

Vrste roda Veronica s umjerenog staništa: usporedba koncentracija hidrolata dobivenih mikrovalnom i Clevenger hidrodestilacijom

Mikulić, Sara

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:166:911879>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#) / [Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

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

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za biologiju

Sara Mikulić

**Vrste roda *Veronica* s umjerenog staništa:
usporedba koncentracije hidrolata dobivenih
mikrovalnom i Clevenger hidrodestilacijom**

Završni rad

Split, 2022.

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za biologiju

Sara Mikulić

**Vrste roda *Veronica* s umjerenog staništa:
usporedba koncentracije hidrolata dobivenih
mikrovalnom i Clevenger hidrodestilacijom**

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

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

VRSTE RODA *VERONICA* S UMJERENOG STANIŠTA: USPOREDBA KONCENTRACIJE HIDROLATA DOBIVENIH MIKROVALNOM I CLEVINGER HIDRODESTILACIJOM

Sara Mikulić

Rod *Veronica* pripada porodici Plantaginaceae te ima veliki broj vrsta rasprostranjenih na brojnim staništima, što ukazuje na njihovu veliku adaptivnost. Nepovoljni životni uvjeti utječu na rast, razvoj i reprodukciju biljaka. Kako bi se zaštitile, biljke su razvile mehanizme izlučivanja specijaliziranih metabolita. Tim metabolitima pripadaju eterična ulja, mješavine slobodnih hlapljivih spojeva dobivenih sekundarnim metaboličkim putevima. Kao nusprodukti izolacije eteričnih ulja nastaju hidrolati, nekoć dosta zanemarivani i smatrani otpadnim produktom, danas predstavljaju temu od velikog interesa. Predmet istraživanja ovog rada su hidrolati vrste roda *Veronica* umjerenog staništa. Tehnike korištene za izolaciju su mikrovalna ekstrakcija i hidrodestilacija po Clevenger-u.

Ključne riječi: rod *Veronica*, umjerenost stanište, hidrolati, destilacija po Clevenger-u, mikrovalna ekstrakcija

Rad sadrži: 28 stranica, 12 slika, 2 tablice, 17 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

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, viši asistent

Rad prihvaćen: Rujan 2022.

Basic documentation card

University of Split

Bachelor thesis

Faculty of Science

Department of Biology

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

Species of the Genus *Veronica* from a Moderate Habitat: Comparison of Hydrosol Concentrations Obtained by Microwave and Clevenger Hydrodistillation

SPECIES OF THE GENUS *VERONICA* FROM MODERATE HABITAT: COMPARISON OF HYDROSOL CONCENTRATIONS OBTAINED BY MICROWAVE EXTRACTION AND HYDRODISTILLATION

Sara Mikulić

The genus *Veronica* belongs to the Plantaginaceae family and it has a large number of species distributed in numerous habitats, which indicates their great adaptability. Unfavorable living conditions affect the growth, development and reproduction of plants. In order to protect themselves they have developed the mechanisms for secretion of specialized metabolites. These metabolites include essential oils, mixtures of free volatile compounds obtained by secondary metabolic pathways. Hydrosols are formed as byproducts of the isolation of essential oils. Once largely neglected and considered a waste product, today they represent a topic of great interest. The subject of this research are hydrosols of the species from genus *Veronica* from moderate habitats. Techniques used for isolation are microwave extraction and Clevenger hydrodistillation.

Key words: genus *Veronica*, moderate habitat, hydrosols, Clevenger distillation, microwave extraction

Thesis contains: 28 pages, 12 figures, 2 tables, 17 references, original language: Croatian

Mentor: Prof. Valerija Dunkić, Ph.D.

Assistant supervisor: Marija Nazlić, mag.educ.biol.et chem

Reviewers: Prof. Valerija Dunkić, Ph.D., Marija Nazlić, mag. educ. biol. et chem, Nenad Vuletić, Ph.D., Senior Assistant

Thesis accepted: September 2022.

Izjava

kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam završni rad s naslovom *VRSTE RODA VERONICA S UMJERENOG STANIŠTA: USPOREDBA KONCENTRACIJE HIDROLATA DOBIVENIH MIKROVALNOM I CLEVINGER HIDRODESTILACIJOM* 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

Sara Mikulić

Sadržaj

1. UVOD.....	7
2. RAZRADA TEME	8
2.1. Botanička pripadnost vrste: <i>Veronica acinifolia</i> (rascijepana čestoslavica).....	8
2.1.1. Morfologija i rasprostranjenost.....	9
2.2. Botanička pripadnost vrste: <i>Veronica chamaedrys</i> (dvorednodlakava čestoslavica)	10
2.2.1. Morfologija i rasprostranjenost.....	11
2.3. Botanička pripadnost vrste: <i>Veronica hederifolia</i> (bršljenasta čestoslavica).....	12
2.3.1. Morfologija i rasprostranjenost.....	13
2.4. Botanička pripadnost vrste: <i>Veronica serpyllifolia</i> L. (jajastolisna čestoslavica)	14
2.4.1. Morfologija i rasprostranjenost.....	15
2.5. Botanička pripadnost vrste: <i>Veronica urticifolia</i> Jacq. (širokolisna čestoslavica).....	16
2.5.1. Morfologija i rasprostranjenost.....	17
2.6. Specijalizirani metaboliti.....	18
2.7. Eterična ulja.....	19
2.8. Hidrolati	19
2.9. Dobivanje eteričnih ulja i hidrolata	20
2.9.1. Vodena destilacija u aparaturi po Clevengeru	20
2.9.2. Izolacija mikrovalnom ekstrakcijom.....	22
2.9.3. Sastav hlapljivih spojeva roda <i>Veronica</i>	24
3. MATERIJALI I METODE	26
3.1. Biljni materijal.....	26
3.2. Eksperimentalni dio.....	27
4. REZULTATI.....	29
5. RASPRAVA	30
6. ZAKLJUČAK.....	32
7. LITERATURA	33

1.UVOD

Rod *Veronica* podijeljen je u 13 podrodova po najnovijoj klasifikaciji i pripada porodici Plantaginaceae, ranije je pripadao porodici Scrophulariaceae. Veliki broj vrsta ukazuje na veliku prilagodljivost unutar roda gdje vrste uspijevaju na suhom, umjerenom i vlažnom staništu. U Hrvatskoj je identificirano 40-ak vrsta roda *Veronica* (Nazlić i sur., 2021.).

Vrste roda *Veronica* izvor su veoma važnih sekundarnih metabolita (iridoidnih glikozida i fenola). Zbog prisutnosti ovih spojeva vrste roda *Veronica* imaju veliku biološku aktivnost i antimikrobno i antioksidativno djelovanje. Još od davnina ovaj rod ima široku primjenu u tradicionalnoj medicini za liječenje reume, rana i drugih bolesti kod ljudi (Salehi i sur., 2019.).

Cilj ovog rada je usporediti kvantitativni sastav hidrolata dobivenih mikrovalnom i Clevenger hidrodestilacijom kod pet vrsta roda *Veronica* sa umjerenog staništa.

2. RAZRADA TEME

2.1. Botanička pripadnost vrste: *Veronica acinifolia* (rascijepana čestoslavica)

ODJELJAK: Spermatophyta (sjemenjače)

PODODJELJAK: Magnoliophytina (kritosjemenjače)

RAZRED: Magnoliatae (dvosupnice)

PODRAZRED: Asteridae

RED: Lamiales (medoćike)

PORODICA: Plantaginaceae

ROD: *Veronica*

VRSTA: *Veronica acinifolia* L.

AUTOR: Carl von Linneaus, Linne

2.1.1. Morfolologija i rasprostranjenost

Listovi ove biljke su cjelovitog ruba, jajasti i slabo nazubljeni. Mogu biti uspravni, jednostavni ili razgranati sa žljezdanim dlačicama (slika 1).

Cvjetovi su smješteni pojedinačno u kutovima listova i imaju duge peteljke. Boja cvjetova je ljubičasto-plava te promjera 3-5 milimetara. Plod je plosnat, rascijepljen skoro do sredine. Obitava većinom na vlažnom ilovastom tlu (<https://www.infoflora.ch/en/flora/veronica-acinifolia.html>).



Slika 1. Izgled biljke *Veronica acinifolia* (Foto: Marija Nazlić)

2.2. Botanička pripadnost vrste: *Veronica chamaedrys* (dvorednodlakava čestoslavica)

ODJELJAK: Spermatophyta (sjemenjače)

PODODJELJAK: Magnoliophytina (kritosjemenjače)

RAZRED: Magnoliatae (dvosupnice)

PODRAZRED: Asteridae

RED: Lamiales (medoćike)

PORODICA: Plantaginaceae

ROD: *Veronica*

VRSTA: *Veronica chamaedrys* L.

AUTOR: Carl von Linneaus, Linne

2.2.1. Morfologija i rasprostranjenost

Dvorednodlakava čestoslavica je višegodišnja zeljasta biljka. Stabljika joj može biti polegnuta ili pridignuta. Prekrivena je dlačicama u dva reda i razgranata. Listovi su jajoliki, nasuprotni i pilastih rubova (slika 3).



Slika 3. Izgled biljke *Veronica chamaedrys* (Foto: Marija Nazlić)

Podanak je razgranat i puzajuć. Cvjetovi su dvospolni, skupljeni u grozdaste cvatove nasuprotno smješteni u pazušcima listova. Plod je dlakavi bočno spljošteni tobolac koji sadrži puno malenih (1mm) plosnatih i jajolikih sjemenki. Rasprostranjena je u zapadnoj Aziji i Europi, raste na livadama i pašnjacima (<https://www.plantea.com.hr/dvorednodlakava-cestoslavica/>).

2.3. Botanička pripadnost vrste: *Veronica hederifolia* (bršljenasta čestoslavica)

ODJELJAK: Spermatophyta (sjemenjače)

PODODJELJAK: Magnoliophytina (kritosjemenjače)

RAZRED: Magnoliatae (dvosupnice)

PODRAZRED: Asteridae

RED: Lamiales (medoćike)

PORODICA: : Plantaginaceae

ROD: *Veronica*

VRSTA: *Veronica hederifolia* L.

AUTOR: Carl von Linneaus, Linne

2.3.1. Morfologija i rasprostranjenost

Bršljenasta čestoslavica je jednogodišnji korov, porijeklom iz Euroazije. Ima plave cvjetove koji rastu u pazušcima zelenih ili crveno-smeđih dlakavih stabljika.

Listovi izgledom podsjećaju na listove bršljana, a sastoje se od 3-5 plitkih režnjeva. Površina listova prekrivena je dlačicama, te su s donje strane crvenkaste boje (slika 4).



Slika 4. Izgled biljke *Veronica hederifolia* (Foto: Marija Nazlić)

2.4. Botanička pripadnost vrste: *Veronica serpyllifolia* L. (jajastolisna čestoslavica)

ODJELJAK: Spermatophyta (sjemenjače)

PODODJELJAK: Magnoliophytina (kritosjemenjače)

RAZRED: Magnoliatae (dvosupnice)

PODRAZRED: Asteridae

RED: Lamiales (medoćike)

PORODICA: Plantaginaceae

ROD: *Veronica*

VRSTA: *Veronica serpyllifolia* L.

AUTOR: Carl von Linneaus, Linne

2.4.1. Morfologija i rasprostranjenost

Jajastolisna čestoslavica je niska trajnica, naraste do 25 cm visine. Listovi su jajasti, narovašenog ili cjelovitog ruba. Gornji listovi su bez peteljke, dok su donji smješteni na kratkim peteljkama (slika 5) (<https://www.plantea.com.hr/cestoslavica/>).

Cvjetovi su bijeli sa ljubičastim oznakama. Sastoje se od 4 latice i rastu iz pazušca listova. Plod im je kapsularnog oblika, prekriven dlačicama ili spljošten srcolikog oblika (https://en.wikipedia.org/wiki/Veronica_serpyllifolia).



Slika 5. Izgled biljke *Veronica serpyllifolia* L. (Foto: Marija Nazlić)

2.5. Botanička pripadnost vrste: *Veronica urticifolia* Jacq. (širokolisna čestoslavica)

ODJELJAK: Spermatophyta (sjemenjače)

PODODJELJAK: Magnoliophytina (kritosjemenjače)

RAZRED: Magnoliatae (dvosupnice)

PODRAZRED: Asteridae

RED: Lamiales (medoćike)

PORODICA: Platanaceae

ROD: *Veronica*

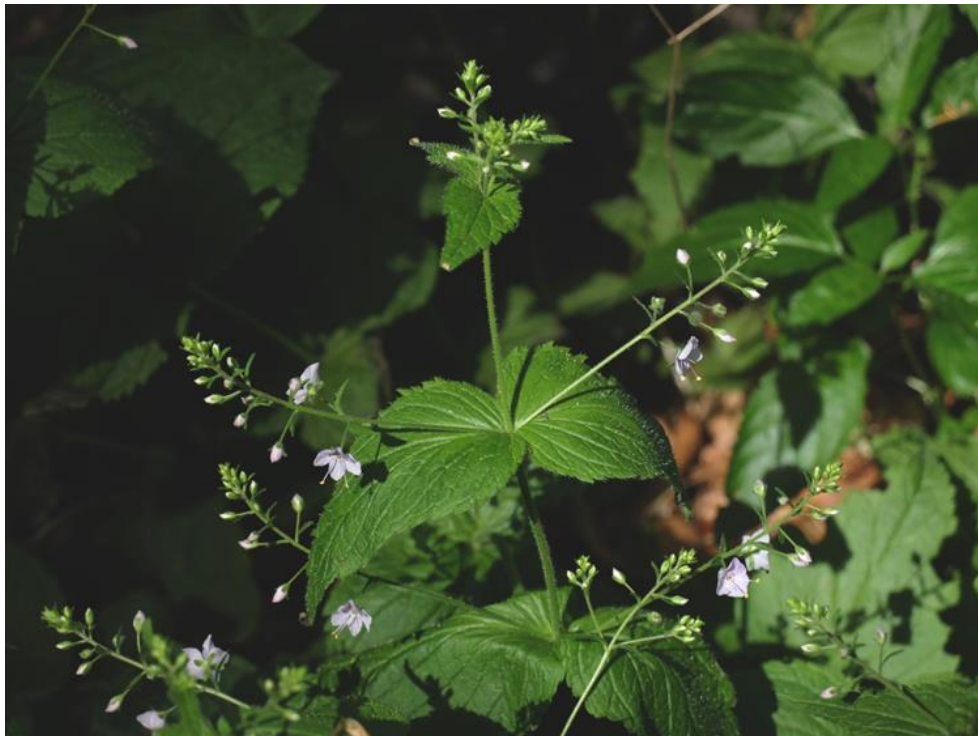
VRSTA: *Veronica urticifolia* Jacq.

AUTOR: Nicolaus Joseph von Jaquin

2.5.1. Morfologija i rasprostranjenost

Stabljika je jednostavna, uspravna ili uzdižuća. Može biti gola ili prekrivena dlačicama. Listovi su srcoliki, ovalni i jako nazubljeni. S obje strane listova nalaze se dlačice.

Gornji listovi srcolikom osnovom sjede na stabljici dok se donji listovi nalaze na kratkim peteljka. Cvjetovi su dvospolni, skupljeni u pazušcima listova u vršne cvatove. Plod je čahura veličine oko 4 mm te sadrži žute sjemenke (<https://www.plantea.com.hr/sirokolisna-cestoslavica/>).



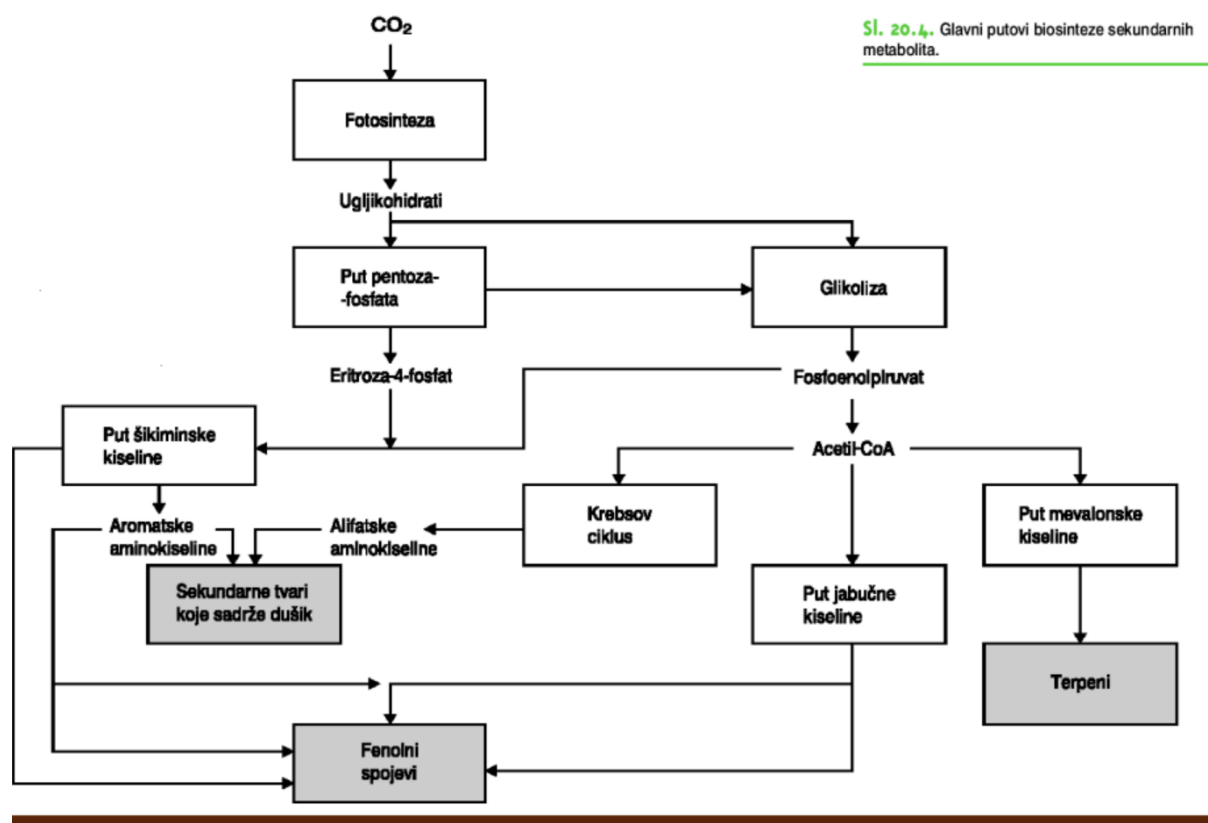
Slika 6. Izgled biljke *Veronica urticifolia* Jacq. (Foto: Dario Kremer)

2.6. Specijalizirani metaboliti

Specijalizirani metaboliti su tvari sintetizirane u biljkama sekundarnim reakcijama iz primarnih ugljikohidrata, aminokiselina i lipida. Nemaju ulogu u rastu i razvoju za razliku od primarnih metabolite, no utječu na interakciju između biljaka i okoliša.

Imaju veliku biološku važnost (antibiotici, insekticidi, herbicidi, pružaju zaštitu od herbivora i mikroorganizama, privlače oprašivače i imaju strukturnu ulogu).

Dijele se prema načinu biosinteze na: terpene, fenilpropanoide i srodne fenolne spojeve, spojeve s dušikom (slika 7) (Pevalek-Kozlina, 2003).



Slika 7. Glavni putevi biosinteze specijaliziranih metabolita (Pevalek-Kozlina, 2003)

2.7. Eterična ulja

Eterična ulja su mješavine složenih hlapljivih spojeva dobivenih sekundarnim metaboličkim putevima. Imaju važnu ulogu u obrani biljaka od nametnika. Također, imaju ulogu signalnih molekula za komunikaciju s drugim biljkama i korisnim kukcima.

Blagodati eteričnih ulja poznate su od davnina, a posljednjih godina se naročito proučavaju njihova antimikrobna i ljekovita svojstva (analgetsko, sedativno, spazmolitičko i protuupalno) (Proto i sur., 2022).

To su mješavine ugljikovodika i njihovih oksigeniranih derivata koji nastaju iz dva različita izopropanoidna puta. Proizvode ih žljezdani trihomi i druge sekretorne strukture, kao što su specijalizirana sekretorna tkiva rasprostranjena po površini biljnih organa osobito cvjetova i listova (Sharifi-Rad i sur., 2017).

2.8. Hidrolati

Hidrolati ili cvjetne vodice nastaju kao nusprodukti u proizvodnji eteričnih ulja. Sastoje se od destilacijske vode u kojoj ostaju raspršene male količine eteričnih ulja.

Imaju široku primjenu u kozmetici, poljoprivrednoj i prehrambenoj industriji, za inhibiciju razvoja patoloških mikroorganizama u hrani te za uklanjanje biofilmova koji predstavljaju prijetnju javnom zdravlju u hrani, lijekovima i kozmetici.

Zbog visokog antioksidativnog potencijala oni su sposobni inhibirati oksidacijske procese (Jakubczyk i sur., 2021).

2.9. Dobivanje eteričnih ulja i hidrolata

Izolacija slobodnih hlapljivih spojeva koji su važni specijalizirani metaboliti biljaka može biti rađena klasičnom ili zelenom ekstrakcijom.

Klasične tehnike izolacije uključuju destilaciju vodenom parom, hidrodestilaciju, destruktivnu destilaciju, hidrodifuziju i hladno prešanje.

Zelene tehnike ekstrakcije obuhvaćaju destilaciju potpomognutu ultrazvukom, turbo destilaciju, ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima i tehnologiju trenutnog kontroliranog pada tlaka (Dunkić i sur., 2022).

2.9.1. Vodena destilacija u aparaturi po Clevengeru

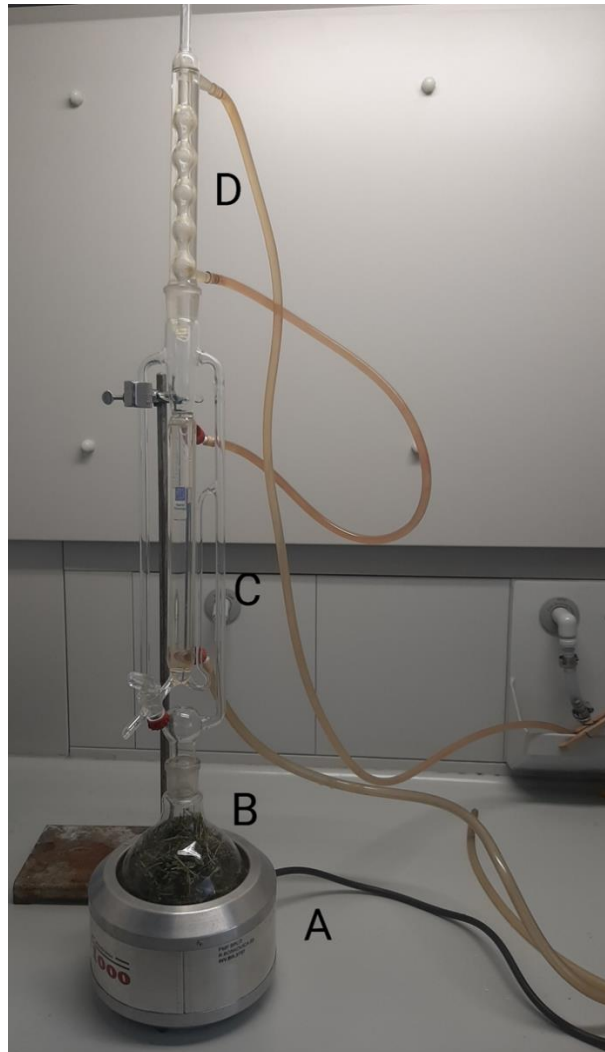
Clevenger aparatura ima tri glavna dijela: tikvicu s okruglim dnom u koju se stavlja organski materijal, kondenzator i separator za automatsko odvajanje destilirane vode (slika 8). Ekstrakcija ulja iz organskog izvora uključuje korištenje pare, a ona sprječava degradaciju eteričnog ulja.

Organski materijal se zajedno s vodom stavlja u tikvicu s okruglim dnom za kuhanje. Nastala para se podiže i sakuplja u malu biretu. Da bi se ulje ekstrahiralo potrebno je slijediti proces kuhanje-kondenzacija-dekantiranje.

Ove razine ekstrakcije ključne su za kontrolu kvalitete eteričnih ulja. U procesu hidrodestilacije vodena para i voda su glavni medij za izdvajanje bioaktivnih spojeva. Nedostatak ove metode je taj što eterično ulje mora biti manje gustoće od vode kako bi moglo plutati po njenoj površini, no s druge strane uz pomoć ove aparature se može ekstrahirati velika količina ulja u odnosu na druge tehnike izolacije

<https://scienceequip.com.au/blogs/news/what-is-clevenger-how-to-extract-organic-essential-oil-using-it-in-a-lab>).

Hidrolati nastaju kao nusprodukt izolacije eteričnih ulja. Voda isparava istovremeno s eteričnim uljem te se para kondenzira u dodiru s hladnim posudama ili cijevima. Ukapljene komponente se unutar sabirne firentinske posude razdvajaju u dvije faze eterično ulje i hidrolat (Aćimović i sur., 2022).



Slika 8. Prikaz aparature za vodenu destilaciju po Clevengeru (Akrap, 2021)

2.9.2. Izolacija mikrovalnom ekstrakcijom

Ekstrakcija je brza i učinkovita metoda razdvajanja i koncentriranja tvari, ona se temelji na različitoj topljivosti tvari u određenim otapalima koji se međusobno ne miješaju.

Mikrovalovi su dio elektromagnetskog zračenja frekvencije oko 2450 MHz u frekvencijskom rasponu 1 GHz do 300 GHz (Blekić i sur., 2011).

Kod mikrovalne ekstrakcije dolazi do promjene stanične strukture pod utjecajem mikrovalova (slika 9 i 10). Ova metoda je puno brža i ima veći prinos od konvencionalnih metoda, jer toplinski i maseni gradijent rade u istom smjeru.

Ekstrakcija bez otapala namijenjena je za odvajanje eteričnih ulja, pri čemu se biljni materijal stavlja u mikrovalni reaktor bez otapala ili vode.

Mikrovalovi zagrijevaju vodu unutar biljnih organa i uzrokuju njihovo pucanje i eterično ulje se oslobađa, ono isparava te se izvan reaktora kondenzira i odvaja. Kod mikrovalne ekstrakcije s otapalom, mikrovalovi isto uzrokuju pucanje biljnih organa pri čemu oslobođeno eterično ulje dolazi u doticaj s otapalom. Otapalo mora imati visoku dielektričnu konstantu (Kosir, 2017).

Jako je bitan odabir otapala, on ovisi o topljivosti željenog ekstrakta, o interakciji između matriksa i otapala i o svojstvima otapala određena dielektričnom konstantom.

Odabrano otapalo treba imati visoku dielektričnu konstantu i da dobro upija mikrovalove. Veoma dobra otapala koja se koriste u ovoj tehnici su etanol, metanol i voda, dovoljno su polarna da bi se mogli zagrijati mikrovalnom energijom. Temperatura također utječe na biljni materijal, povišenjem temperature se povećava ekstrakcijski učinak (Blekić i sur., 2011).



Slika 9. Prikaz uređaja za mikrovalnu ekstrakciju eteričnih ulja (Ethos X)



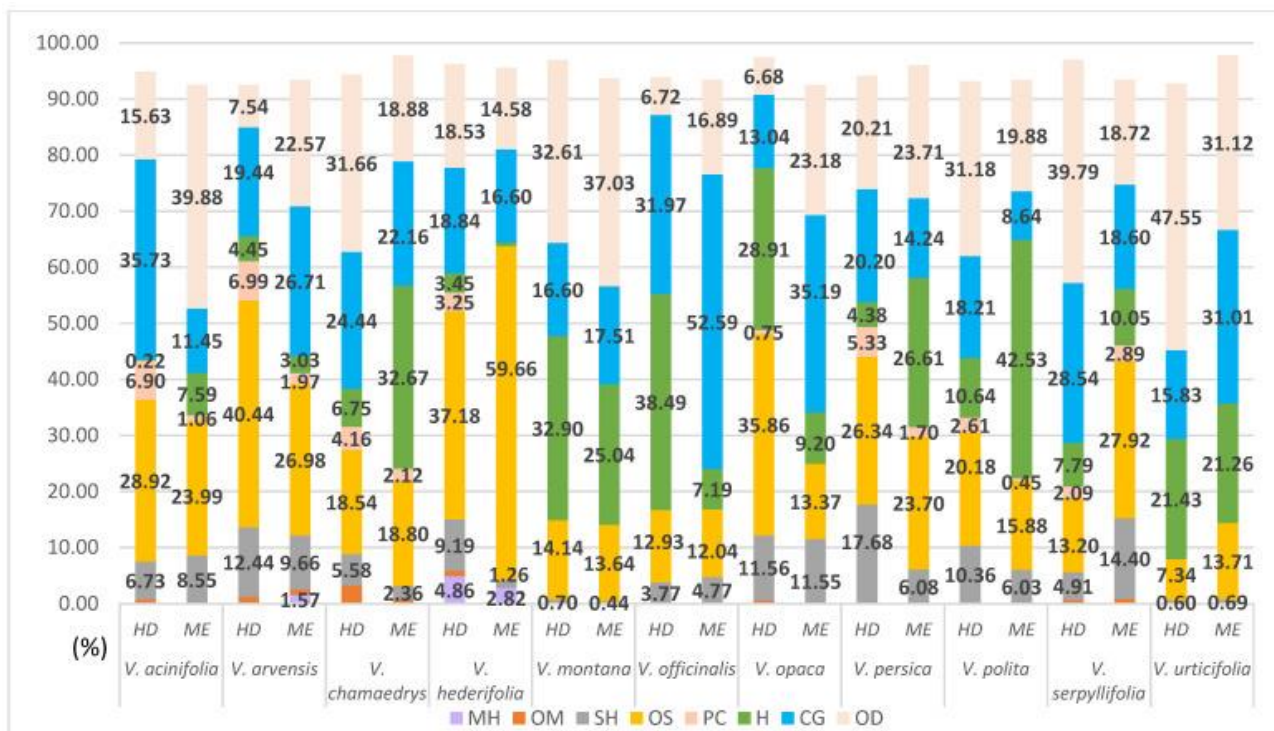
Slika 10. Unutrašnjost uređaja za mikrovalnu ekstrakciju

2.9.3. Sastav hlapljivih spojeva roda *Veronica*

Biljni materijal korišten za proučavanje je rod *Veronica* s umjerenih staništa (tablica 1). Pojam umjereno stanište obuhvaća vrste *Veronica* koje rastu u vinogradima (*V. acinifolia*), voćnjacima (*V. chamaedrys*), oranicama (*V. hederifolia*, *V. serpyllifolia*) i mezofilnim šumama bukve (*V. urticifolia*). Korištenjem hidrodestilacije po Clevengeru (HD) identificirani su spojevi prisutni kod svih vrsta: E-kariofilen, heksahidrofarnezil, fitol, aceton, kariofilen oksid, heksadekanska kiselina, β -ionon i dokozan (Dunkić i sur., 2022).

Analiza uzoraka ovih vrsta pokazala je da kod *V. acinifolia* prevladava β -ionon (17,01%), kariofilen oksid (7,71%) i heksahidrofarnezil aceton (15,37%). Vrsta *V. hederifolia* u svom sastavu najviše ima heksahidrofarnezil acetona (28,85%), specifičnost ove vrste je prisutnost α -tujena u postotku od 4,86% (slika 11) (Dunkić i sur., 2022).

Kod *V. chamaedrys* je u velikoj mjeri prisutan spoj γ -eudesmol (19,98%). Kod *V. chamaedrys*, *V. serpyllifolia* i *V. urticifolia* također je prisutan fitol, u najvećoj mjeri kod *V. urticifolia* (47,55%). Iste komponente izolirane hidrodestilacijom prevladavaju u sastavu hlapljivih spojeva izoliranih mikrovalnom ekstrakcijom (Dunkić i sur., 2022).



Slika 11. Relativni sadržaj hlapljivih spojeva u vrstama *Veronica* prikupljenim iz umjerenih staništa (MH, monoterpeni ugljikovodici; OM, oksigenirani monoterpeni; SH, seskviterpeni ugljikovodici; OS, oksigenirani seskviterpeni; PC, fenolni spojevi; H, ugljikovodici; CG, zajednička skupina kiselina, alkohola i estera; OD, oksigenirani diterpeni) (Dunkić i sur., 2022).

3. MATERIJALI I METODE

Tehnike korištene za izolaciju u ovom istraživanju za pet vrsta (*V. acinifolia*, *V. chamaedrys*, *V. hederifolia*, *V. serpyllifolia* i *V. urticifolia*) su hidrodestilacija po Clevengeru i mikrovalna ekstrakcija.

3.1. Biljni materijal

Tablica 1. Lokacije vrsta *Veronica* (Dunkić i sur., 2022)

Vrste	Mjesto	Zemljopisna širina	Zemljopisna dužina	Nadmorska visina (m)
<i>V. acinifolia</i>	Donji Karin	44°07'18.1" N	15°36'13.7" E	119
<i>V. chamaedrys</i>	Radoboj	46°09'49.4" N	15°55'36.1" E	260
<i>V. hederifolia</i>	Zagreb	45°49'40.4" N	15°58'59.6" E	192
<i>V. serpyllifolia</i>	Zagreb	45°49'40.3" N	15°58'59.5" E	192
<i>V. urticifolia</i>	planina Plešivica	45°45'05.7" N	15°42'28.3" E	350

3.2. Eksperimentalni dio

Pet uzoraka hidrolata dobiveni su destilacijom po Clevengeru i mikrovalnom ekstrakcijom.

Postupak:

U svrhu izračuna masenih koncentracija hlapljivih tvari u hidrolatima ekstrahirale su se hlapljive tvari pomoću organskih otapala. U lijevak za ekstrakciju se dodalo 2 ml uzorka hidrolata, 1 ml dietil-etera i 2 ml pentana. Uzorak se ekstrahirao te su se odvojila dva sloja, gornji sloj hlapljivih tvari otopljenih u organskim otapalima i donji vodeni sloj (slika 12).

Potom se taj vodeni sloj ispusti, a otopljene hlapljive tvari se prebace u staklenu bočicu. Ovako pripremljeni uzorci se stave u hladnjak na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ kako bi se višak vode zaledio. Sljedeći korak je prebacivanje nezaleđenog dijela u prethodno izvaganu staklenu bočicu. Na ovaj način smo uklonili vodu iz željenog uzorka.

Zadnji korak je otparavanje otapala pri sobnoj temperaturi, pri čemu u bočici ostaju samo hlapljivi spojevi. Ovakav uzorak ponovno važno na analitičkoj vagi. Od masa bočice sa uzorkom se oduzme masa prazne bočice te se dobije masa hlapljivih spojeva u 2 mL hidrolata. Iz dobivene mase se izračuna masena koncentracija hlapljivih spojeva u hidrolatima te se usporede vrijednosti dobivene dvjema tehnikama.



Slika 12 . Lijevak za odjeljivanje sa hidrolatom i vodenim slojem

4. REZULTATI

Iz rezultata prikazanih u Tablici 2. može se zaključiti da se kod vrsta *V. acinifolia* i *V. urticifolia* dobije veća masena koncentracija hlapljivih spojeva u hidrolatima nego mikrovalnom ekstrakcijom u odnosu na masenu koncentraciju dobivenu metodom po Clevengeru.

Kod *V. chamaedrys*, *V. hederifolia*, *V. serpyllifolia* dobila se veća masena koncentracija hlapljivih spojeva u hidrolatima metodom po Clevenger-u u odnosu na masenu koncentraciju dobivenu mikrovalnom ekstrakcijom.

Tablica 2. Dobivene masene koncentracije hidrolata

Biljna vrsta	Masa uzorka(mg) Destilacija po Clevengeru	Masa uzorka(mg) Mikrovalna ekstrakcija	Masena koncentracija Clevenger(mg/ml)	Masena koncentracija mikrovalna ekstrakcija (mg/ml)
<i>V. acinifolia</i>	4,95	26,74	2,75	13,37
<i>V. chamaedrys</i>	10,05	9,7	5,025	4,85
<i>V. hederifolia</i>	41,46	0,69	20,73	0,345
<i>V. serpyllifolia</i>	123,18	7,53	61,59	3,765
<i>V. urticifolia</i>	17,08	18,55	8,54	9,275

5. RASPRAVA

Rod *Veronica* sadrži 13 podrodova i pripada porodici Plantaginaceae. Vrste umjerenog staništa dijele zajednička morfološka obilježja. Kod svih pet vrsta analiziranih u ovom radu (*V. acinifolia*, *V. chamaedrys*, *V. hederifolia*, *V. serpyllifolia* i *V. urticifolia*) stabljika je jednostavna uzdižuća ili polegnuta, prekrivena dlakama ili gola. Listovi su jajasti, cjelovitog ruba ili nazubljeni. Izgled i raspored cvjetova se razlikuje kod pojedinih vrsta. Cvjetovi su skupljeni u vršne cvatove kod vrste *V. urticifolia*. Vrsta *V. serpyllifolia* ima cvjetove sa bijelo-ljubičastim oznakama koji rastu iz pazuša listova. Vrsta *V. hederifolia* ima plave cvjetove koji rastu u pazušcima zelenih ili smeđih stabljika. Vrsta *V. chamaedrys* ima cvjetove skupljene u grozdaste cvatove, a kod *V. acinifolia* su cvjetovi ljubičasto-plavi.

Postoje brojne tehnike ekstrakcije slobodnih hlapljivih spojeva. Najčešće korištene su klasična i zelena ekstrakcija. Zahvaljujući različitim tehnikama, omogućena je izolacija točno određenih spojeva.

Po dobivenim rezultatima u ovom radu ne može se reći koja je tehnika ona kojom se dobije veća ukupna količina izoliranih hlapljivih spojeva u hidrolatima. Rezultat je sljedeći : kod vrsta *V. acinifolia* i *V. urticifolia* je dobivena veća masena koncentracija hidrolata nego hidrodestilacijom po Clevengeru. Kod vrsta *V. chamaedrys*, *V. hederifolia*, *V. serpyllifolia* je dobivena veća masena koncentracija hidrolata hidrodestilacijom po Clevengeru.

Usporedivši druga istraživanja izolacije hidrolata nema velike razlike u ukupnoj količini izoliranih komponenti korištenjem mikrovalne ekstrakcije i hidrodestilacije po Clevengeru (tablica 2). Prema pregledu literature iz rezultata nekih radova može se reći da svaka metoda ima svoje prednosti i mane, svakom metodom je moguće dobiti veću količinu određenih spojeva (Idris i Nadzir, 2021; Stashenko i sur., 2004).

Uspoređujući izolirane komponente kod vrste *V. acinifolia* vidljivo je da je velika razlika izoliranih zajedničkih skupina kiselina alkohola i estera. Hidrodestilacijom ih se izoliralo 35,73%, a mikrovalnom ekstrakcijom 11,73%. Velika je razlika i u količini dobivenih fenolnih spojeva, 15,63% vodenom destilacijom (HD) i 39,88% mikrovalnom ekstrakcijom (ME). Kod

vrste *V.chamaedrys* vidljiva je najveća razlika u postotku izoliranih ugljikovodika 6,75% (HD) i 32,67% (ME). Vrsta *V.hederifolia* ima veliku razliku oksigeniranih seskviterpena 37,18% (HD) i 59,66% (ME) (Dunkić i sur., 2022).

Kod analiziranih uzoraka vrste *V. serpyllifolia* ustanovljena je velika razlika u količini fenolnih spojeva 39,79% (HD) a 18,72% (ME), kod vrste *V.urticifolia* je velika razlika u zajedničkim kiselinama alkoholima i esterima 15,83% (HD) i 31,01% (ME). Spojevi u sastavu monoterpenskih ugljikovodika su najmanje identificirani, a najviše kod vrste *V. hederifolia* objema metodama destilacije (Dunkić i sur., 2022). Uspoređujući s drugim radovima koji su koristili ove tehnike izolacije, primjerice istraživanje Idris i suradnika (2021), pokazano je da mikrovalna ekstrakcija ima veću stopu prinosa produkta kod vrste *Centella asiatica*. Ekstrakti dobiveni mikrovalnom ekstrakcijom imali su 26% povećanja prinosa triterpenoidni saponini i 8% povećanja sadržaja saponina. Vodenom destilacijom dobiveno je više seskviterpenskih ugljikovodika. Identificirane su 43 komponente koje predstavljaju 98,60% sastava ulja. Vodena destilacija izvrsna je metoda za izolaciju kariofilena i monoterpenoidih ugljikovodika iz vrste *C. asiatica*. Pronađena su 54 sastojka što predstavlja 98,29% ukupnog sastava ulja. Međutim, ova tehnika troši puno vode, osim što troši i puno energije i vremena. Mikrovalna ekstrakcija s druge strane ima veću stopu ekstrakcije i proizvodi kvalitetnije proizvode uz niže troškove (Idris i Nadzir, 2021).

6. ZAKLJUČAK

U ovom završnom radu uspoređene su dobivene masene koncentracije mikrovalnom ekstrakcijom i hidrodestilacijom po Clevengeru. Po rezultatima ne možemo jednoznačno tvrditi da se jednom ili drugom tehnikom može dobiti veća masena koncentracija lako hlapljivih komponenti. Gledajući koja je tehnika bolja, može se reći da je mikrovalna ekstrakcija brža i efikasnija, te se štedi voda i energija. Hidrolati su veoma obećavajući nusprodukti destilacije, sadrže brojne korisne komponente koja imaju antiviralno, antibiotsko i antioksidacijsko djelovanje. Njihova široka primjena u brojnim aspektima života ljudi zasigurno obećava da će se u budućnosti još više istraživati ove hvale vrijedne supstancije.

7. LITERATURA

1. Aćimović, M.; Šovljanski, O.; Šeregelj, V.; Pezo, L.; Zheljazkov, 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. Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian journal of food science and technology* **2011**, *3*(1), 32-47.
4. 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.
5. Idris, F.N.; Mohd Nadzir, M. Comparative Studies on Different Extraction Methods of *Centella asiatica* and Extracts Bioactive Compounds Effects on Antimicrobial Activities. *Antibiotics* **2021**, *10*, 457.
6. Jakubczyk K., Tuchowska A., Janda-Milczarek K., Plant hydrolates – Antioxidant properties, chemical composition and potential applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 142, **2021**, 112033.
7. Kosir, D. (2017.). Ekstrakcija eteričnog ulja i koncentrata iz smilja, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
8. Nazlić, M.; Fredotović, Ž.; Vuko, E.; Vuletić, N.; Ljubenković, I.; Kremer, D.; Jurišić Grubešić, R.; Stabentheiner, E.; Randić, M.; Dunkić, V. Free Volatile Compounds of *Veronica austriaca* ssp. *jacquinii* (Baumg.) Eb. Fisch. and Their Biological Activity. *Plants* **2021**, *10*, 2529.
9. Pevalek-Kozlina B. (2003.). Fiziologija bilja. Profil, Zagreb
10. Proto, M.R.; Biondi, E.; Baldo, D.; Levoni, M.; Filippini, G.; Modesto, M.; Di Vito, M.; Bugli, F.; Ratti, C.; Minardi, P.; Mattarelli, P. Essential Oils and Hydrolates: Potential Tools for Defense against Bacterial Plant Pathogens. *Microorganisms* **2022**, *10*, 702.
11. Salehi, B.; Shivaprasad Shetty, M.; V. Anil Kumar, N.; Živković, J.; Calina, D.; Oana Docea, A.; Emamzadeh-Yazdi, S.; Sibel Kılıç, C.; Goloshvili, T.; Nikola, S.; Pignata, G.; Šaropov, F.; del Mar Contreras, M.; C. Cho, W.; Martins, N.; Sharifi-Rad, J.

- Veronica Plants—Drifting from Farm to Traditional Healing, Food Application, and Phytopharmacology. *Molecules* **2019**, *24*, 2454.
12. Sharifi-Rad, J.; Sureda, A.; Tenore, G.C.; Daglia, M.; Sharifi-Rad, M.; Valussi, M.; Tundis, R.; Sharifi-Rad, M.; Loizzo, M.R.; Ademiluyi, A.O.; Sharifi-Rad, R.; Ayatollahi, S.A.; Iriti, M. Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. *Molecules* **2017**, *22*, 70.
 13. Stashenko E.E., Jaramillo B.E., Martinez J.R. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of Chromatography Application* **2004**, *1025*(1), 93-103.

Mrežne stranice:

14. <https://www.infoflora.ch/en/flora/veronica-acinifolia.html>
15. <https://www.plantea.com.hr/dvorednodlakava-cestoslavica/>
16. <https://plants.ces.ncsu.edu/plants/veronica-hederifolia/>
17. <https://www.plantea.com.hr/cestoslavica/>
18. https://en.wikipedia.org/wiki/Veronica_serpyllifolia
19. <https://www.plantea.com.hr/sirokolisna-cestoslavica/>
20. <https://scienceequip.com.au/blogs/news/what-is-clevenger-how-to-extract-organic-essential-oil-using-it-in-a-lab>