

Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola vrste *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) s područja sjevernog i srednjeg Jadrana

Palić, Sanela

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:800262>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Sanela Palić

**Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola
vrste *Laurus nobilis* L. (Lauraceae)
s područja sjevernog i srednjeg Jadrana**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

Zahvaljujem se ponajprije mentorici, prof.dr.sc. Renati Jurišić Grubešić, na strpljenju, trudu i razumijevanju prilikom izrade ovoga rada.

Veliko hvala mojim najbližima koji su vjerovali u mene, pružali mi podršku i bodrili me u teškim i izazovnim trenucima, zahvaljujući kojima nisam posustala. Hvala vam i na nesebičnosti zbog koje smo mogli međusobno dijeliti sretne trenutke i na taj ih način uvećati.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Botanički podatci.....	2
1.1.1. Porodica Lauraceae Juss. 1789. (lovari, lovorovke, lovorike).....	2
1.1.2. Rod Laurus (lovari).....	3
1.1.3. Laurus nobilis L. (lovor, pravi lovor, lovorika)	4
1.2. Pregled istraživanja vrste <i>Laurus nobilis</i> L.	6
1.3. Biološki aktivne tvari vrste <i>Laurus nobilis</i> L.	7
1.3.1. Polifenoli	7
1.3.2. Trjeslovine ili tanini	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME	16
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. Biljni materijal.....	17
3.2. Aparatura i kemikalije.....	17
3.3. Metode i postupci istraživanja	18
3.3.1. Kvalitativna analiza trjeslovina	18
3.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	21
4.1. Rezultati kvalitativne analize trjeslovina	21
4.1.1. Rezultati dokazivanja trjeslovina kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga.....	21
4.1.3. Rezultati reakcije dokazivanja trjeslovina koje hidroliziraju	22
4.2. Rezultati kvantitativne analize ukupnih polifenola i trjeslovina	22
5. ZAKLJUČCI	27
6. LITERATURA	28
7. SAŽETAK / SUMMARY	31
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

Biljke su oduvijek prisutne u čovjekovu životu, primarno kao hrana, a sekundarno je spoznata i njihova ljekovita moć. Stoljećima su služile kao jedini izvor liječenja i ublažavanja boli, a prve spoznaje o upotrebi biljaka u medicinske svrhe datiraju još iz doba neandertalaca koji su, prema paleontološkim podacima, koristili čitav niz biljaka i njihovih ekstrakata.

Službena upotreba bilja u liječenju i prevenciji raznih stanja naziva se fitoterapija. Fitoterapija podrazumijeva korištenje biljaka i njihovih pripravaka u svrhu očuvanja i održavanja zdravlja, te prevencije i liječenja bolesti. Zbog sve veće popularnosti preparata na bazi ljekovitog bilja kojima se, prema podacima WHO (<http://www.who/>), služi 80% svjetske populacije, nužno je postaviti uvjete kojima fitoterapeutici moraju odgovarati zbog dobrobiti krajnjih korisnika. Fitoterapeutici ili fitofarmaceutici, prema definiciji (ESCOP - "Europe Scientific Cooperative on Phytotherapy"), kao aktivne sastojke sadrže biljke, biljne dijelove i njihove pripravke, a podrazumijevaju standardizirane biljne droge sa strogo definiranim sadržajem i sastavom terapijski aktivnih tvari, čija je učinkovitost potvrđena farmakološkim i kliničkim istraživanjima, uz naznaku mogućih nuspojava i interakcija s drugim lijekovima (<http://escop.com/>). U fitoterapeutike ubrajamo cijele ljekovite biljke, njihove dijelove (cvjetovi, korijenje, listovi) ili sastojke (eterična ulja), kao i pripravke (tinkture, suhe ekstrakte, uvarke i slično). Osim navedenog, fitoterapeuti upotrebljavaju i ekstrakte i pripravke gljiva i algi ljekovitog djelovanja. Standardizacijom i standardiziranim ekstraktom proizvođač jamči da se u 1 g ili 1 mL proizvoda nalazi točno određena količina aktivne komponente. Budući da biljne vrste, ovisno o lokalitetu na kojem rastu, mogu pokazivati različitost kemjskog sastava, bitno je specificirati i kemotip pojedine svojte. Na hrvatskom tržištu nalazimo dvije vrste preparata s biljnim djelatnim tvarima. Biljni lijek, prema Zakonu o lijekovima (NN 76/13), kao djelatne tvari sadrži isključivo jednu ili više tvari biljnog podrijetla ili jedan ili više biljnih pripravaka, ili jednu ili više biljnih tvari u kombinaciji s jednim ili više biljnih pripravaka. Služi za liječenje bolesti, djeluje farmakološki, standardiziran je, obvezna je kontrola kvalitete i reguliran je putem Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) (<http://www.halmed.hr/>). Nadalje, biljni dodaci prehrani su pripravci proizvedeni iz sirovina biljnog podrijetla, cilj im je obogaćenje prehrane u svrhu održavanja zdravlja, nemaju nužno dozu standardiziranu na sastavnice koje pridonose učinku i regulirani su putem Zavoda za javno zdravstvo, zakonodavstvom o hrani.

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza biološki aktivnih polifenolnih tvari iz listova različitih populacija vrste *Laurus nobilis* L. (*Lauraceae*) s područja sjevernog i srednjeg Jadrana, kao doprinos fitokemijskoj karakterizaciji i spoznavanju fitoterapijskog potencijala spomenute biljne vrste te kao prilog istraživanju različitih populacija iste biljne svojte.

1.1. Botanički podatci

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

Porodica lovora obuhvaća pedesetak rodova s oko 2550 vrsta rasprostranjenih u tropskom i suptropskom području (osobito u jugoistočnoj Aziji i tropskoj Americi), a malim dijelom i u umjerenom pojasu. Važniji rodovi ove porodice su: *Aniba* (npr. ruža drvo - *Aniba rosaeodora*), *Cinnamomum* (npr. kamforovac *Cinnamomum camphora*, pravi cimetovac - *Cinnamomum verum*), *Laurus* (npr. lovor - *Laurus nobilis*), *Litsea* (npr. licea - *Litsea citrata*), *Ravensara* (npr. ravensara - *Ravensara aromatica*), *Sassafras* (npr. sasafra - *Sassafras album*) (Marković, 2005).

Lovori su trajnice, uglavnom trajnozeleno drveće ili grmovi. Rijetko se razvijaju u obliku zeljastog bilja ili penjačica (*Cassytha*). Listovi su gotovo uvijek vazdazeleni, raspored im je zavojit i imaju karakteristike tzv. tvrdolisnih biljaka, tj. kožasti su i siromašni sokom (Nikolić, 2013). U ovoj porodici nalazimo pretežito aromatične biljke koje imaju eterično ulje lokalizirano u raznim dijelovima biljke: list (lovor, ravensara), kora i grančice (cimet), drvo (ruža drvo) i plodovi (licea) (Marković, 2005).

Zbog navedenih eteričnih ulja te brojnih korisnih svojstava i prirodnih produkata, biljke ove porodice su od velikog ekonomskog značaja. Tako, na primjer, čovjek iskorištava plod avokada (*Persea americana*) u prehrambene svrhe, list lovora (*Laurus nobilis*) kao začinsku biljku u kulinarstvu te kao ljekovitu biljku u narodnoj medicini i kozmetologiji, cimet (*Cinnamomum spp.*) kao začinsku biljku, kamfor u kozmetologiji i mnoge druge koje su primjenu pronašle u drvnoj industriji ili kao insekticidi.

U Republici Hrvatskoj zastupljena je samo jedna vrsta, lovor (*Laurus nobilis* L.), a rasprostranjena je uglavnom na obali Jadranskog mora (Slika 1).



Slika 1. Prikaz rasprostranjenosti vrste *Laurus nobilis* L. u Republici Hrvatskoj, Nikolić T. ur. (2015): Flora Croatica baza podataka.

1.1.2. Rod *Laurus* (lovori)

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

Rod obuhvaća dvije vazdazelene vrste, od kojih je *Laurus azorica* (Seub.) Franco rasprostranjen na Azorima, Kanarskom otočju, Madeiri te u Maroku, a *Laurus nobilis* L. u Francuskoj, na Pirinejskom, Apeninskom i Balkanskom poluotoku, u Turskoj te na Kavkazu.

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

Lovor je višegodišnji, vazdazeleni mediteranski grm ili srednje visoko stablo (10-15 m) s prsnim promjerom debla do 60 cm. U mladosti je kora debela, glatka i siva, a kasnije hrapava i crna. Listovi su zavojito raspoređeni, naizmjenični, na kratkoj peteljci, jednostavni, bez palistića, eliptični do duguljasti ili duguljasto suličasti, šiljata ili ušiljena vrha, cijela i često valovita ruba, dugi 7-12 cm, široki 2,5-4,5 cm, kožasti, s gornje strani tamnozeleni i sjajni, s donje strane zeleni bez sjaja, goli i vrlo aromatični (Grdinić i Kremer, 2009). U mezofilu lista lokalizirano je eterično ulje u posebnim stanicama - uljenicama. Okus listova je pomalo opor, gorak i ljut, a miris jak i ugodan (Kuštrak, 2005). Cvjetovi su jednospolni (biljke su dvodomne: muški i ženski cvjetovi razvijaju se na različitim stablima), sitni, žućkastobijeli, široki oko 1 cm, s četiri listića perigona koji su pri dnu srasli, skupljeni u postrane paštastaste cvatove, a razvijaju se od ožujka do svibnja. Muški cvjetovi imaju 8-12 prašnika raspoređenih po četiri u dva ili tri kruga, a prašnice se otvaraju s dva zaklopca prema unutrašnjosti cvijeta. Pri osnovici svih ili većine prašnika nalaze se po dvije žlijezde koje izlučuju nektar. U ženskim cvjetovima je jedan tučak i 2-4 zakržljala prašnika. Iz ženskog se cvijeta razvija plod koji je tamnoplava, jednosjemena, jajolika koštunica promjera 1-1,5 cm koja dozrijeva u kasnu jesen. Mesnati dio ploda sadrži eterično ulje. Biljka najbolje raste na svježim humusno-karbonatnim tlima, ali uspijeva i na suhim tlima i prilično je osjetljiva na niske temperature. Listovi se beru u kasnu jesen, suše u hladu u tankom sloju, u prozračnom i toplom prostoru oko mjesec dana (Grdinić i Kremer, 2009).

Lovor je biljka cijenjena iz antičkih vremena i posvećena grčkom bogu Apolonu, pa su ga u staroj Grčkoj sadili uz njegove hramove. Kao simbol mira i pobjede koristio se za izradu vijenaca za careve, generale i pjesnike. Danas se sušeni listovi koriste kao začim i poboljšivač okusa u kulinarскоj i prehrambenoj industriji. Lovor je prirodni konzervans, a povoljno djeluje i na probavljanje hrane (bolovi u želucu, nadimanje, loša probava). Rabi se i u proizvodnji alkoholnih pića i voćnih sokova. Listovi lovora, kao i plodovi, rabe se u pučkoj medicini i veterini kod gubitka apetita, grčeva u želucu i groznice. Nekoć je bila uvriježena izrada melema od lovora koji su, osobito u veterinarskoj medicini, bili popularni kod reume. (Kuštrak, 2005) .



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

Kemijski sastav

Lovorov list sadrži 1-3% eteričnog ulja s glavnom sastavnicom 1,8-cineolom (do 45%), monoterpenolima (do 15% linalola, do 5% α -terpineola) te malom količinom vrlo aktivnih seskviterpenskih laktona (do 2% kostunolida, dehidrokostuslakton, artemorin, verlоторin, santamarin i reynosin). U listu su prisutne i trjeslovine u velikom postotku te malo gorkih tvari. Plod sadrži 1% eteričnog ulja, 30-40% masnih ulja te šećera i škroba (Kuštrak, 2005; Marković, 2005).

Farmakološko djelovanje i upotreba lista lovora

Koristi se u pučkoj medicini i veterinarstvu. Čaj od listova lovora se koristio za grgljanje kod angine, kao oblog kod nagnječenja ili čireva, ali i protiv grčeva u probavnim organima, mučnine u želucu te gubitku apetita (anoreksija). Svojedobno se čaj preporučivao i protiv bronhitisa, hunjavice i gripe, ali danas se pripravci lista lovora za unutarnju upotrebu rijetko koriste. Kao kupka djeluje vrlo opuštajuće i antireumatski. Iscrpina od narezanih listova u alkoholu upotrebljava se kod istegnuća tetiva, uganuća i reume. Osušeni listovi najčešće se koriste kao začim u kulinarstvu za razna jela jer njegov gorak okus djeluje kao digestiv ili stomahik. U Dalmaciji listove koriste kod konzerviranja i pakiranja suhog voća, naročito smokava, a ujedno je i repelent. Može se upotrebljavati i za proizvodnju alkoholnih pića (Kuštrak, 2005).

Farmakološko djelovanje i upotreba eteričnog ulja lista lovora

Dokazano je djelovanje eteričnog ulja kod prehlada, upale krajnika i kod različitih virusa. Umjereno je aktivno protiv bakterija, ima baktericidno i antiseptičko djelovanje, ali vrlo je aktivno protiv gljivica, naročito vrsta roda *Candida*. Ujedno je i jak ekspektorans, analgetik i spazmolitik. Primjenjuje se dermalno za masažu u aromaterapiji, protiv kožnih osipa, za masnu kožu i akne, protiv boli u mišićima i zglobovima, kod reumatoidnog artritisa, lokalno kod afti i inhalacijski kod virusne infekcije dišnog sustava. No, valja biti oprezan jer zbog visokog sadržaja seskviterpenskih laktona, kod preosjetljivih osoba, može izazvati alergijski dermatitis. U farmaceutskoj se industriji koristi u izradi sapuna, krema, losiona, parfema pa čak i detergenata (Kuštrak, 2005).

1.2. Pregled istraživanja vrste *Laurus nobilis* L.

Iako još nema upotrebu u fitoterapiji, lovor jest predmet znanstvenih istraživanja, prvenstveno zbog sadržaja polifenolnih tvari i eteričnog ulja.

Polifenoli su tvari poznate po svom antioksidativnom djelovanju, stoga ne čudi potreba za ispitivanjem njihovih udjela i aktivnosti u ekstraktima biljnih vrsta koje ih sadrže. U istraživanju koje je ispitivalo antioksidativni kapacitet ekstrakta lista lovora i njegov učinak na smanjenje štetnosti TCDD-a (2,3,7,8-tetraklordibenzo-p-dioksin) na stanicama jetre miša, dokazano je ublažavanje toksičnog učinka TCDD-a na hepatocite te je pokazano kako antioksidativni kapacitet hepatocita značajno raste s povećanjem doze dodanog ekstrakta (Turkez i Geyikoglu, 2011). Talijanski znanstvenici su 2014. godine istraživali neuroprotektivni potencijal antioksidativnog, polifenolima obogaćenog, ekstrakta lovorovog lista. Kako je pretpostavljeno da je oksidativni stres važan faktor u razvoju Alzheimerove bolesti, počelo je razmatranje biljnih droga s antioksidativnim svojstvima kao alternativni i valjani pristup liječenju neurodegenerativnih bolesti (Pacífico i sur., 2014).

Eterično ulje predmet je istraživanja zbog potencijalnog antimikrobnog i antifungalnog učinka. Kako je velik zdravstveni problem cijelog svijeta rastuća mikrobna rezistencija, potencijalni antibiotici iz biljaka predstavljaju korisnu alternativu. Studija provedena od strane turskih znanstvenika, koja je proučavala učinak eteričnog ulja izoliranog iz listova lovora,

dokazala je antimikrobno djelovanje ulja na bakterijama *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium* (El i sur., 2014).

U studiji provedenoj u Brazilu, čiji je cilj bio otkrivanje antifungalnog potencijala eteričnog ulja iz lista lovora na kulturi *Cryptococcus neoformans*, kemijski sastav eteričnog ulja određen je plinskom kromatografijom uparenom s masenom spektrofotometrijom (GC/MS), a minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) i minimalna fungicidna koncentracija (MFC) određene su tehnikom mikrorazrjeđenja bujona. MIC₁₀₀ eteričnog ulja bio je 256 µg/mL, a MFC₅₀ 1024 g/mL te je dokazan antifungalni učinak eteričnog ulja *in vitro* (Pinheiro i sur., 2017).

Istraživanja s eteričnim uljem također su pokazala i učinak na smanjuje lipidne peroksidacije i nastajanje slobodnih radikala te inhibiciju alfa glukozidaze, što ukazuje na potencijalnu ulogu u terapiji dijabetesa (Sahin Basak i Candan, 2013).

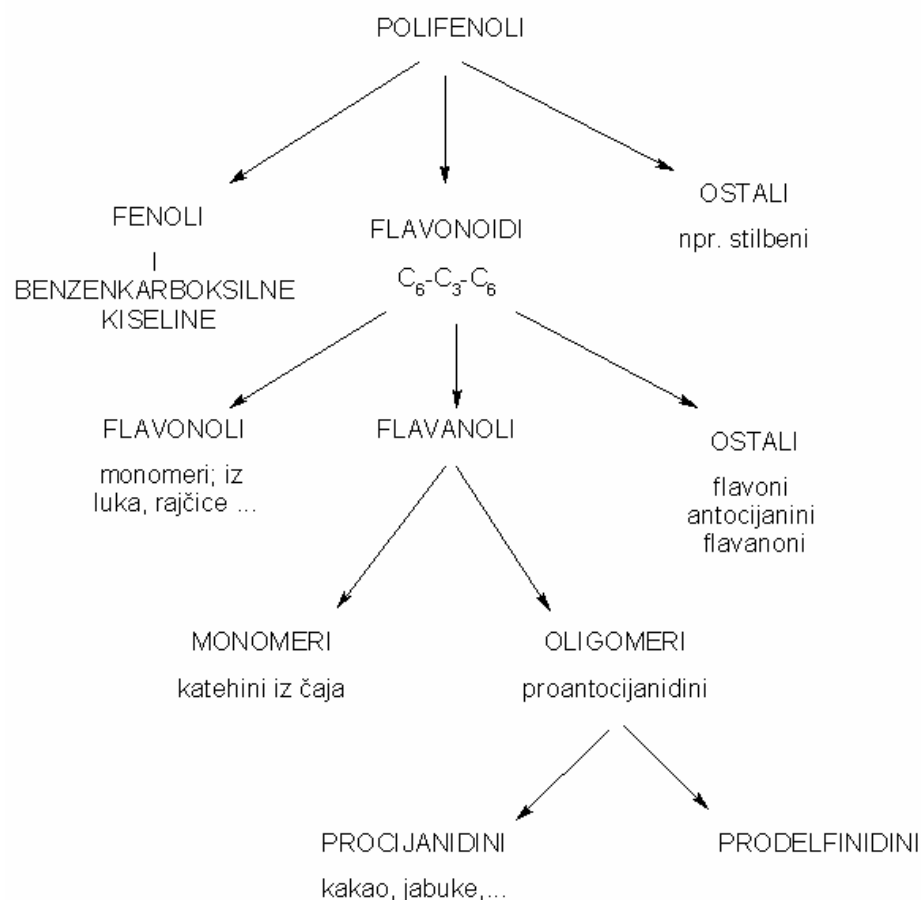
1.3. Biološki aktivne tvari vrste *Laurus nobilis* L.

1.3.1. Polifenoli

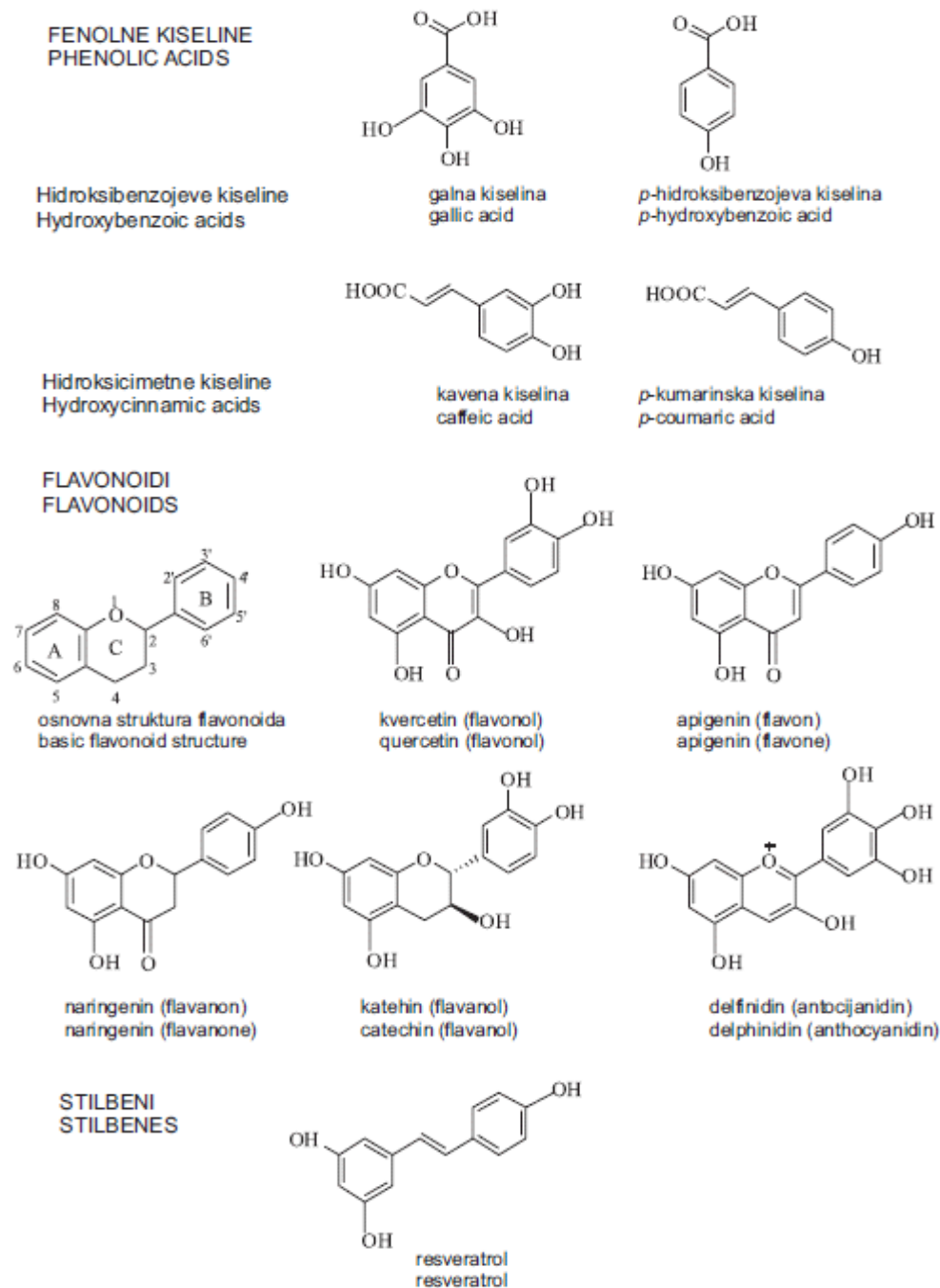
Struktura i značajke

Polifenoli su jedna od najzastupljenijih i najbrojnijih skupina biljnih tvari. U skupinu polifenola ubraja se više od 8000 spojeva različite kemijske strukture. Osnovno je obilježje polifenola prisutnost jedne ili više hidroksiliranih aromatskih prstenova (Bravo, 1998). Sekundarni su metaboliti biljnog metabolizma. Polifenole sačinjavaju fenolne kiseline, flavonoidi i stilbeni. Među fenolnim kiselinama razlikuju se derivati hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Aglikoni flavonoida, tj. flavonoidi bez vezanih molekula šećera, posjeduju strukturu tipa C₆-C₃-C₆. Pritom su atomi ugljika raspoređeni tako da su dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem koji može ili ne mora formirati treći prsten. Stilbeni su polifenoli koji nemaju osnovnu strukturu flavonoida, a sadrže 1,2-difeniletan kao funkcionalnu skupinu (Rastija i Medić-Šarić, 2009; Haslam i Cai, 1994). Polifenoli se sintetiziraju iz dva glavna biosintetska puta: put šikiminske kiseline i acetatni put (acilpolimalonatni put). Šikiminska kiselina je ključna tvar u nastanku aromatskih prirodnih spojeva. Univerzalni je prekursor u biosintezi aromatskih aminokiselina u mikroorganizmima (bakterijama, gljivicama) i višim biljkama, ali ne i u životinjskim organizmima (Vladimir-Knežević, 2008; Bravo, 1998).

U prirodi se polifenoli uglavnom nalaze u konjugiranom obliku, tj. u obliku glikozida, s jednom ili više šećernih jedinica koje su vezane na hidroksilne skupine (premda postoje i oblici u kojima su šećerne jedinice vezane izravno na aromatski ugljikov atom). Vezani šećeri mogu biti u obliku monosaharida, disaharida pa čak i oligosaharida, a najzastupljenija šećerna jedinica je glukoza. Šećerna komponenta može sadržavati i mnoge druge šećere, poput galaktoze, ramnoze, ksiloze i arabinoze, kao i glukoronsku te galakturonsku kiselinu. Polifenoli se mogu konjugirati i s drugim tvarima, kao što su različite karboksilne i organske kiseline, amini i lipidi. Česte su i konjugacije s drugim fenolnim spojevima (Bravo, 1998). Podjela polifenola (Slika 3) temelji se na broju fenolnih prstenova koje sadrže i na strukturnim elementima koji te prstenove povezuju (Berend i Grabarić, 2008).



Slika 3. Osnovna podjela polifenola (Berend i Grabarić, 2008).



Slika 4. Kemijske strukture polifenola (Rastija i Medić-Šarić, 2009).

Rasprostranjenost

Polifenoli su česti sastojci hrane biljnog podrijetla i glavni antioksidansi u našoj prehrani. Dnevno se prehranom unese oko 1 g polifenola, što je mnogo više od unosa ostalih poznatih antioksidansa. Ta je količina deset puta veća od prosječnog unosa vitamina C te sto puta veća od prosječnog unosa vitamina E i karotenoida. Glavni su izvori polifenola u prehrani voće i pića dobivena od biljaka, kao što su voćni sokovi, čaj, kava i crno vino. Tako, primjerice, grožđe, jabuke, kruške, trešnje i razno bobičasto voće sadrže 200-300 mg polifenola na 100 g svježeg voća, a čaša crnog vina, šalica čaja ili kave sadrže u prosjeku oko 100 mg polifenola (Scalbert i sur., 2005; Pandey i Rizvi, 2009).

Neki su polifenoli, poput kvercetina, prisutni u svim biljnim produktima, a neki su pak ograničeni na specifične namirnice (flavanoni u citrusnom voću, izoflavoni u soji, floridzin u jabukama). Namirnice većinom sadrže kompleksnu smjesu polifenola pa je zato za mnoge točan sastav polifenola slabo poznat. Na sastav polifenola utječu okolišni čimbenici, koji mogu biti pedoklimatski (tip tla, izloženost sunčevoj svjetlosti, količina padalina) ili agronomski (uzgoj u stakleniku ili na otvorenom, ukupni urod po jednoj biljci i dr.). Skladištenje također može utjecati na sadržaj polifenola ukoliko se radi o polifenolima koji su podložni oksidaciji. Reakcije oksidacije dovode do nastanka jedne ili više polimernih molekula, što dovodi do promjena u kakvoći namirnice i organoleptičkim svojstvima koje mogu biti poželjne (crni čaj) ili nepoželjne (smeđa boja narezanog voća). Priprema hrane također utječe na količinu polifenola prisutnih u namirnicama. Primjerice, guljenje voća i povrća uklonit će značajnu količinu polifenola, budući da su polifenoli često u značajno većim koncentracijama prisutni u vanjskim dijelovima voća i povrća nego u unutrašnjim. Znatan gubitak polifenola događa se i termičkom pripremom hrane (Manach i sur., 2004).

Biološki učinci

Sve do sredine 1990-ih godina, najviše proučavani antioksidansi bili su antioksidativni vitamini, karotenoidi i minerali. Istraživanja na flavonoidima i ostalim polifenolima, njihovim antioksidativnim svojstvima i prevenciji bolesti počela su 1995. godine. Glavni čimbenik koji je odgađao provedbu istraživanja bila je značajna različitost i složenost kemijskih struktura (Scalbert i sur., 2005).

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

Trenutni dokazi jasno pokazuju doprinos polifenola prevenciji kardiovaskularnih bolesti, raka i osteoporoze te sugeriraju ulogu u prevenciji dijabetesa i neurodegenerativnih bolesti. Tako je, primjerice, crno vino bogat izvor polifenolnih antioksidansa i smatra se uzrokom fenomena „francuski paradoks“ (označava zapanjujuće nisku pojavnost koronarnih bolesti srca u Francuskoj, unatoč konzumaciji hrane s puno masnoća, a povezana je s konzumacijom crnog vina koje sadrži visoke količine polifenolnih spojeva). Smatra se kako su upravo polifenolni antioksidansi prisutni u ekstradjevičanskom maslinovom ulju zaslužni za pozitivan učinak mediteranske prehrane na zdravlje (Castañer i sur., 2011; Scalbert i sur., 2005).

Osim navedenoga, polifenoli, kao fitokemikalije prisutne u gotovo svim namirnicama biljnog podrijetla, moduliraju aktivnost velikog broja enzima (telomeraza, ciklooksigenaza, lipooksigenaza i dr.) te staničnih receptora. Mogu stupati i u interakciju s različitim signalnim putevima i tako utjecati na transdukciju signala, a sve je više i dokaza koji govore u prilog utjecaju polifenola na regulaciju staničnog ciklusa te na funkciju trombocita (D'Archivio i sur., 2007; Manach i sur., 2004).

Puno dokaza o prevenciji bolesti primjenom polifenola potječe od *in vitro* istraživanja ili pokusa na životinjama, koji se često provode dozama mnogo većim od onih kojima su izloženi ljudi kroz prehranu. Očito je da polifenoli poboljšavaju status različitih biomarkera oksidativnog stresa. No, mnogo nesigurnosti i dalje postoji vezano uz značaj tih biomarkera kao prediktora bolesti i prikladnosti korištenih metoda. Također, postoje i studije s kontradiktornim rezultatima, koje govore o prooksidativnom učinku polifenola zbog kojega mogu posljedično inducirati apoptozu i inhibirati staničnu proliferaciju. Jedan od razloga kontradiktornih rezultata leži u tome što polifenolne tvari čini veliki broj različitih spojeva s različitim biološkim djelovanjem, stoga se učinak jednog polifenolnog spoja ne može generalizirati za ostale spojeve. Kako se istraživanja često provode na puno većim dozama od onih unesenih prehranom, nužno je poznavanje bioraspoloživosti i metabolizma različitih polifenolnih spojeva, kao i poznavanje rasprostranjenosti te sadržaja tih spojeva u hrani. Ta su znanja neophodna za razumijevanje

odnosa između unosa polifenola hranom i rizika za razvoj različitih bolesti. Poznavanje bioraspoloživosti polifenolnih spojeva, koja značajno varira između različitih vrsta tih spojeva, iznimno je važna, budući da polifenoli najzastupljeniji u našoj prehrani ne moraju nužno imati i najbolju bioraspoloživost (Primorac, 2012; Scalbert i sur., 2005; Sun i sur., 2002).

1.3.2. Trjeslovine ili tanini

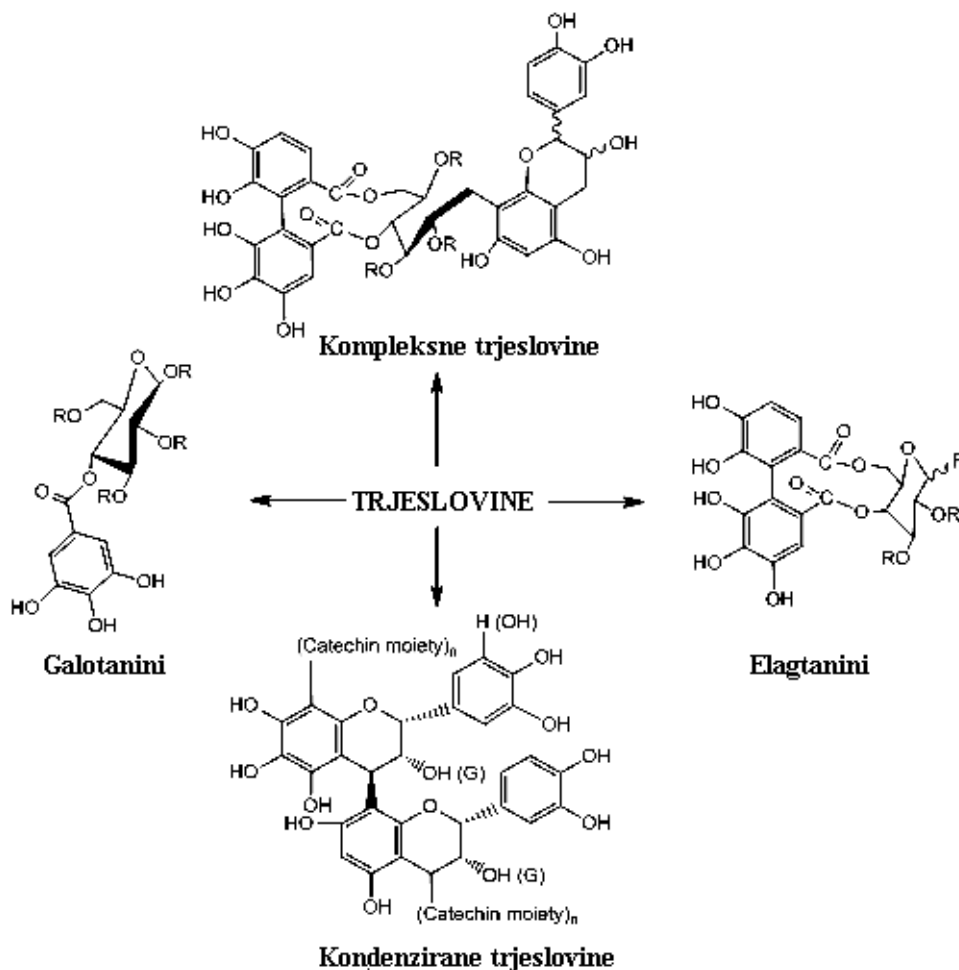
Struktura i značajke

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

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

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

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



Slika 5. Podjela trjeslovina (Ascacio-Valdés i sur., 2011).

Trjeslovine koje hidroliziraju

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

Kondenzirane trjeslovine

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

Rasprostranjenost

Trjeslovine ili tanini široko su rasprostranjeni u biljnom svijetu. Najpoznatije porodice od kojih sve vrste sadrže trjeslovine jesu: od dvosupnica Aceraceae, Actinidiaceae, Anacardiaceae, Bixaceae, Burseraceae, Combretaceae, Dipterocarpaceae, Ericaceae te Najadaceae i Typhaceae od jednosupnica (Mole, 1993). Vrste porodica Brassicaceae (syn. Cruciferae) i Papaveraceae ne sadrže trjeslovine (Rangari, 2007). Trjeslovine su neravnomjerno raspoređene u biljci, pri čemu ih najviše sadrži kora stabljike, zatim kora korijena, ksilemski dijelovi, listovi, i konačno, plodovi. Trjeslovinama su najbogatije patološke tvorevine, *Gallae* ili sisarke (šiške). Radi se o patološkim izraslinama na listu azijskog hrasta i na listovima ruja koje su nastale razvojem ličinke ose (azijski hrast) ili jedne vrste biljnih uši (kineski ruj), a mogu sadržavati do 75% trjeslovina. Razvija se larva, a biljka zbog podražaja stvara trjeslovine. S obzirom na starost pojedinih biljnih organa, utvrđeno je da se trjeslovine javljaju u većoj količini u mlađim dijelovima biljke (lisnim pupoljcima, mladim listovima i cvjetovima), što se objašnjava time da biljka gomila trjeslovine u onim dijelovima koji su joj najvrjedniji. Količina tanina u biljci varira ovisno o različitim okolišnim i sezonskim čimbenicima. Suša, visoka temperatura, velika izloženost svjetlu i slaba kvaliteta zemlje stvaraju uvjete koji pogoduju povećanom sadržaju

trjeslovina u biljci. Sezonska varijabilnost sadržaja ovisi o fazi rasta biljke pa je tako sinteza tanina najintenzivnija u fazi cvatnje biljke, kada je smanjen njezin rast, pa su tada brojni prekursori na raspolaganju za sintezu fenolnih spojeva (Kalodera, 2010; Vladimir-Knežević, 2008).

Biološki učinci

Fiziološko značenje trjeslovina prilično je nejasno. Smatralo se da njihov gorak i trpak okus štiti biljku od štetočina, što se kasnije pokazalo netočnim. Niti pretpostavka da su trjeslovine pričuvene tvari nije se pokazala ispravnom jer se rijetko nalaze u biljnim dijelovima koji služe kao spremnici pričuvenih tvari. No, sa sigurnošću se može ustvrditi da u nekih biljaka trjeslovine sudjeluju u izmjeni tvari stvaranjem redoks sustava. Naime, zahvaljujući brojnim hidroksilnim skupinama u strukturi, trjeslovine djeluju kao snažni antioksidansi, pri čemu one veće molekulske mase djeluju kao jači hvatači slobodnih radikala. Također je poznato da su trjeslovine kelatori metala i da talože proteine. Trjeslovine mogu same po sebi biti i djelatne tvari, a može ih se promatrati i kao pratioce drugih aktivnih tvari, pri čemu utječu na terapijski učinak glavne aktivne komponente (Primorac, 2012; Hagerman, 2002). Glavna upotreba trjeslovina je povezana s njihovim adstrigenim učinkom. Djeluju protiv dijareje i antiseptički, štiteći izložene membrane sluznice koagulacijom, stvarajući vodonepropusni sloj. Precipitirajući proteine, trjeslovine djeluju antimikrobno i antifungalno. Također imaju hemostatsko djelovanje, i mogu djelovati kao antidoti kod nekih slučajeva trovanja (teškim metalima, crnom kavom i većinom alkaloida). Interno se još mogu koristiti i kod želučanog i crijevnog katara te hiperaciditetnog gastritisa. U procesu cijeljenja rana, opekлина, ozeblina i upala, trjeslovine pomažu stvaranjem zaštitnog sloja preko ozlijeđenog tkiva, omogućavajući da se ispod njega slobodno odvija cijeljenje. Istraživanja su pokazala da mnoge trjeslovine neutraliziraju slobodne radikale, a poznato je da su mnoge degenerativne bolesti (rak, multipla skleroza, ateroskleroza, proces starenja) povezane s visokim koncentracijama slobodnih radikala između stanica. Također, određeni tipovi trimernih proantocijanidina mogu štititi protiv bolesti urinarnog trakta. No, trjeslovine su raznoliki spojevi s velikom varijacijom strukture i koncentracije u biljnom svijetu. Zbog toga su biomedicinska istraživanja pozitivnih i negativnih učinaka na zdravlje pri povećanom unosu trjeslovina značajno ograničena nedostatkom metoda za brzu karakterizaciju i standardizaciju (de Jesus i sur., 2012; Kalodera, 2010; Zhang i Lin, 2008; Rangari, 2007).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj je ovoga diplomskog rada kvalitativna i kvantitativna analiza polifenolnih tvari lista lovora (*Laurus nobilis* L., Lauraceae) iz hrvatskih populacija koje rastu na području sjevernog i srednjeg Jadrana.

Kvalitativna analiza obuhvatila je dokazivanje polifenola i trjeslovina u ekstraktima listova lovora primjenom reakcija stvaranja obojenih produkata i taloga, dok je sadržaj ukupnih polifenola i trjeslovina određen spektrofotometrijski.

Svrha fitokemijske karakterizacije provedene u okviru ovoga diplomskog rada jest doprinos znanstvenim istraživanjima hrvatskih populacija vrste *Laurus nobilis* L., s naglaskom na njihov polifenolni sastav i sadržaj, a rezultati provedenih istraživanja mogu poslužiti kao osnova daljnjih istraživanja njihove biološke aktivnosti te fitoterapijskog potencijala pripravaka lovora.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Biljni materijal

Biljni materijal vrste *Laurus nobilis* L. prikupljen je tijekom rujna 2014. godine na šest lokaliteta s područja sjevernog i srednjeg Jadrana: Lovran, Cres, Mali Lošinj, Dugi Otok, Žirje i Split.

Identifikacija biljnog materijala provedena je u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (prema: Domac, 1994). Analizirani su listovi lovora usitnjeni u prah.



Slika 6. Listovi lovora (<http://serpentarius.com.br/ervas-flores-etc/>).

3.2. Aparatura i kemikalije

Aparati i pribor:

- UV-Vis spektrofotometar Agilent 8453 E (Hewlett Packard, Njemačka); kiveta 1 cm;
- PC-HP 845x UV-Visible System (Hewlett-Packard, Njemačka);
- stalci i lijevci za odjeljivanje, povratna hladila, pipete, propipete, menzure, lijevci, čaše, epruvete, kapalice, filter papir;
- odmjerne tikvice; Erlenmeyerove tikvice

Kemikalije:

- Folin-Ciocalteuov fenolni reagens (Merck, Darmstadt, Njemačka);
- formaldehid (T.T.T. doo, Sveta Nedjelja, Hrvatska);
- kalijev hidroksid (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- kazein (Calbiochem, Darmstadt, Njemačka);
- klorovodična kiselina, konc. (Kemika, Zagreb);
- metanol (Carlo Erba, Rodano, Italija);
- natrijev acetat (Alkaloid, Skopje, Makedonija);
- natrijev karbonat dekahidrat (Poch, Gliwice, Poljska);
- octena kiselina, led. (Panreac, Barcelona, Španjolska);
- olovov(II) acetat (Kemika, Zagreb);
- vanilin (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- želatina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka);
- željezov(III) amonijev sulfat (Alkaloid, Skopje, Makedonija);
- željezov(III) klorid heksahidrat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka).

3.3. Metode i postupci istraživanja

3.3.1. Kvalitativna analiza trjeslovina

Dokazivanje trjeslovina kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga

Priprava ekstrakta

0,5 g u prah samljevenih listova vrste *Laurus nobilis* pojedinačno se ekstrahira 15 minuta s 50 mL destilirane vode, u tikvici s povratnim hladilom, u kipućoj vodenoj kupelji. Ohlađeni ekstrakt se filtrira.

Opće reakcije

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

Dokazivanje kondenziranih trjeslovina

U 6 mL ekstrakta dodaju se 3 kapi otopine formaldehida i 6 kapi 10%-tne klorovodične kiseline. Sadržaj se ugrije do vrenja, ohladi, te zatim profiltrira. Potom se filter papir ispere s 1 mL tople vode. Dokaz kondenziranih trjeslovina predstavlja talog na filter papiru koji je netopljiv u toploj 5%-tnoj otopini kalijeva hidroksida.

Dokazivanje trjeslovina koje hidroliziraju

U 5 mL filtrata, koji se dobiva u prethodnoj reakciji taloženja kondenziranih trjeslovina s formaldehidom i klorovodičnom kiselinom, doda se 1 g natrijeva acetata trihidrata (bez protresivanja epruvete), a zatim 1 mL 1%-tne otopine željezova(III) amonijeva sulfata. U prisutnosti trjeslovina koje hidroliziraju, javlja se ljubičasti prsten na mjestu prikladnog pH.

3.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina

Količina ukupnih polifenola u listovima vrste *Laurus nobilis* L. određena je spektrofotometrijskom metodom (Schneider, 1976).

Fino usitnjeni nadzemni biljni dijelovi (0,25 g) ekstrahiraju se s 80 mL 30%-tnog metanola u tikvici s povratnim hladilom, zagrijavanjem na kipućoj vodenoj kupelji oko 15 minuta. Nakon hlađenja, iscrpina je profiltrirana u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopunjena do oznake 30%-tnim metanolom. 2,0 mL filtrata pomiješano je s 8 mL destilirane vode i 10 mL otopine natrijeva acetata (1,92 g natrijeva acetata trihidrata i 0,34 mL octene kiseline pomiješano je i nadopunjeno destiliranom vodom do 100,0 mL). Puferska otopina održava stalnu pH-vrijednost medija (pH =

5), koja je optimalna za taloženje trjeslovina. Otopina dobivena na opisani način označena je kao *otopina 1*. 10,0 mL *otopine 1* mućkano je s 50 mg kazeina na mućkalici 45 minuta. Potom je otopina profiltrirana, a dobiveni je filtrat predstavljao *otopinu 2*.

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

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

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

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

A = izmjerena apsorbancija otopine 1, odnosno otopine 2

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati kvalitativne analize trjeslovina

4.1.1. Rezultati dokazivanja trjeslovina kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga

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

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

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

Reakcijom trjeslovina sa željezovim(III) amonijevim sulfatom nastaje zelenoplavo obojenje.

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

Ovom reakcijom nije došlo do promjene boje niti nastajanja taloga.

4. Reakcija taloženja dodatkom želatine u vodeni ekstrakt droge

U reakciji trjeslovina sa želatinom nastalo je blijedožuto zamućenje.

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

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

Intenziteti zamućenja/obojenja nisu se znatno razlikovali između ispitanih populacija lovora.

4.1.2. Rezultati reakcije dokazivanja kondenziranih trjeslovina

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

U ekstraktu vrste *Laurus nobilis* dokazana je prisutnost kondenziranih trjeslovina nastajanjem netopljivog taloga za sve ispitane ekstrakte.

4.1.3. Rezultati reakcije dokazivanja trjeslovina koje hidroliziraju

Filtratu iz reakcije za dokazivanje kondenziranih trjeslovina doda se 1 g natrijevog acetata trihidrata bez protresivanja, a zatim 1 mL 1%-tne otopine željezova(III) amonijeva sulfata. U svim ispitanim ekstraktima lovora dokazana je prisutnost trjeslovina koje hidroliziraju jer se pojavio jasno vidljiv ljubičasti prsten na mjestu prikladnog pH.

4.2. Rezultati kvantitativne analize ukupnih polifenola i trjeslovina

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

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

Za izmjerene vrijednosti apsorbancija *otopine 1* i *otopine 2* dobiju se pripadajuće koncentracije iz baždarnog dijagrama i izraze kao gramu ukupnih polifenola, odnosno trjeslovina, na 100 g droge (%), pri čemu vrijedi izraz:

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

A = izmjerena apsorbancija otopine 1, odnosno otopine 2

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

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola i trjeslovina prikazani su u Tablicama 1 i 2.

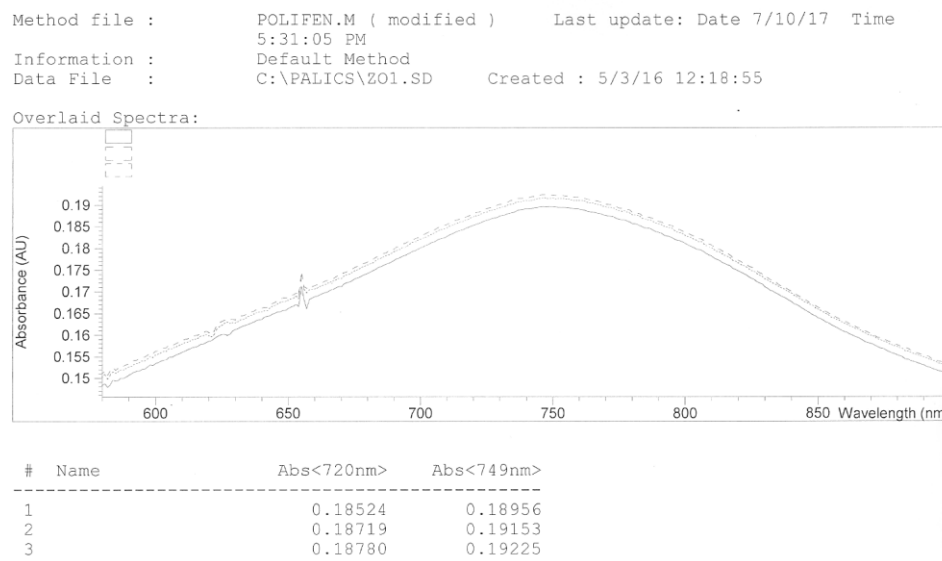
Tablica 1. Sadržaj ukupnih polifenola i trjeslovina u ekstraktima listova lovora s područja sjevernog i srednjeg Jadrana, mjereno na 720 nm (metoda prema Schneideru).

Uzorak	Ukupni polifenoli		Polifenoli nevezani na kazein		Trjeslovine vezane na kazein		Sadržaj ukupnih polifenola		Sadržaj trjeslovina vezanih na kazein	
	A _{720nm} otopine 1	Srednja vrijednost ot1 ± SD	A _{720nm} otopine 2	Srednja vrijednost ot. 2 ± SD	A1-A2	Srednja vrijednost (ot. 1 - ot. 2) ± SD	%	Srednja vrijednost ± SD	%	Srednja vrijednost ± SD
Cres	0,156	0,1563 ± 0,0011	0,089	0,0890 ± 0,0007	0,067	0,0673 ± 0,0018	6,24	6,2533 ± 0,0444	2,68	2,6933 ± 0,0711
	0,158		0,088		0,070		6,32		2,8	
	0,155		0,090		0,065		6,2		2,6	
Dugi Otok	0,150	0,1517 ± 0,0011	0,108	0,1073 ± 0,0004	0,042	0,0443 ± 0,0016	6,00	6,0667 ± 0,0444	1,68	1,7733 ± 0,0622
	0,153		0,107		0,046		6,12		1,84	
	0,152		0,107		0,045		6,08		1,8	
Lovran	0,154	0,1560 ± 0,0033	0,102	0,1013 ± 0,0009	0,052	0,0547 ± 0,0029	6,16	6,2400 ± 0,1333	2,08	2,1867 ± 0,1156
	0,161		0,102		0,059		6,44		2,36	
	0,153		0,100		0,053		6,12		2,12	
Mali Lošinj	0,170	0,1750 ± 0,0033	0,099	0,1017 ± 0,0022	0,071	0,0733 ± 0,0018	6,8	7,0000 ± 0,1333	2,84	2,9333 ± 0,0711
	0,177		0,101		0,076		7,08		3,04	
	0,178		0,105		0,073		7,12		2,92	
Split	0,185	0,1830 ± 0,0013	0,091	0,0947 ± 0,0024	0,094	0,0883 ± 0,0038	7,4	7,3200 ± 0,0533	3,76	3,5333 ± 0,1511
	0,182		0,097		0,085		7,28		3,4	
	0,182		0,096		0,086		7,28		3,44	
Žirje	0,185	0,1863 ± 0,0009	0,107	0,1073 ± 0,0004	0,078	0,0790 ± 0,0007	7,4	7,4533 ± 0,0356	3,12	3,1600 ± 0,0267
	0,187		0,107		0,08		7,48		3,2	
	0,187		0,108		0,079		7,48		3,16	

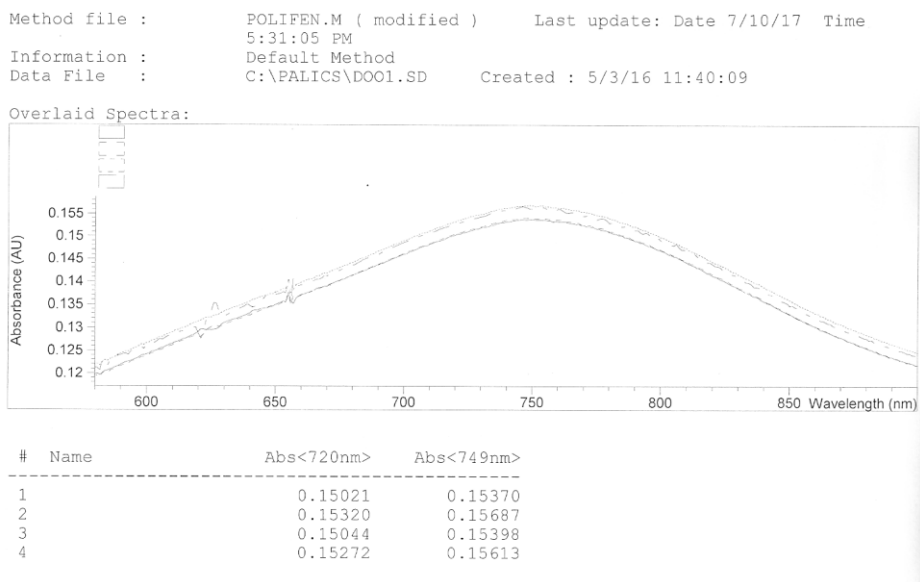
Tablica 2. Sadržaj ukupnih polifenola i trjeslovina u ekstraktima listova lovora s područja sjevernog i srednjeg Jadrana, mjereno na 749 nm (maksimum apsorpcije).

Uzorak	Ukupni polifenoli		Polifenoli nevezani na kazein		Trjeslovine vezane na kazein		Sadržaj ukupnih polifenola		Sadržaj trjeslovina vezanih na kazein	
	A _{749nm} otopine 1	Srednja vrijednost ot1 ± SD	A _{749nm} otopine 2	Srednja vrijednost ot. 2 ± SD	A1-A2	Srednja vrijednost (ot. 1 - ot. 2) ± SD	%	Srednja vrijednost ± SD	%	Srednja vrijednost ± SD
Cres	0,161	0,1610 ± 0,0013	0,091	0,0917 ± 0,0009	0,07	0,0693 ± 0,0022	6,44	6,4400 ± 0,0533	2,8	2,7733 ± 0,0889
	0,163		0,091		0,072		6,52		2,88	
	0,159		0,093		0,066		6,36		2,64	
Dugi otok	0,154	0,1557 ± 0,0011	0,110	0,1093 ± 0,0004	0,044	0,0463 ± 0,0016	6,16	6,2267 ± 0,0444	1,76	1,8533 ± 0,0622
	0,157		0,109		0,048		6,28		1,92	
	0,156		0,109		0,047		6,24		1,88	
Lovran	0,158	0,1593 ± 0,0031	0,104	0,1037 ± 0,0004	0,054	0,0557 ± 0,0029	6,32	6,3733 ± 0,1224	2,16	2,2267 ± 0,1156
	0,164		0,104		0,06		6,56		2,4	
	0,156		0,103		0,053		6,24		2,12	
Mali Lošinj	0,174	0,1783 ± 0,0029	0,101	0,1037 ± 0,0022	0,073	0,0747 ± 0,0016	6,96	7,1333 ± 0,1156	2,93	2,9900 ± 0,0600
	0,180		0,103		0,077		7,2		3,08	
	0,181		0,107		0,074		7,24		2,96	
Split	0,187	0,1843 ± 0,0018	0,093	0,0970 ± 0,0027	0,094	0,0873 ± 0,0044	7,48	7,3733 ± 0,0711	3,76	3,4933 ± 0,1778
	0,184		0,099		0,085		7,36		3,4	
	0,182		0,099		0,083		7,28		3,32	
Žirje	0,190	0,1913 ± 0,0009	0,110	0,1103 ± 0,0004	0,08	0,0810 ± 0,0007	7,6	7,6533 ± 0,0356	3,2	3,2400 ± 0,0267
	0,192		0,110		0,082		7,68		3,28	
	0,192		0,111		0,081		7,68		3,24	

Najveći sadržaj polifenola zabilježen je u listovima lovora prikupljenima na otoku Žirju (Slika 7) i iznosio je $7,45 \pm 0,04\%$ (720 nm) i $7,65 \pm 0,04\%$ (749 nm), dok je najmanji sadržaj polifenola zabilježen u uzorcima s Dugog otoka (Slika 8), a iznosio je $6,07 \pm 0,04\%$ (720 nm) i $6,23 \pm 0,04\%$ (749 nm). U uzorcima s ostalih lokacija pokazan je pravilan rast sadržaja polifenola s padom vrijednosti geografske širine.

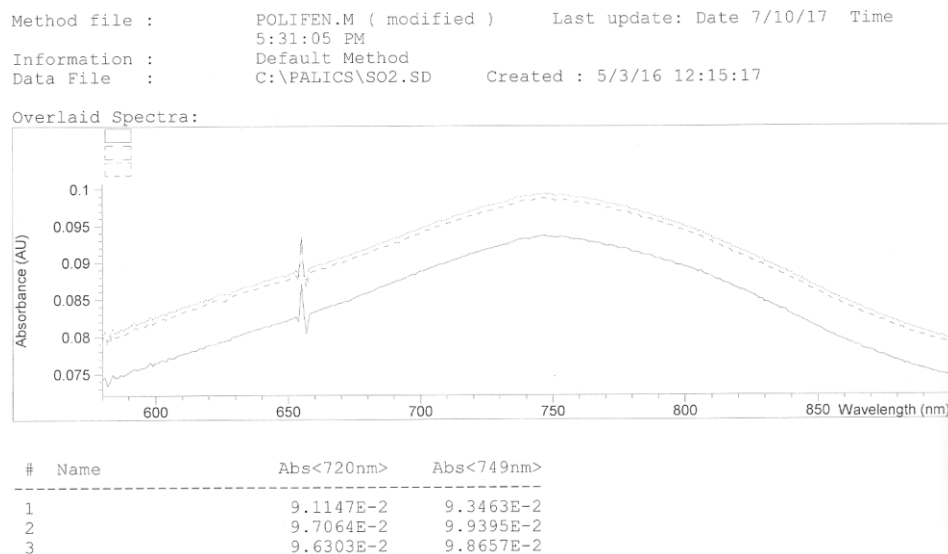


Slika 7. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije ukupnih polifenola u ekstraktu listova lovora, populacija Žirje.

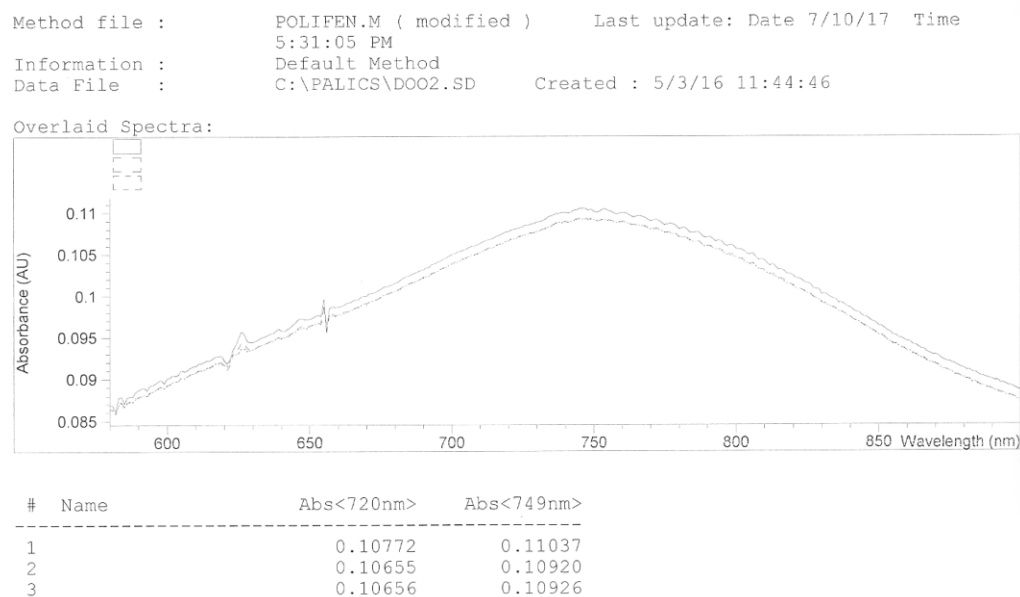


Slika 8. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije ukupnih polifenola u ekstraktu listova lovora, populacija Dugi otok.

Najveći udio trjeslovina u ekstraktima listova lovora zabilježen je u Splitu (Slika 9) i iznosio je $3,53 \pm 0,15\%$ (720 nm) i $3,49 \pm 0,18\%$ (749 nm), dok je najmanje trjeslovina određeno u uzorku s Dugog otoka (Slika 10): $1,77 \pm 0,06\%$ (720 nm) te $1,85 \pm 0,06\%$ (749 nm).



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



Slika 10. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije polifenola bez trjeslovina koje se talože kazeinom u ekstraktu listova lovora, populacija Dugi otok.

5. ZAKLJUČCI

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je djelomična fitokemijska karakterizacija vrste *Laurus nobilis* L. (lovor), koja je uključivala kvalitativnu i kvantitativnu analizu trjeslovina te kvantitativnu analizu ukupnih polifenola i trjeslovina iz listova lovora s područja sjevernog i srednjeg Jadrana (populacije Cres, Dugi Otok, Lovran, Mali Lošinj, Split i Žirje).

Kvalitativnom analizom trjeslovina dokazana je njihova prisutnost u svim ispitanim biljnim ekstraktima primjenom kemijskih reakcija stvaranja obojenih produkata i/ili taloga. Kondenzirane trjeslovine dokazane su reakcijom s formaldehidom i 10%-tnom klorovodičnom kiselinom, dok su s natrijevim acetatom i željezovim(III) amonijevim sulfatom dokazane trjeslovine koje hidroliziraju.

Kvantitativnom analizom određen je sadržaj ukupnih polifenola i trjeslovina u ispitanim ekstraktima listova lovora, a primijenjena je spektrofotometrijska metoda s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom, kojoj prethodi taloženje trjeslovina s kazeinom. Najveći sadržaj ukupnih polifenola u analiziranim uzorcima iznosio je 7,45% (720 nm), odnosno 7,65% (749 nm), a zabilježen je na otoku Žirju, dok je najmanji polifenolni sadržaj iznosio 6,07% (720 nm) / 6,23% (749 nm), a izmjeren je u uzorcima s Dugog otoka.

Najveći udio trjeslovina u ekstraktima listova lovora zabilježen je u Splitu i iznosio je 3,53% (720 nm), odnosno 3,49% (749 nm), dok je najmanji sadržaj trjeslovina određen u uzorku s Dugog otoka te je iznosio 1,77% (720 nm), tj. 1,85% (749 nm).

Rezultati dobiveni u okviru ovoga diplomskog rada predstavljaju prilog fitokemijskom istraživanju roda *Laurus*, pridonose dosadašnjim znanstvenim spoznajama o hrvatskim populacijama lovora te su potvrda fitoterapijskog potencijala te biljne vrste s obzirom na analizirani sadržaj bioaktivnih polifenolnih tvari.

6. LITERATURA

- Ascacio-Valdés JA, Buenrostro-Figueroa JJ, Aguilera-Carbo A, Prado-Barragán A, Rodriguez-Herrera R, Aguilar CN. Ellagitannins: Biosynthesis, biodegradation and biological properties. *J Med Plant Res*, 2011, 5, 4696-4703.
- Berend S, Grabarić Z. Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2008, 59, 205-212.
- Biljni lijekovi, <http://www.halmed.hr/> pristupljeno 6.7.2017.
- Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance. *Nutr Rev*, 1998, 56, 317-333.
- Castañer O, Fitó M, López-Sabater MC, Poulsen HE, Nyyssonen K, Schroeder H, Salonen JT, De la Torre-Carbot K, Zunft HF, De la Torre R, Baeumler H, Gaddi AV, Saez GT, Tomás M, Covas MI. The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial. *Clin Nutr*, 2011, 30, 490-493.
- D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*, 2007, 43, 348-361.
- de Jesus NZT, Falcão HS, Gomes IF, Leite TJA, Lima GRM, Barbosa-Filho JM, Tavares JF, Silva MS, Athayde-Filho PF, Batista LM. Tannins, Peptic Ulcers and Related Mechanisms. *Int J Mol Sci*, 2012, 13, 3203-3228.
- El SB, Karagozlu N, Karakaya S, Sahn S. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils extracted from *Laurus nobilis* L. leaves by using solvent-free microwave and hydrodistillation. *Food Nutr sci*, 2014, 5, 97-106.
- ESCAP, <http://escap.com/> pristupljeno 6.7.2017.
- Grdinić V, Kremer D. Ljekovito bilje i ljekovite droge: farmakoterapijski, botanički i farmaceutski podaci. Zagreb, Hrvatska ljekarnička komora, 2009, str. 19, 178, 349-350.
- Hagerman AE. The Tannin Handbook, Biological Activity of Tannins. Miami University, Oxford, Ohio, USA, 2002.

- Haslam E, Cai Y. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Nat Prod Rep*, 1994, 11, 41-66.
- Herbal medicines, <http://www.who/> pristupljeno 6.7.2017.
- Kalođera Z. Farmakognozija II, interna skripta. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2010, str. 75-79.
- Kuštrak D. Farmakognozija fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing- Tehnička knjiga, 2005, str. 295-299.
- Lauraceae, <https://hirc.botanic.hr/fcd/>, pristupljeno 5.7.2017.
- Laurus nobilis, <https://hirc.botanic.hr/fcd/>, pristupljeno 5.7.2017.
- Laurus nobilis, <http://serpentarius.com.br/ervas-flores-etc/> pristupljeno 6.7.2017.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79, 727-747.
- Marković S. Fitoaromaterapija: monografije esencijalnih ulja i ljekovitih biljaka, temelji fitoaromaterapije. Zagreb, Centar Cedrus, 2005, str. 78, 286-287.
- Nikolić T. Sistemska botanika: raznolikost i evolucija biljnog svijeta. Zagreb, Alfa d.d., 2013, str. 371-375.
- Okuda T, Ito H. Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants – Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Molecules*, 2011, 16, 2191-2217.
- Pacifico S, Gallicchio M, Lorenz P, Duckstein SM, Potenza N, Galasso S, Marciano S, Fiorentino A, Stintzing FC, Monaco P. Neuroprotective potential of Laurus nobilis antioxidant polyphenol-enriched leaf extracts. *Chem Res Toxicol*, 2014, 27(4), 611-626.
- Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2009, 2, 270-278.
- Pinheiro LS, Alves de Oliveira Filho A, Guerra FQS, Pinheiro de Menezes C, Golzio dos Santos S, Pereira de Sousa J, Barbosa Dantas T, de Oliveira Lima E. Antifungal activity of the essential oil isolated from Laurus nobilis L. against Cryptococcus neoformans strains. *J App Pharm Sci*, 7, 2017, 115-118.

- Petrik J. Polifenoli-antioksidansi, nastavni materijal. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008, str. 1-8.
- Primorac I. Kvantitativna analiza polifenola hrvatskih populacija vrste *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb. Diplomski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2012.
- Rangari VD. Pharmacognosy Tannin Containing Drugs, J. L. Chaturvedi College of Pharmacy 846, New Nandanvan, Nagpur, 2007.
- Rastija V, Medić-Šarić M. Kromatografske metode analize polifenola u vinima. *Kem Ind*, 2009, 58, 121-128.
- Sahin Basak S, Candan F. Effect of *Laurus nobilis* L. Essential Oil and its Main Components on α -glucosidase and Reactive Oxygen Species Scavenging Activity. *Iran J Pharm Res*, 12, 2013, 367-379.
- Scalbert A, Johnson I, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*, 2005, 81, 2155-2175.
- Schneider G. Zur Bestimmung der Gerbstoffe mit Casein. *Arch Pharm*, 1976, 309, 38-44.
- Sun AY, Simonyi A, Sun GY. The „French paradox“ and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radic Biol Med*, 2001, 32, 314-318.
- Turkez H, Geyikoglu F. The Effect of Laurel Leaf Extract Against Toxicity Induced by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin in Cultured Rat Hepatocytes. *Arh hig rada toksikol*, 2011, 62, 309-315.
- Vladimir-Knežević S. Farmakognozija I, nastavni materijal. Prirodni fenolni spojevi. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008, str. 9-14.
- Zakon o lijekovima, 2013, Zagreb, Narodne novine, broj 76 (NN/76/13).
- Zhang LL, Lin YM, Tannins from *Canarium album* with potent antioxidant activity. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008, 9, 407-415.

7. SAŽETAK / SUMMARY

U ovom je diplomskom radu provedena kvalitativna i kvantitativna analiza polifenolnih tvari u listovima lovora (*Laurus nobilis* L., Lauraceae), populacije sjevernog i srednjeg Jadrana: Lovran, Cres, Mali Lošinj, Dugi Otok, Žirje i Split. Prisutnost polifenolnih tvari dokazana je općim reakcijama stvaranja obojenih produkata i/ili taloga. Kvantitativna analiza ukupnih polifenola i trjeslovina provedena je spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom. Sadržaj ukupnih polifenola bio je najveći u uzorku s otoka Žirja 7,45% (720 nm), odnosno 7,65% (749 nm), dok je najmanji polifenolni udio iznosio 6,07% (720 nm), tj. 6,23% (749 nm), a određen je u uzorcima s Dugog otoka. Najveća količina trjeslovina u ekstraktima listova lovora zabilježena je u uzorku Split (3,53%, 720 nm; 3,49%, 749 nm), dok je najmanji sadržaj trjeslovina određen za Dugi otok (1,77%, 720 nm; 1,85%, 749 nm). Provedena fitokemijska karakterizacija predstavlja prilog znanstvenom istraživanju roda *Laurus*, pridonosi dosadašnjim znanstvenim spoznajama o hrvatskim populacijama vrste *Laurus nobilis* L. te upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu lovora.

The qualitative and quantitative analysis of polyphenols in leaves of *Laurus nobilis* L., Lauraceae (northern and middle Adriatic populations: Lovran, Cres, Mali Lošinj, Dugi Otok, Žirje and Split) was carried out in this graduate thesis. The presence of polyphenols was proven by using general reactions of developing colored products and precipitates. The quantitative analysis of total polyphenols and tannins was performed by spectrophotometric method with the Folin-Ciocalteu's phenol reagent. The content of total polyphenols was the largest in the sample from the island of Žirje 7.45% (720 nm) and 7.65% (749 nm), while the lowest polyphenol content was 6.07% (720 nm), i.e. 6.23 % (749 nm) and was measured in samples from Dugi otok. The highest amount of tannins in the leaves of laurel was recorded in Split (3.53%, 720 nm, 3.49%, 749 nm), while the smallest content was determined in the sample from Dugi otok (1.77%, 720 nm; 1.85%, 749 nm). This phytochemical characterization is a contribution to the scientific research of the genus *Laurus*, it also contributes to the study of the Croatian populations of *Laurus nobilis* L., completing the present knowledge of phytotherapeutic potential of the investigated herbal species.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

KVALITATIVNA I KVANTITATIVNA ANALIZA POLIFENOLA VRSTE *LAURUS NOBILIS* L. (LAURACEAE) S PODRUČJA SJEVERNOG I SREDNJEG JADRANA

Sanela Palić

SAŽETAK

U ovom je diplomskom radu provedena kvalitativna i kvantitativna analiza polifenolnih tvari u listovima lovora (*Laurus nobilis* L., Lauraceae), populacije sjevernog i srednjeg Jadrana: Lovran, Cres, Mali Lošinj, Dugi Otok, Žirje i Split. Prisutnost polifenolnih tvari dokazana je općim reakcijama stvaranja obojenih produkata i/ili taloga. Kvantitativna analiza ukupnih polifenola i trjeslovina provedena je spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom. Sadržaj ukupnih polifenola bio je najveći u uzorku s otoka Žirja 7,45% (720 nm), odnosno 7,65% (749 nm), dok je najmanji polifenolni udio iznosio 6,07% (720 nm), tj. 6,23% (749 nm), a određen je u uzorcima s Dugog otoka. Najveća količina trjeslovina u ekstraktima listova lovora zabilježena je u uzorku Split (3,53%, 720 nm; 3,49%, 749 nm), dok je najmanji sadržaj trjeslovina određen za Dugi otok (1,77%, 720 nm; 1,85%, 749 nm). Provedena fitokemijska karakterizacija predstavlja prilog znanstvenom istraživanju roda *Laurus*, pridonosi dosadašnjim znanstvenim spoznajama o hrvatskim populacijama vrste *Laurus nobilis* L. te upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu lovora.

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

Rad sadrži: 32 stranice, 10 slika, 2 tablice i 37 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Laurus nobilis* L., polifenoli, trjeslovine, kvalitativna analiza, kvantitativna analiza, UV-Vis spektrofotometrija

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

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

Rad prihvaćen: srpanj, 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF POLYPHENOLS OF *LAURUS NOBILIS* L. (LAURACEAE) FROM THE NORTHERN AND CENTRAL ADRIATIC REGION

Sanela Palić

SUMMARY

The qualitative and quantitative analysis of polyphenols in leaves of *Laurus nobilis* L., Lauraceae (northern and middle Adriatic populations: Lovran, Cres, Mali Lošinj, Dugi Otok, Žirje and Split) was carried out in this graduate thesis. The presence of polyphenols was proven by using general reactions of developing colored products and precipitates. The quantitative analysis of total polyphenols and tannins was performed by spectrophotometric method with the Folin-Ciocalteu's phenol reagent. The content of total polyphenols was the largest in the sample from the island of Žirje 7.45% (720 nm) and 7.65% (749 nm), while the lowest polyphenol content was 6.07% (720 nm), i.e. 6.23 % (749 nm) and was measured in samples from Dugi otok. The highest amount of tannins in the leaves of laurel was recorded in Split (3.53%, 720 nm; 3.49%, 749 nm), while the smallest content was determined in the sample from Dugi otok (1.77%, 720 nm; 1.85%, 749 nm). This phytochemical characterization is a contribution to the scientific research of the genus *Laurus*, it also contributes to the study of the Croatian populations of *Laurus nobilis* L., completing the present knowledge of phytotherapeutic potential of the investigated herbal species.

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

Thesis includes: 32 pages, 10 figures, 2 tables, and 37 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Laurus nobilis* L., polyphenols, tannins, qualitative analysis, quantitative analysis, UV-Vis spectrophotometry

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

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

The thesis was accepted: July, 201

