Kvalitativna i kvantitativna analiza flavonoida vrste Laurus nobilis L. (Lauraceae) s područja Dalmacije

Perica, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:098775

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Matea Perica

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

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. sc. Renati Jurišić Grubešić, na omogućenoj svoj potrebitoj opremi, strpljenju, razumijevanju, pomoći i susretljivosti.

Također zahvaljujem svim svojim bližnjima koji su uvijek bili uz mene i pružali mi potporu tijekom cijelog studija i bez čije podrške ovaj tijek studiranja ne bi prošao lako, hvala im na vjerovanju u mene kada ni sama nisam vjerovala i na bezgraničnoj ljubavi.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Botanički podatci 2

1.1.1. Porodica Lauraceae Juss.1789. (lovori, lovorovke, lovorike) 2

1.1.2. Rod *Laurus* L. (lovori) 3

1.1.3. Vrsta *Laurus nobilis* L. (lovor, pravi lovor, lovorika) 4

1.2. Pregled istraživanja vrste *Laurus nobilis* L. 7

1.3. Biološki aktivne tvari vrste *Laurus nobilis* L. 9

1.3.1. Flavonoidi 9

2. OBRAZLOŽENJE TEME 17

3. MATERIJALI I METODE 18

3.1. Biljni materijal 18

3.2. Aparatura i kemikalije 19

3.3. Metode i postupci istraživanja 20

3.3.1. Kvalitativna analiza flavonoida 20

3.3.2. Kvantitativna analiza flavonoida 21

4. REZULTATI I RASPRAVA 22

4.1. Rezultati kvalitativne analize flavonoida 22

4.2. Rezultati kvantitativne analize flavonoida 26

5. ZAKLJUČCI 31

6. LITERATURA 32

7. SAŽETAK/SUMMARY 35

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

Biljke su čovjekova prvotna sredstva kojima je suzbijao različite bolesti. Kroz povijest su ljudi širom svijeta koristili ljekovito bilje i njegove pripravke za poboljšanje zdravlja, a danas već mnoge biljne vrste imaju utvrđeno mjesto unutar znanstvene medicine i koriste se u tretmanu širokog raspona zdravstvenih stanja**.** Uporaba biljnih pripravaka s terapeutskim svojstvima prisutna je od početka ljudske civilizacije. Sheng-Nongs Herbal Book, jedan je od najranijih izvora narodnog znanja o uporabi biljaka u Kini, potječe iz 3000. godine prije Krista i uključuje znanje o 365 biljaka, životinja i minerala koji su se primjenjivali u zdravstvene svrhe. Unatoč industrijskoj revoluciji i razvoju organske kemije koja je rezultirala sklonosti sintetičkim proizvodima, Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) izvješćuje da se između 70% i 95% građana u većini zemalja u razvoju još uvijek oslanja na tradicionalnu medicinu kao svoj primarni izvor lijekova. Oko 25% lijekova koji se primjenjuju širom svijeta proizvedeno je iz biljnih izvora (Mohamed i sur., 2012).

Koncept fitoterapije potječe od francuskog liječnika Henrija Leclerca koji je prvi uveo taj pojam 1913. godine. Fitoterapija podrazumijeva liječenje, ublažavanje ili sprječavanje bolesti i tegoba upotrebom cijelih ljekovitih biljaka ili njihovih dijelova (npr. cvjetova, listova, korijena.), njihovih sastojaka (eteričnih ulja, ekstrakata i drugih izolata), kao i gotovih pripravaka (www.britannica.com). Mnoge fitokemikalije pozitivno utječu na dugoročno zdravlje i mogu se koristiti za liječenje različitih bolesti. Interes za biljne izvore u razvoju lijekova uvelike se povećao početkom 1980-ih. To bi se moglo pripisati negativnim stranama konvencionalne medicine, primjerice citotoksičnosti, nuspojavama, neučinkovitosti u nekim zdravstvenim stanjima, zloporabi sintetičkih lijekova i, što je najvažnije, visokim troškovima koji su uključeni u konvencionalnu medicinu te činjenici da velik postotak svjetskog stanovništva nema pristup konvencionalnom farmakološkom tretmanu. Vrijedno je i primijetiti da „biljna medicina“ ima najnižu razinu (7,6%) prijavljenih štetnih učinaka u usporedbi s drugim načinima komplementarne i alternativne medicine. Kemijski sastav glavne djelatne tvari fitoterapeutika danas je poznat, a primjenu biljnih pripravaka treba racionalizirati i prepustiti stručnjacima, što je nadasve važno pri kombinaciji s drugim lijekovima. Zlatno polje ljekovitog bilja čuva još mnoge tajne te predstavlja velik izazov suvremenim znanstvenim istraživanjima koja su usmjerena pronalasku novih fitoterapeutika.

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza ukupnih flavonoida 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

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

Porodica lovora objedinjuje oko 50 rodova i 2500 biljnih vrsta. Uglavnom ju čine drvenaste biljke koje rastu u tropskim i suptropskim krajevima (osobito u jugoistočnoj Aziji i tropskoj Americi), a manjim dijelom ih nalazimo i u umjerenom pojasu. U nekim tropskim, šumskim područjima, porodica Lauraceae spada među pet porodica koje imaju najviše prisutnih biljnih vrsta te čine takozvane lovorove šume. Kožnati, uski i ovalni listovi, kao i voštani sloj na površini lista, predstavljaju prilagodbu biljaka ove porodice na veliku količinu kiše i vlage u područjima u kojima rastu (Nikolić, 2013).

Tablica 1. Glavne osobine porodice Lauraceae (Nikolić, 2013).

Habitus	drveće, grmlje	Andrecej	3-26
Mliječni sok	izostaje	Prašnici	Slobodni
Rukavac listova	Izostaje	Pelud	Anaperturni
Palistići	Izostaju	Plodnih listova	1/3
Puči	Paracitne	Ginecej	Monomerni
Nodiji	Unilakularni	Sjemeni zameci	Anatropni
Ksilem	s traheidama i bez traheida	Tip embrionske vreće	Polygonum
Plastidi sitastih cijevi	P-tip ili S-tip	Flavonoli	Prisutni
Cvjetovi	dvospolni ili jednospolni, ciklički	Rasprostranjenost	pantropska, suptropska, do umjerenih područja
Ocvjeće	slobodno	Citologija	n=12

Važniji rodovi spomenute porodicu 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. sasafras - *Sassafras album*) (Marković, 2005).

Actinodaphne
Aiouea
Alseodaphne
Aniba
Apollonias
Aspidostemon
Beilschmiedia
Benzoin
Camphora
Caryodaphnopsis
Cassytha
Chlorocardium
Cinnadenia
Cinnamomum
Cinnamonum
Cryptocarya
Dehaasia
Dicypellium
Dodecadenia
Endiandra
Endlicheria
Eusideroxylon
Gamanthera
Hufelandia
Hypodaphnis
Iteadaphne
Kubitzkia
Laurus
Licaria
Lindera
Litsea
Machilus
Malapoenna
Mezilaurus
Misanteca
Mocinnodaphne
Mutisiopersea
Nectandra
Neocinnamomum
Neolitsea
Notaphoebe
Nothaphoebe
Ocotea
Oreodaphne
Parasassafras
Parthenoxylon
Persea
Phoebe
Phyllostemonodaphne
Pleurothyrium
Polyadenia
Potameia
Potoxylon
Povedadaphne
Ravensara
Rhodostemonodaphne
Sassafras
Schauera
Sextonia
Sinopora
Sinosassafras
Syndiclis
Tetranthera
Tylostemon
Umbellularia
Urbanodendron
Williamodendron

Slika 1. Rodovi porodice Lauraceae (www.theplantlist.org).

U porodici lovora nalazimo pretežito aromatične biljke koje imaju eterično ulje lokalizirano u raznim dijelovima biljke: list (lovor, ravensara), kora i grančice (cimet), drvo (ruža drvo) i plodovi (licea) (Marković, 2005).

Zbog eteričnih ulja te brojnih korisnih svojstava i prirodnih produkata, biljke ove porodice su od velikog ekonomskog značaja. Tako, na primjer, čovjek iskorištava plod avokada (*Persea americana*) u prehrambene svrhe jer je bogat bjelančevinama i mastima, a niskog je udjela šećera. Ukupna hranjiva vrijednost avokada je visoka, osigurava gotovo dvostruku energiju ekvivalentne težine mesa i obilje vitamina kao što su A, B, C, D i E. List lovora (*Laurus nobilis* L.) služi kao začinska biljka u kulinarstvu te kao ljekovita biljka u narodnoj medicini i kozmetologiji, cimet (*Cinnamomum spp*.) također kao začinska biljka, kamfor u kozmetologiji i mnoge druge koje su primjenu pronašle u drvnoj industriji ili kao insekticidi (www.britannica.com).

1.1.2. Rod *Laurus* L. (lovori)

Vrste roda *Laurus* L. drvenaste su, 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 boba promjera 1-1,5 cm koja dozrijeva u kasnu jesen (Grdinić i Kremer, 2009).

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

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

Domovina lovora je Mala Azija, otkud se proširio po mnogim zemljama oko Sredozemnog mora. U Hrvatskoj je rasprostranjen u Istri, Hrvatskom primorju i Dalmaciji, a najbujnije se

razvija na obroncima Učke uz gradove poput Opatije i Lovrana koji i duguje svoje ime upravo ovoj 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 (Kuštrak, 2005).

Latinsko ime dolazi od riječi *laurus* što znači slavljen i *nobilis* što znači plemenit ili obnovljen (Houdret, 2002).

Od antičkog je vremena lovor bio vrlo cijenjeno i sveto drvo. Bio je posvećen Apolu, grčkom bogu glazbe, liječništva, istine i svjetla i mnoga su praznovjerja pričala o njegovim moćima. U Teofrastovim zapisima navodi se običaj držanja lista lovora u ustima da se spriječi nesreća, a do rimskog se doba smatralo da sprječava udare groma. Mislilo se da stabla lovora čiste zrak tamo gdje rastu. Za vrijeme epidemije kuge, rimski car Klaudije preselio je svoj dvor u Laurentium, koji je dobio ime po lovoru koji je tamo rastao, da mu osigura zaštitu. U kršćanstvu je lovor postao simbol vječnog života, pa su se u božićno doba njime ukrašavale kuće i crkve (Houdret, 2002).



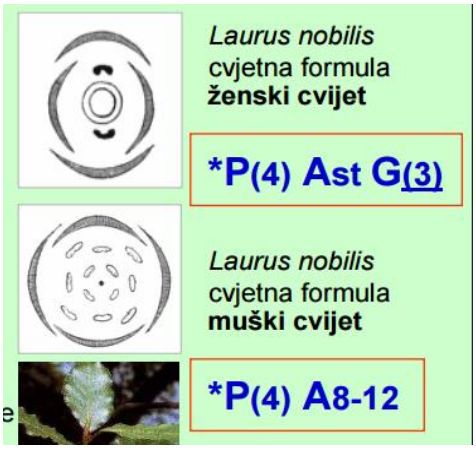
Slika 2. Vrsta *Laurus nobilis* L. – lovor (www.doctorschar.com).

Lovor je drvenasta mediteranska biljka koja u Hrvatskoj raste s ostalim zimzelenim grmljem ili pojedinačno. Staništa lovora su makije, kamenjari 300-400 m nadmorske visine. To je višegodišnji, vazdazeleni grm ili drvo 3-15 m visine, širina krune doseže do 10 m, a životni je vijek i do 100 godina (Dudaš i Venier, 2009).

U mladosti je kora debela, glatka i siva, a kasnije hrapava i crna. Listovi su zavojito raspoređeni, naizmjenični, na kratkoj peteljci, jednostavni, bez palistića, eliptični do duguljasti ili duguljasto suličasti, šiljata ili ušiljena vrha, cijela i često valovita ruba, dugi 7-12 cm, široki 2,5-4,5 cm, kožasti, s gornje strani tamnozeleni i sjajni, s donje strane zeleni bez sjaja, goli i vrlo aromatični (Grdinić i Kremer, 2009).

U mezofilu lista lokalizirano je eterično ulje u posebnim okruglim 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 paštitaste 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).



Slika 3. Cvjetna formula (Nikolić, 2013).

Kemijski sastav

List lovora sadrži 1-3% eteričnog ulja koje je bogato monoterpenolima (do 15% linalola, do 5% α-terpinola), oksidima (do 45% 1,8-cineola) te malom količinom vrlo aktivnih seskviterpenskih laktona (do 2% kostunolida, artemorin).

Osim eteričnih ulja, sadrže i dosta trjeslovina te nešto gorkih tvari.

Plod sadrži 1% eteričnog ulja, 30-40% masnih ulja te šećera i škroba (Kuštrak, 2005; Marković, 2005).

Tablica 2. Kemijski sastav i sadržaj lovorova eteričnog ulja (Kuštrak, 2005).

KEMIJSKI SASTAV I SADRŽAJ LOVOROVA ETERIČNOG ULJA – LAURI FOLII AETHEROLEUM			
Glavne sastavnice (%)	nalazišta		
	Opatija	Rijeka (Pulac)	otok Krk (Kras)
α-pinen	3,6	3,8	4,7
sabinen	8,7	10,2	10,7
1,8-cineol	32,8	30,9	33,6
linalol	7,3	8,8	4,7
terpinen-4-ol	3,5	2,7	4,6
β-kariofilen	1,6	2,2	0,7
α-terpineol	3,5	4,6	3,7
α-terpinilacetat	10,2	8,6	9,1
metil-eugenol	4,8	5,6	8,8
eugenol	3,4	3,9	2,8
Postotak eteričnog ulja u listovima	0,87	1,36	1,53

Primjena lista lovora

Lovor se primjenjuje u pučkoj medicini i veterinarstvu. Čaj od listova lovora se koristio za grgljanje kod angine, kao oblog kod nagnječenja ili čireva, ali i protiv grčeva u probavnim organima te mučnine u želucu. Sušeni list lovora poznat je i cijenjen začin. On se koristi u kulinarstvu za začinjavanje različitih jela, pri konzerviranju povrća i za aromatiziranje octa (Dudaš i Venier, 2009).

Indijska i mediteranska kuhinja potiču upotrebu listova kao antiseptika te probavnog agensa. Osušeni list lovora može se unijeti u čaj da bi osigurao probavno olakšanje ili suprimirao apetit radi postizanja gubitka težine. Svojedobno se čaj preporučivao i protiv bronhitisa, hunjavice te gripe, ali danas se pripravci lista lovora za unutarnju upotrebu rijetko primjenjuju. Kao kupka djeluje vrlo opuštajuće i antireumatično. Iscrpina od narezanih listova lovora u alkoholu upotrebljava se kod istegnuća tetiva, uganuća i reume. U Dalmaciji listove koriste kod konzerviranja i pakiranja suhog voća, naročito smokava, a ujedno je i repelent. Također se primjenjuje u proizvodnji alkoholnih pića i voćnih sokova (Kuštrak, 2005). Dekorativnu vrijednost lovora čine njegovi listovi intenzivno zelene boje 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 vršiti ljeti i uklanjati mladice čim se pojave jer one iscrpljuju stablo lovora (Dudaš i Venier, 2009).

Farmakološko djelovanje i upotreba eteričnog ulja lista 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. Ako se lovorovo ulje dobiveno prešanjem (mješavina eteričnog ulja i masnog ulja) koristi kod reumatskih tegoba, može izazvati kontaktni dermatitis (Pahlow i sur., 1999). U farmaceutskoj se industriji koristi u izradi sapuna, krema, losiona, parfema pa čak i detergenata (Kuštrak, 2005).

1.2. Pregled istraživanja vrste *Laurus nobilis* L.

Iako lovor nije biljka koja se prvenstveno koristi u medicini u obliku raznih farmaceutskih pripravaka, nego većim dijelom služi kao začinska biljka u kulinarstvu, gdje također pokazuje blagotvorna svojstva, proveden je znatan broj istraživanja, i to prije svega zahvaljujući antioksidativnim svojstvima flavonoidnih spojeva.

Utvrđivanjem kemijskog sastava eteričnog ulja lovora identificirano je 26 spojeva. Najznačajniji je izeugenol (53,5%), zatim mircen (16,6%) i kavikol (10,2%). Konstitutivna analiza ukazivala je na prisutnost hlapljivih spojeva, uglavnom ugljikovodika, mono- i seskviterpena, zajedno s fenilpropenima. Istim je ispitivanjem utvrđeno da MIC 100% eteričnog ulja vrste *L. nobilis* iznosi 500 μg/mL. Prirodni proizvodi smatraju se snažnim inhibitorima mikrobne aktivnosti kada su njihove MIC vrijednosti jednake ili manje od 500 μg/mL (Duarte et al., 2007). Stoga su rezultati u ovoj studiji pokazali da ulje eterično vrste *L. nobilis* ima snažne antifungalne učinke. Budući da je ulje slobodno za upotrebu, sigurno i zanemarive

toksičnosti prema FDA, moglo bi se smatrati obećavajućom metom za razvoj lijekova (Peixoto i sur., 2017).

Jedna je znanstvena studija pokazala antifungalni potencijal kemijski karakteriziranog eteričnog ulja vrste *L. nobilis* L. protiv *Candida spp.,* adhezije i formiranje biofilma. Testiran je na minimalnu inhibicijsku i fungicidnu koncentraciju (MIC/MFC) protiv *Candida spp.*, kao i za interakciju s biosintezom stanične stijenke i membranskom ionskom propusnošću. Zatim su procijenjeni učinci na adheziju, formiranje i smanjenje biofilmova vrste *C. albicans*. Fitokemijski profil ulja određen je plinskom kromatografijom spregnutom s masenom spektrometrijom (GC/MS). Dokazana je antifungalna aktivnost, vjerojatno zbog monoterpena i seskviterpena u sastavu eteričnog ulja. Može utjecati na biosintezu stanične stijenke i permeabilnost membrane, a dokazani su i štetni učinci na biofilm vrste *C. albicans* (Peixoto i sur., 2017).

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 alternativni i valjani pristup liječenju neurodegenerativnih bolesti (Pacifico i sur., 2014).

Kako su fenolni spojevi lovora u najvećoj mjeri odgovorni za blagotvorno djelovanje protiv gastrointestinalnih tegoba, nadutosti i slično, provedena je ultrazvučna ekstrakcija fenolnih spojeva uz promjenu različitih eksperimentalnih uvjeta. Zatim je proučeno u kojim je uvjetima najbolja ekstrakcija fenolnih spojeva te su promatrana njihova antioksidativna svojstva. Najbolji uvjeti ekstrakcije: 1 g biljnog uzorka s 12 mL 35% etanola, 40 min ultrazvučne ekstrakcije. Dakle, rezultati su pokazali da se velike količine fenolnih spojeva mogu ekstrahirati iz vrste *L. nobilis* tehnologijom ultrazvučne ekstrakcije (Muniz-Marquez i sur., 2013).

Budući da je poznato da reaktivne kisikove specije izazivaju dijabetes ispitivana je učinkovitost eteričnog ulja kod dijabetesa kroz inhibiciju alfa-glukozidaze ili uklanjanem takvih reaktivnih spojeva. Cilj ove studije je bio ispitati antioksidacijska svojstva eteričnog ulja vrste *Laurus nobilis* L. upotrebom pet različitih *in vitro* metoda: inhibicija hidroksilnih, superoksidnih i DPPH radikala, inhibicija vodikovog peroksida i inhibicija lipidne peroksidacije. Osim toga, korišten je test za inhibiciju α-glukozidaze za procjenu *in vitro* antidijabetičke aktivnosti ulja. Dokazano je da eterično ulje lovora pokazuje najveću inhibicijsku aktivnost protiv hidroksilnih radikala. Ustanovljeno je da je eterično ulje lovora inhibira α-glukozidazu preko 90% (Basak i Candan, 2013).

Cilj jednog istraživanja bio je istražiti znanstvenu procjenu spojeva vrste *L. nobilis* na imunoglobulin E posredovanu preosjetljivosti tipa I *in vitro*, kao što su atopijski dermatitis i astma. Rezultati su upućivali da magnolialid može biti kandidat za liječenje igE-posredovanih reakcija preosjetljivosti, inhibirajući degranulaciju mastocita, proizvodnju IL-4 i proliferaciju rane B stanice ovisne o IL-5 (Lee i sur., 2013).

U Jordanu se u narodnoj medicini koristio lovor kao antidijaroik te je u svrhu znanstvene procjene te biljne vrste za spomenutu primjenu provedeno 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. Lovor djeluje na način 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).

Kako su sintetički antioksidansi uzrokovali mnoštvo nuspojava, uključujući kancerogenost, pojavila se potreba za istraživanjem što većeg broja prirodnih antioksidansa. Cilj jedne znanstvene studije (Emam i sur., 2010) bio je izolirati i strukturno objasniti antioksidativne komponente iz lista lovora. Tako je različitim kromatografskim metodama izolirano 3 spoja. Spektroskopskim i kemijskim metodama utvrđena je prisutnost flavonoidnih antioksidativnih spojeva, kao što su kemferol, kemferol-3-ramnopiranozid i kemferol-3,7-diramnopiranozid.

U istraživanju provedenom 2008. godine potvrđeno je antibakterijsko djelovanje dvaju flavonoida (različitih kemferol-ramnozida), izoliranih iz ekstrakta lista lovora i to protiv meticilin rezistentniih sojeva *Staphylococcus aureus* (MRSA) i vankomicin rezistetnih enterokoka (VRE) (Otsuka i sur., 2008).

Istraživanjem sastojaka eteričnog ulja lovorova lista utvrđeno je da eterično ulje lovora posjeduje akaricidno djelovanje. Glavni sastojci eteričnog ulja su 1,8 cineol (39,2%), α-terpinilacetat (11,3%), sabineni (10,6%) i linalol (7,4%). Koncentracijom eteričnog ulja u otopini od 10% postignut je 73%-tni mortalitet vrste *Psoroptes cuniculi*. Smanjenje koncentracije na 5% u otopini imalo je za posljedicu signifikantno smanjeni učinak za 50%. Otopine s malim koncentracijama (2,5%, 1,25% i 0,625%) eteričnog ulja nisu pokazale akaricidni učinak (Macchioni i sur., 2006).

Istraživana je antioksidativna aktivnost lišća, kore i voćnog metanolnog ekstrakta lovora (sirovi i odmašćeni) na razine lipidne peroksidacije u liposomima induciranim s Fe^{2+}/askorbatnim sustavom i izmjerena spektrofotometrijski pomoću TBA testa. Najznačajnija inhibicija lipidne peroksidacije dobivena je s metanolnim ekstraktima kore lovora (70,6% inhibicije s 1,0 mg sirovog ekstrakta). TLC analiza je pokazala da su ekstrakti lišća, kore i ploda lovora sadržavali

flavonoide, fenolne kiseline i alkaloide. Svi istražni ekstrakti posjedovali su antioksidativnu aktivnost (Simić i suradnici, 2003).

Moguća antiulcerogena aktivnost sjemena vrste *L. nobilis* testirana je na eksperimentalnom (etanol) induciranom ulkusu želuca kod štakora. Rezultati pokazuju antiulcerogenu aktivnost za 20%-tne i 40%-tne vodene ekstrakte, kao i za uljnu frakciju tih sjemenki. Dvadeset posto sirovog ekstrakta djelotvorno je za smanjenje ulceracije izazvane etanolom, maksimalni učinak postiže se dozom od 1 mL/100 g tjelesne težine, dok se kao ulcerogeno sredstvo upotrebljava 0,5 mL/100 g etanola. Kada je količina etanola povećana na 1 mL/100 g 40%-tni ekstrakt je pokazao gastroprotektivnu aktivnost (Afifia i sur., 1997).

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

1.3.1. Flavonoidi

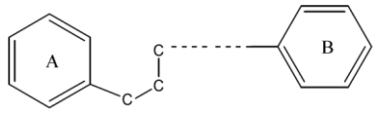
Pojam fenolni spoj obuhvaća širok raspon biljnih tvari koje zajednički imaju aromatski prsten koji nosi jedan ili više hidroksilnih supstituenata. Fenolne tvari obično su topljive u vodi jer se najčešće javljaju u kombinaciji sa šećerom kao glikozidi te se obično nalaze u vakuoli stanice. Iz tog je razloga prilikom analize flavanoida obično bolje ispitati aglikone prisutne u hidroliziranim biljnim ekstraktima, nego složene glikozide koji mogu biti prisutni u izvornom ekstraktu. Fenolni spojevi su aromatski, tako da pokazuju intenzivnu apsorpciju u UV području spektra.

Flavonoidi su velika grupa biljnih sekundarnih metabolita kategoriziranih kao fenolni spojevi, česti u biljkama i obuhvaćaju jarko obojene tvari koje daju boju laticama, listovima i plodovima. Iz biljnog materijala izolirano je preko 4000 različitih flavonoida, a prisutni su od algi do kritosjemenjača. Pronađeni su još u voću, povrću, sjemenkama, raznim čajevima i vinima. Žuta boja (lat. *flavus* = žut) prvih izoliranih spojeva dala je naziv cijeloj skupini. Godine 1930. nobelovac Albert Szent Gyorgyi izolirao je novi spoj iz naranče, vjerujući da se radi o novoj vrsti vitamina te ga nazvao vitamin P. Kasnije se ispostavilo da je riječ o flavonoidu (rutin) te su započela brojna istraživanja kojima se pokušalo izolirati različite pojedinačne flavonoide te utvrditi njihovi mehanizmi djelovanja. Iako su zbog svojih svojstava čovjeku korisni za zdravlje, oni su strane tvari (ksenobiotici) pa se njihov unos u ljudski organizam treba promatrati s oprezom (Hodek, 2012). Flavonoidi su zapravo sekundarni metaboliti, što znači da predstavljaju organske spojeve koji nemaju izravnog utjecaja na rast i razvoj biljaka, ali imaju različite biološke funkcije kao obrambeni i signalni spojevi u reprodukciji, patogenezi i

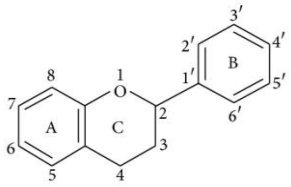
simbiozi (Toplak Galle, 2005). Uključeni su u mehanizme odgovora protiv stresa, uzrokovanog povišenim UV-B zračenjem, infekcijom mikroorganizama ili napadom biljojeda. Također su uključeni u proizvodnju korijenskih čvorova kao sustav za fiksaciju dušika nakon infekcije *Rhizobium* bakterije u različitim mahunarkama. Koriste se i u sistemskoj botanici zbog relativne lakoće njihove izolacije, dobrog očuvanja u herbarijskom materijalu, male količine potrebnog tkiva te zato što su stabilni tijekom vremena, genetski kontrolirani i visoko specifični. U sistemskoj botanici primjenjuju se za utvrđivanje srodstvenih odnosa između blisko srodnih vrsta (Nikolić, 2013).

Struktura

Uobičajeni C_6-C_3-C_6 ugljikov skelet nalazimo u temeljnoj strukturi flavonoida (Slika 4). Ti su spojevi derivati benzopirana, 4H-kromena kojemu benzenski i piranski prsten daju bicikličku strukturu. U većine flavonoida je središnji fragment povezan s kisikom u šesteročlani heterociklički prsten (Slika 5). Ako su aromatski prstenovi međusobno odijeljeni jednim tročlanim mostom, onda su to pravi flavonoidi, a sve ostalo su varijante koje čine različite skupine flavonoida.



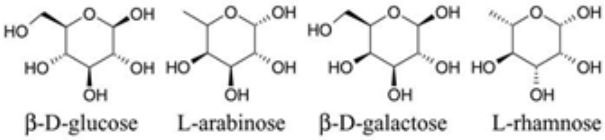
Slika 4. C_6-C_3-C_6 struktura flavonoida.



Slika 5. Heterociklička struktura flavonoida.

Bioraspoloživost, metabolizam i biološka aktivnost flavonoida ovise o konfiguraciji, ukupnom broju hidroksilnih skupina i supstituciji funkcionalnih skupina unutar njihove strukture. Mogu biti hidrofilni i lipofilni (metoksilirani) pa se sukladno tome nalaze u različitim staničnim odjeljcima. Strukturna raznolikost flavonoida rezultat je brojnih modifikacija osnovne skeletne strukture, koje uvjetuju reakcije hidrogenacije, hidroksilacije, O-metilacije hidroksilnih skupina, dimerizacije, sulfatacije i glikozilacije hidroksilnih grupa (O-glikozidi) ili fenolne jezgre (C-glikozidi) (Vladimir-Knežević, 2010). Gotovo 90% flavonoida biljaka nalazi se u obliku glikozida, a građeni su iz dva dijela: aglikonske (nešećerne) i glikonske (šećerne) komponente. Aglikonski dio flavonoida je derivat 2-fenil-dihidrobenzopirana (flavana). Iako šećerni ostatak može biti vezan gotovo u bilo kojem položaju, uglavnom prevladavaju 3- i 7-heterozidi (glikozidi). Od monosaharida su najzastupljeniji D-glukoza, D-galaktoza, L-ramnoza, D-ksiloza i L-arabinoza, a

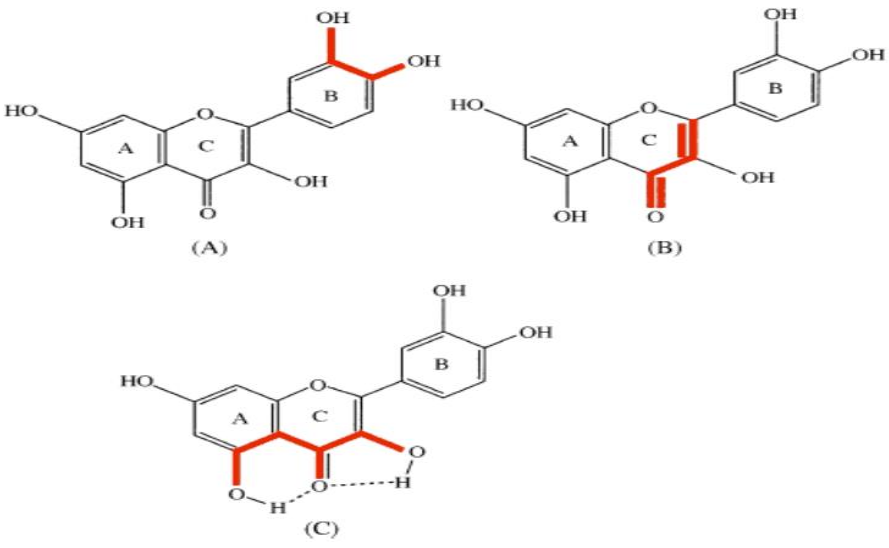
od disaharida rutinoza (L-ramnozido-6-D-glukoza), soforoza (D-glukozido-2-D-glukoza) i sambubioza (D-ksilozido-2-D-glukoza) (Harborne, 1964).



Slika 6. Strukture najzastupljenijih monosaharida u flavonoidima.

U biljkama su najčešće prisutni kao O- ili C-glikozidi, pri čemu je O vezanje učestalije. O-glikozidi imaju šećerne supstituente vezane na hidroksilnu grupu aglikona, obično smještenu na položaju 3 ili 7, dok C-glikozidi imaju šećere vezane za ugljik aglikona, obično 6-C ili 8-C. S obzirom na navedenu strukturnu varijabilnost, postoji iznimno velik broj flavonoida. U biološkim tekućinama (serum, plazma i urin) postoje kao glukuronidni i sulfatni konjugati. U biljkama, lijekovima i prehrambenim proizvodima istraživači su obično zainteresirani za netaknute konjugate (de Rijke i sur., 2006).

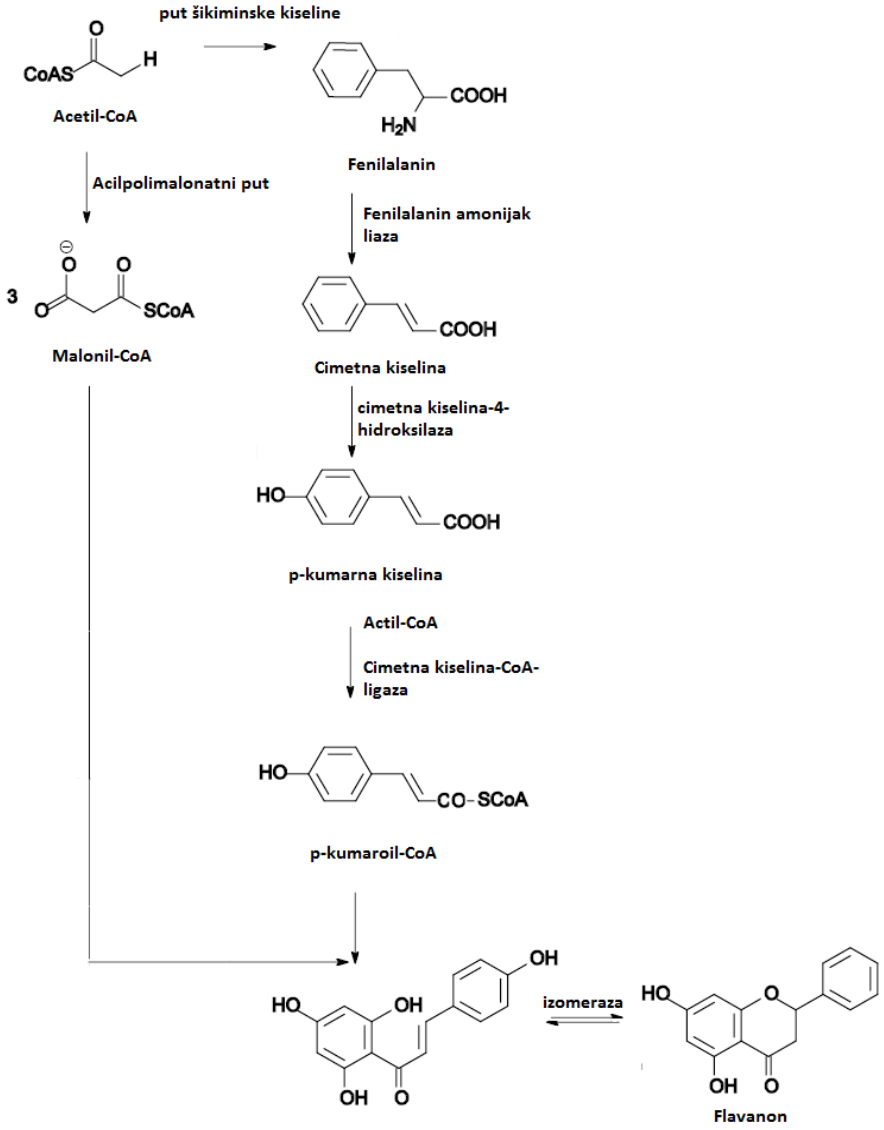
Kapacitet hvatanja slobodnih radikala se kod flavonoida povećava s prisutnošću dvostruke veze između drugog i trećeg ugljikova atoma u kombinaciji s 4-okso-skupinom na prstenu C. Većina istraživanja pokazuje da su flavonoidi kojima nedostaje jedna od tih karakteristika, ili pak obje, slabiji antioksidansi od onih s obje karakteristike. Sposobnost hvatanja SR povećava se povećanjem broja –OH skupina. OH skupine na B prstenu doniraju vodik elektron radikalima te ih stabiliziraju, stvarajući flavonoid-radikal.



Slika 7. Antioksidacijski kapacitet flavonoida.

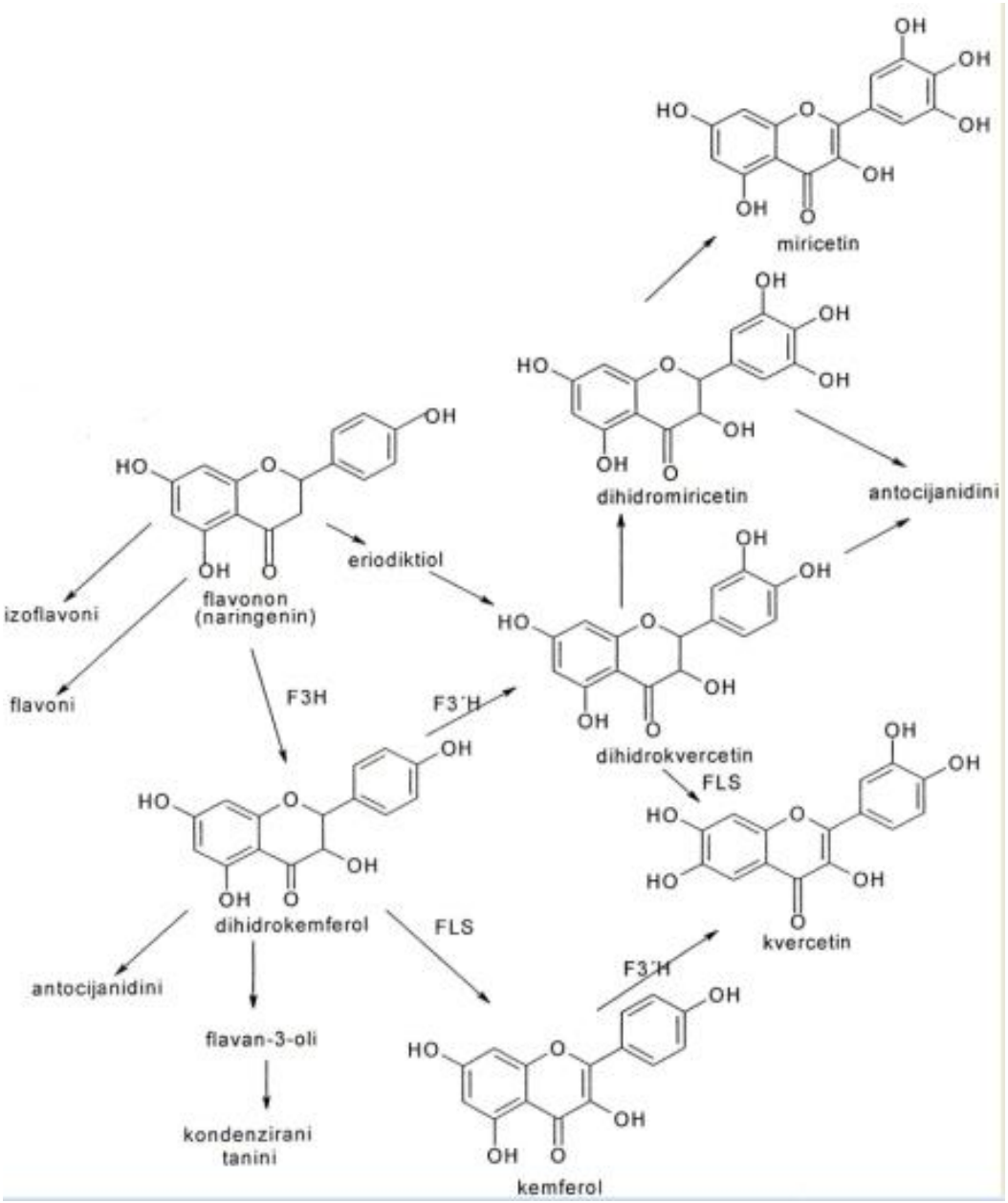
Biosinteza

Flavonoidi su mješovitog biogenog podrijetla. Nastaju kombinacijom puta šikiminske kiseline (koja je bitna u putu nastajanja aromatskih aminokiselina) i acilpolimalonatnog puta. Benzenski prsten B nastaje preko šikiminske kiselina, dok je prsten A acetatnog podrijetla, formiran zatvaranjem poliketidnog lanca. Početni spoj je fenilalanin koji se deaminira do cimetne kiseline, a ona zatim prevodi u p-kumarnu kiselinu. Dodatkom CoA na kiselinu, nastaje p-kumaroil-CoA koji reagira s 3 molekule malonil-CoA dajući naringenin-kalkon. Na kraju dolazi do zatvaranja središnjeg prstena. Sve su reakcije katalizirane određenim enzimima (Vladimir-Knežević, 2010).



Slika 8. Biosinteza flavanona kombinacijom puta šikiminske kisline i acilpolimalonatnog puta.

Naknadne reakcije hidroksilacije, redukcije i metilacije stvaraju različite strukturne varijante flavonoida, a glikozilacija je zadnji korak.

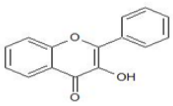
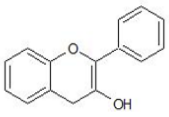
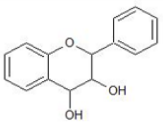
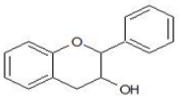


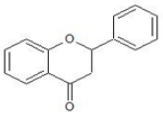
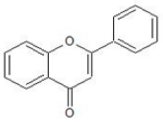
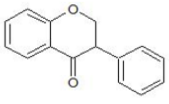
Slika 9. Shematski prikaz biosinteze različitih flavonoidnih spojeva.
(Legenda: CHS- kalkon sintetaza, CHI-kalkon izomeraza, F3H-flavonon 3-hidroksilaza, F3'H-flavonoid 3'-hidroksilaza, FLS-flavonol sintetaza)

Podjela

U skupinu flavonoida spadaju: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanonoli, flavanoli, flavandioli, izoflavoni, biflavonoidi, antocijani, kalkoni i drugi. U prirodi su najviše rasprostranjeni flavoni i flavonoli, a zajedno s flavanonima, antocijanidinima i izoflavonoidima čine više od 80% poznatih flavonoidnih spojeva (Vladimir-Knežević, 2010). Oni spojevi koji sadrže hidroksilnu skupinu u poziciji C-3 pirenskog prstena nazivaju se 3-hidroksiflavonoidi (flavonoli, antocijanidini, leukoantocijanidini, katehini), a oni koji nemaju hidroksilnu skupinu na C-3 su 3-deoksiflavonoidi (flavanoni i flavoni). Daljnja klasifikacija temelji se na postojanju i raspodjeli dodatnih hidroksilnih i metilnih skupina. Izoflavonoidi se razlikuju od ostalih skupina jer je prsten B povezan s prstenom C na položaju C-3, a ne na položaju C-2, kako je uobičajeno. Izdvajaju se antocijanidini i katehini kojima na položaju C-4 nedostaje karbonilna skupina.

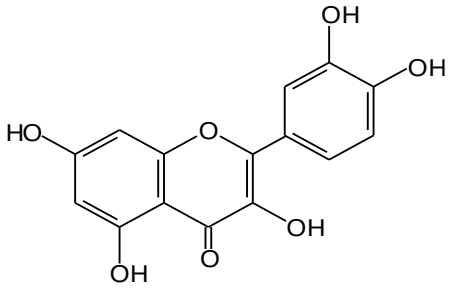
Tablica 3. Strukturna podjela flavonoida.

3 - HIDROKSIFLAVONOIDI	
Flavonoli	
Antocijanidini	
leukoantocijanidini	
Katehini	

3-DEOKSIFLAVONOIDI	
Flavanoni	
Flavoni	
IZOFLAVONOIDI	
Izoflavonoidi	

Flavonoli (3-hidroksiflavoni)

Najčešći aglikon je kvercetin. Najrasprostranjeniji flavonoid je rutin. Šećerni dio molekule, vezan u položaju C3, čini disaharid rutinoza građena od glukoze i ramnoze. Strukturno slični flavonoidi, hiperozid, kvercitrin i izokvercitrin, koji se razlikuju prema vrsti šećera, također su vrlo zastupljeni u biljnim drogama s flavonoidima (Vladimir-Knežević, 2010).



Slika 10. Struktura kvercetina.

Tablica 4. Najzastupljeniji flavonoidi kvercetinskog tipa.

AGLIKON	ŠEĆER	3-O-GLIKOZID
Kvercetin	galaktoza	Hiperozid
Kvercetin	Glukoza	Izokvercitrin
Kvercetin	Ramnoza	Kvercitrin
Kvercetin	Rutinoza	Rutin

Kvercetin je najučestaliji dijetni flavonol, smatra se pretečom i predstavnikom svih flavonoida i to najviše zbog toga što njegova struktura čini osnovni skelet većine ostalih flavonoida. Brojne su eksperimentalne studije pokazale da je kvercetin među najaktivnijim flavonoidima i da mnoge biljke duguju svoju biološku aktivnost upravo njemu. Široko je rasprostranjen u biljnom svijetu i zastupljen u većini namirnica biljnog podrijetla. Najviše je zastupljen u jabukama, bobičastom voću, luku, čajevima, orašastim plodovima, raznim sjemenkama kao i u ginku i gospinoj travi. Vazodilatator je, antihipertenziv i pokazuje antiaterogene učinke te reducira vaskularni *remodeling* povezan s povišenim krvnim tlakom. Nekoliko je studija pokazalo da kvercetin i njegov glukuronirani metabolit (kvercetin 3-O-P-d-glukuronid) inhibiraju proliferaciju, hipertrofiju i migraciju kultiviranih vaskularnih stanica glatkih mišića *in vitro* kada se stimulira serumom ili faktorima rasta. Također je predloženo da kvercetin pokazuje agonističke učinke na PPARγ receptore. Budući da ligandi PPARγ induciraju

preferencijalnu apoptozu kod intimalnog tipa vaskularnog tkiva, pretpostavljeno je da kvercetin može inducirati apoptozu aktivacijom ovih receptora. Osim dobro poznatog antioksidativnog učinka kvercetina, pod određenim uvjetima može se također ponašati kao prooksidans, stvarajući reaktivne kisikove vrste (ROS) (Perez-Vizcaiono i sur., 2006).

Farmakokinetičke studije humane apsorpcije kvercetina nakon oralne doze pokazale su apsorpciju od 24% za aglikon, a 52% za kvercetinske glikozide (Hollman i sur., 1995). Apsorbirani kvercetin se prenosi u jetru vezan na albumin, gdje djelomično podliježe metilaciji, hidroksilaciji ili konjugaciji. Preporučene doze kvercetina kao aglikona u kliničkoj praksi iznose 400-500 mg tri puta dnevno (Manach i sur., 1996).

Biološki učinci i uporaba

Kako je kemijska struktura flavonoida različita, tako se razlikuju i po djelovanju u organizmu. Mnoštvo *in vitro* studija pokazalo je da flavonoidi mogu inhibirati, a ponekad i izazvati veliku raznolikost enzimskih sustava sisavaca (Middleton i Kandaswami, 1994). Neki su od tih enzima uključeni u važne puteve koji reguliraju podjelu stanica i proliferaciju, agregaciju trombocita, detoksikaciju te upalni i imunološki odgovor. Stoga ne čudi da su učinci flavonoida pronađeni u različitim fazama procesa karcinoma, imunološkog sustava i hemostaze u staničnim sustavima i životinjama (Middleton i Kandaswami, 1994).

Epidemiološke studije pokazuju inverznu korelaciju između unosa flavonoida u prehrani i smrtnosti od koronarnih srčanih bolesti, što je dijelom objašnjeno inhibicijom oksidacije lipoproteina niske gustoće i smanjenom agregacijom trombocita (Cook i Samman, 1996).

Flavonoidi djeluju na smanjenje propusnosti kapilara i povećavaju njihovu otpornost. Protuupalno djelovanje posljedica je inhibicije mnogih enzima, poput onih koji sintetiziraju medijatore upale (leukotriene, citokine) i koji pojačavaju aktivnost upalnih stanica (poput tirozin kinaze odgovorne za aktivaciju upalne stanice i 5-lipooksigenaze koja sintetizira leukotriene) (Marković, 2005). Flavonoidi utječu na biosintezu i proinflamatornih i antiinflamatornih citokina te na taj način reguliraju upalne procese.

Flavonoidi su snažni antioksidansi koji odstranjuju slobodne radikale (odgovorne za oštećenje stanica i DNA, ubrzanje procesa starenja, te sudjeluju u razvoju mnogih bolesti) i većinom su netoksični. Od svih flavonoida, flavoni i katehini imaju najveću sposobnost obrane tijela od reaktivnih kisikovih spojeva (Nijveldt i sur., 2001). Kao antioksidansi djeluju na više načina: utječu na status ROS putem enzima ili se uplićući u signalne putove, hvatači su NOS, keliraju i izmjenjuju metalne ione. Mogu međudjelovati i s drugim fiziološkim antioksidansima, kao što su vitamin C ili vitamin E i tako pojačati svoje antioksidacijsko djelovanje. Zbog

sposobnosti zaštite stanica od štete uzrokovane ROS-om, smatra ih se kemopreventivnim specijama. Važno je napomenuti da unatoč korisnim antioksidativnim sposobnostima, istovremeno mogu djelovati kao prooksidansi, osobito kada se primjenjuju u visokim dozama. Osim na kardiovaskularni, pozitivno djeluju i na imunološki sustav (Nikolić, 2013). Neki od njih šire srčane koronarne žile i poboljšavaju rad srca (glog, arnika), ublažavaju grčeve – spazmolitično djelovanje (kamilica), štite jetru i utječu na nastanak žuči – koleretici (osljebad, smilje), pospješuju znojenje – dijaforetici (lipa, končara, bazga), povećavaju količinu urina – diuretici (breza, zečji trn, zlatnica, ljubica). Značajan je i njihov antialergijski učinak te djelovanje protiv upala i skupljanja tekućine u tkivima, tj. edema (jer sprječavaju nastanak tkivnih hormona prostaglandina) (Toplak Galle, 2005).

Flavonoidi mogu pozitivno djelovati i na zdravlje kostiju, posebice na mineralnu gustoću kostiju (što je ranije dokazano na životinjskim studijama).

Flavonoid kvercetin (i u manjoj mjeri metil-katehin) ima posebno važnu ulogu u prevenciji i tretmanu čira želuca. Djeluje tako da promovira sekreciju želučanih sokova, a *in vitro* studije pokazuju da inhibira i rast bakterije *Helicobacter pylori* (www.nutricionizam.com).

Flavonoidi pokazuju i antivirusni učinak. Pokazalo se da antivirusna svojstva flavonoidi postižu zahvaljujući metilnoj skupini na prstenu A. Mogu utjecati na različite stadije replikacijskog ciklusa virusa. Neki flavonoidi utječu na intracelularnu replikaciju virusa, dok drugi inhibiraju infekcijska svojstva virusa. Dokazano je da kvercetin inhibira i infekcije, i replikaciju virusa (Nijveld i sur., 2001). Flavonoidi mogu utjecati na herpes simplex virus, adenovirus, respiratorni sincicijski virus i virus parainfluence (Nijveld i sur., 2001). Različite kombinacije flavona i flavonola pokazale su sinergizam. Tako kemferol i luteolin pokazuju sinergistički učinak protiv herpes simplex virusa (Kumar i Pandey, 2013). U posljednjih dvadeset godina istražuje se antivirusni učinak flavonoida na HIV. No, ta su istraživanja uglavnom provođena u *in vitro* uvjetima i zbog toga nema dokaza o pozitivnom djelovanju flavonoida kod ljudi oboljelih od HIV-a.

Upotreba flavonoida protiv infekcija uzrokovanih bakterijama, gljivicama i protozoama ima dva cilja: uništiti bakterijske i gljivične stanice te suzbiti širenje i učinke bakterijskih toksina (Havsteen, 2002). Upravo su flavonoidima uništeni mnogi bakterijski sojevi s kojima ljudi dolaze u kontakt. Mnogi flavonoidi, kao što su apigenin, galangin, flavonski i flavonolski glikozidi, izoflavoni, flavanoni i kalkon pokazuju snažnu antibakterijsku aktivnost. Bakterije nemaju mnoge enzime, poput lipooksigenaza i cAMP fosfodiesteraza, koji se nalaze u eukariotima i koji su važna mjesta djelovanja flavonoida. Stoga flavonoidi djeluju antibakterijski, inhibirajući ionske kanale i metaloenzime koji su zajednički i bakterijama, i

životinjskim stanicama. Njihovo antimikrobno djelovanje može biti povezano i s njihovom sposobnošću da inaktiviraju mikrobne adhezine, enzime i transportne proteine stanične membrane, stvaranjem kompleksa s proteinima bakterija vodikovim vezama, kovalentnim vezama i hidrofobnim učinkom. Antibakterijski flavonoidi imaju najvjerojatnije višestruke stanične ciljeve, a ne pojedina specifična mjesta djelovanja (Kumar i Pandey, 2013).

Flavonoidi pokazuju i antitumorsko djelovanje zato što utječu na velik broj regulacijskih mehanizama u organizmu, kao što su regulacija rasta, dioba stanica, apoptoza, transkripcija, popravak gena, energija metabolizma, upale i odgovori na stres. Zbog tih različitih učinaka flavonoida na metabolizam tumorskih stanica, teško je racionalizirati njihove učinke na nekoliko osnovnih i specifičnih mehanizama. No, mogu se izdvojiti četiri glavna mehanizama kojima flavonoidi sprječavaju nastanak ili daljnje širenje tumora, a to su: antioksidativna aktivnost, regulacija proteina p53 (koji je bitan u procesu tumorigeneze), inhibicija aktivnosti protein kinaza i apoptoza (Havsteen, 2002). Pokazalo se da flavonoidi smanjuju ekspresiju mutiranog p53 proteina na gotovo nemjerljivu razinu kod raka dojke (Kumar i Pandey, 2013)

Osim brojnih navedenih bioloških učinaka, iscrpine nekih flavonoidnih biljaka rabile su se također za bojanje pamuka, vune, u nekim krajevima i prirodne svile, a također su imale primjenu i u slikarstvu.

Flavonoidi u hrani

Flavonoidi se često pojavljuju u jestivom voću i povrću, ali tip flavonoida razlikuje se u različitim prehrambenim izvorima.

Ljudi normalnom dnevnom prehranom, osobito voćem i povrćem, unose 1-2 g flavonoida dnevno (Kumar i Pandey, 2013).

Najčešći flavonol u prehrani je kvercetin, a u najvećoj koncentraciji prisutan je u crvenom luku. Kvercetin dolazi u raznim glikozidnim oblicima koji se razlikuju ovisno o izvoru koji ga sadrži. U luku nalazimo kvercetin-4'-glukozid i kvercetin-3,4'-glukozid, a u jabukama galaktozide kvercetina. Glikozide kvercetina nalazimo i u bobičastom voću.

U citrusnom voću pojavljuju se gotovo samo flavanoni, gdje su najviše zastupljeni u čvrstom tkivu, a manje koncentracije nađene su i u soku. Hesperidin (hesperetin-7-rutinozid) i narirutin (naringenin-7-rutinozid) su glavni flavonoidi naranča i mandarina, dok je primjerice u grejpu najzastupljeniji naringin (naringenin-7-neohesperozid). Niske koncentracije naringenina možemo pronaći u rajčicama i proizvodima od rajčice.

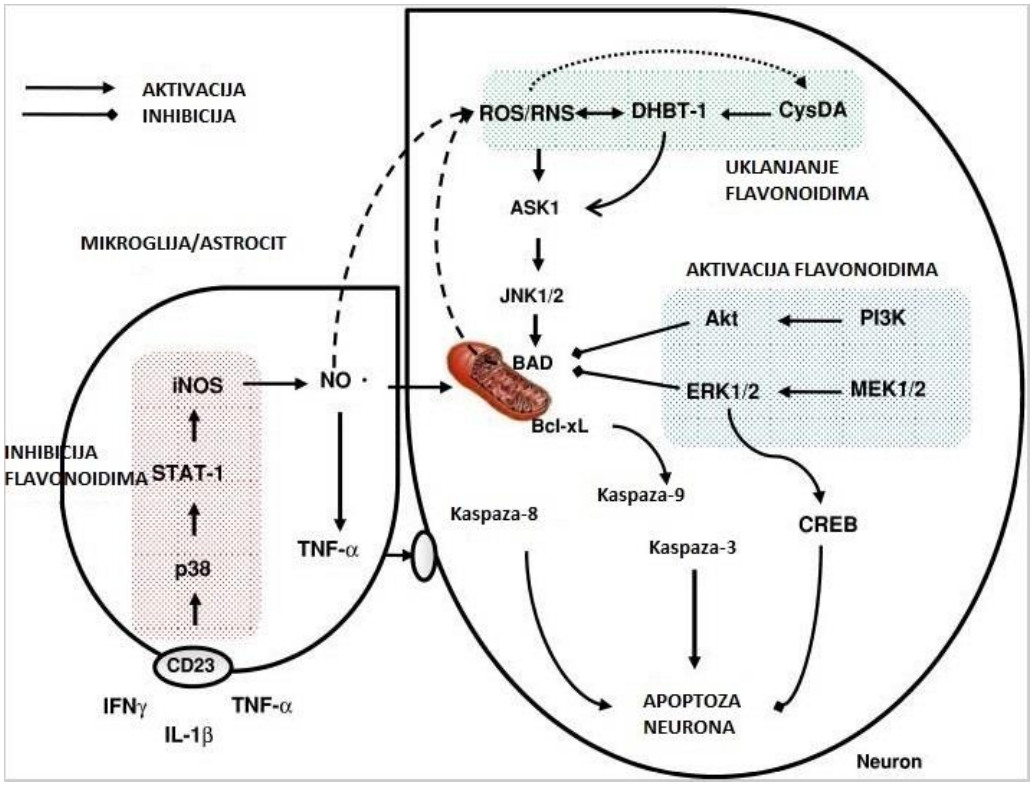
Katehini se pojavljuju kao aglikoni ili su esterificirani s galnom kiselinom. Katehin i epikatehin značajno su zastupljeni u jabukama, kruškama, breskvama i grožđu, a najviše koncentracije katehina nađene su u crnom čaju i crvenom vinu.
Od flavona, kroz hranu unosimo najviše apigenin i luteolin. Glavni izvor su crveni papar i celer.
Antocijanidini i njihovi glikozidi odgovorni su za crvenu, plavu ili ljubičastu boju jestivoga voća i povrća kao što su šljive, jabuke, patlidžan i bobičasto voće. Najznačajniji su pelargonidin, cijanidin, delfinidin i malvidin.
Mahunarke su bogate izoflavonoidima genisteinom i daidzeinom. U najvišim koncentracijama nađeni su u soji i produktima soje, a u manjim koncentracijima i u drugim mahunarkama (Erlund, 2004).
Hranu koja sadrži flavonoide danas se naziva „funkcionalna hrana“. Termin „nutraceutici“, koji dolazi od riječi „nutrition“ i „farmaceutici“, čuva se za onu funkcionalnu hranu koja može osigurati dobrobit za zdravlje ili se koristiti u prevenciji ili tretiranju bolesti (Hodek, 2012).

Flavonoidi i zdravlje mozga

Neuroprotektivna djelovanja dijetetskih flavonoida uključuje niz učinaka unutar mozga, uključujući i potencijal za zaštitu neurona od ozljeda izazvanih neurotoksinima, sposobnost da suzbiju neuroinflamaciju i potencijal za promicanje pamćenja,učenja i kognitivne funkcije. Ovo mnoštvo učinaka podupire dva procesa. Prvo, stupaju u interakciju s važnim kaskadama neuronske signalizacije što dovodi do inhibicije apoptoze izazvane neurotoksičnim vrstama i promicanje neuronalnog preživljavanja i diferencijacije. Te interakcije uključuju selektivne akcije na nizu signalnih kaskada protein kinaze i lipidnih kinaza, a naročito putevi PI3K / Akt i MAP kinaze koji reguliraju transkripcijske čimbenike za preživljavanje i ekspresiju gena. Drugo, oni induciraju periferni i cerebralni protok krvi na način koji može dovesti do indukcije angiogeneze i novog rasta živčanih stanica u hipokampusu. Stoga konzumacija hrane bogate flavonoidima, kao što su bobičasto voće i kakao, tijekom cijelog života ima potencijal ograničavanja neurodegeneracije povezane s različitim neurološkim poremećajima i da spriječi ili preokrene normalna ili abnormalna pogoršanja kognitivnih učinaka (Spencer, 2009).

Nedavno je utvrđeno da je flavanon naringenin pronađen pri visokim koncentracijama u agrumima vrlo učinkovit u smanjenju aktivacije induciranog LPS / IFN-y i rezultirajuće neuronske ozljede, putem inhibicije p38 i STAT-1 i redukcije ekspresije iNOS. Uklanjaju

neurotoksične vrste i induciraju signalne putove za preživljavanje, kao što su ERK1 / 2 i PI3-kinaza / Akt, što dovodi do inhibicije neuronske apoptoze (Slika 11) (Spencer, 2009).



Slika 11. Stanični mehanizmi neuroprotektivnog djelovanja flavonoida.

Zbog intenzivnog interesa za razvoj lijekova sposobnih za poboljšanje funkcije mozga, flavonoidi mogu predstavljati važne molekule prekursora u potrazi za razvojem nove generacije lijekova.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj je ovoga diplomskog rada kvalitativna i kvantitativna analiza bioaktivnih tvari iz skupine flavonoida vrste *Laurus nobilis* L. (lovor) s područja Dalmacije, populacije Brač, Konavle, Korčula, Lastovo, Mljet, Pelješac i Šipan.

Kvalitativna analiza flavonoida provedena je primjenom tankoslojne kromatografije (TLC).

Određivanje flavonoida kvercetinskog aglikona provedeno je spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na stvaranju kompleksa flavonoidnih aglikona s Al^{3+} i mjerenju apsorbancije nastalog kompleksa na 425 nm.

Rezultati provedenih studija predstavljaju osnovu za daljnja istraživanja biološke aktivnosti i fitoterapijskog potencijala hrvatskih populacija lovora te njihovih pripravaka.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Biljni materijal

Biljni materijal (listovi dalmatinskog lovora) prikupljen je tijekom rujna 2014. godine na sedam lokaliteta, a to su: Brač, Konavle, Korčula, Lastovo, Mljet, Pelješac i Šipan.

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



Slika 12. *Laurus nobilis* L.(www.plantea.com.hr).

3.2. Aparatura i kemikalije

Aparatura i pribor:

- UV-Vis spektrofotometar Agilent 8453E (Hewlett Packard, Njemačka); kiveta 1 cm
- ultraljubičasta lampa (UPV Upland U.S.A., UVGL-58)
- TLC ploče s tankim slojem Kieselgela 60 F_{254}
- kromatografska komora i kapilare
- pipete, propipete, menzure, lijevci, čaše, kapalice, epruvete
- lijevci za odjeljivanje i stalci
- odmjerne tikvice, Erlenmayerove tikvice, tikvice s okruglim dnom
- povratna hladila
- vodena kupelj
- plamenik

Kemikalije:

- aceton (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- aluminijev klorid heksahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- etanol (Carlo- Erba, Rodano, Italija)
- etil acetat (Carlo- Erba, Rodano, Italija)
- heksametilentetramin (Zorla, Šabac, Srbija)
- klorovodična kiselina, konc. (Carlo- Erba, Rodano, Italija)
- metanol (Carlo- Erba, Rodano, Italija)
- mravlja kiselina (TTT, Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- natrijev citrat (Gradska ljekarna Zagreb, Hrvatska)
- Naturstoff reagens (NST) (Fluka, Buchs, Švicarska)
- octena kiselina, led. (Panreac, Quimica, Espana)
- Polietilenglikol 4000 (PEG) (Fluka, Buchs, Švicarska)
- Poredbene tvari za TLC (Roth, Karlsruhe, Njemačka)

3.3. Metode i postupci istraživanja

3.3.1. Kvalitativna analiza flavonoida

Tankoslojna kromatografija zasniva se 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).

Postupak:

Biljni su uzorci pripravljeni pojedinačnom ekstrakcijom 0,1 g praškaste droge (listovi lovora) s po 2 mL metanola, tijekom 10 min na vodenoj kupelji zagrijanoj na 60 °C. Ispitivanje prisutnosti flavonoida provedeno je na tankom sloju Kieselgela 60 F_{254} u dvije mobile faze različitih sastava i omjera. Prva mobilna faza sastavljena je od smjese otapala: etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, *V/V*). Druga mobilna faza sastavljena je od smjese otapala: etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, *V/V*). Nakon prskanja Naturstoff-reagensom i 5%-tnom etanolnom otopinom polietilenglikola 4000 (NST/PEG), kromatogrami su promatrani pod UV svjetlom na valnoj duljini od 365 nm (Wagner i sur., 1983).

Naturstoff-reagens priprema se otapanjem 1 g β-etilaminoestera difenilborne kiseline u 100 mL metanola.

Za dobivanje referentnih kromatograma, pripremljene su metanolne otopine standarda (1 mg/mL) kvercetina (aglikon), rutina, kvercitrina, izokvercitrina, naringina.

3.3.2. Kvantitativna analiza flavonoida

Količina ukupnih flavonoida u listovima vrste *Laurus nobilis* L. određena je spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru (1960).

Postupak:

U prah usitnjeni listovi lovora (0,2 g) ekstrahirani su 30 minuta s 20 mL acetona, 2 mL 25%-tne klorovodične kiseline i 1 mL 0,5%-tne otopine heksametilentetramina, zagrijavanjem do vrenja na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Hidrolizat je propušten kroz vatu, a ostatci droge na vati ponovo su ekstrahirani s 20 mL acetona, grijanjem do vrenja 10 minuta. Ta je otopina također propuštena kroz vatu, a prethodno opisana ekstrakcija acetonom ponovljena je još dva puta. Sjedinjeni filtrati razrijeđeni su acetonom do 100,0 mL. Potom je 20,0 mL hidrolizata pomiješano s 20 mL vode te ekstrahirano najprije s 15 mL, a zatim tri puta s po 10 mL etil acetata. Sjedinjene etil acetatne faze isprane su dva puta s po 40 mL vode, propuštene kroz vatu i razrijeđene etil acetatom do 50,0 mL. Po 10,0 mL te otopine preneseno je u dvije odmjerne tikvice od 25,0 mL. U svaku je tikvicu dodano 0,5 mL 0,5%-tne vodene otopine natrijeva citrata. U jednu tikvicu dodano je još 2,0 mL otopine aluminijeva klorida (2 g aluminijeva klorida heksahidrata otopljeno je u 100,0 mL 5%-tne metanolne otopine octene kiseline). Potom su obje tikvice dopunjene do 25,0 mL 5%-tnom metanolnom otopinom octene kiseline. Nakon 45 minuta, izmjerene su apsorbancije otopina s aluminijevim kloridom, u sloju debljine 1 cm, na 425 nm. Slijepi pokus predstavlja prethodno pripremljena otopina bez aluminijeva klorida. Maseni udio flavonoida izračunat je kao kvercetin, prema izrazu:

$$\% = A \times 0{,}772 / b$$

(A = apsorbancija; b = masa droge izražena u g).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati kvalitativne analize flavonoida

Na tanki sloj Kieselgela 60 F_{254} nanesene su standardne otopine flavonoida (aglikon kvercetin te njegov glikozidni oblik naringin i smjesa glikozidnih flavonoida rutina, kvercitrina i izokvercitrina). Analiza se provodila u dva različita razvijača: etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, *V/V*) i etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, *V/V*). Detekcija je provedena prskanjem NST/PEG reagensom, nakon čega su kromatogrami vizualizirani pod UV svjetlom na 365 nm.
Na kromatogramima su uočene fluorescirajuće narančaste zone karakteristične za flavonoide i plavozelene zone fenolnih kiselina i/ili iridoida.

Mobilna faza 1

Na kromatogramu s razvijačem etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, *V/V*) vidljivo je 11 odijeljenih zona različitih boja i jačeg ili slabijeg intenziteta fluorescencije (Slika 13a i 13b).

Na temelju R_f vrijednosti i boje razvijenih kromatografskih zona, može se ustvrditi sljedeće:

- kvercetin se nalazi u svim uzorcima, s tim da je intenzitet fluorescencije zone koja odgovara uzorku s Brača najmanji, a najveći za uzorak s Lastova;

- rutin je također dokazan u svim uzorcima, a najjači intenzitet fluorescencije je vidljiv u uzorcima s Korčule i Lastova, srednje jaki intenzitet pokazuju uzorci s Mljeta, Pelješca i Šipana, a najmanji uzorci populacije Brač i Konavle;

- izokvercitrin se nalazio u svim uzorcima, ali najjači intenzitet fluorescencije pokazuju uzorci s Korčule i Lastova, najslabiji s Brača te populacija Konavle, dok ostali fluoresciraju podjednako;

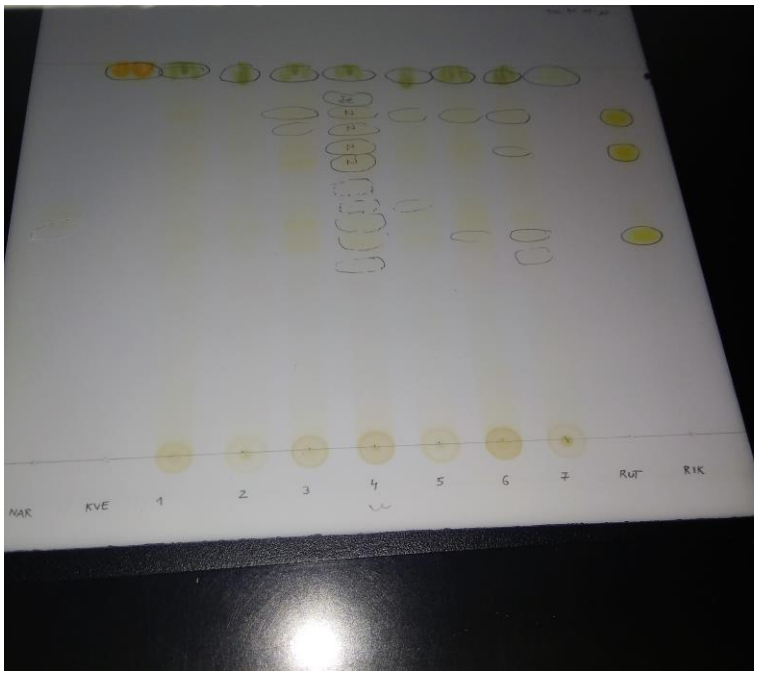
- kvercitrin je detektiran u svim uzorcima, ali je najveći intenzitet fluorescencije uočen kod uzoraka s Lastova i Korčule, dok je intenzitet fluorescencije svih ostalih uzoraka podjednak;

- naringin pokazuje najači intenzitet flourescencije za populacije Korčula i Lastovo.

a)



b)



Slika 13a i 13b. Kromatogram standardnih otopina flavonoida i metanolnih ekstrakata lista lovora u razvijaču etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, *V/V*). Adsorbens je Kieselgel 60 F_{254}, a detekcija je provedena NST/PEG reagensom i UV svjetlom na 365 nm.

Legenda: NAR - naringin, KVE - kvercetin, 1 - populacija Brač, 2 - populacija Konavle, 3 - populacija Korčula, 4 - populacija Lastovo, 5 - populacija Mljet, 6 - populacija Pelješac, 7 - populacija Šipan, RUT - rutin, RIK - smjesa rutina, izokvercitrina i kvercitrina (od najkraće do najdalje putujuće zone).

Tablica 5. R_f vrijednosti odijeljenih sastavnica metanolnih ekstrakata listova lovora i standardnih otopina flavonoida dobivene u razvijaču etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, *V/V*). Legenda je analogna onoj na Slici 13.

MF(100:11:11:27, V/V) b=14,4 cm

14,4	NAR		KVE		1		2		3		4		5		6		7		RUT		RIK	
	a/cm	Rf	a/cm	Rf	a/cm	Rf	a/cm	Rf	a/cm	Rf	a/cm	Rf	a/cm	Rf	a/cm	Rf	a/cm	Rf	a/cm	Rf	a/cm	Rf
1	/	/	/	/	6,30	0,44	6,30	0,44	6,30	0,44	6,30	0,44	6,30	0,44	6,30	0,44	6,30	0,44	/	/	/	/
2	/	/	/	/	7,00	0,49	7,00	0,49	7,00	0,49	7,00	0,49	7,00	0,49	7,00	0,49	7,00	0,49	/	/	7,00	0,49
3	7,50	0,52	/	/	7,70	0,53	7,70	0,53	7,70	0,53	7,70	0,53	7,70	0,53	7,70	0,53	7,70	0,49	/	/	/	/
4	/	/	/	/	8,30	0,58	8,30	0,58	8,30	0,58	8,30	0,58	8,30	0,58	8,30	0,58	8,30	0,58	/	/	/	/
5	/	/	/	/	9,00	0,63	9,00	0,63	9,00	0,63	9,00	0,63	9,00	0,63	9,00	0,63	9,00	0,63	/	/	/	/
6	/	/	/	/	10,10	0,70	10,10	0,70	10,10	0,70	10,10	0,70	10,10	0,70	10,10	0,70	10,10	0,70	/	/	10,40	0,72
7	/	/	/	/	10,80	0,75	10,80	0,75	10,80	0,75	10,80	0,75	10,80	0,75	10,80	0,75	10,80	0,75	/	/	/	/
8	/	/	/	/	11,50	0,80	11,50	0,80	11,50	0,80	11,50	0,80	11,50	0,80	11,50	0,80	11,50	0,80	/	/	/	/
9	/	/	/	/	12,20	0,85	12,20	0,85	12,20	0,85	12,20	0,85	12,20	0,85	12,20	0,85	12,20	0,85	/	/	11,90	0,83
10	/	/	/	/	12,90	0,90	12,90	0,90	12,90	0,90	12,90	0,90	12,90	0,90	12,90	0,90	12,90	0,90	/	/	/	/
11	/	/	14,00	0,97	14,00	0,97	14,00	0,97	14,00	0,97	14,00	0,97	13,80	0,96	13,90	0,97	13,80	0,96	13,80	0,96	/	/

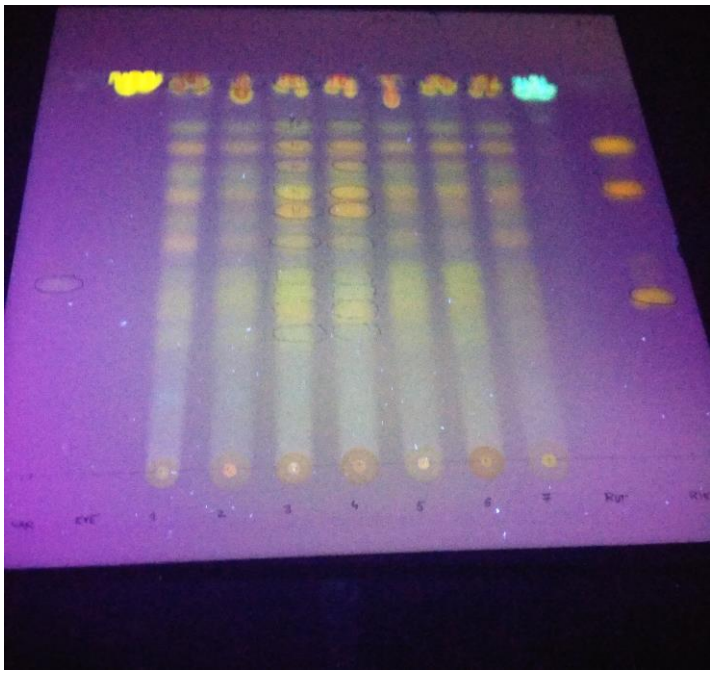
Mobilna faza 2

Na kromatogramu s razvijačem etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, *V/V*) vidljivo je 11 odijeljenih zona različitih boja i jačeg ili slabijeg intenziteta fluorescencije (Slika 14a i 14b).

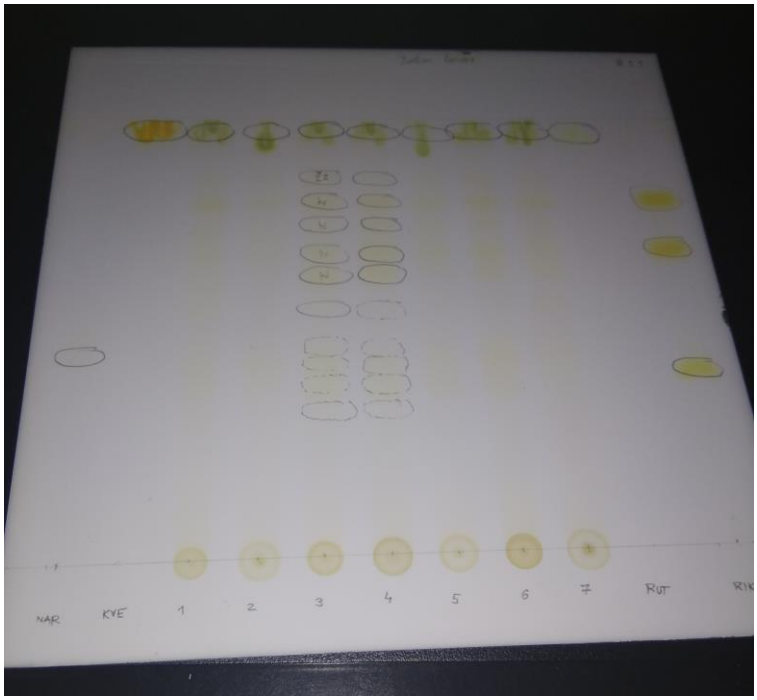
Na temelju R_f vrijednosti i boja razvijenih kromatografskih zona, može se ustvrditi sljedeće:

- kvercetin je detektiran u svim uzorcima s podjednakim intenzitetom fluorescencije;
- rutin se nalazi u svim uzorcima, najjači intenzite fluorescencije za uzorak Korčula;
- izokvercitrin je dokazan u svim uzorcima, ali najjači intenzitet fluorescencije pokazuju uzorci s Lastova i Korčule, a ostali fluoresciraju podjednako;
- kvercitrin se nalazio u svim uzorcima, ali je najveći intenzitet fluorescencije vidljiv kod uzoraka s Lastova, zatim Korčule, dok svi ostali uzorci podjednako fluoresciraju;
- prisutnost naringina je pronađena u svim uzorcima s najačim intenzitetom fluorescencije za uzorak Korčula.

a)



b)



Slika 14a i 14b. Kromatogram standardnih otopina flavonoida i metanolnih ekstrakata lista lovora u razvijaču etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, *V/V*). Adsorbens je Kieselgel 60 $F_{254,}$ a detekcija je provedena NST/PEG reagensom i UV svjetlom na 365 nm.

Legenda: NAR - naringin, KVE - kvercetin, 1 - populacija Brač, 2 - populacija Konavle, 3 - populacija Korčula, 4 - populacija Lastovo, 5 - populacija Mljet, 6 - populacija Pelješac, 7 - populacija Šipan, RUT - rutin, RIK - smjesa rutina, izokvercitrina i kvercitrina (od najkraće do najdalje putujuće zone).

Tablica 6. R_f vrijednosti odijeljenih sastavnica metanolnih ekstrakata listova lovora i standardnih otopina flavonoida dobivene u razvijaču etil acetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, *V/V*). Legenda je analogna onoj na Slici 14.

	MF (8:1:1, V/V)				b=14,5																	
14,5	NAR		KVE		1		2		3		4		5		6		7		RUT		RIK	
	a/cm	Rf	a/cm	Rf	a/cm	Rf	a/cm	Rf	a/cm	Rf	a/cm	Rf	a/cm	Rf	a/cm	Rf	a/cm	Rf	a/cm	Rf	a/cm	Rf
1	/	/	/	/	4,10	0,28	4,10	0,28	4,10	0,28	4,10	0,28	4,10	0,28	4,10	0,28	4,10	0,28	/	/	/	/
2	/	/	/	/	4,90	0,34	4,90	0,34	4,90	0,34	4,90	0,34	4,90	0,34	4,90	0,34	4,90	0,34	/	/	5,20	0,36
3	5,90	0,41	/	/	5,60	0,39	5,60	0,39	5,60	0,39	5,60	0,39	5,60	0,39	5,60	0,39	5,60	0,39	/	/	/	/
4	/	/	/	/	6,10	0,42	6,10	0,42	6,10	0,42	6,10	0,42	6,10	0,42	6,10	0,42	6,10	0,42	/	/	/	/
5	/	/	/	/	7,40	0,51	7,40	0,51	7,40	0,51	7,40	0,51	7,40	0,51	7,40	0,51	7,40	0,51	/	/	/	/
6	/	/	/	/	8,50	0,59	8,50	0,59	8,50	0,59	8,50	0,59	8,50	0,59	8,50	0,59	8,50	0,59	/	/	/	/
7	/	/	/	/	9,30	0,64	9,30	0,64	9,30	0,64	9,30	0,64	9,30	0,64	9,30	0,64	9,30	0,64	/	/	9,40	0,65
8	/	/	/	/	10,40	0,72	10,40	0,72	10,40	0,72	10,40	0,72	10,40	0,72	10,40	0,72	10,40	0,72	/	/	/	/
9	/	/	/	/	11,20	0,77	11,20	0,77	11,20	0,77	11,20	0,77	11,20	0,77	11,20	0,77	11,20	0,77	/	/	11,20	0,77
10	/	/	/	/	12,20	0,84	12,20	0,84	12,20	0,84	12,20	0,84	12,20	0,84	12,20	0,84	12,20	0,84	/	/	/	/
11	/	/	14,00	0,97	14,00	0,97	14,00	0,97	14,00	0,97	14,00	0,97	14,00	0,97	14,00	0,97	14,00	0,97	14,00	0,97	/	/

4.2. Rezultati kvantitavne analize flavonoida

Određivanje sadržaja flavonoida u listovima lovora provedeno je spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru (poglavlje 3.3.1.) koja se temelji na stvaranju kompleksa flavonoidnih aglikona s Al^{3+}. Tvorbi kompleksa prethodi kisela hidroliza flavonoidnih glikozida kako bi se omogućilo oslobađanje aglikona.

Izmjerene su apsorbancije nastalih kompleksa na valnim duljinama od 422 nm (apsorpcijski maksimum) i 425 nm (prema metodi) te je izračunat udio flavonoida, izražen kao kvercetin, prema formuli:

$$\% = A \times 0{,}772 \,/\, \text{masa droge (g)}$$

Slijepi pokus su predstavljale prethodno pripremljene otopine bez aluminijeva klorida.

Pripravljeni su ekstrakti za svaku ispitivanu populaciju lovora, iz kojih su potom pripremljeni uzorci za spektrofotometrijsko određivanje flavonoida. Za svaki je uzorak po tri puta mjerena apsorbancija na obje valne duljine. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonoida u listovima lovora prikazani su u Tablici 7.

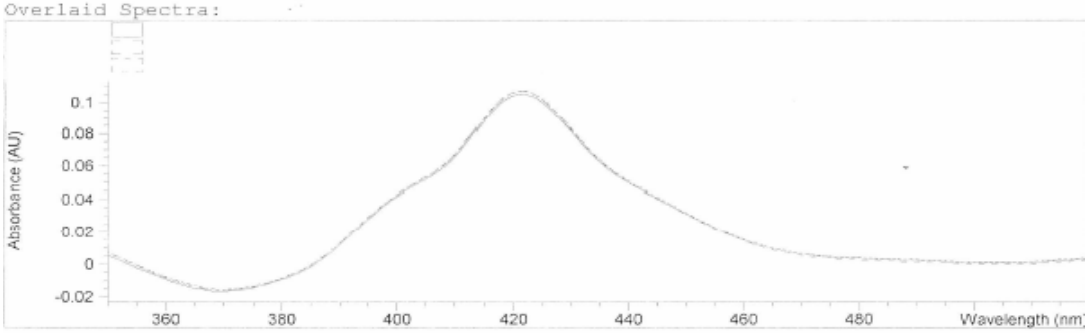
Tablica 7. Sadržaj flavonoida u ekstraktima listova lovora s područja Dalmacije.

UKUPNI FLAVONOIDI (TF)			A(425nm)						
Br. uz.	Uzorak	Odvaga (g)	A1	A2	A3	average	stdev	RSD	%
1	BRAČ	0,2016	0,125	0,132	0,144	0,134	0,010	7,19	0,51
2	KONAVLE	0,2012	0,100	0,102	0,101	0,101	0,001	0,99	0,39
3	KORČULA	0,2018	0,150	0,151	0,153	0,151	0,002	1,01	0,58
4	LASTOVO	0,2006	0,158	0,161	0,159	0,159	0,002	0,96	0,61
5	MLJET	0,2014	0,121	0,121	0,123	0,122	0,001	0,95	0,47
6	PELJEŠAC	0,2007	0,086	0,089	0,085	0,087	0,002	2,40	0,33
7	ŠIPAN	0,2035	0,131	0,136	0,131	0,133	0,003	2,18	0,50

UKUPNI FLAVONOIDI (TF)			A(422nm)						
Br. uz.	Uzorak	Odvaga (g)	A1	A2	A3	average	stdev	RSD	%
1	BRAČ	0,2016	0,128	0,135	0,147	0,137	0,010	7,03	0,52
2	KONAVLE	0,2012	0,105	0,107	0,107	0,106	0,001	1,09	0,41
3	KORČULA	0,2018	0,152	0,153	0,155	0,153	0,002	1,00	0,59
4	LASTOVO	0,2006	0,160	0,164	0,162	0,162	0,002	1,23	0,62
5	MLJET	0,2014	0,124	0,124	0,127	0,125	0,002	1,39	0,48
6	PELJEŠAC	0,2007	0,089	0,092	0,088	0,090	0,002	2,32	0,34
7	ŠIPAN	0,2035	0,137	0,141	0,137	0,138	0,002	1,67	0,52

Method file : FLAVON.M (modified) Last update: Date 6/29/17 Time 1:06:32 PM
Information : Default Method
Data File : C:\MP\F2SD.SD Created : 4/6/17 12:24:50

Overlaid Spectra:

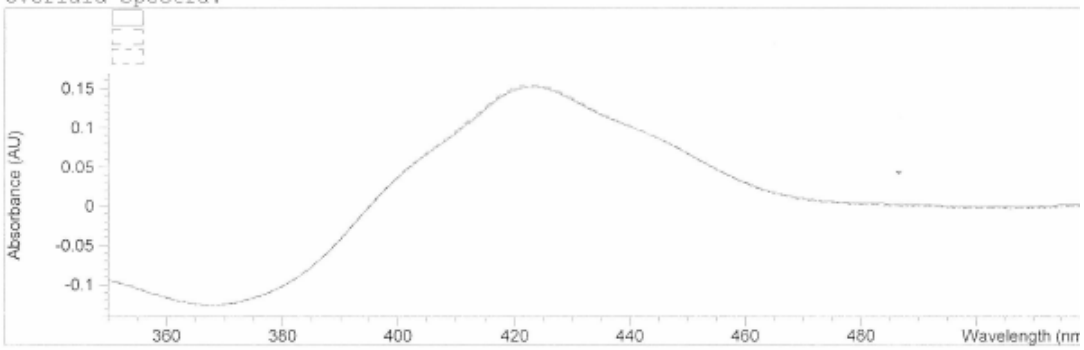


#	Name	Abs<425nm>	Abs<422nm>
1		9.9718E-2	0.10504
2		0.10184	0.10688
3		0.10141	0.10706

Slika 15. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije flavonoida u ekstraktu lista lovora, populacija Konavle.

Method file : FLAVON.M (modified) Last update: Date 6/29/17 Time 1:06:32 PM
Information : Default Method
Data File : C:\MP\F3SD.SD Created : 4/6/17 12:31:02

Overlaid Spectra:

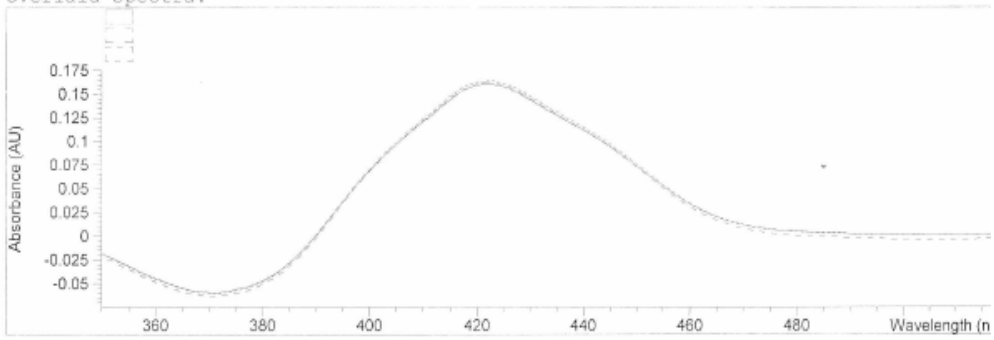


#	Name	Abs<425nm>	Abs<422nm>
1		0.15035	0.15156
2		0.15138	0.15275
3		0.15316	0.15461

Slika 16. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije flavonoida u ekstraktu lista lovora s Korčule.

Method file : FLAVON.M (modified) Last update: Date 6/29/17 Time 1:06:32 PM
Information : Default Method
Data File : C:\MP\F4SD.SD Created : 4/6/17 12:36:37

Overlaid Spectra:

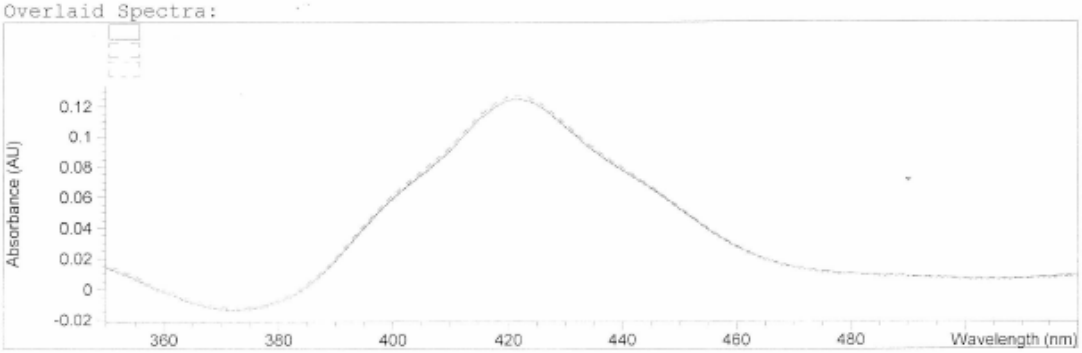


#	Name	Abs<425nm>	Abs<422nm>
1		0.15780	0.16043
2		0.16115	0.16383
3		0.15895	0.16187

Slika 17. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije flavonoida u ekstraktu lista lovora s Lastova.

Method file : FLAVON.M (modified) Last update: Date 6/29/17 Time 1:06:32 PM
Information : Default Method
Data File : C:\MP\F5SD.SD Created : 4/6/17 12:44:07

Overlaid Spectra:

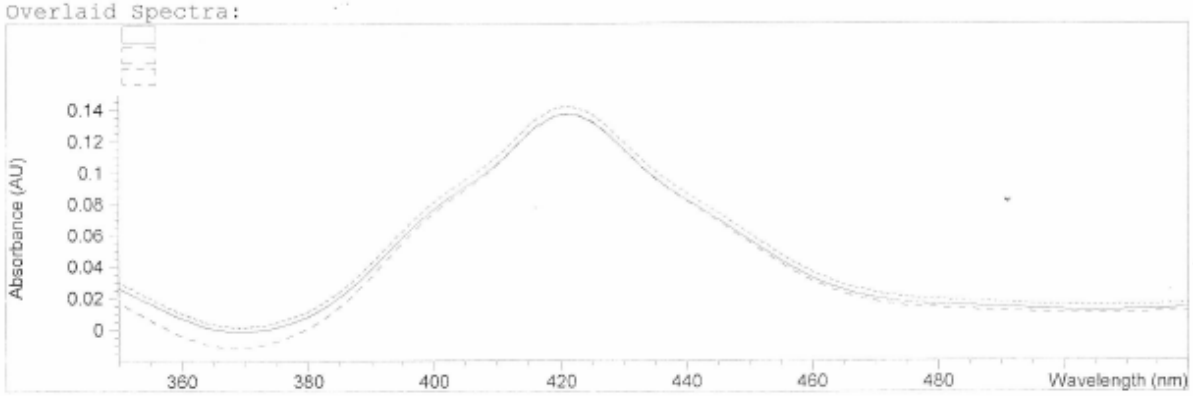


#	Name	Abs<425nm>	Abs<422nm>
1		0.12101	0.12443
2		0.12081	0.12441
3		0.12314	0.12684

Slika 18. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije flavonoida u ekstraktu lista lovora s Mljeta.

Method file : FLAVON.M (modified) Last update: Date 6/29/17 Time 1:06:32 PM
Information : Default Method
Data File : C:\MP\F7SD.SD Created : 4/6/17 12:56:04

Overlaid Spectra:

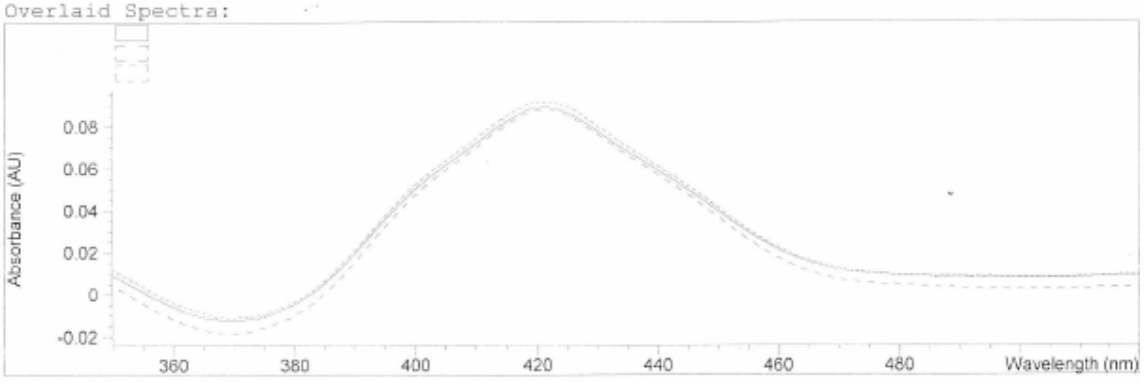


#	Name	Abs<425nm>	Abs<422nm>
1		0.13149	0.13661
2		0.13609	0.14131
3		0.13186	0.13712

Slika 19. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije flavonoida u ekstraktu lista lovora sa Šipana.

Method file : FLAVON.M (modified) Last update: Date 6/29/17 Time 1:06:32 PM
Information : Default Method
Data File : C:\MP\F6SD.SD Created : 4/6/17 12:49:48

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<425nm>	Abs<422nm>
1		8.6171E-2	8.8861E-2
2		8.8980E-2	9.1509E-2
3		8.5038E-2	8.7594E-2

Slika 20. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije flavonoida u ekstraktu lista lovora s Pelješca.

Najveći sadržaj flavonoida zabilježen je u listovima lovora prikupljenima na otoku Lastovu i iznosio je 0,61±0,002% (425 nm) te 0,62±0,002% (422 nm), dok je najmanji sadržaj flavonoida određen u listovima lovora s Pelješca, a iznosio je 0,33±0,002% (425 nm) i 0,34±0,002% (422 nm). Znatnu količinu flavonoida sadržavao je i uzorak populacije Korčula, (0,58±0,002%). Listovi lovora prikupljeni na Braču, Šipanu, Mljetu te u Konavlima sadržavali su podjednake količine flavonoida (oko 0,5%).

5. ZAKLJUČCI

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je djelomična fitokemijska karakterizacija vrste *Laurus nobilis* L. (lovor), koja je uključivala kvalitativnu i kvantitativnu analizu flavonoida iz listova lovora s područja Dalmacije (populacije Brač, Konavle, Korčula, Lastovo, Mljet, Pelješac i Šipan).

Primjenom metode tankoslojne kromatografije (TLC) dokazana je prisutnost flavonoidnih spojeva u metanolnim ekstraktima listova svih analiziranih populacija lovora. Ispitivanje je provedeno na tankom sloju Kieselgela 60 F_{254} u dva različita razvijača, a detekcija je provedena prskanjem kromatograma NST/PEG reagensom i promatranjem razvijenih zona pod UV svjetlom na 365 nm. U razvijaču 1 (etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda, 100:11:11:27, *V/V*) detektirano je 7 narančastih kromatografskih zona koje odgovaraju flavonoidnim sastavnicama i 4 plavozelene zone koje odgovaraju fenolnim kiselinama i/ili iridoidima. Na temelju R_f vrijednosti i boje detektiranih kromatografskih zona, utvrđeno je da se kvercetin, rutin, izokvercitrin i kvercitrin nalaze u svim ispitanim metanolnim ektraktima lista lovora. Najjači intenzitet zona svih prisutnih flavonoida uočen je za uzorke s Lastova i Korčule, a najslabiji kod uzorka Brač i Konavle. U mobilnoj fazi 2 (etil acetat – mravlja kiselina – voda, 8:1:1, *V/V*) detektirano je također 7 narančastih kromatografskih zona koje odgovaraju flavonoidnim sastavnicama i 4 plavozelene zone koje odgovaraju fenolnim kiselinama i/ili iridoidima. Na temelju R_f vrijednosti i boje detektiranih kromatografskih zona, utvrđeni su rezultati analogni onima koji su dobiveni s razvijačem etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, *V/V*).

Kvantitativna analiza flavonoida lista lovora provedena je spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na stvaranju kompleksa flavonoidnih aglikona a Al^{3+} i mjerenjem apsorbancije na dvije valne duljine: 422 nm (maksimum apsorpcije) i 425 nm (izvorna metoda). Najveći sadržaj flavonoida zabilježen je u listovima lovora prikupljenima na otoku Lastovu i iznosio je 0,61±0,002% (425 nm) te 0,62±0,002% (422 nm), dok je najmanji udio flavonoida određen u listovima lovora s Pelješca, a iznosio je 0,33±0,002% (425 nm) i 0,34±0,002% (422 nm). Znatan sadržaj flavonoida određen je također za uzorak Korčula (0,58±0,002%), dok su listovi lovora prikupljeni na Braču, Šipanu, Mljetu te populacija Konavle sadržavali podjednake količine flavonoida, oko 0,5%.

Rezultati dobiveni u okviru ovoga rada pridonose dosadašnjim znanjima o hrvatskim populacijama lovora s obzirom na sadržaj flavonoida te upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu lovora.

6. LITERATURA

Afifia F, Khalia E, Tamimib S, Disic A. Evaluation of the gastroprotective effect of Laurus nobilis seeds on ethanol induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol,* 1997, 58(1), 9-14.

Ašić S. Ljekovito bilje. Rijeka, Dušević i Kršovnik d.o.o., 1999, str. 75.

Basak S. S, Candan F. Effect of Laurus nobilis L. essential oil and its main components on alfa-glucosidase and reactive oxygen species scavenging activity. *Iran J pharm Res*, 2013, 12(2), 367-379.

De Rijke E, Out P, Niessen M. A. W, Ariese F, Gooijer C, Brinkman A. Th. U. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J Chromatogr A*, 2006, 1112(1), 31-63.

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 Chem*, 2014, 156, 339-346.

Dudaš S, Venier L. Varijabilnost sadrzaja eteričnog ulja u listovima lovora Laurus nobilis L. *Glasnik zaštite bilja*, 2009, 32(6), 46-54.

Erlund I. Review of flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavibility and epidemiology. *Nutr Res*, 2004, 24, 851-874.

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.

Flavonoidi, http://nutricionizam.com, pristupljeno 20.8.2017.

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

Grlić LJ. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. Zagreb, August Cesarac Zagreb, 1986, str. 118-119.

Harborne JB, Biochemistry of Phenolic Compounds. Academic press, London-New York, 1964, str. 83, 136, 149.

Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther*, 2002, 96(2-3), 67-202.

Hodek P. Metabolism of drugs and other xenobiotics. Weinheim, Wiley-VCH Verlag, 2012, str. 543-575.

Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr*, 1995, 62(6), 1276-1282.

Houdret J.Ljekovito bilje uzgoj i uporaba: cjelovit i praktičan vodič za uspješan uzgoj bilja i sveobuhvatan popis bilja. Rijeka, Dušević i Kršovnik d.o.o., 2002, str 169.

Julianti E, Jang KH, Lee S, Lee D, Mar W, Oh KB, Shin J. Sesquiterpenes from the leaves of Laurus nobilis L. *Phytochemistry*, 2012, 80, 70-76.

Kalođera Z. Farmakognozija II. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2010, str. 75-79.

Kolega S. Određivanje vanjskog i unutarnjeg zagađenja lovora (*Laurus nobilis* L.) olovom. Diplomski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 1993, str. 10-11.

Kumar S, Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *ScientificWorldJournal*, 2013, 1-16.

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

Lauraceae, http://www.theplantlist.org, pristupljeno 15.8.2017.

Laurales,http:// www.britannica.com pristupljeno 12.8.2016.

Laurus nobilis L., http://www.botanical.com, pristupljeno 12.8.2017.

Lee T, Lee S, Kim K. H, Oh K. B, 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.

Macchioni F, Perrucci S, Cioni P, Morelli I, Castilho P, Cecchi F. Composition and acaricidal activity of Laurus novocanariensis and Laurus nobilis essential oil against Psoraptes cuniculi. *J Essent Oil Res*, 2006, 18(1), 111-114.

Maleš Ž. Izolacija i identifikacija flavonoida drače *Paliurus spina-christi* Mill., Magistarski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 1990.

Maleš Ž. Predavanja s kolegija Farmaceutska botanika, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2010.

Manach C, Regerat F, Texier O, Agullo G, Demigne C, Remesy C. Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutr Res*, 1996, 16(3), 517-544.

Marković S. Fitoaromaterapija: monografije esencijalnih ulja i ljekovitih biljaka, temelji fitoaromaterapije. Zagreb, Centar Cedrus, 2005, str. 78, 286-287, 351-352.

Mohamed I, Shuid A, Borhanuddin B, Fozi N. The Application of Phytomedicine in Modern Drug Development. *The Internet Journal of Herbal and Plant Medicine,* 2012, 1(2).

Muñiz-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, V20, I5, 1149-1154.

Nijveldt RJ, von Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leewen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 2001, 74(4), 418-425.

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

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.

Patrakar R, Mansuriya M, Patil P. Phytochemical and Pharmacological Review on Laurus Nobilis. *Int J Pharm Chem Biol Sci*, 2012, 595-602.

Peixoto L. R, Rosalen P. L, Ferreira G. L. S, Freires I. A, de Carvalho F. G, Castellano L. R, de Castro R. D. (2017). Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of Laurus nobilis Linnaeus essential oil against Candida spp. *Arch Oral Biol*, 2017, 73, 179-185.

Perez-Vizcaino F, Bishop-Bailley D, Lodi F, Duarte J, Cogolludo A, Moreno L, Bosca L, Mitchell J, Warner T. The flavonoid quercetin induces apoptosis and inhibits JNK activation in intimal vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 919–925.

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

Phytotherapy, 2013., https://www.britannica.com, pristupljeno 20. 6. 2017.
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.

Renner SS. Circumscription and phylogeny of the Laurales: Evidence from molecular and morphological dana. *Am J Bot*, 1999, 86(9), 1301-1315.

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

Spencer J. Flavonoids and brain health: multiple effects underpinned by common mechanisms. *Genes Nutr*. 2009, 4(4), 243–250.

Toplak GK. Domaće ljekovito bilje. Mozaik knjiga, Zagreb, 2005, str. 18-19.

Vinha AF, Guido LF, Costa AS, Alves RC, Oliveira MB. Monomeric and oligomeric flavan-3-ols and antioxidant activity of leaves from different *Laurus* sp. *Food Funct*, 2015, 6(6), 1944-1949.

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.

Živković R. Prirodno liječenje probavnih organa ljekovitim biljem i dijetom. Zagreb, Školska knjiga, 1997, str. 25-29, 255-256.

7. SAŽETAK

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza flavonoida vrste *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) s područja Dalmacije (populacije: Brač, Konavle, Korčula, Lastovo, Mljet, Peljašac i Šipan). Primjenom tankoslojne kromatografije potvrđena je prisutnost kvercetina, rutina, izokvercitrina, kvercitrina i naringina u svim ispitanim metanolnim ekstraktima lista lovora. Kvantitativna analiza flavonoida provedena je spektrofotometrijski. Sadržaj analiziranih flavonoida lovora iznosio je od 0,33% (Pelješac) do 0,62% (Lastovo). Provedena kvalitativna i kvantitatvina analiza predstavlja prilog znanstvenom istraživanju vrste *Laurus nobilis* L. i upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu lovora, posebice u odnosu na sadržaj bioaktivnih flavonoidnih tvari.

SUMMARY

In this work, qualitative and quantitative analysis of flavonoids of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) from Dalmatian region was carried out. The thin layer chromatography revealed the presence of quercetin, rutin, isoquercitrin, quercitrin and naringin in all analyzed methanolic extracts of bay leaves (populations: Brač, Konavle, Korčula, Lastovo, Mljet, Pelješac, and Šipan). Quantitative analysis of flavonoids was carried out using the spectrophotometric method. The contents of analyzed flavonoids from laurel leaves varied from 0.33% (Pelješac) to 0.62% (Lastovo). Conducted qualitative and quantitative analysis is a contribution to the scientific study of species *Laurus nobilis* L. and completes the existing knowledge about phytotherapeutic potential of laurel, especially in relation to the content of bioactive flavonoid substances.

Temeljna dokumetacijska 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 FLAVONOIDA VRSTE *LAURUS NOBILIS* L. (LAURACEAE) S PODRUČJA DALMACIJE

Matea Perica

SAŽETAK

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza flavonoida vrste *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) s područja Dalmacije (populacije: Brač, Konavle, Korčula, Lastovo, Mljet, Peljašac i Šipan). Primjenom tankoslojne kromatografije potvrđena je prisutnost kvercetina, rutina, izokvercitrina, kvercitrina i naringina u svim ispitanim metanolnim ekstraktima lista lovora. Kvantitativna analiza flavonoida provedena je spektrofotometrijski. Sadržaj analiziranih flavonoida lovora iznosio je od 0,33% (Pelješac) do 0,62% (Lastovo). Provedena kvalitativna i kvantitatvina analiza predstavlja prilog znanstvenom istraživanju vrste *Laurus nobilis* L. i upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu lovora, posebice u odnosu na sadržaj bioaktivnih flavonoidnih tvari.

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

Rad sadrži: 44 stranice, 20 grafičkih prikaza, 7 tablica i 50 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Laurus nobilis* L., flavonoidi, kvalitativna analiza, kvantitativna analiza, UV-Vis spektrofotometrija, tankoslojna kromatografija

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

Rad prihvaćen: rujan, 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF FLAVONOIDS OF *LAURUS NOBILIS* L. (LAURACEAE) FROM THE DALMATIAN REGION

Matea Perica

SUMMARY

In this work, qualitative and quantitative analysis of flavonoids of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) from Dalmatian region was carried out. The thin layer chromatography revealed the presence of quercetin, rutin, isoquercitrin, quercitrin and naringin in all analyzed methanolic extracts of bay leaves (populations: Brač, Konavle, Korčula, Lastovo, Mljet, Pelješac, and Šipan). Quantitative analysis of flavonoids was carried out using the spectrophotometric method. The contents of analyzed flavonoids from laurel leaves varied from 0.33% (Pelješac) to 0.62% (Lastovo). Conducted qualitative and quantitative analysis is a contribution to the scientific study of species *Laurus nobilis* L. and completes the existing knowledge about phytotherapeutic potential of laurel, especially in relation to the content of bioactive flavonoid substances.

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

Thesis includes: 44 pages, 20 figures, 7 tables, and 50 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Laurus nobilis* L., flavonoids, qualitative analysis, quantitative analysis, UV-Vis spectrophotometry, thin layer chromatography

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

Reviewers: **Renata Jurišić Grubešić**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lidija Bach-Rojecky, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Živka Juričić, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September, 2017