

Usporedba koncentracija hidrolata dobivenih dvjema vrstama ekstrakcije iz vrsta roda Veronica s vlažnog staništa

Jukić, Dora

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:175940>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-06**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za biologiju

Dora Jukić

**Usporedba koncentracija hidrolata dobivenih
dvjema vrstama ekstrakcije iz vrsta roda
Veronica s vlažnog staništa**

Završni rad

Split, 2022.

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za biologiju

Dora Jukić

**Usporedba koncentracija hidrolata dobivenih
dvjema vrstama ekstrakcije iz vrsta roda
Veronica s vlažnog staništa**

Završni rad

Split, 2022.



Ovaj rad je izrađen u Splitu 2022. godine u sklopu HrZZ projekta „Hrvatske vrste roda *Veronica*: fitotaksonomija i biološka aktivnost“ (CROVeS-PhyBA), pod mentorstvom prof. dr. sc. Valerije Dunkić i neposrednim vodstvom asistentice Marije Nazlić. Završni rad je predan na ocjenu Odjelu za biologiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnice biologije i kemije (*univ. bacc. biol. et chem.*).

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu

Završni rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za biologiju

Rudera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

USPOREDBA KONCENTRACIJA HIDROLATA DOBIVENIH DVJEMA VRSTAMA EKSTRAKCIJE IZ VRSTA RODA *VERONICA* S VLAŽNOG STANIŠTA

Dora Jukić

Rod *Veronica* obuhvaća velik broj vrsta koje su zbog svojih osobina prilagođene životu na raznim staništima. Opisanih pet vrsta iz ovog rada žive pretežito na obalama rijeka, potoka i jezera. Izolacijom eteričnih ulja kao nusprodukti nastaju hidrolati, cvjetne vodice obogaćene spojevima iz ulja. Postoje mnoge klasične i nekonvencionalne metode izolacije eteričnih ulja. Za određivanje masene koncentracije hidrolata korištene su metode vodene destilacije u aparaturi po Clevengeru i mikrovalna ekstrakcija.

Ključne riječi: rod *Veronica*, vlažno stanište, hidrolati, vodena destilacija u aparaturi po Clevengeru, mikrovalna ekstrakcija

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Rad sadrži: 30 stranica, 12 slika, 2 tablice i 30 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Mentor: prof.dr.sc. Valerija Dunkić

Neposredni voditelj: Marija Nazlić, *mag.educ.biol.et chem.*

Ocjenjivači: prof.dr.sc. Valerija Dunkić,

Marija Nazlić, *mag.educ.biol.et chem.*

dr.sc. Nenad Vuletić

Rad prihvaćen: rujan, 2022.

Basic documentation card

University of Split

Bachelor Thesis

Faculty of Science

Department of Biology

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

COMPARISON OF HYDROSOL CONCENTRATIONS OBTAINED BY TWO TYPES OF EXTRACTION FROM SPECIES OF THE GENUS VERONICA FROM WET HABITATS

Dora Jukić

The genus *Veronica* includes a large number of species that, due to their characteristics, are adapted to life in various habitats. The five species described in this thesis live mainly on the banks of rivers, streams and lakes. Isolation of essential oils produces hydrosols as by-products, floral waters enriched with compounds from oils. There are many classical and unconventional methods of isolating essential oils. The methods of water distillation in a Clevenger apparatus and microwave extraction were used to determine the mass concentrations of the hydrosols.

Key words: genus *Veronica*, wet habitat, hydrosols, water distillation in a Clevenger apparatus, microwave extraction

Thesis deposited in the library of Faculty of Science, University of Split

Thesis consists of: 30 pages, 12 figures, 2 tables and 30 references. Original language: Croatian

Supervisor: Prof. Valerija Dunkić, PhD

Assistant Supervisor: Marija Nazlić, *mag.educ.biol.et chem*

Reviewers: Ful.Prof. Valerija Dunkić, PhD

Marija Nazlić, *mag.educ.biol.et chem*.

Nenad Vuletić, PhD

Thesis accepted: September, 2022.

Izjava

kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam završni rad s naslovom USPOREDBA KONCENTRACIJA HIDROLATA DOBIVENIH DVJEMA VRSTAMA EKSTRAKCIJE IZ VRSTA RODA *VERONICA* S VLAŽNOG STANIŠTA izradila samostalno pod voditeljstvom prof. dr. sc. Valerije Dunkić. U radu sam primijenila metodologiju znanstveno-istraživačkog rada i koristila literaturu koja je navedena na kraju završnog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući navela u završnom radu na uobičajen, standardan način citirala i povezala fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.

Studentica

Dora Jukić

Sadržaj

1. UVOD	1
2.RAZRADA TEME.....	2
2.1. Vrste roda <i>Veronica</i> s vlažnog staništa	2
2.1.1 <i>Veronica anagallis-aquatica</i> L. ssp.anagallis aquatica- vodena čestoslavica	2
2.1.2. <i>Veronica anagalloides</i> Guss. – močvarna čestoslavica.....	4
2.1.3. <i>Veronica beccabunga</i> L. - potočna čestoslavica	6
2.1.4. <i>Veronica catenata</i> Pennell - lančasta čestoslavica	8
2.1.5. <i>Veronica longifolia</i> L. - dugolisna čestoslavica	10
2.2 Sekundarni metaboliti.....	12
2.2.1. Eterična ulja.....	13
2.2.2. Hidrolati.....	14
2.3. Metode izolacije	15
2.3.1. Vodena destilacija u aparaturi po Clevengeru.....	16
2.3.2. Mikrovalna ekstrakcija	17
2.4. Kemijska analiza eteričnog ulja i hidrolata	19
3. MATERIJALI I METODE.....	20
3.1. Biljni materijal.....	20
3.2.Izolacija hlapljivih spojeva pet vrsta <i>Veronica</i>	21
3.2.1. Vodena destilacija u aparaturi po Clevengeru eteričnog ulja i hidrolata pet vrsta <i>Veronica</i>	21
3.2.2. Mikrovalna ekstrakcija eteričnog ulja i hidrolata pet vrsta <i>Veronica</i>	22
3.3 Daljnja obrada uzoraka hidrolata nakon izolacije	23
4. REZULTATI.....	25
5. RASPRAVA.....	26
6. ZAKLJUČAK	28
7. LITERATURA.....	29

1. UVOD

Porodica *Plantaginaceae* (hrvatski naziv-trpučevke) je porodica koja je dio reda *Lamiales*, dok je prije pripadala redu *Scrophulariales*. U ovoj porodici nalazimo veliki broj jednogodišnjih ili trajnih zeljastih biljaka nerazdijeljenih listova u prizemnoj rozeti i pravilnih dvospolnih cvjetova. Porodica sadrži 110 rodova, a najbrojniji rod je rod čestoslavica, lat. *Veronica* (Katavić,2019.).

Rod *Veronica* sadrži oko 500 vrsta, koje su većim dijelom rasprostranjene na sjevernoj polutci, posebno na području Mediterana i planinskom području. U Hrvatskoj ih je opisano oko 40 (Nazlić i sur., 2021.).

Stabljike su im najčešće polegnute te su listovi nasuprotno smješteni u obliku rozete pri dnu. Cvjetovi rastu pojedinačno iz pazuha listova i skupljeni su u grozdaste ili klasaste cvatove. Plod je tobolac (Katavić, 2019.).

Adaptibilnost ovih vrsta je omogućila njihov život u različitim uvjetima; od vodenih staništa preko umjerenih do suhих. Izložene su raznim oblicima stresa kao što su: iznimno visoke temperature, slanost, poplave, visoke koncentracije teških metala i razni patogeni. Svi ovi faktori okoliša utječu na njihov rast, diferencijaciju i razmnožavanje, a kao odgovor na sve navedeno stvaraju specifične metabolite (Dunkić i sur., 2022.).

Cilj ovog rada je usporediti masene koncentracije hlapljivih spojeva u hidrolatima koje su dobivene vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru i tehnikom mikrovalne ekstrakcije.

2.RAZRADA TEME

2.1. Vrste roda *Veronica* s vlažnog staništa

2.1.1 *Veronica anagallis-aquatica* L. ssp.anagallis aquatica- vodena čestoslavica

To je biljka čija je stabljika glatka, razgranata, široka i šuplja te visoka do 100 cm (Slika 1.). Ima nasuprotne, lancetaste i fino nazubljene listove, a gornji su sjedeći. Cvjetovi su dvospolni s četiri svijetloplave latice te imaju dva prašnika. Gusto rastu u duge grozdaste cvatove u pazušcima gornjih listova. Plod je mala okruglasta kapsula.

Živi pretežno u plitkim vodama, rijekama i potocima. Pogoduju joj sunčana i polusjenovita mjesta na umjereno kiselim tlima (<https://www.plantea.com.hr/vodena-cestoslavica/>).

Sistematika:

ODJELJAK: Spermatophyta (sjemenjače)

PODODJELJAK: Magnoliophytina (kritosjemenjače)

RAZRED: Magnoliatae (dvosupnice)

PODRAZRED: Asteridae

RED: Lamiales (medoćike)

PORODICA: Plantaginaceae (trpučevke)

ROD: *Veronica*

VRSTA: *Veronica anagallis-aquatica* L. ssp.anagallis aquatica



Slika 1. *Veronica anagallis-aquatica* L. ssp. *anagallis aquatica* (Marija Nazlić)

2.1.2. *Veronica anagalloides* Guss. – močvarna čestoslavica

Uspravna je biljka glatke i šuplje stabljike, često ukorijenjena u donjim čvorovima (Slika 2.). Ima mnogo listova koji su nasuprotni, donekle lancetatsti i većinom tupih rubova. Također su spojeni pri bazi te su sjedeći. Cvjetovi su bijelih ili plavih, ovalnih i obično tupa latica. Rastu u gustim grozdovima te im je plod kapsula. Najčešće rastu uz jezera duž Mediterana (<https://plants.jstor.org/compilation/veronica.anagalloides>).

Sistematika:

ODJELJAK: Spermatophyta (sjemenjače)

PODODJELJAK: Magnoliophytina (kritosjemenjače)

RAZRED: Magnoliatae (dvosupnice)

PODRAZRED: Asteridae

RED: Lamiales (medoćike)

PORODICA: Plantaginaceae (trpučevke)

ROD: *Veronica*

VRSTA: *Veronica anagalloides* Guss.



Slika 2. *Veronica anagalloides* Guss. (Dario Kremer)

2.1.3. *Veronica beccabunga* L. - potočna čestoslavica

Ova trajnica ima stabljiku koja je puzajuća, a u gornjem dijelu je uzdižuća. Stabljika je gola i okrugla te joj je podanak puzajuć i dug (Slika 3.) Prisutni su nasuprotni listovi jajastog oblika, tupih vrhova te se nalaze na kratkoj peteljci. Dvospolni cvjetovi su najčešće plave, a rjeđe ružičaste boje. Rastu u pazušcima listova u gornjem dijelu stabljike u obliku grozdastih cvatova. Postoje dva prašnika. Plod je tobolac. Po nazivu prepoznamo potoke kao najčešće stanište uz osunčane izvore i obale rijeka (<https://www.plantea.com.hr/potocna-cestoslavica/>).

Sistematika:

ODJELJAK: Spermatophyta (sjemenjače)

PODODJELJAK: Magnoliophytina (kritosjemenjače)

RAZRED: Magnoliatae (dvosupnice)

PODRAZRED: Asteridae

RED: Lamiales (medoćike)

PORODICA: Plantaginaceae (trpučevke)

ROD: *Veronica*

VRSTA: *Veronica beccabunga* L.



Slika 3. *Veronica beccabunga* (Dario Kremer)

2.1.4. *Veronica catenata* Pennell - lančasta čestoslavica

Lančasta čestoslavica je višegodišnja zeljasta biljka. Ima uspravnu stabljiku koja je čvrsta i šuplja te gola (osim žljezdastih dlačica na cvatu). Na većini čvorova nosi grozdaste cvatove. Listovi su široki, lancetastog do eliptičnog oblika. Rubovi listova su cjeloviti ili sitno nazubljeni. Cvijet je bilateralno simetričan s četiri latice koje su najčešće bijele ili ružičaste boje (Slika 4.). Ima jedan ili dva prašnika. Plod tobolac je okruglog ili jajolikog oblika. Ovu čestoslavicu nalazimo najviše na obalama rijeka i potoka te na močvarnom tlu (<https://gobotany.nativeplanttrust.org/species/veronica/catenata/>).

Sistematika:

ODJELJAK: Spermatophyta (sjemenjače)

PODODJELJAK: Magnoliophytina (kritosjemenjače)

RAZRED: Magnoliatae (dvosupnice)

PODRAZRED: Asteridae

RED: Lamiales (medoćike)

PORODICA: Plantaginaceae (trpučevke)

ROD: *Veronica*

VRSTA: *Veronica catenata* Pennell



Slika 4. *Veronica catenata* Pennell (Dario Kremer)

2.1.5. *Veronica longifolia* L. - dugolisna čestoslavica

Ova zeljasta trajnica ima uspravnu, glatku stabljiku na kojoj su smješteni dugi listovi (Slika 5.). Listovi dolaze u parovima, ali mogu biti i u skupinama od tri ili samo jedan po nodusu. Lancetastog su oblika te su nazubljeni. Cvjetovi imaju pet latica te stvaraju gusto zbijene klasove ljubičaste ili plave boje. Nalazimo jedan ili dva prašnika. Plod je tobolac. Njezino tipično stanište je područje uz rijeke, livade i nizine s velikim udjelom vlage, no za razliku od dosad opisanih vrsta, ova se često sadi kao ukrasna biljka u vrtovima (<https://gobotany.nativeplanttrust.org/species/veronica/longifolia/>).

Sistematika:

ODJELJAK: Spermatophyta (sjemenjače)

PODODJELJAK: Magnoliophytina (kritosjemenjače)

RAZRED: Magnoliatae (dvosupnice)

PODRAZRED: Asteridae

RED: Lamiales (medoćike)

PORODICA: Plantaginaceae (trpučevke)

ROD: *Veronica*

VRSTA: *Veronica longifolia* L.



Slika 5. *Veronica longifolia* L. (Dario Kremer)

2.2 Sekundarni metaboliti

Sekundarni metaboliti su organski spojevi sintetizirani u biljkama sekundarnim reakcijama iz primarnih ugljikohidrata, aminokiselina i lipida.

Oni nemaju ulogu u rastu i razvoju kao primarni metaboliti, ali utječu na interakciju biljaka s okolišem (Pevalek-Kozlina, 2003.).

S obzirom na načine biosinteze dijelimo ih na tri skupine: terpene, fenolne spojeve i spojeve s dušikom. Terpeni su tvari netopive u vodi koje izgrađuje određen broj izoprenskih jedinica - spoj koji sadrži 5 C atoma. Fenolni spojevi sadrže fenolnu, odnosno hidroksilnu skupinu na aromatskom prstenu. Od spojeva s dušikom najznačajniji su alkaloidi (Pevalek-Kozlina, 2003.).

Terpeni se sintetiziraju iz acetyl-CoA putem mevalonske kiseline, a fenolni spojevi putem jabučne ili šikiminske kiseline. Spojevi s dušikom nastaju iz aminokiselina. Sekundarni metaboliti se obično pohranjuju u vakuoli (Pevalek-Kozlina, 2003.).

Njihova glavna uloga je zaštita od raznih nametnika i biljojeda. Potpomažu simbiozu s drugim organizmima, a služe kao i fizička i kemijska barijera štiteći biljke od raznih abiotičkih čimbenika, npr. UV-zračenja (Costa i sur., 2012.).

Sekundarni metaboliti uvelike se koriste u industriji, medicini, farmaciji te poljoprivredi zbog svojih antimikrobnih, antitumorskih svojstava te djeluju kao i inhibitori enzima (Akrap, 2021.).

2.2.1. Eterična ulja

Eterična ulja su sekundarni metaboliti široke primjene koja sadrže razne hlapljive spojeve. To su bistro, bezbojne ili slabije obojene tekućine karakterističnog mirisa i okusa. Spojevi koji čine eterično ulje su najčešće terpeni, alkoholi, ugljikovodici, aldehidi i ketoni te esteri (Mušan, 2016.).

U najvećoj mjeri se sastoje od terpena, točnije od monoterpena i seskviterpena jer su to hlapljivi spojevi u odnosu na ostale terpene (Turek i Stintzing, 2013.).

Eterična ulja nastaju u listovima, cvjetovima, plodovima, korijenju, a rjeđe u stabljici i kori biljaka. Biljke ih stvaraju kao produkte disimilacije u protoplazmi (Mušan, 2016.).

Skladište se na razne načine, a najjednostavniji primjer su stanice uljenice. Imaju oblik vrećice koja se jednim krajem drži za staničnu membranu, primjerice kod porodice Lauraceae. Osim toga, ulja mogu biti pohranjena u intracelularnim prostorima ili kanalima te žljezdanim dlakama (spremnici između kutikule i stanične membrane). Upravo su eterična ulja roda *Veronica* smještena u žljezdanim dlakama (Akrap, 2021.).

Kao rezultat filogenetskog i evolucijskog razvoja svake biljne vrste, uočavamo razne biološke uloge eteričnog ulja specifične za svaki biljni organizam. Ono prvenstveno štiti biljke od raznih nametnika kao što su kukci i mikroorganizmi. Također omogućuju biljci preživljavanje nepovoljnih uvjeta okoliša, a mogu i privući određene kukce koji će pospješiti oprašivanje i oplodnju te biljke (Mušan, 2016.).

Biljke koje izlučuju eterična ulja su karakteristična najviše za tropska područja te područje Mediterana. Eterično ulje je određene kvalitete i sastava, koji ovise o starosti i vrsti biljke, organu biljke koji stvara ulje, uvjetima kao što su tlo, klima i vegetacija te načinu izolacije samog ulja (Štefanac, 2018.).

Mješavine sintetskih mirisa s prirodnim eteričnim uljima dobivene drukčijim postupcima se smiju nazivati samo mirisima, a ne eteričnim uljima. Kemijski definirano ulje ima određen udio pojedinih spojeva, koji se izražava kao postotak te se sastav potvrđuje pomoću plinske kromatografije (<https://www.plantagea.hr/aromaterapija/etericna-ulja/>).

Zbog prethodno opisanih svojstava i djelovanja, eterična ulja imaju široku primjenu u raznim područjima kao što su medicina, farmaceutska i prehrambena industrija te proizvodnja parfema, kozmetike te aromaterapiji.

2.2.2. Hidrolati

Hidrolati, poznate još kao cvjetne vodice, su vodene otopine obogaćene spojevima iz eteričnih ulja. Nastaju kao nusprodukti prilikom izolacije eteričnih ulja (Aćimović, 2019.).

Hidrolati su blage i neškodljive tekućine u usporedbi s eteričnim uljima i biljnim ekstraktima koji zbog velikih koncentracija spojeva mogu nekad biti više štetni nego korisni. U njima prevladavaju hidrofilnije tvari, koje se ne mogu dobro otopiti u nepolarnoj smjesi kao što je ulje, a to su kiseline, alkoholi, dijelom aldehidi i ketoni. Sadrže manji udio terpena i seskviterpena jer su ovi spojevi hidrofobni (Katavić, 2019.).

Zbog nešto drugačijeg sastava, cvjetne vodice mogu imati i drugačiji miris od eteričnog ulja. No, ako hidrolati imaju više oksigeniranih spojeva, sličniji su eteričnim uljima. Ovisno o količini otopljenih hlapljivih tvari u vodi, mijenja se i kvaliteta hidrolata (Akrap, 2021.).

Nedostatak hidrolata je laka kontaminacija mikroorganizmima te se time kvare uz pojavu mutnoće, taloga i neugodnog mirisa. Stoga se konzerviraju odmah nakon destilacije pomoću filtracije kroz filter papir s porama veličine 200 nm ili čak i dodatkom antimikrobnih tvari (<https://www.plantagea.hr/aromaterapija/dobivanje-i-kontrola-kvalitete-hidrolata/>).

Zahvaljujući svojoj biološkoj aktivnosti, hidrolati se primjenjuju najviše kao kozmetički preparati u obliku tonika za lice, kremi i maski. Primjenjuju se i u aromaterapiji te terapiji u obliku obloga, ispiranja nosa, ali i u prehrambenoj industriji (Katavić, 2019.).

Specifično za vrste roda *Veronica* je bogatstvo fenolnim spojevima i iridoidima zbog čega se koriste za liječenje mnogih bolesti, najviše dišnog sustava. Također služe u liječenju tumora, a mogu djelovati i kao diuretik (Nazlić i sur., 2021.).

2.3. Metode izolacije

Postoje razni načini izolacije eteričnih ulja i hidrolata. Biljni materijal, odnosno dio biljke iz kojeg se izolira eterično ulje je temelj odabira metode, kao i sastav samog ulja. Posebno treba paziti na termolabilne komponente ulja i na komponente koje su podložne oksidaciji (Tonković, 2021.).

Najčešća metoda je vodena destilacija u aparaturi po Clevengeru. Ostale konvencionalne metode su: destilacija vodenom parom, direktna parna destilacija, ekstrakcija organskim otapalima, ekstrakcija nehlapljivim otapalima, maceracija i prešanje.

Razlika između vodene i parne destilacije je to što se pri vodenoj destilaciji biljni materijal nalazi u neposrednom dodiru s vodom, a kod parne destilacije je u doticaju samo s vodenom parom. S obzirom da su eterična ulja netopljiva u vodi i manje su gustoće od same vode, prikupljaju se organskim otapalima. Prešanje kao postupak se obično koristi kod agruma (Akrap, 2021.).

Međutim, sve više se koriste i tzv. „zelene“ ekstrakcije koje smanjuju vrijeme postupka izolacije, a to su: mikrovalna ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta enzimima, ekstrakcija ultrazvukom, ekstrakcija superkritičnim fluidima, ekstrakcija pomoću pulsirajućeg električnog polja, ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku te kombinacije navedenih. Potrebna su dodatna istraživanja ovih metoda (Tonković, 2021.).

2.3.1. Vodena destilacija u aparaturi po Clevengeru

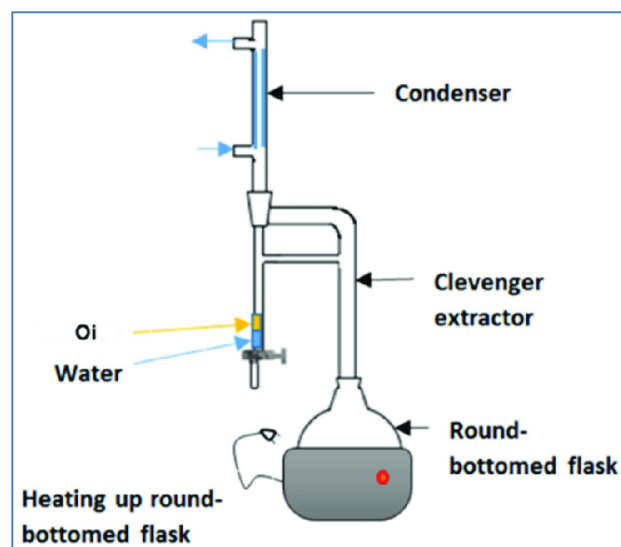
Vodena destilacija ili hidrodestilacija je jedna od najznačajnijih metoda destilacije eteričnih ulja pri čemu se koristi aparatura po Clevengeru (Slika 6.) koja smanjuje količinu komponenata ulja koja zaostaje u vodenom sloju, tj. hidrolatu (Prodanović, 2021.).

Proces podrazumijeva zagrijavanje biljnog materijala u vodi preko temperature vrelišta. Time nastaju plinovi koji se sastoje od vodene pare i para eteričnog ulja. Zatim se u kondenzatoru hlade do temperature ispod 30°C i prevode u tekuće stanje. Nastale dvije tekuće faze se međusobno ne miješaju. Na kraju destilacije dvije faze se odvoje u separatoru gdje se eterično ulje nalazi u gornjem sloju, a donji sloj čini hidrolat (Tonković, 2021.).

Hidrodestilacija je korisna metoda jer visoke temperature ubrzavaju difuzijske sile čime se bolje skuplja eterično ulje iz biljnog materijala (Akrap, 2021.). Ova metoda je uspješnija u odnosu na parnu destilaciju jer se pri parnoj destilaciji može dogoditi nakupljanje biljnog materijala što onemogućava prodiranje pare (Tonković, 2021.).

Prednost ove metode je i korištenje aparature po Clevengeru zbog njezine jednostavne građe. Sastoji se od kalote, tikvice s okruglim dnom, graduirane cijevi i hladila.

Aparatura omogućuje vraćanje kondenzata sa zaostalim komponentama eteričnog ulja (gornje faze) natrag u tikvicu kako bi se ponovila destilacija čime se postiže veće iskorištenje i kvaliteta dobivenog eteričnog ulja (Prodanović, 2021.).



Slika 6. Aparatura po Clevengeru

2.3.2. Mikrovalna ekstrakcija

Mikrovalna ekstrakcija je relativno nova tehnika ekstrakcije uzorka, koja koristi energiju mikrovalova za zagrijavanje uzorka, odnosno otapala.

Inače, ekstrakcija je tipična metoda razdvajanja tvari iz homogene smjese na temelju različite topljivosti u otapalima koja se ne miješaju (Blekić i sur., 2011.).

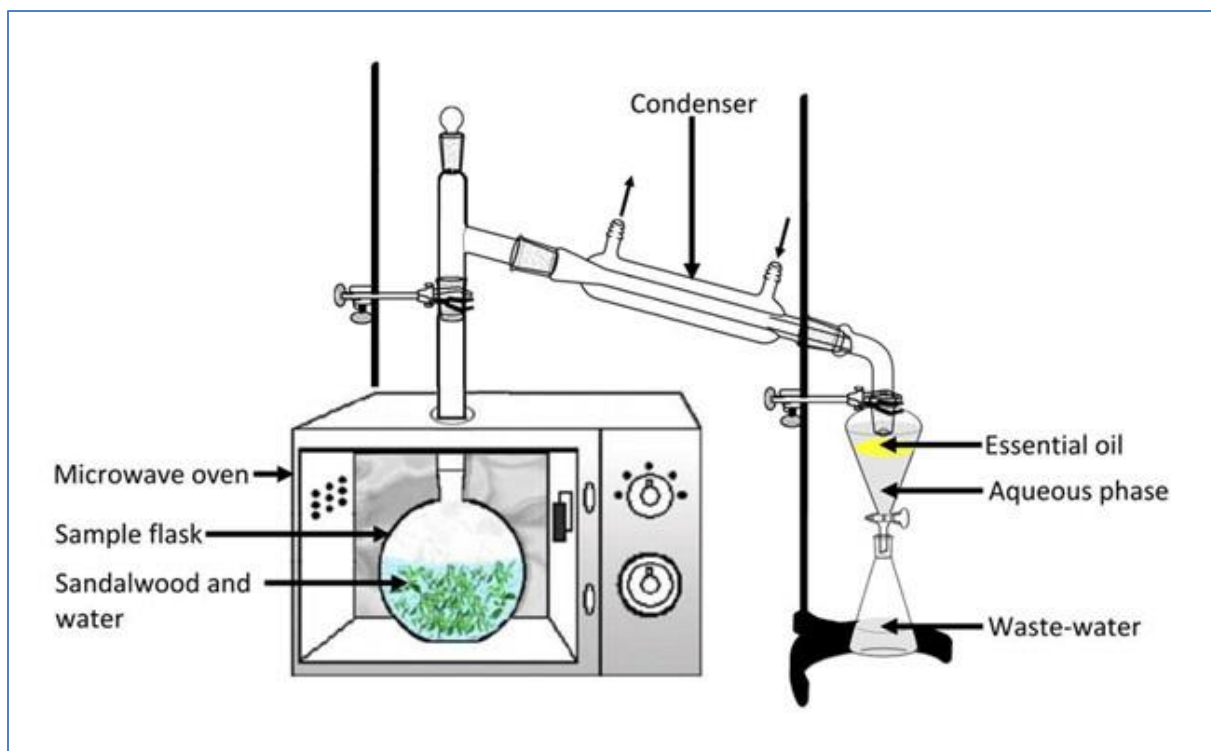
Mikrovalovi su dio elektromagnetskog zračenja čije frekvencije iznose između 300 MHz i 30 GHz. Mikrovalovi pripadaju neionizirajućem zračenju koje uzrokuje pucanje vodikovih veza te se time omogućuje rotacija molekula i gibanje iona. Struktura molekule se ne mijenja (Fini i Breccia, 1999.).

Budući da se svi materijali ne ponašaju jednako pri djelovanju mikrovalova, izbor otapala je vrlo bitan. Polarne tvari apsorbiraju mikrovalno zračenje pa se stoga najčešće one koriste kao otapalo, npr. etanol, metanol i voda. Za razliku od njih nepolarne tvari reflektiraju mikrovalove, a materijali kao što su staklo, porculan i keramika ih propuštaju. Bitan faktor je i konstanta dielektričnosti. Apsorpcija mikrovalnog zračenja je proporcionalna vrijednosti dielektričnosti, dakle što je veća konstanta, veća je i energija mikrovalova koja se apsorbira (Gavranić, 2015.).

Mikrovalna ekstrakcija je mnogo brža od klasičnih metoda ekstrakcije zahvaljujući visokim temperaturama i tlaku koji smanjuju vrijeme trajanja izolacije određenih spojeva. Međutim, povišenje temperature može uzrokovati razgradnju termolabilnih spojeva. To se može izbjeći namještanjem odgovarajuće snage mikrovalova (Blekić i sur., 2011.).

Kako bi se omogućila izolacija eteričnih ulja, koja se sastoje od većinom nepolarnih tvari, koristi se smjesa otapala različite polarnosti. Za razliku od klasičnih metoda ekstrakcije, mikrovalna ekstrakcija omogućuje korištenje svježeg biljnog materijala, ali rezultati su bolji pri korištenju suhog materijala. Sama aparatura se sastoji od hladila, birete, sustava redestilacije i mikrovalne pećnice (Akrap, 2021.) (Slika 7.).

Osim primjene u izolaciji i analizi organskih spojeva, mikrovalovi se često koriste i u prehrambenoj industriji (npr. mikrovalne pećnice). Obično se koriste za zagrijavanje, odmrzavanje i sušenje hrane, ali i u postupcima pasterizacije i sterilizacije hrane (Blekić i sur., 2011.).



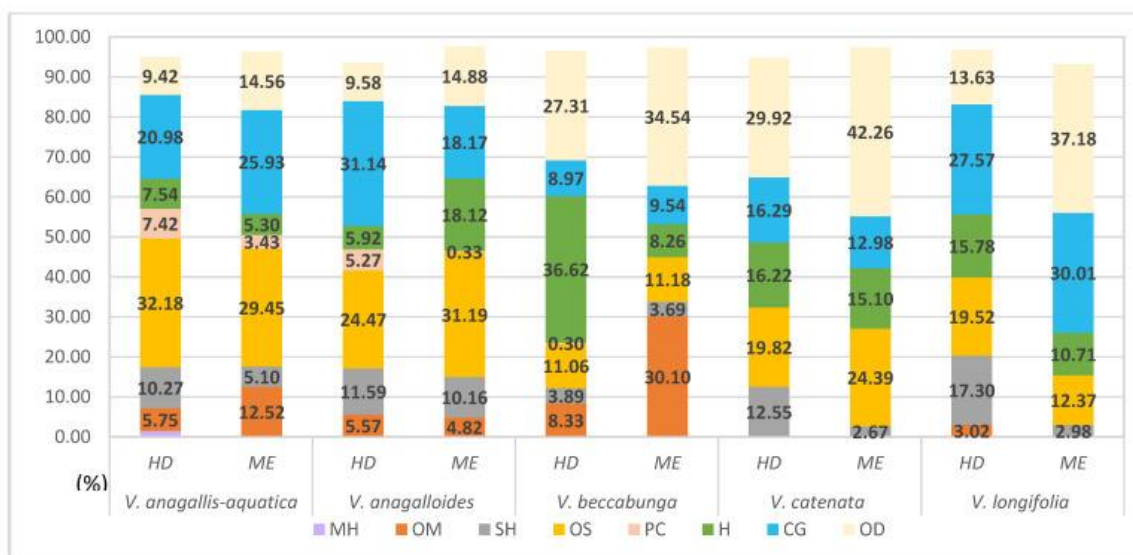
Slika 7. Aparatura za mikrovalnu destilaciju

2.4. Kemijska analiza eteričnog ulja i hidrolata

U slučaju kad je potrebna detaljna kemijska identifikacija samog sastava eteričnog ulja ili hidrolata, obično se koristi GC/MS tehnika koja kombinira metodu plinske kromatografije i masene spektroskopije.

Plinska kromatografija je analitička tehnika kojom se razdvajaju plinovi, hlapljivi spojevi i spojevi koji se pri visokim temperaturama mogu prevesti u plinovito stanje bez razgradnje (Ljubenkov, interna skripta). Na kraju analize rezultati su prikazani kromatogramom gdje su udjeli pojedinih komponenti izraženi postotcima. Zatim se podatci uspoređuju tako da se maseni spektri nepoznatih sastojaka usporede s poznatim određenim spektrima (Akrap, 2021.).

Ovom tehnikom je identificiran i sastav hlapljivih spojeva navedenih pet vrsta *Veronica* koji su izolirani i metodom vodene destilacije i mikrovalnom ekstrakcijom čime je utvrđeno da svih pet vrsta s vlažnog staništa imaju u sastavu E-kariofilen, kariofilen oksid, heksahidrofarnezil aceton, fitol, heksadekansku kiselinu i β -ionon (Dunkić i sur., 2022.) (Slika 8.).



Slika 8. Relativni sadržaj hlapljivih spojeva u vrstama *Veronica* skupljenih na vlažnom staništu. MH-monoterpeni ugljikovodici; OM-oksigenirani monoterpeni; SH-seskviterpeni ugljikovodici; OS-oksigenirani seskviterpeni; PC-fenolni spojevi; H-ugljikovodici; GC-zajednička skupina kiselina, alkohola i estera; OD-oksigenirani diterpeni (Dunkić i sur., 2022.)

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Biljni materijal

Nadzemni dijelovi pet biljnih vrsta; *Veronica anagallis-aquatica* L., *Veronica anagalloides* Guss., *Veronica beccabunga* L., *Veronica catenata* Pennell i *Veronica longifolia* L. sakupljeni su na lokalitetima vlažnih staništa u Hrvatskoj (navedenim u tablici) u proljeće, 2021.godine u fazi cvatnje (Tablica 1.). Biljke su osušene na zraku u jednom sloju te su bile zaštićene od izravnog sunčevog svjetla deset dana.

„Vlažno stanište“ podrazumijeva vrste koje rastu u vodi rijeka, jezera ili močvara.

Tablica 1. Podatci istraživanih vrsta *Veronica*

Vrste	Mjesto	Zemljopisna širina	Zemljopisna dužina	Nadmorska visina
<i>V.anagallis-aquatica</i>	Split	43°31'43.5" N	16°28'45.2" E	22m
<i>V.anagalloides</i>	rijeka Čikola	43°49'36.2" N	16°01'34.2" E	45m
<i>V.beccabunga</i>	Baške Oštarije	44°31'32.1" N	15°10'34.2" E	908m
<i>V.catenata</i>	Trakošćan	46°15'30.3" N	15°56'25.2" E	240m
<i>V.longifolia</i>	Oštarije	45°13'36.1" N	15°16'18.2" E	311m

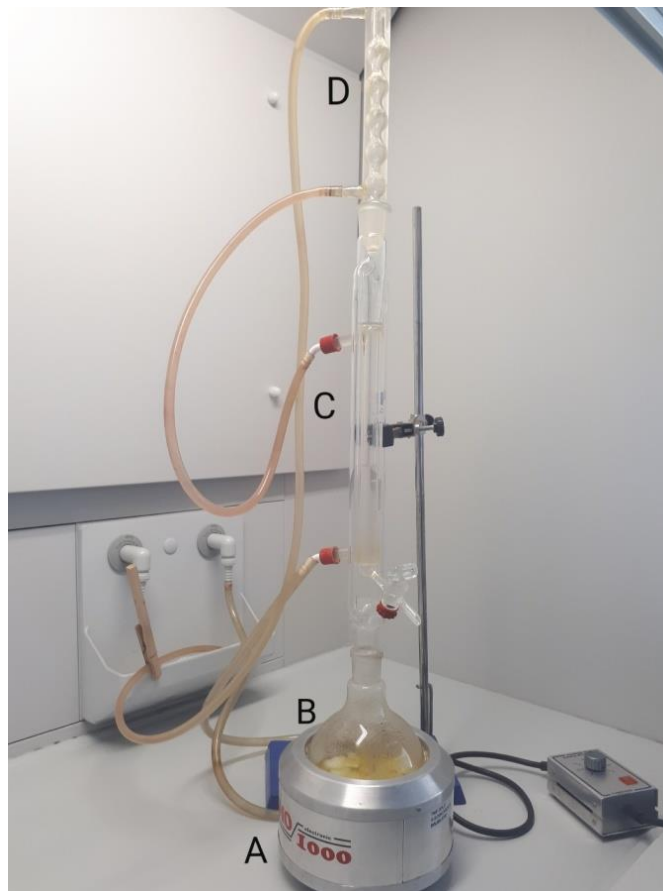
3.2. Izolacija hlapljivih spojeva pet vrsta *Veronica*

Eterično ulje i hidrolati iz pet vrsta *Veronica* izolirano je tehnikama vodene destilacije u aparaturi po Clevengeru i postupkom mikrovalne ekstrakcije.

3.2.1. Vodena destilacija u aparaturi po Clevengeru eteričnog ulja i hidrolata pet vrsta *Veronica*

U tikvicu s okruglim dnom se stavi 30-50 grama biljnog uzorka i destilirana voda. U graduiranu cijev se doda smjesa od 2 mL pentana te 1 mL dietil-etera kako bi se spriječio gubitak hlapljivih spojeva. Nakon dva i pol sata destilacije ulje je prevedeno u smjesu otapala i time odijeljeno od vodenog sloja (hidrolata) (Slika 9.). Zatim se uzorci eteričnog ulja pohrane u hermetički zatvorenim bočicama, a uzorci hidrolata u Falcon tubama.

Uzorci su spremljeni u hladnjak na temperaturi od 4°C do daljnje obrade.

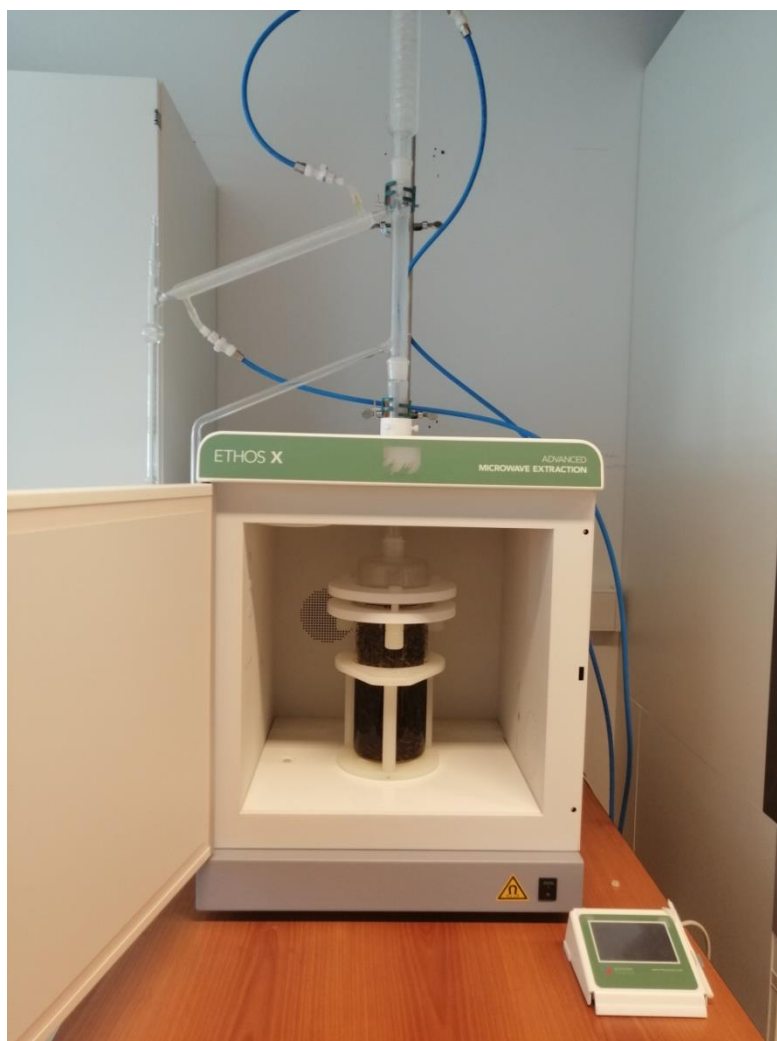


Slika 9. Aparatura po Clevengeru: A-kalota, B-tikvica, C-graduрана cijev, D-hladilo

3.2.2. Mikrovalna ekstrakcija eteričnog ulja i hidrolata pet vrsta *Veronica*

U posudu za mikrovalnu ekstrakciju se stavi 50 grama biljnog uzorka (Slika 10.). Kako je materijal suh, potrebno je dodati malo destilirane vode u posudu. Posuda se postavi u mikrovalnu peć i složi se potpuna aparatura. U biretu se prvo doda destilirana voda. Zatim se ulijeva smjesa od 2 mL pentana i 1 mL dietil-etera kako ne bi došlo do gubitka hlapljivih sastojaka.

Ekstrakcija je provedena pri atmosferskom tlaku pri 500 W dok je temperatura iznosila 98°C u trajanju od ukupno 40 minuta. Sami proces ekstrakcije je započeo nakon 10 minuta i time trajao pola sata. Eterično ulje se time odvojilo od vodenog sloja (hidrolata). Uzorci eteričnog ulja su pohranjeni u hermetički zatvorenim bočicama, a uzorci hidrolata u Falcon tubama. Uzorci su spremljeni u hladnjak do daljnje obrade.



Slika 10. Aparatura za mikrovalnu ekstrakciju (Ethos X)

3.3 Daljnja obrada uzoraka hidrolata nakon izolacije

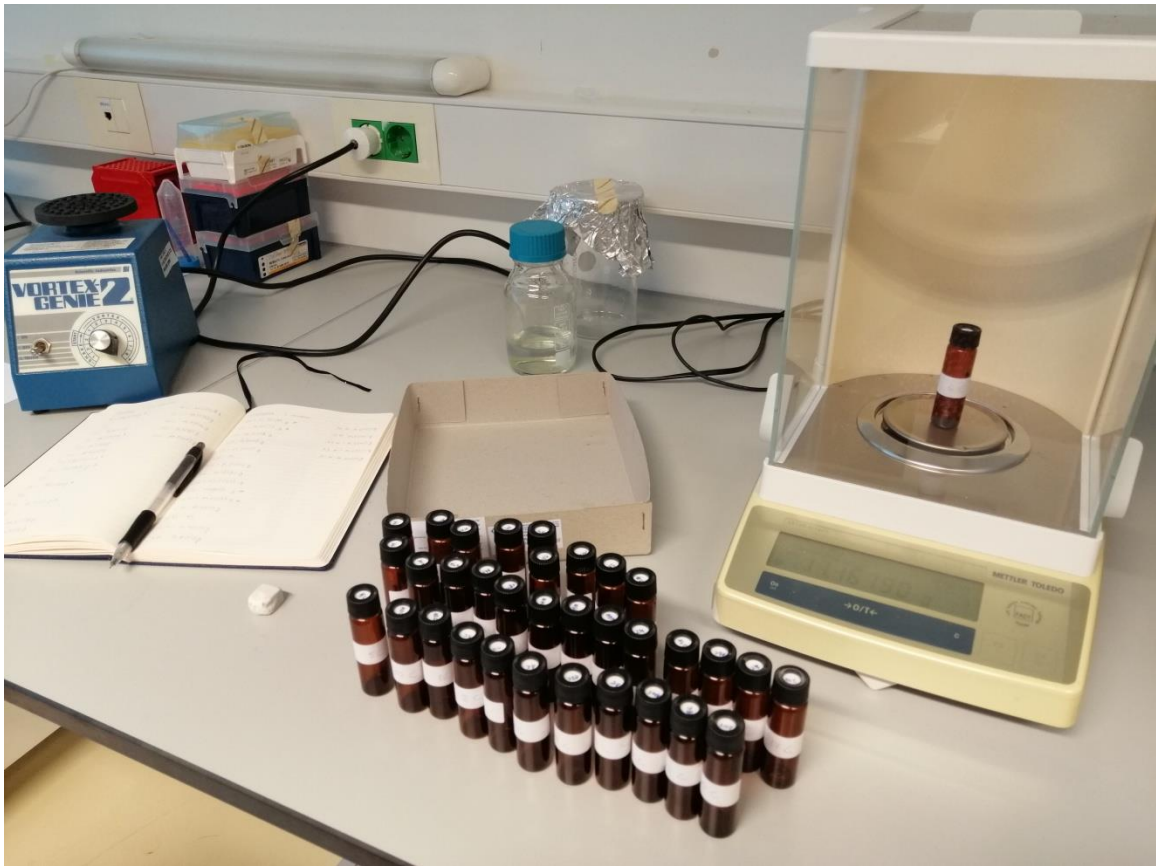
Nakon izolacije uzoraka pomoću prethodno opisanih tehnika slijedi postupak koji je proveden kako bi se prije određivanja masene koncentracije, uklonio mogući višak vode.

U lijevak za odjeljivanje je dodano 2mL uzorka hidrolata, 2 mL pentana i 1 mL dietil-etera. Lijevak se zatvori čepom te se lagano mućka sadržaj 1-2 minute (Slika 11.). Lijevak se stavi na stalak kako bi se odvojile faze. Zatim se ispusti donji, vodeni sloj, a gornji sloj (kojeg čini hidrolat) se prenese u tamnu, staklenu bočicu. Postupak se ponovi za preostale uzorke. Deset uzoraka (pet dobivenih vodenom destilacijom i pet dobivenih mikrovalnom ekstrakcijom) je onda spremljeno u zamrzivač kako bi se zamrznuo eventualni ostatak vode.

Nakon nekoliko sati (u ovom slučaju 24h) hidrolati se iz bočica prebacuju u čiste bočice, dok zamrznuta voda ostaje na dnu bočice. Zadnji korak prije izračuna je otparavanje otapala iz bočica s uzorkom pri sobnoj temperaturi. Na kraju u odvaganim bočicama ostaju samo ekstrahirane hlapljive tvari. Potom su izmjerene mase bočica s uzorkom na analitičkoj vagi te se njihovoj masi oduzme masa prethodno izvaganih praznih bočica kako bi se izračunale mase dobivenih hidrolata (Slika 12.). Iz dobivene mase i volumena uzorka (2mL) se izračuna masena koncentracija svih deset uzoraka hidrolata.



Slika 11. Ekstrakcija uzoraka pomoću lijevka za odjeljivanje



Slika 12. Vaganje uzoraka na analitičkoj vagi

4. REZULTATI

Tablica 2. Dobiveni podatci o uzorcima hidrolata

Biljna vrsta	Masa uzorka(g)- destilacija po Clevengeru	Masa uzorka(g)- mikrovalna ekstrakcija	Masena koncentracija (g/mL)- destilacija po Clevengeru	Masena koncentracija (g/mL) – mikrovalna ekstrakcija
<i>V.anagallis aquatica</i>	0.01853	0.01565	0.009265	0.007825
<i>V.anagalloides</i>	0.01048	0.01242	0.00524	0.006210
<i>V.beccabunga</i>	0.00971	0.13350	0.004885	0.06675
<i>V.catenata</i>	0.15450	0.01051	0.07725	0.005255
<i>V.longifolia</i>	0.01331	0.01986	0.006655	0.009930

Rezultati pokazuju da je za vrste *V.anagallis aquatica* i *V.catenata* veća masena koncentracija hidrolata dobivena vodenom destilacijom (HD) nego mikrovalnom ekstrakcijom (ME).

Za vrste *V.anagalloides*, *V.beccabunga* i *V.longifolia* masena koncentracija hidrolata dobivena mikrovalnom ekstrakcijom (ME) je veća od masene koncentracije dobivene vodenom destilacijom (HD).

5. RASPRAVA

Rod *Veronica* pripada porodici Plantaginaceae. S obzirom na morfologiju opisanih pet vrsta s vlažnog staništa: *V.anagallis-aquatica*, *V.anagalloides*, *V.beccabunga*, *V.catenata* i *V.longifolia*, zaključuje se da svih pet vrsta čini stabljika koja je glatka i šuplja te jednim dijelom (*V.beccabunga*), ali obično cijela uspravna. Što se tiče listova sve vrste imaju nasuprotne cjelovite, lancetaste listove. Mogu biti blago nazubljeni. *V.longifolia* je specifična zbog dugih listova (što se vidi iz samog naziva vrste). Osim što dolaze u parovima, na nodusima se nekad nalazi samo jedan list, a mogu se naći i u skupinama od tri.

Vrste se najviše razlikuju po vjenčiću koji ima latice raznih boja: *V.anagallis-aquatica*-svijetloplave latice, *V.anagalloides*- bijele ili svijetloplave, *V.beccabunga*- plave ili ružičaste, *V.catenata*- bijele ili ružičaste i *V.longifolia*- ljubičaste ili plave boje. Sve vrste stvaraju grozdaste cvatove, osim vrste *V.longifolia* koja stvara klasaste cvatove. Sve vrste imaju jedan ili dva prašnika. Vrste *V.anagallis-aquatica* i *V.anagalloides* imaju kapsulu kao plod, dok ostale vrste imaju tobolac.

Zahvaljujući raznim metodama kao što su destilacije, ekstrakcije i prešanje, moguća je izolacija eteričnih ulja i hidrolata raznih biljaka uključujući i opisanih vrsta roda *Veronica*. Odabir metode je vrlo bitan kako bi se postiglo što veće iskorištenje postupka. U ovom slučaju je riječ o prednostima i manama vodene destilacije i mikrovalne ekstrakcije.

Rezultati dobivenih uzoraka hidrolata pokazuju da ne možemo sa sigurnošću utvrditi kojom metodom se nužno izolira veća ukupna količina hlapljivih spojeva u hidrolatima jer je za vrste *V.anagallis aquatica* i *V.catenata* masena koncentracija hlapljivih spojeva dobivena metodom vodene destilacije (HD) veća od masene koncentracije dobivene metodom mikrovalne ekstrakcije (ME), dok je za ostale tri vrste situacija obratna.

U mnogim istraživanjima se ne ističe značajna međusobna razlika u ukupnoj masenoj koncentraciji hlapljivih spojeva hidrolata dobivene ovim dvjema metodama te su iste glavne komponente izolirane objema metodama. No, odabir metode utječe na relativne postotke određenih spojeva unutar sastava danog hidrolata. Primjerice, glavni spoj (heksahidrofarnetil acetone) iz hidrolata vrste *V.anagallis-aquatica* je izoliran pomoću HD u iznosu od 27,17%, a pomoću ME u iznosu od 25,97%. Isti spoj je također glavna komponenta hidrolata vrste *V.anagalloides*, ali tu je izoliran u manjem postotku metodom HD (14,33%) nego metodom ME (19,12%). Međutim, uspoređujući ovih pet vrsta najveća razlika je uočena u postotku

oksisgeniranih monoterpena vrste *V.beccabunga*, gdje ih je vodenom destilacijom dobiveno 8.33%, a mikrovalnom ekstrakcijom 30.10% (Dunkić i sur., 2022.).

Razlika je i u broju spojeva koji se mogu izolirati ovim dvjema tehnikama. Istraživanje Wu i suradnika (2015.) je pokazalo da su iz hidrolata vrste *Lonicera macranthoides* izolirana 22 različita spoja metodom vodene destilacije, dok je metodom mikrovalne ekstrakcije izolirano samo 8 spojeva.

Neki spojevi se ne mogu izdvojiti objema metodama što nije čudno jer se razlikuju u mehanizmima rada. Vodena destilacija visokim temperaturama i dugim vremenom trajanja postupka može dovesti do razgradnje biljnog materijala (Dunkić i sur., 2022.). S druge strane, mikrovalna destilacija zbog prevelike snage mikrovalova isto može dovesti do razgradnje određenih spojeva pa je vrlo bitno namjestiti adekvatnu snagu u programu uređaja kako ne bi došlo do gubitka komponenti (Akrap, 2021.).

S obzirom na dobivene masene koncentracije hlapljivih spojeva hidrolata navedenih pet vrsta roda *Veronica*, vidi se da nema značajne razlike u ukupnoj koncentraciji hidrolata pa je u ovom slučaju logičniji izbor korištenje metode mikrovalne ekstrakcije. Potrebna je manja količina materijala nego za vodenu destilaciju te je ekološki korisnija metoda jer postupak kraće traje te se koristi manje vode i energije (Dunkić i sur., 2022.).

6. ZAKLJUČAK

U ovom završnom radu uspoređena je masena koncentracija hidrolata pet vrsta roda *Veronica* s vlažnog staništa (*V.anagallis-aquatica*, *V.anagalloides*, *V.beccabunga*, *V.catenata* i *V.longifolia*) izoliranih tehnikama vodene destilacije u aparaturi po Clevengeru i mikrovalne ekstrakcije.

Veća masena koncentracija hidrolata vrsta *V.anagallis aquatica* (0.009265g/mL) i *V.catenata* (0.07725g/mL) je dobivena metodom vodene destilacije nego mikrovalnom ekstrakcijom (0.007825 g/mL, 0.005255 g/mL).

Veća masena koncentracija hidrolata vrsta *V.anagalloides* (0.006210 g/mL), *V.beccabunga* (0.06675 g/mL) i *V.longifolia* (0.009930 g/mL) dobivena je metodom mikrovalne ekstrakcije nego vodenom destilacijom (0.00524 g/mL, 0.004885 g/mL i 0.006655 g/mL).

Hidrolati vrsta roda *Veronica* zbog svog sastava i djelovanja su uvelike vrijedni daljnjih istraživanja, kao i metode vodene destilacije u aparaturi po Clevengeru i mikrovalne ekstrakcije koje su vrlo moćne tehnike s obzirom na široku primjenu zahvaljujući njihovim karakteristikama.

7. LITERATURA

1. Aćimović, M.; Šovljanski, O.; Šeregelj, V.; Pezo, L.; Zheljaskov, V.D.; Ljujić, J.; Tomić, A.; Četković, G.; Čanadanović-Brunet, J.; Miljković, A.; Vujisić, L. Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activity of *Dracocephalum moldavica* L. Essential Oil and Hydrolate. *Plants* **2022**, *11*, 941.
2. Akrap, K. (2021.). Usporedba sastava slobodnih hlapljivih spojeva vrste *Veronica chamaedrys* L. izoliranih mikrovalnom ekstrakcijom i vodenom destilacijom; diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Split
3. Blekić, M., Ražek Jambrak, A., Chemat F. (2011.). Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food. Sci. Technol.* **3(1)** 32-47
4. Costa, T., Vieira, R.F., Bizzo, H.R., Silveira, D., Gimenes, M.A. (2012.). Secondary metabolites. *Chromatography and Its Applications*, 132-164
5. Dunkić, V.; Nazlić, M.; Ruščić, M.; Vuko, E.; Akrap, K.; Topić, S.; Milović, M.; Vuletić, N.; Puizina, J.; Jurišić Grubešić, R.; Srećec, S.; Kremer, D. Hydrodistillation and Microwave Extraction of Volatile Compounds: Comparing Data for Twenty-One *Veronica* Species from Different Habitats. *Plants* **2022**, *11*, 902.
6. Dunkić, V. (2022.). Interna skripta „Fiziologija bilja“. Prirodoslovno-matematički fakultet, Split
7. Fini, A., Breccia, A. (1999.). Chemistry by microwaves. *Pure Appl.Chem.*, Vol. **71**, No.4, pp. 573-579
8. Gavrančić, M. (2015.). Mikrovalna ekstrakcija polifenolnih spojeva iz kožice grožđa; diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb
9. Katavić, I. (2019.). GC-MS analiza hlapljivih spojeva odabranih vrsta roda *Veronica*; diplomski rad, Medicinski fakultet, Split
10. Ljubenković, I. (2021.) Interna skripta „Analitička kemija 2“. Prirodoslovno-matematički fakultet, Split
11. Miletić, L. (2020.). Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja i hidrolata izabranih vrsta biljaka; završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb
12. Mušan, N. (2016.) Sastav eteričnog ulja *Micromeria*, vrste *Micromeria juliana* (L.) BENTH. EX RCHB.i vrste *Micromeria kernerii* (MURB.) s lokaliteta Pijavičino, poluotok Pelješac; diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Split
13. Nazlić, M.; Fredotović, Ž.; Vuko, E.; Vuletić, N.; Ljubenković, I.; Kremer, D.; Jurišić Grubešić, R.; Stabenheiner, E.; Randić, M.; Dunkić, V. Free Volatile Compounds

of *Veronica austriaca* ssp. *jacquini* (Baumg.) Eb. Fisch. and Their Biological Activity. *Plants* **2021**, *10*, 2529.

14. Pevalek-Kozlina B. (2003.). Fiziologija bilja. Profil, Zagreb
15. Prodanović, N. (2021.). Utjecaj različitih tehnika ekstrakcije na iskorištenje i kvalitetu eteričnog ulja *Lavandula x intermedia* Silver; diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Osijek
16. Šimac, A. (2020.). Biološka aktivnost eteričnog ulja, hidrolata i biljnog ekstrakta odabranog samoniklog ljekovitog bilja i mogućnost primjene u prehrambenoj industriji; diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb
17. Štefanac, D. (2018.). Kemijski sastav i biološka aktivnost eteričnih ulja; diplomski rad, Medicinski fakultet, Split
18. Tonković, P. (2021.). Optimiranje procesa vodene destilacije za izolaciju eteričnog ulja sjemenki komorača; diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb
19. Turek, C., Stintzing, F.C. (2013.). Stability of Essential Oils: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **12**
20. Wu, C., Wang, F., Liu, J., Zou, Y., Chen, X. (2015.). A comparison of volatile fractions obtained from *Lonicera macranthoides* via different extractions processes: Ultrasound, microwave, Soxhlet extraction, hydrodistillation and cold maceration. *Integr. Med. Res.*, **4**: 171-177

Mrežne stranice:

21. <https://www.plantea.com.hr/vodena-cestoslavica/>
22. <https://www.plantea.com.hr/potocna-cestoslavica/>
23. <https://plants.jstor.org/compilation/veronica.anagalloides>
24. https://wikihrhr.top/wiki/Veronica_beccabunga
25. <https://gobotany.nativeplanttrust.org/species/veronica/catenata/>
26. <https://plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/cgi-bin/NSWfl.pl?page=nswfl&lvl=sp&name=Veronica~catenata>
27. <https://gobotany.nativeplanttrust.org/species/veronica/longifolia/>
28. <https://candide.com/ZA/plants/42d55988-a878-42b3-b0d1-7b08bff668ac>
29. <https://www.plantagea.hr/aromaterapija/dobivanje-i-kontrola-kvalitete-hidrolata/>
30. <https://www.plantagea.hr/aromaterapija/etericna-ulja/>