Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola i trjeslovina vrste Laurus nobilis L. (Laureaceae) s područja Dalmacije

Rogulj, Anamarija

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:909683

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Anamarija Rogulj

Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola i trjeslovina vrste *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) s područja Dalmacije

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju *Analitika lijekova* Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova, u suradnji sa Zavodom za farmaceutsku botaniku Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Renate Jurišić Grubešić.

ZAHVALA

Zahvaljujem prije svega svojoj mentorici prof. dr. sc. Renati Jurišić Grubešić. Hvala na posvećenom vremenu, strpljivošću, susretljivošću u svakom trenutku te stručnom znanju kojim ste mi zaista puno pomogli u izradi ovog rada.

Zahvaljujem se i našoj tehničarki Đurđici Nestić na iznimno toplom pristupu, velikom strpljenju i pomoći prilikom rada u laboratoriju.

Veliko hvala mojim prijateljima i kolegama s kojima sam dijelila i uspjehe i poraze na ovom mukotrpnom putu, ali kojeg na kraju ipak mogu nazvati najljepšim dobom života upravo zbog divnih uspomena koje s njima dijelim, i prijateljstvu koje se ne može mjerit s ničim drugim.

I najveća zahvala mojim roditeljima i sestri koji su bili uz mene u svakom trenutku ovih 5 godina, pružali neizmjernu potporu, ljubav, vjeru i bez kojih sve ovo nebi bilo niti moguće. Najveća zasluga ide vama, bolju obitelj ne mogu poželjeti, hvala od srca!

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1

1.1. Botanički podatci ... 2

1.1.1. Porodica Lauraceae Juss. 1789. (lovori, lovorovke, lovorike) ... 2

1.1.2. Rod *Laurus* L. (lovori) ... 3

1.1.3. Vrsta *Laurus nobilis* L. (lovor, pravi lovor, lovorika) ... 3

1.2. Pregled istraživanja vrste *Laurus nobilis* L. ... 6

1.3. Biološki aktivne tvari vrste *Laurus nobilis* L. ... 8

1.3.1. Polifenoli ... 8

1.3.1.1. Struktura i značajke ... 8

1.3.1.2. Rasprostranjenost ... 9

1.3.1.3. Biološki učinci ... 10

1.3.2. Trjeslovine ... 11

1.3.2.1. Struktura i značajke ... 11

1.3.2.2. Rasprostranjenost ... 13

1.3.2.3. Biološki učinci ... 14

2. OBRAZLOŽENJE TEME ... 15

3. MATERIJALI I METODE ... 16

3.1. Biljni materijal ... **16**

3.2. Aparatura i kemikalije ... 16

3.3. Metode i postupci istraživanja ... **17**

3.3.1. Kvalitativna analiza trjeslovina ... 17

3.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina ... 18

4. REZULTATI I RASPRAVA ... 20

4.1. Rezultati kvalitativne analize trjeslovina ... 20

4.2. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola i trjeslovina ... 21

5. ZAKLJUČCI ... 26

6. LITERATURA ... 27

7. SAŽETAK/SUMMARY ... 31

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

U vrijeme suvremene tehnologije, čudesnih otkrića kemije i biologije i novih lijekova koji, po liječnicima suvremene medicine i farmaceutskoj industriji liječe mnoštvo tegoba i bolesti, sve više ljudi poseže za ljekovitim tvarima iz prirode. Uviđa se da konvencionalna medicina nije u mogućnosti riješiti sve zdravstvene probleme, a liječenje koje se zasniva na prirodnim ljekovitim tvarima i prikladnom načinu života smatra se manje agresivnim i znatno pristupačnijim od konvencionalne terapije.

Fitoterapija je najstariji oblik medicine koja se koristi ne samo u liječenju, već i u prevenciji mnogih bolesti. Podrazumijeva liječenje, ublažavanje i sprječavanje bolesti primjenom ljekovitih biljaka, njihovih dijelova (list, plod), sastojaka (eterično ulje), kao i pripravaka (tinkture, suhi ekstrakti). Francuski liječnik Henri Leclerc (1870-1955), često nazivan „ocem fitoterapije“, prvi je uveo taj termin u medicinsku znanost godine 1913. (www.britannica.com).

Danas mnoge znanstvene discipline kemijski, biodinamički i farmakološki dokazuju djelotvornost i sigurnost primjene ljekovitog bilja i njihovih pripravaka, pa i njihove prednosti u odnosu na kemijske preparate. Zato suvremenu fitoterapiju ne možemo smatrati alternativnim liječenjem, već sastavnim dijelom suvremene farmacije i znanstvene medicine koja čini važnu prevenciju i pomoć pri liječenju raznih bolesti.

Biljne lijekove podržala je i Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) koja pruža pomoć nastojanjima nerazvijenih zemalja da povećaju upotrebu takvih terapeutika. Zbog siromaštva i nedostupnosti moderne medicine, oko 65-80% svjetske populacije koja živi u zemljama u razvoju ovisi prvenstveno o ljekovitim biljkama za primarnu zdravstvenu zaštitu (www.who) . Iako sporijeg djelovanja i često potrebnog dugotrajnog liječenja, fitoterapeutici posjeduju širok terapijski raspon, manje neželjenih djelovanja od konvencionalnih lijekova i manje klinički značajnih interakcija s lijekovima i drugim tvarima, ali samo ukoliko se upotrebljavaju na ispravan način. Zato primjenu ljekovitog bilja treba racionalizirati i prepustiti stručnjacima, a posebice je to važno pri kombiniranju različitih biljnih pripravaka te njihove primjene zajedno s konvencionalnim lijekovima.

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza bioaktivnih prirodnih tvari iz skupine polifenola, ekstrahiranih iz listova različitih populacija vrste *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) s područja Dalmacije, a u svrhu njezine fitokemijske karakterizacije te spoznavanja fitoterapijskog potencijala.

1.1. Botanički podatci

1.1.1. Porodica Lauraceae (lovori, lovorike, lovorovke)

Lovor (*Laurus*) je rod biljaka iz porodice lovorike (Laureaceae) (Juss.) koja sadrži, po najnovijim istraživanjima, 68 rodova i 2978 vrsta. Uglavnom je čine drvenaste biljke koje rastu u tropskim i suptropskim krajevima (osobito u jugoistočnoj Aziji i tropskoj Americi), a manjim dijelom ih nalazimo i u umjerenom pojasu. S obzirom da rastu u područjima s velikim količinama kiše i vlage, biljke ove porodice su se prilagodile na takve uvjete u vidu kožnatih, uskih i ovalnih listova, kao i voštanog sloja na površini lista (Nikolić, 2013).

Važniji rodovi ove porodice su: *Aniba* (npr. ruža drvo - *Aniba rosaeodora*), *Cinnamomum* (npr. kamforovac *Cinnamomum camphora*, pravi cimetovac - *Cinnamomum verum*), *Laurus* (npr. lovor - *Laurus nobilis*), *Litsea* (npr. licea - *Litsea citrata*), *Ravensara* (npr. ravensara - *Ravensara aromatica*), *Sassafras* (npr. sasafras - *Sassafras album*) (Marković, 2005).

Actinodaphne	*Cinnadenia*	*Hypodaphnis*	*Mutisiopersea*	*Phyllostemonodaphne*	*Sinosassafras*
Aiouea	*Cinnamomum*	*Iteadaphne*	*Nectandra*	*Pleurothyrium*	*Syndiclis*
Alseodaphne	*Cinnamonum*	*Kubitzkia*	*Neocinnamomum*	*Polyadenia*	*Tetranthera*
Aniba	*Cryptocarya*	*Laurus*	*Neolitsea*	*Potameia*	*Tylostemon*
Apollonias	*Dehaasia*	*Licaria*	*Notaphoebe*	*Potoxylon*	*Umbellularia*
Aspidostemon	*Dicypellium*	*Lindera*	*Nothaphoebe*	*Povedadaphne*	*Urbanodendron*
Beilschmiedia	*Dodecadenia*	*Litsea*	*Ocotea*	*Ravensara*	*Williamodendron*
Benzoin	*Endiandra*	*Machilus*	*Oreodaphne*	*Rhodostemonodaphne*	
Camphora	*Endlicheria*	*Malapoenna*	*Parasassafras*	*Sassafras*	
Caryodaphnopsis	*Eusideroxylon*	*Mezilaurus*	*Parthenoxylon*	*Schauera*	
Cassytha	*Gamanthera*	*Misanteca*	*Persea*	*Sextonia*	
Chlorocardium	*Hufelandia*	*Mocinnodaphne*	*Phoebe*	*Sinopora*	

Slika 1. Rodovi porodice Lauraceae (www.theplantlist.org).

Većina biljaka iz porodice lovora su aromatične biljke koje imaju eterično ulje lokalizirano u raznim dijelovima biljke: list (lovor, ravensara), kora i grančice (cimet), drvo (ruža drvo) i plodovi (licea) (Marković, 2005).

Upravo zbog tih eteričnih ulja te brojnih korisnih svojstava i prirodnih produkata, biljke ove porodice su od velikog ekonomskog značaja. Tako čovjek iskorištava plod avokada (*Persea americana*) u prehrambene svrhe, cimet (*Cinnamomum spp*.) kao začinsku biljku, kamfor u kozmetologiji te lovor (*Laurus nobilis* L.), čiji su osušeni listovi omiljeni začin, a eterična ulja iz listova primjenjuju se u aromaterapiji, kozmetici i prehrambenoj industriji. Brojne mediteranske zemlje poput Grčke i Španjolske razvile su snažnu gospodarsku granu izvozom lovora i lovorovog ulja upravo zbog njegova blagotvornog utjecaja na zdravlje.

1.1.2. Rod *Laurus* L. (lovori)

Vrste roda *Laurus* L. su drvenaste, vazdazelene biljke koje rastu kao drveća ili grmovi. Listovi su jednostavni, izmjenično poredani, aromatični zbog prisutnih žlijezda s eteričnim uljem. Biljke su dvodomne, a cvjetovi aktinomorfni, jednospolni, s 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, jednopretinčana, s jednim sjemenim zametkom. Plod je jednosjemena kuglasta boba, promjera 1-1,5 cm, koja dozrijeva u kasnu jesen (Grdinić i Kremer, 2009).
Rod obuhvaća dvije vazdazelene vrste, od kojih je *Laurus azorica* (Seub.) Franco rasprostranjena na Azorima, Kanarskom otočju, Madeiri te u Maroku, a *Laurus nobilis* L. u Francuskoj, na Pirinejskom, Apeninskom i Balkanskom poluotoku, u Turskoj te na Kavkazu.

1.1.3. Vrsta *Laurus nobilis* L. (lovor, pravi lovor, lovorika)

Lovor je drvenasta mediteranska kultura s prirodnim populacijama u primorskom području Hrvatske i zemljama oko Sredozemnog mora. Podrijetlo lovora je Mala Azija, a raste i u Južnoj Americi (Pahlow, 1999). U Hrvatskoj je rasprostranjen u Istri, Hrvatskom primorju i Dalmaciji, a najbujnije se razvija na obroncima Učke, uz gradove poput Opatije i Lovrana koji duguje svoje ime upravo toj biljci. Raste u priobalju ili na otocima, i to pojedinačno, tako da tvori malene šume, ili u skupinama s ostalim vazdazelenim biljem, posebice u listopadnim hrastovim šumama.
Naziv biljke potječe od latinskih riječi *laudare* – što znači hvaliti, uzdizati, i *nobilis* – što znači plemenit (Kuštrak, 2005).
Prvi zapisi o pronalasku i uporabi lovora datiraju još iz antičkih vremena Grčke i Rima kada se lovorov vijenac darivao pobjednicima Olimpijskih igara umjesto zlatnih medalja. Rimska kultura je lovor prigrlila kao simbol pobjede, a grane lovora i danas se nalaze na grbu Republike Grčke.



Slika 2. *Laurus nobilis* L. (http://herbaria.plants.ox.ac.uk).

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 ili duguljasto suličasti, šiljata ili ušiljena vrha, cijela i često valovita ruba, dugi 7-12 cm, široki 2,5-4,5 cm, kožasti, s gornje strani tamnozeleni i sjajni, s donje strane zeleni bez sjaja, goli i vrlo aromatični (Grdinić i Kremer, 2009).

U mezofilu lista lokalizirano je eterično ulje u posebnim stanicama – uljenicama. Okus listova je pomalo opor, gorak i ljut, a miris jak i ugodan (Kuštrak, 2005).

Cvjetovi su jednospolni (a biljke dvodomne: muški i ženski cvjetovi razvijaju se na različitim stablima), sitni, žućkastobijeli, 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. Biljka najbolje raste na svježim humusno-karbonatnim tlima, ali uspijeva i na suhim tlima i prilično je osjetljiva na niske temperature. Listovi se beru u kasnu jesen, suše u hladu u tankom sloju, u prozračnom i toplom prostoru oko mjesec dana (Grdinić i Kremer, 2009).

Kemijski sastav

List lovora sadrži 1-3% eteričnog ulja koje je bogato monoterpenolima (do 15% linalola, do 5% α-terpinola), oksidima (do 45% 1,8-cineola) te malom količinom vrlo aktivnih seskviterpenskih laktona (do 2% kostunolida, artemorin).

Osim eteričnih ulja, sadrže i dosta trjeslovina te nešto gorkih tvari.

Plod sadrži 1% eteričnog ulja, 30-40% masnih ulja te šećera i škroba (Kuštrak, 2005; Marković, 2005).

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

KEMIJSKI SASTAV I SADRŽAJ LOVOROVA ETERIČNOG ULJA – LAURI FOLII AETHEROLEUM

Glavne sastavnice (%)	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

Farmakološko djelovanje i upotreba lista lovora

Lovor je multifunkcionalna biljka. Koristi se u pučkoj medicini i veterinarstvu. Čaj od listova lovora se koristio za grgljanje kod angine, kao oblog kod nagnječenja ili čireva, ali i protiv grčeva u probavnim organima, mučnine u želucu te gubitku apetita (anoreksija). Svojedobno se čaj preporučivao i protiv bronhitisa, hunjavice i gripe, ali danas se pripravci lista lovora za unutarnju upotrebu rijetko koriste. Kao kupka djeluje vrlo opuštajuće i antireumatski. Iscrpina od narezanih listova u alkoholu upotrebljava se kod istegnuća tetiva, uganuća i reume. Osušeni list lovora poznat je i cijenjen začin. On se koristi u kulinarstvu za razna jela jer njegov izrazito aromatičan, ljut, jak i gorak okus djeluje kao digestiv ili stomahik. U Dalmaciji listove koriste kod konzerviranja i pakiranja suhog voća, naročito smokava, a ujedno je i repelent. U nekim zemljama se suši meso u dimu od lovorovih grančica, a može se upotrebljavati i za proizvodnju alkoholnih pića (Kuštrak, 2005).

Farmakološko djelovanje i upotreba eteričnog ulja lista lovora

Lauri folii aetheroleum – eterično ulje se dobiva ekstrakcijom iz listova lovora. Lovorov list sadrži prosječno od 1 do 3% eteričnog ulja. Glavni sastojak eteričnog ulja je cineol, a osim toga sadrži trjeslovine i gorke tvari. Dokazano je djelovanje eteričnog ulja kod prehlada, upale krajnika i kod različitih viroza. Umjereno je aktivno protiv bakterija, ima baktericidno i antiseptičko djelovanje, ali vrlo je aktivno protiv gljivica, naročito vrsta roda *Candida*. Ujedno je i jak ekspektorans, analgetik i spazmolitik. Primjenjuje se dermalno za masažu u aromaterapiji, protiv kožnih osipa, za masnu kožu i akne, protiv boli u mišićima i zglobovima, kod reumatoidnog artritisa, lokalno kod afti i inhalacijski kod virusne infekcije dišnog sustava. No, valja biti oprezan jer zbog visokog sadržaja seskviterpenskih laktona kod preosjetljivih osoba može izazvati alergijski dermatitis. U farmaceutskoj se industriji koristi u izradi sapuna, krema, losiona, parfema pa čak i detergenata (Kuštrak, 2005).

1.2. Pregled istraživanja vrste *Laurus nobilis* L.

Iako je lovor biljka koja većim dijelom služi kao začin u kulinarstvu, proveden je značajan broj znanstvenih istraživanja o njegovoj mogućoj uporabi u obliku farmaceutskih pripravaka, i to prije svega zahvaljujući antioksidativnim svojstvima flavonoidnih spojeva.

U najnovijoj studiji, istražen je učinak vrste *Laurus nobilis* L. i njegovih izoliranih flavonoida i glikozida na lipidni profil lokalnog iračkog ženskog kunića. Rezultati su pokazali da su oralnom primjenom snižene razine TC, TG, LDL-C i VLDL-C, u usporedbi s kontrolnom skupinom, te je stoga list lovora korisno sredstvo u tretiranju hiperlipidemije (AL-Samarrai i sur., 2017).

U Brazilu je ispitana antifungalna aktivnost eteričnog ulja iz listova lovora na kulturi *Cryptococcus neoformans.* Kemijski sastav ulja analiziran je plinskom kromatografijom spregnutom s masenom spektroskopijom (GC-MS), a minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) i minimalna fungicidna koncentracija (MFC) određene su tehnikom mikrorazrjeđenja bujona. MIC_{100} eteričnog ulja bio je 256 μg/mL, a MFC_{50} 1024 g/mL te je dokazan antifungalni učinak eteričnog ulja *in vitro* protiv *Cryptococcus neoformans* (Pinheiro i sur., 2017).

Nadalje, provedena je kemijska karakterizacija samonikle sorte lovora i one iz uzgoja te se uspoređivao fenolni profil, nutritivna vrijednost i antioksidativna aktivnost. Istraživanje je pokazalo da je divlji lovor bolji s obzirom na nutritivne vrijednosti, ali uzgojeni tip lovora pokazao je veće vrijednosti fenolnog profila i antioksidativne aktivnosti (Dias i sur., 2014).

Skupina talijanskih znanstvenika 2014. godine istraživala je neuroprotektivni potencijal antioksidativnog, polifenolima obogaćenog ekstrakta lovorovog lista. Kako je bilo pretpostavljeno da je oksidativni stres važan faktor u razvoju Alzheimerove bolesti, počelo se razmatrati biljne droge s antioksidativnim svojstvima kao alternativan i valjani pristup liječenju neurodegenerativnih bolesti (Pacifico i sur., 2014).

Kako su fenolni spojevi lovora u najvećoj mjeri odgovorni za blagotvorno djelovanje protiv gastrointestinalnih tegoba, nadutosti i sl., provedena je ultrazvučna ekstrakcija fenolnih spojeva uz promjenu različitih eksperimentalnih uvjeta. Potom je proučeno u kojim je uvjetima najbolja ekstrakcija fenolnih spojeva te su promatrana njihova antioksidativna svojstva. Najbolji uvjeti ekstrakcije: 1 g biljnog uzorka, 12 mL 35% etanola, 40 min ultrazvučne ekstrakcije (Muniz-Marquez i sur., 2013).

U Jordanu se u narodnoj medicini koristio lovor kao antidijaroik, no, kako je danas potrebna znanstvena validacija biljke za određenu primjenu, provedeno je istraživanje antidijaroičke aktivnosti lovora kod štakora. Dokazana je prisutnost flavonoida, alkaloida i tanina u ekstraktu lista lovora te potvrđeno inhibitorno djelovanje ekstrakta na dijareju izazvanu uljem ricinusa. Djeluje na način da inhibira crijevnu tranziciju ugljena i uzrokuje značajnu, o dozi ovisnu, relaksaciju glatkih mišića crijeva štakora. Tim je radom potvrđena opravdana uporaba lovora kod različitih gastrointestinalnih tegoba, posebice dijareje (Qnais i sur., 2012).

Također je provedeno *in vitro* istraživanje o utjecaju lovora na inhibiciju rasta stanica kolorektalnog tumora. Potvrđena je *in vitro* bioaktivnost koja bi mogla imati relevantnu protektivnu ulogu u ranoj fazi kolorektalnog tumora (Bennett i sur., 2013).

U istraživanju provedenom 2008. godine potvrđeno je antibakterijsko djelovanje dvaju flavonoida (različitih kemferol-ramnozida), izoliranih iz ekstrakta lista lovora, i to protiv meticilin rezistentniih sojeva *Staphylococcus aureus* (MRSA) i vankomicin rezistetnih enterokoka (VRE) (Otsuka i sur., 2008).

U iranskoj tradicionalnoj medicini koristi se eterično ulje iz listova lovora kao antiepileptik. Godine 2002. provedeno je istraživanje antikonvulzijske aktivnosti lovora protiv eksperimentalnih napadaja. Eterično ulje je štitilo miša od toničkih konvulzija induciranih maksimalnim elektrošokom, a posebno pentilentetrazolom. Komponente koje se smatraju odgovornima za takav učinak su metileugenol, eugenol i pinen koji su prisutni u eteričnom ulju (Sayyah i sur., 2002).

1.3. Biološki aktivne tvari vrste *Laurus nobilis* L.

1.3.1. Polifenoli

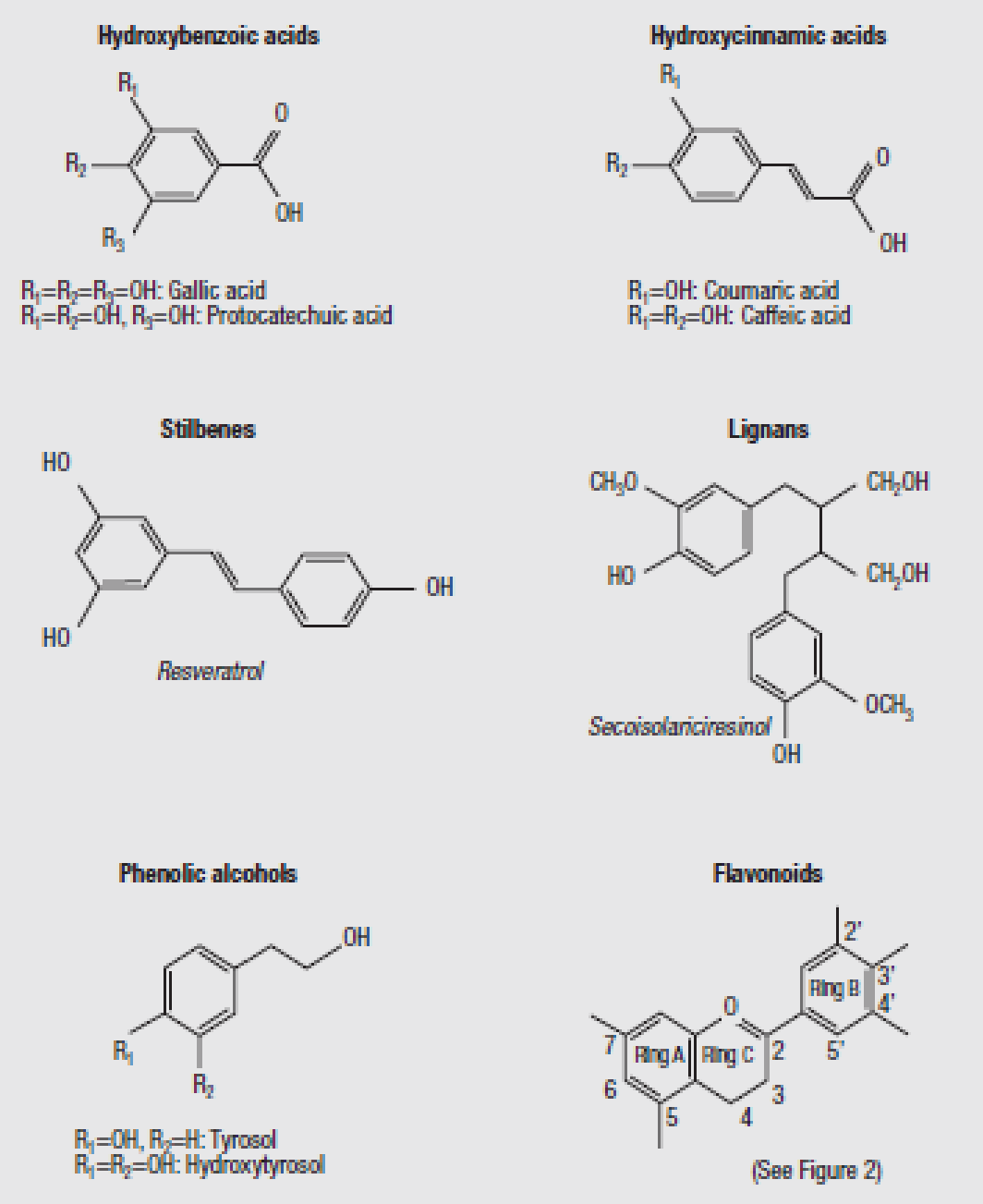
1.3.1.1. Struktura i značajke

Polifenoli čine jednu od najbrojnijih i najraspostranjenijih skupina tvari u biljnom carstvu, s više od 8000 trenutno poznatih fenolnih struktura (Bravo, 1998). Produkti su sekundarnog metabolizma biljaka i obično su uključeni u obranu od ultraljubičastog zračenja ili napada patogena. Premda se radi o vrlo heterogenoj skupini spojeva, gledano s kemijskog stajališta osnovno obilježje svih polifenola je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova (Manach i sur.,2004; Berend i Grabarić, 2008).

Polifenoli su podijeljeni u nekoliko skupina prema broju fenolnih prstenova koje sadrže i strukturnim elementima koji te prstenove povezuju. Glavne skupine polifenola su: flavonoidi, fenolne kiseline, fenolni alkoholi, stilbeni i lignani. Flavonoidi dijele zajednički ugljikov kostur difenil propana, dva benzenska prstena (A i B) povezanih propanskim lancem koji može formirati zatvoren piranski prsten (C) s jednim od benzenskih prstenova. Fenolne kiseline mogu se podijeliti u dvije skupine: derivati hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Tirosol i hidroksitirosol su glavni fenolni alkoholi koji su prvenstveno sadržani u ekstradjevičanskom maslinovom ulju. Stilbeni su nađeni u hrani u malim količinama, a glavni predstavnik je resveratrol. Lignani su produkti oksidativne dimerizacije dvije fenilpropanske jedinice (D'Archivio i sur., 2007).

Polifenoli nastaju iz dva glavna biosintetska puta: put šikiminske kiseline i acetatni put (acilpolimalonatni put). Šikiminska kiselina ključna je supstancija u onom u kojem nastaju aromatski prirodni spojevi. Univerzalni je prekursor u biosintezi aromatskih aminokiselina u mikroorganizmima (bakterijama, gljivicama) i višim biljkama, ali ne i u životinjskim organizmima (Vladimir-Knežević, 2008; Bravo, 1998).

Prirodni polifenoli primarno dolaze u konjugiranom obliku, s jednom ili više šećernih jedinica vezanih na hidroksilnu skupinu (premda postoje i oblici u kojima su šećerne jedinice izravno vezane na aromatski ugljikov atom). Vezani šećeri mogu biti monosaharidi, disaharidi ili čak oligosaharidi. Najčešća šećerna komponenta je glukoza, iako su nađene i galaktoza, ramnoza, ksiloza i arabinoza, te glukuronska i galakturonska kiselina. Moguće su i konjugacije polifenola s drugim tvarima, kao što su karboksilne i organske kiseline, amini i lipidi, a česte su i konjugacije s drugim fenolnim spojevima (Bravo, 1998).



Slika 3. Podjela polifenola na temelju njihovih kemijskih struktura (D'Archivio i sur., 2007).

1.3.1.2. Rasprostranjenost

Polifenoli su glavni antioksidansi u našoj prehrani. Ukupni dnevni unos hranom doseže 1 gram, što je mnogo više od unosa ostalih poznatih antioksidansa. Na primjer, ta količina je 10 puta veća od unosa vitamina C i 100 puta veća od unosa vitamina E i karotenoida. Glavni prehrambeni izvori polifenola su voće i pića dobivena od biljaka, poput voćnih sokova, čaja,

kave i crnog vina. Povrće, žitarice, čokolada i suhe mahunarke također pridonose ukupnom unosu polifenola (Scalbert i sur., 2005).

S obzirom na to da su u većini namirnica smjese polifenola kompleksne, za mnoge biljne produkte je sastav polifenola slabo poznat, a faktori koji utječu na njhov sastav su brojni. Okolišni faktori imaju možda najveći utjecaj, a mogu biti pedoklimatski (tip tla, izloženost sunčevoj svjetlosti, količina padalina) ili agronomski (uzgoj u stakleniku ili na otvorenom, ukupni urod po jednoj biljci i dr.). Skladištenje utječe na sastav polifenola koji su podložni oksidaciji. Reakcije oksidacije dovode do nastanka jedne ili više polimernih molekula, što dovodi do promjena u kakvoći namirnice, posebice u boji i organoleptičkim svojstvima.Takve promjene mogu biti poželjne, kao što je slučaj kod crnog čaja, ili nepoželjne, kao smeđa boja narezanog voća. Priprema hrane također ima značajan utjecaj na sadržaj polifenola u namirnicama. Na primjer, guljenje voća i povrća može ukloniti znatnu količinu polifenola jer su u višim koncentracijama prisutni u vanjskim dijelovima voća i povrća u odnosu na unutarnje. Termička obrada također ima velik utjecaj pa tako luk i rajčice gube između 75% i 85% početnog sadržaja kvercetina nakon 15 min ključanja, 65% nakon kuhanja u mikrovalnoj pećnici, i 30% nakon prženja. Zbog toga je poželjno kuhanje povrća na pari (Manach i sur.,2004).

1.3.1.3. Biološki učinci

Do sredine 1990-ih godina, najviše proučavani antioksidansi bili su antioksidativni vitamini, karotenoidi i minerali. Istraživanja na flavonoidima i ostalim polifenolima, njihovim antioksidativnim svojstvima i prevenciji bolesti počela su nakon 1995. godine. Glavni razlog koji je odgađao provedbu istraživanja bila je velika raznolikost i složenost kemijskih struktura.

Pozitivna djelovanja polifenola navedena u znanstvenim istraživanjima obuhvaćaju: antiinflamatorno, antimikrobno, antifungalno, diuretičko, antihepatotoksično, antihipertenzivno, antiaritmično, antikoagulirajuće, spazmolitičko, kardiotonično, antialergijsko, antiulkusno, analgetsko, antimalarijsko, hipoglikemijsko i antioksidativno djelovanje (Petrik, 2008).

Trenutni dokazi pokazuju doprinos polifenola u prevenciji kardiovaskularnih bolesti, raka i osteoporoze te sugeriraju njihovu ulogu u prevenciji neurodegenerativnih bolesti i dijabetesa. Većina tih dokaza je proizašla iz *in vitro* studija i eksperimenata na životinjama koji su često provođeni s puno višim dozama od onih kojima su ljudi izloženi prehranom. Očito je da polifenoli poboljšavaju status različitih biomarkera oksidativnog stresa. No, postoji još uvijek

mnogo nesigurnosti vezano uz značaj tih biomarkera kao prediktora bolesti i prikladnosti korištenih metoda. Epidemiološke studije jasno potvrđuju zaštitne učinke konzumiranja polifenola protiv kardiovaskularnih bolesti. Za razliku od toga, dokazi o protektivnom djelovanju polifenola protiv raka, neurodegenerativnih bolesti i pogoršanja funkcije mozga još uvijek proizlaze većim dijelom iz pokusa na životinjama te *in vitro* eksperimenata (Scalbert i sur., 2005).

Prehrambeni polifenoli mogu iskazivati sinergistička djelovanja. Sinergija je pojam koji opisuje uzajamno komplementarno djelovanje dviju komponenata čiji je zajednički učinak veći od zbroja učinaka pojedinih sastavnica. Sinergistički učinak primijećen je kod unosa kvercetina i katehina u smanjivanju daljnjeg zgrušavanja, što ukazuje na to da su polifenoli učinkovitiji u kombinaciji (Shivashankara i Acharya, 2010). Upravo zbog toga je raznovrsna prehrana koja uključuje raznoliko voće i povrće najbolji način unosa velikog raspona polifenolnih spojeva koji mogu onda djelovati individualno ili sinergistički, djelujući još učinkovitije na naše zdravlje.

1.3.2. Trjeslovine ili tanini

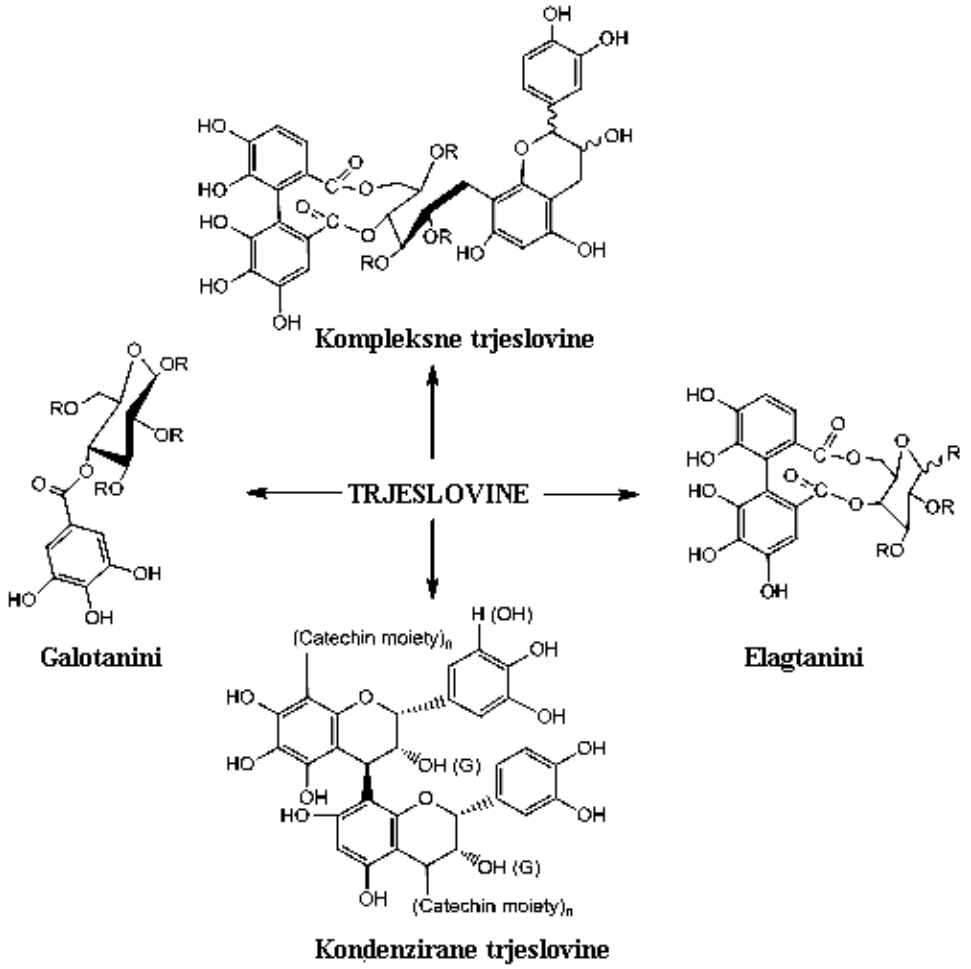
1.3.2.1. Struktura i značajke

Trjeslovine su skupina fenolnih spojeva koji su značajan produkt sekundarnog metabolizma biljaka. Ime im potječe iz 1796. kada je opisana njihova sposobnost da reagiraju sa životinjskom kožom pri njenoj obradi („tanning“). Karakteristike koje razlikuju trjeslovine od ostalih vrsta biljnih polifenola načelno su: vezivanje na proteine, baze, pigmente, velike molekule i metalne ione, antioksidativno djelovanje i drugo. Te se značajke koriste za njihovo kvalitativno i kvantitativno razlikovanje pri analizi polifenola. Postoje različiti pristupi kategorizaciji trjeslovina. Jednu od podjela prikazuje Slika 4. Trjeslovine su prvotno podijeljene u dvije grupe, prema polifenolnim skupinama u svojim molekulama, na trjeslovine tipa pirogalola i trjeslovine tipa katehola (katehina). Razvojem kemije trjeslovina, došlo je do preimenovanja tih dviju grupa (Okuda i Ito, 2011; Kalođera, 2010; Zhang i Lin, 2008; Rangari, 2007) u sljedeće skupine:

- trjeslovine koje hidroliziraju (galotanini i elagtanini);
- kondenzirane trjeslovine (katehinske trjeslovine):

Izolacija bioaktivnih stilbenoida i raznih oligomera rezveratrola, kao i florotanina iz smeđih algi, proširila je skupinu trjeslovina i povezanih polifenola i na navedene grupe spojeva.

Zbog čestih nemogućnosti provjera strukture trjeslovina opisanih u istraživanjima, a što je neophodno za karakterizaciju bioloških i farmakoloških svojstava nekog spoja, došlo je do uvođenja dodatne kategorizacije trjeslovina i povezanih polifenola u dvije grupe: tip A (s konstantnom strukturom) i tip B (s promjenjivom strukturom) (Okuda i Ito, 2011).



Slika 4. Podjela trjeslovina (Ascacio-Valdés i sur., 2011).

Trjeslovine koje hidroliziraju

Kao što samo ime kaže, trjeslovine koje hidroliziraju su spojevi topljivi u vodi djelovanjem mineralnih kiselina ili enzima kao što je tanaza. Njihova strukutra sadrži nekoliko molekula fenolnih kiselina, kao što su galna, heksahidrodifenolna ili elagna kiselina, povezanih esterskim vezama na središnju molekulu šećera, najčešće glukoze. Ovisno o fenolnim kiselinama nastalim nakon hidrolize, dalje se dijele na galotanine (sastavljene od galne kiseline) ili elagtanine (sadrže heksahidrodifenolnu kiselinu koja nakon intraesterifikacije daje elagnu kiselinu) (Vladimir-Knežević, 2008; Rangari, 2007).

Kondenzirane trjeslovine

Kondenzirane trjeslovine, za razliku od prethodne grupe, neće hidrolizirati na jednostavnije molekule djelovanjem mineralnih kiselina ili enzima. Ponekad se za njih koristi naziv proantocijanidini. Strukturno su to polimerni flavonoidi koji mogu imati i preko 50 jedinica (a rijetko su oligomerne strukture). Flavonoidi su raznolika skupina metabolita temeljena na heterocikličnoj prstenastoj bazi nastaloj od fenilalanina u poliketidnoj biosintezi. U trjeslovinama najčešće nalazimo katehin i epikatehin koji su flavan-3-oli, dok su leukoantocijanidini flavan-3,4-diolne strukture. Ti su polifenoli često dalje povezani na ugljikohidrate ili proteine kako bi tvorili još složenije trjeslovine (Rangari, 2007). Iako se naziv kondenzirane trjeslovine i dalje koristi za opisivanje tih polifenola, kemijski pojam koji ih bolje označava, „proantocijanidini“, polako se usvaja. Proantocijanidini su spojevi koji daju antocijanidinske pigmente nakon oksidativnog cijepanja (ne hidrolize!) u vrućem alkoholu. Kada se na njih djeluje kiselinama ili enzimima, obično polimeriziraju, dajući netopljive crvene produkte poznate pod imenom flobafeni (npr. kod kininovca) (Hagerman, 2002).

1.3.2.2. Rasprostranjenost

Trjeslovine ili tanini široko su rasprostranjeni u biljnom svijetu. Najpoznatije porodice od kojih sve vrste sadrže trjeslovine jesu: od dvosupnica Aceraceae, Actinidiaceae, Anacardiaceae, Bixaceae, Burseraceae, Combretaceae, Dipterocarpaceae, Ericaceae, te Najadaceae i Typhaceae od jednosupnica (Mole, 1993). Vrste porodica Brassicaceae (syn. Cruciferae) i Papaveraceae ne sadrže trjeslovine (Rangari, 2007).

Trjeslovine su neravnomjerno raspoređene u biljci, pri čemu ih najviše sadrži kora stabljike, zatim kora korijena, ksilemski dijelovi, listovi, i konačno, plodovi. Trjeslovinama su najbogatije patološke tvorevine, *Gallae* ili sisarke (šiške). Radi se o patološkim izraslinama na listu azijskog hrasta i na listovima ruja koje su nastale razvojem ličinke ose (azijski hrast) ili jedne vrste biljnih uši (kineski ruj), a mogu sadržavati do 75% trjeslovina. Razvija se larva, a biljka zbog podražaja stvara trjeslovine. S obzirom na starost pojedinih biljnih organa, utvrđeno je da se trjeslovine javljaju u većoj količini u mlađim dijelovima biljke (lisnim pupoljcima, mladim listovima i cvjetovima), što se objašnjava time da biljka gomila trjeslovine u onim dijelovima koji su joj najvrjedniji.

Količina tanina u biljci varira ovisno o različitim okolišnim i sezonskim čimbenicima. Suša, visoka temperatura, velika izloženost svjetlu i slaba kvaliteta zemlje stvaraju uvjete koji pogoduju povećanom sadržaju trjeslovina u biljci. Sezonska varijabilnost sadržaja ovisi o fazi

rasta biljke pa je tako sinteza tanina najintenzivnija u fazi cvatnje biljke, kada je smanjen njezin rast, pa su tada brojni prekursori na raspolaganju za sintezu fenolnih spojeva (Kalođera, 2010; Vladimir-Knežević, 2008).

1.3.2.3. Biološki učinci

Fiziološko značenje trjeslovina prilično je nejasno. Smatralo se da njihov gorak i trpak okus štiti biljku od štetočina, što se kasnije pokazalo netočnim. Niti pretpostavka da su trjeslovine pričuvne tvari nije se pokazala ispravnom jer se rijetko nalaze u biljnim dijelovima koji služe kao spremnici pričuvnih tvari. No, sa sigurnošću se može ustvrditi da u nekih biljaka trjeslovine sudjeluju u izmjeni tvari stvaranjem redoks sustava. Naime, zahvaljujući brojnim hidroksilnim skupinama u strukturi, trjeslovine djeluju kao snažni antioksidansi, pri čemu one veće molekulske mase djeluju kao jači hvatači slobodnih radikala. Također je poznato da su trjeslovine kelatori metala i da talože proteine. Trjeslovine mogu same po sebi biti i djelatne tvari, a može ih se promatrati pratiocima drugih aktivnih tvari, pri čemu utječu na terapijski učinak glavne aktivne komponente (Primorac, 2012; Hagerman, 2002).

Glavna upotreba trjeslovina povezana je s njihovim adstringentnim učinkom. Djeluju protiv dijareje i antiseptički, štiteći izložene membrane sluznice koagulacijom, stvarajući vodonepropusni sloj. Precipitirajući proteine, trjeslovine djeluju antimikrobno i antifungalno. Također, imaju hemostatsko djelovanje, i mogu djelovati kao antidoti kod nekih slučajeva trovanja (teškim metalima, crnom kavom i većinom alkaloida). Interno se još mogu koristiti i kod želučanog i crijevnog katara te hiperaciditetnog gastiritisa. U procesu cijeljenja rana, opeklina, ozeblina i upala, trjeslovine pomažu stvaranjem zaštitnog sloja preko ozlijeđenog tkiva, omogućavajući da se ispod njega slobodno odvija cijeljenje. Istraživanja su pokazala da mnoge trjeslovine neutraliziraju slobodne radikale, a poznato je da su mnoge degenerativne bolesti (rak, multipla skleroza, ateroskleroza, proces starenja) povezane s visokim koncentracijama slobodnih radikala između stanica. Također, određeni tipovi trimernih proantocijanidina mogu štititi protiv bolesti urinarnog trakta. No, trjeslovine su raznoliki spojevi s velikom varijacijom strukture i koncentracije u biljnom svijetu. Zbog toga su biomedicinska istraživanja pozitivnih i negativnih učinaka na zdravlje pri povećanom unosu trjeslovina znatno ograničena nedostatkom metoda za brzu karakterizaciju i standardizaciju (de Jesus i sur., 2012; Kalođera, 2010; Zhang i Lin, 2008; Rangari, 2007).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovog diplomskog rada je kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola i trjeslovina vrste *Laurus nobilis* L. (lovor) s područja Dalmacije – populacije Brač, Konavle, Korčula, Lastovo, Mljet, Pelješac i Šipan.

Kvalitativna analiza polifenola i trjeslovina u ekstraktima listova lovora provedena je općim reakcijama stvaranja obojenih produkata i taloga, a sadržaj ukupnih polifenola i trjeslovina određen je spektofotometrijski.

Svrha kvalitativne i kvantitativne analize provedene u okviru ovoga diplomskog rada jest doprinos znanstvenim istraživanjima vrste *Laurus nobilis* L., a rezultati provedene studije predstavljaju osnovu daljnjih istraživanja biološke aktivnosti i fitoterapijskog potencijala pripravaka vrste *Laurus nobilis* L. s područja Dalmacije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Biljni materijal

Biljni je materijal prikupljen tijekom rujna 2014. godine na sedam lokaliteta s područja Dalmacije, a to su: Brač, Konavle, Korčula, Lastovo, Mljet, Pelješac i otok Šipan.
Identifikacija biljnog materijala provedena je u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (prema: Domac, 1994). Analizirani su pulverizirani listovi lovora (*Laurus nobilis* L.).



Slika 5. Listovi lovora (http://herbaria.plants.ox.ac.uk).

3.2. Aparatura i kemikalije

Aparatura i pribor:

- UV-Vis spektrofotometar Agilent 8453 E (Hewlett Packard, Njemačka)
- kiveta za spektrofotometar
- pipete, propipete, menzure, lijevci, čaše, kapalice, epruvete, satna stakla, filtar papir
- odmjerne tikvice
- povratna hladila
- plamenik, tronožac, stalak za odjeljivanje, kleme

Kemikalije:

- Folin-Ciocalteuov reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- formaldehid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kazein (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- kalijev hidroksid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- klorovodična kiselina, konc. (Panreac Quimica S.A.V., Barcelona, Španjolska)
- metanol (Carlo- Erba, Rodano, Italija)
- natrijev acetat trihidrat (Alkaloid, Skopje, Makedonija)
- natrijev karbonat dekahidrat (Poch, Gliwice, Poljska)
- octena kiselina, led. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- olovov acetat (Kiedel-de Haën ag. Seelze- Hanover, Njemačka)
- želatina (Sigma, St. Louis)
- željezov(III) klorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)
- željezov(III) amonijev sulfat (Alkaloid, Skopje, Makedonija)
- vanilin (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

3.3. Metode i postupci istraživanja

3.3.1. Kvalitativna analiza trjeslovina

Dokazivanje trjeslovina kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga

Priprava ekstrakta

0,2 g pulveriziranog biljnog materijala ekstrahira se 10 minuta s 20 mL destilirane vode, u tikvici s povratnim hladilom, u kipućoj vodenoj kupelji. Ohlađeni ekstrakt se profiltrira.

Opće reakcije

1. U 2 mL filtrata dodaju se 2 kapi 5%-tne otopine željezova(III) klorida.
2. U 2 mL filtrata dodaju se 2-3 kapi 1%-tne otopine željezova(III) amonijeva sulfata.
3. U 5 mL filtrata doda se 0,5 mL 10%-tne otopine olovova acetata.
4. U 2 mL filtrata doda se 2 mL 1%-tne otopine želatine.
5. U 1 mL filtrata doda se 2 mL 1%-tne otopine vanilina u koncentriranoj klorovodičnoj kiselini.

Dokazivanje kondenziranih trjeslovina

U 3 mL ekstrakta dodaju se 2 kapi otopine formaldehida i 3 kapi 10%-tne klorovodične kiseline. Sadržaj se ugrije do vrenja, ohladi, te zatim profiltrira. Potom se filtar papir ispere s 1 mL tople vode. Dokaz kondenziranih trjeslovina predstavlja talog na filtar papiru koji je netopljiv u toploj 5%-tnoj otopini kalijeva hidroksida.

Dokazivanje trjeslovina koje hidroliziraju

Filtratu koji se dobije u prethodnoj reakciji taloženja kondenziranih trjeslovina s formaldehidom i klorovodičnom kiselinom, doda se 1 g natrijeva acetata trihidrata (bez protresivanja epruvete), a zatim 1 mL 1%-tne otopine željezova(III) amonijeva sulfata. U prisutnosti trjeslovina koje hidroliziraju, javlja se ljubičasti prsten na mjestu prikladnog pH.

3.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina

Količina ukupnih flavonoida u nadzemnim dijelovima vrste *Laurus nobilis* L. određena je spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru (1960).

Fino ustinjeni nadzemni biljni dijelovi (0,25 g) ekstrahiraju se s 80 mL 30%-tnog metanola u tikvici s povratnim hladilom, zagrijavanjem na kipućoj vodenoj kupelji oko 15 minuta. Nakon hlađenja, iscrpina je profiltrirana u odmjernu tikvicu od 100,0 mL te nadopunjena do oznake 30%-tnim metanolom. 2,0 mL filtrata pomiješano je s 8 mL destilirane vode i 10 mL otopine natrijeva acetata (1,92 g natrijeva acetata trihidrata i 0,34 mL octene kiseline pomiješano je i nadopunjeno destiliranom vodom do 100,0 mL). Puferska otopina održava stalnu pH-vrijednost medija (pH = 5), koja je optimalna za taloženje trjeslovina. Otopina dobivena na opisani način označena je kao *otopina 1*. 10,0 mL *otopine 1* mućkano je s 50 mg kazeina na mućkalici 45 minuta. Potom je otopina profiltrirana, a dobiveni je filtrat predstavljao *otopinu 2*.

Po 1,0 mL *otopine 1* i *otopine 2* pomiješano je odvojeno u odmjernim tikvicama od 10,0 mL s po 0,5 mL Folin-Ciocalteuova reagensa i nadopunjeno do oznake s 33%-tnom otopinom natrijeva karbonata dekahidrata (Folin-Ciocalteuov fenolni reagens sadrži natrijev volframat, natrijev molibdat, destiliranu vodu, 85%-tnu fosfatnu kiselinu, 36%-tnu klorovodičnu kiselinu, litijev sulfat i brom. Apsorbancije dobivenih plavih otopina izmjere se na 720 nm, uz destiliranu vodu kao slijepi pokus. Vrijednost koju daje *otopina 1* odgovara količini ukupnih

polifenola, dok razlika vrijednosti dobivenih za *otopinu 1* i *otopinu 2* predstavlja količinu trjeslovina vezanih na kazein.

Za izračunavanje koncentracije trjeslovina izrađen je baždarni pravac. U tu je svrhu 10 mg tanina (*Acidum tannicum*) osušeno na 80°C i otopljeno u 100,0 mL destilirane vode (osnovna otopina standarda). Radni standard pripremljen je miješanjem 5,0 mL osnovne otopine standarda i 5,0 mL puferske otopine. Koncentracijski niz, dobiven razrjeđivanjem volumena od 0,2 do 1,2 mL radnog standardado 10,0 mL puferskom otopinom (što odgovara koncentraciji trjeslovina od 0,001 do 0,006 mg/mL), daje linearni porast apsorbancije. Za izmjerene vrijednosti apsorbancija *otopine 1* i *2* očitaju se pripadajuće koncentracije iz baždarnog dijagrama i izraze kao grami ukupnih polifenola, odnosno trjeslovina, na 100 g droge (%).

Odnosno, za izražavanje sadržaja u gramima polifenola na 100 g droge (%), vrijedi izraz:

$$\%\,\text{polifenola} = \frac{A}{0{,}025} = 40A$$

A = izmjerena apsorbancija otopine 1, odnosno otopine 2

Razlika sadržaja (%) ukupnih polifenola, koji je dobiven mjerenjem *otopine 1*, i sadržaja određenog za *otopinu 2*, predstavlja sadržaj (%) trjeslovina koje su istaložene kazeinom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati kvalitativne analize trjeslovina

Rezultati općih reakcija dokazivanja trjeslovina

1. Reakcija taloženja dodatkom željezova(III) klorida u vodeni ekstrakt droge

Dodatkom 5%-tne otopine željezova(III) klorida u vodeni ekstrakt droge nastalo je zelenoplavo zamućenje.

2. Reakcija promjene boje dodatkom željezova(III) amonijeva sulfata u vodeni ekstrakt droge

Reakcijom trjeslovina sa željezovim(III) amonijevim sulfatom nastalo je vrlo intezivno zelenoplavo obojenje.

3. Reakcija promjene boje dodatkom olovova acetata u vodeni ekstrakt droge

Reakcijom trjeslovina s olovovim acetatom nastalo je vrlo intezivno žutozeleno obojenje.

4. Reakcija taloženja dodatkom želatine u vodeni ekstrakt droge

Reakcijom trjeslovina sa želatinom nastalo je slabo blijedožuto zamućenje.

5. Reakcija promjene boje dodatkom otopine vanilina u vodeni ekstrakt droge

Dodatkom 1%-tne otopine vanilina u koncentriranoj klorovodičnoj kiselini u vodeni ekstrakt droge nastalo je intezivno narančasto obojenje.

Intenzitet zamućenja/obojenja nije se znatno razlikovao između ispitanih populacija lovora, ali dalo se zamijetiti da je bio izraženiji u uzorcima, redom, s Lastova, Korčule i Pelješca, a najslabiji u uzorcima iz populacija Konavle i Brač.

Rezultati reakcije dokazivanja kondenziranih trjeslovina

Nakon dodatka formaldehida i 10%-tne klorovodične kiseline u vodeni ekstrakt droge, sadržaj se ugrije do vrenja te se potom ohladi i profiltrira. Filtar papir se ispere s 1 mL tople vode, a kondenzirane trjeslovine dokazuju se talogom na filtar papiru koji je netopljiv u 5%-tnoj otopini kalijeva hidroksida.

U reakciji sa svih sedam ekstrakata nastao je žućkasti talog koji je bio netopljiv u 5%-tnoj otopini kalijeva hidroksida, što je dokaz prisutnosti kondenziranih trjeslovina.

Rezultati reakcije dokazivanja trjeslovina koje hidroliziraju

Filtratu iz reakcije za dokazivanje kondenziranih trjeslovina doda se 1 g natrijeva acetata trihidrata bez protresivanja, a zatim 1 mL 1%-tne otopine željezova(III) amonijeva sultata. Kod svih sedam ekstrakata dokazana je prisutnost trjeslovina koje hidroliziraju jer je nastao vidljiv ljubičasti prsten na mjestu prikladnog pH.

4.2. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola i trjeslovina

Kvantitativna analiza ukupnih polifenola i trjeslovina u listovima lovora provedena je spektrofotometrijskom metodom prema Schneideru. Metoda se temelji na reakciji polifenolnih spojeva s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom (FCR), kojoj prethodi taloženje trjeslovina s kazeinom. Nakon dodatka FCR, izmjerene su apsorbancije dobivenih plavih otopina na 720 nm, uz destiliranu vodu kao slijepu probu.

Količina ukupnih polifenola i trjeslovina određena je pomoću prethodno dobivenog baždarnog pravca, na osnovi izmjerenih apsorbancija analiziranih poredbenih otopina taninske kiseline propisanih koncentracija.

Za izmjerene vrijednosti apsorbancija *otopine 1* i *otopine 2* izračunaju se koncentracije analiziranih polifenolnih tvari i izraze kao grami ukupnih polifenola, odnosno trjeslovina, na 100 g droge (%), pri čemu vrijedi izraz:

$$\%\,\text{polifenola} = \frac{A}{0{,}025} = 40A$$

A = izmjerena apsorbancija otopine 1, odnosno otopine 2

Napravljena je jedna ekstrakcija droge za svaku populaciju te su uzeta tri uzorka za spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina. Za svaki od uzoraka tri je puta izvršeno mjerenje apsorbancija.

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola i trjeslovina prikazani su u Tablicama 2 i 3.

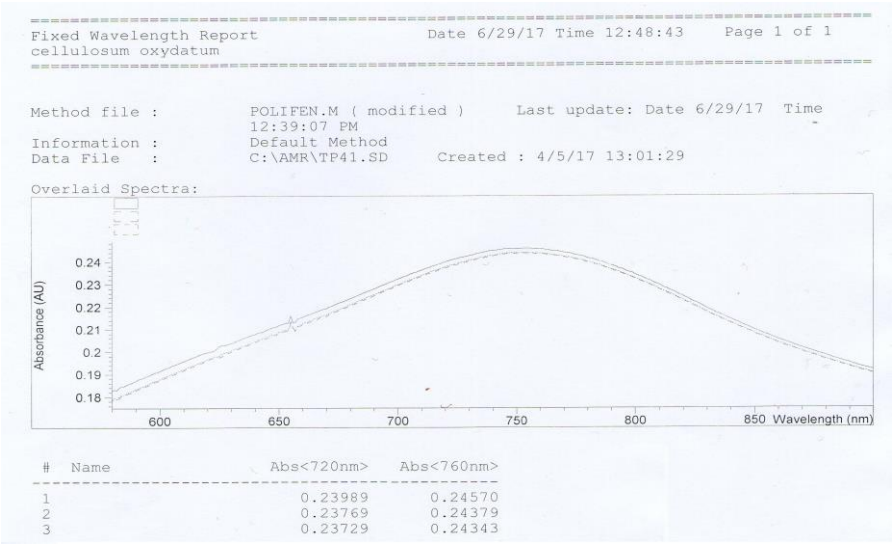
Tablica 2. Sadržaj ukupnih polifenola i trjeslovina u ekstraktima listova lovora s područja Dalmacije, mjereno na 720 nm (metoda prema Schneideru).

	Ukupni polifenoli		Polifenoli nevezani na kazein		Trjeslovine vezane na kazein		Sadržaj ukupnih polifenola		Sadržaj trjeslovina vezanih na kazein	
Uzorak	**A_{720nm} otopine 1**	**Srednja vrijednost otl ± SD**	**A_{720nm} otopine 2**	**Srednja vrijednost ot. 2 ± SD**	**A1-A2**	**Srednja vrijednost (ot. 1 - ot. 2) ± SD**	**%**	**Srednja vrijednost ± SD**	**%**	**Srednja vrijednost ± SD**
1. Brač	0,148	0,148 ± 0	0,065	0,0643 ± 0,0012	0,0830	0,0837 ± 0,0012	5,92	5,92 ± 0	3,32	3,35 ± 0,05
	0,148		0,065		0,0830		5,92		3,32	
	0,148		0,063		0,0850		5,92		3,40	
2. Konavle	0,162	0,1382 ± 0,0019	0,105	0,1027 ± 0,0021	0,0570	0,0583 ± 0,0023	6,48	6,44 ± 0,11	2,28	2,33 ± 0,09
	0,163		0,102		0,0610		6,52		2,44	
	0,158		0,101		0,0570		6,32		2,28	
3. Korčula	0,193	0,1943 ± 0,0032	0,102	0,102 ± 0,001	0,0910	0,0923 ± 0,0023	7,72	7,77 ± 0,13	3,64	3,69 ± 0,09
	0,192		0,101		0,0910		7,68		3,64	
	0,198		0,103		0,0950		7,92		3,80	
4. Lastovo	0,24	0,2383 ± 0,0015	0,119	0,1207 ± 0,0015	0,1210	0,1177 ± 0,0029	9,60	9,53 ± 0,06	4,84	4,71 ± 0,12
	0,238		0,122		0,1160		9,52		4,64	
	0,237		0,121		0,1160		9,48		4,64	
5. Mljet	0,174	0,1687 ± 0,0046	0,099	0,0987 ± 0,0006	0,0750	0,07 ± 0,0044	6,96	6,75 ± 0,18	3,00	2,8 ± 0,17
	0,166		0,098		0,0680		6,64		2,72	
	0,166		0,099		0,0670		6,64		2,68	
6. Pelješac	0,197	0,1967 ± 0,0006	0,109	0,1087 ± 0,0015	0,0880	0,088 ± 0,001	7,88	7,87 ± 0,02	3,52	3,52 ± 0,04
	0,197		0,11		0,0870		7,88		3,48	
	0,196		0,107		0,0890		7,84		3,56	
7. Šipan	0,166	0,1623 ± 0,0032	0,096	0,0957 ± 0,0006	0,07	0,0667 ± 0,0029	6,64	6,49 ± 0,13	2,80	2,67 ± 0,12
	0,161		0,096		0,065		6,44		2,60	
	0,16		0,095		0,065		6,40		2,60	

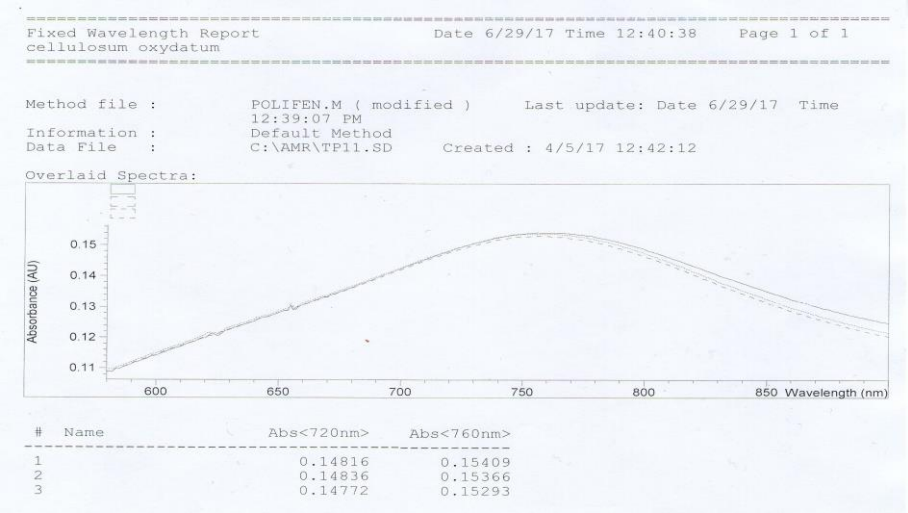
Tablica 3. Sadržaj ukupnih polifenola i trjeslovina u ekstraktima listova lovora s područja Dalmacije, mjereno na 760 nm (maksimum apsorpcije).

	Ukupni polifenoli		Polifenoli nevezani na kazein		Trjeslovine vezane na kazein		Sadržaj ukupnih polifenola		Sadržaj trjeslovina vezanih na kazein	
Uzorak	A760nm otopine 1	Srednja vrijednost ot1 ± SD	A760nm otopine 2	Srednja vrijednost ot. 2 ± SD	A1-A2	Srednja vrijednost (ot. 1 - ot. 2)	%	Srednja vrijednost ± SD	%	Srednja vrijednost ± SD
1. Brač	0,154	0,1537 ± 0,0006	0,067	0,0667 ± 0,0015	0,0870	0,087 ± 0,001	6,16	6,15 ± 0,02	3,48	3,48 ± 0,04
	0,154		0,068		0,0860		6,16		3,44	
	0,153		0,065		0,0880		6,12		3,52	
2. Konavle	0,166	0,1382 ± 0,0019	0,107	0,1053 ± 0,0015	0,0590	0,0593 ± 0,0015	6,64	6,59 ± 0,09	2,36	2,37 ± 0,06
	0,166		0,105		0,0610		6,64		2,44	
	0,162		0,104		0,0580		6,48		2,32	
3. Korčula	0,199	0,1983 ± 0,0031	0,105	0,105 ± 0,001	0,0940	0,0933 ± 0,0021	7,96	7,93 ± 0,12	3,76	3,73 ± 0,08
	0,195		0,104		0,0910		7,80		3,64	
	0,201		0,106		0,0950		8,04		3,80	
4. Lastovo	0,246	0,2443 ± 0,0015	0,122	0,124 ± 0,0017	0,1240	0,1203 ± 0,0032	9,84	9,77 ± 0,06	4,96	4,81 ± 0,13
	0,244		0,125		0,1190		9,76		4,76	
	0,243		0,125		0,1180		9,72		4,72	
5. Mljet	0,178	0,1733 ± 0,004	0,103	0,1023 ± 0,0006	0,0750	0,071 ± 0,0035	7,12	6,93 ± 0,16	3,00	2,84 ± 0,14
	0,171		0,102		0,0690		6,84		2,76	
	0,171		0,102		0,0690		6,84		2,76	
6. Pelješac	0,202	0,201 ± 0,001	0,112	0,1117 ± 0,0015	0,0900	0,0893 ± 0,0012	8,08	8,04 ± 0,04	3,60	3,57 ± 0,05
	0,201		0,113		0,0880		8,04		3,52	
	0,2		0,11		0,0900		8,00		3,60	
7. Šipan	0,17	0,1663 ± 0,0032	0,099	0,099 ± 0	0,071	0,0673 ± 0,0032	6,80	6,65 ± 0,13	2,84	2,69 ± 0,13
	0,165		0,099		0,066		6,60		2,64	
	0,164		0,099		0,065		6,56		2,60	

Najveći sadržaj polifenola zabilježen je u listovima lovora prikupljenima na otoku Lastovu (Slika 6) i iznosio je 9,53±0,06% (720 nm) i 9,77±0,06% (760 nm), dok je najmanji sadržaj polifenola zabilježen u uzorcima s otoka Brača (Slika 7), a iznosio je 5,92±0,00% (720 nm) i 5,15±0,02% (760 nm).

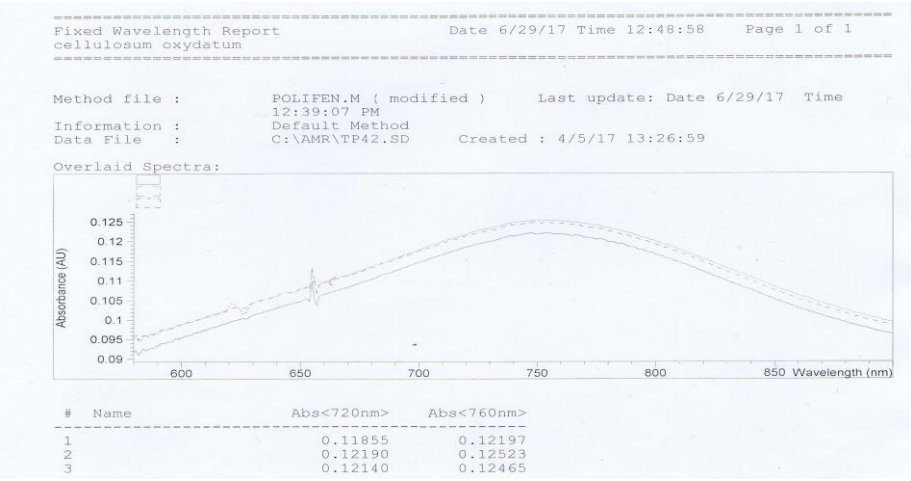


Slika 6. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije ukupnih polifenola u ekstraktu listova lovora, populacija Lastovo.

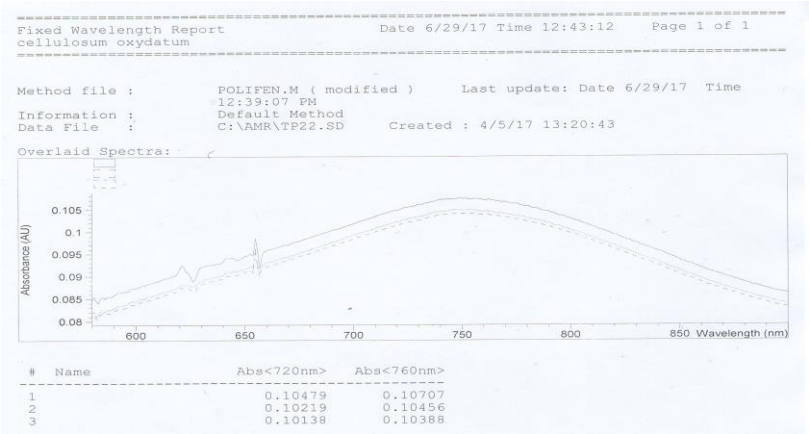


Slika 7. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije ukupnih polifenola u ekstraktu listova lovora, populacija Brač.

Najveći udio trjeslovina u ekstraktima listova lovora zabilježen je za populaciju Lastovo (Slika 8) i iznosio je 4,71±0,12% (720 nm) i 4,81±0,13% (760 nm), dok je najmanje trjeslovina određeno u uzorku Konavle (Slika 9): 2,33± 0,09% (720 nm) te 2,37±0,06% (760 nm).



Slika 8. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije polifenola bez trjeslovina koje se talože kazeinom u ekstraktu listova lovora, populacija Lastovo.



Slika 9. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije polifenola bez trjeslovina koje se talože kazeinom u ekstraktu listova lovora, populacija Konavle.

5. ZAKLJUČCI

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je djelomična fitokemijska karakterizacija vrste *Laurus nobilis* L. (lovor), koja je uključivala kvalitativnu i kvantitativnu analizu ukupnih polifenola i trjeslovina iz listova lovora s područja Dalmacije (populacije Brač, Konavle, Korčula, Lastovo, Mljet, Pelješac i Šipan).

Kvalitativna analiza trjeslovina provedena je općim reakcijama taloženja i promjene boje te je dokazana njihova prisutnost u svim ispitivanim biljnim ekstraktima. Kondenzirane trjeslovine dokazane su reakcijom s formaldehidom i 10%-tnom klorovodičnom kiselinom, pojavom taloga na filtar papiru, dok su trjeslovine koje hidroliziraju dokazane natrijevim acetatom i željezovim(III) amonijevim sulfatom, pojavom ljubičastog prstena na mjestu prikladnog pH.

Kvantitativnom analizom određen je sadržaj ukupnih polifenola i trjeslovina u ispitanim ekstraktima listova lovora primjenom spektrofotometrijske metode s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom, kojoj prethodi taloženje trjeslovina s kazeinom. Najveći sadržaj ukupnih polifenola u analiziranim uzorcima iznosio je 9,53% (720 nm), odnosno 9,77% (760 nm), zabilježen je za uzorke s otoka Lastova, dok je najmanji sadržaj ukupnih polifenola iznosio 5,92% (720 nm), odnosno 5,15% (760 nm), a izmjeren je u uzorcima s otoka Brača.
Najveći udio trjeslovina u ekstraktima listova lovora zabilježen je ponovo za populaciju Lastovo i iznosio je 4,71% (720 nm), odnosno 4,81% (760 nm), dok je najmanji sadržaj trjeslovina određen u uzorku populacije Konavle te je iznosio 2,33% (720 nm), odnosno 2,37% (760 nm).

Fitokemijska karakterizacija koja je provedena u okviru ovoga diplomskog rada predstavlja doprinos znanstvenom istraživanju biološki aktivnih tvari roda *Laurus* te je potvrda fitoterapijskog potencijala te biljne vrste s obzirom na analizirani sadržaj bioaktivnih polifenolnih tvari.

6. LITERATURA

AL-Samarrai OR, Naji NA, Hameed RR. Effect of Bay leaf (Laurus nobilis L.) and its isolated (flavonoids and glycosides) on the lipids profile in the local Iraqi female rabbits. *Tikrit Journal of Pure Science*, 2017, 22(6).

Ascacio-Valdés JA, Buenrostro-Figueroa JJ, Aguilera-Carbo A, Prado-Barragán A, Rodriguez-Herrera R, Aguilar CN. Ellagitannins: Biosynthesis, biodegradation and biological properties. *J Med Plant Res*, 2011, 5(19), 4696-4703.

Ašić S. Ljekovito bilje. Rijeka, Dušević i Kršovnik d.o.o., 1999, str. 75.

Bennett L, Abeywardena M, Burnard S, Forsyth S, Head R, King K, Patten G, Watkins P, Williams R, Zabaras D, Lockett T. Molecular size fractions of bay leaf (Laurus nobilis) exhibit differentiated regulation of colorectal cancer cell growth in vitro. *Nutr Cancer*, 2013, 65, 746-764.

Berend S, Grabarić Z. Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2008, 59, 205-212.

Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance. *Nutr Rev*, 1998, 56, 317-333.

Dall'Acqua S, Cervellati R, Speroni E, Costa S, Guerra MC, Stella L, Greco E, Innocenti G. Phytochemical composition and antioxidant activity of Laurus nobilis L. leaf infusion. *J Med Food*, 2009, 12(4), 869-876.

D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*, 2007, 43, 348-361.

de Jesus NZT, Falcão HS, Gomes IF, Leite TJA, Lima GRM, Barbosa-Filho JM, Tavares JF, Silva MS, Athayde-Filho PF, Batista LM. Tannins, Peptic Ulcers and Related Mechanisms. *Int J Mol Sci*, 2012, 13, 3203-3228.

Dias MI, Barros L, Dueñas M, Alves RC, Oliveira MBPP, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR. Nutritional and antioxidant contributions of *Laurus nobilis* L. leaves: Would be more suitable a wild or a cultivated sample? *Food Chemistry*, 2014, 156, 339-346.

Dohranović S, Bosnić T, Osmanović S. Značaj i uloga alternativne medicine u liječenju. *Hrana u zdravlju i bolesti: znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*, 2012, 1, 39-47

Dudaš S, Venier L. Varijabilnost sadržaja eteričnog ulja u listovima lovora Laurus nobilis L. *Glasnik Zaštite Bilja*, 2009, 32, 46-54

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

Hagerman, AE. The Tannin Handbook, Biological Activity of Tannins. Miami University, Oxford, Ohio, USA, 2002.

Haslam E, Cai Y. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Nat Prod Rep*,1994, 11, 41-66.

Henri-Leclerc, https://www.britannica.com/biography/Henri-Leclerc, pristupljeno 04.07.2017.

Herbal medicines, http://www.who/, pristupljeno 6.7.2017.

Kalođera Z. Farmakognozija II, interna skripta. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2010, str. 75-79.

Kolega S. Određivanje vanjskog i unutarnjeg zagađenja lovora (*Laurus nobilis* L.) olovom. Diplomski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 1993, str. 10-11.

Kuštrak D. Farmakognozija fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing- Tehnička knjiga, 2005, str. 295-299, 408-409.

Lauraceae, https://www.theplantlist.org, pristupljeno 04.07.2017.

Laurales, https://www.britannica.com, pristupljeno 02.07.2017.

Laurus nobilis., https://herbaria.plants.ox.ac.uk pristupljeno 14.08.2017.

Maleš Ž. Predavanja s kolegija Farmaceutska botanika, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2010.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79, 727-747

Marković S. Fitoaromaterapija: monografije esencijalnih ulja i ljekovitih biljaka, temelji fitoaromaterapije. Zagreb, Centar Cedrus, 2005, str. 78, 286-287.

Mole S. The systematic distribution of tannins in the leaves of angiosperms: a tool for ecological studies. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1993, 21, 833-846

Muñiz-Márquez DB, Martínez-Ávila GC, Wong-Paz JE, Belmares-Cerda R, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2013, V20, I5, 1149-1154.

Nikolić T. Sistemska botanika: raznolikost i evolucija biljnog svijeta. Zagreb, Alfa d.d., 2013, str. 107-108, 360-365, 371-375.

Okuda T, Ito H. Tannins of Constant Structurein Medicinal and Food Plants – Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Molecules*, 2011, 16, 2191-2217.

Otsuka N, Liu MH, Shiota S, Ogawa W, Kuroda T, Hatano T, Tsuchiya T. Anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) compounds isolated from *Laurus nobilis*. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(9), 1794-1797.

Pacifico S, Gallicchio M, Lorenz P, Duckstein SM, Potenza N, Galasso S, Marciano S, Fiorentino A, Stintzing FC, Monaco P. Neuroprotective potential of *Laurus nobilis* antioxidant polyphenol-enriched leaf extracts. *Chem Res Toxicol*, 2014, 27(4), 611-626.

Pahlow M. Das grosse Buch der Heilpflanzen. Weltbildverlag, Augsburg, 1999, str. 395-397

Perlain E. Sastav eteričnih ulja lovora (*Laurus nobilis L.*). Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Splitu, Odjel za biologiju, Split, 2016, str. 4-7.

Petrik J. Polifenoli-antioksidansi, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008, str. 1-8.

Pinheiro LS, Alves de Oliveira Filho A, Guerra FQS, Pinhiero de Menezes C, Golzio dos Santos S, Pereira de Sousa J, Barbosa Dantas T, de Oloviera Lima E. Antifungal activity of the essential oil isolated from Laurus nobilis L. against Cryptococcus neoformans strains. *J App Pharm Sci*, 7, 2017, 115-118.

Primorac I. Kvantitativna analiza polifenola hrvatskih populacija vrste *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb. Diplomski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2012.

Qnais EY, Abdulla FA, Kaddumi EG, Abdalla SS. Antidiarrheal activity of *Laurus nobilis* L. leaf extract in rats. *J Med Food*, 2012, 15(1), 51-57.

Rangari VD. Pharmacognosy Tannin Containing Drugs, J. L. Chaturvedi College of Pharmacy 846, New Nandanvan, Nagpur, 2007.

Rastija V, Medić-Šarić M. Kromatografske metode analize polifenola u vinima. *Kem Ind*, 2009, 58, 121-128.

Renner SS. Circumscription and phylogeny of the Laurales: Evidence from molecular and morphological dana. *Am J Bot*, 1999, 86(9), 1301-1315.

Sayyah MJ, Valizadeh J, Kamalinejad M. Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of Laurus nobilis against pentylenetetrazole-and maximal electroshock-induced seizures. *Phytomed*, 2002, 9(3), 212-216

Scalbert A, Johnson I, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*, 2005, 81, 2155-2175.

Schneider G. Zur Bestimmung der Gerbstoffe mit Casein. *Arch Pharm*, 1976, 309, 38-44.

Shivashankara KS, Acharya SN. Bioavailability of dietary polyphenols and the cardiovascular diseases. *Open Nutraceuticals J*, 2010, 3, 227-241.

Vladimir-Knežević S, Blažeković B. Praktikum iz Farmakognozije, Interna skripta. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008, str. 20-21.

Vladimir-Knežević S. Farmakognozija I, Prirodni fenolni spojevi. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008, str. 9-14.

Zhang LL, Lin YM, Tannins from Canarium album with potent antioxidant activity. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008, 9, 407-415.

Živković R. Prirodno liječenje probavnih organa ljekovitim biljem i dijetom. Zagreb, Školska knjiga, 1997, str. 25-29, 255-256.

7. SAŽETAK/SUMMARY

U ovom je diplomskom radu provedena kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola i trjeslovina u listovima lovora vrste *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) s područja Dalmacije (populacije: Brač, Konavle, Korčula, Lastovo, Mljet, Pelješac i Šipan). Kvalitativna analiza provedena je općim reakcijama stvaranja obojenih produkata i/ili taloga, a kvantitativna analiza ukupnih polifenola i trjeslovina provedena je spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom. Najveći sadržaj ukupnih polifenola bio je u uzorku s otoka Lastova 9,53% (720 nm), odnosno 9,77% (760 nm), dok je najmanji udio polifenola određen je u uzorku s otoka Brača, a iznosio je 5,92% (720 nm), odnosno 5,15% (760 nm). Najveći udio trjeslovina zabilježen je u uzorku s otoka Lastova i iznosio je 4,71% (720 nm), odnosno 4,81% (760 nm), a najmanji udio određen je za populaciju Konavle 2,33% (720 nm) i 2,37% (760 nm). Provedena fitokemijska karakterizacija predstavlja prilog znanstvenom istraživanju roda *Laurus*, pridonosi dosadašnjim znanstvenim spoznajama o hrvatskim populacijama lovora s obzirom na sadržaj polifenolnih biološki aktivnih tvari te upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu vrste *Laurus nobilis* L.

In this graduate thesis, a qualitative and quantitative analysis of polyphenols and tannins in leaves of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) from the region of Dalmatia (populations: Brač, Konavle, Korčula, Lastovo, Mljet, Pelješac, Šipan) was carried out. Qualitative analysis was carried out with general reactions of the formation of colored products and/or precipitates, while quantitative analysis of total polyphenols and tannins was performed by a spectrophotometric method with the Folin-Ciocalteu's phenol reagent. The highest content of total polyphenols was in the sample from the island of Lastovo: 9.53% (720 nm) and 9.77% (760 nm), while the smallest amount of polyphenols was determined in the sample from the island of Brač and it was 5.92% (720 nm) and 5.15% (760 nm). The highest content of tannins was recorded for the Lastovo population: 4.71% (720 nm) and 4.81% (760 nm), while the smallest amount was determined in the sample from Konavle: 2.33% (720 nm) and 2.37% (760 nm). This phytochemical characterization contributes to the scientific research of the *Laurus* genus, contributes to the scientific knowledge of Croatian laurel populations with regard to the content of polyphenolic biologically active substances and completes the current understanding of the phytotherapeutic potential of *Laurus nobilis* L.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

KVALITATIVNA I KVANTITATIVNA ANALIZA POLIFENOLA I TRJESLOVINA VRSTE *LAURUS NOBILIS* L. (LAURACEAE) S PODRUČJA DALMACIJE

Anamarija Rogulj

SAŽETAK

U ovom je diplomskom radu provedena kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola i trjeslovina u listovima lovora vrste *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) s područja Dalmacije (populacije: Brač, Konavle, Korčula, Lastovo, Mljet, Pelješac i Šipan). Kvalitativna analiza provedena je općim reakcijama stvaranja obojenih produkata i/ili taloga, a kvantitativna analiza ukupnih polifenola i trjeslovina provedena je spektrofotometrijskom metodom s Folin- Ciocalteuovim fenolnim reagensom. Najveći sadržaj ukupnih polifenola bio je u uzorku s otoka Lastova 9,53% (720 nm), odnosno 9,77% (760 nm), dok je najmanji udio polifenola određen je u uzorku s otoka Brača, a iznosio je 5,92% (720 nm), odnosno 5,15% (760 nm). Najveći udio trjeslovina zabilježen je u uzorku s otoka Lastova i iznosio je 4,71% (720 nm), odnosno 4,81% (760 nm), a najmanji udio određen je za populaciju Konavle 2,33% (720 nm) i 2,37% (760 nm). Provedena fitokemijska karakterizacija predstavlja prilog znanstvenom istraživanju roda *Laurus*, pridonosi dosadašnjim znanstvenim spoznajama o hrvatskim populacijama lovora s obzirom na sadržaj polifenolnih biološki aktivnih tvari te upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu vrste *Laurus nobilis* L.

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

Rad sadrži: 33 stranice, 9 slika, 3 tablice i 49 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Laurus nobilis* L., polifenoli, trjeslovine, kvalitativna analiza, kvantitativna analiza, UV-Vis spektrofotometrija, Folin-Ciocalteu-ov fenolni reagens

Mentor: **Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.
Dr. sc. Lidija Bach Rojecky, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.
Dr. sc. Živka Juričić, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan, 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Analysis
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF POLYPHENOLS AND TANNINS OF *LAURUS NOBILIS* L. (LAURACEAE) FROM THE REGION OF DALMATIA

Anamarija Rogulj

SUMMARY

In this graduate thesis, a qualitative and quantitative analysis of polyphenols and tannins in leaves of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) from the region of Dalmatia (populations: Brač, Konavle, Korčula, Lastovo, Mljet, Pelješac, Šipan) was carried out. Qualitative analysis was carried out with general reactions of the formation of colored products and/or precipitates, while quantitative analysis of total polyphenols and tannins was performed by a spectrophotometric method with the Folin-Ciocalteu's phenol reagent. The highest content of total polyphenols was in the sample from the island of Lastovo: 9.53% (720 nm) and 9.77% (760 nm), while the smallest amount of polyphenols was determined in the sample from the island of Brač and it was 5.92% (720 nm) and 5.15% (760 nm). The highest content of tannins was recorded for the Lastovo population: 4.71% (720 nm) and 4.81% (760 nm), while the smallest amount was determined in the sample from Konavle: 2.33% (720 nm) and 2.37% (760 nm). This phytochemical characterization contributes to the scientific research of the *Laurus* genus, contributes to the scientific knowledge of Croatian laurel populations with regard to the content of polyphenolic biologically active substances and completes the current understanding of the phytotherapeutic potential of *Laurus nobilis* L.

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

Thesis includes: 33 pages, 9 figures, 3 tables, and 49 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Laurus nobilis* L., polyphenols, tannins, qualitative analysis, quantitative analysis, UV-Vis spectrophotometry, Folin & Ciocalteu's phenol reagent

Mentor: **Renata Jurišić Grubešić**, **Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Renata Jurišić Grubešić**, **Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lidija Bach Rojecky, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Živka Juričić, **Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September, 2017