Spektrofotometrijsko određivanje polifenola u etanolnim ekstraktima lovora (Laurus nobilis L.)

Matanović, Angela

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:159:540775

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Angela Matanović
7155/BT

SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE POLIFENOLA U ETANOLNIM EKSTRAKTIMA LOVORA (*Laurus nobilis* L.)

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Analitička kemija
Mentor: Doc. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Spektrofotometrijsko određivanje polifenola u etanolnim ekstraktima lovora (*Laurus nobilis* L.)

Angela Matanović, 0058207458

Sažetak: Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka vrlo raznolike strukture koja im među mnogobrojnim funkcijama, omogućava i antikorozijsku aktivnost. Antikorozijsko djelovanje polifenola temelji se na mehanizmu adsorbcije te tvorbi zaštitnih filmova na površini metala ili metalnih legura.

Cilj ovog rada bio je odrediti optimalne uvjete ultrazvučne ekstrakcije polifenola iz suhih listova lovora, koji će se koristiti u daljnjim pripravama ekstrakata namijenjenih za antikorozijska ispitivanja. Na temelju dobivenih vrijednosti masenih udjela ukupnih fenola i flavonoida određenih UV/Vis spektrofotometrijom, među postavljenim uvjetima ultrazvučne ekstrakcije (vrijeme 3, 6 i 9 min, amplituda 60, 80 i 100 %, te 30 i 70 %, *v*/*v* etanol), vrijeme od 9 min, 100 %-tna amplituda i 70 %-tni etanol odabrani su kao optimalni parametri koji će se koristiti pri ekstrakciji polifenola kao ekološki prihvatljivih inhibitora korozije.

Ključne riječi: antikorozijska aktivnost, ekstrakcija, lovor, polifenoli, ultrazvuk
Rad sadrži: 30 stranica, 8 slika, 16 tablica, 25 literaturnih navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: Doc. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino
Pomoć pri izradi: Darjan Pipić, tehnički suradnik
Datum obrane: 8. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Analitical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Spectrophotometric determination of polyphenols from ethanol extracts of laurel (*Laurus nobilis* L.)

Angela Matanović, 0058207458

Abstract: Polyphenols are secondary plant metabolites of very diverse structures, which among lot of functions, also provide anticorrosion activity. Anticorrosion action of polyphenols is based on adsorption mechanism with formation of protective films on metals and metal alloys surface.

The aim of this work was determination of optimum ultrasonic extraction conditions of polyphenols from dry laurel leaves, which will be used in further preparation of extracts for monitoting of its anticorrosive activity. On the basis of obtained mass fraction values of total phenols and flavonoides, determined by UV/Vis spectrophotometry, among used ultrasound extraction conditions (time 3, 6 and 9 min, amplitude 60, 80 and 100 %, and 30 and 70 % ethanol), the time of 9 min, 100 % amplitude and 70 % ethanol are chosen as optimal parameters for extraction of polyphenols as a ecologically acceptable corrosion inhibitors.

Keywords: anticorrosion activity, extraction, laurel, polyphenols, ultrasound
Thesis contains: 30 pages, 8 figures, 16 tables, 25 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: Assistant Professor, PhD, Antonela Ninčević Grassino
Technical support and assistance: Darjan Pipić, Technical Associate
Defence date: 8th of September, 2017.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 2
2.1. BILJKA LOVOR 2
2.1.1. Opis biljke 2
2.1.2. Raznolikost vrste 3
2.1.3. Funkcionalna svojstva lovora 4
2.1.3. Upotreba lovora 4
2.2. FENOLNI SPOJEVI 5
2.2.1. Glavne skupine 6
2.2.1.1. Jednostavni fenoli 6
2.2.1.2. Fenolne kiseline 6
2.2.1.3. Kumarini 6
2.2.1.4. Stilbeni 7
2.2.1.5. Flavonoidi 7
2.3. METODE EKSTRAKCIJE 9
2.3.1. Ekstrakcija refluksiranjem 10
2.3.2. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija 10
2.4. UV/Vis SPEKTROFOTOMETRIJA 11
3. EKSPERIMENTALNI DIO 12
3.1. MATERIJAL 12
3.2. KEMIKALIJE 12
3.3. OTOPINE 12
3.4. APARATURA I PRIBOR 13
3.5. METODE RADA 14
3.5.1. Ekstrakcija lista lovora ultrazvukom 14
3.5.2. Ekstrakcija lista lovora refluksiranjem 14
3.5.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola 14
3.5.3.1. Izrada baždarnog dijagrama galne kiseline 15
3.5.3.2. Postupak određivanja ukupnih fenola u ekstraktima lovora 15
3.5.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida 15
3.5.4.1. Izrada baždarnog dijagrama rutina 16
3.5.4.2. Postupak određivanja ukupnih flavonoida u ekstraktima lovora 16
3.5.5. Određivanje boje 16
4. REZULTATI I RASPRAVA 17

4.1. Određivanje ukupnih fenola 17
4.2. Određivanje ukupnih flavonoida 21
4.3. Određivanje boje 24
5. ZAKLJUČAK 28
6. LITERATURA 29

1. UVOD

Lovor je zimzeleni aromatični grm ili stablo karakteristično za mediteransko područje. Od davnina je poznat po svom blagotvornom učinku na ljudsko zdravlje koji je posljedica djelovanja biološki aktivnih spojeva iz lovora. Listovi lovora sadržavaju visoke koncentracije polifenola vrlo raznolike strukture zahvaljujući kojoj ekstrakti i eterična ulja posjeduju brojna svojstva poput antioksidacijske, antikorozivne, antimikrobne i antitumorske aktivnosti.

Budući da je vrlo mali broj znanstvenih radova pokazao da se ekstrakti lovora mogu koristiti kao efikasni, ekološki prihvatljivi inhibitori korozije zahvaljujući visokoj koncentraciji polifenola (Gülşen, 2012), cilj ovog rada bio je pripraviti etanolne (30 i 70 %, *v*/*v*) ekstrakte lovora koji će se koristiti pri ispitivanjima njihova antikorozijskog djelovanja na metale, odnosno metalne legure u sastavu ambalažnog materijala namijenjenog za konzerviranje prehrambenih proizvoda.

S obzirom na činjenicu da se adsorpcija polifenola na površinu metala, a stoga i stvaranje zaštitnih antikorozijskih filmova, može odvijati interakcijom između nesparenih elektrona heteroatoma iz polifenola i prazne d orbitale metala, ili interakcijom π-elektrona iz aromatskog prstena polifenola i prazne d orbitale metala (Fouda i sur., 2013), u ovom radu su detaljno opisane glavne skupine polifenola prisutnih u biljnom tkivu.

Dakle, u provedenom istraživanju su:

- pripravljeni 30 i 70 %-tni etanolni ekstrakti suhih listova lovora ultrazvučnom ekstrakcijom, variranjem vremena (3, 6 i 9 min) i amplitude (60, 80 i 100 %)
- određene masene koncentracije, odnosno maseni udjeli, ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima primjenom spektrofotometrije u ultraljubičastom (UV) i vidljivom (Vis) području elektromagnetskog zračenja
- odabrani optimalni uvjeti ultrazvučne ekstrakcije na temelju dobivenih vrijednosti masenih udjela polifenola, koji će se primjenjivati u daljnjim pripravama ekstrakta namijenjenih za potrebe ispitivanja antikorozijskog djelovanja.

Budući da su ekstrakti pripremljeni nekonvencionalnom, ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom, u ovom radu objašnjen je i princip ove ekstrakcijske tehnike. Također, u cilju praćenja efikasnosti ultrazvučne ekstrakcije, pripremljeni su i ekstrakti dobiveni klasičnom metodom, ekstrakcijom refluksiranjem.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BILJKA LOVOR

2.1.1. Opis biljke

Lovor (*Laurus nobilis* L., Tablica 1) poznat i kao lovorika, lavorika, lavor, lavrika je zimzeleni grm ili stablo iz porodice lovora (*Lauraceae*) koje može narasti do 10 metara visine. Listovi lovora su naizmjenični, kožasti, većinom cjelovitog ruba, valoviti i tamnozeleni. Dužina listova može biti 6 - 12 cm, a širina 2 - 4 cm. Dvodomna je biljka, a cvjetovi su mu skupljeni u pazušcima listova i razvijaju se tijekom ožujka i travnja. Plod je do 18 mm duga izdužena koštunica tamnoljubičaste boje promjera oko 1 cm koja sadrži jednu sjemenku. Na Slici 1 može se vidjeti detaljan prikaz građe nadzemnog dijela lovora. Listovi lovora se najčešće beru nakon dozrijevanja plodova, suše se i koriste kao začini, dok se plodovi koriste za dobivanje ulja. List sadrži 1 - 3 % eteričnog ulja kojemu je glavni sastojak cineol, a plod sadrži oko 1 % eteričnog ulja i oko 30 % masnog ulja (Grlić, 1990). Još u antici lovor je bio izuzetno cijenjen. Njegove grančice su predstavljale slavu i dodjeljivale su se u obliku vijenca pobjednicima u ratu i slavnim pjesnicima. Lovor je rasprostranjen na području oko Sredozemnog mora, a u Hrvatskoj raste u Istri, na Lošinju, Rabu, Pagu, Visu, Hvaru, Braču, Pelješcu i na južnodalmatinskoj obali. Traži toplu i vlažnu klimu te dopire do 400 m nadmorske visine (Grlić, 1990).



Slika 1. Detaljni prikaz nadzemnog dijela biljke lovor (Anonimus 1)

Tablica 1. Sistematika lovora (NRCS - Natural Resources Conservation Service, 2017).

TAKSONOMIJA LOVORA	
CARSTVO	Plantae
ODJELJAK	Magnoliophyta
RAZRED	Magnoliopsida
RED	Laurales
PORODICA	Lauraceae
ROD	*Laurus*
VRSTA	*Laurus nobilis*

2.1.2. Raznolikost vrste

Laurus nobilis ima nekoliko kultivara od kojih su najpoznatiji *Laurus nobilis* 'Aurea', *Laurus nobilis* 'Angustifolia' i *Laurus nobilis* 'Bay Junior' prikazani na Slici 2.

Laurus nobilis 'Aurea' može narasti do 8 metara visine, a vrlo se lako može prepoznati po svojim kožastim, aromatičnim, zlatno-žutim listovima.

Laurus nobilis 'Angustifolia' može narasti do 8 metara visine. Listovi su mu uži i izduženiji od listova običnog lovora.

Laurus nobilis 'Bay Junior' ima sporiji rast i manje listove od običnog lovora.



Slika 2. Listovi kultivara lovora, redom: *Laurus nobilis* 'Aurea', *Laurus nobilis* 'Angustifolia', *Laurus nobilis* (obični lovor) i *Laurus nobilis* 'Bay Junior' (Anonimus 2).

2.1.3. Funkcionalna svojstva lovora

Iako se lovor najčešće koristi kao začin, u nekim državama nalazi primjenu i u tradicionalnoj medicini zbog svojih antimikrobnih, antifungalnih, hipoglikemijskih, anti-ulcerogenih, antioksidacijskih i protuupalnih svojstava. Njegova antimikrobna svojstva očituju se u inhibitornom djelovanju na bakterije *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella flexnerii* i *Salmonella typhi*, a hipoglikemijska u djelovanju listova lovora na način da potiču aktivnost inzulina (Peter, 2012). Antioksidacijska aktivnost lovora posljedica je djelovanja fenolnih spojeva koji su vrlo dobri antioksidansi te su sposobni stabilizirati ili inaktivirati slobodne radikale prije nego što oni napadnu i oštete stanice. Slobodni radikali su sve kemijske vrste koje u svojoj vanjskoj elektronskoj ljusci sadrže jedan ili više nesparenih elektrona i svi su izuzetno reaktivni zbog njihova nastojanja za postizanjem stabilne elektronske konfiguracije. Nastaju u organizmu tijekom normalnih metaboličkih procesa, ali ako dođe do njihove pretjerane proizvodnje, mogu izazvati oksidaciju molekula deoksiribonukleinskih kiselina, masti i proteina što u konačnici dovodi do različitih bolesti. Upravo zbog toga su antioksidansi neophodni za održavanje zdravlja organizma. Polifenoli svoje antioksidacijsko djelovanje postižu na više načina (Veličković, 2013), a to su:

- predaja H - atoma, direktno vezanje slobodnih radikala
- keliranje prooksidacijskih metalnih iona (Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} i Mg^{2+})
- aktiviranje antioksidacijskih enzima
- inaktiviranje prooksidacijskih enzima

2.1.4. Upotreba lovora

Biološki aktivni spojevi iz lovora nalaze primjenu i u suvremenoj medicini. Laurozid B, glukozid iz lista lovora, u visokoj koncentraciji inhibira rast stanica raka kože (melanoma), a pritom ne djeluje inhibirajuće na rast zdravih stanica kože (Panza i sur., 2011). Lovor se može koristiti i u prehrambenoj industriji. Pokazano je (Marques i sur., 2015) da eterično ulje lovora ima brojne pozitivne učinke na proizvode mesne industrije kao što su smanjenje oksidacije mesa i produljenje svježine proizvoda, zbog čega se može koristiti kao biokonzervans. Eterično ulje lovora uvodi se i u prehranu peradi, pri čemu uzrokuje njihov ubrzani rast, smanjenje stope mortaliteta i povećanje proizvodnje jaja. Također, ako se dodaje u količini od 1 %, *v/w* (volumen eteričnog ulja po masi ribe) može se primijeniti i za produljenje roka trajanja zamrznute lokarde, ribe iz porodice skušovki koja ima velik udio nezasićenih masnih kiselina te brzo gubi na kvaliteti nakon zamrzavanja. Zbog svoje

antioksidacijske, antifungalne, insekticidne i antibakterijske aktivnosti, eterično ulje lovora može se koristiti i u poljoprivredi kao konzervans prilikom skladištenja voća, povrća i žitarica, ali i za kontrolu bolesti i suzbijanje nametnika. Međutim, svi ovi pozitivni učinci eteričnog ulja lovora još uvijek ne nalaze primjenu u industriji zbog njegove visoke cijene, raznolikosti kemijskog sastava (ovisno o okolišnim uvjetima), prevelike količine potrebne za prehrambenu industriju te zbog jakih senzorskih svojstava koja odbijaju kupce (Marques i sur., 2015).

Ekstrakti lovora pokazuju i antikorozijska svojstva (Gülşen, 2012) pa se, zahvaljujući visokoj koncentraciji polifenola, mogu koristiti kao vrlo efikasni, prirodni i ekološki prihvatljivi inhibitori korozije.

Eterično ulje lovora koristi se i u kozmetičkoj industriji za proizvodnju različitih krema, parfema i sapuna.

2.2. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi čine jednu od najvećih grupa sekundarnih metabolita biljaka. Zajednička osobina im je prisutnost barem jednog hidroksiliranog aromatskog prstena. Biosinteza aromatskih spojeva se kod biljaka uglavnom odvija preko šikimske kiseline pa tako i većina fenolnih spojeva nastaje metaboličkim putem koji se naziva ciklus šikimske kiseline. Fenolni spojevi u biljnim organizmima imaju različite uloge; sudjeluju u rastu, razvoju te zaštiti biljke. Najčešće se dijele prema broju ugljikovih atoma u molekuli pa tako postoje (Balasundram i sur., 2006):

- jednostavni fenoli (C_6)
- hidroksibenzojeve kiseline (C_6-C_1)
- acetofenoni i fenilocetene kiseline (C_6-C_2)
- hidroksicimetne kiseline (fenilpropanoidi - kumarini, izokumarini, kromoni i kromeni) (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-$C_6)_2$]
- lignin [$(C_6$-$C_3)_n$]

- kondenzirani tanini [$(C_6\text{-}C_3\text{-}C_6)_n$]

2.2.1. Glavne skupine fenola prisutnih u biljkama

2.2.1.1. Jednostavni fenoli

Fenol je zajedničko ime za hidroksibenzen i njegove derivate. Hidroksibenzen je po kemijskom sastavu alkohol koji se sastoji od benzenskog prstena s vezanom hidroksilnom skupinom. Fenoli su topljivi u alkoholu i glicerolu, a u manjoj mjeri i u vodi. Iako su jednostavne građe, u prirodi su prisutni samo u nekoliko aromatskih biljaka i to u obliku glikozida. Vrlo su korozivni te se ubrajaju među najtoksičnije sastojke eteričnih ulja. Zahvaljujući svojoj antimikrobnoj aktivnosti, fenol je bio prvi antiseptik koji se koristio u kirurgiji. Primjeri jednostavnih fenola su katehol i floroglucinol, a u biljnjim tkivima se uglavnom ugrađuju u kompleksnije polifenolne spojeve (Lattanzio, 2013).

2.2.1.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline dijele se na hidroksibenzojeve ($C_6\text{-}C_1$) i hidroksicimetne kiseline ($C_6\text{-}C_3$) te njihove derivate. Hidroksibenzojeve kiseline se u prirodi često nalaze vezane za šećere i organske kiseline ili kao sastavni dijelovi kompleksnijih spojeva poput tanina i lignina, a neki od primjera kiselina iz te skupine su *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, galna i siringinska kiselina (Macheix i sur., 1990). Najpoznatiji primjeri hidroksicimetnih kiselina su ferulinska, *p*-kumarinska, sinapinska i kafeinska kiselina. U prirodi se vrlo često mogu pronaći u obliku estera koji nastaju stvaranjem kemijske veze između karboksilne skupine fenolne kiseline i hidroksilne skupine organskog spoja (Macheix i sur., 1990).

2.2.1.3. Kumarini

Kumarini su derivati cimetne kiseline nastali ciklizacijom bočnog lanca *o*-kumarinske kiseline. U prirodi se mogu pronaći slobodni i vezani za šećere. Dijele se na hidroksikumarine koji su najčešće u formi glikozida, furanokumarine koji su građeni od peteročlanog furanoznog prstena vezanog na kumarinsku jezgru i piranokumarine koji, umjesto furanoznog, imaju šesteročlani piranski prsten (Lattanzio, 2013). Kumarini pokazuju antikoagulacijska, antimikrobna i antitumorska svojstva. Međutim, kumarini pokazuju i toksična svojstva pa je njihova koncentracija u namirnicama propisana zakonskim

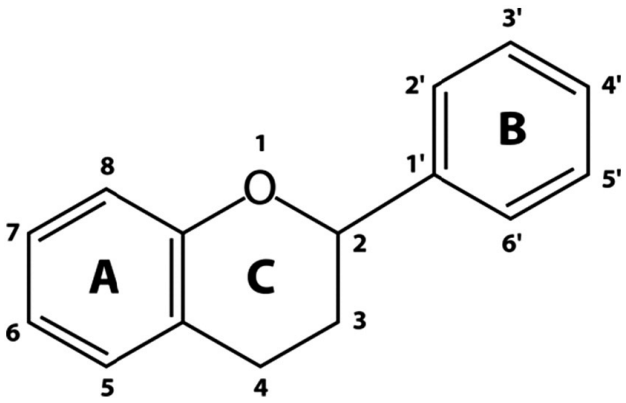
odredbama (Pravilnik o aromama, 2010). Pojedini kumarini imaju utjecaj i na imunološki sustav, rast stanica i diferencijaciju (Molnar i Čačić, 2011).

2.2.1.4. Stilbeni

Stilbeni su građeni od dva fenolna prstena povezana mostom od dva ugljikova atoma. Glavna fiziološka uloga im je obrana od mikroorganizama i regulacija rasta, a njihova sinteza inducirana je djelovanjem mikroorganizmima ili abiotičkim čimbenicima (Lattanzio, 2013).

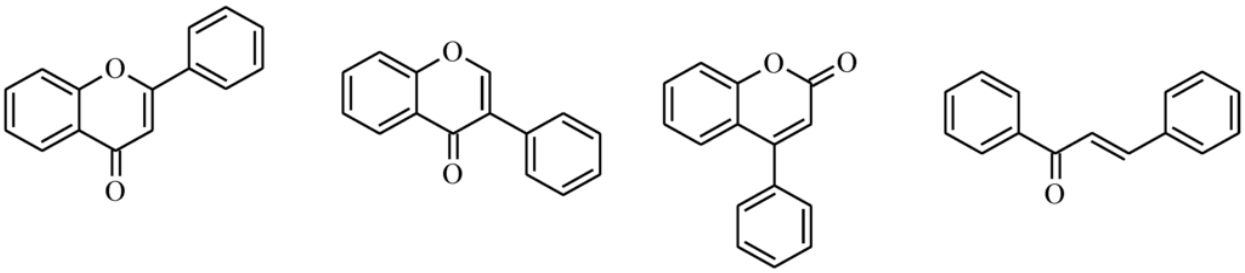
2.2.1.5. Flavonoidi

Osnovnu kemijsku strukturu flavonoida čine dva aromatska prstena (A i B) povezana heterocikličkim piranskim prstenom (C) kao što prikazuje Slika 3. Mogu biti hidroksilirani, metoksilirani i glikolizirani što utječe na svojstva flavonoida. Sa šećerima se najčešće povezuju na položaju 3- i to najviše s glukozom.



Slika 3. Osnovna struktura flavonoida (Balasundram i sur., 2006).

Ovisno o položaju na kojem se aromatski prsten (B) veže na piranski (C), flavonoidi se dijele na: flavonoide, izoflavonoide i neoflavonoide. I halkoni se ubrajaju u flavonoide iako im nedostaje ciklizirani piranski prsten (Tsao, 2010). Slika 4 prikazuje njihove strukture.

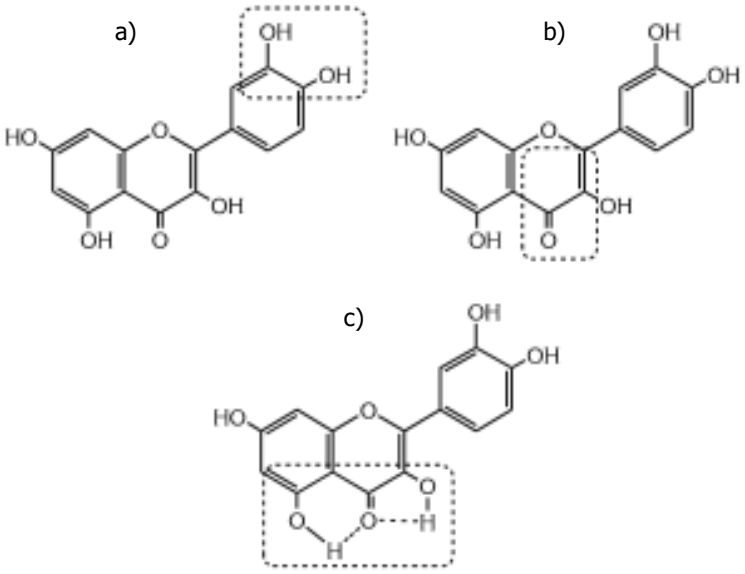


a) b) c) d)

Slika 4. Kemijska struktura: a) flavonoida, b) izoflavonoida, c) neoflavonoida i d) halkona (Selepe i Van Heerden, 2013).

Nadalje, prema stupnju hidroksilacije i varijacijama piranskog prstena (C) flavonoidi se dijele u podgrupe kao što su: antocijani, flavan-3-oli, flavoni, flavanoni i flavonoli (Tsao 2010). U carstvu biljaka (Comalada i sur., 2012) su prisutni apigenin i luteolin (flavoni), naringenin i hesperitin (flavanoni), te kamferol, kvercetin i miricetin (flavonoli). Flavan-3-oli se često zajedničkim imenom nazivaju i katehini, a od ostalih flavonoida se razlikuju po nedostatku dvostruke veze između C2 i C3 atoma i karbonilne skupine na C4 atomu C prstena. Katehin i epikatehin su izomeri koji mogu formirati polimere, a ti polimeri se nazivaju proantocijanidini. Flavan-3-oli se mogu pronaći u voću, posebno u kožici grožđa i borovnice te u kori jabuke. Antocijanidini su glavne komponente crvenih, plavih i ljubičastih pigmenata, a u biljkama se uglavnom nalaze u obliku glikozida koji se nazivaju antocijanini (Tsao, 2010). Flavonoidi imaju brojne biološke učinke, a najpoznatija je njihova antioksidacijska aktivnost. Glavne strukturne značajke flavonoida važne za antioksidacijsko djelovanje (Kazazić, 2004) prikazane su na Slici 5, a one su:

- o-dihidroksilna (kateholna) struktura u B-prstenu (a) koja daje stabilnost radikalu i omogućuje delokalizaciju elektrona,
- 2,3-dvostruka veza u konjugaciji s 4-ketoskupinom (b), što omogućuje delokalizaciju elektrona iz B-prstena i
- hidroksilne skupine na položaju 3- i 5- (c) koje osiguravaju vodikovu vezu s keto-skupinom.



Slika 5. Strukturne skupine flavonoida važne za njihovo antioksidacijsko djelovanje (Kazazić, 2014).

Zbog svoje antioksidacijske, antibakterijske, antivirale, hepatoprotektivne i antitumorske aktivnosti, flavonoidi su izrazito važni za ljudsku prehranu. Neki od flavonoida koji imaju dokazanu antibakterijsku aktivnost su apigenin, galangin, kvercetin i naringenin. Apigenin, kvercetin, naringenin i rutin posjeduju hepatoprotektivnu aktivnost dok antitumorsku aktivnost posjeduju kvercetin i genistein (Kumar i Pandey, 2013).

2.3. METODE EKSTRAKCIJE

Ekstrakcija je postupak odjeljivanja biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala, a temelji se na različitoj topljivosti tvari u ekstrakcijskom sredstvu (otapalo). Otapalo treba biti selektivno za spojeve koji se ekstrahiraju i ne smije reagirati s ostalim spojevima prisutnim u biljnom matriksu, mora imati veliki ekstrakcijski kapacitet, ne smije biti škodljivo za ljude i opremu te treba imati nisku cijenu nabave. Osim prikladnog otapala, faktori koji utječu na ekstrakciju su temperatura, pH, veličina čestica i difuzija otapala. Najpoznatije klasične, konvencionalne metode ekstrakcije su: Soxhlet ekstrakcija, maceracija, hidrodestilacija i ekstrakcija refluksiranjem. Suvremene, nekonvencionalne metode ekstrakcije su: ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, mikrovalovima i enzimima, ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem, ekstrakcija superkritičnim fluidima i ekstrakcija visokim tlakom (Azmir i sur., 2013).

Klasične metode zahtijevaju dosta vremena, energije te relativno velike količine biljnog materijala i otapala što se nastoji riješiti primjenom suvremenih metoda ekstrakcije. Osim toga, nekonvencionalne metode primjenom odgovarajućih parametara ekstrakcije omogućavaju veću selektivnost, a time i bolju ekstrakciju točno određenog spoja ili grupe spojeva (Gupta i sur., 2012).

2.3.1. Ekstrakcija refluksiranjem

Ekstrakcija refluksiranjem je klasična metoda ekstrakcije kod koje se aparatura za provođenje ekstrakcije sastoji od tikvice s okruglim dnom, hladila, vodene ili uljne kupelji s plamenikom ili električnim kuhalom. U tikvicu s okruglim dnom stavlja se materijal za ekstrakciju i odgovarajuće otapalo, nastala smjesa se grije, otapalo isparava te odlazi do hladila gdje se pare kondenziraju i vraćaju u reakcijsku smjesu. Na taj način se u reakcijskoj smjesi održava konstantna temperatura koja odgovara temperaturi vrelišta otapala. Zbog trenutnog hlađenja i kondenzacije para otapala, smjesa se može grijati duže vrijeme bez straha da bi moglo doći do isparavanja otapala iz tikvice.

2.3.2. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija

Ultrazvuk je zvuk frekvencija viših od 20 kHz. Ultrazvuk frekvencije 20 - 100 kHz i intenziteta 1 - 1000 W/cm^2 izaziva strukturne promjene biljnog materijala zbog čega se može koristiti za ekstrakciju. Prilikom prolaska ultrazvučnih valova kroz medij, dolazi do nastajanja područja promjenjivih kompresija i ekspanzija tlaka, odnosno fluktacije tlaka, što rezultira pojavom kavitacije (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Kavitacija je pojam koji označava formiranje mjehurića plina u tekućem mediju. Veličina mjehurića oscilira tako da se u ekspanziji povećavaju, a u kompresiji smanjuju. Međutim, u fazi ekspanzije uvijek narastu više nego što se u fazi kompresije smanje. U jednom trenutku narastu toliko da energija ultrazvuka više nije dovoljna da bi se održala plinska faza te dolazi do implozije mjehurića. Prilikom implozije mjehurića tlak naraste do 100 MPa, a temperatura do 5500 K. Kavitacija potiče ekstrakciju na način da uzrokuje oštećenja stanične stijenke i povećanje brzine difuzije što olakšava ispiranje sastojaka iz stanice. Da bi efikasnost ekstrakcije bila što veća, potrebno je optimizirati temperaturu i tlak, izbor otapala, vrijeme tretiranja te frekvenciju, snagu i distribuciju ultrazvučnih valova (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Ultrazvuk se može primjenjivati u obliku sonde i u obliku kupelji. Ako se koristi sonda,

nemoguće je istovremeno pripremati više ekstrakata jer je sonda tijekom cijelog postupka ekstrakcije u neposrednom dodiru s uzorkom (Khoddami i sur., 2013).

2.4. UV/Vis SPEKTROFOTOMETRIJA

UV/Vis spektroskopija se najčešće koristi za određivanje koncentracija onih tvari koje apsorbiraju ultraljubičasto (UV) ili vidljivo (Vis) elektromagnetsko zračenje na valnim duljinama od 200 do 800 nm. Metoda se bazira na propuštanju zrake svjetlosti kroz uzorak, mjerenju intenziteta svjetla koje je prošlo kroz uzorak te uspoređivanju tog intenziteta s intenzitetom ulaznog svjetla. Mnoge vrste koje ne apsorbiraju ultraljubičasto ili vidljivo zračenje mogu se određivati nakon kemijske reakcije kojom se prevode u derivate koji apsorbiraju. Funkcijski odnos apsorbancije uzorka (analita) i njegove koncentracije daje Lambert-Beerov zakon:

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

gdje je A apsorbancija, I_0 intenzitet ulaznog svjetla, I intenzitet svjetla propuštenog kroz uzorak, ε molarni apsorpcijski koeficijent, c množinska koncentracija i b debljina sloja otopine. Za mjerenje apsorbancije koristi se spektrofotometar, a sastoji od izvora svjetla, monokromatora, zaslona za odabir valne duljine, kivete (spremnik za uzorak), detektora i računarskog dijela.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

Listovi lovora sakupljeni u području Srednje Dalmacije (Trogir, Hrvatska) te osušeni i usitnjeni.



Slika 6. Usitnjeni listovi lovora.

3.2. KEMIKALIJE

- Aluminijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Etanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina (Acros Organics, New Jersey, USA)
- Metanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat, bezvodni (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev nitrit (Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka)
- Natrijev hidroksid (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Rutin (Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka)

3.3. OTOPINE

- Folin-Ciocalteu reagens (0,2 M)

  U odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetirano je 2,5 mL 2 M Folin-Ciocalteu reagensa i do oznake nadopunjeno deioniziranom vodom.
- Na_2CO_3 (20 %, *w/v*)

200 g Na_2CO_3 otopljeno je u 800 mL ključale deionizirane vode i nakon hlađenja otopina je prebačena u odmjernu tikvicu od 1000 mL, te je dodano nekoliko kristalića Na_2CO_3. Otopina je nakon 24 h profiltrirana.

- $NaNO_2$ (5 %, *w/v*)
  Odvagano je 5 g $NaNO_2$ i otopljeno u deioniziranoj vodi, u odmjernoj tikvici od 100 mL.
- $AlCl_3$ (10 %, *w/v*)
  Odvagano je 10 g $AlCl_3$ i otopljeno u deioniziranoj vodi, u odmjernoj tikvici od 100 mL.
- NaOH (1 M)
  Odvagano je 2 g NaOH i otopljeno u deioniziranoj vodi, u odmjernoj tikvici od 50 mL.

3.4. APARATURA I PRIBOR

- Analitička vaga (JOBST, Samobor, Hrvatska)
- Infracrveni termometar, B220 (Trotec, Njemačka)
- Kolorimetar CM-3500d (Konica Minolta Sensing, Inc. Osaka, Japan)
- Magnetska miješalica (IKA, RH basic 2, Boutersem, Belgija)
- Ultrazvučna sonda promjera 22 mm (dr. Hielcher, GmbH, Teltow, Njemačka)
- Ultrazvuk (dr. Hielcher, GmbH, Teltow, Njemačka)
- UV/Vis spektrofotometar (PERKIN-ELMER, Lambda 1, Massachusetts, USA)
- Automatska pipeta volumena 40 - 200 µL (KemoLab, Zagreb, Hrvatska)
- Boce za čuvanje otopina od 500 mL
- Falcon kivete za čuvanje uzoraka, 50 mL
- Graduirane pipete od 1, 2 i 5 mL
- Menzure od 10, 100 i 500 mL
- Odmjerne tikvice od 25, 50, 100 i 500 mL
- Propipeta
- Povratno hladilo
- Staklene čaše od 50, 100 i 250 mL
- Stakleni lijevci
- Staklene kapaljke
- Tikvica s okruglim dnom od 250 mL

3.5. METODE RADA

Analitičke metode korištene u radu su: ekstrakcija ultrazvukom i refluksiranjem, UV/Vis spektrofotometrija i određivanje boje.

3.5.1. Ekstrakcija lista lovora ultrazvukom

Suhi listovi lovora se usitne te se pripremi 18 odvaga od 3,000 g u staklenim čašama od 250 mL. U 9 čaša se doda 100 mL 30 %-tnog etanola, a u preostalih 9 čaša 100 mL 70 %-tnog etanola. Tako pripremljeni uzorci se podvrgnu ultrazvukom potpomognutoj ekstrakciji s parametrima: izlazna snaga 400 W, frekvencija 30 kHz, ciklus 1, te varijacijama u amplitudi (60, 80 i 100 %) i vremenu trajanja ekstrakcije (3, 6 i 9 min). Temperatura se mjeri neposredno prije i nakon ekstrakcije pomoću infracrvenog termometra.
Nakon ekstrakcije, uzorci su ručno stiješteni kroz gazu, a potom su ekstrakti dodatno procijeđeni kroz cijedilo te filtrirani preko običnog filter papira u odmjerne tikvice od 100 mL. Tikvice se nadopune do oznake otapalom korištenim za ekstrakciju (30 ili 70 %-tni etanol). Dobiveni ekstrakti čuvaju se u hladnjaku na temperaturi od +4 °C.

3.5.2. Ekstrakcija lista lovora refluksiranjem

3,000 g samljevenih listova lovora se odvaže i prenese u tikvicu s okruglim dnom. U tikvicu se doda 100 mL etanola (30 ili 70 %-tni etanol) te se započne ekstrakcija koja traje 1,5 ili 3 h. Postupak obrade ekstrahiranih uzoraka za daljnja analitička određivanja identičan je postupku opisanom u poglavlju 3.5.1.

3.5.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Za određivanje koncentracije ukupnih fenola korištena je spektrofotometrijska metoda koja se bazira na kolornoj reakciji fenolnih spojeva sa smjesom fosforwolframove i fosfomolbidenske kiseline tj. s Folin-Ciocalteu reagensom (FC). Pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima, te kiseline se reduciraju u volframov i molbidenov oksid koji su plavo obojeni. Obojenje će biti intenzivnije što je veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima, a sam intenzitet obojenja se mjeri pri valnoj duljini od 760 nm.

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

$$Mo(VI) + e^- \rightarrow Mo(V)$$

3.5.3.1. Izrada baždarnog dijagrama galne kiseline

Pripremi se polazna otopina standarda tj. otopina galne kiseline masene koncentracije 5 g/L na način da se 0,5 g galne kiseline odvaže i prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL te se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola nakon čega se tikvica nadopuni deioniziranom vodom do oznake. Od te otopine galne kiseline prirede se pojedinačne otopine tako da se otpipetira 0,2, 0,6, 1,0, 2,0, 2,6 i 3,6 mL alikvota polazne otopine galne kiseline u odmjernim tikvicama od 100 mL, a potom se tikvice nadopune s deioniziranom vodom do oznake. Masene koncentracije galne kiseline u pojedinim tikvicama iznose 10, 30, 50, 100, 130 i 180 mg/L. Iz svake tikvice se otpipetira 1,0 mL otopine standarda u odmjerne tikvice od 25 mL nakon čega se doda 10 mL deionizirane vode, 1,3 mL Folin-Ciocalteu reagensa (0,2 M), a nakon 5 minuta i 3,75 mL otopine Na_2CO_3 (20 %), te deionizirana voda do oznake. Za slijepu probu upotrijebljen je 1 mL dedeionizirane vode. Priređene otopine čuvaju se 2 h na sobnoj temperaturi i na tamnom mjestu, a potom im se na valnoj duljini od 760 nm izmjeri apsorbancija te izradi baždarni dijagram.

3.5.3.2. Postupak određivanja ukupnih fenola u ekstraktima lovora

Iz ekstrakata pripremljenih u odmjernim tikvicama od 100 mL (poglavlje 3.5.1. i 3.5.2.) otpipetira se 0,1 mL u odmjernu tikvicu od 25 mL, doda se 10 mL deionizirane vode, 1,3 mL FC reagensa te nakon 5 minuta i 3,75 mL 20 %-tne otopine Na_2CO_3, a potom se tikvica nadopuni deioniziranom vodom i ostavi stajati 2 h na sobnoj temperaturi i tamnom mjestu. Slijepa proba se pripremi na isti način, ali se umjesto 0,1 mL ekstrakta doda 0,1 mL deionizirane vode. Tako pripremljenim otopinama izmjeri se apsorbancija na 760 nm.

3.5.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida

Za određivanje koncentracije ukupnih flavonoida korištena je aluminij-klorid metoda koja se temelji na formiranju stabilnog aluminij-flavonoid kompleksa između aluminija i C4 keto skupine i C3 ili C5 hidroksilne skupine flavona i flavonola. Intenzitet obojenja formiranog kompleksa se mjeri pri valnoj duljini od 510 nm.

3.5.4.1. Izrada baždarnog dijagrama rutina

Pripremi se polazna otopina standarda tj. otopina rutina masene koncentracije 1 g/L na način da se 0,1 g rutina odvaže i prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL te se otopi u 10 mL metanola nakon čega se tikvica nadopuni deioniziranom vodom do oznake. Od pripravljene otopine rutina pripreme se pojedinačne otopine u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira 0,5, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 i 12,0 mL alikvota standardne otopine rutina u svaku tikvicu i potom se tikvice nadopune do oznake deioniziranom vodom. Masene koncentracije rutina u pojedinim tikvicama iznose 5, 20, 40, 60, 80 i 120 mg/L. Iz tih tikvica alikvot od 1,0 mL prenese se u odmjernu tikvicu od 25 mL, a potom se doda 2 mL deionizirane vode, 0,3 mL 5 %-tne otopine $NaNO_2$, 0,5 mL 10 %-tne otopine $AlCl_3$ (nakon 5 min) i 2 mL 1 M otopine NaOH (nakon 6 min). Slijepa proba se pripremi na isti način, s tim da se umjesto 1,0 mL standardne otopine doda deionizirana voda. Tako priređenim otopinama izmjeri se apsorbancija na valnoj duljini od 510 nm, a potom se izradi baždarni dijagram.

3.5.4.2. Postupak određivanja ukupnih flavonoida u uzorcima

Alikvot od 0,2 mL prethodno pripremljenih ekstrakata (poglavlje 3.5.1. i 3.5.2.) otpipetira se u odmjerne tikvice od 25 mL, doda se 2 mL deionizirane vode, 0,3 mL 5 %-tne otopine $NaNO_2$, 0,5 mL 10 %-tne otopine $AlCl_3$ (nakon 5 min), 2 mL 1 M otopine NaOH (nakon 6 min), a potom se tikvice nadopune deioniziranom vodom do oznake. Slijepa proba se pripremi na isti način, ali se umjesto 0,2 mL ekstrakta doda deionizirana voda. Pripremljenim otopinama mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 510 nm.

3.5.5. Određivanje boje ekstrakata

Boja ekstrakata, odnosno *L*, *a* i *b* parametri boje određeni su pomoću kolorimetra CM-3500d prema CIE sustavu kojeg čine:

- *L** - svjetlina (0 - crna, 100 - bijela boja)
- *a** - udio crvene (+) odnosno zelene boje (-)
- *b** - udio žute (+) odnosno plave boje (-)
- ΔE vrijednosti izračunata je prema formuli: $\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$

Kao referentni uzorci korišteni su L2 i L4 dobiveni ekstrakcijom refluksiranjem s deioniziranom vodom u trajanju od 1,5 i 3 h.

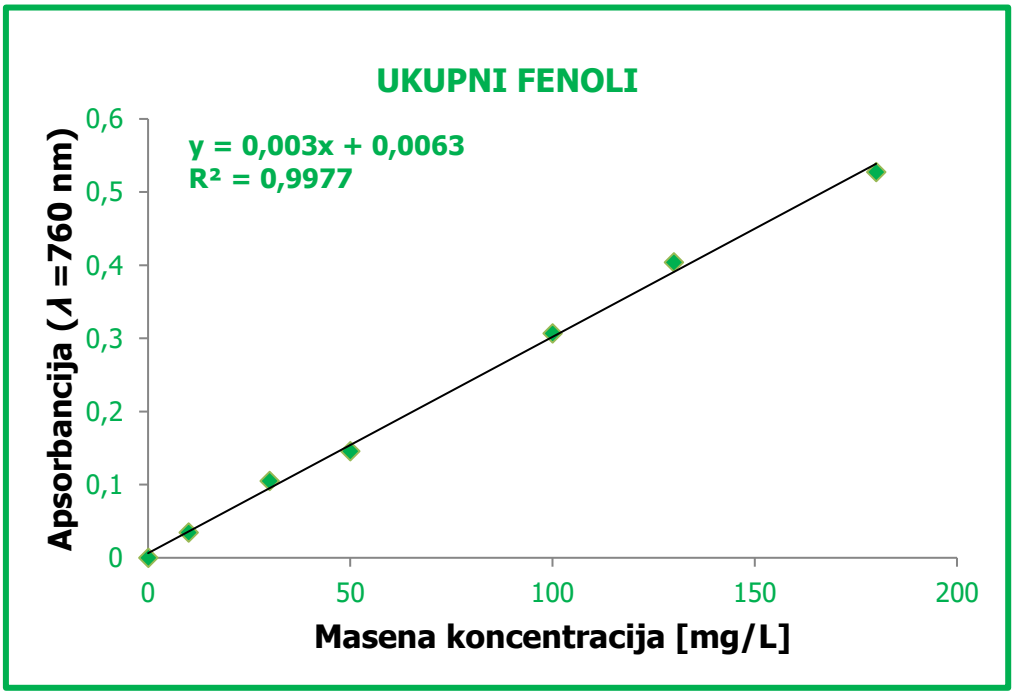
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA

Uzorcima pripremljenim u odmjernim tikvicama od 25 mL izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 760 nm (poglavlje 3.5.3.2.), a pomoću baždarnog dijagrama galne kiseline (Tablica 2, Slika 7) određena je masena koncentracija te maseni udio ukupnih fenola u suhim listovima lovora. Tablice 3 i 4 prikazuju maseni udio ukupnih fenola izražen kao mg galne kiseline na g suhog lista lovora ekstrahiranog u 30 i 70 %-tnom etanolu.

Tablica 2. Rezultati mjerenja apsorbancija pojedinačnih standardnih otopina galne kiseline.

Masena koncentracija [mg/L]	Apsorbancija (λ=760 nm)
0	0,000
10	0,035
30	0,105
50	0,146
100	0,307
130	0,404
180	0,528



Slika 7. Baždarni dijagram galne kiseline.

Iz dobivenih rezultata (Tablica 3) jasno se vidi da s povećanjem vremena ekstrakcije raste i maseni udio ukupnih fenola kod većine 30 %-tnih ekstrakata lovora. Izuzeci su uzorci ekstrahirani primjenom 60 %-tne amplitude gdje je najveći maseni udio ukupnih fenola dobiven ekstrakcijom u trajanju od 3 minute.

Promatrajući utjecaj amplitude na prinos ukupnih fenola u ekstraktima lovora, vidi se da smanjenje amplitude sa 100 na 60 % uzrokuje smanjenje udjela ukupnih fenola. Najviše vrijednosti (w = 628,3 mg/g) dobivene su pri amplitudi od 100 % i vremenu od 9 min. Međutim, na temelju vrlo malih dobivenih razlika u udjelu ukupnih fenola u uzorcima ekstrahiranim 6 i 9 min, može se zaključiti da je vrijeme od 6 min dovoljno za postizanje vrlo zadovoljavajućih prinosa.

Tablica 3. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u ekstraktima lovora dobivenim ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom u 30 %-tnom etanolu.

Uzorak	Amplituda [%]	Vrijeme [min]	Temperatura (početna) [°C]	Temperatura (krajnja) [°C]	ΔT	Apsorbancija ± SD	w [mg galne kiseline/g] ± SD
1-AM	**100**	3	23,5	34,2	10,7	0,216 ± 0,002	582,5 ± 5,6
2-AM		6	23,4	46,3	22,9	0,230 ± 0,000	621,4 ± 0,0
3-AM		9	23,4	54,0	30,6	0,233 ± 0,001	628,3 ± 1,4
4-AM	**80**	3	23,2	32,5	9,3	0,206 ± 0,001	553,3 ± 1,4
5-AM		6	23,2	41,4	18,2	0,227 ± 0,001	611,7 ± 1,4
6-AM		9	23,3	47,0	23,7	0,231 ± 0,000	624,2 ± 0,0
7-AM	**60**	3	22,6	28,3	5,7	0,202 ± 0,001	544,3 ± 2,3
8-AM		6	22,8	35,4	12,6	0,195 ± 0,001	522,8 ± 1,4
9-AM		9	23,1	40,0	16,9	0,197 ± 0,001	528,3 ± 3,1

N = 4

Osim 30 %-tnim etanolom, ultrazvučna ekstrakcija polifenola provedena je i 70 %-tnim etanolom, a rezultati pokazuju (Tablica 4) da je 70 %-tni etanol efikasnije ekstrakcijsko sredstvo. Naime, u usporedbi s 30 %-tnim, kod 70 %-tnog etanola su izmjerene veće temperature, odnosno promjene temperatura (ΔT) koje utječu na efikasniju ekstrakciju polifenola. Primjerice, kod uzorka lovora ekstrahiranog pri 100 %-tnoj amplitudi i vremenu od 9 min zabilježena je najveća promjena temperature, a ona iznosi 38 °C. S obzirom na navedene parametre najveći maseni udio ukupnih fenola (704,7 mg/g) nađen je kod 12-AM ekstrakta.

Tablica 4. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u ekstraktima lovora dobivenim ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom u 70 %-tnom etanolu.

Uzorak	Amplituda [%]	Vrijeme [min]	Temperatura (početna) [°C]	Temperatura (krajnja) [°C]	ΔT	Apsorbancija ± SD	W [mg galne kiseline/g] ± SD
10-AM	**100**	3	23,5	42,4	18,9	0,227 ± 0,000	613,1 ± 0,0
11-AM		6	23,7	54,5	30,8	0,247 ± 0,000	668,6 ± 0,0
12-AM		9	23,9	61,8	37,9	0,260 ± 0,000	704,7 ± 0,0
13-AM	**80**	3	23,1	37,2	14,1	0,208 ± 0,000	560,3 ± 0,0
14-AM		6	23,6	48,9	25,3	0,228 ± 0,000	615,8 ± 0,0
15-AM		9	23,2	55,9	32,7	0,244 ± 0,002	661,0 ± 5,3
16-AM	**60**	3	21,9	31,9	10,0	0,182 ± 0,000	488,1 ± 0,0
17-AM		6	22,1	39,5	17,4	0,204 ± 0,001	547,8 ± 1,4
18-AM		9	22,4	46,2	23,8	0,223 ± 0,001	601,9 ± 2,8

$N = 4$

Promatrajući utjecaj parametara ekstrakcije na prinos polifenola u 70 %-tnim etanolnim ekstraktima lovora (Tablica 4), jasno se vidi da povećanje vremena uzrokuje porast, dok

smanjenje amplitude opadanje vrijednosti masenih udjela ukupnih fenola, što je u skladu s rezultatima dobivenim za 30 %-tni etanol. Međutim, u usporedbi s 30 %-tnim etanolom, ovdje su razlike između masenih udjela u uzorcima dobivenih ekstrakcijom od 6 i od 9 min relativno velike te je biljni materijal poželjno ekstrahirati 9 min.

Uz ultrazvučnu ekstrakciju kao nekonvencionalnu metodu ekstrakcije, u ovom radu korištena je i klasična metoda ekstrakcije, refluksiranje. Dobiveni rezultati (Tablice 5 i 6) pokazuju da povećanje vremena ekstrakcije negativno utječe na prinos ukupnih fenola, pa su veći maseni udjeli (670,7 mg/g i 918,6 mg/g) nađeni u ekstraktima refluksiranim 1,5 h uz 30 i 70 % etanol.

Tablica 5. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u ekstraktima lovora dobivenim ekstrakcijom refluksiranjem uz 30 %-tni etanol.

Uzorak	Vrijeme [h]	Apsorbancija ± SD	*w* [mg galne kiseline/g] ± SD
L11	1,5	0,248 ± 0,001	670,7 ± 2,3
L9	3	0,203 ± 0,003	545,0 ± 7,2

Tablica 6. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u ekstraktima lovora dobivenim ekstrakcijom refluksiranjem uz 70 %-tni etanol.

Uzorak	Vrijeme [h]	Apsorbancija ± SD	*w* [mg galne kiseline/g] ± SD
L8	1,5	0,337 ± 0,004	918,6 ± 9,8
L5	3	0,307 ± 0,003	833,9 ± 8,4

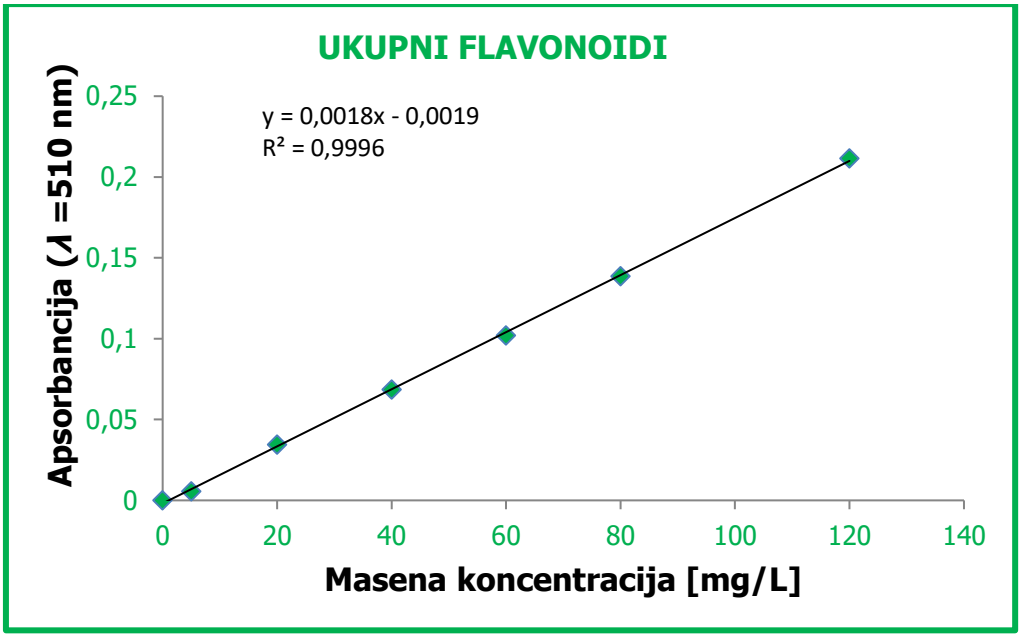
Važno je naglasiti da gotovo i ne postoje znanstveni radovi koji pokrivaju područje ekstrakcije polifenola iz lovora ultrazvukom ili pak refluksiranjem, pa i usporedba dobivenih rezultata s drugim vrijednostima nije bila moguća. Među rijetkim radovima valja istaknuti istraživanje Muñiz-Márquez i sur. (2014), koji dobivaju vrijednosti do 10 mg/g ovisno o vremenu ekstrakcije (2, 4, 6 i 8 h) i volumnom udjelu etanola (35 i 70 %) uz ekstrakciju destilacijom.

4.2. ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA

Uzorcima pripremljenim u odmjernim tikvicama od 25 mL izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 510 nm (poglavlje 3.5.4.2.), a pomoću baždarnog dijagrama rutina (Tablica 7, Slika 8) određena je masena koncentracija ukupnih flavonoida, te maseni udio izražen kao mg rutina na g suhog lista lovora ekstrahiranog u 30 i 70 %-tnom etanolu (Tablice 8 i 9).

Tablica 7. Rezultati mjerenja apsorbancije pojedinačnih standarnih otopina rutina.

Masena koncentracija [mg/L]	Apsorbancija (λ=510 nm)
0	0,000
5	0,006
20	0,035
40	0,069
60	0,102
80	0,139
120	0,212



Slika 8. Baždarni dijagram rutina.

Tablica 8. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida u ekstraktima lovora dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom uz 30 %-tni etanol.

Uzorak	Amplituda [%]	Vrijeme [min]	Temperatura (početna) [°C]	Temperatura (krajnja) [°C]	ΔT	Apsorbancija ± SD	w [mg rutina/g] ± SD
1-AM	**100**	3	23,5	34,2	10,7	0,081 ± 0,000	191,9 ± 0,0
2-AM		6	23,4	46,3	22,9	0,090 ± 0,001	211,6 ± 1,2
3-AM		9	23,4	54,0	30,6	0,100 ± 0,002	235,9 ± 4,6
4-AM	**80**	3	23,2	32,5	9,3	0,076 ± 0,001	180,9 ± 1,9
5-AM		6	23,2	41,4	18,2	0,083 ± 0,001	195,4 ± 1,2
6-AM		9	23,3	47,0	23,7	0,087 ± 0,001	204,6 ± 1,2
7-AM	**60**	3	22,6	28,3	5,7	0,085 ± 0,001	200,0 ± 3,5
8-AM		6	22,8	35,4	12,6	0,076 ± 0,000	180,9 ± 1,0
9-AM		9	23,1	40,0	16,9	0,080 ± 0,001	188,4 ± 1,2

$N = 4$

Isto kao i kod određivanja ukupnih fenola (Tablica 3), i ovdje se može zaključiti da povećanjem vremena ekstrakcije uglavnom raste i udio ukupnih flavonoida, a smanjenjem amplitude opada (Tablica 8). Najučinkovitija ekstrakcija ukupnih flavonoida uz 30 %-tni etanol ostvarena je pri 100 %-tnoj amplitudi i vremenu od 9 min (uzorak 3-AM).

Ako ove rezultate usporedimo s rezultatima ekstrakcije ukupnih fenola (Tablica 3), vidimo da je najmanji udio ukupnih fenola (522,8 mg/) nađen u uzorku 8-AM koji je ekstrahiran 6 min pri 60 %-tnoj amplitudi, a upravo u tom uzorku je nađeno i najmanje ukupnih flavonoida (180,9 mg/g). Također, najveći udio ukupnih fenola određen je u uzorku koji je ekstrahiran 9 min pri 100 %-tnoj amplitudi (Tablica 3) što odgovara i najvećem masenom udjelu (235,9 mg/g) ukupnih flavonoida nađenom kod 3-AM uzorka (Tablica 8).

Tablica 9. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida u ekstraktima lovora dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom uz 70 %-tni etanol.

Uzorak	Amplituda [%]	Vrijeme [min]	Temperatura (početna) [°C]	Temperatura (krajnja) [°C]	ΔT	Apsorbancija ± SD	w [mg rutina/g] ± SD
10-AM	**100**	3	23,5	42,4	18,9	0,091 ± 0,001	213,9 ± 1,2
11-AM		6	23,7	54,5	30,8	0,106 ± 0,000	249,8 ± 0,0
12-AM		9	23,9	61,8	37,9	0,110 ± 0,001	257,9 ± 1,2
13-AM	**80**	3	23,1	37,2	14,1	0,078 ± 0,000	185,5 ± 1,0
14-AM		6	23,6	48,9	25,3	0,100 ± 0,000	235,9 ± 0,0
15-AM		9	23,2	55,9	32,7	0,105 ± 0,001	246,3 ± 1,2
16-AM	**60**	3	21,9	31,9	10,0	0,073 ± 0,002	173,4 ± 4,6
17-AM		6	22,1	39,5	17,4	0,086 ± 0,002	204,1 ± 4,1
18-AM		9	22,4	46,2	23,8	0,093 ± 0,000	219,7 ± 0,0

$N = 4$

U usporedbi s 30 %-tnim etanolom (Tablica 8), sa 70 %-tnim (Tablica 9) ostvarena je efikasnija ekstrakcija ukupnih flavonoida, a najviša vrijednost (257,9 mg/g) nađena je u uzorku 12-AM koji je ekstrahiran 9 min pri amplitudi od 100 %.

Ako rezultate iz Tablice 9 usporedimo s rezultatima ekstrakcije ukupnih fenola dobivenih upotrebom 70 %-tnog etanola (Tablica 4), vidimo da obje grupe rezultata imaju jednake odnose efikasnosti s obzirom na primjenjene parametre ekstrakcije. U oba slučaja efikasnost ekstrakcije raste povećanjem vremena, a smanjuje se smanjenjem amplitude. Slijedeći to pravilo, najmanji maseni udio (173,4 mg/g) ukupnih flavonoida nađen je u uzorku dobivenom ekstrakcijom u vremenu od 3 min s 60 %-tnom amplitudom.

Usporedbom masenih udjela ukupnih flavonoida dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom i ekstrakcijom refluksiranjem (Tablice 10 i 11), može se zaključiti da je ekstrakcija refluksiranjem učinkovitija, pogotovo ako se upotrijebi 70 % etanol kao ekstrakcijsko sredstvo. Tako se, primjerice, ultrazvučnom ekstrakcijom dobiva 257,9 mg/g, a refluksiranjem 362,6 mg/g ukupnih flavonoida. Uz 30 %-tni etanol kao otapalo, razlike u prinosu ukupnih flavonoida su vrlo male pa je tako ultrazvučnom ekstrakcijom dobiveno 235,9 mg/g, a refluksiranjem 249,8 mg/g ukupnih flavonoida. S obzirom da ekstrakcija refluksiranjem traje duže (1,5 h), ekstrakciju ultrazvukom možemo smatrati isplativijom ako se upotrijebi 30 %-tni etanol.

Tablica 10. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida u ekstraktima lovora dobivenim ekstrakcijom refluksiranjem uz 30 %-tni etanol.

Uzorak	Vrijeme [h]	Apsorbancija ± SD	*w* [mg rutina/g] ± SD
L11	1,5	0,106 ± 0,001	249,8 ± 2,3
L9	3	0,080 ± 0,001	189,6 ± 1,6

Tablica 11. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida u ekstraktima lovora dobivenim ekstrakcijom refluksiranjem uz 70 %-tni etanol.

Uzorak	Vrijeme [h]	Apsorbancija ± SD	*w* [mg rutina/g] ± SD
L8	1,5	0,145 ± 0,002	339,5 ± 5,3
L5	3	0,155 ± 0,000	362,6 ± 1,0

4.3. ODREĐIVANJE BOJE

Poznato je da *L* parametar boje predstavlja svjetlinu pa što je vrijednost *L* bliža nuli, to je boja uzorka bliža crnoj, odnosno uzorak je tamniji. U skladu s navedenim, kod ekstrakata dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom u 30 %-tnom etanolu (Tablica 12), pri 80 i 100 %-tnoj amplitudi, svjetlina ekstrakata opada porastom vremena ekstrakcije, odnosno porastom masenih udjela ukupnih fenola i flavonoida. Dakle, najtamniji je 3-AM uzorak (*L* = 71,03) dobiven ekstrakcijom pri 100 %-tnoj amplitudi u trajanju od 9 min, a upravo u tom ekstraktu su zabilježene i najveći maseni udjeli ukupnih fenola i flavonoida. Kod 60 %-tne

amplitude dobiveni su najsvijetliji ekstrakti s gotovo jednakim *L* vrijednostima pri 3, 6 i 9 min ekstrakcije.

Među 70 %-tnim ekstraktima (Tablica 13) najtamnijim se pokazao uzorak 14-AM (*L* = 74,12), iako je 12-AM (75,03), imao najveci udio ukupnih fenola i flavonoida. S druge pak strane, najsvjetliji ekstrakt je 16-AM (*L* = 81,95) u kojem su zabilježene i najmanje vrijednosti ukupnih fenola i flavonoida.

Tablica 12. Parametri boje određeni u 30 %-tnim etanolnim ekstraktima lovora dobivenim ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom.

Uzorak	Amplituda [%]	Vrijeme [min]	*L**	*a**	*b**	Δ*E*
1-AM	**100**	3	80,44	3,02	47,56	29,16
2-AM		6	76,61	3,22	49,87	26,10
3-AM		9	71,03	4,23	55,67	20,37
4-AM	**80**	3	82,03	2,79	45,32	31,55
5-AM		6	80,74	2,58	46,68	30,16
6-AM		9	77,94	3,10	50,27	26,30
7-AM	**60**	3	85,71	2,12	43,70	34,69
8-AM		6	85,85	1,67	42,38	35,94
9-AM		9	84,12	1,83	43,84	34,02

Tablica 13. Parametri boje određeni u 70 %-tnim etanolnim ekstraktima lovora dobivenim ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom.

Uzorak	Amplituda [%]	Vrijeme [min]	*L**	*a**	*b**	Δ*E*
10-AM	**100**	3	80,87	-18,08	89,49	44,78
11-AM		6	77,71	-19,66	94,27	47,83
12-AM		9	75,03	-19,29	96,18	48,19
13-AM	**80**	3	79,61	-19,34	90,90	46,22
14-AM		6	74,12	-20,04	95,81	48,50
15-AM		9	75,05	-19,91	95,81	48,49
16-AM	**60**	3	81,95	-19,70	87,80	45,71
17-AM		6	78,60	-19,31	91,94	46,49
18-AM		9	75,62	-20,02	94,56	47,96

Tablice 14 i 15 pokazuju parametre boje u uzorcima lovora dobivenim ekstrakcijom refluksiranjem. Vidi se da su 30 i 70 % ekstrakti dobiveni ekstrakcijom u trajanju od 1,5 h tamniji od ekstrakata dobivenih ekstrakcijom u trajanju od 3 h što odgovara i vrijednostima masenih udjela ukupnih fenola i flavonoida. Tako je ekstrakt L8 (L = 70,48) najtamniji, a upravo u njemu je zabilježen i najveći maseni udio ukupnih fenola u usporedbi s ostalim ekstraktima pripravljenim u ovom radu.

Tablica 16 prikazuje parametre boje određene u referentnim uzorcima (L2 i L4) dobivenim ekstrakcijom refluksiranjem s deioniziranom vodom u trajanju od 1,5 i 3 h. U usporedbi s 30 i 70 %-tnim etanolnim ekstraktima, vodeni ekstrakti lovora su tamniji kod vremena ekstrakcije od 3 h. Dakle, može se zaključiti kako odabir otapala (voda ili etanol), volumni udio otapala u vodenoj fazi, metoda ekstrakcije, kao i procesni parametri utječu na različitu obojenost ekstrakata, odnosno njihove L, a i b vrijednosti. Sukladno tome, parametri ekstrakcije mogu se odabrati ovisno o željenoj boji ekstrakta i njegovoj krajnjoj upotrebi.

Tablica 14. Parametri boje određeni u 30 %-tnim etanolnim ekstraktima lovora dobivenim ekstrakcijom refluksiranjem.

Uzorak	Vrijeme [h]	L^*	a^*	b^*	ΔE
L11	1,5	80,34	6,51	48,60	26,46
L9	3	85,95	4,97	39,65	36,56

Tablica 15. Parametri boje određeni u 70 %-tnim etanolnim ekstraktima lovora dobivenim ekstrakcijom refluksiranjem.

Uzorak	Vrijeme [h]	L^*	a^*	b^*	ΔE
L8	1,5	70,48	-3,68	98,30	37,88
L5	3	73,37	-6,67	100,49	41,64

Tablica 16. Parametri boje određeni u vodenim ekstraktima lovora dobivenim ekstrakcijom refluksiranjem (referentni uzorci).

Uzorak	Vrijeme [h]	*L**	*a**	*b**	Δ*E*
L2	1,5	75,00	18,43	65,62	6,54
L4	3	69,37	19,85	68,64	0,00

5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata, može se zaključiti da je 70 %-tni etanol efikasnije otapalo u usporedbi s 30 %-tnim etanolom jer su upotrebom 70 %-tnog etanola dobiveni veći maseni udjeli ukupnih fenola i flavonoida u gotovo svim ekstraktima, pri istoj amplitudi i vremenu trajanja ekstrakcije.

Također, kod većine analiziranih uzoraka može se primijetiti porast prinosa polifenola s povećanjem vremena (od 3 do 9 min) i amplitude (od 60 do 100 %) ekstrakcije. Dakle, najviši maseni udjeli ukupnih fenola dobiveni su ekstrakcijom u trajanju od 9 min pri 100 %-tnoj amplitudi uz 30 %-tni (628,3 mg/g) i 70 %-tni (704,7 mg/g) etanol.

Kod ekstrakcije refluksiranjem, najviši prinos polifenola dobiven je ekstrakcijom 70 %-tnim etanolom u trajanju od 1,5 h, a iznosi 918,6 mg/g.

Iako su prinosi kod ekstrakcije refluksiranjem veći, treba uzeti u obzir i vrijeme trajanja postupka koje je kod ekstrakcije ultrazvukom puno kraće zbog čega je ova tehnika bolji izbor. Osim toga, ekstrakcija refluksiranjem 70 %-tnim etanolom se odvija pri temperaturi vrelišta otapala (pri atmosferskom tlaku iznosi oko 85 °C), koja može utjecati na degradaciju termolabilnih sastojaka ekstrakta. S druge strane, ultrazvučna ekstrakcija se može odvijati pri sobnoj temperaturi, a pri tome porast temperature unutar 9 min ekstrakcije nije veći od 40 °C.

Iz tog razloga, ova ekstrakcijska tehnika, upotrebom 70 %-tnog etanola uz vrijeme ekstrakcije od 9 min i 100 %-tnu amplitudu (optimalni parametri), će se koristiti u daljnjoj pripravi ekstrakata lišća lovora koji će se primjenjivati kao prirodni, ekološki prihvatljivi inhibitori korozije metala i metalnih legura.

6. LITERATURA

Anonimus 1, < http://www.pfaf.org/user/Default.aspx > Pristupljeno 15. kolovoza 2017.

Anonimus 2, < https://www.tuinadvies.nl > Pristupljeno 15. Kolovoza 2017.

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

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

Comalada M., Xaus J., Gálvez J. Watson R R., Preedy V. R. (2012) Flavonoids and Immunomodulation. U: Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases: Bioactive Food in Chronic Disease States, 1. izd., Watson R. R., Preedy V. R., ur. Elsevier Inc. str. 556.

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

Fouda A. S., Eldesoky A. M., Elmorsi M. A., Fayed T. A., Atia M. F. (2013) New Eco-Friendly Corrosion Inhibitors Based on Phenolic Derivatives for Protection Mild Steel Corrosion. *International Journal of Electrochemical Science* **8**: 10219 - 10238.

Grlić LJ. (1990) Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, 2. izd., August Cesarec Zagreb. str. 118 - 119.

Gupta A., Naraniwal M., Kothari V. (2012) Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *International Journal of Applied and Natural Sciences* **1**: 8 - 26.

Gülşen A. (2012) Corrosion inhibition of mild steel by Laurus nobili s leaves extract as green inhibitor. *Research on Chemical Intermediates* **38**: 1311 - 1321.

Kazazić S. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **55**: 279 - 290.

Khoddami A., Wilkes M. A., Roberts T. H. (2013) Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* **18:** 2328 - 2375.

Kumar S., Pandey A. K. (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal* **2013**: ID 162750, 16 stranica.

Lattanzio V. (2013) Phenolic Compounds: Introduction. U: Natural Products, Ramawat K. G., Mérillon J. M., ur., Springer - Verlag Berlin Heidelberg. str. 1544 - 1573.

Macheix J., Fleuriet A., Billot J. (1990) Fruit phenolics, CRC Press. str. 17 - 21.

Marques A., Teixeira B., Nunes M. L. (2015) Bay Laurel (Laurus nobilis) Oils. U: Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety, Preedy V. R., ur. Elsevier Inc. str. 241 - 245.

Molnar M., Čačić M. (2011) Biološka aktivnost derivata kumarina. *Croatian Journal of Food Science* and *Technology* **3**: 55 - 64.

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**: 271 - 276.

NRCS United States Department of Agriculture. NRCS - Natural Resources Conservation Service, < https://plants.usda.gov/java/ > Pristupljeno 15. kolovoza 2017.

Panza E., Tersigni M., Iorizzi M., Zollo F., De Marino S., Festa C., Napolitano M., Castello G., Ialenti A., Ianaro A. (2011) Lauroside B, a Megastigmane Glycoside from Laurus Nobilis (Bay Laurel) Leaves, Induces Apoptosis in Human Melanoma Cell Lines by Inhibiting NF-κB Activation. *Journal of Natural Products* **74**: 228 - 233.

Peter K. V. (2012) Handbook of Herbs and Spices, 2. izd., Woodhead Publishing Limited. str. 79.

Pravilnik o aromama (2010) *Narodne novine* **86** (NN 86/2010).

Selepe M. A., Van Heerden F. R. (2013) Application of the Suzuki-Miyaura Reaction in the Synthesis of Flavonoids. *Molecules* **18(4)**: 4739-4765.

Tsao R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2**: 1231 - 1246.

Veličković J. (2013) Hemijska analiza i antioksidativna aktivnost ekstrakata odabranih biljnih vrsta bogatih fenolnim jedinjenjima, doktorska disertacija.

Izjava o izvornosti

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

Angela Matanović

ime i prezime studenta