

Sezonska varijabilnost sadržaja fenolnih kiselina vrste *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) s područja Lovrana

Kirchbauer, Matea

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:163:936450>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

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



Matea Kirchbauer

**Sezonska varijabilnost sadržaja fenolnih kiselina
vrste *Laurus nobilis* L. (Lauraceae)
s područja Lovrana**

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 s Farmaceutskim botaničkim vrtom "Fran Kušan" Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Renate Jurišić Grubešić.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Renati Jurišić Grubešić, na velikoj pomoći, strpljenju, savjetima, vremenu i trudu uloženom u izradu ovog diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima i sestri bez čije pomoći sve ovo ne bi bilo moguće, također dečku i prijateljima koji su vjerovali u mene, pružali mi podršku u teškim trenucima, ali i dijelili sa mnom sve lijepe trenutke i iskreno se radovali mojim uspjesima.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Botanički podatci	3
1.1.1. Porodica Lauraceae (lovari, lovorike, lovorovke).....	3
1.1.2. Rod <i>Laurus</i> L. (lovari).....	5
1.1.3. Vrsta <i>Laurus nobilis</i> L. (lovor, pravi lovor, lovorika).....	5
1.1.3.1. <i>Lovor kroz povijest</i>	5
1.1.3.2. <i>Stanište i rasprostranjenost</i>	6
1.1.3.3. <i>Izgled biljke</i>	6
1.1.3.4. <i>Kemijski sastav</i>	7
1.1.3.5. <i>Farmakološko djelovanje i upotreba lista lovora</i>	8
1.1.3.6. <i>Farmakološko djelovanje i upotreba eteričnog ulja lista lovora</i>	8
1.1.3.7. <i>Pregled istraživanja vrste <i>Laurus nobilis</i> L.</i>	9
1.2. Biološki aktivne tvari vrste <i>Laurus nobilis</i> L.	12
1.2.1. Polifenoli.....	12
1.2.1.1. <i>Struktura i značajke</i>	12
1.2.1.2. <i>Rasprostranjenost</i>	15
1.2.1.3. <i>Biološki učinci</i>	16
1.2.2. Fenolne kiseline.....	127
1.2.2.1. <i>Struktura i značajke</i>	17
1.2.2.2. <i>Rasprostranjenost</i>	19
1.2.2.3. <i>Biološki učinci</i>	20
2. OBRAZLOŽENJE TEME	22
3. MATERIJALI I METODE	23
3.1. Biljni materijal.....	23
3.2. Aparatura i kemikalije.....	23
3.3. Metode i postupci istraživanja.....	24
3.3.1. <i>Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih kiselina</i>	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
5. ZAKLJUČAK	35
6. LITERATURA	36
7. SAŽETAK/SUMMARY	44

1. UVOD

Primjena ljekovitog bilja i njegovih pripravaka najstariji su pristup tretiranja različitih bolesti kroz povijest ljudskog roda. Tome svjedoče i zapisi koji potječu još iz Egipta i Mezopotamije, antičke Grčke, arapskih zemalja te srednjovjekovnih samostana. Fitoterapija danas predstavlja osnovu očuvanja zdravlja i dodatnu mogućnost prevencije i liječenja blažih oblika bolesti.

Podatci Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) govore da se 80% svjetske populacije primarno liječi biljnim pripravcima (www.who.int). Kao prva linija liječenja koristi se u udaljenim i siromašnim područjima gdje je to i jedina moguća medicinska usluga. No, čak i u područjima gdje je dostupna suvremena medicina, popularnost biljnih pripravaka je u velikom porastu jer se smatraju manje štetnima, sigurnijim i pristupačnijim od konvencionalne terapije.

Ukoliko se upotrebljava na ispravan način, ljekovito bilje može imati manje štetnih učinka od konvencionalne terapije te manje klinički značajnih interakcija. Veliki problem je uzimanje pripravaka na "svoju ruku", bez savjetovanja sa stručnim osobama koje bi upozorile na moguće interakcije, nuspojave, kontraindikacije te time omogućile racionalnu uporabu takvih proizvoda.

U Hrvatskoj se većina biljnih pripravaka registrira kao dodatak prehrani te kao takvi ne podliježu strogoj regulativi, nemaju potpuno definirani kemijski sastav, nisu standardiziranog sadržaja pojedinačnih sastavnica te upitne kvalitete. Takvom registracijom proizvođači moraju samo dokazati da je njihov pripravak zdravstveno ispravan (mikrobiološka čistoća, prisutnost teških metala), ali se ne zahtijeva obuhvatna kontrola kakvoće kao što je to slučaj kod biljnih lijekova. Na taj način proizvođači dodataka prehrani izbjegavaju skupe analize, iz čega proizlazi moguće patvorenje i subdoziranje takvim proizvodima.

Biljni lijekovi služe za liječenje bolesti, standardiziranog su sastava i sadržaja djelatnih tvari, imaju dokazano farmakološko djelovanje te propisanu obveznu i obuhvatnu kontrolu kvalitete. Regulirani su putem ovlaštenih regulatornih tijela; u Republici Hrvatskoj je to Agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) (www.halmed.hr). Stoljeća uporabe pojedinih biljnih tvari i pripravaka u narodnoj medicini potkrijepljena su suvremenim znanstvenim i kliničkim istraživanjima o njihovoj djelotvornosti i sigurnosti primjene pa se modernu fitoterapiju ne smije svrstati u alternativnu terapiju, već je valja sagledati kao dio znanstvene medicine. Biljni dijelovi koji se pritom koriste u liječenju su korijen, zelen, kora, list, cvijet, plod i dr. Ljekovito

bilje se danas primjenjuje u različitim farmaceutskim oblicima: vodene iscrpine droga (macerati, infuzi, dekoti), vodeno-alkoholne iscrpine droga (tinkture, ekstrakti), čajevi, biljni prašci te kapsule i tablete.

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je kvantitativna analiza fenolnih kiselina ekstrahiranih iz listova vrste *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) s područja Lovrana, sabranih u razdoblju od svibnja 2015. do travnja 2016., a u svrhu praćenja sezonske varijabilnosti sadržaja fenolnih kiselina te spoznavanja najboljeg perioda sabiranja biljnog materijala s obzirom na njegov polifenolni sastav i sadržaj.

1.1. Botanički podatci

1.1.1. Porodica Lauraceae (lovori, lovorike, lovorovke)

Lovor (*Laurus*) je rod biljaka iz porodice lovorike (Lauraceae) (Juss.) koja sadrži 67 rodova i 2747 vrsta. Uglavnom su to drvenaste biljke koje nalazimo u tropskim i subtropskim krajevima (jugoistočna Aziji i tropska Amerika), a manjim dijelom rastu 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).

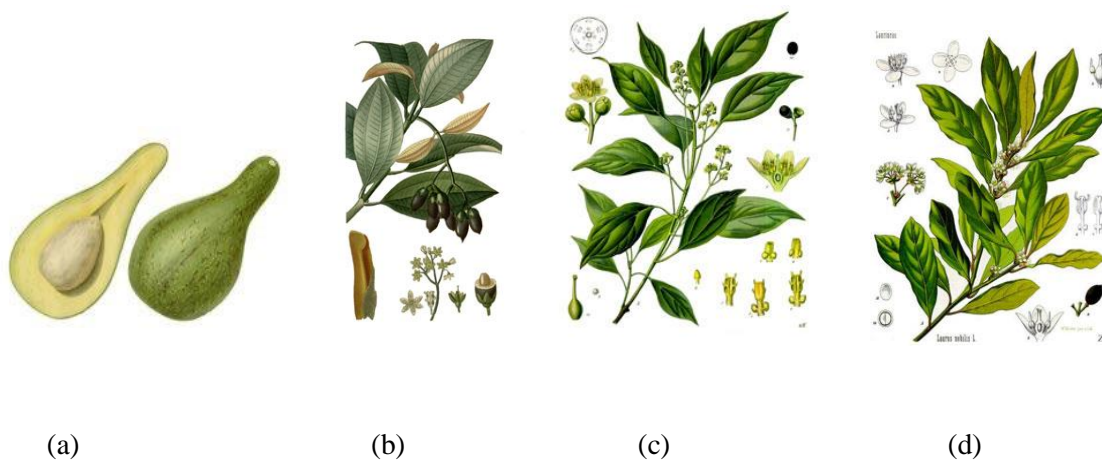
Tablica 1. Prikaz rodova porodice Lauraceae prema abecednom redu (Nikolić, 2013).

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>

Budući da rastu u vlažnim i kišnim klimatskim uvjetima, biljke spomenute porodice su se prilagodile te razvile kožnate, uske, ovalne listove i voštani sloj na površini (Nikolić, 2013).

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

Upravo zbog eteričnih ulja te brojnih korisnih svojstava i prirodnih produkata, biljke porodice lovora su od velikog ekonomskog značaja. Tako se plod avokada (Slika 1a) (*Persea americana*) koristi u prehrambene svrhe, cimet (Slika 1b) (*Cinnamomum spp.*) kao začinska biljka, kamfor u kozmetologiji (izrada različitih masti i insekticid) (Slika 1c) te lovor (*Laurus nobilis* L.), čije osušene listove koristimo kao začim za brojna jela, a eterična ulja iz listova su našla primjenu u aromaterapiji, kozmetologiji i prehrambenoj industriji zbog njegova blagotvornog utjecaja na zdravlje (Slika 1d).



Slika 1. Avokado (a); cimet (b); kamfor (c); lovor (d)

(<https://www.pfaf.org/>).

1.1.2. Rod *Laurus* L. (lovari)

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

Rod obuhvaća dvije vazdazelene vrste, od kojih je vrsta *Laurus azorica* (Seub.) Franco rasprostranjena na Azorima, Kanarskom otočju, Madeiri te u Maroku, a *L.nobilis* L. u Francuskoj, na Pirinejskom, Apeninskom i Balkanskom poluotoku, u Turskoj te na Kavkazu. *L. azorica* se, za razliku od vrste *L. nobilis*, ne koristi kao začim zbog otrovnih listova. *L. azorica* nalazi se na crvenoj listi ugroženih biljaka (Conforti i sur., 2006; Guido i sur., 2015).

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

1.1.3.1. Lovor kroz povijest

Naziv biljke potječe od latinskih riječi *laudare* – što znači hvaliti, uzdizati, i *nobilis* – što znači plemenit (Kuštrak, 2005). Zapisi o pronalasku i uporabi lovora potječu još iz antičkih vremena Grčke i Rima kada se lovorov vijenac darivao pobjednicima Olimpijskih igara. Također su se lovorovim vijencem nagrađivali pjesnici, pobjednici i druge osobe kojima se odavalo najviše priznanje (laureati). Rimska kultura je lovor prigrlila kao simbol pobjede, vječnosti i besmrtnosti. Kao iznimno popularna biljka s dugom tradicijom uporabe, našao je svoje mjesto na zastavama Dominikanske Republike i Perua, nacionalnom amblemu Grčke, japanskim kovanicama, brojnim grbovima itd. (Marković, 2005; Nikolić, 2013).

1.1.3.2. Stanište i rasprostranjenost

Lovor je drvenasta mediteranska kultura s prirodnim populacijama u primorskom području Hrvatske i zemljama oko Sredozemnog mora. Podrijetlo lovora je Mala Azija, a raste i u Južnoj Americi (Pahlow, 1999). U Hrvatskoj je rasprostranjen u Istri, Hrvatskom primorju i Dalmaciji, a najbujnije se razvija na obroncima Učke, uz gradove poput Opatije i Lovrana koji duguje svoje ime upravo toj biljci. Raste u priobalju ili na otocima, i to pojedinačno, tako da tvori malene šume, ili u skupinama s ostalim vazdazelenim biljem, posebice u listopadnim hrastovim šumama (Slika 2).



Slika 2. Rasprostranjenost vrste *Laurus nobilis* L. u Hrvatskoj (<https://hirc.botanic.hr/fcd>).

1.1.3.3. Izgled biljke

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 (Slika 3) (Grdinić i Kremer, 2009).



Slika 3. Listovi vrste *Laurus nobilis* L. (www.britannica.com).

U mezofilu lista lokalizirano je eterično ulje u posebnim stanicama – uljenicama. Okus listova je pomalo opor, gorak i ljut, a miris jak i ugodan (Kuštrak, 2005). Cvjetovi su jednospolni (a biljke dvodomne: muški i ženski cvjetovi razvijaju se na različitim stablima), sitni, žućkastobijeli, široki oko 1 cm, s četiri listića perigona koji su pri dnu srasli, skupljeni u postrane paštite 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).

1.1.3.4. Kemijski sastav

Lovorov list sadrži 1-3% eteričnog ulja u kojemu je glavna sastavnica 1,8-cineol čini čak 45%; prisutni su još i monoterpenoli (do 15% linalola, do 5% α -terpinola) te mala količina vrlo aktivnih seskviterpenskih laktona (do 2% kostunolida i artemorin).

U listu se također u velikom postotku nalaze trjeslovine te nešto gorkih tvari.

Zreli plod sadrži 1% eteričnog ulja, 30-40% masnih ulja (gliceridi palmitinske, oleinske, laurinske i linolne kiseline) te šećera i škroba (Kuštrak, 2005; Marković, 2005).

1.1.3.5. Farmakološko djelovanje i upotreba lista lovora

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

1.1.3.6. Farmakološko djelovanje i upotreba eteričnog ulja lista lovora

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

1.1.3.7. Pregled istraživanja vrste *Laurus nobilis* L.

Iako je lovor biljka koja većim dijelom služi kao začim u kulinarstvu, proveden je znatan broj znanstvenih istraživanja o njegovoj mogućoj uporabi u obliku farmaceutskih pripravaka i to, prije svega, zbog antioksidativnog i antimikrobnog djelovanja.

Osnovni sastojci ekstrakta lista lovora s antioksidativnim učinkom su flavonoidi: luteolin, kemferol, glikozidi kemferola (kemferol-3-ramnopiranozid i kemferol-3,7-diramnopiranozid) te 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 na povećanju količine glutationa (Kaurinović i sur, 2010). Simić i suradnici su istražili utjecaj lišća, kore i metanolnog ekstrakta ploda lovora na razine lipidne peroksidacije u liposomima induciranim s Fe^{2+} /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).

Antimikrobno djelovanje je postalo predmet velikog broja istraživanja budući da je rezistencija na antibiotike veliki zdravstveni problem te se sve više poseže za rješenjima iz biljnog ili životinjskog svijeta. Najnovije istraživanje dokazuje kako vodeno-alkoholni ekstrakt lovora svojim antibakterijskim učinkom uništava Gram pozitivnu bakteriju *Paenibacillus larvae*. Ona uzrokuje bolest pčela poznatu kao američka gnjiloća. Spore spomenute bakterije mogu se pronaći u medu te tako ugroziti ljudsko zdravlje, no, osim toga, problematična je i uporaba antibiotika čiji se ostaci mogu pronaći u medu. Zato je lovor, odnosno njegove fenolne sastavnice, obećavajuća alternativa za kontrolu te bolesti (Fernandez i sur., 2018).

U Tunisu su znanstvenici istraživali učinke eteričnog ulja vrste *L. nobilis* L. na oralne sojeve bakterije *Staphylococcus aureus*. Dokazano je baktericidno djelovanje i inhibicija stvaranja biofilma što može imati važnu ulogu u prevenciji oralnih infekcija (Merghni i sur., 2016).

Istraživanje iz 2008. godine potvrdilo je antibakterijsko djelovanje flavonoida (različitih kemferol-ramnozida) izoliranih iz ekstrakta lista lovora, i to protiv meticilin rezistentnih sojeva vrste *Staphylococcus aureus* (MRSA) i vankomicin rezistentnih enterokoka (VRE) (Otsuka i sur., 2008).

Brazilski su znanstvenici ispitali antifungalnu aktivnost eteričnog ulja iz listova lovora na kulturi *Cryptococcus neoformans*. Plinskom kromatografijom spregnutom s masenom spektrometrijom (GC-MS) određen je kemijski sastav ulja, 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* protiv vrste *Cryptococcus neoformans* (Pinheiro i sur., 2017).

Slična je studija provedena na kulturi *Candida spp.* gdje se promatrao utjecaj eteričnog ulja lovora na adheziju i formiranje biofilma. Eterično ulje ima antifungalnu aktivnost vjerojatno zbog prisutnosti seskviterpena i monoterpena, a dokazano je da može utjecati na biosintezu stanične stijenke i permeabilnost membrane te djelovati štetno na biofilm vrste *C. albicans*. (Peixoto i sur., 2017.)

Osim djelovanja na bakterije i gljivice ispitan je učinak vrste *Laurus nobilis* L. i njegovih izoliranih flavonoida i glikozida na lipidni profil iračkog ženskog kunića. Rezultatima je dobiveno da oralnom primjenom list lovora snižava razine TC, TG, LDL-C i VLDL-C, u usporedbi s kontrolnom skupinom te je stoga korisno sredstvo u tretiranju hiperlipidemije. (AL-Samarrai i sur., 2017).

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

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

Proučavano je djelovanje alkaloida lindoldhamina izoliranog iz lista lovora na aktivaciju kanala osjetljivih na kiselinu (ASIC). ASIC igraju važnu ulogu u sinaptičkoj plastičnosti, učenju i nocicepciji te su povezani s boli i različitim psihijatrijskim i neurološkim bolestima. Istraživanje je pokazalo da lindoldhamin ima agonističko i pozitivno alosteričko djelovanje na ljudske ASIC3 kanale pri fiziološkom pH te tako otvara putove za sintezu novih lijekova (Osmakov i sur., 2018).

U još jednom istraživanju ispitivao se antioksidativni učinak ekstrakta lista lovora i njegov učinak na smanjenje štetnosti TCDD-a (2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksina), vrlo toksičnog okolišnog polutanta. Dokazano je ublažavanje toksičnog učinka TCDD-a na hepatocite štakora te da antioksidativni kapacitet hepatocita značajno raste porastom doze ekstrakta (Turkez i Geyikoglu, 2011).

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

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

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

Istraživala se i uporaba eteričnog ulja u šećernoj bolesti. Dokazano je smanjenje lipidne peroksidacije i stvaranja slobodnih radikala te inhibicija alfa glukozidaze, što znači da bi eterično ulje moglo imati potencijalnu ulogu u terapiji dijabetesa (Sahin Basak i Candan, 2013).

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

1.2.1. Polifenoli

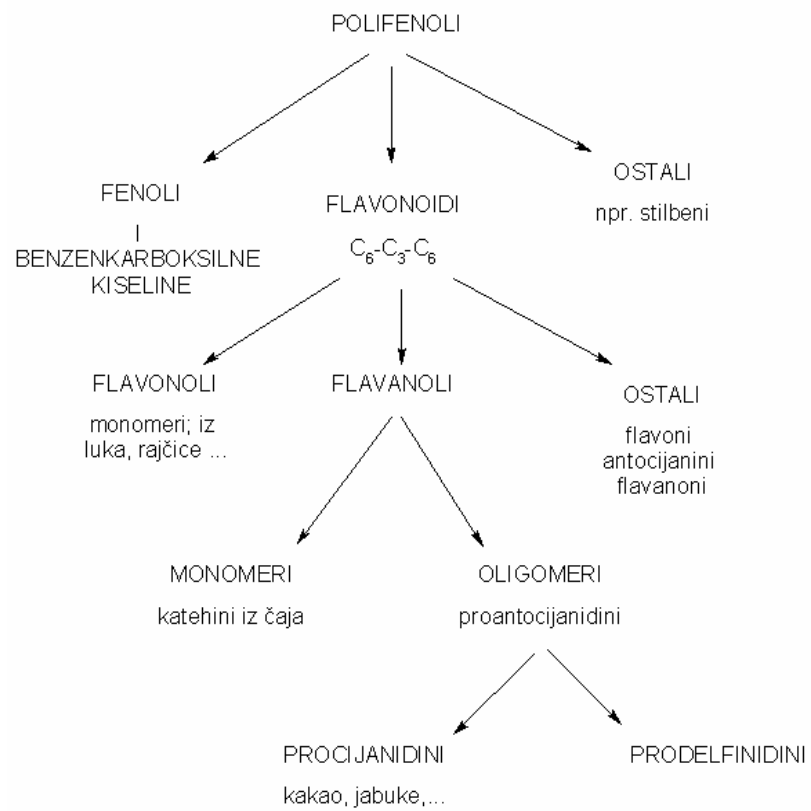
1.2.1.1. Struktura i značajke

Polifenoli su jedna od najzastupljenijih i najbrojnijih skupina biljnih tvari. Osnovno je obilježje polifenola prisutnost jednog ili više hidroksiliranih aromatskih prstenova. Tako u skupinu polifenola ubrajamo više od 8000 spojeva različite kemijske strukture (Bravo, 1998).

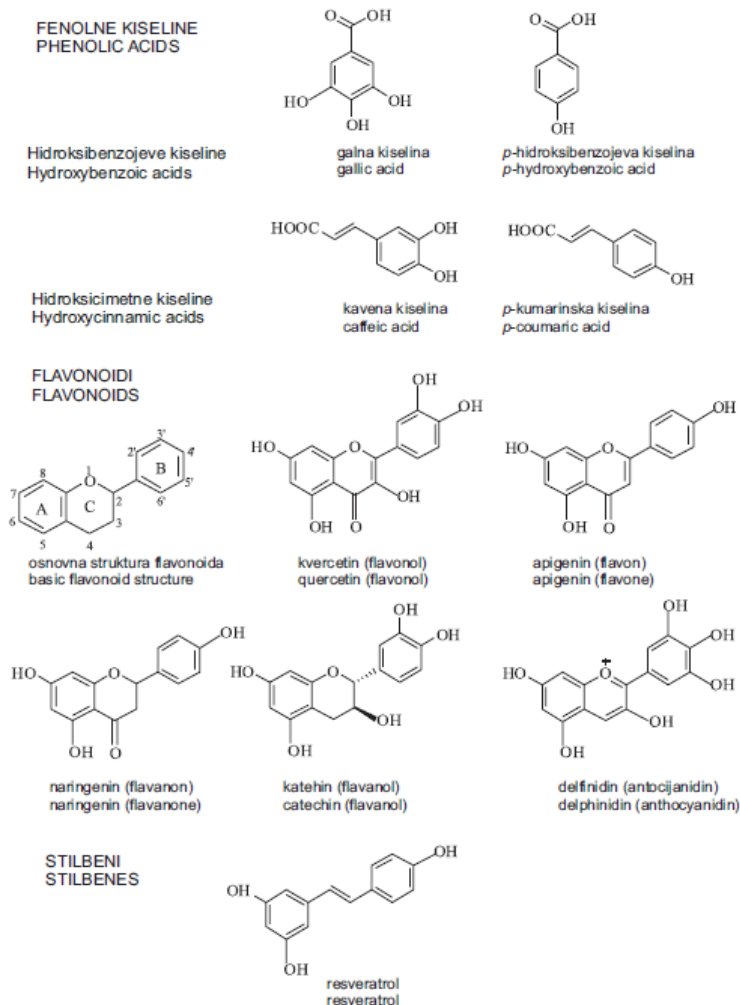
Polifenole čine fenolne kiseline, flavonoidi i stilbeni. Među fenolnim kiselinama razlikuju se derivati hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Flavonoidi bez vezanih molekula šećera (aglikoni flavonoida), posjeduju strukturu tipa C₆-C₃-C₆. Atomi ugljika raspoređeni su tako da su dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem koji može, ali i 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).

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 i oligosaharida, a glukoza je najzastupljenija šećerna jedinica. Šećerna komponenta može sadržavati i mnoge druge šećere, poput galaktoze, ramnoze, ksiloze i arabinoze, kao i glukuronsku te galakturonsku kiselinu. Polifenole nalazimo i kao konjugate 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 (Slike 4 i 5) temelji se na broju fenolnih prstenova koje sadrže i na strukturnim elementima koji te prstenove povezuju (Rastija i Medić-Šarić, 2009; Berend i Grabarić, 2008).

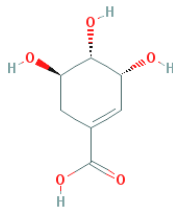


Slika 4. Osnovna podjela polifenola (Berend i Grabarić, 2008).



Slika 5. Kemijske strukture polifenola (Rastija i Medić-Šarić, 2009).

Polifenoli se sintetiziraju iz dva glavna biosintetska puta: put šikiminske kiseline i acetatni put (acilpolimalonatni put). Šikiminska kiselina je glavna tvar u nastanku aromatskih prirodnih spojeva. Univerzalni je prekursor u biosintezi aromatskih aminokiselina u mikroorganizmima (bakterijama, gljivicama) i višim biljkama, ali ne i u životinjskih organizama. Aromatske aminokiseline (tirozin, fenilalanin) nadalje grade proteine i peptide, ali su i važni međuprodukti u biosintezi mnogih sekundarnih metabolita, kao što su alkaloidi, fenoli, fenolne kiseline, fenilpropani, kumarini, flavonoidi, lignani i dr. (Vladimir-Knežević, 2008; Bravo, 1998).



Slika 6. Struktura šikiminske kiseline (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

1.2.1.2. Rasprostranjenost

Polifenole često nalazimo u hrani biljnog podrijetla te su tako glavni antioksidansi u našoj prehrani. Prosječno se dnevno prehranom unese oko 1 g polifenola, što je mnogo više od unosa drugih poznatih antioksidansa. Tako je količina unesenih polifenola 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 (voćni sokovi, čaj, kava i crno vino). Tako, npr., 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 (Pandey i Rizvi, 2009; Scalbert i sur., 2005).

Neki su polifenoli, poput kvercetina, prisutni u većini biljnih vrsta, a neki su pak ograničeni na specifične namirnice (flavanoni u citrusnom voću, izoflavoni u soji, florizin 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 agronomski (uzgoj u stakleniku ili na otvorenom, ukupni urod po jednoj biljci i dr.) i pedoklimatski (tip tla, izloženost sunčevoj svjetlosti, količina padalina). Osim toga, način i uvjeti skladištenja mogu utjecati na sadržaj polifenola ukoliko se radi o polifenolima koji su podložni oksidaciji. Reakcije oksidacije tako mogu dovesti do nastanka polimernih molekula, čime se mijenja kakvoća namirnice i organoleptička svojstva, a one mogu biti poželjne (crni čaj) ili nepoželjne (smeđa boja narezanog voća). Osim toga, priprema i obrada hrane također utječu na količinu polifenola prisutnih u namirnicama. Primjerice, guljenje voća i povrća uklonit će značajnu količinu polifenola jer su polifenoli često u znatno većim koncentracijama prisutni u vanjskim dijelovima voća i povrća nego u unutrašnjim. Veliki gubitak polifenola događa se i termičkom preradom hrane (Manach i sur., 2004).

1.2.1.3. Biološki učinci

Dugi su niz godina kao antioksidansi najviše proučavani antioksidativni vitamini, karotenoidi i minerali. Istraživanja na flavonoidima i ostalim polifenolima, njihovim antioksidativnim svojstvima i prevenciji bolesti intenzivno su započela 1995. godine. Razlog zbog kojega se odgađala provedba istraživanja bila je značajna različitost i složenost njihovih 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, antimalarično, hipoglikemijsko i antioksidativno djelovanje (Petrik, 2008).

Postoje dokazi koji jasno pokazuju doprinos polifenola prevenciji kardiovaskularnih bolesti, posebice ateroskleroze, potom karcinoma 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 također 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).

Novija istraživanja utvrdila su kako bi se polifenoli zbog svog antioksidativnog i protuupalnog djelovanja mogli koristiti za prevenciju i liječenje očnih bolesti (glaukoma, katarakte, makularne degeneracije, dijabetičke retinopatije) koje vode do ireverzibilne sljepoće (Xu i sur., 2017).

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

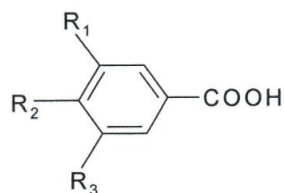
prehranu. Očito je da polifenoli poboljšavaju status različitih biomarkera oksidativnog stresa te pokazuju velik potencijal za prevenciju ili terapiju različitih stanja. No, mnogo nesigurnosti i dalje postoji vezano uz značaj tih biomarkera kao prediktora bolesti i prikladnosti korištenih metoda. Također postoje studije s kontradiktornim rezultatima koje govore o prooksidativnom učinku polifenola zbog kojega mogu posljedično inducirati apoptozu te 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 na ostale spojeve. Kako se istraživanja često provode na puno većim dozama od onih unesenih prehranom, nužno je poznavanje biorasploživosti 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 biorasploživosti 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 biorasploživost (Primorac, 2012; Scalbert i sur., 2005; Sun i sur., 2002).

1.2.2. Fenolne kiseline

1.2.2.1. Struktura i značajke

Nakon flavonoida, drugu skupinu po važnosti i zastupljenosti biljnih polifenola čine fenolne kiseline. Strukturu fenolnih kiselina čini benzenski prsten povezan karboksilnom skupinom (Lafay i sur., 2008). Na temelju strukture, razlikuju se dvije skupine fenolnih kiselina: derivati benzojeve kiseline (hidroksibenzojeve kiseline, C₆-C₁, Slika 7) i derivati cimetine kiseline (hidroksicimetine kiseline, C₆-C₃, Slika 8) (Robbins i sur., 2003).

Najzastupljeniji derivati hidroksibenzojeve kiseline su galna, protokatehinska, vanilinska, siringinska, gentistinska i elaginska kiselina. Hidroksibenzojeve kiseline mogu nastati izravno iz međuprodukata puta šikiminske kiseline. No, u biljkama češće nastaju razgradnjom derivata cimetine kiseline (Russell i sur., 1999).

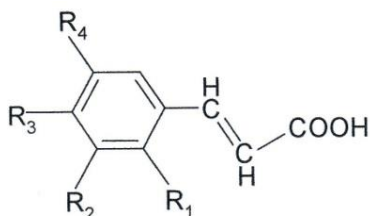


HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE:

galna	$R_1=R_2=R_3=OH$
protokatehinska	$R_1=H$ $R_2=R_3=OH$
vanilinska	$R_1=H$ $R_2=OH$

Slika 7. Kemijska struktura hidroksibenzojevih kiselina (Robards i sur., 1999).

Najzastupljeniji derivati hidroksicimetne kiseline su kavena, kumarinska, ferulična i sinapična kiselina. Predstavljaju važne građevne jedinice mnogih drugih prirodnih spojeva te često dolaze u obliku specifičnih estera, kao npr. klorogenska kiselina i ružmarinska kiselina (Russell i sur., 1999; Ralph i sur., 1994). Manji se broj fenolnih kiselina javlja u slobodnom obliku, dok su većinom u biljkama prisutne konjugirane (ponajviše esterifikacijom) sa strukturnim biljnim dijelovima (celulozom, proteinima i ligninom) ili s različitim molekulama, uključujući jednostavne šećere i organske kiseline (Vuković, 2013).



HIDROKSICIMETNE KISELINE:

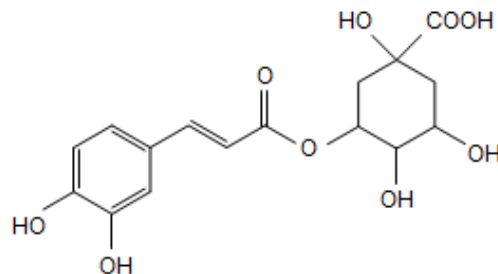
ferulična	$R_1=R_2=R_4=H$ $R_3=OH$ $R_4=OCH_3$
kumarinska	$R_1=R_2=H$ $R_3=OH$
kavena	$R_1=R_2=H$ $R_3=R_4=OH$
sinapična	$R_1=H$ $R_3=OH$

Slika 8. Kemijska struktura hidroksicimetnih kiselina (Macheix i sur., 1990).

1.2.2.2. Rasprostranjenost

Hidroksibenzojeve kiseline nalazimo u manjim količinama u jestivim biljkama. Iznimka su neka crvena voća, crna rotkvica i luk koji mogu sadržavati do nekoliko desetaka miligrama hidroksibenzojevih kiselina po kilogramu svježe namirnice. Čaj je važan izvor galne kiseline: listovi čajevca mogu sadržavati do 4,5 g galne kiseline po kilogramu svježeg lista čajevca. Nadalje, hidroksibenzojeve kiseline su komponente složenih struktura, kao što su trjeslovine koje hidroliziraju (galotanini u mangu i elagtanini u crvenom voću: jagodama, malinama i kupinama).

Hidroksicimetne kiseline često nalazimo u raznim biljkama. Najzastupljeniji su derivati kumarinska, kavena, ferulična i sinapinska kiselina. Te kiseline rijetko dolaze u slobodnom obliku, osim kod prerađene hrane koja je podvrgnuta smrzavanju, sterilizaciji ili fermentaciji. Vezani su oblici glikozilirani derivati ili esteri kininske ili šikiminske kiseline. Kavena i kininska kiselina zajedno tvore klorogensku kiselinu koja se nalazi u mnogim vrstama voća te u visokim koncentracijama u kavi. Jedna šalica kave može sadržavati 70-350 mg klorogenske kiseline (Slika 9).



Slika 9. Klorogenska kiselina (Bival Štefan, 2015).

Borovnice, kivi, šljive, trešnje i jabuke imaju, od svih vrsta voća, najveći sadržaj hidroksicimetnih kiselina te sadrže 0,5-2 g hidroksicimetnih kiselina po kilogramu svježeg voća. Kavena kiselina, u slobodnom obliku i u obliku estera, najzastupljenija je fenolna kiselina te čini između 75% i 100% ukupnog sadržaja fenolnih kiselina kod većine voća. Hidroksicimetne kiseline se nalaze u svim dijelovima voća, ali u najvećim su koncentracijama prisutne u vanjskom dijelu zrelog voća. Ferulična kiselina je najzastupljenija fenolna kiselina u žitaricama. Njezin se sadržaj u žitaricama kreće između 0,8 g i 2 g po kilogramu suhe žitarice. U vanjskom dijelu zrna žitarice nalazi se čak 98% ukupne ferulične kiseline u znu (Manach i sur., 2004).

1.2.2.3. Biološki učinci

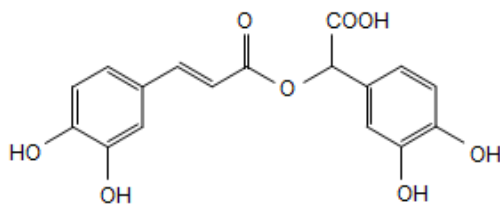
Fenolne kiseline koje unosimo prehranom fiziološki su antioksidansi koji "hvataju" slobodne kisikove i dušikove radikale. *In vitro* studije koristile su različite sustave kako bi se oksidirao LDL te mjerila prevencija oksidacije nakon uključenja u sustav specifične fenolne komponente. Najviše su proučavane hidroksicimetne kiseline koje su, u modelu u kojemu su se koristili Cu^{2+} ioni, pokazale snažno antioksidativno djelovanje. U studijama se pokazalo da kavena kiselina djeluje sinergistički s alfa tokoferolom, pojačavajući antioksidativni kapacitet LDL-a, reciklirajući alfa tokoferol od alfa tokoferoksil-radikala (Laranjinha i sur., 1995). U drugoj se studiji pokazalo da kavena i p-kumarinska kiselina djeluju sinergistički s askorbinskom kiselinom (Vieira i sur., 1998).

Kavena kiselina pokazuje veliku antioksidacijsku aktivnost, *in vitro* i *in vivo* hepatoprotektivno, protuvirusno, protuupalno djelovanje, a u kombinaciji s ružmarinskom kiselinom i antimikrobno djelovanje; također, kavena kiselina i njezin derivat, feniletil ester kavene kiseline, inhibiraju karcinogenezu (Ikeda i sur., 2011; Sato i sur., 2011; Chao i sur., 2009; Gülcin, 2006; Widmer i sur., 2006; Janbaz i sur., 2004; von Gadow i sur., 1997).

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 olakšati simptome dijabetičke neuropatije (nociceptivni učinak uočen kod štakora), služiti u liječenju i prevenciji metaboličkog sindroma, terapiji osteoartritisisa i drugih upalnih stanja te kod hepatocelularnog karcinoma (povećava osjetljivost na 5-fluorouracil) (Bival Štefan, 2015).

Objavljena su brojna istraživanja koja opisuju širok raspon bioloških aktivnosti ružmarinske kiseline. Tako, primjerice, ružmarinska kiselina pokazuje snažno antioksidativno, antimutageno, antidepresivno, hepatoprotektivno, protuvirusno, antibakterijsko i antimikotično djelovanje (Furtado i sur., 2008; Tepe, 2008; Swarup i sur., 2007; Vattem i sur., 2006; Widmer i sur., 2006; Qiao i sur., 2005; Bais i sur., 2002; Osakabe i sur., 2002; Takeda i sur., 2002). 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). Tako ružmarinska kiselina, zbog svoje

antioksidacijske aktivnosti i zbog inhibicije upalnih odgovora, predstavlja vrlo učinkovitu terapiju za alergijski rinokonjuktivitis (Osakabe i sur., 2004). Osim toga, pokazuje i antiangiogeni potencijal koji također može biti povezan s njezinom antioksidacijskom aktivnošću (Huang i sur., 2006).



Slika 10. Ružmarinska kiselina (Bival Štefan, 2015).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovoga diplomskog rada je kvantitativna analiza fenolnih kiselina vrste *Laurus nobilis* L., s područja Lovrana u razdoblju od 12 mjeseci (svibanj 2015. do travnja 2016.), a u svrhu praćenja sezonske varijabilnosti sadržaja fenolnih kiselina. Količina fenolnih kiselina (%), izraženih kao ružmarinska, odnosno klorogenska kiselina, određen je spektrofotometrijskom metodom prema Europskoj farmakopeji. Ovim su istraživanjem utvrđena razdoblja kroz godinu s najvećim postotkom fenolnih kiselina u lovoru, što ukazuje na najpovoljniji period sabiranja biljnog materijala u odnosu na sadržaj spomenutih polifenolnih tvari.

Svrha provedene kvantitativne analize u okviru ovoga rada u konačnici je doprinos znanstvenim istraživanjima vrste *Laurus nobilis* L., a rezultati predstavljaju polazište i dobru osnovicu daljnjih istraživanja biološke aktivnosti i fitoterapijskog potencijala lovora.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Biljni materijal

Za potrebe ovoga istraživanja primijenjeni su listovi lovora (*Laurus nobilis* L., *Laureace*) s područja Lovrana (Istra, RH). Materijal je prikupljen tijekom dvanaest mjeseci, u razdoblju od svibnja 2015. do travnja 2016. godine. Identifikacija biljnog materijala provedena je u Farmaceutskom botaničkom vrtu "Fran Kušan" Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu, prema dostupnim literaturnim podacima (Domac, 1984).

Analizirani su pulverizirani listovi biljne vrste *L. nobilis* L.



Slika 11. Priprema uzoraka listova lovora za analizu.

3.2. Aparatura i kemikalije

Aparatura i pribor:

- UV-Vis spektrofotometar Agilent 8453E (Hewlett Packard, Njemačka)
- kiveta za spektrofotometar (1 cm)
- pipete, propipete, menzure, lijevci, čaše, kapalice, stakleni štapići, filter papir
- tikvice s okruglim dnom i odmjerne tikvice
- povratna hladila
- plamenik, tronožac, azbestna mrežica, stalak, kleme

Kemikalije:

- etanol (Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, Francuska)
- klorovodična kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev hidroksid (Sigma-Aldrich, Stockholm, Švedska)
- natrijev molibdat (Kemika, Zagreb)
- natrijev nitrit (Gram-Mol, Zagreb)

3.3. Metode i postupci istraživanja

3.3.1. Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih kiselina

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina, tj. hidroksicimetnih derivata u listovima lovora s područja Lovrana provedena je spektrofotometrijskom metodom prema monografiji Rosmarini folium koju propisuje Europska farmakopeja (EDQM, 2018), gdje je sadržaj izražen kao ružmarinska kiselina, te spektrofotometrijskom metodom koju propisuje Europska farmakopeja (EDQM, 2004), a sadržaj je izražen kao klorogenska kiselina.

Određivanje ukupnih hidroksicimetnih derivata izraženih kao ružmarinska kiselina

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina u uzorcima lovora provedena je niže opisanim postupkom.

Ekstrakt. 0,200 g praškasto usitnjene biljne droge ekstrahira se s 80 mL 50%-tnog etanola (V/V) i zagrijava u tikvici s povratnim hladilom na kipućoj vodenoj kupelji 30 min. Nakon hlađenja i filtriranja, filtrat se nadopuni 50%-tnim etanolom do 100,0 mL u odmjerne tikvici (osnovna otopina).



Slika 12. Ekstrakcija biljnog materijala.

Ispitivana otopina 1,0 mL osnovne otopine pomiješa se s 2,0 mL 0,5 M klorovodične kiseline, 2,0 mL otopine nitrit-molibdat reagensa (10 g natrijeva nitrita i 10 g natrijeva molibdata otopi se u 100,0 mL destilirane vode) te 2,0 mL 8,5%-tne otopine natrijevog hidroksida. Tikvica se nadopuni destiliranom vodom do 10,0 mL u odmjerne tikvici.

Kompenzacijska otopina 1,0 mL osnovne otopine razrijedi se destiliranom vodom do 10,0 mL u odmjerne tikvici.

Apsorbancija dobivenih otopina odmah je izmjerena na 505 nm. Maseni udio fenolnih kiselina izračunat je i izražen kao ružmarinska kiselina prema izrazu:

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

A – izmjerena apsorbancija na 505 nm

m – masa droge izražena u gramima

Specifična apsorbancija ($A_{1\%}^{1\text{cm}}$) ružmarinske kiseline pri 505 nm iznosi 400.

Određivanje ukupnih hidroksicimetnih derivata izraženih kao klorogenska kiselina

Ispitivana otopina je pripravljena na isti način kao i za određivanje hidroksicimetnih derivata izraženih kao ružmarinska kiselina. Apsorbancija dobivenih otopina odmah je izmjerena na 525 nm. Maseni udio fenolnih kiselina izračunat je i izražen kao klorogenska kiselina prema izrazu:

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

A – izmjerena apsorbancija na 525 nm

m – masa droge izražena u gramima

Specifična apsorbancija ($A_{1\%}^{1\text{cm}}$) klorogenske kiseline pri 525 nm iznosi 188.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina u biljnim uzorcima vrste *Laurus nobilis* L. s područja Lovrana provedena je spektrofotometrijskom metodom prema Europskoj farmakopeji.

Određivanje se temelji na prisutnosti o-dihidroksifenolne skupine u strukturi hidroksicimetnih derivata koji s nitrit-molibdat reagensom daju žuto obojene komplekse. Zaluživanjem otopine, žuta boja prelazi u narančastocrvenu. Apsorbancija je izmjerena na 505 nm (ružmarinska kiselina), odnosno na 525 nm (klorogenska kiselina) te je sadržaj ukupnih hidroksicimetnih derivata izražen pomoću specifične apsorbancije koja za ružmarinsku kiselinu iznosi 400, a za klorogensku kiselinu 188.

Sadržaj ružmarinske kiseline računa se prema izrazu:

$$\% = \frac{A \times 2,5}{m}$$

A – izmjerena apsorbancija na 505 nm;

m – masa droge izražena u gramima.

Analogno tome, apsorbancija je izmjerena i na 525 nm, a sadržaj ukupnih hidroksicimetnih derivata izražen je kao klorogenska kiselina prema izrazu:

$$\% = \frac{A \times 5,3}{m}$$

Napravljena je jedna ekstrakcija droge za svaki uzorak lovora (uzorci sabirani kroz 12 mjeseci) te su uzete tri otopine za spektrofotometrijsko određivanje. Svako je mjerenje izvedeno tri puta (A1, A2, A3) te je izračunata srednja vrijednost mjerenja (\bar{A}). Također je provedena i statistička

analiza, tako da se izračunalo standardno odstupanje (SD) prema izrazu $SD = \sqrt{\frac{\sum(A - \bar{A})^2}{N - 1}}$, gdje je N broj podataka koji u ovom slučaju iznosi 3.

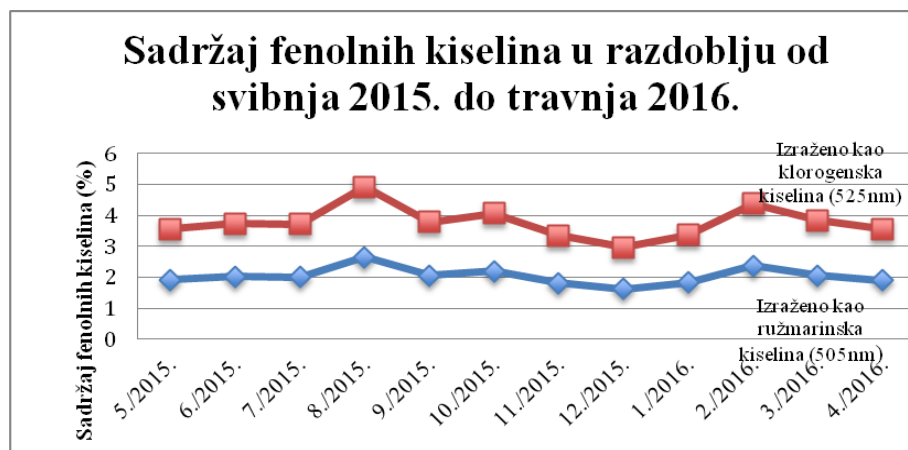
Postotak fenolnih kiselina izračunat je prema iznad objašnjenim izrazima, a rezultati su prikazani Tablicama 2 i 3.

Tablica 2. Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktu vrste *Laurus nobilis* L. izražen kao ružmarinska kiselina (505 nm).

Mjesec/godina	A _{505nm}	$\bar{A} \pm SD$	Masa uzorka (g)	% fenolnih kiselina
5./2015.	0,152	0,1543±0,0032	0,2000	1,93
	0,153			
	0,158			
6./2015.	0,153	0,1623±0,0081	0,2012	2,02
	0,167			
	0,167			
7./2015.	0,158	0,1623±0,0045	0,2015	2,01
	0,162			
	0,167			
8./2015.	0,213	0,2133±0,0006	0,2011	2,65
	0,214			
	0,213			
9./2015.	0,164	0,1663±0,0040	0,2015	2,06
	0,171			
	0,164			
10./2015.	0,186	0,17833±0,0116	0,2020	2,21
	0,165			
	0,184			
11./2015.	0,151	0,1460±0,0050	0,2008	1,82
	0,146			
	0,141			
12./2015.	0,119	0,1293±0,0093	0,2000	1,62
	0,137			
	0,132			
1./2016.	0,153	0,1473±0,0051	0,2007	1,84
	0,146			
	0,143			
2./2016.	0,189	0,1910±0,0026	0,2017	2,37
	0,190			
	0,194			
3./2016.	0,164	0,1657±0,0015	0,2005	2,07
	0,166			
	0,167			
4./2016.	0,159	0,1540±0,0046	0,2014	1,91
	0,150			
	0,153			

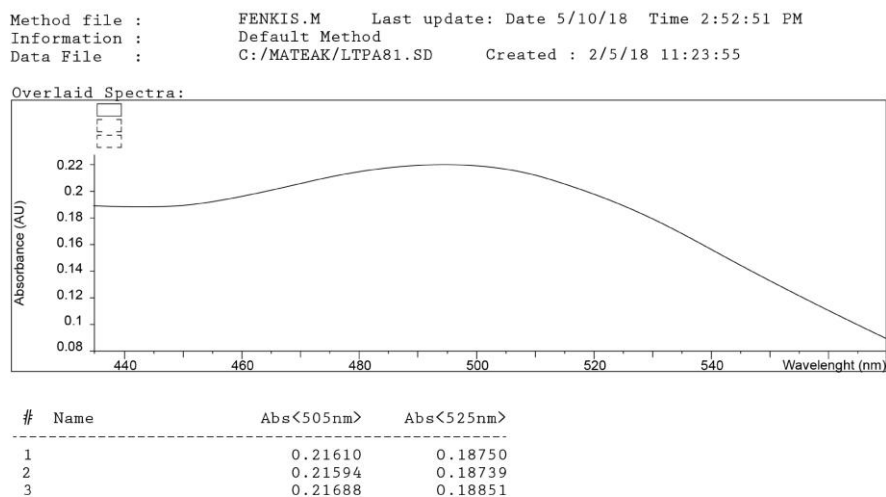
Tablica 3. Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktu vrste *Laurus nobilis* L. izražen kao klorogenska kiselina (525 nm).

Mjesec/godina	A _{525nm}	$\bar{A} \pm SD$	Masa uzorka (g)	% fenolnih kiselina
5./2015.	0,132	0,1340±0,0026	0,2000	3,55
	0,133			
	0,137			
6./2015.	0,134	0,1420±0,0070	0,2012	3,74
	0,145			
	0,147			
7./2015.	0,137	0,1410±0,0040	0,2015	3,71
	0,141			
	0,145			
8./2015.	0,188	0,1867±0,0012	0,2011	4,92
	0,186			
	0,186			
9./2015.	0,142	0,1440±0,0035	0,2015	3,79
	0,148			
	0,142			
10./2015.	0,162	0,1550±0,0096	0,2020	4,07
	0,144			
	0,159			
11./2015.	0,131	0,1270±0,0040	0,2008	3,35
	0,127			
	0,123			
12./2015.	0,103	0,1117±0,0078	0,2000	2,96
	0,118			
	0,114			
1./2016.	0,133	0,1277±0,0047	0,2007	3,37
	0,126			
	0,124			
2./2016.	0,165	0,1667±0,0021	0,2017	4,38
	0,166			
	0,169			
3./2016.	0,143	0,1453±0,0025	0,2005	3,84
	0,145			
	0,148			
4./2016.	0,139	0,1350±0,0036	0,2014	3,55
	0,132			
	0,134			



Grafički prikaz 1. Sadržaj fenolnih kiselina u razdoblju od svibnja 2015. do travnja 2016.

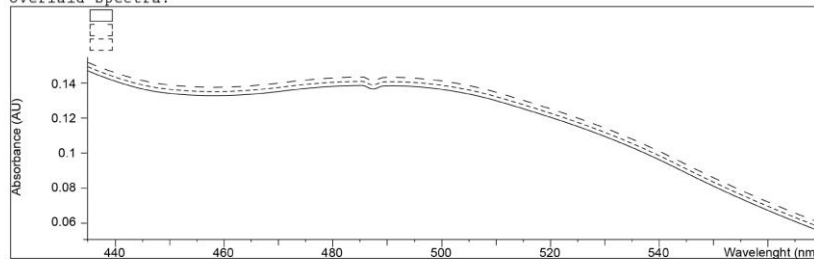
Najveći sadržaj fenolnih kiselina zabilježen je u listovima lovora prikupljenim u kolovozu 2015. godine (Slika 13) i iznosio je 2,65% na 505 nm te 4,92% na 525 nm, dok je najmanja vrijednost zabilježena u prosincu 2015. godine (Slika 14) i iznosila je 1,62% (505 nm) i 2,96% (525 nm). Iz grafičkog prikaza je vidljivo kako u zimskim mjesecima nastupa značajan pad sadržaja fenolnih kiselina, što odgovara hladnijim vremenskim uvjetima tijekom tog razdoblja.



Slika 13. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije ekstrakta lista lovora – kolovoz 2015.

Method file : FENKIS.M Last update: Date 5/10/18 Time 2:52:51 PM
 Information : Default Method
 Data File : C:/MATEAK/LTPA122.SD Created : 2/6/18 13:23:08

Overlaid Spectra:



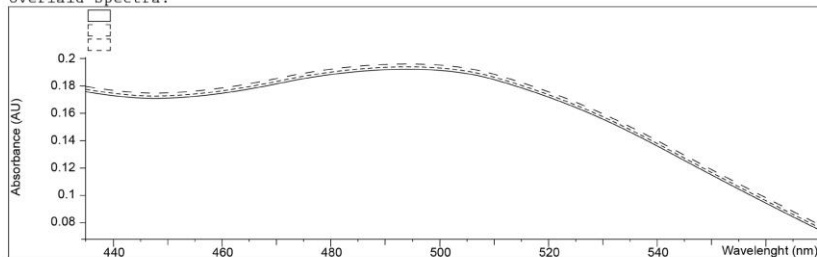
#	Name	Abs<505nm>	Abs<525nm>
1		0.13432	0.11634
2		0.13709	0.11860
3		0.13849	0.11991

Slika 14. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije ekstrakta lista lovora – prosinac 2015.

Nadalje je zanimljivo da je vrlo visoka koncentracija fenolnih kiselina zabilježena u veljači 2016. (Slika 15). Sadržaj na 505 nm iznosio je 2,37%, a na 525 nm 4,38%. Uvidom u vremenske uvjete u Lovranu u tom periodu (DHMZ), pronađeni su podaci o natprosječno toplom vremenu za to doba godine, a osim toga je zabilježena i ekstremna količina padalina, što je potencijalno objašnjenje visokog sadržaja fenolnih kiselina lovora u tom razdoblju (Slike 16 i 17).

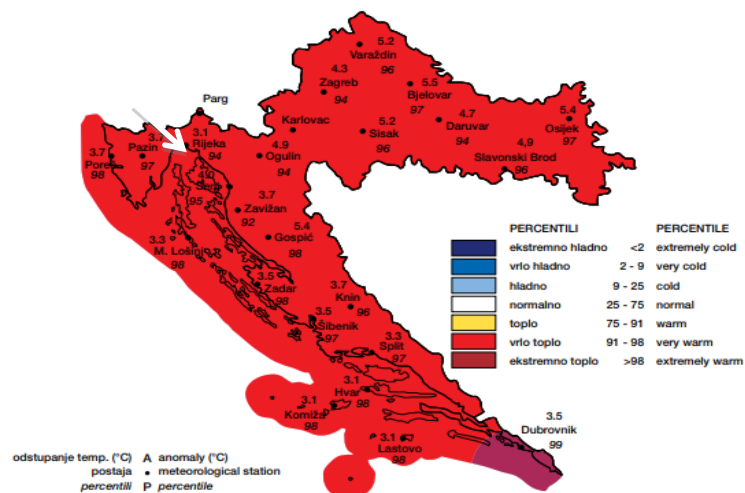
Method file : FENKIS.M (modified) Last update: Date 5/10/18 Time 2:52:51 PM
 Information : Default Method
 Data File : C:/MATEAK/LTPA022.SD Created : 2/7/18 11:52:19

Overlaid Spectra:

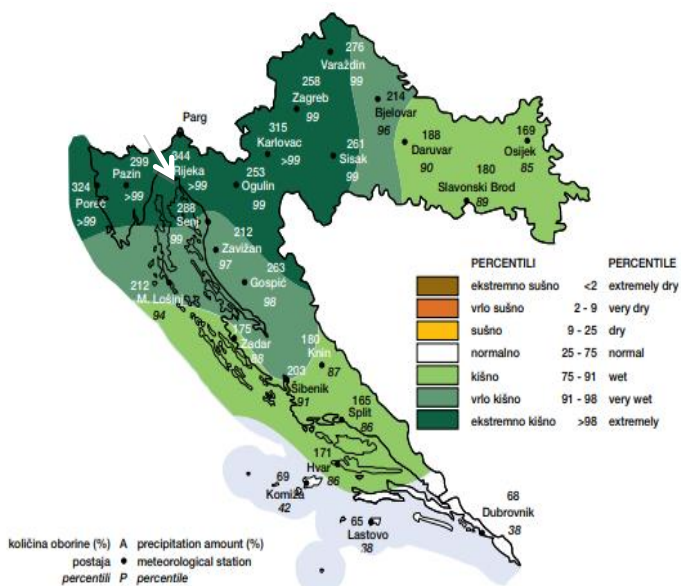


#	Name	Abs<505nm>	Abs<525nm>
1		0.18806	0.16423
2		0.18994	0.16579
3		0.19206	0.16790

Slika 15. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije ekstrakta lista lovora – veljača 2016.

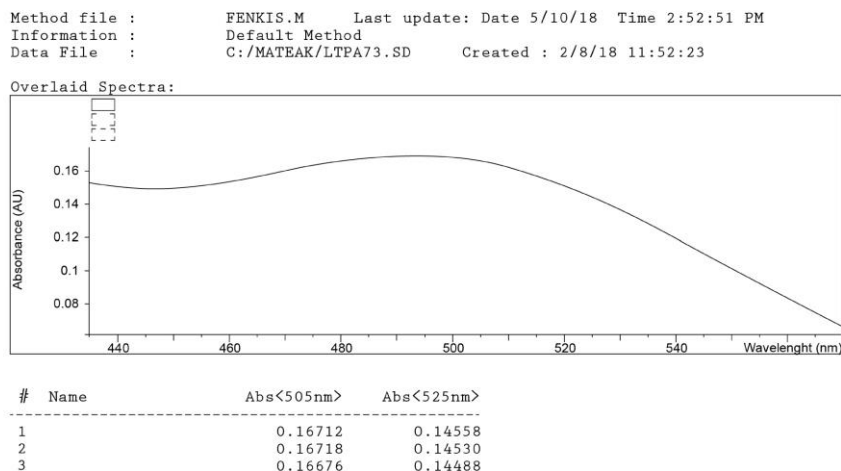


Slika 16. Odstupanje srednje mjesečne temperature zraka (°C) od višegodišnjeg prosjeka u Hrvatskoj za veljaču 2016. (DHMZ).

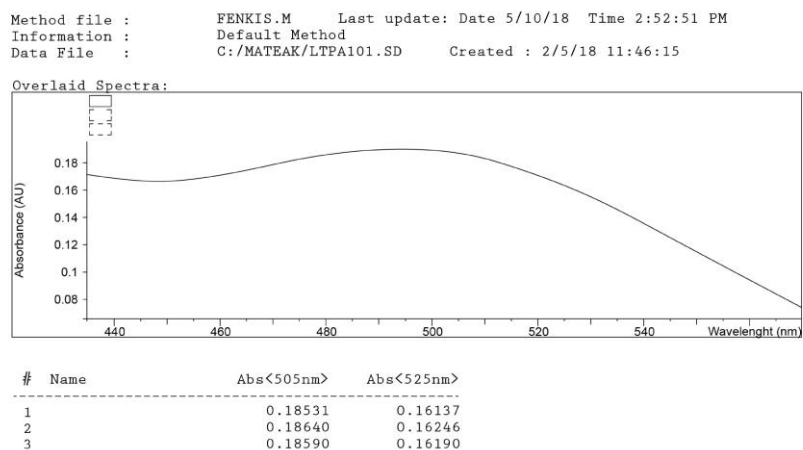


Slika 17. Mjesečne količine oborine, u postotcima višegodišnjeg prosjeka u Hrvatskoj za veljaču 2016. (DHMZ).

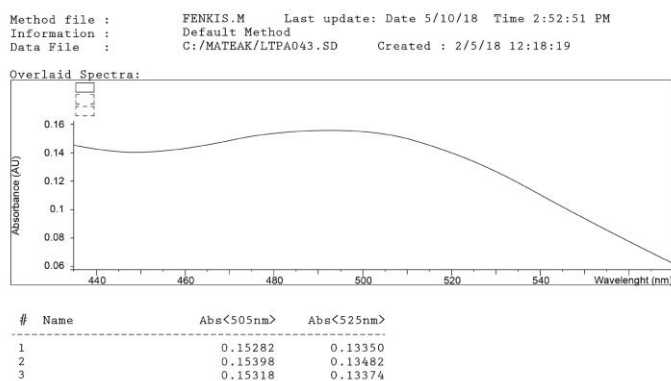
Slike 18-20 prikazuju karakteristične primjere određivanja sadržaja fenolnih kiselina lovora (redom: srpanj i listopad 2015. te travanj 2016. godine).



Slika 18. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije ekstrakta lista lovora – srpanj 2015.



Slika 19. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije ekstrakta lista lovora – listopad 2015.



Slika 20. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije ekstrakta lista lovora – travanj 2016.

Sukladno dobivenim rezultatima (Tablice 2 i 3). te prema Grafičkom prikazu 1, vidljivo je da uzorci lista lovora imaju veći udio klorogenske nego ružmarinske kiseline.

U prosjeku je, mjerenjem sadržaja fenolnih kiselina izraženih kao klorogenska kiselina, dobiven za $1,73 \pm 0,24\%$ veći postotak od onoga dobivenog mjerenjem sadržaja fenolnih kiselina izraženih kao ružmarinska kiselina (Tablica 4).

Tablica 4. Usporedba rezultata dobivenih spektrofotometrijskim mjerenjem fenolnih kiselina na 505 nm (izraženi kao ružmarinska kiselina) i 525 nm (izraženi kao klorogenska kiselina).

Mjesec/godina	%R	%K	%K - %R	%K - %R (avg)	SD
5./2015.	1,93	3,55	1,62	1,73	0,24
6./2015.	2,02	3,74	1,72		
7./2015.	2,01	3,71	1,69		
8./2015.	2,65	4,92	2,27		
9./2015.	2,06	3,79	1,72		
10./2015.	2,21	4,07	1,86		
11./2015.	1,82	3,35	1,53		
12./2015.	1,62	2,96	1,34		
1./2016.	1,84	3,37	1,54		
2./2016.	2,37	4,38	2,01		
3./2016.	2,07	3,84	1,78		
4./2016.	1,91	3,55	1,64		

Oznake: **%K** – fenolne kiseline (FK) izražene kao klorogenska kiselina (%); **%R** – FK izražene kao ružmarinska kiselina (%); **%K-%R** – razlika prosjeka mjerenja na 525 nm i 505 nm, te prosjek i standardna devijacija postotaka.

5. ZAKLJUČAK

U okviru ovoga diplomskoga rada provedena je djelomična fitokemijska karakterizacija vrste *Laurus nobilis* L. (lovor). U svrhu praćenja sezonske varijabilnosti sadržaja fenolnih kiselina u uzorcima listova lovora, provedena je kvantitativna analiza spomenutih polifenolnih tvari u uzorcima s područja Lovrana sabiranih mjesečno, kroz razdoblje od svibnja 2015. do travnja 2016. godine.

Određivanje sadržaja fenolnih kiselina 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 iz kolovoza 2015. godine (2,65%), dok je najmanji udio zabilježen u uzorku iz prosinca 2015. (1,62%). Analogni rezultati dobiveni su i spektrofotometrijskom metodom preko klorogenske kiseline, tj. najveći udio zabilježen je u uzorku lista lovora iz kolovoza 2015. te je iznosio 4,92%, a najmanji je sadržaj izmjeren u uzorku lista lovora iz prosinca 2016. (2,96%). Nadalje je zanimljivo da je vrlo visoka vrijednost sadržaja zabilježena u veljači 2016. – sadržaj fenolnih kiselina izražen kao ružmarinska kiselina iznosio je 2,37%, dok je udio fenolnih kiselina izražen kao klorogenska kiselina iznosio 4,38%. Uvidom u vremenske uvjete u Lovranu za veljaču 2016., pronađeno je da je temperatura zraka bila iznadprosječno visoka za to doba godine te je također zabilježena i ekstremna količina padalina, što bi moglo objasniti visok sadržaj fenolnih kiselina u tom razdoblju.

Usporedbom dobivenih rezultata određivanja sadržaja fenolnih kiselina u ekstraktima listova lovora s područja Lovrana kroz jednu kalendarsku godinu, utvrđen je veći sadržaj klorogenske nego ružmarinske kiseline u ispitivanim biljnim uzorcima.

Istraživanja provedena u okviru ovoga diplomskoga rada proširila su saznanja o sezonskoj varijabilnosti sadržaja fenolnih kiselina u listovima lovora s područja Lovrana te općenito pridonose istraživanjima polifenola vrste *Laurus nobilis* L. s područja Republike Hrvatske.

6. LITERATURA

AL-Samarrai, Othman Rashid, Nazar Ahmed Naji, and Rafaa Razooq Hameed. "Effect of Bay leaf (*Laurus nobilis* L.) and its isolated (flavonoids and glycosides) on the lipids profile in the local Iraqi female rabbits." *Tikrit Journal of Pure Science*, 2017, 22 (6), 73-75.

Avokado; cimet; kamfor; lovor, www.pfaf.org, pristupljeno 30.5.2018.

Bennett L, Abeywardena M, Burnard S, Forsyth S, Head R, King K, Patten G, Watkins P, Williams R, Zabarar D, Lockett T. Molecular size fractions of bay leaf (*Laurus nobilis*) exhibit differentiated regulation of colorectal cancer cell growth in vitro. *Nutr Cancer*, 2013, 65(5), 746-764.

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

Biljni lijekovi, www.halmed.hr, pristupljeno 20.4.2018.

Biljni lijekovi, www.who.int, pristupljeno 20.4.2018.

Bival Štefan M. Biološki učinci fenolnih kiselina iz odabranih vrsta porodice Lamiaceae. Doktorski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2015.

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, Nyssonen K, Schroeder H, Salonen JT, De la Torre-Carbot K, Zunft HF, De la Torre R, Baumler 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.

Chao PC, Hsu CC, Yin MC. Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. *Nutr Metab (Lond)*, 2009, 6, 33.

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.

Council of Europe. European Pharmacopoeia. 5th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2007. str. 2372-2378.

Council of Europe. European Pharmacopoeia. 5th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2007. str. 2372-2378.

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.

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

Domac R. Mala flora Hrvatske i susjednih područja. Zagreb, Školska knjiga Zagreb, 1984, str. 264.

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.

Fernández NJ, Damiani N, Podaza EA, Martucci JF, Fasce D, Quiroz F, Meretta PE, Quintana S, Eguras JM, Gende LB. *Laurus nobilis* L. Extracts against *Paenibacillus* larvae: Antimicrobial activity, antioxidant capacity, hygienic behavior and colony strength. *Saudi Journal of Biological*, 2018, u tisku, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.04.008>

Furtado MA, de Almeida LCF, Furtado RA, Cunha WR, Tavares DC. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mut Res*, 2008, 657, 150–154.

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

Guido L. F, Vinha A. F, Costa A. S. G, Alvesa R. C, Oliveira B. Monomeric and oligomeric flavan-3-ols and antioxidant activity of leaves from different *Laurus* sp. *Food Funct.*, 2015,6, 1944-1949.

Gülcin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 2006, 207, 213-220.

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

Huang WY, Cai YZ, Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr Cancer*, 2010, 62 (1), 1–20.

Ikeda K, Tsujimoto K, Uozaki M, Nishide M, Suzuki Y, Koyama AH, Yamasaki H. Inhibition of multiplication of herpes simplex virus by caffeic acid. *Int J Mol Med*, 2011, 28, 595–598.

Janbaz KH, Saeed SA, Gilani AH. Studies on the protective effects of caffeic acid and quercetin on chemical-induced hepatotoxicity in rodents. *Phytomedicine*, 2004, 11, 424–430.

Kaurinović B, Popovic M, Vlasisavljevic S. *In Vitro* and *in Vivo* Effects of *Laurus nobilis* L. Leaf Extracts. *Molecules*. 2010, 15, 3378-3390.

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

Lafay S, Gil-Izquierdo A. Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem Rev*, 2008, 7, 301–311.

Laranjinha J, Vieira O, Madeira V, Almeida L. Two related phenolic antioxidants with opposite effects on vitamin E content in low density lipoproteins oxidized by ferryl myoglobin: Consumption vs regeneration. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 323, 373-381.

Lauraceae, <http://www.theplantlist.org>, pristupljeno 25.4.2018.

Lurales, www.britannica.com, pristupljeno 25.4.2018.

Laurus nobilis L., www.herbaria.plants.ox.ac.uk, pristupljeno 29.4.2018.

Maleš Ž. Predavanja s kolegija Farmaceutska botanika, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2011.

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, 351-352.

Merghni A, Marzouki H, Hentati H, Aouni M, Mastouri M. Antibacterial and antibiofilm activities of *Laurus nobilis* L. essential oil against *Staphylococcus aureus* strains associated with oral infections. *Current Research in Translational Medicine*, 2016, 64, 29-34.

Monografija *Rosmarini folium*, <http://online6.edqm.eu/ep905/#>, pristupljeno 20.4.2018.

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

Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Sanbongi C, Kato Y, Osawa T, Yoshikawa T. Rosmarinic acid, a major polyphenolic component of *Perilla frutescens*, reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced liver injury in d-galactosamine (d-GalN)-sensitized mice. *Free Radic Biol Med*, 2002, 33, 798–806.

Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Yoshikawa T. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis*, 2004, 25, 549–557.

Osmakov DI, Koshelev SG, Andreev YA, Dubinnyi MA, Kublitski VS, Efremov RG, Sobolevsky AI, Kozlov SA. Proton-independent activation of acid-sensing ion channel 3 by an alkaloid, lindoldhamine, from *Laurus nobilis*. *British Journal of Pharmacology* 2018, 175, 924-937

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

Pacifico S, Gallicchio M, Lorenz P, Duckstein SM, Potenza N, Galasso S, Marciano S, Fiorentino A, Stintzing FC, Monaco P. Neuroprotective Potential of *Laurus nobilis* Antioxidant Polyphenol-Enriched Leaf Extracts. *Chem Res Toxicol*, 2014, 27(4), 611-626.

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

Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2009, 2, 270-278.

Peixoto RL, Rosalen PL, Silva Ferreira GL, Freires IA, de Carvalho FG, Castellano LR, Dias de Castro R. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. . *Archives of Oral Biology*, 2017, 73, 179-185.

Perlain, Emanuela. *Sastav eteričnih ulja lovora (Laurus nobilis L.)*. Diss. University of Split. University of Split, Faculty of science. Department of Biology., 2016.

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

Pinheiro, LÍlian Sousa, Abrahão Alves de Oliveira Filho, and Felipe Queiroga Sarmiento Guerra. Antifungal activity of the essential oil isolated from *Laurus nobilis* L. against *Cryptococcus neoformans* strains. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2017, 7.05, 115-118.

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

Qiao S, Li W, Tsubouchi R, Haneda M, Murakami K, Takeuchi F, Nisimoto Y, Yoshino M. Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264.7 macrophages. *Free Radical Res*, 2005, 39, 995–1003.

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.

Ralph J, Quideau S, Grabber JH, Hatfield RD. Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell-walls. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1994, 1, 3485–3498.

Rasprostranjenost vrste *Laurus nobilis* L. u Hrvatskoj, www.hirc.botanic.hr/fcd, pristupljeno 29.05.2018.

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

Robbins RJ. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(10), 2866-87.

Russell WR, Burkitt MJ, Provan GJ, Chesson A. Structure specific functionality of plant cell wall hydroxycinnamates. *J Sci Food Agric*, 1999, 79, 408–410.

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. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 2013, 12, 367-379.

Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, Sugawara M, Iseki K. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int J Pharm*, 2011, 403, 136–138.

Sayyah, M., J. Valizadeh, and M. Kamalinejad. Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* against pentylenetetrazole-and maximal electroshock-induced seizures. *Phytomedicine*, 2002, 9.3, 212-216.

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

Šikiminska kiselina, www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, pristupljeno 15.5.2018.

Simić M, Kundaković T, Kovačević N. Preliminary assay on the antioxidative activity of *Laurus nobilis* extracts. *Fitoterapia*, 2003, 74(6), 613-616.

Sun AY, Simonyi A, Sun GY. The „French paradox” and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radic Bio Med*, 2002, 32, 314-318.

Swarup V, Ghosh J, Ghosh S, Saxena A, Basu A. Antiviral and anti-Inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. *Antimicrob Agents Chemoter*, 2007, 51, 3367–3370.

Takeda H, Tsuji M, Inazu M, Egashira T, Matsumiya T. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. *Eur J Pharmacol*, 2002, 449, 261–267.

Tepe B. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Benth) and *Salvia verbenaca* L. from Turkey. *Bioresour Technol*, 2008, 99,1584–1588.

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

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

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.

Von Gadow A, Joubert E, Hansmann CF. Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chem*, 1997, 60, 73-77.

Vuković R. Učinak inducibilne ekspresije gena crypt na sintezu fenolnih spojeva i antioksidacijski status transgenog korjenja ukrasne koprive (*Coleus blumei Benth.*). Doktorski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, 2013.

Widmer TL, Laurent N. Plant extracts containing caffeic acid and rosmarinic acid inhibit zoospore germination of *Phytophthora* spp. Pathogenic to *Theobroma cacao*. *Eur J Plant Pathol*, 2006, 115, 377-388.

Xu Z, Sun T, Li W, Sun X. Inhibiting effects of dietary polyphenols on chronic eye diseases. *Journal of Functional Foods*, 2017, 39, 186-197.

7. Sažetak/Summary

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je kvantitativna analiza fenolnih kiselina vrste *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) s područja Lovrana kroz razdoblje od svibnja 2015. do travnja 2016. godine u svrhu praćenja sezonske varijabilnosti spomenutih polifenolnih tvari. Kvantitativna analiza fenolnih kiselina provedena je spektrofotometrijski te je sadržaj izražen 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 1,62% (prosinac 2015.) do 2,65% (kolovoz 2015.), te u rasponu od 2,96% (prosinac 2015.) do 4,92% (kolovoz 2015.) kada su izražene kao klorogenska kiselina. Provedena kvantitativna analiza predstavlja prilog znanstvenom istraživanju polifenola vrste *Laurus nobilis* L. i upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu lovora, posebice u odnosu na sadržaj bioaktivnih fenolnih tvari.

Summary

In this work, quantitative analysis of phenolic acids in leaves of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) from Lovran was carried out. The samples of laurel leaves were collected during the one year period (from May 2015 to April 2016) with the intention of determining the seasonal variability of the phenolic acid contents. Phenolic acids were analyzed using pharmacopoeial spectrophotometric methods: on 505 nm (expressed as rosmarinic acid) and 525 nm (expressed as chlorogenic acid). The contents of analyzed compounds varied in laurel leaves from 1.62% (December 2015) to 2.65% (August 2015), when expressed as rosmarinic acid, and from 2.96% (December 2015) to 4.92% (August 2015), when expressed as chlorogenic acid. Conducted 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.

8. Temeljna dokumentacijska kartica / Basic documentation card

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

Diplomski rad

SEZONSKA VARIJABILNOST SADRŽAJA FENOLNIH KISELINA VRSTE *LAURUS NOBILIS* L. (LAURACEAE) S PODRUČJA LOVRANA

Matea Kirchbauer

SAŽETAK

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je kvantitativna analiza fenolnih kiselina vrste *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) s područja Lovrana kroz razdoblje od svibnja 2015. do travnja 2016. godine u svrhu praćenja sezonske varijabilnosti spomenutih polifenolnih tvari. Kvantitativna analiza fenolnih kiselina provedena je spektrofotometrijski te je sadržaj izražen 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 1,62% (prosinac 2015.) do 2,65% (kolovoz 2015.), te u rasponu od 2,96% (prosinac 2015.) do 4,92% (kolovoz 2015.) kada su izražene kao klorogenska kiselina. Provedena kvantitativna analiza predstavlja prilog znanstvenom istraživanju polifenola 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: 45 stranice, 20 slika, 1 grafički prikaz, 4 tablice i 76 literaturna navoda.
Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Laurus nobilis* L., fenolne kiseline, kvantitativna analiza, UV-Vis spektrofotometrija, sezonska varijabilnost

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. Maja Ortner Hadžiabdić, docentica Sveučilišta u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: lipanj, 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

SEASONAL VARIABILITY OF THE PHENOLIC ACID CONTENTS OF *LAURUS NOBILIS* L. (LAURACEAE) FROM LOVRAN

Matea Kirchbauer

SUMMARY

In this work, quantitative analysis of phenolic acids in leaves of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) from Lovran was carried out. The samples of laurel leaves were collected during the one year period (from May 2015 to April 2016) with the intention of determining the seasonal variability of the phenolic acid contents. Phenolic acids were analyzed using pharmacopoeial spectrophotometric methods: on 505 nm (expressed as rosmarinic acid) and 525 nm (expressed as chlorogenic acid). The contents of analyzed compounds varied in laurel leaves from 1.62% (December 2015) to 2.65% (August 2015), when expressed as rosmarinic acid, and from 2.96% (December 2015) to 4.92% (August 2015), when expressed as chlorogenic acid. Conducted 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: 45 pages, 20 figures, 1 chart, 4 tables, and 76 references.

Original is in Croatian language.

Keywords: *Laurus nobilis* L., phenolic acids, quantitative analysis, UV-Vis spectrophotometry, seasonal variability

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
Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June, 2018