

# Utjecaj metoda ekstrakcije na udio eteričnog ulja i fenolni sastav lista lovora (*Laurus nobilis* L.)

---

Macut, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2019

*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:159:823292>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-16**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2019.

Maja Macut

1092/PI

**UTJECAJ METODA  
EKSTRAKCIJE NA UDIO  
ETERIČNOG ULJA I FENOLNI  
SASTAV LISTA LOVORA  
(*Laurus nobilis* L.)**



Ovo istraživanje je financirano sredstvima znanstvenog projekta „Interakcije slatkovodnih patogenih oomiceta i okoliša“ (HRZZ InteractOomyc, UIP-05-2017) Hrvatske zaklade za znanost HRZZ (2018.-2023.).

Rad je izrađen u Laboratoriju za analitičku kemiju u Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Maje Dent, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Anđele Miljanović, mag.ing. (Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama).

Zahvaljujem se svojoj mentorici, doc. dr. sc. Maji Dent na stručnom vodstvu te na savjetima i razumijevanju tijekom pisanja diplomskog rada.

Zahvaljujem se Anđeli Miljanović, mag. ing. na pomoći tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.

Zahvaljujem se kolegicama Ivi i Marini na ugodnoj radnoj atmosferi u laboratoriju.

Na kraju, zahvaljujem se svima bez kojih ne bih završila PBF. Mojim roditeljima, prijateljima i MMGB-u koji su mi bili velika podrška tijekom studiranja te na koje sam se mogla osloniti u svakom trenutku.

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Zavod za kemiju i biokemiju**

**Laboratorij za analitičku kemiju**

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

UTJECAJ METODA EKSTRAKCIJE NA UDIO ETERIČNOG ULJA I FENOLNI SASTAV LISTA  
LOVORA (*Laurus nobilis* L.)

*Maja Macut, 1092/PI*

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je odrediti udio eteričnog ulja i fenolni sastav lista lovora nakon provedene vodene destilacije. Predtretman klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem i ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom uz dodatak enzima (celulaza, pektinaza, ksilanaza) neposredno prije provedene Clavenger vodene destilacije nije pridonio povećanju udjela ekstrahiranog eteričnog ulja i udjela fenolnih spojeva iz lista lovora. Spektrofotometrijski su određeni visoki maseni udjeli ukupnih fenola u vodenom ekstraktu (27,27 mg GAE g<sup>-1</sup>) i ekstraktu biljnog ostatka lista lovora (20,01 mg GAE g<sup>-1</sup>) koji zaostaju nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru. U biljnim ostacima lovora nakon provedene vodene destilacije je ispitivan utjecaj smjese otapala, te su primjenom smjese etanol-metanol-voda (1:1:1) ekstrahirani veći maseni udjeli fenolnih spojeva nego primjenom smjese etanol-voda (1:1) i metanol-voda (1:1). Vodeni ekstrakt, ekstrakt biljnog ostatka, eterično ulje i hidrolat lovora predstavljaju vrijedan izvor biološki aktivnih spojeva, te će se u daljnjim analizama ispitati njihovo djelovanje na patogene oomicete.

**Ključne riječi:** lovor, fenolni spojevi, ultrazvuk, enzimi

**Rad sadrži:** 51 stranica, 11 slika, 12 tablica, 59 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** doc.dr.sc. Maja Dent

**Pomoć pri izradi:** Anđela Miljanović, mag.ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac
2. Doc. dr. sc. Ana Bielen
3. Doc. dr. sc. Maja Dent
4. Izv. prof. dr. sc. Lidija Šver

**Datum obrane:** 22.11.2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Chemistry and Biochemistry

Laboratory for Analytical Chemistry

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### INFLUENCE OF EXTRACTION METHODS ON THE YIELD OF ESSENTIAL OIL AND PHENOLIC COMPOSITION OF LAUREL BAY LEAF (*Laurus nobilis* L.)

*Maja Macut, 1092/PI*

**Abstract:** The aim of this study was to determine the oil content and phenolic composition of laurel bay. Pretreatment with classical extraction by refluxing and ultrasound-assisted extraction with the addition of enzymes (cellulase, pectinase, xylanase) just prior to the Clavenger hydro-distillation did not contribute to the increase of the extracted essential oil from the laurel bay leaves. In the aqueous extract and the hydrolate that are left behind after Clavenger hydro-distillation are spectrophotometrically determined mass fraction of total phenols, hydroxycinnamic acids, flavonoids and flavonols. After the hydro-distillation the influence of solvent mixture was investigated in the plant residues of the laurel bay leaves and the highest mass fraction of phenolic compounds was extracted using ethanol-methanol-water (1:1:1), while using ethanol-water (1:1) and methanol-water (1:1) significantly less. Aqueous extract, hydrolate and extract of laurel bay leaves are valuable sources of phenolic compounds and in further analysis will be determined their oomycete activity.

**Keywords:** bay leaves, phenolic compounds, ultrasound, enzymes

**Thesis contains:** 51 pages, 11 figures, 12 tables, 59 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** Ph.D. Maja Dent, Assistant Professor

**Technical support and assistance:** Anđela Miljanović, BSc

**Reviewers:**

1. Ph.D. Verica Dragović-Uzelac, Full Professor
2. Ph.D. Ana Bielen, Assistant Professor
3. Ph.D. Maja Dent, Assistant Professor
4. Ph.D. Lidija Šver, Associate Professor

**Thesis defended:** 22.11.2019.



## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. LOVOR .....	2
2.2. ETERIČNO ULJE LISTA LOVORA .....	3
2.3. FENOLNI SPOJEVI .....	4
2.3.1. Flavonoidi .....	5
2.3.2. Fenolne kiseline .....	6
2.3.3. Fenolni spojevi lovora .....	7
2.4. METODE EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA .....	7
2.4.1. Klasična ekstrakcija otapalima .....	8
2.4.2. Enzimima potpomognuta ekstrakcija .....	10
2.4.3. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija .....	11
2.5. CLEVENGER VODENA DESTILACIJA .....	12
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	14
3.1. MATERIJAL .....	14
3.2. KEMIKALIJE I STANDARDI .....	14
3.3. APARATURA I PRIBOR .....	16
3.4. METODE RADA .....	17
3.4.1. Izolacija eteričnog ulja lovora uz predtretmane .....	17
3.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva u lovoru .....	20
<b>4. RASPRAVA I REZULTATI</b> .....	29
4.1. ODREĐIVANJE MASENOG UDJELA FENOLNIH SPOJEVA U VODENIM ESKTRAKTIMA NAKON PROVEDENE VODENE DESTILACIJE PO CLAVENGERU .....	30
4.1.1. Fenolni spojevi u vodenim ekstraktima nakon pred tretmana ekstrakcije refluksiranjem .....	30

4.1.2. Fenolni spojevi u vodenim ekstraktima nakon pred tretmana ekstrakcije potpomognute ultrazvukom.....	31
4.2. ETERIČNO ULJE LOVORA .....	32
4.3. FENOLNI SPOJEVI U HIDROLATU .....	32
4.4. FENOLNI SPOJEVI U EKSTRAKTU BILJNOG OSTATKA LOVORA.....	33
4.5. ODREĐIVANJE MASENOG UDJELA FENOLNIH SPOJEVA U VODENIM EKSTRAKTIMA NAKON PROVEDENE VODENE DESTILACIJE PO CLAVENGERU .....	36
4.5.1. Fenolni spojevi u vodenim ekstraktima nakon predtretmana klasične ekstrakcije refluksiranjem.....	36
4.5.2. Fenolni spojevi u vodenim ekstraktima nakon predtretmana ekstrakcije potpomognute ultrazvukom.....	38
4.6. ETERIČNO ULJE LOVORA .....	40
4.7. FENOLNI SPOJEVI U HIDROLATU .....	40
4.8. FENOLNI SPOJEVI U EKSTRAKTU BILJNOG OSTATKA LOVORA.....	41
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>45</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>46</b>

# 1. UVOD

Lovor (*Laurus nobilis* L.) je višegodišnja biljka iz porodice lovora Lauraceae, najviše rasprostranjena na području Mediterana. Tradicionalno se koristi kao začim, ali i u medicinske svrhe zbog svojih antioksidacijskih i antimikrobnih svojstava. Lovor je bogat fenolnim spojevima, u najvećoj mjeri su zastupljeni flavonoidi i fenolne kiseline (Čakmak i sur., 2016), a najznačajniji sastojak lovorovog lista jest njegovo eterično ulje. Na sastav i koncentraciju fenolnih spojeva lovora utječu brojni faktori kao što su metode ekstrakcije, vrsta i polarnost otapala, temperatura, vrijeme ekstrakcije, veličina čestica, omjer i volumen otapala i uzorka. Eterično ulje lista lovora (*Lauri folii aetheroleum*) dobiva se ekstrakcijom iz lista lovora odnosno vodenom destilacijom listova te mu se pripisuju snažna antioksidacijska i antimikrobna svojstva (Mihovilović, 2000).

Cilj ovog istraživanja je bio odrediti utjecaj metoda ekstrakcija na dobiveni udio eteričnog ulja lovora te na maseni udio fenolnih spojeva lista lovora (ukupni fenoli, flavonoidi, hidroksicimetne kiseline i flavonoli). Ispitivan je utjecaj predtretmana enzimima (ksilanaza, celulaza, pektinaza) klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem te ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom na udio eteričnog ulja dobivenog vodenom destilacijom po Clavengeru iz lista lovora, a u vodenim ekstraktima i hidrolatu kao nusproduktu nakon provedene vodene destilacije su spektrofotometrijski određeni maseni udjeli fenolnih spojeva. U biljnim ostacima lovora koji predstavljaju otpad nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru je ispitan utjecaj smjese otapala (etanol-voda (1:1), metanol-voda (1:1), etanol-metanol-voda(1:1:1)) na ekstrakciju fenolnih spojeva te su spektrofotometrijski određeni maseni udjeli ukupnih fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. LOVOR

Lovor (*Laurus nobilis* L.) je višegodišnja biljka iz porodice lovora (Lauraceae), najviše rasprostranjena na području Mediterana. Raste u mediteranskim zemljama kao što su Hrvatska, Grčka, Španjolska, Portugal, Cipar, Italija, Meksiko i Gvatemala. U našim krajevima je rasprostranjena vrsta *L.nobilis* iz roda *Laurus* (Grđinić i Kremer, 2009). Lovor je drvenasta, vazdazelena biljka koja raste kao drvo ili grm. Listovi su zavojito raspoređeni, eliptični do duguljasti, šiljasti ili ušiljena vrha, cijela i često valovita ruba, dugi 7-12 cm, široki 2,5-4,5 cm, kožasti, s gornje strane tamnozeleni i sjajni, s donje zeleni, goli, vrlo aromatični zbog prisutnih žlijezda s eteričnim uljem. Cvjetovi su zelenkasto bijeli, široki oko 1 cm, jednospolni, s četiri listića perigona koji su pri dnu srasli, skupljeni u postrane paštite cvatove. Plod je jednosjemena, kuglasta, crno zelenkasta ili tamnoplava bobica promjera 1-1,5 cm koja dozrijeva u kasnu jesen. Mesnati dio ploda sadrži eterično ulje. U našim krajevima se mnogo uzgaja u nasadima primorskog područja kao ukrasna i začinska biljka. Najbolje raste na svježim, humusno-karbonatnim tlima, ali uspijeva i na suhim tlima. Prilično je osjetljiv na niske temperature (Grđinić i Kremer, 2009).

Osušeni list je dobra sirovina za ekstrakte. Suhi list se sastoji od 7% proteina, 9% masti, 50% ugljikohidrata i 25% sirovih vlakana. Sadrži minerale, vitamine B skupine i askorbinsku kiselinu (Attokaran, 2017).

Lovorovo lišće se može brati tijekom cijele godine zahvaljujući biljci koja je zimzelena. Međutim, kod aromatičnog bilja, lišće se skuplja kad biljke nose cvjetove, a u Hrvatskoj je to od kolovoza do listopada. Berba bi se trebala odvijati u optimalnim uvjetima i izbjegavati visoka vlažnost i kiša jer se time ubrzava propadanje i dolazi do nepoželjne promjene boje što rezultira proizvodom niske kvalitete. Nakon branja lišće se suši čime se razina vlage smanjuje sa 80 % na ispod 10 % kako bi se poboljšala njihova stabilnost (Ambrose i sur., 2016).



Slika 1. (foto:M.Čičak, Flora Croatica baza podataka 2011)

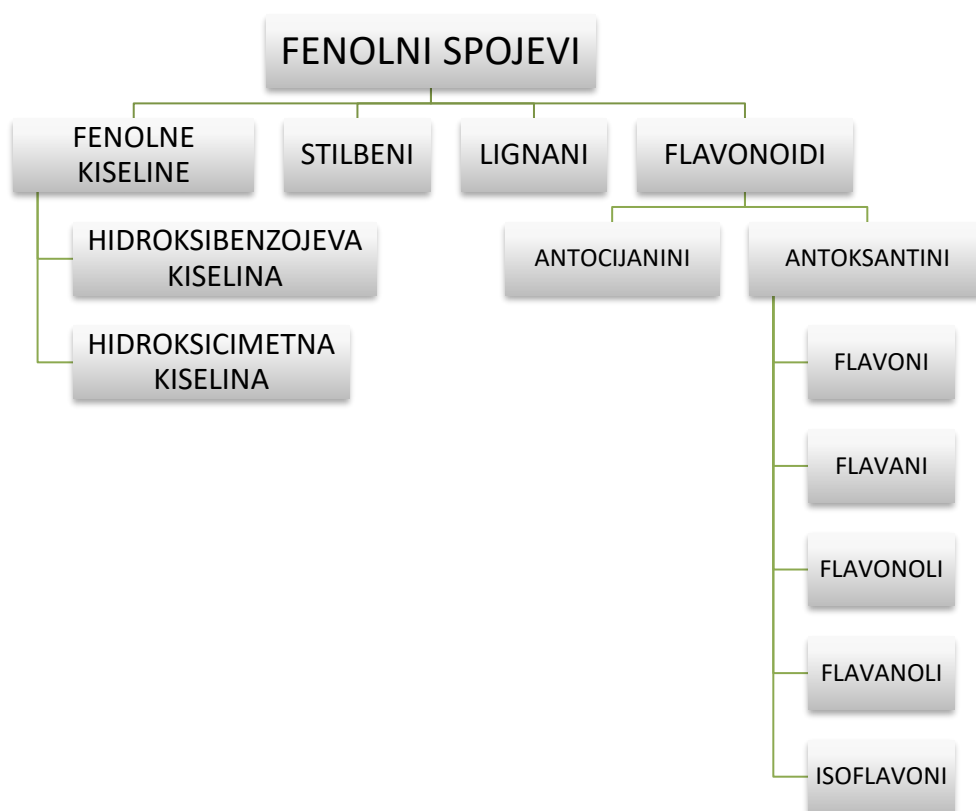
## 2.2. ETERIČNO ULJE LISTA LOVORA

Najznačajniji sastojak lovorovog lista jest njegovo eterično ulje. Eterično ulje lista lovora (*Lauri folii aetheroleum*) dobiva se ekstrakcijom iz lista lovora odnosno vodenom destilacijom listova. Iako metode izolacije imaju određenog utjecaja na konačni sastav eteričnog ulja, također je dokazano da postoji određeni utjecaj zemljopisnog podrijetla lista na njegov kemijski sastav (Pino i sur, 1993). Osušeni listovi lovora daju prosječno 1-3 % eteričnog ulja. Eterično ulje lovora je svjetlo žuta tekućina s karakterističnom aromatičnom i začinskom aromom. Glavni sastojak eteričnog ulja je 1,8-cineol, zbog kojeg ima miris nalik eukapliptusu, a osim njega sadrži i treslovine te gorke tvari (Dudaš i Venler, 2009). Topljiv je u većini fiksiranih ulja, kao što je mineralno ulje te u propilen glikolu, dok je netopivo u glicerinu. U eteričnom ulju lovora prisutni su i linalool, eugenol,  $\alpha$ -terpinil acetat, sabinen,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen i metil eugenol (Boulila i sur., 2015). Upravo zbog svog kemijskog sastava i visokog udjela navedenih spojeva eteričnom ulju lovora se pripisuje snažno antioksidacijsko djelovanje (Boulila i sur., 2015; Mihovilović, 2000). Lovor je vrlo popularan začim u Europi i Sjevernoj Americi, te se eterično ulje sve više koristi kao dodatak prerađenoj hrani kao što su prahovi za juhe, u preljevima i umacima (Attokaran, 2011).

## 2.3. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi su jedna od najvećih i najrasprostranjenijih skupina sekundarnih metabolita u biljkama. Imaju ulogu zaštite bilja od insekata, zaštitu od UV zračenja, pigmentacije, privlačenja oprašivača i raspršivača sjemena te su uključeni u mnoge funkcije biljaka. Iako se ne klasificiraju kao bitne hranjive tvari, imaju značajni zdravstveni doprinos u ljudskom tijelu.

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti sastavljeni od aromatskog prstena koji ima vezanu jednu ili više hidroksilnih skupina (Shahidi i Yeo, 2016). Identificirano je više od 8000 različitih fenolnih spojeva.



Slika 2. Podjela fenolnih spojeva (Han i sur., 2007)

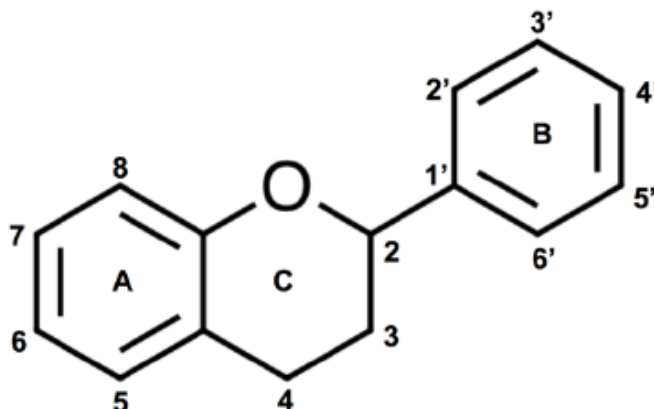
Ovisno o njihovoj strukturi, fenolni spojevi pokazuju širok raspon svojstava. Osim ako nisu u potpunosti esterificirani, eterificirani ili glikozilirani, fenolni spojevi su topljivi u polarnim organskim otapalima. Uz nekoliko iznimaka, topljivost u vodi raste sa brojem prisutnih hidroksilnih grupa (Belščak-Cvitanović i sur, 2018). Fenolni spojevi su poznati i kao biljni pigmenti (naročito antocijani) te su odgovorni za različite nijanse od svijetlo crvene do tamno

plave i ljubičaste boje. Isparljivi fenolni spojevi, poput npr. vanilina izraziti su nosioci intezivnih aroma (Belščak-Cvitanović i sur., 2018).

### 2.3.1. Flavonoidi

Flavonoidi su najveća grupa fenolnih spojeva u prirodi, čak više od 6000 fenolnih spojeva čine flavonoidi. Flavonoidi uz klorofile i karotenoide predstavljaju jedne od najčešćih pigmentata, a i njihovo ime potječe od riječi *flavus* (od grčkog, što znači žuto) što ukazuje da su mnogi predstavnici žuti biljni pigmenti. Nalaze se u raznim dijelovima biljke kao što su list, cvijet, sjemenka, bobica, kora i korijen. Osnovnu strukturu flavonoida čini difenilpropan ( $C_6-C_3-C_6$ ) u kojoj su dva benzenska prstena (A i B) povezana piranskim prstenom (C) koji ima vezan kisik (Teixeira i sur., 2013). Oni koji su zastupljeni u hrani razlikuju se po povezanosti B i C prstena, ali i prema stupnju nezasićenosti, stupnju oksidacije i prema broju i položaju hidroksilnih, metoksilnih i glikozidnih skupina skupine u C prstenu. Prema tome, glavne skupine flavonoida su flavoni, flavonoli, flavan-3-oli, izoflavoni, flavanoni te antocijanidini (Nollet & Gutierrez-Uribe, 2018).

Flavonoidi i njegovi konjugati imaju značajnu biokemijsku i fiziološku ulogu u raznim biljkama. Antocijani doprinose boji cvijetu koja je važna za privlačenje životinja i insekata za njeno oprašivanje i širenje sjemena. Također djeluju i kao metaboliti stresa zbog ranjavanja, nedostatka hranjivih tvari, ekstremno hladnog okruženja ili kao potencijalni uništavači slobodnih radikala te za zaštitu od UV zračenja (Miranda i sur., 2012).



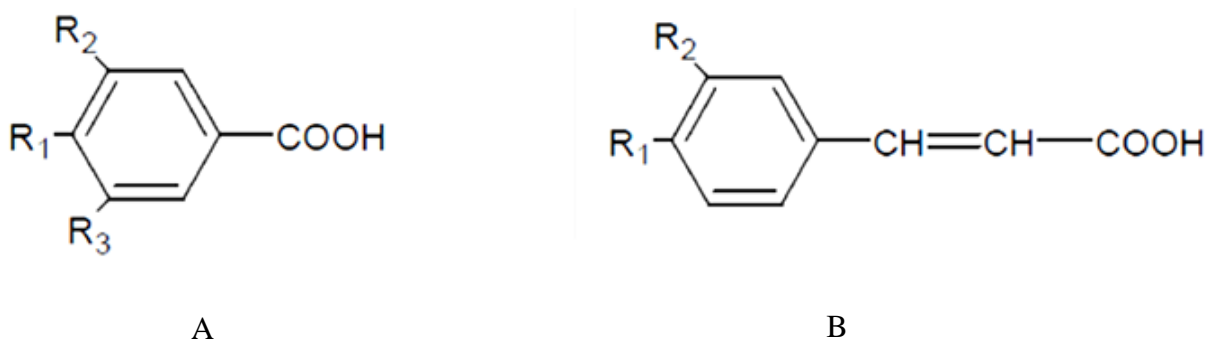
Slika 3. Osnovna struktura flavonoida (Teixeira i sur., 2013)

### 2.3.1.1. Flavonoli

Flavonoli imaju nezasićenu vezu između drugog i trećeg C atoma na C prstenu te je na trećem C atomu prstena vezana i hidroksilna skupina. Flavonoli poput mircetina, kvercetina, isorhamnetina i kampferola obično se pojavljuju kao *O*-glikozidi. Konjugacija se najčešće javlja na položaju trećeg C atoma prstena, ali supstitucije se također mogu pojaviti i na 5, 7, 4', 3' i 5' položajima ugljikovog prstena (Veberič, 2010). Flavonoli su najraširenija podskupina flavonoida, prisutni su u gotovo svim vrstama voća. Imaju važnu ulogu u biljnom svijetu jer su odgovorni za boju, okus, štite od oksidacije masti, zaštitu vitamina i enzima te služe kao zaštita od UV zračenja i parazita. Biološka i farmakološka svojstva flavonola ovise o njihovoj kemijskoj strukturi, poput prisutnosti hidroksilne grupe, supstituciji funkcionalne skupine i dvostruke veze između C<sub>2</sub> i C<sub>3</sub> atoma (Sharma i sur, 2018).

### 2.3.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline dijelimo na hidroksibenzojeve kiseline i hidroksicimetne kiseline (Chen i sur, 2019). Hidroksibenzojeve kiseline imaju osnovnu C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> strukturu, a u tu skupinu spadaju *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, protokatehinska, salicilna, galna, siringinska i gentizinska kiselina.



Slika 4. Osnovne strukture hidroksibenzojevih (A) i hidroksicimetnih (B) kiselina (Bravo i sur., 2013)



Hidroksicimetne kiseline imaju osnovnu C6-C3 strukturu. U prirodi se rijetko pojavljuju kao slobodne kiseline, uglavnom dolaze u konjugiranim oblicima te kao esteri. Najčešće su ferulinska, sinapinska, kafeinska, *p*-kumarinska (Robbins, 2003). Zbog svoje antioksidativne, antimikrobne i antikancerogene i aktivnosti pozitivno djeluju na zdravlje ljudi (Chen i sur., 2019).

### 2.3.3. Fenolni spojevi lovora

Lovor je bogat fenolnim spojevima, koji se nalaze u svim dijelovima biljke. Najzastupljeniji fenolni spojevi su: epikatehin, procijanidin dimer i trimer, flavonoidi (kvercetin, izorhamnetin, kampferol, luteolin, rutin i njihovi derivati) te flavonoli i flavon, zatim fenolne kiseline (vanilinska, kafeinska, ferulinska, *p*-kumarinska i 2-hidroksicimetna kiselina) (Boulila i sur., 2005). Također, bogat je tokoferolima odnosno njihovim izomerima ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) koji skupa s ostalim spojevima doprinose antioksidativnim i antimikrobnim svojstvima lovora (Cakmak i sur., 2016).

## 2.4. METODE EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA

Ekstrakcija je početni i najvažniji korak u izolaciji različitih vrsta biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala. Metode ekstrakcije mogu se podijeliti u konvencionalne i napredne metode. Konvencionalne metode ekstrakcije uključuju ekstrakciju Soxhletom, maceraciju i vodenu destilaciju, a karakteriziraju ih visoka temperatura, potrošnja velike količine otapala, dugotrajno ekstrahiranje pri čemu dolazi do isparavanja velike količine otapala. Cilj naprednih metoda ekstrakcije je koristiti manje ekološki prihvatljiva otapala, ušteda energije, sprječavanje zagađenja i proizvodnja čistih proizvoda s manje derivata. Neke od naprednih metoda ekstrakcije koje se sve više koriste su: ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija superkritičnim plinovima, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija visokim tlakom te enzimski potpomognuta ekstrakcija (Sahne i sur., 2016). Navedenim tehnikama se postiže bolja kontrola uvjeta ekstrakcije, naročito vremena trajanja ekstrakcije.

Glavni ciljevi postupka ekstrakcije povezani su s jednim ili više važnih svojstava:

- visoki prinos
- visoka selektivnost/čistoća: dobiveni ekstrakt ima malu količinu interferirajućih ili nepoželjnih spojeva
- visoka osjetljivost
- niska granica detekcije/kvantifikacije

Na učinkovitost ekstrakcije osim primjene same tehnike veliki utjecaj ima izbor otapala, temperatura, vrijeme ekstrakcije, veličina čestica, omjer otapalo/kruta tvar te broj koraka ekstrakcije (Rostagno, 2013; Mussatto i sur., 2011). Stoga je vrlo važno optimizirati uvjete ekstrakcije kako bi se povećala učinkovitost.

Ipak, od navedenih faktora, dva su bitnija koja treba uzeti u obzir prilikom ekstrakcije, a to su temperatura i vrijeme trajanja ekstrakcije. Temperatura ima značajan učinak na proces ekstrakcije jer dolazi do promjene svojstava otopljenih tvari i otapala. Temperatura utječe na topljivost i propusnost otopljenih tvari te na viskozitet i površinsku napetost tekućina (Rostagno, 2013).

Vrijeme ekstrakcije je parametar koji je izravno povezan s temperaturom. Iako produljenje postupka povećava prinos, produljena izloženost biljnog materijala visokim temperaturama može dovesti do degradacije spojeva (Rostagno, 2013). Dakle, kod ekstrakcije biljnog materijala poželjno je koristiti manje agresivne uvjete, što kraće vrijeme ekstrakcije pri nižim temperaturama u svrhu postizanja maksimalnog ekstrakcijskog kapaciteta (Myint i sur., 1995).

#### 2.4.1. Klasična ekstrakcija otapalima

Klasična ekstrakcija otapalima je najčešće upotrebljavana tehnika pripreme ekstrakta iz biljnog materijala zbog svoje jednostavnosti i učinkovitosti te široke primjenjivosti. Prilikom odabira otapala treba uzeti u obzir određene karakteristike kao što su (Rostagno, 2013):

- reaktivnost - otapalo ne smije reagirati s ciljnim spojevima
- kemijska i termička stabilnost

- selektivnost
- viskozitet - treba biti niska
- točka vrelišta - niska točka vrenja zahtjeva i nisku energiju za uklanjanje ekstrakta
- zapaljivost - treba izbjegavati zapaljiva otapala
- toksičnost
- ekonomski aspekt

Uzimajući u obzir sve aspekte, ne postoji univerzalno otapalo za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala, jer topljivost fenolnih spojeva ovisi o kemijskoj strukturi spojeva koji se ekstrahiraju i polarnosti ekstrakcijskog otapala.

Najčešće korištena otapala za izolaciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala su voda, etanol (Altiok i sur., 2008; Wang i sur., 2009; Ross i sur., 2009; Naczk i Shahidi, 2004), metanol (Robards i Antolovich, 1997; Ross i sur., 2009; Naczk i Shahidi, 2004) i aceton sa različitim udjelima vodene faze u organskoj (Robards i Antolovich, 1997; Naczk i Shahidi, 2006) te etil-acetat i dietil-eter. Navedena otapala i njihove vodene otopine su se pokazale vrlo učinkovitim za izolaciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala.

Primjenom vodenih otopina etanola i acetona se postiže veći ekstrakcijski kapacitet izolacije fenolnih spojeva nego primjenom čistih otapala. Altiok i sur. (2008) su proveli istraživanje u kojem su koristili etanol i aceton te njihove vodene otopine za ekstrakciju fenola iz lišća masline te je uspoređivan ukupan sadržaj fenola u ekstraktu lišća masline u različitim ekstrakcijskim sustavima. Ukupni udio fenola u 70% vodenoj otopini etanola je bio nešto viši nego u 90 % vodenoj otopini acetona. Osim što se dobila veća količina ukupnih fenola, etanol je bolji izbor zbog svoje manje toksičnosti, ekološki je sigurniji te je jeftini. Dent i sur. (2013) su proveli istraživanje utjecaja vodenih otopina etanola i acetona od 30, 50 i 70% na ekstrakcijski kapacitet izolacije fenolnih spojeva iz kadulje, varirajući vrijeme trajanja ekstrakcije (30, 60 i 90 minuta) i temperaturu (60 i 90 °C). Najbolji rezultat su postigli primjenom 30% vodenih otopina etanola i acetona pri 60 °C kroz 30 minuta ekstrakcije u vodenoj kupelji. Ovi rezultati pokazuju da prilikom ekstrakcije voda doprinosi većem ekstrakcijskom kapacitetu izolacije fenolnih spojeva jer povećava proces difuzije i olakšava ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog tkiva.

Provedena su i druga istraživanja (Areias i sur. 2000; Wang i sur., 2007; Tomson i sur., 2012) kojima je zaključeno da se binarnim sustavom otapala postiže učinkovitija ekstrakcija fenolnih spojeva nego sa mono sustavima otapala.

#### 2.4.2. Enzimima potpomognuta ekstrakcija

Enzimima potpomognuta ekstrakcija se koristi u svrhu poboljšanja ekstrakcijskog kapaciteta izolacije biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala. Enzimi se koriste kao pred tretman obrade biljnog materijala, prije uobičajenih metoda ekstrakcije, radi postizanja boljeg prinosa i kvalitete sastojaka. Ima dobre učinke zbog visoke specifičnosti, blagih reaktivnih uvjeta i maksimalnog očuvanja originalne djelotvornosti aktivnih spojeva. Ekstrakcija potpomognuta enzimima temelji se na sposobnosti enzima da hidroliziraju stanice stijenke i narušavaju integritet stijenke biljne stanice u blagim procesnim uvjetima, što omogućava učinkovitu ekstrakciju i oslobađanje biološki aktivnih spojeva (Kumar i sur., 2017). Kada se enzimi i supstrati vežu zajedno, oblik molekule enzima se mijenja u oblik pogodan za interakciju između enzima i supstrata. Promjena oblika supstrata rezultira naprezanjem i stresom supstrata uzrokujući pucanje veza.

Enzimi se klasificiraju se u slijedeće vrste: hidrolaze, transferaze, oksidoreduktaze, ligaze, liaze i izomeraze. Na temelju njihovog svojstva da kataliziraju određene reakcije, određeni enzim djeluje na specifični supstrat (Cheng i sur., 2015). Biljne stanice sadrže polisaharide poput celuloze, hemiceluloze i pektina koji djeluju kao prepreka oslobađanju intracelularnih tvari. Za optimalnu aktivnost enzima treba voditi računa o uvjetima reakcije, kao što je temperatura, vrijeme, pH, koncentracija i veličina čestica supstrata (Cheng i sur., 2015). Odabir odgovarajućeg enzima ili optimalne mješavine enzima također je bitno za postizanje očekivanog rezultata (Wijesinghe i Jeon, 2012). Iako svaki enzim za sebe ima dobro djelovanje i povećava učinkovitost ekstrakcije, istraživanja su ipak pokazala kako kombinacija određenih enzima ima značajno veće povećanje učinka na prinos ekstrakcije u odnosu na upotrebu svakog enzima zasebno (Ghandahari i sur., 2018).

### 2.4.3. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je brza tehnika netermičke ekstrakcije koja u odnosu na klasičnu ekstrakciju nudi visoku ponovljivost u kratkom vremenu uz pojednostavljeno upravljanje, smanjenu potrošnju otapala te nižu energiju.

Ekstrakcija ultrazvukom koristi se za dobivanje fenolnih spojeva iz biljaka koristeći etanol, mješavine etanola i vode, vode i acetona te drugih otapala.

Može se provoditi u ultrazvučnoj kupelji ili primjenom uređaja određene snage i frekvencije ultrazvuka primjenom sonde direktno uronjene u medij koji želimo ekstrahirati. Iako se ultrazvučne kupelji više koriste, imaju dva glavna nedostatka koja značajno smanjuju eksperimentalnu ponovljivost i obnovljivost. To su nedostatak uniformiranosti u raspodjeli ultrazvučne energije i pad snage s vremenom. Ultrazvučne sonde imaju prednost u odnosu na ultrazvučnu kupelj u tome što fokusiraju svoju energiju na lokaliziranu zonu uzorka, na taj način osiguravajući učinkovitiju kavitaciju u tekućini (Luque-Garcia & Luque de Castro, 2003).

Ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka može povećati učinkovitost ekstrakcije, olakšavajući prodiranje otapala u biljni materijal i omogućava otpuštanje unutar staničnih tvari. Također, ultrazvuk miješa otapalo koje se koristi za ekstrakciju čime se povećava kontaktna površina između otapala i ciljanih spojeva, dopuštajući veću penetraciju otapala u uzorak. Stoga ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom smanjuje vrijeme ekstrakcije, kao i potrošnju otapala (Shalmashi, 2009).

Važan dio ultrazvučne obrade je cjelovita optimizacija procesa. Frekvencija (kHz), amplituda (%), primijenjeni ciklus (%), izlazna snaga (W) i geometrijski parametri sonde (duljina i promjer-mm) su čimbenici koje treba pažljivo pripremiti i uzeti u obzir (Dent i sur., 2015). Djelovanje ekstrakcije ultrazvukom pripisano je širenjem ultrazvučnih valova što rezultira pojavom kavitacije. Visoke sile smicanja uzrokuju povećanu masu prijenosa ekstrakta. Mehanizam ultrazvuka u tekućinama oslanja se na mehanički učinak uzrokovan implozijom kavitacijskih mjehurića. Tijekom implozije kavitacijskih mjehurića malih veličina, stvaraju se snažne sile smicanja, dok visoki tlakovi i temperature nastale kao posljedica pucanja mjehurića uzrokuju uništavanje biljnog tkiva i omogućuju oslobađanje staničnog materijala i poboljšani prijenos mase (Vilkhu i sur., 2007). Prednosti ultrazvuka za prehrambenu industriju uključuju: a) sveukupno povećanje prinosa i brzine ekstrakcije, b) poboljšanje

vodenog postupka ekstrakcije gdje se otapala ne mogu koristiti, c) pružanje mogućnosti korištenja alternativnih otapala poboljšanjem njihovog ekstrakcijskog djelovanja, d) omogućavanje zamjene jeftinijih izvora sirovih proizvoda uz održavanje biološki aktivne razine, e) povećanje ekstrakcije osjetljive na toplinu u komponentama u uvjetima u kojima bi u protivnom imali male ili neprihvatljive prinose (Vilkhu i sur., 2007).

## **2.5. CLEVINGER VODENA DESTILACIJA**

Vodena destilacija po Clavengeru je najčešće korištena metoda za izolaciju eteričnih ulja u biljci. Vodena destilacija zahtjeva duže vrijeme ekstrakcije što rezultira većim troškovima i može izazvati hidrolizu nekih sastojaka eteričnih ulja što rezultira nižim prinosima i gubicima lako hlapljivih spojeva uslijed dugotrajnog zagrijavanja (Pingret i sur., 2012).



Slika 5. Aparatura za Calvenger vodenu destilaciju (vlastita fotografija)

## **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **3.1. MATERIJAL**

List lovora je ubran na području Dalmacije tijekom kolovoza 2018. godine. Nakon branja je osušen i skladišten na suhom i tamnom mjestu u propilenskim vrećicama. Neposredno prije provođenja analiza je samljeven.

### **3.2. KEMIKALIJE I STANDARDI**

#### **Kemikalije za postupak ekstrakcije**

- Etanol (96 %, v/ v)
- Metanol (100%, v/ v)
- Deionizirana voda

#### **Kemikalije i standardi za spektrofotometrijsko određivanje**

- Folin-Ciocalteu reagens
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %, w/ v)
- Standard galne kiseline ( $\gamma=5 \text{ g L}^{-1}$ )
- Etanol (96 %, v/ v)
- Metanol (100, v/ v)
- Aluminijev klorid (10 %, w/ v)
- Kalijev acetat ( $c=1 \text{ M}$ )
- Standard kvercetina ( $\gamma=100 \text{ mg L}^{-1}$ )
- Koncentrirana klorovodična kiselina (37 %, v/ v)
- Standard kafeinske kiseline ( $\gamma=100 \text{ mg L}^{-1}$ )



## Reagensi za određivanje ukupnih fenola

- **Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)**

FC reagens se razrijedi deioniziranom vodom u omjeru 1:2.

- **Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %, w/ v)**

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.

- **Standard galne kiseline ( $\gamma=5 \text{ g L}^{-1}$ )**

Priprema: Odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj ladici za vaganje te se pomoću 10 mL 96%-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni deioniziranom vodom.

## Reagensi za određivanje flavonoida

- **Etanol (96%, v/ v)**

- **Metanol (100%, v/ v)**

- **Aluminijev klorid (10 %, w/ v)**

Priprema: 1 g aluminijev klorida (aluminijski klorid-heksahidrat) otopi se sa 5 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- **Kalijev acetat ( $c=1 \text{ M}$ )**

Priprema: 9,845 g kalijevog acetata otopi se u 10 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- **Standard kvercetin ( $\gamma=100 \text{ mg L}^{-1}$ )**

Priprema: Odvaži se 5 mg standarda kvercetina u plastičnoj ladici za vaganje te se pomoću 5 mL 100%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 50 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom. Iz alikvotne otopine priprede se redom razrijeđenja od 10, 25, 50 i 75 mg L<sup>-1</sup>.

## Reagensi za određivanje hidroksicimetnih kiselina i flavonola

- **Koncentrirana klorovodična kiselina** (37 %, v/ v)
- **Etanol** (96%, v/ v)
- **Klorovodična otopina** ( $\gamma=1 \text{ g L}^{-1}$ )  
Priprema: 0,227 mL koncentrirane 37%-tne klorovodične kiseline se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni 96%-tnim etanolom do oznake.
- **Klorovodična otopina** ( $\gamma=2 \text{ g L}^{-1}$ )  
Priprema: 0,454 mL koncentrirane 37%-tne klorovodične kiseline se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- **Standard kafeinske kiseline** ( $\gamma=100 \text{ mg L}^{-1}$ )  
Priprema: Odvažuje se 5 mg standarda kafeinske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 80%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 50 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni 80%-tnim metanolom.
- **Standard kvercetina** ( $\gamma=100 \text{ mg L}^{-1}$ )  
Priprema: Odvažuje se 5 mg standarda kvercetina u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 50 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni 80%-tnim metanolom.

### 3.3. APARATURA I PRIBOR

- Ultrazvučna sonda (UP200Ht, Hulscher, 200)
- Magnetska mješalica (MS-H-S, DLAB)
- Spektrofotometar (Perkin-Elmer)
- Vortex (Fuse T, VELP Scientifica)
- Analitička vaga (GR-200-EC, A&D Instruments Ltd.)
- Clavenger aparatura
- Termometar
- Staklene kivete
- Mikropipeta 100 i 1000  $\mu\text{L}$

- Pipete volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL
- Odmjerne tikvice volumena 100 mL (6 komada) i 1000 mL
- Plastična ladica za vaganje

### 3.4. METODE RADA

#### 3.4.1. Izolacija eteričnog ulja lovora uz predtretmane

Samljeveni listići lovora su korišteni za dobivanje eteričnog ulja i ekstrakciju fenolnih spojeva. Vodena destilacija samljevenih listića lovora provedena je metodom po Clavengeru nakon prethodno primjenjenih predtretmana odnosno različitih vrsta ekstrakcije. Predtretmani koji su prethodili vodenoj destilaciji po Clavengeru su:

- a) Klasična ekstrakcija fenolnih spojeva iz listića lovora primjenom vode kao otapala na temperaturi 40 °C kroz 60 minuta,
- b) Ekstrakcija listića lovora uz predtretman enzimima (ksilanaza, pektinaza, celulaza),  $\gamma=0,02 \text{ g L}^{-1}$  primjenom vode kao otapala na temperaturi 40 °C kroz 60 minuta,
- c) Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom s direktno uronjenom ultrazvučnom sondom u biljni uzorak listića lovora primjenom vode kao otapala pri optimalnim uvjetima ekstrakcije ( $A=30\%$ ,  $t=10$  minuta), te
- d) Ekstrakcija listića lovora uz predtretman enzimima (ksilanaza, pektinaza, celulaza), ( $\gamma=0,02 \text{ g L}^{-1}$ ) primjenom direktno uronjene ultrazvučne sonde u biljni uzorak listića lovora primjenom vode kao otapala ( $A=30\%$ ,  $t=10$  minuta).

Nakon provedenih predtretmana pri optimalnim uvjetima ekstrakcije potpomognute ultrazvukom u svim uzorcima je provedena vodena destilacija po Clavengeru u svrhu dobivanja eteričnog ulja lovora.

Predtretmanu koji je proveden uz primjenu ultrazvuka prethodila je optimizacija uvjeta ekstrakcije za svako otapalo (odabir optimalne amplitude i vremena ekstrakcije) na način opisan u poglavlju 3.4.1.3. Nakon provedene vodene destilacije dobiveno je eterično ulje koje je odvojeno za daljnje analize (GC/MS analiza i ispitivanje inhibicijske aktivnosti prema patogenim oomicetama), te nusprodukti (hidrolat i biljni ostatak nakon vodene destilacije) koji su također bili predmet daljnjih istraživanja:

- a) Biljni ostatak nakon vodene destilacije je ekstrahirano primjenom otapala različite polarnosti (etanol-voda (1:1), metanol-voda (1:1), etanol-metanol-voda (1:1:1)) pri optimalnim uvjetima ekstrakcije potpomognute ultrazvukom ( $A=30\%$ ,  $t=10$  minuta).
- b) U ekstraktima dobivenim iz biljnog ostatka spektrofotometrijski su određeni maseni udjeli fenolnih spojeva (ukupni fenoli, hidroksicimetne kiseline, flavonoli i flavonoidi), dok su u hidrolatu određeni ukupni fenoli.

#### *3.4.1.1. Klasična ekstrakcija refluksiranjem*

Odvažuje se 20 g uzorka prethodno usitnjenih listića lovora u Erlenmeyerovu tikvicu i dodaje se 250 mL pročišćene vode. Sadržaj tikvice se dobro promiješa te se provodi klasična ekstrakcija uz refluks pri  $40^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 60 minuta. Po završetku ekstrakcije sadržaj tikvice se prenese u okruglu tikvicu od 500 mL i sve zajedno se stavi na vodenu destilaciju po Clavengeru u svrhu dobivanja eteričnog ulja.

#### *3.4.1.2. Ekstrakcija uz predtretman enzimima*

Ekstrakcija uz predtretman enzimima (ksilanaza, celulaza, pektinaza) je provedena neposredno prije provođenja vodene destilacije po Clavengeru. U Erlenmeyerovu tikvicu odvažuje se 5 mg enzima u 250 mL pročišćene vode te se odvažuje 20 g uzorka prethodno samljevenih listića lovora. Sadržaj tikvice se dobro promiješa te se provodi predtretman enzimima na vodenoj kupelji pri  $40^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 60 minuta. Po završetku predtretmana enzimima na vodenoj kupelji sadržaj tikvice se prenese u okruglu tikvicu od 500 mL i sve zajedno se stavi na vodenu destilaciju po Clavengeru u svrhu dobivanja eteričnog ulja.

#### *3.4.1.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom*

U prvoj fazi istraživanja provedena je ekstrakcija listića lovora primjenom uređaja s direktno uronjenom ultrazvučnom sondom, primjenom vode kao otapala. Varirane su amplitude od 30,

50 i 100 % te vrijeme ekstrakcije od 5, 10 i 15 minuta dok je ciklus konstantan-1. U dobivenim ekstraktima su određeni ukupni fenoli te je na temelju dobivenih vrijednosti odabrana optimalna amplituda od 30 % te vrijeme ekstrakcije od 10 minuta koje će se koristiti u daljnjim ekstrakcijama.

*U drugoj fazi istraživanja* provedena je ekstrakcija listića lovora primjenom uređaja s direktno uronjenom ultrazvučnom sondom primjenom vode kao otapala pri optimalnim uvjetima ekstrakcije (A=30%, t=10 minuta). Nakon završene ekstrakcije, uzorak je prenesen u okruglu tikvicu od 500 mL i provedena je vodena destilacija po Clavengeru.

*U trećoj fazi istraživanja* je neposredno prije provođenja vodene destilacije po Clavengeru proveden pred tretman enzimima (ksilanaza, celulaza, pektinaza), na način da je odvagano 5 mg enzima u 250 mL pročišćene vode i dodano je 20 g samljevenih listića lovora te je provedena ekstrakcija primjenom ultrazvučne sonde pri optimalnim uvjetima ekstrakcije (A=30%, t=10 min). Nakon završene ekstrakcije, uzorak je prenesen u okruglu tikvicu od 500 mL i provedena je vodena destilacija po Clavengeru.

#### *3.4.1.4. Clavenger vodena destilacija*

Odvaži se 20 g uzorka u okruglu tikvicu od 500 mL i doda se 250 mL pročišćene vode. Sadržaj se zagrijava te se vodena destilacija provodi u aparaturi po Clavengeru kroz 2 sata uz praćenje temperature. Nakon završene vodene destilacije, uzorak se ostavi hladiti 30 minuta i nakon toga se odvoji eterično ulje i hidrolat koji se skladište na hladnom i tamnom mjestu do provođenja daljnjih analiza. Biljni ostatak se profiltrira i ostavi sušiti na zraku do provođenja daljnjih analiza, a vodeni ekstrakt se skladišti u zamrzivaču na -18 °C.

#### *3.4.1.5. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom biljnog ostatka listića lovora*

Provedena je ekstrakcija fenolnih spojeva iz biljnog ostatka lovora dobivenog nakon provedene vodene destilacije primjenom ultrazvučne sonde na način da su za svako otapalo određeni optimalni uvjeti ekstrakcije. Odvaže se 1 g biljnog ostatka lovora u suhu čašu i doda se 25 mL otapala (etanol-voda (1:1), metanol-voda (1:1), etanol-metanol-voda (1:1:1)) te se sadržaj čaše dobro promiješa i provodi se ekstrakcija primjenom uređaja s direktno uronjenom ultrazvučnom sondom. Varirane su amplitude od 30, 50 i 100 % te vrijeme ekstrakcije od 5, 10 i 15 minuta dok je ciklus konstantan-1. U dobivenim ekstraktima su određeni ukupni fenoli te je na temelju dobivenih vrijednosti odabrana optimalna amplituda 30 % te vrijeme ekstrakcije od 10 minuta za sva korištena otapala koje će se koristiti u daljnjim ekstrakcijama.

Postupak ekstrakcije primjenom ultrazvučne sonde svih biljnih ostataka nakon provedene vodene destilacije provodi se pri optimalnim uvjetima ekstrakcije ( $A=30\%$ ,  $t=10$  min) u ultrazvučnoj komori na način da se odvaže 1 g uzorka i doda 25 mL otapala (etanol-voda (1:1), metanol-voda (1:1), etanol-metanol-voda (1:1:1)). Nakon završene ekstrakcije dobiveni ekstrakt lovora se profiltrira preko lijevka i filter papira (Papir crna vrpca Munktell 125 mm/388, Filtrak, Germany) u odmjernu tikvicu od 25 mL i nadopuni do oznake otapalom korištenim za ekstrakciju. Priređeni ekstrakti su čuvani u zamrzivaču pri temperaturi od  $-18$  °C do provođenja analiza. Rade se dva paralelna određivanja.

#### 3.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva u lovoru

Određivanje fenolnih spojeva je provedeno u ekstraktima lovora dobivenim nakon provedene ekstrakcije potpomognute ultrazvukom u svrhu određivanja optimalnih uvjeta ekstrakcije primjenom ultrazvučne sonde, zatim u vodenim ekstraktima nakon provedene vodene destilacije te u hidrolatima. Također, maseni udjeli fenolnih spojeva određeni su u ekstraktima dobivenim iz biljnog ostatka primjenom otapala različite polarnosti, nakon provedene vodene destilacije.

### 3.4.2.1. *Određivanje ukupnih fenola*

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

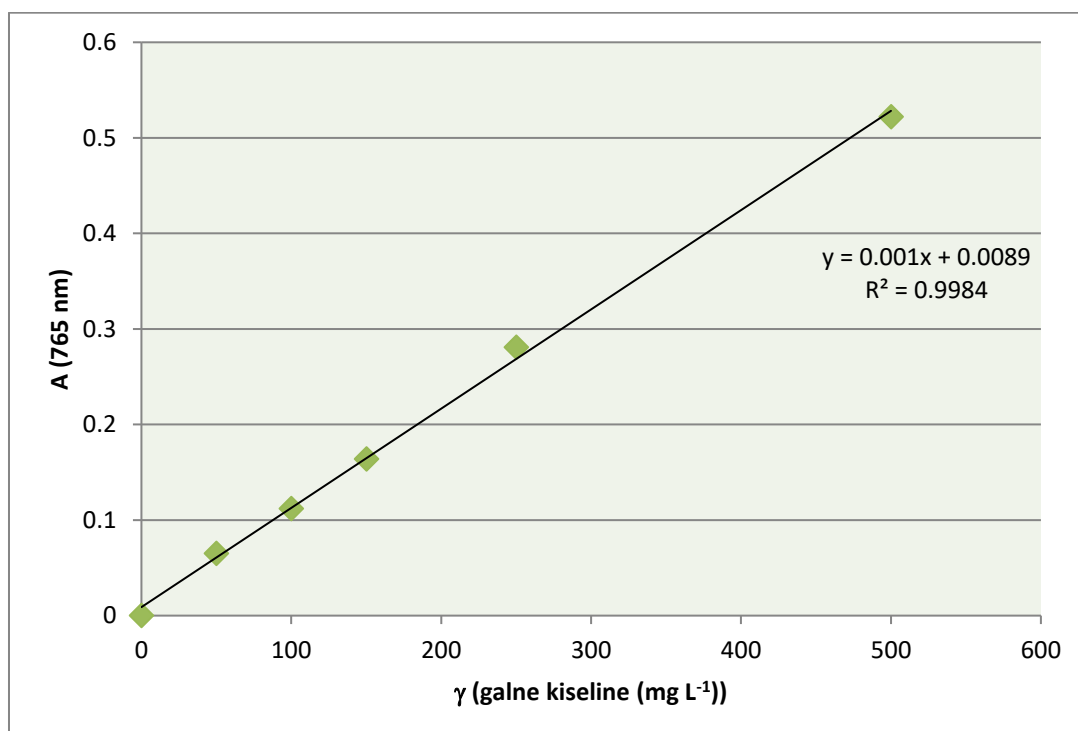
#### **Izrada baždarnog pravca za ukupne fenole**

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se standardna otopina galne kiseline, masene koncentracije  $5 \text{ g L}^{-1}$ . Od standardne otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da koncentracije standardnih otopina galne kiseline iznose 50, 100, 150, 250, 500  $\text{mg L}^{-1}$ . Iz svake tikvice otpipetira se 125  $\mu\text{L}$  otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 7,5 mL destilirane vode, 625  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa te nakon 3 minute doda se 1875  $\mu\text{L}$  zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa, a potom uzorci stoje u mraku 2 h. Za slijepu probu se uzima 125  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri 765 nm o masenoj koncentraciji galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ ) pomoću programa Microsoft Excel.

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 125  $\mu\text{L}$  ekstrakta (prethodno razrijeđenog), 7,5 mL deionizirane vode, 625  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa te nakon 3 minute doda se 1875  $\mu\text{L}$  zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa i potom uzorci stoje u mraku 2 h. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

Tablica 1. Masene koncentracija individualnih standardnih otopina galne kiseline i pripadajuće vrijednosti apsorbancija izmjerene spektrofotometrom pri valnoj duljini od 765 nm

$\gamma(\text{mg L}^{-1})$	A
0	0
50	0,065
100	0,112
150	0,164
250	0,281
500	0,522



Slika 6. Baždarni pravac galne kiseline



### 3.4.2.2. *Određivanje ukupnih flavonoida*

Određivanje ukupnih flavonoida provodi se spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na kolornoj reakciji flavonoida s aluminijevim kloridom i kalijevim acetatom te mjerenjem nastalog inteziteta obojenja pri 415 nm (Chang i sur, 2002).

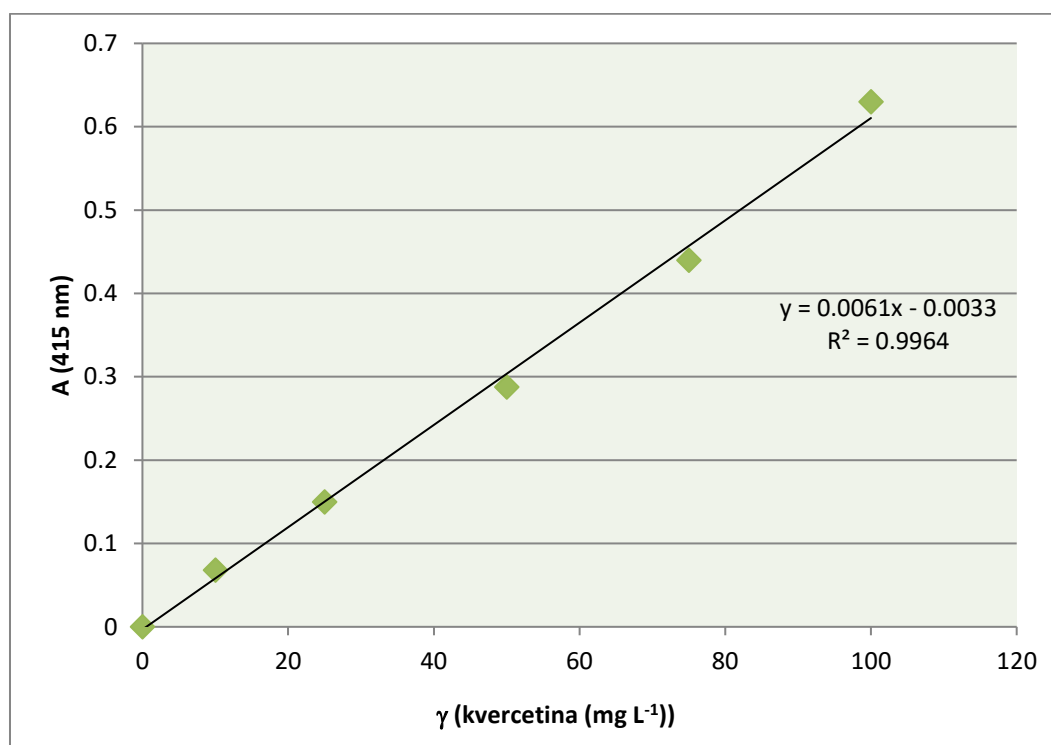
#### **Izrada baždarnog pravca za flavonoide**

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se otopina standarda kvercetina, masene koncentracije  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Od standardne otopine kvercetina rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da koncentracije standardnih otopina kvercetina iznose 10, 25, 50 i  $75 \text{ mg L}^{-1}$ . Također se za analizu uzima i alikvotna otopina standarda koncentracije  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Iz svake tikvice otpipetira se redom 0,5 mL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 1,5 ml 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10 %-tnog aluminijeva klorida, 0,1 mL 1M kalijeva acetata i 2,8 mL destilirane vode. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa, a potom uzorci stoje u mraku 30 min. Za slijepu probu se uzima 0,5 mL 100%-tnog metanola te se umjesto 10%-tnog aluminij klorida dodaje 0,1 mL destilirane vode. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 415 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri 415 nm o masenoj koncentraciji kvercetina ( $\text{mg L}^{-1}$ ) pomoću programa Microsoft Excel.

Ekstrakti se prije analize trebaju razrijediti otapalom korištenim za ekstrakciju. U staklenu epruvetu otpipetira se redom 0,5 mL ekstrakta, 1,5 mL 96 %-tnog etanola, 0,1 mL 10%-tnog aluminijevog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL deionizirane vode. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju te se umjesto 10 %-tnog aluminijeva klorida dodaje isti volumen deionizirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesta potom stoji 30 minuta nakon čega se izmjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 415 nm.

Tablica 2. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina kvercetina i pripadajuće vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 415 nm.

$\gamma$ (mg L <sup>-1</sup> )	A
0	0
10	0,068
25	0,150
50	0,288
75	0,440
100	0,630



Slika 7. Baždarni pravac kvercetina

### 3.4.2.3. *Određivanje hidrokscimetnih kiselina i flavonola*

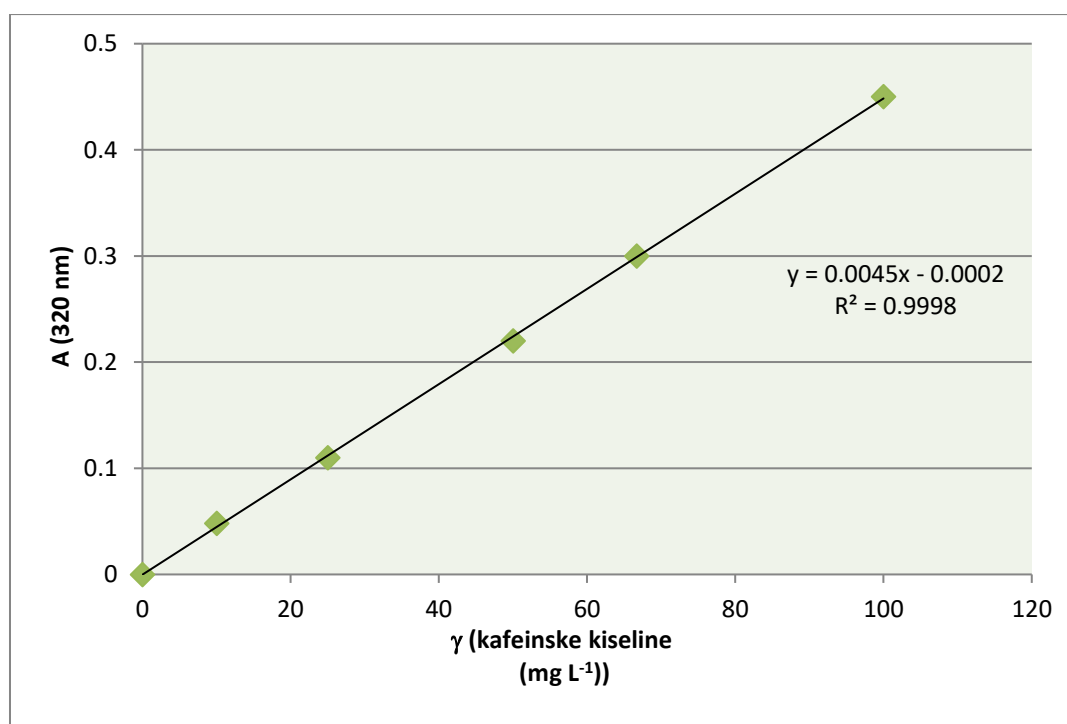
Određivanje ukupnih hidrokscimetnih kiselina i flavonola provodi se spektrofotometrijskom metodom pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 320 nm za hidrokscimetne kiseline dok se flavonoli određuju pri 360 nm. Ekstrakte je prije mjerenja potrebno razrijediti. U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250  $\mu\text{L}$  ekstrakta, 250  $\mu\text{L}$  1 g  $\text{L}^{-1}$  HCl u 96%-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g  $\text{L}^{-1}$  HCl. Za određivanje ukupnih flavonola apsorbancija se mjeri na 360 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

#### A) HIDROKSCIMETNE KISELINE

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se standardna otopina kafeinske kiseline, masene koncentracije 100 mg  $\text{L}^{-1}$ . Od standardne otopine kafeinske kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da koncentracije standardnih otopina kafeinske kiseline iznose 10, 25, 50 i 66,7 mg  $\text{L}^{-1}$ . Iz svake tikvice otpipetira se 250  $\mu\text{L}$  otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 250  $\mu\text{L}$  1 g  $\text{L}^{-1}$  HCl u 96 %-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g  $\text{L}^{-1}$  HCl. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa. Za slijepu probu se uzima 80%-tni metanol. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 320 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri 320 nm o masenoj koncentraciji kafeinske kiseline (mg  $\text{L}^{-1}$ ) pomoću programa Microsoft Excel.

Tablica 3. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina kafeinske kiseline i pripadajućih vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 320 nm.

$\gamma$ (mg L <sup>-1</sup> )	A
0	0
10	0,048
25	0,110
50	0,220
66,7	0,300
100	0,450



Slika 8. Baždarni pravac kafeinske kiseline

## B) FLAVONOLI

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se standardna otopina kvercetina, masene koncentracije 100 mg L<sup>-1</sup>. Od standardne otopine kvercetina pripreme se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da koncentracije standardnih otopina kafeinske kiseline iznose 2,5, 5, 10, 25 i 50 mg L<sup>-1</sup>. Iz svake tikvice otpipetira se 250  $\mu$ L otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 250  $\mu$ L 1 g L<sup>-1</sup> HCl u 96 %-

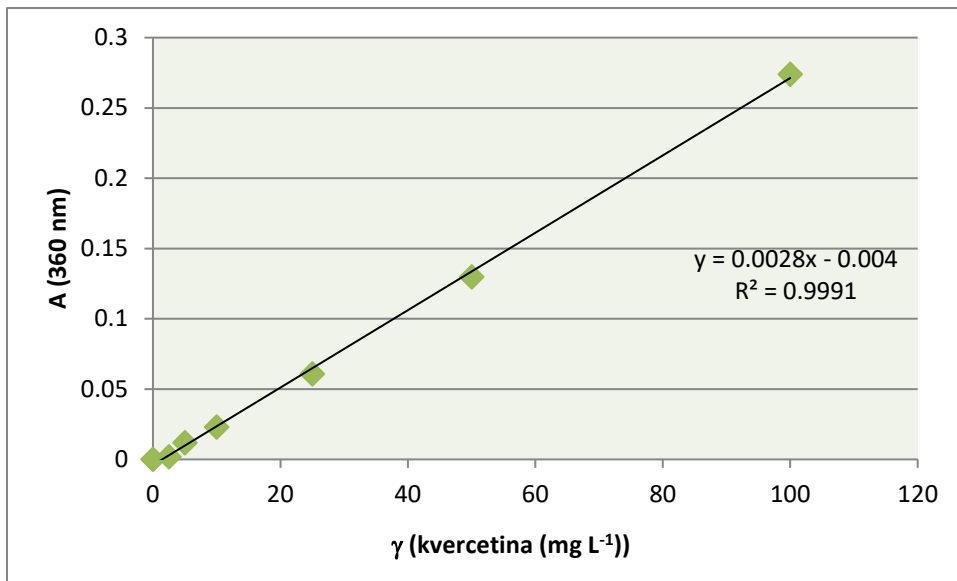
tnom etanolu i 4,55 mL 2 g L<sup>-1</sup> HCl. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa. Za slijepu probu se uzima 100%-tni metanol. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 360 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri 360 nm o masenoj koncentraciji kvercetina (mg L<sup>-1</sup>) pomoću programa Microsoft Excel.

Za određivanje fenolnih spojeva u listu lovora bilo je potrebno izraditi baždarni dijagram. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apcisi nanesene koncentracije standarda, a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm (za određivanje ukupnih fenola), 415 nm (za određivanje ukupnih flavonoida), 320 nm (za određivanje hidroksicimetne kiseline) i 360 nm

(za određivanje flavonola). Maseni udjeli pojedinačnih fenolnih spojeva izraženi su kao ekvivalent njihovih standarda.

Tablica 4. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina kvercetina i pripadajućih vrijednosti apsorbancije izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 320 nm.

$\gamma$ (mg L <sup>-1</sup> )	A
<b>0</b>	0
<b>2,5</b>	0,002
<b>5</b>	0,012
<b>10</b>	0,023
<b>25</b>	0,061
<b>50</b>	0,130
<b>100</b>	0,274



Slika 9. Baždarni pravac kvercetina

## 4. RASPRAVA I REZULTATI

U ovom radu provedena je vodena destilacija po Clavengeru s ciljem dobivanja eteričnog ulja. Kako bi se povećao prinos eteričnog ulja iz lista lovora, istraživana je utjecaj klasične ekstrakcije refluksiranjem te ultrazvučne ekstrakcije primjenom uređaja s direktno uronjenom ultrazvučnom sondom bez te uz dodatak enzima (pektinaza, celulaza, ksilanaza) na udio izoliranog eteričnog ulja iz lista lovora. Provedenom vodenom destilacijom dobiveno je eterično ulje, hidrolat, vodeni ekstrakt i biljni ostatak. Eterično ulje je spremljeno za daljnje kemijske analize i ispitivanje inhibicijskog djelovanja patogenih oomiceta. U vodenom ekstraktu i hidrolatu su određeni maseni udjeli fenolnih spojeva (ukupni fenoli, flavonoidi, hidroksicimetne kiseline, flavonoli). U ekstraktu biljnog ostatka su nakon provedene ekstrakcije potpomognute ultrazvukom primjenom polarnih otapala (etanol-voda (1:1), metanol-voda (1:1), etanol-metanol-voda (1:1:1)) određeni maseni udjeli ukupnih fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola. Rezultati su prikazani u tablicama (5.-12).

#### 4.1. ODREĐIVANJE MASENOG UDJELA FENOLNIH SPOJEVA U VODENIM ESKTRAKTIMA NAKON PROVEDENE VODENE DESTILACIJE PO CLAVENGERU

4.1.1. Fenolni spojevi u vodenim ekstraktima nakon pred tretmana ekstrakcije refluksiranjem

Tablica 5. Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva u vodenim ekstraktima nakon provedene Clavenger vodene destilacije kojoj je prethodila ekstrakcija refluksiranjem bez i s dodatkom enzima (pektinaza, celulaza,ksilanaza) pri 40 °C kroz 60 minuta.

	UKUPNI FENOLI w (mg GAE/g)±SD	FLAVONOIDI w (mg QE/g)±SD	HIDROKSICIMETNE KISELINE w (mg CAE/g) ±SD	FLAVONOLI w (mg QE/g)±SD
<b>LOVOR</b>	27,27±4,49	0,80±0,01	0,82±0,24	1,08±0,18
<b>LOVOR-BEZ ENZIMA</b>	21,29±0,63	0,81±0,13	0,73±0,11	0,68±0,15
<b>LOVOR-PEKTINAZA</b>	26,88±2,97	0,56±0,01	0,76±0,00	0,85±0,02
<b>LOVOR-CELULAZA</b>	24,20±0,89	0,44±0,07	0,83±0,20	0,97±0,05
<b>LOVOR-KSILANAZA</b>	24,54±1,89	0,68±0,04	0,84±0,02	1,17±0,07

U tablici 5. su prikazani rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola u vodenom ekstraktu lovora koji nije prethodno tretiran, te rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola u vodenim ekstraktima nakon provedene klasične ekstrakcije refluksiranjem bez enzima, te uz dodatak enzima (pektinaza, celulazaksilanaza) pri 40°C kroz 60 minuta, nakon čega je provedena vodena destilacija.



4.1.2. Fenolni spojevi u vodenim ekstraktima nakon pred tretmana ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

Tablica 6. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola u vodenim ekstraktima dobivenim ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom pri amplitudi 30, 50 i 100 % i vremenu ekstrakcije 5, 10 i 15 minuta.

UKUPNI FENOLI $w$ (mg GAE/g)±SD			
Amplituda (%)	30	50	100
Vrijeme ekstrakcije (min)			
5	16,87±0,18	8,86±0,05	7,32±0,14
10	17,37±0,53	8,27±0,21	6,00±0
15	16,86±0,18	8,30±0,21	6,38±0,16

Tablica 7. Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva u vodenim ekstraktima nakon provedene Clavenger vodene destilacije kojoj je prethodila ultrazvučna ekstrakcija pri optimalnim uvjetima (A=30%, 10 min) bez i s dodatkom enzima (pektinaza, celulaza,ksilanaza).

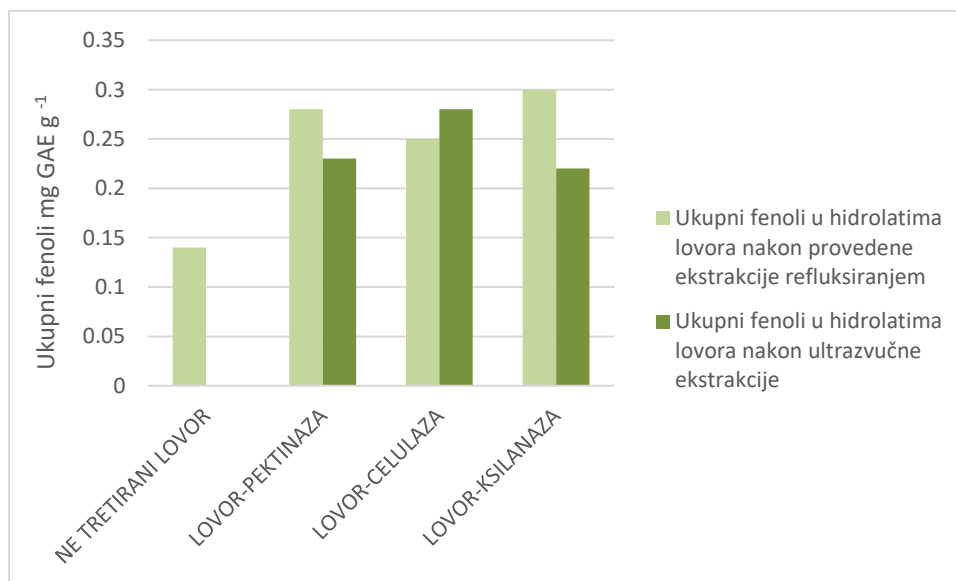
	UKUPNI FENOLI $w$ (mg GAE/g)±SD	FLAVONOIDI $w$ (mgQE/g)±SD	HIDROKSICIMETNE KISELINE $w$ (mg CAE/g)±SD	FLAVONOLI $w$ (mg QE/g)±SD
<b>LOVOR BEZ ENZIMA</b>	25,51±1,04	0,69±0,04	0,75±0,02	0,92±0,03
<b>LOVOR-PEKTINAZA</b>	23,18±2,12	0,60±0,01	0,60±0,07	0,84±0,05
<b>LOVOR-CELULAZA</b>	9,08±0,22	0,36±0,03	0,38±0,01	0,47±0,05
<b>LOVOR-KSILANAZA</b>	17,59±1,11	0,61±0,05	0,65±0,02	0,89±0,03

## 4.2. ETERIČNO ULJE LOVORA

Tablica 8. Eterično ulje lovora nakon provedene Clavenger vodene destilacije.

Eterično ulje lovora (mL/100 g)		
biljka + enzim	Predtretman klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem	Predtretman ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom
<b>LOVOR</b>	2	2
<b>LOVOR-pektinaza</b>	2	2
<b>LOVOR-celulaza</b>	2	2
<b>LOVOR-ksilanaza</b>	2	2

## 4.3. FENOLNI SPOJEVI U HIDROLATU



Slika 10. Grafički prikaz spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u hidrolatima lovora u kojima je neposredno prije Clavenger vodene destilacije provedena ekstrakcija potpomognuta enzimima pri 40 °C kroz 1h te ultrazvučna ekstrakcija potpomognuta enzimima (A=30%, 10 min).

#### 4.4. FENOLNI SPOJEVI U EKSTRAKTU BILJNOG OSTATKA LOVORA

Tablica 9. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola u ekstraktima biljnog ostatka lista lovora nakon provedene ekstrakcije potpomognute ultrazvukom pri amplitudi 30, 50 i 100 % i vremenu ekstrakcije 5, 10 i 15 minuta primjenom otapala etanol-voda (1:1), metanol-voda (1:1), etanol-metanol-voda (1:1:1).

Amplituda (%)	Vrijeme ekstrakcije (min)	Etanol-voda (1:1)	Metanol-voda (1:1)	Etanol-metanol-voda (1:1:1)
<b>w (mg GAE/g)±SD</b>				
<b>30</b>	5	23,05±2,72	31,72±1,39	35,95±4,58
	10	22,09±0,34	12,43±1,05	44,25±3,97
	15	13,95±2,15	23,38±1,29	39,66±1,52
<b>50</b>	5	16,20±1,40	21,82±3,26	43,24±2,10
	10	25,37±3,06	10,35±,17	36,58±5,04
	15	11,02±1,39	7,13±0,08	26,42±6,37
<b>100</b>	5	22,01±3,94	16,02±1,87	41,44±3,45
	10	5,55±2,86	8,82±1,16	28,70±5,03
	15	6,62±0,83	9,57±0,66	9,00±13,19

Tablica 10. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola u ekstraktima biljnog ostatka lista lovora u kojima je neposredno prije ekstrakcije potpomognute ultrazvukom pri optimalnim uvjetima (A=30%, 10 min) primjenom etanol-vode (1:1), metanol-vode(1:1) i etanol-metanol-vode (1:1:1) provedena ekstrakcija refluksiranjem pri 40 °C kroz 1h, a potom i Clavenger vodena destilacija.

		UKUPNI FENOLI w (mg GAE/g)±SD	FLAVONOIDI w (mg QE/g)±SD	HIDROKSICIMETNE KISELINE w (mg CAE/g)±SD	FLAVONOLI w (mg QE/g)±SD
<b>LOVOR</b>	Etanol-voda (1:1)	18,54±0,00	3,08±0,00	5,45±0,16	5,75±0,20
	Metanol-voda (1:1)	14,55±0,00	1,72±0,00	2,44±0,16	2,95±0,23
	Etanol-metanol-voda (1:1)	20,1±0,00	3,80±0,00	5,94±0,55	6,46±0,05

Tablica 11. Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva u ekstraktima biljnog ostatka lista lovora u kojima je neposredno prije ekstrakcije potpomognute ultrazvukom pri optimalnim uvjetima (A=30%, 10 min) primjenom etanol-vode (1:1), metanol-vode(1:1) i etanol-metanol-vode (1:1:1) provedena ekstrakcija refluksiranjem uz dodatak enzima (pektinaza, celulaza, ksilanaza) pri 40 °C kroz 1h, a potom i Clavenger vodena destilacija.

		UKUPNI FENOLI <i>w</i> (mg GAE/g)±SD	FLAVONOIDI <i>w</i> (mg QE/g)±SD	HIDROKSICIMETNE KISELINE <i>w</i> (mg CAE/g)±SD	FLAVONOLI <i>w</i> (mg QE/g)±SD
<b>LOVOR- PEKTINAZA</b>	Etanol- voda (1:1)	9,97±0,00	1,02±0,00	2,49±0,13	1,77±0,02
	Metanol- voda (1:1)	11,03±0,00	0,98±0,00	1,97±0,14	1,55±0,18
	Etanol- metanol- voda (1:1)	15,00±0,00	1,93±0,00	4,14±0,20	4,23±0,08
<b>LOVOR- CELULAZA</b>	Etanol- voda (1:1)	14,25±0,00	1,23±0,00	2,50±0,02	2,32±0,15
	Metanol- voda (1:1)	8,03±0,00	0,68±0,00	1,31±0,03	1,00±0,05
	Etanol- metanol- voda (1:1)	16,19±0,00	1,76±0,00	3,69±0,03	3,25±0,05
<b>LOVOR- KSILANAZA</b>	Etanol- voda (1:1)	14,26±0,00	1,29±0,00	2,86±0,08	2,29±0,05
	Metanol- voda (1:1)	11,85±0,00	0,92±0,00	1,63±0,05	1,46±0,10
	Etanol- metanol- voda (1:1)	19,8±0,00	2,50±0,00	5,48±0,11	4,79±0,30

Tablica 12. Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva u ekstraktima biljnog ostatka lista lovora u kojima je neposredno prije ekstrakcije potpomognute ultrazvukom pri optimalnim uvjetima (A=30%, 10 min) primjenom etanol-vode (1:1), metanol-vode(1:1) i etanol-metanol-vode (1:1:1) provedena ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom pri optimalnim uvjetima (A=30%, 10 min) uz dodatak enzima (pektinaza, celulaza, ksilanaza) a potom i Clavenger vodena destilacija.

		UKUPNI FENOLI w (mg GAE/g)±SD	FLAVONOIDI w (mg QE/g)±SD	HIDROKSICIMETNE KISELINE w (mg CAE/g)±SD	FLAVONOLI w (mg QE/g)±SD
<b>LOVOR- PEKTINAZ A</b>	Etanol- voda (1:1)	13,50±0,00	1,55±0,00	2,22±0,63	2,04±0,15
	Metanol -voda (1:1)	10,96±0,00	0,98±0,00	1,30±0,11	1,61±0,10
	Etanol- metanol -voda (1:1)	16,12±0,00	1,92±0,00	3,87±0,13	3,66±0,13
<b>LOVOR- CELULAZA</b>	Etanol- voda (1:1)	14,63±0,00	1,67±0,00	2,79±0,02	3,48±0,03
	Metanol -voda (1:1)	11,62±0,00	1,03±0,00	1,33±0,16	1,70±0,08
	Etanol- metanol -voda (1:1)	19,28±0,00	2,61±0,00	4,95±0,08	4,70±0,13
<b>LOVOR- KSILANAZ A</b>	Etanol- voda (1:1)	11,93±0,00	1,73±0,00	3,09±0,09	2,95±0,13
	Metanol -voda (1:1)	6,82±0,00	0,69±0,00	2,02±1,60	1,04±0,05
	Etanol- metanol -voda (1:1)	18,45±0,00	2,99±0,00	5,11±0,16	5,34±0,13

#### **4.5. ODREĐIVANJE MASENOG UDJELA FENOLNIH SPOJEVA U VODENIM EKSTRAKTIMA NAKON PROVEDENE VODENE DESTILACIJE PO CLAVENGERU**

4.5.1. Fenolni spojevi u vodenim ekstraktima nakon predtretmana klasične ekstrakcije refluksiranjem

*Ukupni fenoli.* Iz prikazanih rezultata u tablici 5. vidimo da se maseni udio ukupnih fenola kreće od 21,29 do 27,27 mg GAE g<sup>-1</sup>. Najveći maseni udio ukupnih fenola od 27,27 mg GAE g<sup>-1</sup> je određen u vodenom ekstraktu lovora u kojem neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru nije proveden predtretman klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem te nisu dodani enzimi. Najmanji maseni udio ukupnih fenola od 21,29 mg GAE g<sup>-1</sup> je određen u vodenom ekstraktu lovora u kojem je proveden predtretman klasičnom ekstrakcijom bez dodatka enzima. U vodenim ekstraktima lovora u kojima je proveden predtretman klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem uz dodatak enzima (ksilanaza, pektinaza, celulaza) neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru su određeni maseni udjeli ukupnih fenola od 24,20 do 26,88 mg GAE g<sup>-1</sup>. Rezultati su pokazali da uz dodatak enzima, najveći ekstrakcijski kapacitet izolacije ukupnih fenola iz lista lovora je postignut primjenom klasične ekstrakcije refluksiranjem, uz dodatak enzima pektinaze. Predtretman klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem lista lovora neposredno prije provedene vodene destilacije ne pridonosi povećanju masenog udjela ukupnih fenola u odnosu na ekstrakciju lista lovora bez ikakvog pred tretmana, dodatak enzima (pektinaza, celulaza, ksilanaza) nije značajno doprinio povećanu ekstrakcijskog kapaciteta izolacije ukupnih fenolnih spojeva.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se ekstrakcijom refluksiranjem uz dodatak enzima postiže gotovo jednak ili nešto manji ekstrakcijski kapacitet izolacije ukupnih fenolnih spojeva iz lista lovora. Od korištenih enzima (celulaza, pektinaza i ksilanaza), najveći maseni udio ukupnih fenola iz lista lovor dobiven je uz dodatak pektinaze. Fu i sur. (2008) su proveli istraživanje u kojem su koristili enzime celulazu, beta-glukozidazu te pektinazu i rezultati su pokazali kako je od ta tri enzima pektinaza bila najučinkovitija u ekstrakciji ispitivanih spojeva što se, ako uspoređujemo samo ekstrakcijski kapacitet s dodatkom enzima, podudara s našim rezultatima. Boulila i sur. (2015) su odredili ukupne fenole od 26,60 mg GAE g<sup>-1</sup> u vodenom ekstraktu nakon provedene vodene destilacije, što se podudara s našim rezultatom od 27,27 mg GAE g<sup>-1</sup>.

*Flavonoidi, hidroksicimne kiseline, flavonoli.* Iz prikazanih rezultata u tablici 5. vidimo da su maseni udjeli flavonoida, hidroksicimnih kiselina i flavonola određeni u značajno nižim masenim udjelima u odnosu na ukupne fenole. Maseni udio flavonoida kreće od 0,44 do 0,81 mg QE g<sup>-1</sup>. Maseni udio hidroksicimnih kiselina se kreće od 0,73 do 0,84 mg CAE g<sup>-1</sup>, dok se maseni udio flavonola kreće od 0,68 mg QE g<sup>-1</sup> do 1,17 mg QE g<sup>-1</sup>. Najveći maseni udio flavonoida od 0,81 mg QE g<sup>-1</sup> je određen u vodenom ekstraktu lovora u kojem je neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru proveden predtretman klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem, bez dodatka enzima. Najveći maseni udio hidroksicimnih kiselina od 0,84 mg CAE g<sup>-1</sup> i flavonola od 1,17 mg QE g<sup>-1</sup> je određen u vodenom ekstraktu lovora u kojem je neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru proveden predtretman klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem, uz dodatak enzima ksilanaze. Najmanji maseni udio hidroksicimnih kiselina od 0,73 mg CAE g<sup>-1</sup> te najmanji maseni udio flavonola od 0,68 mg QE g<sup>-1</sup> je određen u vodenom ekstraktu lovora u kojem je proveden predtretman klasičnom ekstrakcijom uz refluksiranje, bez dodatka enzima. Najmanji maseni udio flavonoida od 0,44 mg QE g<sup>-1</sup> je određen u vodenom ekstraktu lovora u kojem je proveden predtretman klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem, uz dodatak enzima celulaza neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru.

Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da povećanju ekstrakcijskog kapaciteta izolacije flavonoida iz lista lovora doprinosi predtretman klasične ekstrakcije refluksiranjem bez dodatka enzima neposredno prije provedene vodene destilacije, uz dodatak enzima maseni udjeli flavonoida nisu se povećali. Pred tretmanom klasične ekstrakcije refluksiranjem uslijed zagrijavanja, dolazi do porasta temperature koja doprinosi smanjenju čvrstoće stanične stijenke i mekšanju biljnog tkiva čime se olakšava izlaženje fenolnih spojeva iz biljnog materijala (Balasubramaniam i sur., 2019), što doprinosi povećanje ekstrakcijskog kapaciteta izolacije flavonoida iz lista lovora. Iznimka su hidroksicimne kiseline i flavonoli gdje dolazi do povećanja masenog udjela uz dodatak enzima ksilanaze.

Na maseni udio ukupnih fenola u vodenom ekstraktu lovora se predtretmanom klasične ekstrakcije refluksiranjem uz dodatak enzima (celulaza, pektinaza i ksilanaza) postiže gotovo jednak ekstrakcijski kapacitet izolacije ukupnih fenolnih spojeva, osim kod pektinaze gdje je veći. Na maseni udio hidroksicimnih kiselina i flavonola najveći utjecaj je imala ksilanaza. Na maseni udio flavonoida u vodenom ekstraktu lovora predtretman klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem bez dodatka enzima je doprinio povećanju masenog udjela flavonoida. Očekivano povećanje masenog udjela fenolnih spojeva uz dodatak enzima celulaze, pektinaze

i ksilanaze pa u budućim analizama treba razmisliti o povećanju koncentracije enzima i produžetku vremena predtretmana.

#### 4.5.2. Fenolni spojevi u vodenim ekstraktima nakon predtretmana ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

Prilikom određivanja optimalnih uvjeta kod ekstrakcije potpomognute ultrazvukom primjenom uređaja s direktno uronjenom ultrazvučnom sondom varirane su amplituda (30, 50 i 100 %) i vrijeme ekstrakcije (5, 10 i 15 minuta). Dobiveni su vodeni ekstrakti u kojima se provelo spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola. Iz tablice 6. vidimo da je najveći maseni udio ukupnih fenola od 17,37 mg GAE g<sup>-1</sup> pri amplitudi 30 % i vremenu od 10 minuta, dok je najmanji maseni udio ukupnih fenola od 6,00 mg GAE g<sup>-1</sup> pri amplitudi 100 % i vremenu od 10 minuta. Kao optimalni uvjeti su uzeti amplituda od 30 % te vrijeme od 10 minuta.

Pri većim amplitudama, temperature uzoraka su više nego na manjim amplitudama zbog čega dolazi do povećanog isparavanja uzorka te se dio uzorka rasprši po ultrazvučnoj komori. Balasubramaniam i sur. (2019) su zaključili da povećanjem amplitude ultrazvuka je povećana i snaga ultrazvuka što posljedično dovodi do povećanja temperature. Viša temperatura rezultira smanjenjem sadržaja fenolnih spojeva jer se smanjuje broj kavitacija mjehurića što smanjuje utjecaj kolapsa šupljine na homogenizirani uzorak te se na taj način razgrađuju. Ovo pokazuje da ultrazvučna snaga i frekvencija imaju dinamičnu ulogu u ekstrakciji fenolnih spojeva (Balasubramaniam i sur., 2019) te da je odabir optimalnih uvjeta bitan za uspješnu ekstrakciju.

*Ukupni fenoli.* U tablici 7. vidimo da se maseni udio ukupnih fenola kreće od 9,08 do 25,51 mg GAE g<sup>-1</sup>. Najveći maseni udio ukupnih fenola od 25,51 mg GAE g<sup>-1</sup> je određen u vodenom ekstraktu lovora u kojem neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru proveden predtretman ultrazvučnom ekstrakcijom bez dodatka enzima. U vodenim ekstraktima lovora u kojima je proveden predtretman ultrazvučnom ekstrakcijom uz dodatak



enzima (ksilanaza, pektinaza, celulaza) neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru su određeni maseni udjeli ukupnih fenola od 9,08 do 23,18 mg GAE g<sup>-1</sup>.

Najmanji maseni udio ukupnih fenola od 9,08 mg GAE g<sup>-1</sup> je određen u vodenom ekstraktu lovora u kojem je proveden predtretman ultrazvučnom ekstrakcijom sa dodatkom enzima celulaze, a najveći od 23,18 mg GAE g<sup>-1</sup> dodatkom enzima pektinaze. Predtretman ekstrakcije potpomognute ultrazvukom sa i bez dodatka enzima nije doprinio povećanju ekstrakcijskog kapaciteta izolacije ukupnih fenolnih spojeva iz lista lovora.

*Flavonoidi, hidroksicimetne kiseline, flavonoli.* Iz prikazanih rezultata u tablici 7. vidimo da se maseni udio flavonoida kreće od 0,36 do 0,69 mg QE g<sup>-1</sup>, maseni udio hidroksicimetnih kiselina se kreće od 0,38 do 0,75 mg CAE g<sup>-1</sup>, dok se maseni udio flavonola kreće od 0,47 do 0,92 mg QE g<sup>-1</sup>. Najveći maseni udio flavonoida od 0,69 mg QE g<sup>-1</sup>, hidroksicimetnih kiselina od 0,75 mg CAE g<sup>-1</sup> te flavonola od 0,92 mg QE g<sup>-1</sup> je određen u vodenom ekstraktu lovora u kojem je neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru provedena ultrazvučna ekstrakcija, bez dodatka enzima. Najmanji maseni udio flavonoida od 0,36 mg QE g<sup>-1</sup>, udio hidroksicimetnih kiselina od 0,38 mg CAE g<sup>-1</sup> te flavonola od 0,47 mg QE g<sup>-1</sup> je određen u vodenom ekstraktu lovora u kojem je proveden predtretman ultrazvučnom ekstrakcijom uz dodatak enzima celulaze neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru.

Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da provedenim predtretmanom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom bez dodatka enzima, neposredno prije provedene vodene destilacije su u vodenom ekstraktu lista lovora izolirani najveći maseni udjeli ukupnih fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola. Očekivano povećanje masenog udjela fenolnih spojeva uz dodatak enzima celulaze, pektinaze i ksilanaze nije postignuto iako je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom provedena pri optimalnim uvjetima ekstrakcije (A=30%, 10 min). Tijekom 10 minuta ekstrakcije, enzimi vjerojatno nisu dostigli dovoljnu aktivnost i nisu postigli optimalno djelovanje te nije došlo do željenog povećanja potencijala penetracije staničnih stijenki što bi rezultiralo otpuštanjem fenolnih spojeva i povećanjem ekstrakcijskog kapaciteta. Enzimi poput celulaze ili pektinaze se koriste za povećanje potencijala penetracije staničnih stijenki, što rezultira otpuštanjem fenolnih spojeva i povećanjem prinosa ekstrakcije biološki aktivnih spojeva. Očekivani porast ekstrakcijskog kapaciteta izolacije fenolnih spojeva u predtretmanu klasične ekstrakcije refluksiranjem i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom uz dodatak enzima (celulaza, pektinaza, ksilanaza) nije postignut.

#### 4.6. ETERIČNO ULJE LOVORA

U tablici 8. su prikazani rezultati udjela eteričnog ulja u listu lovora nakon provedene Clavenger vodene destilacije te uz predtretman klasične ekstrakcije refluksiranjem i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom s i bez dodatka enzima (celulaza, pektinaza, ksilanaza). Udio eteričnog ulja u listu lovora iznosi 2 mL/100 g uzorka, provedeni postupak predtretmana klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem i ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom s i bez dodatka enzima nije imao utjecaja na povećanje udjela izoliranog eteričnog ulja iz lista lovora. Daljnjim analizama GC/MS potrebno je utvrditi da li je došlo do promjene kemijskog sastava eteričnog ulja uslijed dodatka enzima. Hosni i sur. (2013) su ispitali povećanje prinosa ulja prilikom enzimima potpomognute ekstrakcije kod timijana i ružmarina gdje je povećanje prinosa nije bilo jednako kod obje biljke. Razlog je taj što ružmarin ima ojačanu kutikula koja u potpunosti pokriva žljezdane trihome za razliku od timijana čija je kutikula tanka i porozna. Takve razlike u morfološkim i strukturnim značajkama sekundarnih struktura se pripisuju razlikama u dobivenim rezultatima. Boulila i sur. (2015) zaključili su da primjenom celuloze, hemiceluloze i ksilanaze, izolacija eteričnog ulja iz lišća lovora znatno poboljšana, dolazi do promjene kemijskog sastava ulja. Dobiveni rezultati udjela izoliranog eteričnog ulja lovora odgovaraju literaturnim navodima drugih autora (Boutemak i sur., 2015; Sowbhagya i sur., 2011; Hosni i sur., 2013).

#### 4.7. FENOLNI SPOJEVI U HIDROLATU

Kao nusprodukt provedene vodene destilacije po Clavengeru dobijemo hidrolate koji su vrijedan izvor fenolnih spojeva te smo u njima proveli spektrofotometrijsko određivanje fenolnih spojeva. U najvećoj mjeri su zastupljeni ukupni fenolni spojevi, dok su flavonoidi, hidroksicimetne kiseline i flavonoli određeni u vrlo malim masenim udjelima.

Na slici 11. vidimo da se maseni udio ukupnih fenola kreće od 0,14 do 0,30 mg GAE g<sup>-1</sup> kod klasične ekstrakcije refluksiranjem te od 0,22 do 0,28 mg GAE g<sup>-1</sup> kod ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Najveći maseni udio ukupnih fenola od 0,30 mg GAE g<sup>-1</sup> je određen u hidrolatu u kojem neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru je proveden predtretman klasične ekstrakcije refluksiranjem s dodatkom enzima ksilanaze.

Najmanji maseni udio ukupnih fenola od 0,14 mg GAE g<sup>-1</sup> je određen u hidrolatu u kojem je neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru nije proveden predtretman ekstrakcije. Na slici 11. vidimo da se dodatkom enzima povećava maseni udio ukupnih fenola u hidrolatima lovora. Primjena ultrazvučne ekstrakcije kao predtretmana daje nešto niže vrijednosti ukupnih fenola u hidrolatima, te je najveći maseni udio ukupnih fenola od 0,28 mg GAE g<sup>-1</sup> određen u hidrolatu u kojem neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru je proveden predtretman ultrazvučne ekstrakcije s dodatkom enzima celulaze, dok je najmanji maseni udio ukupnih fenola od 0,22 mg GAE g<sup>-1</sup> određen u hidrolat u lovora u kojem je neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru proveden predtretman ultrazvučne ekstrakcije s dodatkom enzima ksilanaze. Razlog maloj količini fenolnih spojeva u hidrolatima jest to što su hidrolati nusprodukt proizvodnje eteričnog ulja, te dio fenolnih spojeva zaostaje u vodenom ekstraktu i biljnim ostacima lovora.

#### **4.8. FENOLNI SPOJEVI U EKSTRAKTU BILJNOG OSTATKA LOVORA**

Nakon izolacije eteričnog ulja, zaostaje nam otpad, odnosno biljni ostatak lista lovora. Biljni ostatak predstavlja važan izvor fenolnih spojeva koji su ekstrahirali polarnim otapalima u cilju izolacije što veće količine fenolnih spojeva. Dodatno, kako bismo izvukli maksimum, primijenili smo ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom, kojoj smo prethodno odredili optimalne parametre ekstrakcije za svako primjenjeno otapalo (tablica 9).

Iz prikazanih rezultata u tablici 9. vidimo da se maseni udio ukupnih fenola kreće od 5,55 do 25,37 mg GAE g<sup>-1</sup> za otapalo etanol-voda (1:1), od 7,13 do 31,72 mg GAE g<sup>-1</sup> za otapalo metanol-voda (1:1) te od 9,00 do 44,25 mg GAE g<sup>-1</sup> za otapalo etanol-metanol-voda (1:1:1). Kod otapala etanol-voda (1:1) najveći maseni udio ukupnih fenola od 23,05 mg GAE g<sup>-1</sup> je pri amplitudi 30 % i vremenu od 5 minuta. Za otapalo metanol-voda (1:1) vidimo da je najveći maseni udio ukupnih fenola od 31,72 mg GAE g<sup>-1</sup> na amplitudi 30 % i vremenu od 5 minuta, dok je kod otapala etanol-metanol-voda (1:1:1) najveći maseni udio ukupnih fenola od 44,25 mg GAE g<sup>-1</sup> na amplitudi 30 % i vremenu od 10 minuta. Najmanji maseni udio ukupnih fenola od 5,55 mg GAE g<sup>-1</sup> za otapalo etanol-voda te od 9,00 mg GAE g<sup>-1</sup> za etanol-metanol-voda (1:1:1) je određen na amplitudi 100 % i vremenu od 10 minuta. Kod otapala metanol-voda (1:1) najmanji maseni udio ukupnih fenola od 7,13 mg GAE g<sup>-1</sup> je određen na amplitudi 50 % i vremenu od 15 minuta.

*Ukupni fenoli.* Iz prikazanih rezultata tablice 10 vidimo da se maseni udio ukupnih fenola u biljnom ostatku u kojem neposredno prije vodene destilacije proveden predtretman klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem bez dodatka enzima kreće od 14,55 do 20,1 mg GAE g<sup>-1</sup>. Najveći ekstrakcijski kapacitet izolacije ukupnih fenola od 20,10 mg GAE g<sup>-1</sup> je postignut primjenom otapala etanol-metanol-voda (1:1:1). U vodenim ekstraktima lovora u kojima je proveden predtretman klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem uz dodatak enzima (ksilanaza, pektinaza, celulaza) neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru su određeni maseni udjeli ukupnih fenola od 8,03 do 19,80 mg GAE g<sup>-1</sup> (tablica 11.). Najmanji maseni udio ukupnih fenola od 8,03 mg GAE g<sup>-1</sup> je određen u biljnom ostatku u kojem je proveden predtretman klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem u otapalu metanol-voda (1:1) bez dodatka enzima. Iz prikazanih rezultata tablice 12 vidimo da se maseni udio ukupnih fenola kreće od 6,82 do 19,28 mg GAE g<sup>-1</sup>. Najveći maseni udio ukupnih fenola od 19,28 mg GAE g<sup>-1</sup> je određen u biljnom ostatku primjenom otapala etanol-metanol-voda (1:1:1) u kojem neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru je proveden predtretman ultrazvučnom ekstrakcijom uz dodatak enzima celulaze. Najmanji maseni udio ukupnih fenola od 6,82 mg GAE g<sup>-1</sup> je određen u biljnom ostatku primjenom otapala metanol-voda (1:1) u kojem je neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru proveden predtretman ultrazvučnom ekstrakcijom uz dodatak enzima ksilanaze. Primjenom predtretmana klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem, ali i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom uz dodatak enzima (celulaza, pektinaza i ksilanaza) ne doprinosi povećanju masenog udjela ukupnih fenola iz biljnog ostatka lovora nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da primjenom smjese otapala etanol-metanol-voda (1:1:1) postiže učinkovitija ekstrakcija ukupnih fenolnih spojeva nego primjena sustava otapala etanol-voda (1:1) ili metanol-voda (1:1). Doprinos primjenjenog otapala u ekstrakciji fenolnih spojeva iz biljnog ostatka lovora je puno veći od samog izbora predtretmana. Dobiveni rezultati u ovom istraživanju pokazuju da maseni udjeli ukupnih fenola u biljnom ostatku lovora nakon provedene vodene destilacije ovise o primjenjenom otapalu za ekstrakciju, što je u skladu s istraživanjima drugih autora prema kojima ekstrakcijski kapacitet izolacije fenolnih spojeva u raznim biljnim vrstama ovisi o vrsti otapala. Na samu ekstrakciju fenolnih spojeva, veliki utjecaj ima polarost otapala gdje primjenom polarnijih otapala se postiže veći udio ekstrahiranih fenolnih spojeva iz kadulje (Dent i sur. 2013; Veličković i sur. 2006; Naczki i Shahidi, 2004). Samo prisustvo i udio vode u organskoj fazi otapala ima značajnu ulogu, pogotovo kod ekstrakcije ukupnih fenolnih spojeva. Voda pojačava proces difuzije i olakšava ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala te upotreba vode uz alkoholnu otopinu dovodi do bubrenja materijala što doprinosi

jačem prodiranju otapala u biljni materijal (Rafiee i sur., 2011). Uzeći u obzir navedene rezultate možemo zaključiti da etanol-metanol-voda (1:1:1) zbog polarnosti otapala te njihove optimalne kombinacije jest najbolje otapalo za ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog ostatka lovora. Smjesom etanol-voda (1:1) su ekstrahirani nešto niži maseni udjeli ukupnih fenola, dok smjesom metanol-voda (1:1) najmanji.

*Flavonoidi, hidroksicimetne kiseline i flavonoli.* Iz prikazanih rezultata tablice 10 vidimo da se maseni udio flavonoidau biljnom ostatku u kojem neposredno prije vodene destilacije nije proveden nikakav predtretman kreće od 1,72 do 3,80 mg QE g<sup>-1</sup>, a maseni udio hidroksicimetnih kiselina od 2,44 do 5,94mg CAE g<sup>-1</sup> i flavonola od 2,95 do 6,46 mg QE g<sup>-1</sup>. Najveći ekstrakcijski kapacitet izolacije flavonoida od 3,80 mg QE g<sup>-1</sup>, hidroksicimetnih kiselina od 5,94 mg CAE g<sup>-1</sup>i flavonola od 6,46 mg QE g<sup>-1</sup>je postignut primjenom otapala etanol-metanol-voda (1:1:1), a najmanji za flavonoide od 1,72 mg QE g<sup>-1</sup>, hidroksicimetne kiseline od 2,44 mg CAE g<sup>-1</sup>i flavonola od 2,95 mg QE g<sup>-1</sup>je određen u biljnom ostatku u kojem je proveden pred tretman klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem u otapalu metanol-voda (1:1) bez dodatka enzima. U ekstraktima biljnog ostatka lovora u kojima je proveden predtretman klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem uz dodatak enzima (ksilanaza, pektinaza, celulaza) neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru su određeni maseni udjeli flavonoida od 0,68 do 2,50 mg QE g<sup>-1</sup>(tablica 11). Iz prikazanih rezultata u tablici 11 vidimo da se maseni udio maseni udio hidroksicimetnih kiselina se kreće od 1,31 do 5,48 mg CAE g<sup>-1</sup>, dok se maseni udio flavonola kreće od 1,00 mg QE g<sup>-1</sup> do 4,79 mg QE g<sup>-1</sup>. Najveći maseni udio flavonoida od 2,50 mg QE g<sup>-1</sup>, hidroksicimetnih kiselina od 5,48 mg CAE g<sup>-1</sup> te flavonola od 4,79 mg QE g<sup>-1</sup> je određen u biljnom ostatku dobivenog primjenom otapala etanol-metanol-voda (1:1:1) u kojem je neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru proveden predtretman klasičnom ekstrakcijom uz dodatak enzima ksilanaze. Najmanji maseni udio flavonoida od 0,68 mg QE g<sup>-1</sup>, udio hidroksicimetnih kiselina od 1,31 mg CAE g<sup>-1</sup> te flavonola od 1,00 mg QE g<sup>-1</sup>je određen u biljnom ostatku dobivenog primjenom otapala metanol-voda (1:1) u kojem je proveden predtretman klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem uz dodatak enzima celulaze neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru.

U ekstraktima biljnog ostatka lovora u kojima je proveden predtretman ekstrakcije potpomognute ultrazvukom uz dodatak enzima (ksilanaza, pektinaza, celulaza) neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru su određeni maseni udjeli flavonoida od 0,69 do 2,99 mg QE g<sup>-1</sup>(tablica 12). Iz prikazanih rezultata u tablici 12 vidimo da se maseni udio hidroksicimetnih kiselina se kreće od 1,30 do 5,11 mg CAE g<sup>-1</sup>, dok se maseni udio flavonola

kreće od 1,04 mg QE g<sup>-1</sup> do 5,34 mg QE g<sup>-1</sup>. Najveći maseni udio flavonoida od 2,99 mg QEg<sup>-1</sup>, hidroksicimetnih kiselina od 5,11 mg CAE g<sup>-1</sup> te flavonola od 5,34 mg QE g<sup>-1</sup> je određen u biljnom ostatku dobivenog primjenom otapala etanol-metanol-voda (1:1:1) u kojem je neposredno prije vodene destilacije po Clavengeru proveden predtretman klasičnom ekstrakcijom uz dodatak enzima ksilanaze. Najmanji maseni udio flavonoida od 0,69 mg QE g<sup>-1</sup> i flavonola od 1,04 mg QE g<sup>-1</sup> je određen u biljnom ostatku dobivenog primjenom otapala metanol-voda (1:1) u kojem je proveden predtretman klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem uz dodatak enzima ksilanaze, odnosno za hidroksicimetnih kiselina od 1,30 mg CAE g<sup>-1</sup> uz dodatak pektinaze.

Svi dobiveni ekstrakti biljnog ostatka lista lovora bogat su izvor fenolnih spojeva, ali njihov maseni udio značajno ovisi o smjesi i polarnosti otapala kojim se provodi ekstrakcija. U biljnim ostacima lovora koji predstavljaju otpad nakon provedene vodene destilacije u najvećim masenim udjelima su izolirani ukupni fenolni spojevi. Primjenom predtretmana klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem, ali i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom uz dodatak enzima (celulaza, pektinaza i ksilanaza) ne doprinosi povećanju masenog udjela ukupnih fenola iz biljnog ostatka lovora nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru. Doprinos primjenjenog otapala u ekstrakciji fenolnih spojeva iz biljnog ostatka lovora je puno veći od samog izbora pred tretmana. Flavonoidi, hidroksicimetne kiseline i flavonoli su zastupljeni u nižim masenim udjelima. Na maseni udio flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola je najveći utjecaj imalo smjesa otapala kojom je provedena ekstrakcija fenolnih spojeva. Smjesa otapala etanol-metanol-voda (1:1:1) se pokazala najučinkovitijem izborom otapala, dok smjesom metanol-voda (1:1) su ekstrahirani najniži maseni udjeli fenolnih spojeva. Neovisno o primjenjenom predtretmanu klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem ili ekstrakcije potpomognute ultrazvukom najveći ekstrakcijski kapacitet izolacije flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola iz biljnog ostatka lovora je postignut uz dodatak enzima ksilanaze, a najmanji uz dodatak celulaze osim za hidroksicimetne kiseline pektinaze.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih u ovom radu može se zaključiti slijedeće:

1. Provedenom vodenom destilacijom po Clavengeru u svrhu dobivanja eteričnog ulja lista lovora (*Laurus nobilis* L.), nusprodukti koji se dobiju su: vodeni ekstrakt lista lovora, hidrolat lista lovora i biljni ostatak lista lovora koji predstavljaju bogat izvor fenolnih spojeva. Maseni udjeli ukupnih fenolnih spojeva iznosili su kako slijedi: u vodenom ekstraktu 27,27 mg GAE g<sup>-1</sup>; u ekstraktu biljnog ostatka lista lovora 20,01 mg GAE g<sup>-1</sup> te u hidrolatu koji zaostaje nakon provedene vodene destilacije 0,30 mg GAE g<sup>-1</sup>.
2. Primjenjeni enzimski tretmani (celulaza, pektinaza, ksilanaza) te metode ekstrakcije (klasična ekstrakcija uz refluks te ekstrakcija ultrazvukom) nisu značajno utjecale na prinos eteričnog ulja izoliranog iz lista lovora. Stoga je udio eteričnog ulja iznosio 2 mL/100g neovisno o primjenjenom predtretmanu te metodi ekstrakcije.
3. Na povećanje masenog udjela fenolnih spojeva u vodenom ekstraktu i ekstraktu biljnog ostatka lovora nije imao utjecaj predtretmana klasičnom ekstrakcijom refluksiranjem i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom s i bez dodatka enzima.
4. Na prinose fenolnih spojeva tijekom oba postupka ekstrakcije najviše je utjecala vrsta primjenjenog otapala. Najveći prinosi fenolnih spojeva iz biljnog ostatka lovora dobiveni su primjenom smjese više komponentnih otapala etanol-metanol-voda (1:1:1), dok binarne smjese otapala kao npr. metanol-voda (1:1) nisu imali značajniji utjecaj.
5. Ekstrakcija potpomognuta enzimima (celulaza, pektinaza, ksilanaza) u koncentracijama ( $\gamma=0,02$  g L<sup>-1</sup>, A=30%, t=10 min) nije doprinjela očekivanom povećanju prinosa eteričnog ulja kao ni masenog udjela fenolnih spojeva. Stoga je potrebno provesti dodatna istraživanja uz variranje koncentracija enzima i vremena ekstrakcije.
6. Zbog utvrđenog visokog udjela biološki aktivnih spojeva odnosno fenola, vodeni ekstrakt, ekstrakt biljnog ostatka, hidrolat i eterično ulje lovora su visokovrijedni supstrati koji će se u daljnjim analizama koristiti za ispitivanje njihovog inhibicijskog djelovanja na patogene oomicete.

## 6. LITERATURA

Altıok, E., Baycin, D., Bayraktar, O., Ulku, S. (2008) Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Sep. Purif. Technol.* **62**(2), str. 342-348.

Ambrose, D.C.P, Manickavasagan, A., Naik, R. (2016) Leafy medicinal herb: botany, chemistry, postharvest technology and uses. U: Bay, (Cakmak, H, Kumcuoglu, S., Tavman, S., ured.), CAB International, Boston, str. 49-51.

Areias, F.M., Valentão, P., Andrade, P.B.; Ferreres, F.; Seabra, R.M. (2000) Flavonoids and phenolic acids of sage: influence of some agricultural factors. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 6081-6084

Attokaran, M. (2011) Natural Food Flavors and Colorants 1.izd., Blackwell Publishing Ltd., Iowa, str. 75-79.

Attokaran, M. (2017) Natural Food Flavors and Colorants: Individual Flavors and Colorants. 2.izd, WILEY Blackwell, Chicago.

Balasubramaniam, V.G., Ayyappan, P., Sathvika, S., Antony, U. (2019) Effect of enzyme pretreatment in the ultrasound assisted extraction of finger millet polyphenols. *J. Food Sci. Tech.* **56** (3), 1583-1594.

Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., Komes, D. (2018) Overview of polyphenols and their properties. Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications. 1.izd., Woodhead Publishing, str. 5-13.

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

Boutemak, K., Benali, N., Moulai-Mostefa, N. (2015) Effect of Hemicellulase on Extraction of Essential Oil from Algerian *Artemisia campestris*. *International Journal of Chemical and Molecular Engineering* **9** (12), 1508-1511.



Bravo, H.R., Copaja, S.V., Lamborot, M. (2013) Phytotoxicity of Phenolic Acids From Cereals. *Herbicides-Advances in Research* (Price, A., J., Kelton, J., A., ured.), IntechOpen

Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C. (2002) Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J. Food Drug Anal.* **10(3)**, str. 178-182.

Chen, C-Y.O., Costa, S.M., Carolo, K. (2019) Phenolic Acids, str. 357-381.

Cheng, X., Bi, L., Zhao, Z., Chen, Y. (2015) Advances in Enzyme Assisted Extraction of Natural Products. *3rd Int Conf Mater Mech Manuf Eng (IC3ME 2015)*, str. 371-375.

Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Eleze Garofulić, I., Bosiljkov, T., Ježek, D., Brnčić, M. (2015) Comparison of Conventional and Ultrasound-assisted Extraction Techniques on Mass Fraction of Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis* L.). *Chem. Biochem. Eng. Q.*, **29 (3)**, 475-484.

Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Brnčić, M., Bosiljkov, T., Levaj, B. (2013) The effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. *Food Technol. Biotech.* **51 (1)**, 84-91.

Dudaš, S., Venler, L. (2009) Varijabilnost sadržaja eteričnog ulja u listovima lovora *Laurus nobilis* L. *Glasnik zaštite bilja*, **33(6)**, 46-54.

Fu, Y. J., Liu, W., Zu, Y. G., Tong, M. H., Li, S. M., Yan, M. M., Luo, H. (2008) Enzyme assisted extraction of luteolin and apigenin from pigeonpea [*Cajanuscajan* L. Millsp.] leaves. *Food Chem.* **111 (2)**, 508–512.

Ghandahari Yazdi, A.P., Barzegar, M., Sahari, M.A., Gavlighi, H.A. (2019) Optimization of the enzyme-assisted aqueous extraction of phenolic compounds from pistachio green hull. *Food Science & Nutr.* **7 (1)**, 356-366.

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

Han, X., Shen, T., Lou, H., (2007) Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.* **8(9)**, 950–988.

- Hosni, K., Hassen, I., Chaabane, H., Jemli, M., Dallali, S., Sebei, H., Casabianca, H. (2013) Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity. *Ind. Crops Prod.***47**, 291-299.
- Kumar, K., Yadav, A.N., Kumar, V., Yvas, P., Dhaliwal, H.S. (2017) Food waste: a potential bioresource for extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. *Bioresour. Bioprocess.***4 (18)**, 1-14.
- Li, B. B., Smith, B., & Hossain, M. M. (2006) Extraction of phenolics from citrus peels: II. Enzyme-assisted extraction method. *Sep. Purif. Technol.***48**, 189–196.
- Luque-Garcia, J., Luque de Castro, M. (2003) Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends Anal. Chem.***22(1)**, 41-47.
- Luque-Garcia, J., Luque de Castro, M. (2003) Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends Anal. Chem.***22(1)**, 41-47.
- Mihovilović, I. (2000) *Proizvodnja i prerada ljekovitog i aromatičnog bilja*. 1.izd. Zagreb: Prodigital d.o.o.
- Miranda, C.L., Maier, C.S., Stevens, J.F. (2012) Flavonoids. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Mussatto, S.I., Ballesteros, L.F., Martins, S., Teixeira, J.A. (2011) Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Sep. Purif. Technol.***83**, 173-179.
- Myint, S., Daud, W.R.W., Mohamad, B., Kadhum, A.A.H. (1995) Separation and Identification of Eugenol in Ethanol Extract of Cloves by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.***72 (10)**, 1231.-1233.
- Naczki, M.& Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr.***1054(1-2)**, 95–111.
- Nollet, L.M.L., Gutierrez-Urbe, J.A. (2018) Phenolic Compounds in Food: Characterization and Analysis. U:Flavonoids, (Durazzo, A., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 172-184.
- Penner, M.H. (2010) Basic Principles of Spectroscopy. U: Food analysis. (Nielsen, S., ured.), Springer Science+Business Media, LLC, str. 375-385.

Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.S., Chemat, F. (2012) An Improved Ultrasound Clevenger for Extraction of Essential Oils. *Food Anal. Methods***7**(1), 9-12.

Pino, J., Borges, P., Roncal, E. (1993) The chemical composition of laurel leaf oil from various origins. *Die Nahrung*, **37**(6), 592-595.

Rafiee, Z., Jafari, S.M., Alami, M., Khomeiri, M. (2011) Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *J Anim. Plant Sci.***21** (4), 738-745.

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

Rostagno, M.A., Palma, M., Barroso, C.G. (2003) Ultrasound assisted extraction of soy isoflavones. *J. Chromatogr. A*, **1012**, 119-128.

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

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

Shahidi, F., Yeo, J. (2016). Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules***21**(9), 1216.

Shalmashi, A. (2009) Ultrasound-assisted extraction of oil from tea seeds. *J. Food Lipids***16**(4), 465-474.

Sharma, A., Sharma, P., Sing Tuli, H., Sharma, A.K. (2018) Phytochemical and Pharmacological Properties of Flavonols. *Encyclopedia of Life Sciences*.

Sowbhagya, H.B., Srinivas, P., Purnima, K.T., Krishnamurthy, N. (2011) Enzyme-assisted extraction of volatiles from cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds. *Food Chem.***127** (4), 1856-1861.

Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S., Geros, H. (2013) Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments. *Int. J. Mol. Sci.***14** (9), 18711-18739.

Tomsone, L., Kruma, Z., Galoburda, R. (2012) Comparison of different solvents and extraction methods for isolation of phenolic compounds from horseradish roots (*A Armoracia rusticana*). *World Acad. Sci. Eng. Technol.* **64**, 903-908.

Veberič, R. (2010) Bioactive compounds in fruit plants . Biotehnološka fakulteta. Dostupno: [http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2712/Bioactive\\_compounds\\_in\\_fruit\\_plants\\_-\\_Veberic.pdf](http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2712/Bioactive_compounds_in_fruit_plants_-_Veberic.pdf) <Dostupno kolovoz 26, 2019>. Ljubljana, str. 8-11.

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. (2007) Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – A review. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.***9**, 161-169.

Wijesinghe, W.A.J.P., Jeon, Y.J. (2012) Enzyme-assisted extraction (EAE) of bioactive components: A useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: A review. *Fitoterapia*, **83**, 6-12.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Maja Maart

---

Ime i prezime studenta