

# Kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih kiselina vrste *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) s područja Dalmacije

---

Svalina, Božica

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:163:628545>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-05**



Repository / Repozitorij:

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



**Božica Svalina**

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

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. sc. Renati Jurišić Grubešić, na velikoj pomoći pri izradi ovog diplomskog rada, na vremenu ustupljenom kako bih sve shvatila i odradila, ali i na puno strpljenja i izlaženja u susret.*

*Veliko hvala mojoj obitelji bez čije podrške ništa ne bi bilo moguće, svim prijateljima koji su stalno bili uz mene i onima koji su mi svojom podrškom pomogli u izradi ovog rada!*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1 Botanički podatci</b> .....	2
1.1.1 Nadred Magnolianae .....	2
1.1.2 Red Laurales .....	3
1.1.3 Porodica Lauraceae (lovorovke).....	3
1.1.4 Rod <i>Laurus</i> .....	5
1.1.5 Vrsta <i>Laurus nobilis</i> L. (lovor).....	6
1.1.5.1 Stanište i rasprostranjenost .....	6
1.1.5.2 Lovor kroz povijest.....	6
1.1.5.3 Izgled biljke .....	7
1.1.5.4 Kemijski sastav.....	10
1.1.5.5 Djelovanje i uporaba lovorova eteričnog ulja ( <i>Lauri folii aetheroleum</i> ).....	11
1.1.5.6 Djelovanje i uporaba lovorova lista ( <i>Lauri folium</i> ).....	11
1.1.5.7 Sažetak istraživanja potencijalne uporabe lista lovora ( <i>Laurus nobilis</i> L.) .....	12
<b>1.2 Biološki aktivne tvari vrste <i>Laurus nobilis</i> L.</b> .....	14
1.2.1 Prirodni fenolni spojevi .....	14
1.2.1.1 Fenolne kiseline.....	15
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	26
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	27
<b>3.1 Biljni materijal</b> .....	27
<b>3.2 Aparatura i kemikalije</b> .....	28
<b>3.3 Metode i postupci istraživanja</b> .....	29
3.3.1 Kvalitativna analiza fenolnih kiselina .....	29
3.3.2 Kvantitativna analiza fenolnih kiselina .....	30
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	32
<b>4.1 Rezultati kvalitativne analize fenolnih kiselina primjenom tankoslojne kromatografije</b> .....	32
<b>4.2 Rezultati kvantitativne analize fenolnih kiselina spektrofotometrijskom metodom</b> .....	38
<b>4.3 Rasprava</b> .....	44
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	45
<b>6. LITERATURA</b> .....	46
<b>7. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	50
<b>8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

# 1. UVOD

Čovjek je od svog postanka koristio biljke za različite namjene. Služile su mu kao hrana, lijek, korištene su za ogrjev, izradu nastambi, zaštitnih ograda, čamaca. Kako je od početka spoznao vrijednost biljaka, nastavio ju je istraživati i primjenjivati na različite sofisticiranije načine.

Jednako tako, razvijala se i uporaba biljaka kao lijekova. Najstariji zapisi o uporabi biljaka u liječenju sežu od 3000 do 2500 g. pr. Kr. (Petrovska, 2012). No, smatra se da su se neke biljke koristile i prije tih zapisa, npr. vrsta *Cannabis sativa* L. za koju se smatra da se koristila u Kini još prije 8000 godina ili vrsta *Papaver somniferum* L. koja se inicijalno uzgajala u Mezopotamiji prije oko 5400 godina, a opij koji se izolira iz njega se i danas koristi (Tyler, 2000). U to vrijeme biljke su bile gotovo jedino oružje u borbama s bolešću. S vremenom se spoznao ljekoviti potencijal sve većeg broja biljnih vrsta, a kako su kulture napretkom civilizacije sve više dolazile u dodir jedne s drugima, međusobno su se izmjenjivale mnoge informacije, pa tako i one o ljekovitosti biljaka te su na taj način nadograđivana ljudska saznanja.

U 30-im godinama prošlog stoljeća, smanjila se uporaba biljaka u liječenju. Uzrok tome bilo je otkriće sulfonamida, sintetskih antibiotika, iz kojih su znanstvenici dalje razvijali različite druge lijekove. Sintetski su lijekovi bili puno isplativiji za industriju, tj. puno skuplji, posebno uzimajući u obzir da ih je većina bila pod patentom zaštitom, ali i zato što ih je bilo puno lakše standardizirati i istražiti njihovo djelovanje. Iako se biljni pripravci nisu koristili u jednakoj mjeri kao prije, njihova djelotvornost je bila potvrđena. Tijekom 1970-ih i 1980-ih godina znanstvenici sve više istražuju kemijski sastav i djelovanja biljnih droga i njihovih pripravaka te proučavaju i utvrđuju terapijski potencijal i dobrobit primjene takvih terapeutika (Tyler, 2000).

Taj trend se nastavio do danas. Interes za uporabom biljnih preparata sve više raste, što zbog isplativosti, ali i zbog uvjerenja bolesnika da su biljni preparati sigurniji za njihovo zdravlje. No, biljni svijet je izrazito kompleksan te je potrebno provesti još mnogo istraživanja kako bi se otkrio potpuni terapijski potencijal biljaka. Popularnost liječenja biljnim tvarima u današnje vrijeme zasigurno će pridonijeti ostvarenju navedenoga.

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza ukupnih fenolnih kiselina iz listova vrste *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) s područja Dalmacije, u svrhu spoznavanja fitoterapijskog potencijala te fitokemijskih značajki hrvatskih populacija lovora.

## 1.1 Botanički podatci

Predmetna vrsta ovog diplomskog rada, *Laurus nobilis* L., pripada odjeljku sjemenjača, pododjeljku kritosjemenjača, razredu dvosupnica, podrazredu Magnoliidae / Polycarpicae, nadredu Magnolianaes, redu Laurales, porodici Lauraceae (lovorovke), potporodici Lauroideae te rodu *Laurus* (Maleš 2011; Nikolić, 2013), kako je prikazano u Tablici 1.

Tablica 1. Sistematika biljne vrste *Laurus nobilis* L. (Maleš, 2011; Nikolić 2013).

<b>Odjeljak</b> ( <i>phylum</i> )	<b>Sjemenjače</b> ( <i>Spermatophyta</i> )
<b>Pododjeljak</b> ( <i>subphylum</i> )	<b>Kritosjemenjače</b> (Magnoliophytina/Angiospermae)
<b>Razred</b> ( <i>classis</i> )	<b>Dvosupnice</b> (Magnoliatae/Magnoliopsida/Dicotyledonae),
<b>Podrazred</b> ( <i>subclassis</i> )	<b>Magnoliidae/Polycarpicae</b>
<b>Nadred</b> ( <i>superordo</i> )	<b>Magnolianaes</b>
<b>Red</b> ( <i>ordo</i> )	<b>Laurales</b>
<b>Porodica</b> ( <i>familia</i> )	<b>Lovori, lovorovke</b> (Lauraceae)
<b>Potporodica</b> ( <i>subfamilia</i> )	<b>Lauroideae</b>
<b>Rod</b> ( <i>genus</i> )	<b>lovor</b> ( <i>Laurus</i> )
<b>Vrsta</b> ( <i>species</i> )	<b>lovor</b> ( <i>Laurus nobilis</i> L.)

### 1.1.1 Nadred Magnolianaes

Nadred Magnolianaes sastoji se od 1000 vrsta smještenih u 19 porodica i 5 redova: Magnoliales, Laurales, Piperales, Canellales i Chloranthales. Najveće i ekonomski najznačajnije porodice su magnolije (Magnoliaceae) i lovori (Lauraceae) koji su detaljnije opisani u nastavku, Annonaceae te osobito porodica paprova (Piperaceae). Većinom se koriste kao aromatično začinsko bilje, dok se neki razvijaju u jestive plodove (avokado, *Persea americana* Mill.), a mnoge vrste cijene se u hortikulturi ili kao izvor drvne građe (Nikolić, 2013).

### 1.1.2 Red Laurales

Red Laurales obuhvaća 2860 vrsta smještenih u 7 porodica s ukupno 91 rodom. Većina vrsta (85%) pripada porodici Lauraceae koja je detaljnije opisana u nastavku. Zbog svoje iskoristivosti u proizvodnji drvne građe ističe se porodica južnjačkih sasafrasa (*Atherospermataceae*) (Nikolić, 2013).

### 1.1.3 Porodica Lauraceae (Ivorovke)

Porodica Lauraceae obuhvaća oko 50 rodova s približno 2500 vrsta (Nikolić, 2013). Rodovi porodice Lauraceae prikazani su u Tablici 2 prema abecednom redu.

Tablica 2. Prikaz rodova porodice Lauraceae prema abecednom redu (Nikolić, 2013).

Rodovi porodice <i>Lauraceae</i>	<i>Actinodaphne, Adenodaphne, Aiouea, Alseodaphne, Anaueria, Aniba, Apollonias, Aspidostemon</i>
	<i>Beilschmiedia, Brassiodendron</i>
	<i>Caryodaphnopsis, Cassytha, Chlorocardium, Cinnadenia, Cinnamomum, Clinostemon, Cryptocarya</i>
	<i>Dehaasia, Dicypellium, Dodecadenia</i>
	<i>Endiandra, Endlicheria, Eusideroxylon</i>
	<i>Gamanthera</i>
	<i>Hexapora, Hypodaphnis</i>
	<i>Iteadaphne</i>
	<i>Kubitzkia</i>
	<i>Laurus, Licaria, Lindera, Litsea</i>
	<i>Mezilaurus</i>
	<i>Nectandra, Neocinnamomum, Neolitsea, Notaphoebe</i>
	<i>Ocotea</i>
	<i>Paraia, Persea, Phoebe, Phyllostemonodaphne, Pleurothyrium, Potameia, Potoxylon, Povedadaphne</i>
	<i>Ravensara, Rhodostemonodaphne</i>
	<i>Sassafras, Syndiclis</i>
	<i>Triadodaphne</i>
	<i>Umbellularia, Urbanodendron</i>
	<i>Williamodendron</i>

Središte područja rasprostranjenosti (areala) ove porodice je u jugoistočnoj Aziji i tropskom pojasu Amerike, ali su pripadnici porodice rasprostranjeni i u subtropskim područjima. Manjim dijelom naseljava umjerena područja ili se može pojaviti u reliktnim šumama. Na području Hrvatske može se pronaći vrsta *Laurus nobilis*. Biljke ove porodice su drvenaste i grmaste trajnice. Karakteriziraju ih trajnozeleni, kožasti listovi siromašni sokom, kao posljedica prilagodbe kserofitskim uvjetima staništa (radi umanjenja gubitka vode jer naseljava većinom jako suha staništa), uglavnom u izmjeničnom rasporedu. Biljke su aromatične i u mnogim dijelovima biljke mogu se naći uljni kanali. Osnovne karakteristike porodice Lauraceae prikazane su u Tablici 3 (Maleš, 2011; Nikolić, 2013).

Tablica 3. Prikaz karakteristika porodice Lauraceae (Nikolić, 2013).

<b>Osobina</b>	<b>Mliječni sok</b>	<b>Rukavac listova</b>	<b>Palistići</b>	<b>Puči</b>	<b>Nodiji</b>	<b>Ksilem</b>	<b>Plastidi sitastih cijevi</b>
	izostaje	izostaje	izostaju	paracitne	unilakularni	s i bez traheida	P ili S tip
<b>Osobina</b>	<b>Cvjetovi</b>	<b>Ocvijeće</b>	<b>Andrecej</b>	<b>Prašnici</b>	<b>Otvaranje prašnika</b>	<b>Pelud</b>	<b>Plodni listovi</b>
	Ciklički dvospolni ili jednospolni	slobodno	3-26	slobodni	Pore ili longitudinalni zaklopci	Anaperturni	1/3
<b>Osobina</b>	<b>Ginecej</b>	<b>Sjemeni zameci</b>	<b>Tip embrionske vrećice</b>	<b>Flavonoli</b>	<b>Citologija</b>		
	Monomerni	anatropni	Polygonum	prisutni	X*12		

Porodica Lauraceae ekonomski je najznačajnija porodica reda Laurales. Od vrsta se ističe avokado (*Persea americana*) čiji se plod zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti (izrazito kalorična hrana bogata različitim vitaminima, npr. vitaminima A, B, C, D i E) već dugo koristi kao hrana (prikazan na Slici 2). Osušeni listovi lovora koriste se kao začim u mediteranskoj kuhinji te se biljna vrsta također koristi kao lijek u narodnoj medicini. Iz kore vrste *Cinnamomum zeylanicum* Blume, prikazana na Slici 1, dobiva se mljeveni cimet koji se koristi kao začim, a iz zelenih listova se može izolirati eugenol koji se koristi kao zamjena za ulje kinčica u industriji parfema te kao zaslađivač za hranu i zubne paste. Iz vrste *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl. dobiva se kamfor koji se koristi u farmaceutskoj industriji prilikom izrade različitih masti te kao insekticid, dok se kora vrste *Cinnamomum cambodianum* Lecomte koristi za izradu mirisnih štapića. Upotreba vrsta porodice Lauraceae u drvnoj industriji je zanemariva, jednim dijelom zbog prevelike eksploatacije drva porodice u



prošlosti, a drugim dijelom zbog sadržaja alkaloida u drvu koji može uzrokovati dermatitis i ozbiljne iritacije dišnog sustava drvodjelaca ([www.britannica.com](http://www.britannica.com)).



Slika 1. Vrsta *Cinnamomum zeylanicum* (Nikolić, 2013).



Slika 2. Plod avokada, *Persea americana* ([www.globalspecies.org](http://www.globalspecies.org)).

#### 1.1.4 Rod *Laurus*

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

Od roda *Laurus* se u Europi mogu pronaći tri vrste: *L. azorica* (Seub.) Franco, koja raste isključivo na Azorskom otočju (Portugal), *L. novocanariensis* Rivas Mart., Lousâ, Fern. Prieto, E. Díaz, J. C. Costa & C. Aguiar, endemična vrsta koja raste na otoku Madeira (Portugal) i *L. nobilis*, vrsta koja raste na Mediteranu. *L. azorica* se, za razliku od vrste *L. nobilis*, ne koristi kao začim jer su listovi te vrste otrovni. *L. azorica* nalazi se na crvenoj listi ugroženih biljaka (Conforti i sur., 2006; Guido i sur., 2015).

## 1.1.5 Vrsta *Laurus nobilis* L. (lovor)

### 1.1.5.1 Stanište i rasprostranjenost

Lovor je samonikla biljka južne Europe. Domovina lovora je u Maloj Aziji, otkud se raširio po zemljama Sredozemnog mora. U Hrvatskoj je lovor rasprostranjen u Istri, Hrvatskom primorju i Dalmaciji, kako je prikazano na Slici 3. Najbujnije se razvija u medunčevobjelogradovim sastojinama na obroncima Učke (Lovran, Opatija), kako je također vidljivo na Slici 3. Raste pojedinačno ili u skupinama među ostalim vazdazelenim biljem, posebice u listopadnoj hrastovoj šumi, a rjeđe u makiji. Na nekim mjestima tvori malene šume, a raste i do 300 – 400 m nadmorske visine (Kuštrak, 2005).



Slika 3. Prikaz rasprostranjenosti lovora u Hrvatskoj  
(hirc.botanic.hr).

### 1.1.5.2 Lovor kroz povijest

Još su u starom vijeku lovor smatrali svetim stablom. Bila je popularna biljka i stare Grčke i Rima, a upotrebljavali su je i stari Egipćani. U Grčkoj je bio posvećen bogu Apolonu te su ga sadili uz njegove hramove. Osim toga, liječnici su iznad svojih ulaznih vrata imali plod lovora kao oznaku svojeg znanja. Sam naziv roda u koji spada lovor, *Laurus*, potječe od latinske riječi *laudare* što znači hvaliti, uzdizati, te ne čudi da se stoga kao simbol pobjede koristio za

krunjenje istaknutih pojedinaca u mnogim djelatnostima i sportu. Kao iznimno popularna biljka s dugom tradicijom uporabe, našao je svoje mjesto na zastavama Dominikanske Republike i Perua, nacionalnom amblemu Grčke, japanskim kovanicama, brojnim grobovima itd. (Marković, 2005; Nikolić, 2013).

### 1.1.5.3 Izgled biljke

Lovor je vazdazeleni grm ili nisko stablo. Odlikuje se vazdazelenim, kožastim, duguljasto eliptičnim i zašiljenim listovima valovitih rubova na kratkoj peteljci (Kuštrak, 2005) koji opadaju nakon pet do šest godina (Nikolić, 2013). Listovi su s gornje strane sjajni i tamnozeleno boje zbog debelostijene i sjajno reflektirajuće epiderme kao prilagodbe kserofitskim uvjetima staništa, a s donje su strane svjetliji i bez sjaja (Slika 4). Dugi su do 10 cm, a široki 3 – 5 cm (Kuštrak, 2005).



Slika 4. *Laurus nobilis* L.  
(caliban.mpipz.mpg.de).

Lovor cvate u proljeće, od ožujka do svibnja, a plodovi sazrijevaju u kasnu jesen (Slika 5). Žućkastobijeli jednospolni cvjetovi razvijaju se u obliku čuperaka u pazušcima listova, skupljeni u postrane paštaste cvatove, kao što se može vidjeti na Slici 6. Biljka je dvodomna, odnosno prašnički cvjetovi i tučci cvjetova razvijaju se na različitim stablima. Iz ženskog se

cvijeta razvija tamnomodra ili crnozelenkasta jajolika jednosjemena koštunica, prikazana na Slici 5, koja dozrijeva u kasnu jesen. Mesnati dio koštunice sadržava eterično ulje (Kuštrak, 2005; Nikolić, 2013; Grdinić i Kremer, 2009).



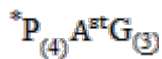
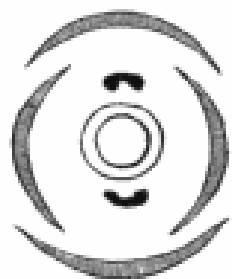
Slika 5. Plodovi lovora ([www.plantea.com.hr](http://www.plantea.com.hr)).



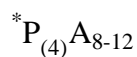
Slika 6. Lovor (*Laurus nobilis* L.) u cvatu ([hirc.botanic.hr](http://hirc.botanic.hr)).

Cvjetovi su široki oko 1 cm te imaju četiri listića perigona koji su pri dnu srasli. 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, kako se može vidjeti na cvjetnim formula prikazanima na Slikama 7 i 8. (Grdinić i Kremer, 2009).



Slika 7. Cvjetna formula ženskog cvijeta lovora (*Laurus nobilis*) (Nikolić, 2013).



Slika 8. Cvjetna formula muškog cvijeta lovora (*Laurus nobilis*) (Nikolić, 2013).

U palisadnom parenhimu i mezofilu lista lokalizirano je eterično ulje u posebnim okruglim stanicama (uljenicama), zbog kojega je okus lovorovih listova jako aromatičan, pomalo trpak i nagorak (Kuštrak, 2005; Nikolić, 2013).

Lovor se najbolje razvija na svježim, humusno-karbonatnim tlima, ali uspijeva i na suhim tlima. Prilično je osjetljiv na niske temperature (Grdinić i Kremer, 2009).

#### 1.1.5.4 Kemijski sastav

Lovorov list sadrži 1-3% eteričnog ulja s 1,8-cineolom kao glavnom sastavnicom, mnogo trjeslovina i malo gorkih tvari. Eterično ulje lovora (*Lauri folii aetheroleum*) dobiva se parnom destilacijom osušenih listova i vršnih ogranaka lovora. Biosinteza i nakupljanje eteričnog ulja u listu lovora najveće je u ljetnim mjesecima (najviše sredinom ljeta). Glavne sastavnice eteričnog ulja lovora s područja Hrvatske prikazane su u Tablici 4. Vidljive su razlike u kemijskom sastavu koje su uvjetovane pedološkim i klimatskim čimbenicima, a takve razlike imaju utjecaj na terapijski učinak (aromaterapija) (Kuštrak, 2005). Benzenske komponente eteričnog ulja (eugenol, metileugenol itd.) daju aromatična svojstva listu (Kaurinović i sur., 2010).

Tablica 4. Kemijski sastav i sadržaj lovorova eteričnog ulja (*Lauri folii aetheroleum*) (Kuštrak, 2005).

Glavne sastavnice (%)	Nalazišta		
	Opatija	Rijeka (Pulac)	Otok Krk (Kras)
<b><math>\alpha</math>-pinen</b>	3,6	3,8	4,7
<b>sabinen</b>	8,7	10,2	10,7
<b>1,8-cineol</b>	32,8	30,9	33,6
<b>linalol</b>	7,3	8,8	4,7
<b>terpinen-4-ol</b>	3,5	2,7	4,6
<b><math>\beta</math>-kariofilen</b>	1,6	2,2	0,7
<b><math>\alpha</math>-terpineol</b>	3,5	4,6	3,7
<b><math>\alpha</math>-terpinilacetat</b>	10,2	8,6	9,1
<b>metil-eugenol</b>	4,8	5,6	8,8
<b>eugenol</b>	3,4	3,9	2,8
<b>Postotak eteričnog ulja u listovima</b>	0,87	1,36	1,53

#### 1.1.5.5 Djelovanje i uporaba lovorova eteričnog ulja (*Lauri folii aetheroleum*)

Eterično ulje ima antiseptičko djelovanje, djeluje protiv vrsta roda *Candida* i mnogih bakterija, npr. *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gonococcus*, *Pneumococcus*, *E. coli* i *Klebsiella* te se stoga može koristiti pri prehladi, upali krajnika i različitim virozama, a osim toga ima i antivirusno (većinom zbog  $\alpha$ -sabinena) i antifungalno djelovanje. Također ima ekspektorirajuća (zbog 1,8-cineola) i mukolitička svojstva. Nadalje, ulje se primjenjuje prilikom liječenja bolova u mišićima i zglobovima, kožnih osipa, za varikozne vene u obliku mikstura, u obliku hladnih kompresa za hematome te u aromaterapiji za masažu. Može se lokalno primjenjivati za liječenje afti. Primjenjuje se u izradi parfema, osobito u mirisima za muškarce i losionima protiv brijanja zbog svojih antiseptičkih svojstava (Kuštrak, 2005; Marković, 2005).

No, zbog sadržaja nekih seskviterpenskikh laktona, od kojih u najvećem postotku sadržava kostunolid, proizvodi koji sadrže eterično ulje lovora (npr. kreme ili losioni) mogu izazvati alergijski dermatitis. Zabilježeni su i slučajevi konjunktivitisa kod vrtlara, farmera ili svjećara, također zbog sadržaja seskviterpenskikh laktona (Kuštrak, 2005; Marković, 2005).

#### 1.1.5.6 Djelovanje i uporaba lovorova lista (*Lauri folium*)

Listovi lovora rabe se u pučkoj medicini i veterinarstvu. Danas se rijetko koriste za unutarnju primjenu, dok su se nekad koristili kod gubitka apetita, grčeva u želucu i groznici. Od listova se može izrađivati čaj koji se primjenjuje protiv bronhitisa, hunjavice i gripe, za grgljanje kod angine te kao oblog kod nagnječenja i čireva. Od davnina poznata uporaba lista lovora je kao začim različitim jelima, gdje, osim što pridonosi boljem okusu, također djeluje kao prirodni konzervans i potpomaže probavljanje hrane. Osim toga, lišće lovora koristi se i za proizvodnju alkoholnih pića i voćnih sokova (Kuštrak, 2005).

Dekorativnu vrijednost lovora čine njegovi listovi intenzivno zelene boje, kao i mogućnost oblikovanja zbog dobrog podnošenja rezidbe. Iz tog je razloga često zastupljen pri uređivanju zelenih površina, u vrtovima i parkovima, na ulazima hotela, ali i uz putove, na frekventnim lokacijama urbanih sredina. Rezidbu lovora treba provoditi ljeti i uklanjati mladice čim se pojave jer one iscrpljuju stablo (Dudaš i Venier, 2009).

#### 1.1.5.7 Sažetak istraživanja potencijalne uporabe lista lovora (*Laurus nobilis* L.)

Antioksidativni potencijal lista lovora je opširno istraživani. Osnovi sastojci ekstrakta lista lovora s antioksidativnim učinkom su flavonoidi: luteolin, kemferol, glikozidi kemferola (kemferol-3-ramnopiranozid i kemferol-3,7-diramnopiranozid) i rutin (Emam i sur., 2010). Antioksidativno djelovanje ekstrakta lista lovora temelji se na inhibiciji lipidne peroksidacije te utjecaju na aktivnosti različitih enzima, npr. peroksidaza, katalaza, glutation peroksidaza, ksantin oksidaza i povećanju količine glutationa (Kaurinović i sur., 2010). Muñiz-Márquez i suradnici su istražili optimalne uvjete za ultrazvučnu ekstrakciju fenolnih spojeva iz lista lovora. Najbolji uvjeti ekstrakcije bili su sljedeći: 1 g biljnog uzorka, 12 mL 35% etanola, 40 min ultrazvučne ekstrakcije (Muñiz-Márquez i sur., 2013.). Simić i suradnici istražili su utjecaj lišća, kore i voćnog metanolnog ekstrakta lovora na razine lipidne peroksidacije u liposomima induciranim s Fe<sup>2+</sup>/askorbatnim sustavom. Najznačajnija inhibicija lipidne peroksidacije dobivena je s metanolnim ekstraktima kore lovora (70,6% inhibicije s 1,0 mg sirovog ekstrakta), a svi su ekstrakti sadržavali flavonoide, fenolne kiseline i alkaloidne te su pokazali antioksidativnu aktivnost (Simić i sur., 2003).

Istraživan je učinak lista lovora kod zečeva na dijete bogatoj mastima s obzirom na rizik od razvoja katarakte te je uočen smanjen rizik od razvoja katarakte kod zečeva koji su bili dohranjivani s 1 g/kg sušenih listova lovora. Zaključeno je kako se i spomenuti učinak temelji na antioksidativnom djelovanju sastojaka lista lovora, točnije inhibiciji lipidne peroksidacije inducirane oksidativnim stresom (Casamassima i sur., 2017).

Pacifico i suradnici istražili su učinak alkoholnog ekstrakta lista lovora bogatog flavonoidima na Alzheimerovu bolest. Taj je ekstrakt smanjivao nastajanje amiloidnih plakova u kulturi stanica. Točan mehanizam nije poznat, ali se pretpostavlja da se temelji na sposobnosti sprječavanja apoptoze uzrokovane neurotoksičnim tvarima (antioksidativni učinak) i na inhibiciji sekretaza bitnih za nastanak plakova (Pacifico i sur., 2014).

Khan i suradnici uočili su da uzimanje 1 do 3 grama lista lovora kroz 30 dana smanjuje rizične faktore (uočeno je smanjenje razina glukoze u serumu, smanjenje razina LDL kolesterola i triglicerida i povećanje razina HDL kolesterola) za dijabetes tip II i kardiovaskularne bolesti (Khan i sur., 2009).

Istražen je hepatoprotektivni učinak u kulturi hepatocita štakora kod toksičnosti izazvane 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksinom, vrlo čestim zagađivačem okoliša, koji je posljedica



povećanja ukupnog antioksidativnog kapaciteta nakon primjene ekstrakta lista lovora (Turkez i Geyikoglu, 2011).

Provedena su brojna istraživanja o antibakterijskom učinku ekstrakta lista lovora. Od gram-negativnih bakterija, najveću osjetljivost prema ekstraktu lista lovora pokazala je vrsta *Pseudomonas aeruginosa*, dok se od gram-pozitivnih bakterija ističe *Streptococcus epidermis*, koji je pokazo izrazitu osjetljivost na ekstrakt polisaharda fukoidana iz lista lovora. Također je uočena inhibicija stvaranja biofilma na bakterijama, mehanizma rezistencije, osobito kod vrste *Streptococcus epidermis*, što je najvećim djelom posljedica sadržaja alginata u listu lovora (Chmit i sur., 2014). Acilirani glikozidi kemferola iz lista lovora pokazali su djelotvornost protiv vrste *Staphylococcus aureus* (Lee i sur., 2012) te meticilin rezistentnih sojeva *Staphylococcus aureus* (MRSA) i vankomicin rezistentnih enterokoka (VRE) (Otsuka i sur., 2008).

Istražen je i učinak lista lovora na tumorske stanice. Dokazano je inhibitorno djelovanje acetonskog ekstrakta na HeLa stanice adenokarcinoma vrata maternice te je takav ekstrakt lovora pokazao potencijal za daljnja istraživanja (Berrington i Lall, 2012).

Dokazana je također inhibitorna aktivnost aciliranih glikozida kemferola u ekstraktu lista lovora na Na/K ATP-azu te stoga postoji potencijal za razvoj novih, manje toksičnih, lijekova za kliničku upotrebu kod liječenja srčanih aritmija ili kongestivnog zatajenja srca od postojećih kardiotoničnih glikozida (npr. digoksin) (Lee i sur., 2012).

Dokazan je također antikonvulzivni i antiepileptični učinak ekstrakta lista lovora (Conforti i sur., 2006). Koo i suradnici istražili su učinak jednog sastojka ekstrakta lista lovora na dopaminom induciranu apoptozu živčanih stanica u kulturi koju je inhibirao te bi stoga mogao imati neuroprotektivan učinak u Parkinsonovoj bolesti (Koo i sur., 2011).

Qnais i suradnici proučili su antidijaroički učinak lovora u štakora te opravdali uporabu lovora kod gastrointestinalnih tegoba. U ekstraktu lovora dokazana je prisutnost flavonoida, alkaloida i tanina te je potvrđeno blagotvorno djelovanje na dijareu izazvanu uljem ricinusa. Utvrđeno je da lovor, ovisno o dozi, inhibira crijevnu tranziciju ugljena te uzrokuje relaksaciju glatkih mišića crijeva štakora (Qnais i sur., 2012).

Istraživan je i učinak seskviterpenskih laktona iz lista lovora, koji su prethodno navedeni kao uzročnici alergijskog dermatitisa kao sastojci eteričnog ulja. Provedeno je istraživanje o utjecaju kostulonida, sastojka lista lovora, na razine alkohola kod alkoholom opterećenih

štakora te je primijećena inhibicija porasta razina alkohola zbog smanjenog pražnjenja želuca i razrjeđivanja koncentracije alkohola povećanjem količine tekućine u želucu (Matsuda i sur., 2002). Dokazan je njihov učinak na reakcije preosjetljivosti tipa I jer seskviterpenski laktoni iz lista lovora inhibiraju degranulaciju mastocita, stvaranje IL-4 i proliferaciju B limfocita ovisnu o IL-5 te se stoga predlažu kao mogući kandidati za daljnja istraživanja liječenja astme ili atopijskog dermatitisa (Lee i sur., 2013). Također je uočen njihov učinak na stvaranje dušikovog oksida (protuupalni učinak) i učinak na povećanje aktivnosti glutation-S-transferaze (Kaurinović i sur., 2010).

## **1.2 Biološki aktivne tvari vrste *Laurus nobilis* L.**

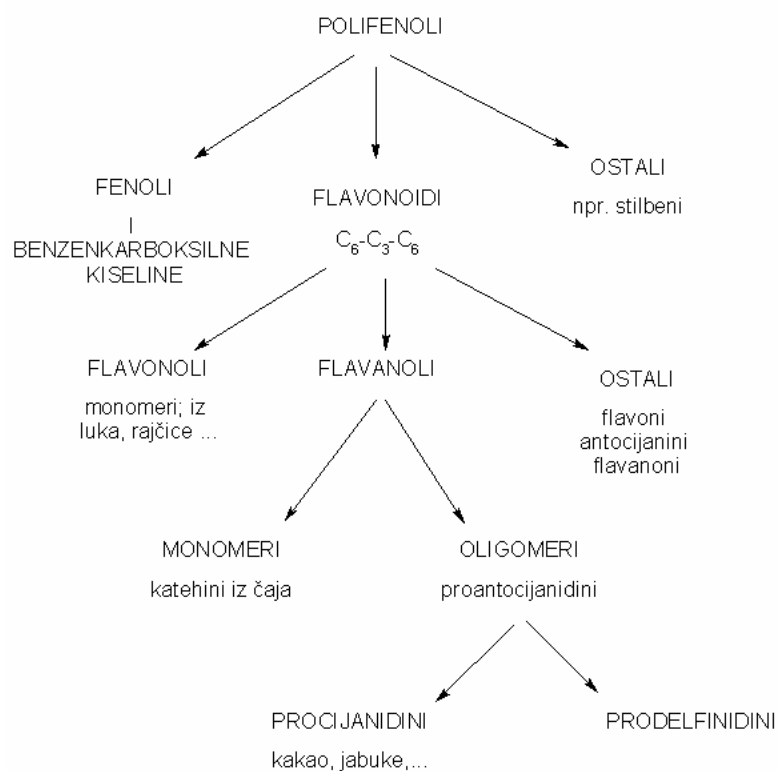
### **1.2.1 Prirodni fenolni spojevi**

Fenolni spojevi, odnosno polifenoli, jedni su od najbrojnijih i najrasprostranjenijih prirodnih vrsta koje se mogu pronaći u biljaka. Poznato ih je preko 8000, od kojih većinu čine flavonoidi (oko 4000). Nalaze se u različitom voću, povrću i prehrambenim proizvodima, npr. čaj, vino i čokolada (D'Archivio i sur., 2007).

Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka te nastaju iz dva glavna puta biosinteze: put šikiminske kiseline i acetatni put (acilpolimalonatni put) (Bravo, 1998).

Polifenoli su široka skupina tvari koja sadržava vrlo jednostavne molekule, npr. fenolne kiseline, ali i one vrlo kompleksne, npr. trjeslovine (Bravo, 1998).

Podjela polifenola (Slika 9) temelji se na broju fenolnih prstenova koje sadrže i na strukturnim elementima koji te prstenove povezuju (Berend i Grabarić, 2008).



Slika 9. Podjela polifenola (Berend i Grabarić, 2008).

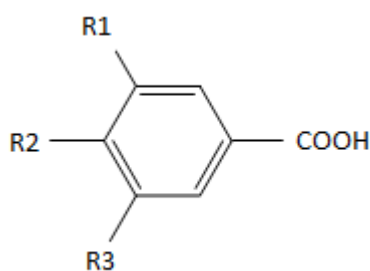
U prirodi se polifenoli uglavnom nalaze u konjugiranom obliku, tj. u obliku glikozida, s jednom ili više šećernih jedinica koje su vezane na hidroksilne skupine (premda postoje i oblici u kojima su šećerne jedinice vezane izravno na aromatski ugljikov atom). Vezani šećeri mogu biti u obliku monosaharida, 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 glukuronsku 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).

### 1.2.1.1 Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su prirodni fenolni neflavonoidni spojevi. Široko su rasprostranjene u voću, povrću, žitaricama, ali i u ljekovitim biljnim vrstama. Njihova uloga kao sekundarnih metabolita u biljaka još nije potpuno razjašnjena, ali se smatra da sudjeluju u mnogim procesima, kao što su unos nutrijenata, sinteza proteina, aktivnost enzima, fotosinteza, aleopatija itd. (Robbins, 2003).

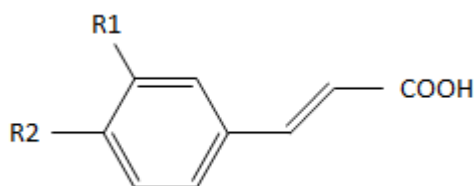
S obzirom na svoju kemijsku strukturu, dijele se na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline.

Osnovna struktura hidroksibenzojevih kiselina je C6-C1, a međusobno se razlikuju prema različitim obrascima hidroksilacije i metilacije benzenskog prstena (Slika 10). Hidroksibenzojeve kiseline općenito se mogu naći u malom broju biljaka te se stoga ne smatra da ova skupina kiselina ima značajan nutritivni potencijal (D'Archivio i sur., 2007).



Slika 10. Osnovna strukturalna jedinica hidroksibenzojevih kiselina  
(Bival Štefan, 2015).

Hidroksicimetne kiseline (Slika 11), za razliku od hidroksibenzojevih, mogu se pronaći u velikom broju biljaka. Njihova osnovna strukturalna jedinica sastoji se od C6-C3 (D'Archivio i sur., 2007).

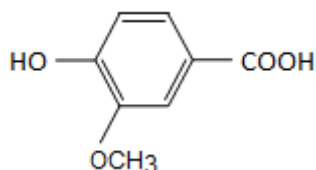


Slika 111. Osnovna strukturalna jedinica hidroksicimetnih kiselina  
(Bival Štefan, 2015).

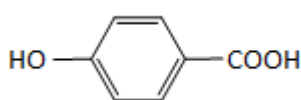
U biljnim se drogama mogu naći u više različitih oblika, npr. kao slobodne kiseline, esteri s drugim kiselinama, esteri sa šećerima, glikozidi dekarboksiliranih kiselina, esteri s alkoholima ili u sklopu flavonoida aciliranih fenolnim kiselinama (Hänsel i Sticher, 2004).

## Fenolne kiseline u slobodnom obliku

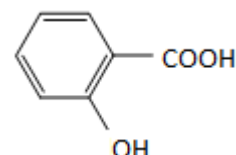
Fenolne kiseline se u slobodno obliku u biljaka mogu naći vrlo rijetko i u niskim koncentracijama. Galna, protokatehinska, vanilinska (Slika 12), p-hidroksibenzojeva (Slika 13) i salicilna kiselina (Slika 14) su hidroksibenzojeve kiseline koje se mogu pronaći u slobodnom obliku (Hänsel i Sticher, 2004).



Slika 12. Vanilinska kiselina  
(Bival Štefan, 2015).

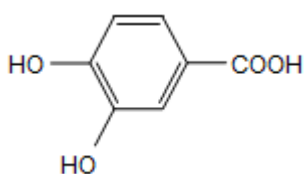


Slika 13. p-hidroksibenzojeva  
kiselina (Bival Štefan, 2015).

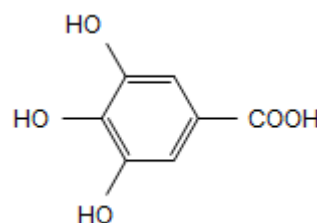


Slika 14. Salicilna kiselina  
(Bival Štefan, 2015).

Protokatehinska kiselina (Slika 15) može se pronaći u većim koncentracijama u smeđežutim ljuskama luka (*Allium cepa*). Galna kiselina (Slika 16) nalazi se u višim koncentracijama u bijkama bogatima galotaninima, npr. listovi medvjete (*Arcostaphylos uva-ursi*) i kora hamamelisa (*Hamamelis virginiana*) (Hänsel i Sticher, 2004). Listovi čajevca također sadržavaju velike količine galne kiseline; čajevac može imati do 4,5 g galne kiseline po kilogramu listova (Manach i sur., 2004).

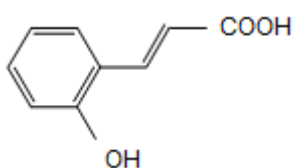


Slika 15. Protokatehinska kiselina  
(Bival Štefan, 2015).

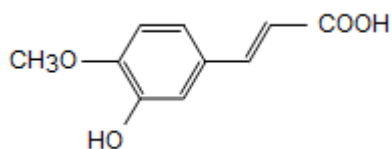


Slika 16. Galna kiselina  
(Bival Štefan, 2015).

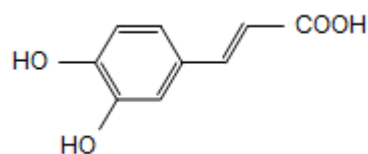
Hidroksicimetne kiseline također se mogu pronaći u slobodnom obliku. O-kumarinska kiselina (Slika 17) nalazi se u vrstama roda *Melilotus* (kokotci), izoferulična kiselina (Slika 18) može se pronaći u korijenu i rizomu odoljena (*Valeriana officinalis*), dok kavene kiseline (Slika 19) ima u kamilici (*Chamaemelum nobile*) i listovima bazge (*Sambucus nigra*) (Hänsel i Sticher, 2004).



Slika 17. o-Kumarinska kiselina  
(Bival Štefan, 2015).

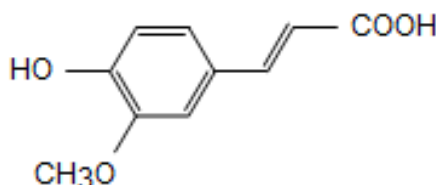


Slika 18. Izoferulična kiselina  
(Bival Štefan, 2015).



Slika 19. Kavena kiselina  
(Bival Štefan, 2015).

Ferulična kiselina (Slika 20) izolirana je iz porodice *Apiaceae*, rod *Ferula*, te je po tome i dobila svoje ime. Visoke koncentracije nalaze se u zrnu pešnice, točnije u vanjskim dijelovima zrna, u aleuronu i perikarpu, gdje se nalazi vezana na arabinoksilane i hemicelulozu. Samim time, može se pronaći i u pšeničnom brašnu, međutim njezina koncentracija u brašnu ovisi o načinu prosijavanja. Osim pšeničnog brašna, nalazi se i u rižinom, zobenom i kukuruznom brašnu. Može se pronaći u listovima eukaliptusa (*Eucalyptus globulus*) te u rabarbari (*Rheum rhabarbarum*) i kičici (*Centarium erythrea*). Poznata je po svom blagotvornom djelovanju, smatra se da djeluje kao koleretik, odnosno potiče tok žuči te, kao i ostali fenolni spojevi, kao antioksidans (Hänsel i Sticher, 2004; Manach i sur., 2004).

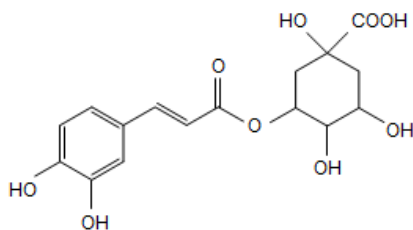


Slika 20. Ferulična kiselina (Bival Štefan, 2015).

#### *Fenolne kiseline u obliku estera s drugim kiselinama*

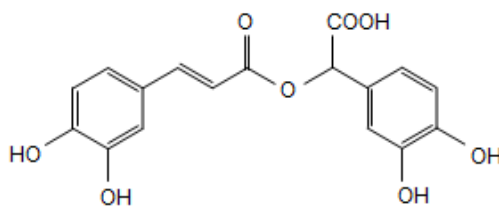
Fenolne kiseline se u spomenutom obliku mogu pronaći u mnogim biljnim vrstama, ali u vrlo niskim koncentracijama (do 0,01%), uz iznimku visoke koncentracije u zelenim zrnima kave vrsta *Coffea arabica* i *Coffea canephora* (3-8%) (Hänsel i Sticher, 2004).

Najčešće su to esteri kaveni i kininske kiseline, s klorogenskom kiselinom kao prototipom. Visoka koncentracija klorogenske kiseline (Slika 21) nalazi se u kavi: jedna šalica kave može sadržavati 70-350 mg klorogenske kiseline (Manach i sur., 2004). Kafeoilkininske kiseline mogu se pronaći u svježim listovima artičoke (*Cynara scolymus*) te se, uz flavonoide, smatraju uzrokom blagotvornog učinka artičoke na zdravlje (prevencija arterioskleroze, zaštita staničnih membrana) (Hänsel i Sticher, 2004).



Slika 21. Klorogenska kiselina (Bival Štefan, 2015).

Ružmarinska kiselina (Slika 22) izvorno je izolirana iz vrste *Rosmarinus officinalis* (ružmarin), ali je kasnije pronađena u velikom broju vrsta, posebice u porodici *Lamiaceae*. Ta je kiselina od farmaceutskog značenja jer je inhibitor alternativnog puta aktivacije komplementa, inhibitor lipooksigenaze i leukotriensintaze te može prekinuti lančane reakcije slobodnih radikala. Osim toga, zajedno s kafeoilkininskim kiselinama i kavenom kiselinom, zaustavlja stvaranje upalnih tvari, npr. produkata raspada arahidonske kiseline (LTB<sub>4</sub>), što objašnjava njihovu upotrebu za liječenje upalnih i alergijskih bolesti u narodnoj medicini Japana i Koreje (Hänsel i Sticher, 2004).



Slika 22. Ružmarinska kiselina (Bival Štefan, 2015).

Također se ističe litospermična kiselina koja se može pronaći u različitim rodovima, npr. *Lythiospermum*. *In vitro* istraživanja su pokazala da ima antigonadotropnu aktivnost (Hänsel i Sticher, 2004).

Detaljniji prikaz nekih dodatnih izvora fenolnih kiselina prikazan je u Tablici 5.

Tablica 5. Udio slobodnih fenolnih kiselina u različitim biljkama (Manach i sur., 2004).

	Izvor (veličina porcije)	Količina fenolnih kiselina u miligramima po kilogramu biljke	Količina fenolnih kiselina u miligramima po porciji biljke
<b>Hidroksibenzojeve kiseline</b>	Kupina (100 g)	80–270	8–27
Protokatehinska kiselina	Brusnica (100 g)	60–100	6–10
Galna kiselina	Crni ribiz (100 g)	40–130	4–13
p-hidroksibenzojeva kiselina	Jagoda (200 g)	20–90	4–18
<b>Hidroksicimetne kiseline</b>	Borovnica (100 g)	2000–2200	200–220
Kavena kiselina	Kivi (100 g)	600–1000	60–100
Klorogenska kiselina	Višnja (200 g)	180–1150	36–230
Kumarinska kiselina	Šljiva (200 g)	140–1150	28–230
Ferulična kiselina	Patlidžan (200 g)	600–660	120–132
Sinapinska kiselina	Jabuka (200 g)	50–600	10–120
	Kruška (200 g)	15–600	3–120
	Cikorija (200 g)	200–500	40–100
	Artičoka (100 g)	450	45
	Krumpir (200 g)	100–190	20–38
	Kukuruzno brašno (75 g)	310	23
	Brašno: pšenično, rižino, zobeno (75 g)	70–90	5–7
	Sok od jabuke (200 mL)	10–500	2–100
	Kava (200 mL)	350–1750	70–350

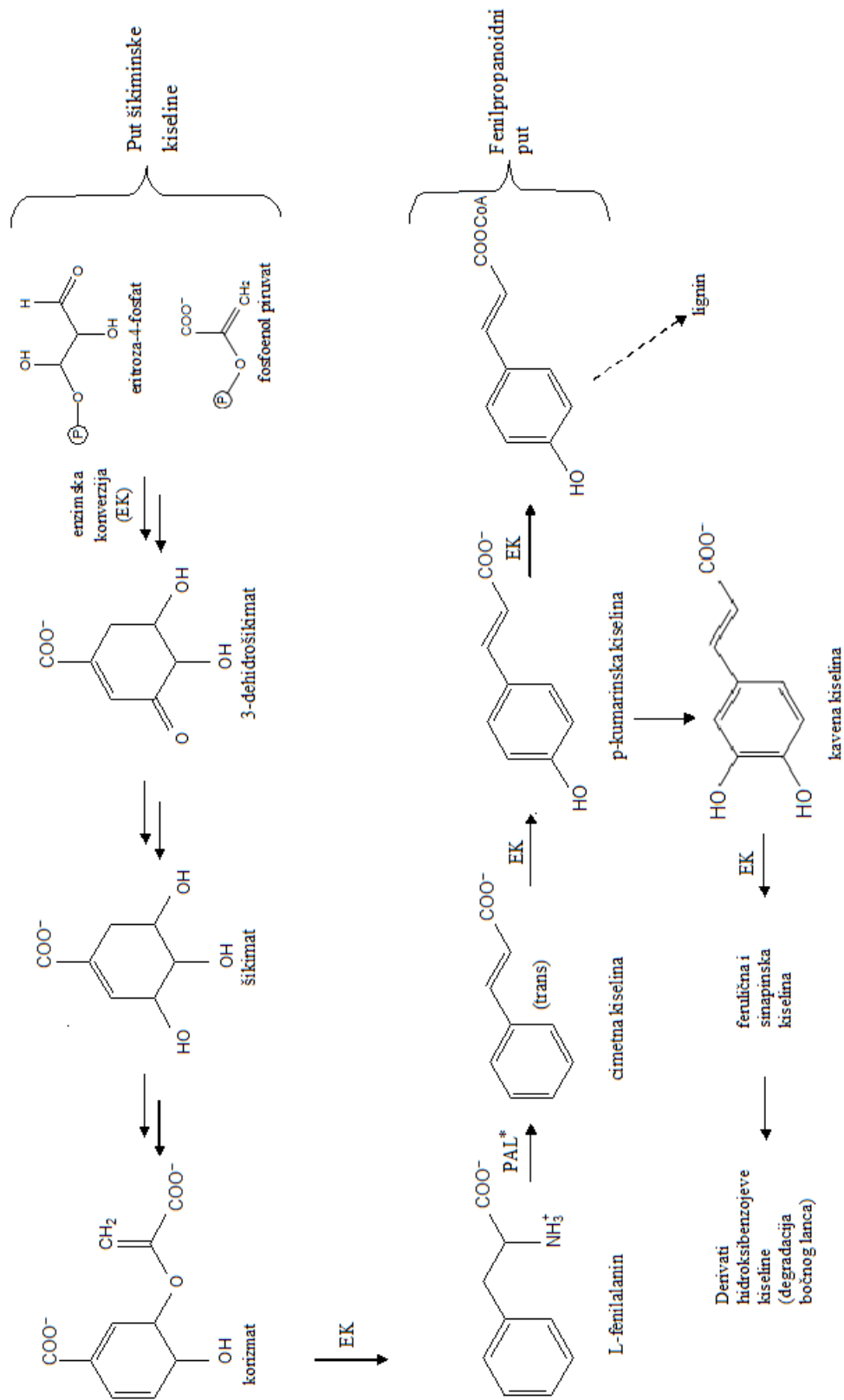


### *Fenolne kiseline u obliku estera sa šećerima*

Esteri hidroksicimetnih kiselina s mono- i oligosaharidima mogu se pronaći u većine viših biljaka u značajnim dozama. Ističu se verbaskozid (čest u porodica *Lamiaceae*, *Oleaceae* itd.) i ehinezoid koji se može pronaći u vrsti *Echinacea angustifolia* (Hänsel i Sticher, 2004).

### *Biosinteza fenolnih kiselina*

Početni spoj u biosintezi hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina je aminokiselina L-fenilalanin, a nastaje iz korizmata koji je konačni produkt biosintetskog puta šikiminske kiseline. L-fenilalanin se potom trima uzastopnim reakcijama pretvara u hidroksicimetne derivate u fenilpropanoidnom putu kojim nastaje većina aromatskih sekundarnih metabolita u biljkama. Prvi je korak stereospecifična deaminacija kojom nastaje trans dvostruka veza u bočnom lancu hidroksicimetnih derivata te potom slijedi hidroksilacija u C-4 položaju aromatskog prstena kojom nastaje p-kumarat. Daljnjom enzimskom aktivacijom, p-kumarat prelazi u p-kumaril koenzim A, ester koji stupa u daljnje reakcije fenilpropanoidnog puta. Reakcije daljnje sinteze fenolnih kiselina odvijaju se poslije nastanka p-kumarata i prije nastanka njegovog CoA estera. Različitim reakcijama hidroksilacije i metilacije p-kumarata nastaju hidroksicimetne kiseline (npr. ferulična, kavena, sinapinska itd.). Za biosintezu hidroksibenzojevih kiselina pretpostavljaju se dva puta (Slika 23): osnovni put koji se odvija degradacijom bočnog lanca hidroksicimetnih derivata i alternativni put koji kreće od 3-dehidrošikimata te uključuje enzimske reakcije kojima se prevodi u različite derivate hidroksibenzojevih kiselina (Bival Štefan, 2015; Robbins, 2013).



Slika 23. Biosinteza fenolnih kiselina (Bival Štefan, 2015).

### *Metabolizam i biodostupnost fenolnih kiselina*

Procjenjuje se da čovjek dnevno unese od 25 mg do 1 g fenolnih kiselina, ovisno o načinu ishrane pojedinca, jer su fenolne kiseline široko rasprostranjene u biljnom svijetu (Robbins, 2003). Biodostupnost fenolnih kiselina je različita te najzastupljenija fenolna kiselina u biljnom materijalu ne mora ujedno imati najvišu koncentraciju aktivnog metabolita u organizmu. Metaboliti prisutni u krvi rezultat su probave i metabolizma u jetri te se obično razlikuju od izvornog spoja. Napravljena je opsežna analiza provedenih studija koje su ispitivale biodostupnost fenolnih kiselina. Kada je unos klorogenske kiseline bio visok, kao metabolit je pronađena isključivo kavena kiselina, što međutim ne može isključiti da se određeni dio klorogenske kiseline može pronaći u izvornom obliku, jer je ona podložna hidrolizi esterazama koje se koriste prilikom obrade bioloških uzoraka prije mjerenja. Ispitana je i usporedna biodostupnost hidroksicimetnih kiselina te se pokazalo kako je najveća biodostupnost p-kumarinske kiseline, a ostale su redom od najveće prema najmanjoj bile: ferulična > kavena > ružmarinska > klorogenska. Hidroksicimetne kiseline imaju relativno brz metabolizam, metaboliziraju se u lumenu crijeva i crijevnoj mukozi te jetri i bubregu, a metabolički put ovisi o strukturi i dozi. Hidroksibenzojeve kiseline manje su zastupljene u biljnom svijetu te je samim time manji broj studija njihove biodostupnosti (Bival Štefan, 2015).

### *Biološki učinci i potencijalna primjena fenolnih kiselina*

Istraživanja provedena na ružmarinskoj kiselini pokazala su njezine brojne učinke. Dokazan je antioksidacijsko djelovanje te učinak na stabilizaciju stanične membrane, ali i baktericidno djelovanje na određene sojeve koji su često rezistentni na antibiotike (*Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterococcus faecalis*). Nadalje, dokazano je da ružmarinska kiselina može imati protektivne učinka kod različitih faktora opasnih po zdravlje, npr. UVB zračenja (smanjuje oštećenja humanih keratinocita), doksorubicina i 1,2-dimetilhidrazina (smanjuje oštećenja DNA). Pokazala je potencijal za primjenu kod atopijskog dermatitisa i drugih upalnih stanja, kod različitih neuroloških oboljenja (gdje bi se mogla koristiti kao protektivni faktor) te u prevenciji i terapiji karcinoma dojke (inhibirala je metastaziranje na kosti) (Bival Štefan, 2015).

Klorogenska kiselina je pokazala potencijalnu primjenu u različitim bolestima krvožilnog sustava, npr. plućnoj hipertenziji (inhibira proliferaciju glatkih mišićnih stanica plućne arterije uzrokovanu hipoksijom), hipertenziji (smanjuje sistolički i dijastolički krvni tlak), ali ima i antiagregacijsko djelovanje što može pridonijeti prevenciji tih bolesti. Istraživanja su pokazala kako bi mogla olakšavati simptome dijabetičke neuropatije (nociceptivni učinak uočen kod štakora), služiti u liječenju i prevenciji metaboličkog sindroma, terapiji osteoartritisa i drugih upalnih stanja te kod hepatocelularnog karcinoma (povećava osjetljivost na 5-fluorouracil) (Bival Štefan, 2015).

Kliničkim studijama dokazano je da kavena kiselina smanjuje trombocitopeniju i leukopeniju uzrokovanu imatinibom u pacijenata oboljelih od kronične mijeloične leukemije. Osim toga, rezultati različitih istraživanja pokazali su da bi se mogla koristiti u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja, terapiji akutnog i kroničnog kontaktnog dermatitisa te u liječenju virusa influence tipa A. Potencijal u liječenju rezistentnih sojeva, kao što su *Staphylococcus aureus* i meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*, pokazale su kavena i galna kiselina. Osim toga, galna je kiselina, djelovanjem na signalne puteve i enzime (amilaza i glukozidaza), pokazala kako bi se mogla koristiti u dijabetesu i aterosklerozi, čemu pridonosi i njezin dokazani antioksidativni učinak. Različite kiseline pokazale su učinak u prevenciji oksidacijskog stresa te antioksidativnu aktivnost, npr. ferulična, izoferulična te p-hidroksibenzojeva kiselina. Također, uključujući gore navedene kiseline, dokazan je učinak na kardiovaskularni sustav, npr. p-kumarinske kiseline (protektivni učinak kod izoproterenolom izazvanog infarkta miokarda) i sinapinske kiseline (smanjuje krvni tlak, disfunkciju miokarda i krvnih žila itd.). Uočeni su i učinci fenolnih kiselina na živčani sustav; npr. siringična kiselina je zbog svojeg antioksidativnog i neuroprotektivnog učinka pokazala potencijal u profilaksi kod ishemijskih ozljeda leđne moždine; ferulična kiselina bi se mogla koristiti kod cerebralne ishemije zbog svog neuroprotektivnog djelovanja preko različitih neuroloških protektivnih faktora; i p-kumarinska kiselina koja djelovanjem na GABA receptore djeluje anksiolitički i smanjivanjem neurološkog deficita pokazuje potencijal u prevenciji simptoma anksioznosti i terapiji cerebralne ishemije. Potencijal u liječenju dijabetesa pokazale su izoferulična kiselina (inhibira glukoneogenezu i povećava unos glukoze u tkiva) i siringična kiselina (smanjuje glukozu u plazmi i povećava koncentracije inzulina i C-peptida). Rezultati različitih studija pokazali su kako bi brojne fenolne kiseline mogle pronaći svoje mjesto u terapiji karcinoma, npr. sinapinska kiselina u terapiji karcinoma kolona (uočen je protektivan učinak u štakora) i ferulična kiselina koja je pokazala

nefroprotektivan učinak kod primjene citostatika cisplatina. Potencijalnu uporabu u terapiji ulceroznog kolitisa i ostalih kroničnih upalnih bolesti probavnog sustava mogla bi naći vanilinska kiselina, koja je kod životinjskih modela smanjivala ekspresiju ciklooksigenaze 2 (COX-2) i aktivirala ekspresiju NF-κB. No, većina istraživanja provedena je *in vitro* ili *in vivo* na životinjama te je potrebno dodatno istraživati spomenute učinke (Bival Štefan, 2015).

U novije su vrijeme iz droga koje se koriste u kineskoj medicini (*Salviae miltiorrhizae radix*) izolirane nove fenolne kiseline koje su pokazale različite potencijalne blagotvorne učinke na zdravlje, kao što su vazodilatatorni učinak, sniženje krvnog tlaka, poboljšanje funkcije bubrega i hepatoprotektivni učinak (Hänsel i Sticher, 2004).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovog diplomskog rada bio je kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih kiselina u uzorku lista *Laurus nobilis* L. (lovor) s područja Dalmacije / južnog Jadrana.

Kvalitativna analiza fenolnih kiselina provedena je primjenom tankoslojne kromatografije (TLC).

Kvantitativna analiza provedena je spektrofotometrijskom metodom koju propisuje Europska farmakopeja, a koja se temelji na reakciji nitrit-molibdat reagensa s o-dihidroksifenolnom skupinom u strukturi hidroksicimetnih derivata (fenolnih kiselina).

Rezultati provedene studije predstavljaju osnovu daljnjih istraživanja biološke aktivnosti i fitoterapijskog potencijala pripravaka vrste *Laurus nobilis* L.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Biljni materijal

Biljni materijal prikupljen je tijekom rujna 2014. godine sa 7 područja južnog Jadrana: Sumartin na Braču, Blato na Korčuli, Lastovo na Lastovu, Orebić na Pelješcu, Suđurađ na Šipanu, Polača na Mljetu te Pločice u Konavlima, kao što je prikazano u Tablici 6. Identifikacija biljnog materijala provedena je u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Tablica 6. Popis, zemljopisni položaj i nadmorska visina lokaliteta s kojih je prikupljen biljni materijal.

Lokalitet	Zemljopisni položaj		Nadmorska visina
	Zemljopisna dužina	Zemljopisna širina	(m)
Brač (Sumartin)	43 17'17.9" N	16 51'58.4" E	5-25
Korčula (Blato)	42 56'12.1" N	16 47'47.8" E	144
Lastovo (Lastovo)	42 45'55.2" N	16 54'04.7" E	88
Pelješac (Orebić)	42 58'44.3" N	17 08'29.6" E	131
Šipan (Suđurađ)	42 42'42.6" N	17 54'56.9" E	48
Mljet (Polača)	42 47'06.7" N	17 22'39.5" E	25
Konavle (Pločice)	42 29'32.0" N	18 24'43.8" E	226

## 3.2 Aparatura i kemikalije

Aparatura:

- UV-Vis spektrofotometar Agilent 8453E (Hewlett Packard, Njemačka); kiveta 1 cm
- Ultraljubičasta lampa (UPV Upland U.S.A., UVGL-58)
- Tikvice s okruglim dnom, odmjerne tikvice, Erlenmeyerove tikvice
- Povratno hladilo
- Plamenik, stalak, azbestna mrežica
- Lijeveci za odjeljivanje, filter papir
- Vodena kupelj
- Menzure, pipete, propipete, kapalice, čaše, žlice, štapići
- Epruvete
- Kieselgel 60 F<sub>254</sub>
- Kromatografska komora, Eppendorf epruvete, kapilare

Kemikalije:

- Etanol (Carlo Erba, Rodano, Italija)
- Klorovodična kiselina
- Natrijev nitrit (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev molibdat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid (Sigma-Aldrich, Stockholm, Švedska)
- Metanol (Carlo Erba, Rodano, Italija)
- Etil acetat (Carlo Erba, Rodano, Italija)
- Mravlja kiselina (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Ledena octena kiselina (Panreac, Barcelona, Španjolska)
- Naturstoff reagens (NST) (Fluka, Buchs, Švicarska)
- Polietilenglikol 4000 (PEG 4000) (Fluka, Buchs, Švicarska)
- Standardne otopine ferulične, kavene, klorogenske i ružmarinske kiseline (Roth, Karlsruhe, Njemačka)



### 3.3 Metode i postupci istraživanja

#### 3.3.1 Kvalitativna analiza fenolnih kiselina

Kvalitativna analiza fenolnih kiselina u biljnom materijalu provedena je dvjema metodama tankoslojne kromatografije (TLC). TLC se zasniva na raspodjeli tvari između krutog adsorbensa (nepokretne faze) i tekuće pokretne faze. Uzorak se na tanki sloj adsorbensa nanosi kao točka ili linija, a razvijanje se provodi u zatvorenoj komori s mobilnom fazom. Pokretna faza prolazi kroz tanki sloj adsorbensa nošena kapilarnim silama. Do razlučivanja sastojaka smjese dolazi zbog različitog afiniteta pojedinih sastavnica smjese prema nepokretnoj i pokretnoj fazi, što uzrokuje različite faktore zaostajanja odijeljenih tvari ( $R_f$ -vrijednosti). Karakterizacija odijeljenih sastavnica provodi se pomoću  $R_f$ -vrijednosti i/ili usporedbom s kromatogramom poredbene tvari.  $R_f$ -vrijednost predstavlja omjer udaljenosti koju prijeđe ispitivana tvar i udaljenosti koju prijeđe pokretna faza (Vladimir-Knežević i Blažeković, 2008).

#### *Priprema ekstrakta biljnog materijala*

Po 0,1 g praškaste droge (list lovora) ekstrahira se s 2 mL metanola tijekom 10 minuta na vodenoj kupelji zagrijanoj na 60°C.

#### *Tankoslojna kromatografija (TLC)*

TLC se provodi na pločama s tankim slojem Kieselgela 60 F<sub>254</sub>. Kao mobilne faze primijenjene su dvije različite smjese otapala. Za prvu ploču korišteni su: etil acetat, mravlja kiselina, ledena octena kiselina i voda u omjeru 100:11:11:27 (V/V). Za drugu ploču korištena je smjesa otapala etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V). Obje ploče prskane su Naturstoff-reagensom i 5% etanolnom otopinom polietilen glikola 4000 (NST/PEG). Kromatogrami su potom promatrani pod UV svjetlom na valnoj duljini od 365 nm (Wagner i sur., 1983). Naturstoff-reagens se pripremi otapanjem 1 g β-etilaminoestera difenilborne kiseline u 100 mL metanola. Poredbene otopine pripremljene su otapanjem standarda ferulične, kavene, klorogenske i ružmarinske kiseline u metanolu.

### 3.3.2 Kvantitativna analiza fenolnih kiselina

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina, tj. hidroksicimetnih derivata u listovima vrste *Laurus nobilis* L. provedena je spektrofotometrijskom metodom prema monografiji Rosmarini folium koju propisuje Europska farmakopeja (EDQM, 2004), gdje je sadržaj izražen na ružmarinsku kiselinu, te spektrofotometrijskom metodom koju propisuje Europska farmakopeja (EDQM, 2004), a sadržaj je izražen kao klorogenska kiselina.

#### **Kvantitativna analiza fenolnih kiselina izraženih kao ružmarinska kiselina**

*Ekstrakcija (priprema osnovne otopine):* Izvagano je po 0,200 g praškasto usitnjene biljne droge, dodano 80 mL 50%-tnog etanola i zagrijavano u tikvici s povratnim hladilom na kipućoj vodenoj kupelji 30 minuta. Nakon hlađenja se osnovna otopina dobije filtriranjem sadržaja kroz filter papir u odmjernu tikvicu od 100,0 mL te nadopunjavanjem do oznake 50%-tnim etanolom.

*Priprema ispitivane otopine:* 1,0 mL osnovne otopine se u odmjernoj tikvici od 10,0 mL pomiješa s 2,0 mL 0,5 M klorovodične kiseline, 2,0 mL nitrit-molibdat reagensa koji je dobiven otapanjem 10 g natrijeva nitrita i 10 g natrijeva molibdata u 100,0 mL vode te s 2,0 mL 8,5%-tne otopine natrijevog hidroksida. Tikvica se nadopuni do 10,00 mL destiliranom vodom.

*Priprema kompenzacijske otopine:* 1,0 mL ispitivane otopine razrijedi se destiliranom vodom do 10,00 mL u odmjernoj tikvici od 10,00 mL.

Svi su uzorci pripremljeni u duplikatu. Apsorbancija dobivenih otopina mjerena je na 505 nm. Mjerenja svakog uzorka provedena su 3 puta.

Maseni udio fenolnih kiselina izračunat je pomoću specifične apsorbancije koja za ružmarinsku kiselinu pri 505 nm iznosi 400 i izražen kao ružmarinska kiselina prema izrazu:

$$\% = A \times 2,5 / m$$

gdje je:

- A – izmjerena apsorbancija na 505 nm
- m – masa droge izražena u gramima

## **Kvantitativna analiza fenolnih kiselina izraženih kao klorogenska kiselina**

*Ekstrakcija (priprema osnovne otopine):* Izvagano je po 0,200 g praškasto usitnjene biljne droge, dodano 80 mL 50%-tnog etanola i zagrijavano u tikvici s povratnim hladilom na kipućoj vodenoj kupelji 30 minuta. Nakon hlađenja se osnovna otopina dobije filtriranjem sadržaja kroz filter papir u odmjernu tikvicu od 100,0 mL te nadopunjavanjem do oznake 50%-tnim etanolom.

*Priprema ispitivane otopine:* 1,0 mL osnovne otopine se u odmjernoj tikvici od 10,0 mL pomiješa s 2,0 mL 0,5 M klorovodične kiseline, 2,0 mL nitrit-molibdat reagensa koji je dobiven otapanjem 10 g natrijeva nitrita i 10 g natrijeva molibdata u 100,0 mL vode te s 2,0 mL 8,5%-tne otopine natrijevog hidroksida. Tikvica se nadopuni do 10,00 mL destiliranom vodom.

*Priprema kompenzacijske otopine:* 1,0 mL ispitivane otopine razrijedi se destiliranom vodom do 10,00 mL u odmjernoj tikvici od 10,00 mL.

Svi su uzorci pripremljeni u duplikatu. Apsorbancija dobivenih otopina mjerena je na 525 nm. Mjerenja svakog uzorka provedena su 3 puta.

Maseni udio fenolnih kiselina izračunat je pomoću specifične apsorbancije koja za klorogensku kiselinu pri 525 nm iznosi 188 i izražen kao klorogenska kiselina prema izrazu:

$$\% = A \times 5,3 / m$$

gdje je:

- A – izmjerena apsorbancija na 525 nm
- m – masa droge izražena u gramima

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

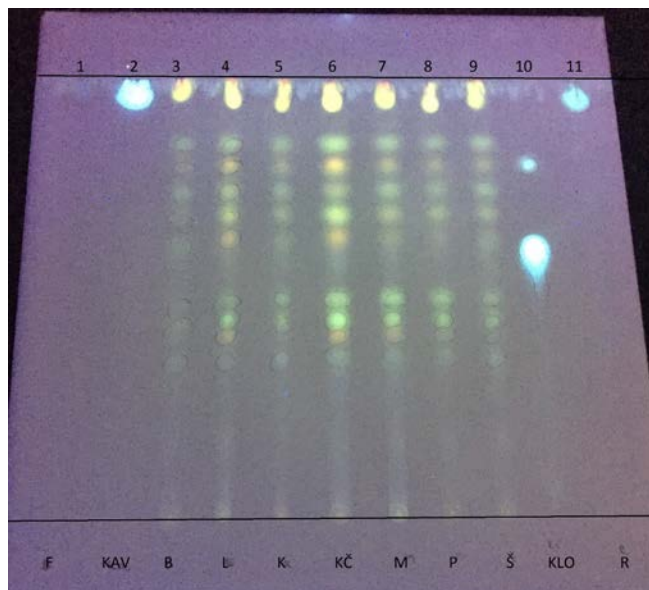
### **4.1 Rezultati kvalitativne analize fenolnih kiselina primjenom tankoslojne kromatografije**

Kao stacionarna faza korišten je tanki sloj Kieselgela 60F<sub>254</sub> na koji su nanesene standardne otopine fenolnih kiselina (ferulične, kavene, klorogenske i ružmarinske kiseline) te metanolni ekstrakti droga. Kao mobilna faza korištene su dvije različite smjese otapala; za prvu ploču primijenjena je smjesa etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V); za drugu ploču korištena je smjesa etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V). Obje ploče prskane su Naturstoff-reagenskom i 5%-tnom otopinom polietilenglikola 4000 (NST/PEG) te su potom kromatogrami promatrani pod UV svjetlom valne duljine 365 nm (Wagner i sur., 1983).

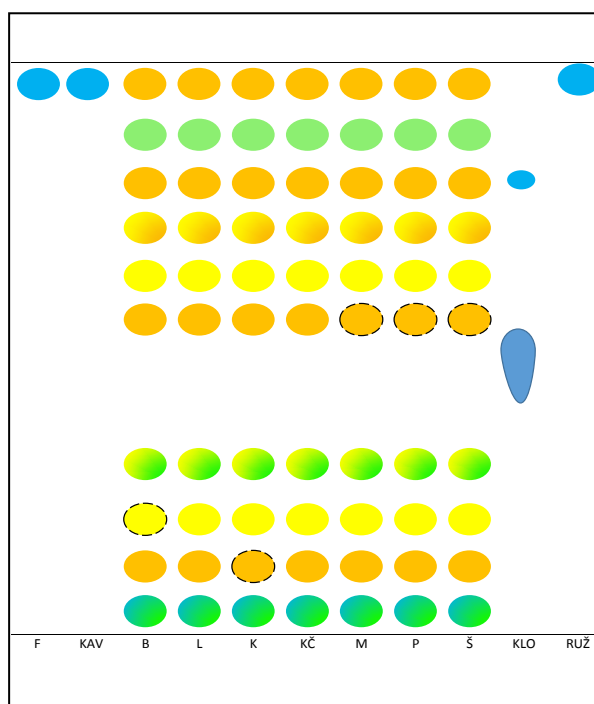
Promatranjem kromatograma pod UV-365 nm, uočljive su narančaste, žute, narančastožute, zelene, plavozelene i zelenožute mrlje. Narančaste mrlje pripadaju kvercetinским flavonoidima, a narančaste mrlje na vrhu kromatograma (nepolarne tvari) pripadaju aglikonu kvercetinsu. Žute mrlje također mogu pripadati flavonoidima, ali drugog tipa (npr. naringenin, luteolin). Plavozelene ili zelene kromatografske zone vjerojatno pripadaju iridoidima i/ili fenolnim kiselinama.

#### **Rezultati TLC s razvijačem (1): etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V)**

Na kromatogramu je vidljivo da su se uzorci razdvojili u 10 zona različitih boja te različitih intenziteta obojenja. U svakom uzroku prisutne su 4 mrlje žute boje, 4 mrlje narančaste boje, 1 mrlja žutonarančaste boje te jedna mrlja svijetlozelene boje. Standardne otopine ferulične, kavene i ružmarinske kiseline daju po 1 mrlju plave boje, dok standardna otopina klorogenske kiseline pokazuje dvije plavo obojene zone.



Slika 24. Kromatogram metanolnih ekstrakata lovorova lista s razvijanjem (1); UV-365 nm. Oznake: 1/F – ferulična kis.; 2/KAV - kavena kis.; 3/B- Brač; 4/L – Lastovo; 5/K – Konavle; 6/KČ – Korčula; 7/M – Mljet; 8/P – Pelješac; 9/Š – Šipan; 10/KLO – klorogenska kis.; 11/R – rutin.



Slika 25. Prikaz boja i okvirnog položaja razvijenih mrlja na kromatogramu sa Slike 24. Mrlje označene isprekidanom crnom linijom bile su slabije vidljive.

Tablica 7 prikazuje izračun  $R_f$  vrijednosti za svaku kromatografsku zonu svih uzoraka.

$R_f$  vrijednost (a/b) računa se kao omjer udaljenosti sredine svake kromatografske zone od starta (a) u odnosu na udaljenost starta od fronta (b). U ovom slučaju, b iznosi 14,9 cm.

Tablica 7. Prikaz kromatografskih vrijednosti (a) i  $R_f$  vrijednosti za razvijlač (1).

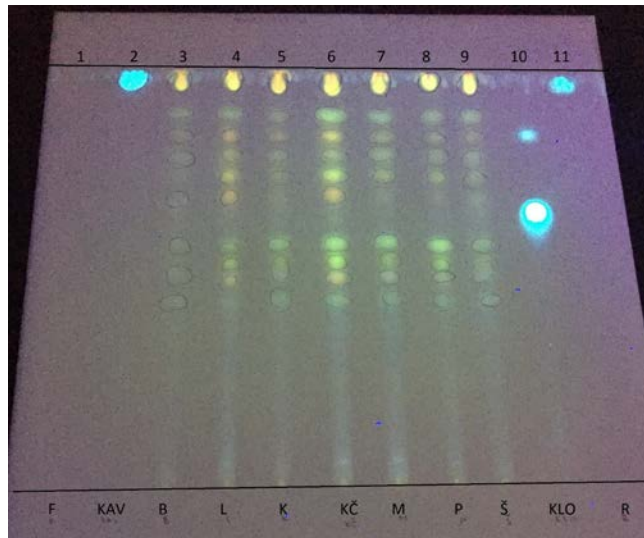
uzorci		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
zone		F	KAV	B	L	K	KČ	M	P	Š	KLO	R
1	a	-	-	4,70	4,70	4,70	4,80	4,80	4,80	4,70	-	-
	$R_f$	-	-	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	-	-
2	a	-	-	5,40	5,50	5,40	5,50	5,60	5,50	5,40	-	-
	$R_f$	-	-	0,36	0,37	0,36	0,37	0,38	0,37	0,36	-	-
3	a	-	-	5,80	6,00	5,90	6,00	6,10	6,00	5,90	-	-
	$R_f$	-	-	0,39	0,40	0,40	0,40	0,41	0,40	0,40	-	-
4	a	-	-	6,50	6,70	6,80	6,70	6,80	6,70	6,70	-	-
	$R_f$	-	-	0,44	0,45	0,46	0,45	0,46	0,45	0,45	-	-
5	a	-	-	8,70	8,80	8,80	8,90	8,90	8,90	8,80	8,40	-
	$R_f$	-	-	0,58	0,59	0,59	0,60	0,60	0,60	0,59	0,56	-
6	a	-	-	9,50	9,60	9,70	9,70	9,70	9,70	9,70	-	-
	$R_f$	-	-	0,64	0,64	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	-	-
7	a	-	-	10,40	10,50	10,40	10,60	10,40	10,50	10,50	-	-
	$R_f$	-	-	0,70	0,70	0,70	0,71	0,70	0,70	0,70	-	-
8	a	-	-	11,30	11,40	11,30	11,40	11,40	11,30	11,40	11,50	-
	$R_f$	-	-	0,76	0,77	0,76	0,77	0,77	0,76	0,77	0,77	-
9	a	-	-	12,30	12,20	12,20	12,30	12,30	12,30	12,30	-	-
	$R_f$	-	-	0,83	0,82	0,82	0,83	0,83	0,83	0,83	-	-
10	a	14,00	14,10	14,30	14,20	14,10	14,10	14,20	14,20	14,30	-	14,00
	$R_f$	0,94	0,95	0,96	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,96	-	0,94

Na temelju položaja kromatografskih zona uzoraka i standarda te usporedbe izračunatih  $R_f$  vrijednosti, moguće je zaključiti sljedeće:

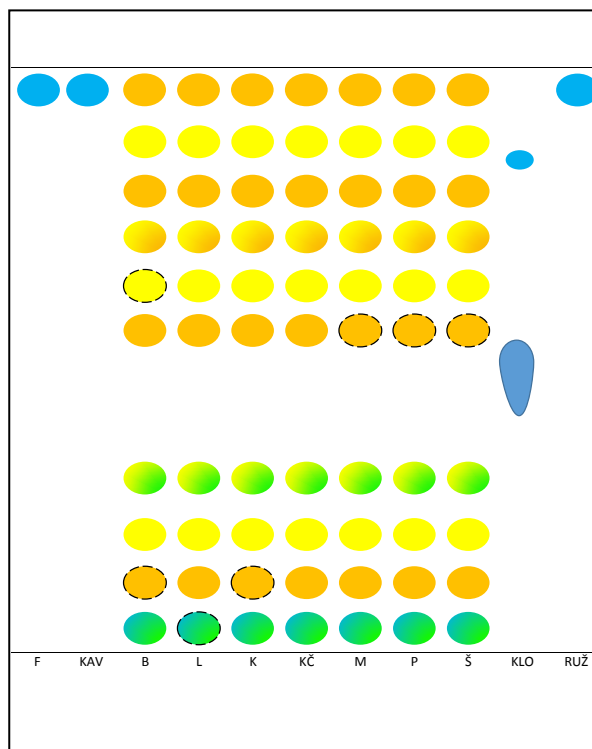
- najveći intenzitet razvijenih kromatografskih zona primijećen je za uzorak s Korčule;
- zona klorogenske kiseline je plave boje, no  $R_f$  vrijednosti koje odgovaraju klorogenskoj kiselini uočeni su kao svijetlo narančaste mrlje, stoga nije moguće sa sigurnošću potvrditi prisutnost spomenute fenolne kiseline u uzorcima lovora jer je moguće da su narančaste zone flavonoida prekrile plavkastu klorogensku kiselinu; najveći intenzitet mrlja sa spomenutom  $R_f$  vrijednošću uočen je za uzorak s Korčule, potom za Brač, dok je u ostalim uzorcima intenzitet fluorescencije znatno slabiji;
- mrlje koje odgovaraju  $R_f$  vrijednostima standardnih otopina ferulične, kavene i ružmarinske kiseline podudaraju se s narančastim mrljama kvercetinškog aglikona; naime, to su izrazito nepolarni spojevi koji visoko putuju u primijenjenom razvijaju te je moguće međusobno prekrivanje plavozelenih (ferulična, ružmarinska i kavena kiselina) i narančastih mrlja (kvercetin). Stoga se prisutnost/odsutnost ferulične, ružmarinske i kavene kiseline u ispitanim uzorcima lovora ne može sa sigurnošću potvrditi.

### **Rezultati kromatografije s razvijanjem (2): etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V)**

Na kromatogramu promatranom pod UV-365 nm vidljivo je da su se uzorci razdvojili u 10 različitih zona različitih boja i intenziteta. Analizom se svaki uzorak razdijelio u 3 žute, 4 narančaste, 1 žutonarančastu, 1 zelenožutu i 1 zelenoplavu zonu. Standardne otopine ferulične, kavene i ružmarinske kiseline daju po 1 mrlju plave boje, dok se standardna otopina klorogenske kiseline razdvojila u 2 mrlje plave boje.



Slika 26. Kromatogram metanolnih ekstrakata lovorova lista s razvijačem (2); UV-365 nm. Oznake: 1/F – ferulična kis.; 2/KAV - kavena kis.; 3/B- Brač; 4/L – Lastovo; 5/K – Konavle; 6/KČ – Korčula; 7/M – Mljet; 8/P – Pelješac; 9/Š – Šipan; 10/KLO – klorogenska kis.; 11/R – rutin.



Slika 27. Prikaz boja i okvirnog položaja razvijenih mrlja na kromatogramu sa Slike 26. Mrlje označene isprekidanom crnom linijom bile su slabije vidljive.



Tablica 8 prikazuje izračun  $R_f$  vrijednosti za svaku kromatografsku zonu svih uzoraka.

$R_f$  vrijednost (a/b) računa se kao omjer udaljenosti sredine svake kromatografske zone od starta (a) u odnosu na udaljenost starta od fronta (b). U ovom je slučaju b iznosio 15 cm.

Tablica 8. Prikaz kromatografskih vrijednosti (a) i  $R_f$  vrijednosti za razvijlač (2).

uzorci		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
zone		F	KAV	B	L	K	KČ	M	P	Š	KLO	R
1	a	-	-	5,90	5,80	6,00	5,90	6,00	5,90	5,90	-	-
	$R_f$	-	-	0,39	0,39	0,40	0,39	0,40	0,39	0,39	-	-
2	a	-	-	6,80	6,60	6,90	6,70	6,70	6,80	6,70	-	-
	$R_f$	-	-	0,45	0,44	0,46	0,45	0,45	0,45	0,45	-	-
3	a	-	-	7,00	7,30	7,30	7,20	7,40	7,20	7,10	-	-
	$R_f$	-	-	0,47	0,49	0,49	0,48	0,49	0,48	0,47	-	-
4	a	-	-	7,90	7,80	8,00	8,00	8,10	7,90	7,80	-	-
	$R_f$	-	-	0,53	0,52	0,53	0,53	0,54	0,53	0,52	-	-
5	a	-	-	9,70	9,70	9,70	9,80	9,90	9,70	9,60	9,00	-
	$R_f$	-	-	0,65	0,65	0,65	0,65	0,66	0,65	0,64	0,60	-
6	a	-	-	10,50	10,50	10,50	10,60	10,50	10,50	10,40	-	-
	$R_f$	-	-	0,70	0,70	0,70	0,71	0,70	0,70	0,69	-	-
7	a	-	-	11,30	11,40	11,30	11,40	11,40	11,30	11,20	-	-
	$R_f$	-	-	0,75	0,76	0,75	0,76	0,76	0,75	0,75	-	-
8	a	-	-	12,20	12,20	12,20	12,20	12,20	12,00	12,00	12,10	-
	$R_f$	-	-	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81	0,80	0,80	0,81	-
9	a	-	-	13,10	13,00	12,90	13,00	12,90	12,90	12,90	-	-
	$R_f$	-	-	0,87	0,87	0,86	0,87	0,86	0,86	0,86	-	-
10	a	14,50	14,40	14,40	14,40	14,40	14,40	14,30	14,30	14,30	-	14,30
	$R_f$	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,95	0,95	0,95		0,95

Na temelju položaja kromatografskih zona uzoraka i standarda te usporedbe izračunatih  $R_f$  vrijednosti dobivenih u kromatografskim uvjetima s razvijlačem (2), moguće je izvesti zaključke analogne onima dobivenim pri tumačenju kromatograma s razvijlačem (1).

S razvijlačem (2) postignuto je nešto lošije razdvajanje i slabiji intenzitet fluorescencije razvijenih kromatografskih zona u odnosu na kromatogram dobiven s razvijlačem (1).

## 4.2 Rezultati kvantitativne analize fenolnih kiselina spektrofotometrijskom metodom

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina, tj. hidroksicimetnih derivata, u uzorcima listova lovora s područja Dalmacije provedena je spektrofotometrijskom metodom prema monografiji Europske farmakopeje, gdje su fenolne kiseline izražene kao ružmarinska kiselina (EDQM, 2004), odnosno kao klorogenska kiselina (EDQM, 2004). Postupak ekstrakcije jednak je za obje metode i opisan u poglavlju 3.3.1.

Određivanje se temelji na prisutnosti o-dihidroksifenolne skupine u strukturi hidroksicimetnih derivata koja s nitrit-molibdat reagensom daje žuto obojene komplekse. Zaluživanjem otopine, žuta boja prelazi u narančastocrvenu (Vladimir-Knežević, 2008).

Svi su uzorci pripremljeni u duplikatu. Apsorbancija dobivenih otopina mjerena je na 505 nm za metodu kojom se sadržaj fenolnih kiselina izražava kao ružmarinska kiselina, te na 525 nm za metodu kojom se udio fenolnih kiselina računa kao klorogenska kiselina.

Mjerenja svakog uzorka provedena su 3 puta.

Maseni udio fenolnih kiselina izračunat je i izražen kao ružmarinska kiselina prema izrazu:

$$\% = A \times 2,5 / m$$

gdje je: A – izmjerena apsorbancija na 505 nm; m – masa droge izražena u gramima; specifična apsorbancija ružmarinske kiseline pri 505 nm iznosi 400.

Maseni udio fenolnih kiselina izračunat je i izražen kao klorogenska kiselina prema izrazu:

$$\% = A \times 5,3 / m$$

gdje je: A – izmjerena apsorbancija na 525 nm; m – masa droge izražena u gramima; specifična apsorbancija klorogenske kiseline pri 525 nm iznosi 188.

## Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina izraženih kao ružmarinska kiselina

Svi postupci rađeni su u duplikatu te se stoga u nastavku nalaze dvije tablice za dva mjerenja, Tablice 9. i 10.

Svako mjerenje izvedeno je tri puta (A1, A2, A3) te je izračunata srednja vrijednost mjerenja ( $\bar{A}$ ). Također je provedena i statistička analiza u obliku računanja standardnog odstupanja

(SD) koja se računa po izrazu  $SD = \sqrt{\frac{\sum(A - \bar{A})^2}{N - 1}}$ , gdje je N broj podataka koji u ovom slučaju iznosi 3 te u obliku računanja relativnog standardnog odstupanja (RSD) koja se računa po izrazu  $\frac{SD}{\bar{A}}$ .

Postotak fenolnih kiselina računat je prema iznad objašnjenom izrazu.

Svi postupci rađeni su u duplikatu te se stoga u nastavku nalaze dvije tablice za dva mjerenja Tablica 9. i Tablica 10. Dobivene Vis-spektre donose slike 28. do 34.

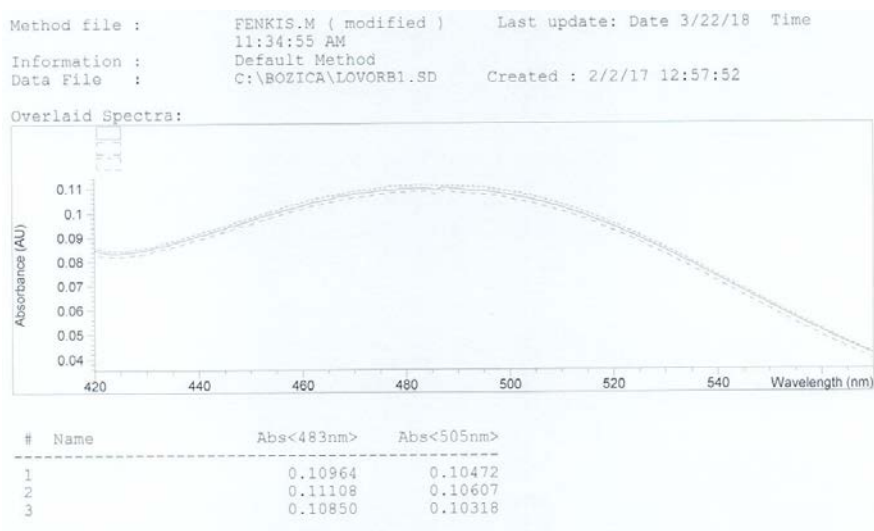
Tablica 9. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina izraženih kao ružmarinska kiselina (PRVO MJERENJE).

Br. uz.	Uzorak	Odvaga (g)	A1	A2	A3	$\bar{A}$	SD	RSD	%
1	Brač	0,1999	0,105	0,106	0,103	0,1047	0,0015	1,4594	1,31
2	Lastovo	0,2018	0,245	0,245	0,246	0,2453	0,0006	0,2353	3,04
3	Konavle	0,2008	0,178	0,178	0,175	0,1770	0,0017	0,9786	2,20
4	Korčula	0,2019	0,229	0,231	0,229	0,2297	0,0012	0,5028	2,84
5	Mljet	0,2003	0,185	0,187	0,187	0,1863	0,0012	0,6197	2,33
6	Pelješac	0,2004	0,231	0,234	0,230	0,2317	0,0021	0,8986	2,89
7	Šipan	0,2003	0,202	0,202	0,202	0,2020	0,0000	0,0000	2,52

Tablica 10. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina izraženih kao ružmarinska kiselina (DRUGO MJERENJE).

Br. uz.	Uzorak	Odvaga (g)	A1	A2	A3	$\bar{A}$	SD	RSD	%
1	Brač	0,1999	0,115	0,108	0,108	0,1103	0,0040	3,6629	1,38
2	Lastovo	0,2018	0,244	0,244	0,243	0,2437	0,0006	0,2369	3,02
3	Konavle	0,2008	0,177	0,178	0,175	0,1767	0,0015	0,8646	2,20
4	Korčula	0,2019	0,234	0,232	0,232	0,2327	0,0012	0,4963	2,88
5	Mljet	0,2003	0,191	0,189	0,186	0,1887	0,0025	1,3339	2,35
6	Pelješac	0,2004	0,244	0,243	0,243	0,2433	0,0006	0,2373	3,04
7	Šipan	0,2003	0,196	0,192	0,193	0,1937	0,0021	1,0749	2,42

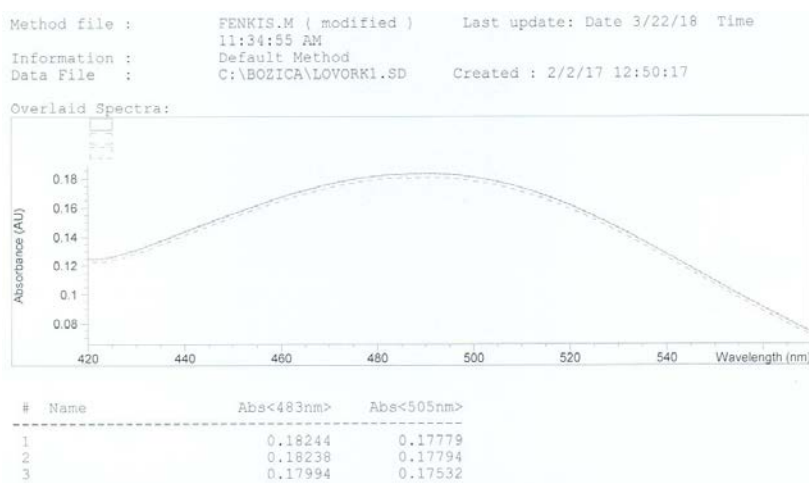
Najveći udio fenolnih kiselina zabilježen je u uzorku lista lovora s Lastova te je iznosio  $3,04 \pm 0,0006\%$ , odnosno  $3,02 \pm 0,0006\%$ . Sličan, iako nešto manji postotak fenolnih kiselina izmjeren je u uzorku s Pelješca te je iznosio  $3,04 \pm 0,0006\%$ , odnosno  $2,89 \pm 0,0021\%$ . Najmanji udio fenolnih kiselina zabilježen je u uzorku s Brača te je iznosio  $1,38 \pm 0,004\%$ , odnosno  $1,31 \pm 0,0015\%$ .



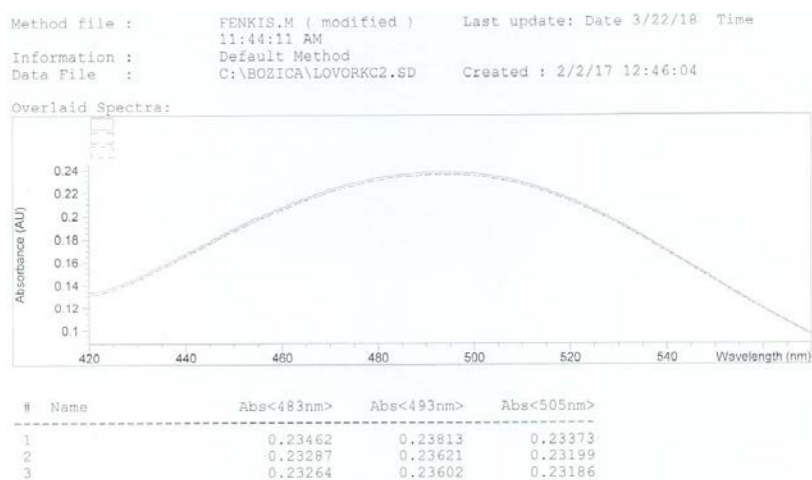
Slika 28. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije fenolnih kiselina u ekstraktu lovora s Brača.



Slika 29. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije fenolnih kiselina u ekstraktu lovora s Lastova.



Slika 30. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije fenolnih kiselina u ekstraktu lovora iz Konavala.



Slika 31. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije fenolnih kiselina u ekstraktu lovora s Korčule.

## Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina izraženih kao klorogenska kiselina

Svako mjerenje izvedeno je tri puta (A1, A2, A3) te je izračunata srednja vrijednost mjerenja ( $\bar{A}$ ). Također je provedena i statistička analiza u obliku računanja standardnog odstupanja (SD) i relativnog standardnog odstupanja (RSD) koje se računaju prema iznad objašnjenim izrazima. Postotak fenolnih kiselina računat je prema prethodno objašnjenom izrazu.

Svi postupci rađeni su u duplikatu te se stoga u nastavku nalaze dvije tablice (Tablica 11. i Tablica 12).

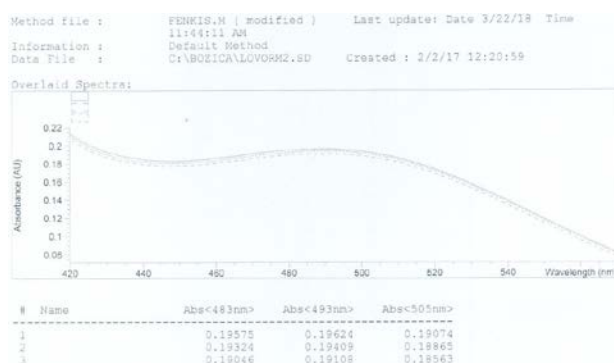
Tablica 11. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina izraženih kao klorogenska kiselina (PRVO MJERENJE).

Br. uz.	Uzorak	Odvaga (g)	A1	A2	A3	$\bar{A}$	SD	RSD	%
1	Brač	0,1999	0,09	0,091	0,088	0,0897	0,0015	1,7036	2,38
2	Lastovo	0,2018	0,213	0,213	0,212	0,2127	0,0006	0,2715	5,59
3	Konavli	0,2008	0,154	0,154	0,152	0,1533	0,0012	0,7531	4,05
4	Korčula	0,2019	0,199	0,203	0,201	0,2010	0,0020	0,9950	5,28
5	Mljet	0,2003	0,159	0,162	0,162	0,1610	0,0017	1,0758	4,26
6	Pelješac	0,201	0,201	0,205	0,201	0,2023	0,0023	1,1414	5,34
7	Šipan	0,2003	0,174	0,175	0,175	0,1747	0,0006	0,3305	4,62

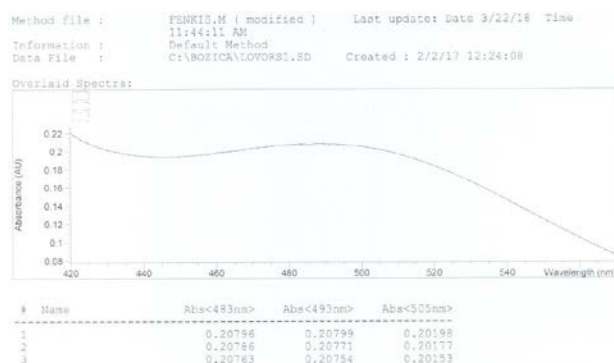
Tablica 12 Rezultati spektrofotometrijskog određivanja fenolnih kiselina izraženih kao klorogenska kiselina (DRUGO MJERENJE).

Br. uz.	Uzorak	Odvaga (g)	A1	A2	A3	$\bar{A}$	SD	RSD	%
1	Brač	0,1999	0,099	0,093	0,093	0,0950	0,0035	3,6464	2,52
2	Lastovo	0,2018	0,211	0,212	0,211	0,2113	0,0006	0,2732	5,55
3	Konavli	0,2008	0,153	0,154	0,152	0,1530	0,0010	0,6536	4,04
4	Korčula	0,2019	0,205	0,203	0,203	0,2037	0,0012	0,5670	5,35
5	Mljet	0,2003	0,166	0,164	0,161	0,1637	0,0025	1,5376	4,33
6	Pelješac	0,2004	0,214	0,213	0,213	0,2133	0,0006	0,2706	5,64
7	Šipan	0,2003	0,171	0,167	0,168	0,1687	0,0021	1,2342	4,46

Najveći udio fenolnih kiselina zabilježen je u uzorku lista lovora s Lastova te je iznosio  $5,59 \pm 0,0006\%$  te  $5,55 \pm 0,0006\%$ . Najveći pojedinačni postotak zapravo je dobiven u ekstraktu s Pelješca te je iznosio  $5,64 \pm 0,0006\%$ , međutim, ako se uzme u obzir drugo mjerenje ( $5,34 \pm 0,0023\%$ ), može se zaključiti kako je ipak veći udio fenolnih kiselina u ekstraktu s Lastova. Najmanji udio fenolnih kiselina zabilježen je u uzorku s Brača te je iznosio  $2,38 \pm 0,0015\%$ , odnosno  $2,52 \pm 0,0035\%$ .



Slika 32. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije fenolnih kiselina u ekstraktu lovora s Mljeta.



Slika 33. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije fenolnih kiselina u ekstraktu lovora sa Šipana.



Slika 34. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije fenolnih kiselina u ekstraktu lovora s Pelješca.

### 4.3 Rasprava

Usporedbom rezultata dobivenih spektrofotometrijskim mjerenjem na 505 nm (fenolne kiseline izražene kao ružmarinska kiselina) i 525 nm (fenolne kiseline izražene kao klorogenska kiselina), uočljivo je kako je postotak fenolnih kiselina izraženih kao ružmarinska kiselina bitno manji nego postotak fenolnih kiselina izraženih kao klorogenska kiselina, što se može vidjeti u Tablici 13.

Tablica 13. Usporedba rezultata dobivenih spektrofotometrijskim mjerenjem fenolnih kiselina na 505 nm (izraženi kao ružmarinska kiselina) i 525 nm (izraženi kao klorogenska kiselina).

Br. Uz.	Uzorak	%R1	%R2	%K1	%K2	%R (avg)	%K (avg)	%K - %R	%K - %R (avg)	SD
1	Brač	1,31	1,38	2,38	2,52	1,35	2,45	1,10	2,07	0,5115
2	Lastovo	3,04	3,02	5,59	5,55	3,03	5,57	2,54		
3	Konavli	2,2	2,2	4,05	4,04	2,20	4,04	1,84		
4	Korčula	2,84	2,88	5,28	5,35	2,86	5,31	2,45		
5	Mljet	2,33	2,35	4,26	4,33	2,34	4,30	1,96		
6	Pelješac	2,89	3,04	5,34	5,64	2,97	5,49	2,52		
7	Šipan	2,52	2,42	4,62	4,46	2,47	4,54	2,07		

Oznake: %R1, %R2 i %R(avg) – postotak dobiven prvim i drugim mjerenjem na 505 nm (fenolne kiseline izražene kao ružmarinska kiselina) te srednja vrijednost tih mjerenja; %K1, %K2 i %K(avg) – postotak dobiven prvim i drugim mjerenjem na 525 nm (fenolne kiseline izražene kao klorogenska kiselina) te srednja vrijednost tih mjerenja; %K - %R – razlika prosjeka mjerenja na 525 nm i 505 nm, te prosjek i standardna devijacija postotaka.

Oba načina mjerenja pokazala su kako najveću koncentraciju fenolnih kiselina ima uzorak lista lovora (*Laurus nobilis* L.) s Lastova, kojega po sadržaju slijedi Pelješac. Odnosi sadržaja fenolnih kiselina iz ostalih uzoraka su također pokazali analogne rezultate, odnosno u oba načina kvantitativnog određivanja, postotak fenolnih kiselina slijedio je rastući niz: Brač, Konavle, Mljet, Šipan, Korčula, Pelješac i Lastovo.

U prosjeku je mjerenjem fenolnih kiselina izraženih kao klorogenska kiselina dobiven za  $2,07 \pm 0,5115$  veći postotak od postotka dobivenog mjerenjem fenolnih kiselina izraženih kao ružmarinska kiselina.

Sukladno navedenome, moguće je pretpostaviti da uzorci lista lovora imaju veći udio klorogenske nego ružmarinske kiseline.



## 5. ZAKLJUČCI

U okviru ovog diplomskog rada provedena je djelomična fitokemijska karakterizacija vrste *Laurus nobilis* L. (lovor). Provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza listova lovora s područja Dalmacije/južnog Jadrana (Sumartin na Braču, Blato na Korčuli, Lastovo na Lastovu, Orebić na Pelješcu, Suđurađ na Šipanu, Polača na Mljetu te Pločice na Konavlima).

Kvalitativnom analiza koja je provedena primjenom metode tankoslojne kromatografije (TLC) može se utvrditi prisutnost fenolnih kiselina u metanolnim ekstraktima lovora. Analiza je provedena na tankom sloju Kieselgela 60 F<sub>254</sub>, primjenom dva razvijaača: (1) etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V) i (2) etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V). Korištene su standardne otopine fenolnih kiselina (ferulične, kavene, klorogenske i ružmarinske kiseline). Kromatografske zone su detektirane prskanjem Naturstoff-reagensom i 5%-tnom otopinom polietilenglikola 4000 (NST/PEG) te promatranjem pod UV svjetlom valne duljine 365 nm; na kromatogramu s razvijaačem (1) uočeno je 10 odvojenih zona koje su se međusobno razlikovale u bojama i intenzitetima. Najjači intenzitet razvijenih kromatografskih zona uočen je u uzorcima s Korčule. Nije bilo moguće sa sigurnošću potvrditi prisutnost svih ispitanih fenolnih kiselina, iako se usporedbom dobivenih R<sub>f</sub> vrijednosti može pretpostaviti njihova prisutnost. Vrlo slični rezultati, iako nešto manje intenzivni, dobiveni su s razvijaačem (2).

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina u listovima lovora provedena je spektrofotometrijski prema Europskoj farmakopeji s nitrit-molibdat reagensom u lužnatom mediju i mjerenjem apsorbancije na 505 nm (sadržaj izražen kao ružmarinska kiselina) te na 525 nm (sadržaj izražen kao klorogenska kiselina). Najveći udio fenolnih kiselina izraženih kao ružmarinska kiselina zabilježen je u uzorku lista lovora s Lastova (3,04%), a najmanji udio zabilježen je u uzorku s Brača (1,38%). Analogni rezultati dobiveni su i spektrofotometrijskom metodom preko klorogenske kiseline, tj. najveći udio zabilježen je u uzorku lista lovora s Lastova te je iznosio 5,59%, a najmanji sadržaj u uzorku lista s Brača (2,52%). Usporedbom rezultata utvrđen je veći sadržaj klorogenske nego ružmarinske kiseline u ispitivanim uzorcima lovora.

Istraživanja provedena u okviru ovoga diplomskog rada proširila su saznanja o polifenolnom sastavu lovora s područja južnog Jadrana i pridonose fitokemijskim istraživanjima vrste *Laurus nobilis* L. s područja Republike Hrvatske.

## 6. LITERATURA

1. Berend S, Grabarić Z. Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2008, 59, 205-212.
2. Berrington D, Lall N. Anticancer Activity of Certain Herbs and Spices on the Cervical Epithelial Carcinoma (HeLa) Cell Line. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012, 1-11.
3. Bival Štefan M. Biološki učinci fenolnih kiselina iz odabranih vrsta porodice Lamiaceae. Doktorski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2015, str. 1-9.
4. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*, 1998, 56, 317-333.
5. Casamassima D, Chiosi F, Vizzarri F, Palazzo M, Costagliola C. The Effect of *Laurus nobilis* on the Blood and Lenses Antioxidant Activity in Rabbit Under Fat-Enriched Diet. *Physiol. Res.* 2017, 66(2), 325-333.
6. Chmit M, Kanaan H, Habib J, Abbass M, Mcheik A, Chokr A. Antibacterial and antibiofilm activities of polysaccharides, essential oil, and fatty oil extracted from *Laurus nobilis* growing in Lebanon. *Asian Pac J Trop Med*, 2014, 7(Suppl 1), 546-552.
7. Conforti F, Statti G, Uzunov D, Menichini F. Comparative Chemical Composition and Antioxidant Activities of Wild and Cultivated *Laurus nobilis* L. Leaves and *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* (Ucria) Coutinho Seeds. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(10), 2056-2064.
8. D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*, 2007, 43(4), 348-361.
9. Dudaš S, Venier L. Varijabilnost sadržaja eteričnog ulja u listovima lovora *Laurus nobilis* L. *Glasnik zaštite bilja*, 2009, 32(6), 46-54.
10. EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care). European Pharmacopoeia, 4th Ed., Strasbourg, Council of Europe, 2004. str. 1026-1027, 2372-2378.

11. Emam AM, Mohamed MA, Diab YM, Megally NY. Isolation and structure elucidation of antioxidant compounds from leaves of *Laurus nobilis* and *Emex spinosus*. *Drug Discov Ther*, 2010, 4(3), 202-207.
12. Grdinić V, Kremer D. Ljekovito bilje i ljekovite droge: farmakoterapijski, botanički i farmaceutski podaci. Zagreb, Hrvatska ljekarnička komora, 2009, str. 19, 178, 349-350.
13. Guido LF, Vinha AF, Costa ASG, Alvesa RC, Oliveira B. Monomeric and oligomeric flavan-3-ols and antioxidant activity of leaves from different *Laurus* sp. *Food Funct*, 2015, 6, 1944-1949.
14. Hänsel R, Sticher O. Pharmakognosie – Phytopharmazie 7 Auflage. Berlin, Springer-Lehrbuch, 2004, str. 778 - 791.
15. Kaurinovic B, Popovic M, Vlaisavljevic S. *In Vitro* and *in Vivo* Effects of *Laurus nobilis* L. Leaf Extracts. *Molecules*, 2010, 15, 3378-3390.
16. Khan A, Zaman G, Anderson RA. Bay leaves improve glucose and lipid profile of people with type 2 diabetes. *J Clin Biochem Nutr*, 2009, 44(1), 52-56.
17. Koo U, Nam K, Ham A, Lyu D, Kim B, Lee S, Kim KH, Oh K, Mar W, Shin J. Neuroprotective Effects of 3a-Acetoxyeudesma-1,4(15),11(13)-trien-12,6a-olide Against Dopamine-Induced Apoptosis in the Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Line. *Neurochem Res*, 2011, 36, 1991–2001.
18. Kuštrak D. Farmakognozija fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing- Tehnička knjiga, 2005, str. 295-299, 408-409.
19. *Laurus nobilis* L., [http://caliban.mpipz.mpg.de/thome/band2/tafel\\_071.html](http://caliban.mpipz.mpg.de/thome/band2/tafel_071.html), pristupljeno: 05.03.2018.
20. *Laurus nobilis* L., <http://hirc.botanic.hr/fcd>, pristupljeno 02.03.2018.
21. Lee S, Chung S, Lee S, Park W, Oh I, Mar W, Shin J, Oh K. Acylated Kaempferol Glycosides from *Laurus nobilis* Leaves and Their Inhibitory Effects on Na/K-Adenosine Triphosphatase. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(3), 428-432.
22. Lee T, Lee S, Kim KH, Oh KB, Shin J, Mar W. Effects of magnolialide isolated from the leaves of *Laurus nobilis* L.(Lauraceae) on immunoglobulin E-mediated type I hypersensitivity in vitro. *J Ethnopharmacol*, 2013, 149(2), 550-556.
23. Maleš Ž. Predavanja s kolegija Farmaceutska botanika, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2011.
24. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79, 727-747.

25. Marković S. Fitoaromaterapija: monografije esencijalnih ulja i ljekovitih biljaka, temelji fitoaromaterapije. Zagreb, Centar Cedrus, 2005, str. 78, 286-287, 351-352.
26. Matsuda H, Shimoda H, Ninomiya K, Yoshikawa M. Inhibitory mechanism of costunolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Laurus nobilis*, on blood-ethanol elevation in rats: involvement of inhibition of gastric emptying and increase in gastric juice secretion. *Alcohol Alcohol*, 2002, 37(2), 121-127.
27. Muñoz-Márquez DB, Martínez-Ávila GC, Wong-Paz JE, Belmares-Cerda R, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrason Sonochem*, 2013, 20(5), 1149-1154.
28. Nikolić T. Sistemska botanika: raznolikost i evolucija biljnog svijeta. Zagreb, Alfa d.d., 2013, str. 107-108, 360-365, 371-375.
29. Otsuka N, Liu MH, Shiota S, Ogawa W, Kuroda T, Hatano T, Tsuchiya T. Anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) compounds isolated from *Laurus nobilis*. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(9), 1794-1797.
30. 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.
31. Persea Americana, <http://www.globalspecies.org/ntaxa/834304>, pristupljeno: 01.02.2018.
32. Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev*, 2012, 6(11), 1-5.
33. Plodovi lovora, <https://www.plantea.com.hr/lovor/digital-camera-3/>, pristupljeno 05.03.2018.
34. Porodica Lauraceae, <https://www.britannica.com/plant/Laurales#ref72777>, pristupljeno 22.02.2018.
35. Qnais EY, Abdulla FA, Kaddumi EG, Abdalla SS. Antidiarrheal activity of *Laurus nobilis* L. leaf extract in rats. *J Med Food*, 2012, 15(1), 51-57.
36. Robbins RJ. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(10), 2866-2887.
37. Simić M, Kundaković T, Kovačević N. Preliminary assay on the antioxidative activity of *Laurus nobilis* extracts. *Fitoterapia*, 2003, 74(6), 613-616.

38. 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.
39. Tyler VE. Herbal medicine: from the past to the future. *Public Health Nutrition*, 2000, 3(4A), 447-452.
40. Vladimir-Knežević S, Blažeković B. Praktikum iz Farmakognozije, Interna skripta. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008, str. 20-21.
41. Vladimir-Knežević S. Farmakognozija I, Seminari, Određivanje sadržaja ljekovitih tvari u biljnim drogama II. dio. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008, str. 5-6.
42. Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. Drogenanalyse. Berlin- Heidelberg-New York, Springer-Verlag, 1983, str. 110.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih kiselina vrste *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) s područja Dalmacije/južnog Jadrana (populacije: Brač, Konavle, Korčula, Lastovo, Mljet, Peljašac i Šipan). Kvalitativna analiza fenolnih kiselina (ferulične, kavene, klorogenske i ružmarinske) primjenom tankoslojne kromatografije nije sa sigurnošću potvrdila njihovu prisutnost. Kvantitativna analiza fenolnih kiselina provedena je spektrofotometrijski te je sadržaj mjereno kao ružmarinska kiselina (505 nm) i klorogenska kiselina (525 nm). Maseni udio analiziranih fenolnih kiselina lovora izraženih kao ružmarinska kiselina kretao se u rasponu od 1,31% (Brač) do 3,04% (Lastovo), odnosno, izraženih kao klorogenska kiselina u rasponu od 2,52% (Brač) do 5,59% (Lastovo). Provedena kvalitativna i kvantitativna analiza predstavlja prilog znanstvenom istraživanju vrste *Laurus nobilis* L. i upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu lovora, posebice u odnosu na sadržaj bioaktivnih fenolnih tvari.

## Summary

In this work, qualitative and quantitative analysis of phenolic acids of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) from Dalmatian region (populations: Brač, Konavle, Korčula, Lastovo, Mljet, Pelješac, and Šipan) was carried out. Qualitative analysis of phenolic acids (ferulic, caffeic, chlorogenic and rosmarinic acid) using thin layer chromatography did not confirmed their presence with certainty. Quantitative analysis of phenolic acids was carried out using the spectrophotometric method. Phenolic acids were analyzed on 505 nm (expressed as rosmarinic acid) and 525 nm (expressed as chlorogenic acid). The contents of analyzed compounds from laurel leaves varied from 1.31% (Brač) to 3.04% (Lastovo) when expressed as rosmarinic acid, and from 2.52% (Brač) to 5.59% (Lastovo) when expressed as chlorogenic acid. Conducted qualitative and quantitative analysis is a contribution to the scientific study of *Laurus nobilis* L. and completes the existing knowledge about phytotherapeutic potential of laurel, especially in relation to the content of bioactive phenolic substances.

# 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 FENOLNIH KISELINA VRSTE *LAURUS NOBILIS* L. (LAURACEAE) S PODRUČJA DALMACIJE

Božica Svalina

### SAŽETAK

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih kiselina vrste *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) s područja Dalmacije/južnog Jadrana (populacije: Brač, Konavle, Korčula, Lastovo, Mljet, Peljašac i Šipan). Kvalitativna analiza fenolnih kiselina (ferulične, kavene, klorogenske i ružmarinske) primjenom tankoslojne kromatografije nije sa sigurnošću potvrdila njihovu prisutnost. Kvantitativna analiza fenolnih kiselina provedena je spektrofotometrijski te je sadržaj mjeren kao ružmarinska kiselina (505 nm) i klorogenska kiselina (525 nm). Maseni udio analiziranih fenolnih kiselina lovora izraženih kao ružmarinska kiselina kretao se u rasponu od 1,31% (Brač) do 3,04% (Lastovo), odnosno, izraženih kao klorogenska kiselina u rasponu od 2,52% (Brač) do 5,59% (Lastovo). Provedena kvalitativna i kvantitativna analiza predstavlja prilog znanstvenom istraživanju vrste *Laurus nobilis* L. i upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu lovora, posebice u odnosu na sadržaj bioaktivnih fenolnih tvari.

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

Rad sadrži: 51 stranicu, 34 grafička prikaza, 13 tablica i 42 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Laurus nobilis* L., fenolne kiseline, kvalitativna analiza, kvantitativna analiza, tankoslojna kromatografija 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. Živka Juričić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: ožujak, 2018.



# 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 PHENOLIC ACIDS OF *LAURUS NOBILIS* L. (LAURACEAE) FROM THE DALMATIAN REGION

**Božica Svalina**

### SUMMARY

In this work, qualitative and quantitative analysis of phenolic acids of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) from Dalmatian region (populations: Brač, Konavle, Korčula, Lastovo, Mljet, Pelješac, and Šipan) was carried out. Qualitative analysis of phenolic acids (ferulic, caffeic, chlorogenic and rosmarinic acid) using thin layer chromatography did not confirmed their presence with certainty. Quantitative analysis of phenolic acids was carried out using the spectrophotometric method. Phenolic acids were analyzed on 505 nm (expressed as rosmarinic acid) and 525 nm (expressed as chlorogenic acid). The contents of analyzed compounds from laurel leaves varied from 1.31% (Brač) to 3.04% (Lastovo) when expressed as rosmarinic acid, and from 2.52% (Brač) to 5.59% (Lastovo) when expressed as chlorogenic acid. Conducted qualitative and quantitative analysis is a contribution to the scientific study of *Laurus nobilis* L. and completes the existing knowledge about phytotherapeutic potential of laurel, especially in relation to the content of bioactive phenolic substances.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.  
Thesis includes: 51 pages, 34 figures, 13 tables, and 42 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Laurus nobilis* L., phenolic acids, qualitative analysis, quantitative analysis, thin layer chromatography, 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

**Živka Juričić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: March, 2018