomičnosti, ekstrakcija se najčešće provodi na temperaturama manjim od 100°C.
- Površini krute tvari iz koje ekstrahiramo; prilikom ekstrakcije materijal se često usitnjava jer se tako povećava dodirna površina između materijala i otapala čime se povećava brzina prijenosa mase.
- Viskoznosti otapala; ako otapalo ima manju viskoznost lakše će prodirati u kruti materijal.
- Protoku otapala; ako je protok otapala veći smanjit će granični sloj između koncentrirane otopine i površine materijala i povećat će se brzina ekstrakcije.
- Unutarnjoj difuziji otapala kroz materijal; ako se ekstrahira iz biljnog materijala koji sadrži staničnu stijenku, difuzija je otežana te se da bi se olakšao i skratio put difuzije otapala biljni materijal usitnjava (Herceg, 2011).

Metode ekstrakcije dijele se na tradicionalne i nove metode. Tradicionalne metode poput Soxhlet ekstrakcije, maceracije i vodene destilacije karakterizirane su primjenom visokih temperatura i duljim vremenom ekstrakcije što može dovesti do degradacije bioaktivnih spojeva te potrošnjom i isparavanjem velikih količina otapala. Upravo iz tih razloga sve se češće pribjegava novim metodama ekstrakcije kao što su ekstrakcija superkritičnim fluidima, ekstrakcija uz primjenu visokog tlaka, ekstrakcija potpomognuta enzimima, mikrovalovima ili ultrazvukom. Cilj novih metoda je upotreba manje opasnih hlapljivih organskih otapala, postizanje veće kvalitete ekstrakta, skraćeno vrijeme ekstrakcije, provedba pri nižim temperaturama, ekonomičnost i ekološka prihvatljivost (Sahne i sur., 2016).

2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

2.3.1.1. Ultrazvuk

Ultrazvuk je zvučni val frekvencije između 20 kHz i 100 MHz, izvan dosega ljudskog sluha (Sahne i sur., 2016). Energija ultrazvuka je okarakterizirana snagom i intenzitetom zvuka te gustoćom zvučne energije prema čemu se dijeli na ultrazvuk niskog intenziteta, ispod 1 Wcm^{-3} , koji koristi frekvencije više od 100 kHz i ultrazvuk visokog intenziteta, iznad 1 Wcm^{-3} , s rasponom frekvencija od 18 do 100 kHz (Dolatowski i sur., 2007). Ultrazvuk je određen amplitudom, frekvencijom, valnom duljinom i koeficijentom prigušenja.

Ultrazvučni postav se sastoji od generatora, koji pretvara električnu energiju u visoku frekvenciju izmjenične struje, i pretvornika, koji pretvara visoku frekvenciju izmjenične struje u mehaničke vibracije. Nastale mehaničke vibracije uzrokuju kavitaciju. Ovisno o načinu izvedbe ultrazvučni postav sadrži ili ultrazvučnu sondu (slika 4) ili ultrazvučnu kupelj (Brnčić i sur., 2009). Ultrazvučna kupelj se sastoji od spremnika s jednim ili više ultrazvučnih pretvornika te obično radi na frekvenciji od 40 kHz. Jeftine su i dostupne, moguće je tretirati više uzorka istodobno, ponovljivost je manja te se intenzitet ultrazvuka smanjuje prolaskom kroz vodu u spremniku i stakleno posuđe u kojem se nalaze uzorci. Ultrazvučne sonde obično rade na frekvenciji od 20 kHz, a pretvornik je direktno povezan sa sondom koja se uranja direktno u uzorak. Na taj se način smanjuje gubitak ultrazvučne energije te se intenzitet prenosi kroz manju površinu u usporedbi s ultrazvučnom kupelji (Chemat i sur., 2017). Nedostatak upotrebe ultrazvučne sonde je neprestani kontakt sonde i uzorka čime se smanjuje ponovljivost i preciznost, povećava se temperatura u uzorku te je veći rizik od onečišćenja i stvaranja pjene (Khoddami i sur., 2013; Chemat i sur., 2017).



Slika 4. Ultrazvučni postav sa sondom (Vlastita fotografija)

2.3.1.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom koristi se ultrazvuk visokog intenziteta najčešće u rasponu frekvencija od 20 do 40 kHz. Ultrazvuk visokog intenziteta uzrokuje fizičke promjene biljnog materijala koje dovode do skraćivanja vremena provedbe i povećanja učinkovitosti ekstrakcije (Dolatowski i sur., 2007). Ultrazvučni intenzitet proporcionalan je amplitudi ultrazvuka te razina kavitacije ovisi o amplitudi, no veća amplituda nužno ne znači učinkovitiju ekstrakciju (Tiwari, 2015). Najčešće korištena otapala za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom fenolnih spojeva iz biljaka su etanol, kombinacija etanol/voda, voda i aceton (Dent i sur., 2015). Iako je u klasičnim ekstrakcijama poput Soxhlet ekstrakcije etanol manje učinkovit od metanola, u ekstrakciji potpomognutom ultrazvukom upotreba etanola rezultirala je pojačanjem ukupnog antioksidacijskog kapaciteta te se etanol uz manju toksičnost i dobivanje iz obnovljivih izvora pokazao kao efikasno i održivo otapalo za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom (Rodrigues i Fernandes, 2009).

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom bazira se na pojavi fenomena kavitacije. Prolaskom zvučnih valova ultrazvuka kroz tekući medij nastaju longitudinalni valovi, koji uzrokuju izmjene ciklusa kompresije i ekspanzije. Dolazi do izmjenjivanja visokog i niskog tlaka uslijed čega se u otapalu stvara veliki broj mjehurića plina. Veličina nastalih mjehurića oscilira kako oscilira i tlak te u fazi ekspanzije malo više narastu nego što se smanje tijekom kompresije. Dosezanjem određene kritične veličine mjehurić plina više ne može apsorbirati energiju te dolazi do implodije mjehurića plina, odnosno mjehurić plina se urušava u sebe. Implodijom mjehurića oslobađa se velika količina energije te dolazi do porasta temperature i tlaka (Brnčić i sur., 2009; Chuo i sur., 2020). Kada energija ultrazvuka nije dovoljna da se zadrži plinska faza dolazi do brze kondenzacije plinovitih mjehurića te uslijed njihova sudaranja nastaju šok valovi koji također uzrokuju porast temperature (Brnčić i sur., 2009). Implodija nastalih kavitacijskih mjehurića uzrokuje kemijske fizikalne i mehaničke promjene u biljnom materijalu. Uslijed nastalih promjena dolazi do lakše hidratacije materijala, oštećenja staničnih stijenka i povećanja njezinih pora. Olakšava se difuzija otapala u stanice materijala, olakšava se otpuštanje bioaktivnih spojeva iz stanica i povećava se prijenos mase (Muniz-Marquez i sur., 2013; Vilku i sur., 2008). Pojava kavitacije ovisi o karakteristikama ultrazvuka (amplitudi, frekvenciji i intenzitetu), o duljini ekstrakcije, temperaturi i vlažnosti, primijenjenom otapalu, ali i o svojstvima proizvoda: viskoznosti, gustoći i površinskoj napetosti (Brnčić i sur., 2009; Chuo i sur., 2020). Kako se uzorci tijekom ekstrakcije uslijed zvučne energije zagrijavaju potrebno je kontrolirati temperaturu. Visoka temperatura otapala pojačava difuziju prijenosa tvari, ali smanjuje kavitaciju i dolazi do razgradnje termolabilnih

bioaktivnih spojeva (Tiwari, 2015). Chemat i sur. (2017) su proučavajući učinak ultrazvuka na biljni materijal primijetili da uz kavitaciju ultrazvuk djeluje i drugim neovisnim ili kombiniranim mehanizmima poput fragmentacije, erozije, kapilarnosti, destrukcije i sonoporacije.

Prednosti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom u odnosu na klasične metode su: skraćeno vrijeme ekstrakcije, niže temperature ekstrakcije, ponovljivost, veći prinosi bioaktivnih spojeva, upotreba manjih količina otapala, veća čistoća i selektivnost ekstrakta, povećana produktivnost, ušteda energije i ekološka prihvatljivost (Dent i sur., 2015; Chemat i sur., 2017; Sahne i sur., 2016). Mjehurići nastali kavitacijom povećavaju hidrofobni karakter ekstrakcijskog otapala što olakšava ekstrakciju polarnih otapala i smanjuje potrebu za upotrebom nepoželjnih hidrofobnih ili jako polarnih ekstrakcijskih otapala (Vilkhu i sur., 2008). Nedostatak ultrazvučne ekstrakcije je povremen štetan utjecaj energije ultrazvuka na bioaktivne spojeve začinskog i ljekovitog bilja što može dovesti do formiranja slobodnih radikala i neželjenih promjena na molekulama (Handa i sur., 2008; Chuo i sur., 2020). Zbog dobre izvedbe ekstrakcije i jednostavnosti, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom se sve više koristi prilikom ekstrakcije bioaktivnih tvari iz biljnog materijala (Chuo i sur., 2020).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci lista lovora

Za provedbu eksperimentalnog dijela ovog završnog rada korišteni je suhi list lovora (*Laurus nobilis*) 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).

3.1.2. Kemikalije

- Etanol, 50 %-tni (Lach:ner, Neratovice, Češka Republika)
- Etanol, 70 %-tni (Lach:ner, Neratovice, Češka Republika)
- Etanol, 96 %-tni (Lach:ner, Neratovice, Češka Republika)
- Folin – Ciocalteu reagens (F.C. reagens) (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
- Galna kiselina (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka)
- Glacijalna octena kiselina, 99-100 %-tna (CARLO ERBA Reagents, Le Vaudreuil, Francuska)
- Klorovodična kiselina, 37%-tna (CARLO ERBA Reagents, Le Vaudreuil, Francuska)
- Natrij-acetat trihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat anhidrid (Lach:ner, Neratovice, Češka Republika)
- Trolox (Acros Organics, New Jersey, SAD)
- TPTZ-a (2,4,6-tripiridil-s-triazin) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka)
- Željezo (III)-klorid heksahidrat (GRAM MOL, Zagreb, Hrvatska)

3.1.3. Otopine

- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6
Priprema: Odvaži se 3,1 g natrij-acetat trihidrata u plastičnoj ladici 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.
- FRAP reagens
Priprema: U staklenoj čaši volumena 50 mL pripremi se FRAP reagens 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.
- Klorovodična kiselina, 40 mM

Priprema: Otpipetira se 330 μ L 37 %-tne klorovodične kiseline i nadopuni destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL.

- TPTZ-a (2,4,6-tripiridil-s-triazin), 10 mM

Priprema: 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

Priprema: Odvaži se 0,0501 g Troloxa. Odvaga se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom.

- Standard galne kiseline

Priprema: Odvaži 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 otopina)

Priprema: 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.

- Željezo (III)-klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), 20 mM

Priprema: 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.

3.1.4. Instrumenti i pribor

- Analitička vaga ($\pm 0,0001$ g), (OHAUS, AX224, Parsippany, SAD)
- Centrifuga (Hettich, Rotofix 32, Tuttlingen, Njemačka)
- Spektrofotometar (VWR, UV-1600PC Spectrophotometer, Pennsylvania, SAD)
- Termička kupelj (BÜCHI, Heating Bath B-490, Flawil, Švicarska)
- Ultrazvuk (Heilscher, UP200Ht ultrasonic processor, Teltow, Njemačka); sonda od titanija, \varnothing 14 mm, (154 mm²), duljine cca. 80 mm, vanjski naboj M6x0,75, za uzorke od 50 mL do 1000 mL, omjer amplitude cca. 1:1,2
- Vortex (IKA, MS2 Minishaker, Staufen, Njemačka)

- Automatske pipete 100-1000 μ L, 0,5-5 mL
- Erlenmeyerove tikvice od 50 mL
- Filter papir

- Infracrveni termometar
- Kivete za čuvanje uzorka
- Menzure od 50 mL
- Odmjerne tikvice od 50 mL
- Plastična ladica za vaganje
- Staklene čaše
- Staklene epruvete
- Staklene kivete
- Stakleni lijevci

3.2. Metode rada

Ekstrakti iz sušenog i usitnjenog lovorovog lista dobiveni su ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom, a potom je u dobivenim ekstraktima spektrofotometrijski određen maseni udio fenolnih spojeva te antioksidacijski kapacitet FRAP metodom.

3.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija fenolnih spojeva lovora provedena je prema eksperimentalnom dizajnu prikazanom u tablici 3. S ciljem utvrđivanja utjecaja parametara ekstrakcije na maseni udio fenolnih spojeva lovora i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata varirano je vrijeme ekstrakcije (5, 10 i 15 min), amplituda ultrazvuka (50, 75 i 100 %) i koncentracija etanola u otapalu (50 i 70 %). Sve ekstrakcije su provedene pri konstantnoj frekvenciji (26 kHz) i snazi ultrazvuka (200 W), primjenom sonde promjera 14 mm.

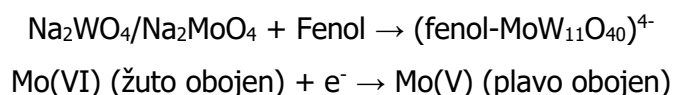
Za ekstrakciju se odvaži 1g suhog, usitnjenog lovorovog lista te se prelije s 40 mL otapala. Sonda ultrazvuka se uroni u sredinu tikvice s otapalom i uzorkom te se ekstrakcija provede po zadanim parametrima. Tijekom ekstrakcije temperatura se hlađenjem reakcijske smjese ledom održava ispod 50°C kako ne bi došlo do razgradnje fenolnih spojeva uslijed visokih temperatura. Nakon ekstrakcije, uzorci se centrifugiraju i filtriraju kroz filter papir u odmjerne tikvice od 50 mL, te se nadopune do oznake s odgovarajućim otapalom. Dobiveni ekstrakti skladište se na temperaturi od +4°C do provođenja analiza.

Tablica 3. Eksperimentalni dizajn za izolaciju fenolnih spojeva lovora primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

| Broj uzorka | % EtOH | Vrijeme (min) | Amplituda (%) |
|-------------|--------|---------------|---------------|
| 1 | 50 | 5 | 50 |
| 2 | | | 75 |
| 3 | | | 100 |
| 4 | | 10 | 50 |
| 5 | | | 75 |
| 6 | | | 100 |
| 7 | | 15 | 50 |
| 8 | | | 75 |
| 9 | | | 100 |
| 10 | 70 | 5 | 50 |
| 11 | | | 75 |
| 12 | | | 100 |
| 13 | | 10 | 50 |
| 14 | | | 75 |
| 15 | | | 100 |
| 16 | | 15 | 50 |
| 17 | | | 75 |
| 18 | | | 100 |

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Koncentracija ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima se određuje spektrofotometrijskom metodom koja se bazira na reakciji fenolnih spojeva s Folin-Ciocalteu reagensom odnosno sa smjesom fosfowolframove i fosfomolibdenske kiseline u alkalnim uvjetima (Shortle i sur., 2014). Uslijed oksidacije fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima, fosfowolframova i fosfomolibdena kiseline se reduciraju u plavo obojene volframov i molbidenov oksid. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se spektrofotometrom na valnoj duljini od 765 nm te se iz dobivenih apsorbancija pomoću baždarnog pravca galne kiseline određuju maseni udijeli fenola. Nastalo obojenje ovisi o broju hidroksilnih, oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima, te je intenzivnije što je broj tih skupina veći.



3.2.2.1. Postupak određivanja ukupnih fenola

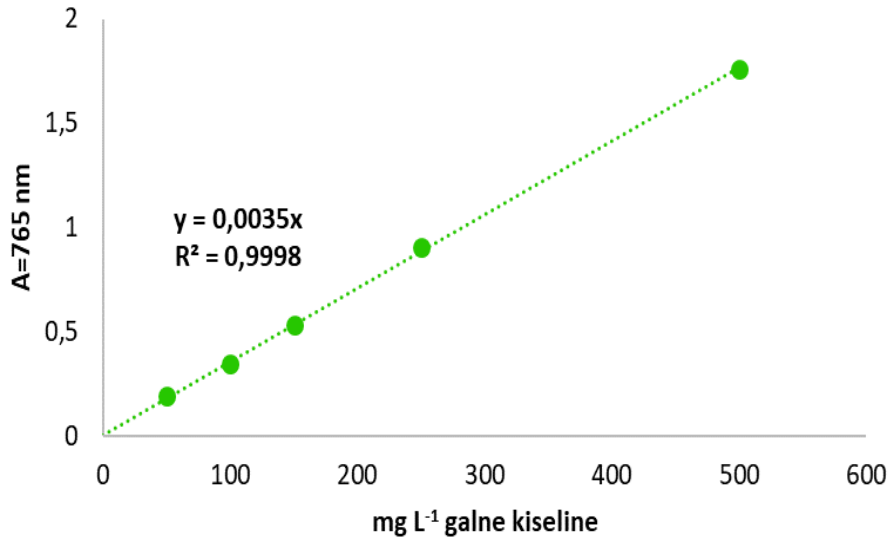
Prethodno pripremljene ekstrakte iz lista lovora dobivene ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom za potrebe određivanja ukupnih fenola spektrofotometrijom potrebno je prethodno razrijediti 5 puta.

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 μL ekstrakta, 200 μL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri temperaturi od 50°C (u kupelji od rotavapora). Na isti način pripremi se i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100 μL otapala za ekstrakciju (50%-tni i 70%-tni etanol). Potom se na spektrofotometru pri valnoj duljini 765 nm mjeri apsorbancija odnosno optička gustoća otopine.

3.2.2.2. Izrada baždarnog dijagrama galne kiseline

Za pripremu baždarnog pravca odvaži se 0,5 g galne kiseline, otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od pripremljene otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 100 μL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200 μL Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute dodaje se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a uzorci se potom termostatiraju 25 minuta pri T=50°C (u kupelji od rotavapora). Za slijepu probu uzima se 100 μL destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrti se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu se na apscisu nanose koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm (slika 5). Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 5. Baždarni dijagram galne kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0035 * X (R^2 = 0,9998)$$

Gdje je: Y – apsorbancija pri 765 nm

X - koncentracija galne kiseline

R² – koeficijent determinacije

Koncentracije ukupnih fenola izražavaju se su u mg GAE/g osušenog lovorovog lista kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

FRAP (eng. Ferric Reducing Antioxidant Power) metoda temelji se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) u kiselom mediju pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridiltriazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 583 nm. FRAP vrijednosti najčešće se izražavaju preko FeSO₄, askorbinske kiseline ili Trolox ekvivalenta (Benzie i Strain, 1996).

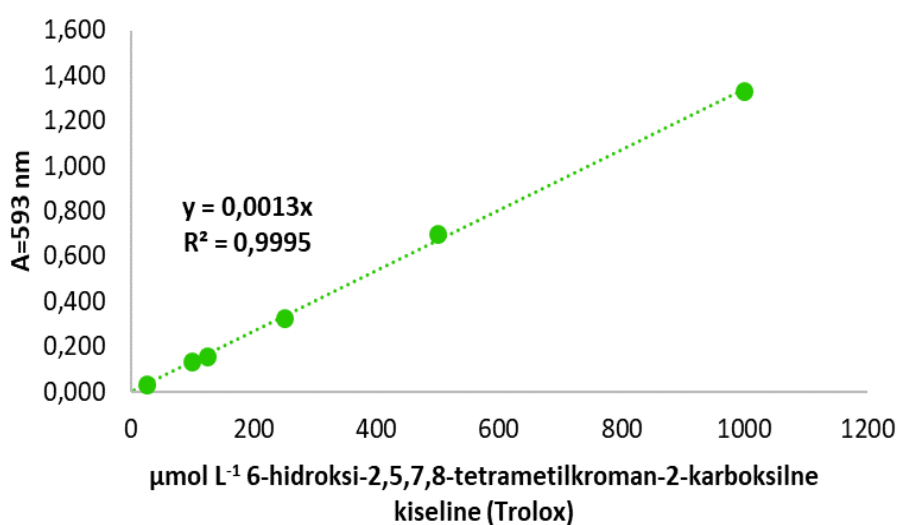
3.2.3.1. Postupak određivanja

Prethodno pripremljene ekstrakte iz lista lovora dobivene ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom za potrebe određivanja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom potrebno je prethodno razrijediti 20 puta.

U staklene epruvete redom se otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL uzorka i 2080 μL FRAP reagensa, dobro se promiješa (pomoću Vortexa) te 5 minuta termostatira pri $T=37^\circ\text{C}$. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, a umjesto uzorka dodaje se ekstrakcijsko otapalo (50%-tni ili 70%-tni etanol).

3.2.3.2. Izrada baždarnog dijagrama

Za izradu baždarnog pravca pripremi se 2 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline) tako da se odvaže 0,0501 g Troloxa. Odvaga se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nadopuni do oznake 96%-tnim etanolom. 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 i 5 mL alikvota standardne otopine Troloxa u svaku tikvicu. Odmjerne tikvice se potom nadopunjavaju do oznake 96%-tnim etanolom. Koncentracije Troloxa u tim tikvicama iznose: 25, 100, 125, 50 i 1000 $\mu\text{mol/L}$. Nakon toga, u staklene epruvete redom se otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL otopine standarda iz prethodno pripremljenih odmjernih tikvica i 2080 μL FRAP reagensa. Potom slijedi miješanje (pomoću Vortexa) i termostatiranje pri $T=37^\circ\text{C}$. Apsorbancija se mjeri pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, gdje se umjesto uzorka dodaje 96%-tni etanol. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu se na apscisu nanose koncentracije Troloxa ($\mu\text{mol/L}$), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 593 nm (slika 6). Antioksidacijski kapacitet uzorka određen FRAP metodom izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 6. Baždarni dijagram Troloxa

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y=0,0013 * X (R^2=0,9995)$$

Gdje je: Y - apsorbancija pri 593 nm

X - ekvivalent Troloxa (TE) ($\mu\text{mol/L}$)

R^2 – koeficijent determinacije

Antioksidacijski kapacitet izražava se u $\mu\text{mol TE/ g}$ osušenog lovorovog lista kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti maseni udio ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet u ekstraktima lovorovog lista izoliranim primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom uz 50%-tni i 70%-tni etanol kao otapalo. Ekstrakcija se provodila pri amplitudama od 50, 75 i 100% u vremenu trajanja od 5, 10 i 15 minuta. U ekstraktima je određen maseni udio ukupnih fenola spektrofotometrijskom metodom mjerenjem apsorbancije na 765 nm i antioksidacijski kapacitet primjenom FRAP metode i mjerenjem apsorbancije na 593 nm. Maseni udio ukupnih fenola je prikazan u tablici 4, dok je antioksidacijski kapacitet prikazan u tablici 6.

4.1. Određivanje masenog udjela ukupnih fenola

Fenolni spojevi su različitog kemijskog sastava. Mogu biti topljivi u vodi ili u mastima, mogu se nalaziti neotopljeni ili vezani na staničnu membranu pa učinak ekstrakcije ukupnog masenog udjela fenola uvelike ovisi o provedenoj ekstrakciji i primijenjenom otapalu (Ishtiaque i sur., 2015).

Tablica 4. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u ekstraktima lovora dobivenim ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom

| Broj uzorka | Otapalo | Amplituda (%) | Vrijeme ekstrakcije (min) | mg GAE/ g uzorka ± SD |
|-------------|--------------|---------------|---------------------------|-----------------------|
| 1 | 50%-tni EtOH | 50 | 5 | 11,54±0,25 |
| 2 | | | 10 | 23,54±0,61 |
| 3 | | | 15 | 11,09±0,55 |
| 4 | | 75 | 5 | 7,90±0,40 |
| 5 | | | 10 | 25,90±1,16 |
| 6 | | | 15 | 11,57±0,15 |
| 7 | | 100 | 5 | 17,51±1,06 |
| 8 | | | 10 | 12,71±0,35 |
| 9 | | | 15 | 26,68±1,01 |

| | | | | |
|-----------|--------------|-----|----|------------|
| 10 | 70%-tni EtOH | 50 | 5 | 16,70±0,05 |
| 11 | | | 10 | 26,69±1,01 |
| 12 | | | 15 | 25,42±0,20 |
| 13 | | 75 | 5 | 24,48±1,06 |
| 14 | | | 10 | 21,71±0,55 |
| 15 | | | 15 | 20,12±0,30 |
| 16 | | 100 | 5 | 26,59±1,41 |
| 17 | | | 10 | 23,19±1,26 |
| 18 | | | 15 | 18,12±1,01 |

Ekstrakcijom iz osušenog lovrovog lista 50%-tnim etanolom u dobivenim ekstraktima udio ukupnih fenola varira od $7,90 \pm 0,4$ do $26,68 \pm 1,01$ mg GAE/ g uzorka. Ekstrakcijom 70%-tnim etanolom udio fenolnih spojeva je nešto viši te varira od $16,70 \pm 0,05$ do $26,69 \pm 1,01$ mg GAE/ g uzorka (tablica 4). Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem koje je provela Macut (2019), koja je u ekstraktima lovora nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom pri amplitudama 30, 50 i 100% i vremenu ekstrakcije 5, 10 i 15 minuta primjenom otapala etanol-voda (1:1) utvrdila raspon fenolnih spojeva od $5,55 \pm 2,86$ do $25,37 \pm 3,06$ mg GAE/g uzorka.

Statistička analiza je pokazala značajan utjecaj ($p < 0,05$) koncentracije etanola korištenog za ekstrakciju, vremena trajanja ekstrakcije i amplitude ultrazvuka primijenjene tijekom ekstrakcije na masenu koncentraciju ukupnih fenola u ekstraktima lista lovora (tablica 5).

Tablica 5. Analiza varijance utjecaja koncentracije etanola, vremena i amplitude ultrazvuka na koncentraciju ukupnih fenola u ekstraktima lista lovora

| | Ukupni fenoli, mg GAE/g | |
|------------------------------|-------------------------|-------|
| | F | p |
| Koncentracija EtOH, % | 510,04 | 0,00* |
| Vrijeme, min | 114,69 | 0,00* |
| Amplituda, % | 23,93 | 0,00* |

*statistički značajan utjecaj na 95% razini vjerojatnosti

Uspoređujući ekstrakciju 50%-tnim i 70%-tnim etanolom kao bolje otapalo se pokazao 70%-tni etanol jer se pri istim amplitudama i tijekom istog vremena u većini slučajeva ekstrahirao veći udio fenolnih spojeva. Veću učinkovitost 70%-tnog etanola kao otapala prilikom ekstrakcije zabilježili su i Muniz-Marquez i sur. (2014). Proveli su ekstrakciju uz refluks iz lovorovog lista u 0%-tnom, 35%-tnom i 70%-tnom etanolu te se najveći udio ukupnih fenolnih spojeva ekstrahirao primjenom 70%-tnog etanola.

Udio ekstrahiranih fenolnih spojeva ovisi o primijenjenoj amplitudi i vremenu izloženosti toj amplitudi. Kada se ekstrakcija provodi tijekom 5 minuta udio fenolnih spojeva raste kako se primjenjuju veće amplitude te je najveći uz primjenu amplitude od 100%. Kada se vrijeme ekstrakcije produlji na 10 i 15 minuta upotrebom sve viših amplituda dolazi do opadanja udjela ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktima te je najveći udio ekstrahiran kod amplitude od 50%. Provedbom ekstrakcije 50%-tnim etanolom tijekom 10 minuta primijećeno je odstupanje jer je najveći udio fenolnih spojeva određen upotrebom amplitude od 75% i provedbom ekstrakcije tijekom 15 minuta kada je najveći udio ukupnih fenolnih spojeva određen upotrebom amplitude od 100%.

Ekstrakcijom 50%-tnim etanolom pri amplitudama od 50 i 75% s produljenjem vremena ekstrakcije od 5 do 10 minuta raste i udio fenolnih spojeva ($23,54 \pm 0,61$ i $25,90 \pm 1,16$ mg GAE/g uzorka), a nakon 10 minuta ekstrakcije udio fenolnih spojeva opada. Kod amplitude od 100% s duljinom trajanja ekstrakcije raste i udio ukupnih fenolnih spojeva te je najveći udio ekstrahiran tijekom 15 minuta ($26,68 \pm 1,01$ mg GAE/g uzorka). Ekstrakcijom 70%-tnim etanolom pri amplitudi od 50% najveći udio fenolnih spojeva je određen kod ekstrakcije tijekom 10 minuta ($26,69 \pm 1,01$ mg GAE/g uzorka), dok je pri višim amplitudama najveći udio ekstrahiran tijekom 5 minuta ($24,48 \pm 1,06$ i $26,59 \pm 1,41$ mg GAE/g uzorka), a daljnjom ekstrakcijom udio fenolnih spojeva opada. Može se zaključiti da je kod viših amplituda dovoljna kraća ekstrakcija da bi se ekstrahirao jednak udio fenolnih spojeva kao prilikom nižih amplituda.

Dobiveni podaci koji ukazuju na maksimalnu masenu koncentraciju ukupnih fenola u ekstraktu dobivenom ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom do 10 minuta, te smanjenje udjela fenolnih spojeva s produljenjem ekstrakcije, slažu se s istraživanjem Upadhyay-a i sur. (2015) i Rincon-a i sur. (2019). Do opadanja udjela fenolnih spojeva tijekom dulje ekstrakcije pri višim amplitudama može doći jer dulje tretiranje uzrokuje zagrijavanje ekstrakcijskog otapala, a porast temperature dovodi do razgradnje biološki aktivnih spojeva poput fenola. Drugi razlog koji je mogao dovesti do smanjenja udjela fenola pri višim amplitudama je progresivno povećanje intenziteta ultrazvuka pri čemu se stvara više šupljina koje ometaju

širenje ultrazvučnih valova. Nastale šupljine se spajaju i stvaraju veće šupljine koje slabije implodiraju te je kavitacijski učinak na biljne stanice slabiji pa se samim time smanjuje i izdvajanje bioaktivnih spojeva iz biljnih stanica (Upadhyay i sur., 2015). Nadalje, visok intenzitet ultrazvuka i pojava kavitacije mogu dovesti i do razgradnje ekstrahiranih spojeva i nastanka slobodnih radikala koji dodatno ubrzavaju njihovu razgradnju (Tiwari, 2015; Rincon i sur., 2019; González de Peredo i sur., 2019). Miljanović i sur. (2020) su također zabilježili opadanje udjela fenolnih spojeva pri višim amplitudama i tijekom dulje ekstrakcije.

Sveukupno gledajući kao najbolji uvjeti ekstrakcije, pri kojima su ekstrahirani najveći udjeli fenolnih spojeva, pokazali su se ekstrakcija 50%-tnim etanolom pri amplitudi od 75% tijekom 10 minuta ($25,90 \pm 1,16$ mg GAE/g uzorka) i pri amplitudi od 100% tijekom 15 minuta ($26,68 \pm 1,01$ mg GAE/g uzorka), te ekstrakcija 70%-tnim etanolom pri amplitudi od 50% tijekom 10 minuta ($26,69 \pm 1,01$ mg GAE/g uzorka) i pri amplitudi od 100% tijekom 5 minuta ($26,59 \pm 1,41$ mg GAE/g uzorka). Uzimajući u obzir ekonomičnost samog postupka ekstrakcije najprihvatljivijom za daljnju upotrebu su se pokazale ekstrakcija 50%-tnim etanolom kod amplitude 75% tijekom 10 minuta i ekstrakcija 70%-tnim etanolom kod amplitude 50% tijekom 10 minuta jer se kroz kraće vrijeme i nižu amplitudu, a time i uz manju potrošnju energije ekstrahira visok udio fenolnih spojeva koji se značajno ne razlikuje od udjela fenola u ekstraktima dobivenim primjenom 50%-tnog i 70%-tnog etanola pri amplitudi od 100%.

4.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Antioksidacijski kapacitet se koristi kao parametar koji pokazuje prisutnost bioaktivnih i funkcionalnih komponenti u nekoj otopini ili ekstraktu. Postoji više različitih postupaka za njegovo određivanje pa su dobiveni rezultati o antioksidacijskim svojstvima često ograničeni (Muniz-Marquez i sur., 2014). U ovom radu antioksidacijska aktivnost ekstrakata lovorovog lista se određivala FRAP metodom.

Tablica 6. Rezultati dobiveni određivanjem antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom u ekstraktima lovora dobivenim ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom

| Broj uzorka | Otapalo | Amplituda (%) | Vrijeme ekstrakcije (min) | $\mu\text{mol TE/ g}$ suhog uzorka \pm SD | |
|-------------|--------------|---------------|---------------------------|---|--------------------|
| 1 | 50%-tni EtOH | 50 | 5 | 159,09 \pm 3,25 | |
| 2 | | | 10 | 218,56 \pm 0,54 | |
| 3 | | | 15 | 182,86 \pm 1,09 | |
| 4 | | 75 | 100 | 5 | 224,60 \pm 2,17 |
| 5 | | | | 10 | 263,16 \pm 3,26 |
| 6 | | | | 15 | 220,81 \pm 7,59 |
| 7 | | 100 | 100 | 5 | 172,82 \pm 0,00 |
| 8 | | | | 10 | 181,73 \pm 4,34 |
| 9 | | | | 15 | 178,25 \pm 6,52 |
| 10 | 70%-tni EtOH | 50 | 5 | 194,78 \pm 10,84 | |
| 11 | | | 10 | 183,20 \pm 2,17 | |
| 12 | | | 15 | 155,30 \pm 4,88 | |
| 13 | | 75 | 100 | 5 | 162,25 \pm 10,82 |
| 14 | | | | 10 | 210,80 \pm 5,97 |
| 15 | | | | 15 | 158,07 \pm 14,61 |
| 16 | | 100 | 100 | 5 | 111,80 \pm 5,41 |
| 17 | | | | 10 | 159,17 \pm 4,88 |
| 18 | | | | 15 | 197,86 \pm 2,72 |

Ekstrakcijom iz osušenog lovorovog lista 50%-tnim etanolom u dobivenim ekstraktima antioksidacijski kapacitet varira od 159,09 \pm 3,25 do 263,16 \pm 3,26 $\mu\text{mol TE/ g}$ suhog uzorka. Ekstrakcijom 70%-tnim etanolom antioksidacijski kapacitet varira od 111,80 \pm 5,41 do 210,80 \pm 5,97 $\mu\text{mol TE/ g}$ suhog uzorka (tablica 6). Lu i sur. (2011) su u svom

istraživanju ekstrakcijom iz lovorovog lista, 60%-tnim etanolom kroz 24 h pri 35°C, odredili visoku antioksidacijsku aktivnost i visok udio fenolnih spojeva. Primjenom FRAP metode i mjerenjem apsorbancije dobivenog ekstrakta pri 593 nm odredili su antioksidacijski kapacitet od $504,25 \pm 26,74 \mu\text{mol TE/g}$ suhog uzorka.

Statistička analiza je pokazala značajan utjecaj ($p < 0,05$) koncentracije etanola korištenog za ekstrakciju, vremena trajanja ekstrakcije i amplitude ultrazvuka primijenjene tijekom ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost dobivenih ekstrakata (tablica 7).

Tablica 7. Analiza varijance utjecaja koncentracije etanola, vremena i amplitude ultrazvuka na koncentraciju ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata lista lovora

| | Antioksidacijska aktivnost, $\mu\text{mol TE/g}$ | |
|------------------------------|--|----------|
| | F | p |
| Koncentracija EtOH, % | 200,65 | 0,00* |
| Vrijeme, min | 78,45 | 0,00* |
| Amplituda, % | 120,19 | 0,00* |

*statistički značajan utjecaj na 95% razini vjerojatnosti

Uspoređujući antioksidacijski kapacitet ekstrakata dobivenih ekstrakcijom 50%-tnim i 70%-tnim etanolom, ekstrakti dobiveni ekstrakcijom 50%-tnim etanolom imaju veći antioksidacijski kapacitet. Najveći antioksidacijski kapacitet imao je ekstrakt dobiven 10 minutnom ekstrakcijom 50%-tnim etanolom pri amplitudi od 75% ($263,169 \pm 3,26 \mu\text{mol TE/g}$ suhog uzorka) koja se ujedno pokazala i jednom od najučinkovitijih za izolaciju ukupnih fenolnih spojeva.

Ekstrakcijom 50%-tnim etanolom neovisno o duljini provedbe ekstrakcije (5, 10 ili 15 minuta) najveći antioksidacijski kapacitet određen je u ekstraktima dobivenima ekstrakcijom uz amplitudu od 75%. Ekstrakcijom 70%-tnim etanolom tijekom 5 minuta antioksidacijski kapacitet je najveći upotrebom amplitude od 50%, a daljnjim porastom amplitude opada. Ekstrakcijom tijekom 10 minuta najveći antioksidacijski kapacitet se postiže uz amplitudu od 75%, a najmanji uz amplitudu od 100%. Ekstrakcijom tijekom 15 minuta dolazi do porasta antioksidacijskog kapaciteta kako raste i amplituda. Uspoređujući amplitude ultrazvuka prilikom upotrebe i 50%-tnog i 70%-tnog etanola optimalna amplituda pokazala se 75%-tna, odnosno dobiveni su ekstrakti s najvećima antioksidacijskim kapacitetom.

Kao kod određivanja ukupnog udjela fenola jednak trend porasta antioksidacijskog kapaciteta do određenog vremena, a potom njegovo opadanje daljnjom ekstrakcijom zabilježen je i prilikom određivanja antioksidacijskog kapaciteta. U ekstraktima dobivenima ekstrakcijom uz 50%-tni etanol kao otapalo pri različitim amplitudama ultrazvuka (50%, 75% i 100%) najveći antioksidacijski kapacitet kod svih amplituda određen je u ekstraktima dobivenima tijekom ekstrakcije od 10 minuta, nakon čega opada. Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem koje su proveli Hossain i sur. (2012), koji su provodili ultrazvučnu ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz mažurana u trajanju od 5, 10 i 15 minuta te su najveći antioksidacijski kapacitet izmjerili u ekstraktima dobivenim ekstrakcijom u trajanju od 10 minuta. Ekstrakcijom 70%-tnim etanolom kod amplitude od 50% najveći antioksidacijski kapacitet određen je ekstrakcijom tijekom 5 minuta, kod amplitude od 75% tijekom 10 minuta, a kod amplitude od 100% tijekom 15 minuta.

Antioksidacijski kapacitet često se povezuje s udjelom prisutnih fenola u ekstraktima pa je tako i u ekstraktu dobivenom ekstrakcijom 50%-tnim etanolom pri amplitudi od 75% tijekom 10 minuta, u kojem je određena visoka koncentracija ukupnih fenola, određen najveći antioksidacijski kapacitet. Dobiveni rezultati se podudaraju s istraživanjem koje su proveli Hashemi i sur. (2017). Proučavajući utjecaj amplitude i temperature kod ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na kinetiku, temperaturu, antioksidacijska i antimikrobna svojstva ekstrakata bosiljka zaključili su kako se antioksidacijski kapacitet mijenja proporcionalno s koncentracijom fenolnih spojeva.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih u ovom istraživanju možemo zaključiti sljedeće:

1. Ekstrakti lovorovog lista su značajan izvor fenolnih spojeva. Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva ovisno o uvjetima ekstrakcije i primijenjenom otapalu varira od $7,90 \pm 0,40$ do $26,69 \pm 1,01$ mg GAE/g uzorka.
2. Kao učinkovitije otapalo za izolaciju fenolnih spojeva lovora se pokazao 70%-tni etanol jer se pri istim amplitudama i tijekom istog vremena u većini slučajeva ekstrahirao veći udio fenolnih spojeva nego prilikom upotrebe 50%-tnog etanola.
3. Uzimajući u obzir trajanje ekstrakcije, amplitudu i udio izoliranih fenolnih spojeva najekonomičnije i stoga najprihvatljivije za daljnju upotrebu su ekstrakcija 50%-tnim etanolom kod amplitude 75% tijekom 10 minuta i ekstrakcija 70%-tnim etanolom kod amplitude 50% tijekom 10 minuta.
4. Ekstrakti lovorovog lista imaju visok antioksidacijski kapacitet koji ovisno o uvjetima ekstrakcije varira od $111,80 \pm 5,41$ do $263,16 \pm 3,26$ $\mu\text{mol TE/ g}$ suhog uzorka.
5. Kao učinkovitije otapalo za dobivanje ekstrakata s većim antioksidacijskim kapacitetom pokazao se 50%-tni etanol, a optimalna amplituda pokazala se 75%-tna.
6. Uz primjenu 50%-tnog i 70%-tnog etanola kao otapala najveći antioksidacijski kapacitet određen je u ekstraktima dobivenima ekstrakcijom u trajanju od 10 minuta uz amplitudu od 75% ($263,16 \pm 3,26$ i $210,80 \pm 5,97$ $\mu\text{mol TE/ g}$ suhog uzorka).

6. POPIS LITERATURE

Alejo-Armijo A., Altarejos J., Salido S. (2017) Phytochemicals and biological activities of laurel tree (*Laurus nobilis*). *Natural product communications* **12** (5): 743 - 757.

Altemimi A., Lakhssassi N., Baharlouei A., Watson D.G., Lightfoot D.A. (2017) Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants* **6**: 42.

Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry* **99**: 191 - 203.

Batool S., Khera R.A., Hanif M.A., Ayub M.A. (2020) Bay leaf. Medicinal plants of South Asia, Elsevier, Okara, str. 63 - 74.

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

Boulila A., Hassen I., Haouari L., Mejri F., Amor I.B., Casabianca H., Hosni K. (2015) Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from bay leaves (*Laurus nobilis* L.). *Industrial Crops and Products* **74**: 485 - 493.

Brnčić M., Tripalo B., Penava A., Karlović D., Ježek D., Vikić Topić D., Karlović S., Bosiljkov T. (2009) Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **4**: 32 - 37.

Chemat F., Rombaut N., Sicaire A.G., Meullemiestre A., Fabiano-Tixier A.S., Abert-Vian M. (2017) Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols, and applications. A review. *Ultrasonics sonochemistry* **34**: 540 - 560.

Chuo S.C., Nasir H.M., Mohd-Setapar S.H., Mohamed S.F., Ahmad A., Wani W.A., Muddassir M., Alarifi A. (2020) A Glimpse into the Extraction Methods of Active Compounds from Plants. *Critical reviews in analytical chemistry* 2020: 1 - 30.

Dent M., Dragović-Uzelac V., Elez Garofulić I., Bosiljkov T., Ježek D., Brnčić M. (2015) Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction techniques on mass fraction of phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **29** (3): 475 - 484.

Dolatowski Z.J., Stadnik J., Stasiak D. (2007) Applications of ultrasound in food technology. *Acta Sci. Pol, Technol. Aliment.* **6(3)**: 89 – 99.

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

González de Peredo A., Vázquez-Espinosa M., Espada-Bellido E., Ferreiro-González M., Amores-Arocha A., Palma M., Barbero G., Jiménez-Cantizano A. (2019) Alternative ultrasound-assisted method for the extraction of the bioactive compounds present in myrtle (*Myrtus communis* L.). *Molecules* **24**: 882.

Handa S.S., Khanuja S.P.S., Longo G., Rakesh D.D. (2008) Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. International Centre for Science and High Technology, Trieste, str. 25.

Hashemi S.M.B., Ghorashi Sh., Hadizadeh F., Zarei Z., Yazdani M., Noormohammadi M. (2017) Effect of Amplitude of Ultrasound-Assisted Solvent Extraction and Extraction Temperature on the Kinetics, Thermodynamics, Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Ocimum basilicum* L. Extract. *J. Agr. Sci. Tech.* **19**: 1517 – 1526.

Herceg Z. (2011) Procesi u prehrambenoj industriji, Plejada, Zagreb, str. 98 - 103.

Hossain M.B., Brunton N.P., Patras A., Tiwari B., O'donnell C.P., Martin-Diana A.B., Barry-Ryan C. (2012) Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. *Ultrasonics sonochemistry* **19 (3)**: 582 - 590.

Ishtiaque S., Naz S., Soomro N., Khan K., Siddiqui R. (2015) Antioxidant activity and total phenolics content of extracts from *Murraya koenigii* (curry leaves), *Laurus nobilis* (bay leaves), and *Camellia sinensis* (tea). *Quaid-E-Awam University Research Journal of Engineering, Science & Technology* **14(2)**: 20 - 25.

Kaurinovic B., Popovic M., Vlasisavljevic S. (2010) In vitro and in vivo effects of *Laurus nobilis* L. leaf extracts. *Molecules* **15**: 3378 - 3390.

Kaurinovic B., Vastag D. (2019) Flavonoids and phenolic acids as potential natural antioxidants. U: Antioxidants, (Shalaby, E., ured.) IntechOpen, London, str. 127 - 146.

Khoddami A., Wilkes M.A., Roberts T.H. (2013) Techniques for analysis of plant phenolic

compounds. *Molecules* **18**: 2328 - 2375.

Kilic A., Hafizoglu H., Kollmannsberger H., Nitz S. (2004) Volatile constituents and key odorants in leaves, buds, flowers, and fruits of *Laurus nobilis* L. *Journal of agricultural and food chemistry* **52**: 1601 - 1606.

Kuštrak D. (2005) Farmakognozija – fitofarmacija, Golden marketing, Zagreb, str. 295 – 298.

Lu M., Yuan B., Zeng M., Chen J. (2011) Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. *Food Research International* **44**: 530 - 536.

Macut M. (2019) Utjecaj metoda ekstrakcije na udio eteričnog ulja i fenolni sastav lista lovora (*Laurus nobilis* L.) (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Miljanović A., Bielen A., Grbin D., Marijanović Z., Andlar M., Rezić T., Roca S., Jerković I., Vikić-Topić D., Dent M. (2020) Effect of enzymatic, ultrasound, and reflux extraction pretreatments on the chemical composition of essential oils. *Molecules* **25**: 4818.

Muchuweti M., Kativu E., Mupure C.H., Chidewe C., Ndhlala A.R., Benhura M.A.N. (2007) Phenolic composition and antioxidant properties of some spices. *American Journal of Food Technology* **2(5)**: 414 - 420.

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**: 1149 - 1154.

Muñiz-Márquez D.B., Rodríguez R., Balagurusamy N., Carrillo M.L., Belmares R., Contreras J.C., Nevárez G.V., Aguilar C.N. (2014) Phenolic content and antioxidant capacity of extracts of *Laurus nobilis* L., *Coriandrum sativum* L. and *Amaranthus hybridus* L. *CyTA-Journal of Food* **12(3)**: 271 - 276.

Peris I., Blázquez M.A. (2015) Comparative GC-MS analysis of bay leaf (*Laurus nobilis* L.) essential oils in commercial samples. *International journal of food properties* **18(4)**: 757 - 762.

Rincon E., Balu A.M., Luque R., Serrano L. (2019) Mechanochemical extraction of antioxidant phenolic compounds from Mediterranean and medicinal *Laurus nobilis*: A comparative study with other traditional and green novel techniques. *Industrial Crops and Products* **141**:

111805.

Rodrigues S., Fernandes F.A. (2009) Ultrasound-assisted extraction. *Stewart Postharvest Reviews* **5**: 1 - 11.

Sahne F., Mohammadi M., Najafpour G.D., Moghadamnia A.A. (2016) Extraction of bioactive compound curcumin from turmeric (*Curcuma longa* L.) via different routes: A comparative study. *Pak. J. Biotechnol.* **13(3)**: 173 - 180.

Shirsath S.R., Sonawane S.H., Gogate P.R. (2012) Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations – A review of status. *Chemical Engineering and Processing* **53**: 10 – 23.

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

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**: 191 - 198.

Tiwari B.K. (2015) Ultrasound: A clean, green extraction technology. *Trends in Analytical Chemistry* **71**: 100 - 109.

Upadhyay R., Nachiappan G., Mishra H.N. (2015) Ultrasound-assisted extraction of flavonoids and phenolic compounds from *Ocimum tenuiflorum* leaves. *Food Science and Biotechnology* **24(6)**: 1951 - 1958.

Vilkhu K., Mawson R., Simons L., Bates D. (2008) Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **9**: 161 - 169.

[Slika 1] Listovi i plodovi lovora, preuzeto 22. veljače 2021. s <https://www.plantea.com.hr/>

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.

Petra Brezjan
ime i prezime studenta