

Određivanje najučinkovitije metode ekstrakcije te otapala za izolaciju fenolnih spojeva iz vrsta *Veronica polita* L. i *Veronica chamaedrys* L.

Lauc, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:166:331389>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Splitu

Prirodoslovno- matematički fakultet

Odjel za biologiju

**ODREĐIVANJE NAJUČINKOVITIJE METODE
EKSTRAKCIJE TE OTAPALA ZA IZOLACIJU FENOLNIH
SPOJEVA IZ VRSTA**

Veronica polita L. i Veronica chamaedrys L.

Završni rad

Split, rujan, 2023.

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno- matematički fakultet
Odjel za biologiju

**ODREĐIVANJE NAJUČINKOVITIJE METODE
EKSTRAKCIJE TE OTAPALA ZA IZOLACIJU FENOLNIH
SPOJEVA IZ VRSTA**

Veronica polita L. i Veronica chamaedrys L.

Završni rad

Mentor: prof.dr.sc. Valerija Dunkić

Student: Marija Lauc

Split, rujan 2023.



Ovaj rad je izrađen u Splitu 2023. 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 dr.sc. Ivane Vrca. Završni rad je predan na ocjenu Odjelu za biologiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnice biologije (*univ. bacc. biol.*).

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu

Završni rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za biologiju

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

ODREĐIVANJE NAJUČINKOVITIJE METODE EKSTRAKCIJE TE OTAPALA ZA IZOLACIJU FENOLNIH SPOJEVA IZ VRSTA *Veronica polita* L. i *Veronica chamaedrys* L.

Marija Lauc

Rod *Veronica* pripada porodici Plantaginaceae te broji preko 200 vrsta. Široka rasprostranjenost ali i razni dobrobiti za zdravlje, koje dolaze ponajprije od sekundarnih metabolita, stavljaju ovaj rod u centar raznih medicinskih, farmakoloških i bioloških istraživanja. Glavni cilj ovog rada bio je istražiti koje metode ekstrakcije te koja otapala su najučinkovitija za ekstrakciju fenolnih spojeva iz vrsta *Veronica chamaedrys* L. i *Veronica polita* L. Od metoda ekstrakcije ispitivane su: maceracija, dekokcija te ekstrakcija ultrazvučnom kupelji na 25 °C i 40 °C. Za otapala korišteni su: destilirana voda, 80%-tni etanol te metanol.

Ključne riječi: *V. polita*, *V. chamaedrys*, fenolni spojevi, ekstrakcija ultrazvučnom kupelji, maceracija, dekokcija, destilirana voda, 80%-tni etanol, metanol.

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

Rad sadrži: 26 stranica, 17 slika, 2 tablice i 28 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Mentor: prof. dr.sc. Valerija Dunkić

Neposredni voditelj: dr.sc. Ivana Vrca

Ocjenjivači:

prof.dr.sc. Valerija Dunkić,

dr. sc. Ivana Vrca

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

Rad prihvaćen: Rujan 2023.

Basic documentation card

University of Split

Bachelor Thesis

Faculty of Science

Department of Biology

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

DETERMINATION OF THE MOST EFFICIENT EXTRACTION METHOD AND SOLVENTS FOR THE ISOLATION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM THE SPECIES

Veronica polita L. and *Veronica chamaedrys* L.

Marija Lauc

The genus *Veronica* belongs to the Plantaginaceae family and has over 200 species. Wide distribution but also various health benefits, which come primarily from secondary metabolites, put this genus at the center of various medical, pharmacological and biological research. The main goal of this work was to investigate which extraction methods and which solvents are the most effective for the extraction of phenolic compounds from the species *Veronica chamaedrys* L. and *Veronica polita* L. The examined extraction methods are: maceration, decoction and extraction with an ultrasonic bath at 25 °C and 40 °C. The following solvents were used: distilled water, 80% ethanol and methanol.

Key words: *V. polita*, *V. chamaedrys*, phenolic compounds, ultrasonic bath extraction, maceration, decoction, distilled water, 80% ethanol, methanol.

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

Thesis consist of: 26 pages, 17 figures, 2 tables and 28 references. Original language is Croatian.

Supervisor: Prof. Valerija Dunkić, PhD

Assistant Supervisor: Ivana Vrca, PhD

Reviewers:

Prof. Valerija Dunkić, PhD

Ivana Vrca, PhD

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

Thesis accepted: September 2023.

Izjava

kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam završni rad s naslovom ODREĐIVANJE NAJUČINKOVITIJE METODE EKSTRAKCIJE TE OTAPALA ZA IZOLACIJU FENOLNIH SPOJEVA IZ VRSTA *Veronica polita* L. i *Veronica chamaedrys* L. 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

Marija Lauc

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1 Rod <i>Veronica</i>	2
2.1.1 <i>Veronica polita</i> L.	3
2.1.2 <i>Veronica chamaedrys</i> L.	3
2.2 Sekundarni biljni metaboliti	4
2.2.1 Terpeni	6
2.2.2 Spojevi koji sadrže dušik.....	6
2.2.3 Fenolni spojevi	6
2.2.3.1 Jednostavni fenoli	8
2.2.3.2 Lignin.....	8
2.2.3.3 Flavonoidi	9
2.2.3.4 Tanini.....	10
2.3 Ekstrakcija otapalima	10
2.4 Tehnike izolacije i identifikacije	11
2.4.1 Maceracija.....	11
2.4.2 Dekokcija	11
2.4.3 Ekstrakcija ultrazvukom	12
2.5 Tehnike uparavanja.....	12
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1 Biljni materijal	13
3.2 Uređaji i kemikalije	13
3.3 Priprema biljnog materijala za tehnike ekstrahiranja	14
3.3.1 Ekstrahiranje fenolnih spojeva ultrazvukom	15
3.3.2 Maceracija	16
3.3.3 Dekokcija	17
3.4 Uparavanje otapala	17
4. Rezultati i rasprava	19
5. ZAKLJUČAK	23
LITERATURA.....	24

1. UVOD

U ovom radu korištene su vrste *Veronica chamaedrys* L. i *Veronica polita* L. koje pripadaju rodu *Veronica* iz porodice Plantaginaceae. Vrste roda *Veronica* široko su rasprostranjene sa širokim spektrom uporabe. U ovom istraživanju glavnu ulogu imale su tehnike ekstrakcija i odabir otapala za izolaciju fenolnih spojeva. Uloga im je raznovrsna, od pružanja zaštite od herbivora i mehaničke potpore do privlačenje oprašivača. Kroz ovaj rad prikazane su određene metode ekstrakcije fenolnih spojeva iz biljnih materijala kao što su ekstrakcija potpomognuta ultrazvučnom kupelji (pri dvije različite temperature), maceracija te dekokcija. Ekstrakcija je provedena i u tri različita otapala: destilirana voda, 80 %-tni etanol te metanol.

Cilj istraživanja bio je odrediti s kojom metodom i kojim otapalom će se postići najveći prinos suhog ekstrakta koji sadrži fenolne spojeve.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Rod *Veronica*

Rod *Veronica* (čestoslavica) u prošlosti je bio svrstavan u porodicu Scrophulariaceae, a u zadnjih dvadeset godina došlo je do velikog broja istraživanja koja su dovela do taksonomskih promjena te svrstale ovaj rod u porodicu Plantaginaceae (Dunkić i sur., 2022). Ta porodica ima 120 biljnih rodova, a najveći broj vrsta, čak preko 200 pripada rodu *Veronica*. Najzastupljeniji je na sjevernoj polutci te u Australskoj regiji (Australija, Novi Zeland, Nova Gvineja). Vrste roda *Veronica* česte su i u Mediteranskom dijelu Sredozemlja, sve od mora pa do visokih alpskih uzvisina (Salehi i sur., 2019), stoga ne čudi da u Hrvatskoj imamo preko 30 vrsta. Upravo ta široka rasprostranjenost biljaka ovog roda svrstala ih je u jedne od najkorištenijih biljnih vrsta u medicinskoj primjeni. Između ostalog, ekstrakti biljke *Veronica* pokazuju antioksidativno, antimikrobno, antifungalno, protuupalno, skolicidno i antikancerogeno djelovanje (Sharifi-Rad i sur., 2018). Još u davnoj prošlosti ljudi su bili svjesni tih dobrobiti za ljudsko zdravlje te su ih koristili za liječenje gripe, respiratornih bolesti, kašlja, hernije, raka, edema i raznih rana (Xue i sur., 2019). Na području Balkana jedna od najpoznatijih vrsta bila je *Veronica officinalis* L. koja se koristila za liječenja različitih bolesti jetre, ekcema, čireva pa čak i zmijskih ugriza (Kwak i sur., 2009). Sve navedeno ovaj rod stavlja u centar raznih medicinskih, farmakoloških i bioloških istraživanja.

Botanička pripadnost roda *Veronica*:

- ODJELJAK: Spermatophyta (sjemenjače)
- PODODJELJAK: Magnoliophytina (kritosjemenjače)
- RAZRED: Magnoliatae (dvosupnice)
- PODRAZRED: Asteridae
- RED: Lamiales (medicinske)
- PORODICA: Plantaginaceae (trpučevke)
- ROD: *Veronica*
- AUTOR: Carl von Linneaus, Linne

2.1.1 *Veronica polita* L.

Veronica polita L. (u narodu poznatija kao siva poljska vrtnica) jednogodišnja je zeljasta cvjetnica iz porodice trputaca (Plantaginaceae) (Slika 1). Podrijetlom je iz jugozapadne Azije, ali je danas naturalizirana širom svijeta (Jia i sur., 2022). Korijen joj je kratak, stabljika visine do 25 cm, leži na zemlji ili se blago uzdiže te je od tla bogato razgranata. Listovi su brojni i nalaze se na kratkoj lisnoj peteljci, cjeloviti, na rubu blago urezani, tamno zelene boje, dok su cvjetovi pojedinačni, nebesko plavi u pazušcu lista (<https://onlineherbar.bio.bg.ac.rs/181.html>). Ova biljka se dugo koristi u tradicionalnoj kineskoj medicini za liječenje dismenoreje, metroragije te malarije. Važna su i njezina protuupalna i antioksidativna svojstva, ali i ekonomska vrijednost te primjena u ekologiji i farmaciji (Jia i sur., 2022).

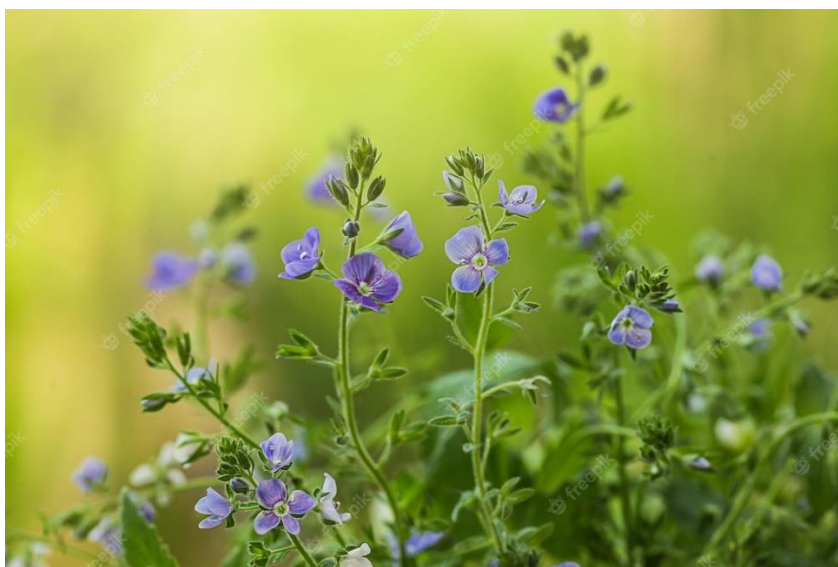


Slika 1. *Veronica polita* L. (izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Veronica_polita)

2.1.2 *Veronica chamaedrys* L.

Veronica chamaedrys L. (u narodu poznata kao dvorednodlakava čestoslavica) višegodišnja je zeljasta biljka (Slika 2). Stabljika je polegnuta ili pridignuta, razgranata, jednostavna i prekrivena dlakama u dva reda. Listovi su sitni, nasuprotni, dlakavi po naličju, jajastog oblika sa pilastim rubom. Cvjetovi su dvospolni, na dlakavim stapkama i čine grozdasti cvat. Plod je

dlakavi tobolac, bočno spljošten u kojem se nalaze sitne jajolike i glatke sjemenke
<https://www.plantea.com.hr/dvorednodlakava-cestoslavica/>.

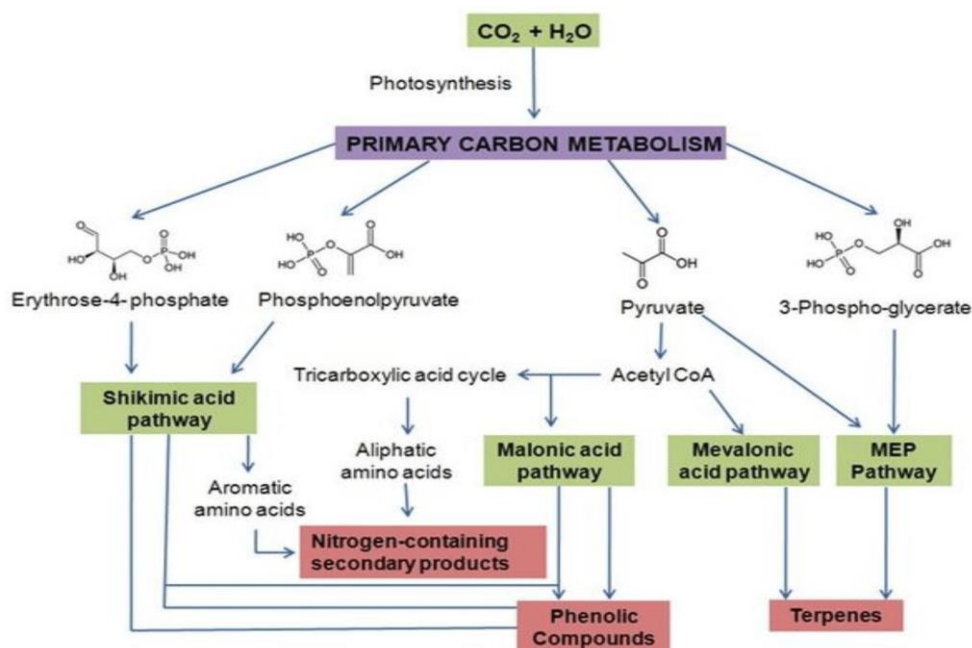


Slika 2. *Veronica chamaedrys* L. (izvor: https://www.freepik.com/premium-photo/blue-flowers-germander-speedwell-veronica-chamaedrys-wild-herbs_27863324.htm)

2.2 Sekundarni biljni metaboliti

Na staništima na kojima žive, biljke su izložene raznim predatorima i patogenima kao što su razne vrste bakterija, gljiva i virusa koji su široko rasprostranjeni u gotovo svim ekosustavima. Od svih tih patogena, ali i raznih herbivora, biljke kao nepokretni organizmi ne mogu pobjeći te su tijekom evolucije, zahvaljujući nasljednim mutacijama i prirodnoj selekciji razvile razne prednosti (Pevalek-Kozlina, 2003). Veliku ulogu u zaštiti imaju periderma i kutikula koje ne samo da štite biljku od pretjeranog isparavanja vode, već su i svojevrsna barijera za ulaz gljiva i bakterija. Razne biljke imaju trnove, žareće dlake ili zadebljale dijelove lista koje ih brane od predatora. Uz sve to biljke su razvile i sekundarne metabolite (Pevalek-Kozlina, 2003). To su organske tvari koje su proizvedene u samoj biljci kako bi ju učinile kompetitivnom u njezinom okolišu. Različite studije su dokazale kako se sekundarni metaboliti prenose preko vezikula, jednostavnom difuzijom ili pomoću proteina koji su odgovorni za transport (Akrap, 2021). Glavna uloga sekundarnih metabolita je da obrane biljku od nametnika i raznih bolesti. Tu su prednost za biljku prepoznali ljudi te su danas sekundarni metaboliti važni u proizvodnji

lijekova. U biljnom carstvu otkriveno je do 2015. godine oko 50 000 biljnih sekundarnih metabolita (Teoh, 2015). Za razliku od primarnih metabolita (klorofil, aminokiseline, nukleotidi, ugljikohidrati...) (Pevalek-Kozlina, 2003) sekundarni metaboliti nemaju nikakvu ulogu u procesima fotosinteze, disanja, prijenosu otopljenih tvari ili diferencijaciji. Oni nastaju od prekursora primarnih metabolita (Akrap, 2021). Posebni su također i po svojoj ograničenoj raspodjeli u biljnom carstvu (Pevalek-Kozlina, 2003), što je u prošlosti potaklo razne znanstvenike na istraživanje sekundarnih metabolita, kako bi se lakše determinirale biljne vrste (Teoh, 2015). Uz sve navedene prednosti za same biljke i ljude, sekundarni metaboliti su od velike važnosti i za životinje. Naime, u nižim dozama i koncentracijama mogu imati potpuno blagotvoran utjecaj na ishranu i zdravlje životinja (Rogošić i sur., 2013). Na temelju načina biosinteze, sekundarne metabolite dijelimo u tri velike skupine: terpene, fenolne spojeve i spojeve koje sadrže dušik (Slika 3). Terpeni su lipidi koji se sintetiziraju iz acetil-CoA putem mevalonske kiseline. Spojevi koji sadrže dušik sintetiziraju se iz aminokiselina, dok najvažnije u ovom radu, fenole, dobijemo putem šikiminske ili jabučne kiseline.



Slika 3. Putevi sinteze sekundarnih biljnih metabolita (izvor: <https://www.mdpi.com/2037-0164/13/1/3>)

2.2.1 Terpeni

Terpeni ili terpenoidi su najveća skupina sekundarnih metabolita. Netopivi su u vodi te se sintetiziraju iz izopentenskih jedinica (sadrže 5 C atoma), često nazvanih izoprenskim (Pevalek-Kozlina, 2003). Biosinteza terpena počinje spajanjem triju molekula acetyl-CoA čime nastaje mevalonska kiselina. Mnogi terpeni imaju važne uloge u rastu i razvoju biljke, štiteći je od raznih biotičkih i abiotičkih stresova a važni su i u interakciji sa drugim organizmima na primjer kukcima (Rosenkranz, 2021). Brojnim studijama utvrđeno je da antimikrobno djelovanje terpena smanjuje *in vitro* probavljivost u preživača. Također, visok sadržaj terpena i njihovih ekstrakata u pojedinim grmovima dokazano negativno utječe na unos hrane, probavljivost i proizvodnu sposobnost životinja (Rogošić i sur., 2013). Na osnovi broja izoprenskih jedinica terpene dijelimo na: monoterpene (limonen, mentol, micen, α - i β - pinen), seskviterpene (kostunolid, gosipol, timol, geraniol), diterpene (abietinska kiselina, forbol, taksol), triterpene (steroidi, limonidi, glikozidi) i politerpene (guma).

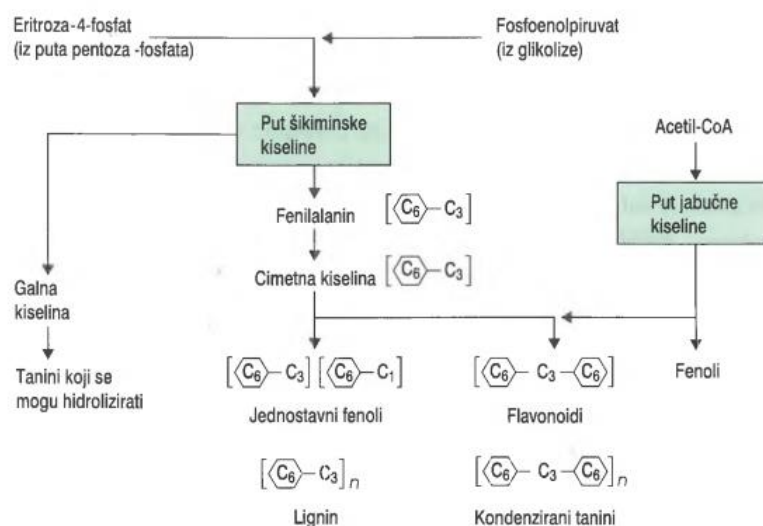
2.2.2 Spojevi koji sadrže dušik

Sekundarni metaboliti koji sadrže dušik sintetiziraju se iz alifatskih (Lys, Asp i ornitin) i aromatskih (Tyr i Trp) aminokiselina (interna skripta, Dunkić). U većim količinama otrovni su za ljude, ali u manjim dozama služe kao lijekovi (Pevalek-Kozlina, 2003), npr. alkaloidi se primjenjuju u medicinske svrhe dugi niz godina. U prošlosti su korišteni kao purgativi, sedativi, za liječenje ugriza zmije te spuštanje povišene tjelesne temperature (Akrap, 2021). U sekundarne metabolite s dušikom ubrajamo: alkaloide (atropin, koniin, kokain, nikotin, kofein, morfin, kodein, atropin, efedrin), cijanogene glikozide (durin, amigdalin), glukozinolate, neproteinske aminokiseline (kanavanin) te obrambene proteine.

2.2.3 Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su izrazito raznolika skupina sekundarnih biljnih metabolita te ih nalazimo otopljene u vakuoli ili u obliku glikozida ili estera šećera. To su aromatski ili alifatski spojevi s najmanje jednim aromatskim prstenom na koji je vezana jedna ili više OH skupina. Ovisno o

građi mogu biti topivi samo u organskim otapalima, neki u vodi, a neki su veliki netopivi polimeri. Glavne uloge fenolnih spojeva za biljku su zaštita od herbivora, mehanička potpora, privlačenje oprašivača, rasprostranjivanje ploda ili redukcija rasta susjednih biljaka (alelopatija) (Pevalek-Kozlina, 2003). Zadnja istraživanja dokazuju i važnost fenolnih spojeva i na zdravlje ljudi. Naime, fenolni spojevi imaju antioksidativna, antibakterijska, protutumorska, protuupalna svojstva dok određeni pokazuju i veliku učinkovitost u zaštiti kože od sunca ili zaštitu kardiovaskularnog sustava. Za vrijeme pandemije korona virusa neki fenolni spojevi predloženi su kao mogući lijekovi, npr. kurkumin, kavina ili galna kiselina (Sun i sur., 2023). Postoje dva najvažnija puta biosinteze fenolnih spojeva. Prvi put je preko šikiminske kiseline i puno je značajniji za biljke (Slika 4). Put započinje jednostavnim ugljikohidratom koji se nastavlja do aromatskih aminokiselina (fenilalanina i tirozina). U tom putu ključan je enzim fenilalanin-amonij-lijaza (PAL) koji potiče konverziju fenilalanina u trans-cimetnu kiselinu. Na taj enzim djeluju i vanjski i unutarnji čimbenici pa na primjer gljivična infekcija biljke potiče njegovu sintezu i samim tim veću količinu fenolnih spojeva u biljci. Ovaj biosintetski put naziv je dobio po međuspoju šikiminskoj kiselini koja je prisutna u biljkama, gljivama i bakterijama no ne i u životinjama. Razni herbicidi kao što je na primjer Round-up djeluje upravo na zaustavljanje tog puta. Drugi put biosinteze je put jabučne kiseline i značajniji je za gljive i bakterije (Slika 4). Podijeljeni su u različite skupine ovisno o broju fenolnih prstenova koje posjeduju (Sun i sur., 2023) na: jednostavne fenole, lignin, flavonoide i tanine.



Slika 4. Sinteza fenolnih spojeva (izvor: Fiziologija bilja, Pavalek-Kozlina, 2003)

2.2.3.1 Jednostavni fenoli

Jednostavni fenoli imaju važnu ulogu u zaštiti biljke od herbivornih kukaca i gljiva (Pevalek-Kozlina, 2003). U jednostavne fenole prisutne u biljkama ubrajamo:

- Jednostavne fenilpropane: npr. trans-cimetna, kavina i ferulinska kiselina. Ova skupina fenola često djeluje inhibirajuće na rast susjednih biljaka.
- Fenilpropanske laktone ili kumarine: npr. umbeliferon i psoralen. Psoralen je furanokumarin koji nije otrovan dok ga ne aktivira svjetlost, tada postaje fototoksičan. Djelovanjem svjetlosti iz UV-A regije prevodi se u visokoenergizirano stanje te se može ugrađivati u DNA zavojnicu i izazivati smrt.
- Derivate benzojeve kiseline: nastaju iz fenilpropanoida. Neki od poznatijih su vanilin i salicilna kiselina koja ima ulogu zaštititi biljku od patogena, a danas je prisutna i u farmakologiji (Pevalek-Kozlina, 2003).

2.2.3.2 Lignin

Lignin je druga najzastupljenija organska tvar u biljkama, odmah nakon celuloze. Glavna uloga mu je pružanje mehaničke potpore biljci, održavanje uspravnog položaja i provođenje vode i mineralnih tvari kroz ksilem pod negativnim tlakom. Ovi polimeri talože se u stijenke sekundarno zadebljalih stanica, čineći ih krutim i zadebljalim. Osim prirodnog taloženja biosinteza i taloženje lignina potiče se i u stresnim uvjetima kao što su oštećenja, infekcija patogenom, metabolički stres ili poremećaj u strukturi stanične stijenke (Vanholme i sur., 2010). Sinteza ide preko fenilalanina iz kojeg nastaju tri alkohola: koniferilni, kumarilni i sinapilni. Oni služe kao preteče ligninu. U obliku beta-glikozidnih alkohola, koji su topljiviji u vodi prenose se na mjesto sinteze lignina. Tamo se uz pomoć enzima beta-glukozidaze oslobađaju i pretvaraju u radikale koji se na različite načine spajaju u tri dimenzije i ulažu između celuloznih mikrofibrila. Samim tim lignin je jako teško izolirati od celuloze i odrediti mu točnu strukturu (Pevalek-Kozlina, 2003).

2.2.3.3 Flavonoidi

Flavonoidi predstavljaju najveću skupinu biljnih fenola. Strukturu predstavljaju dva aromatska prstena od 15 C atoma povezani mostom od 3 C atoma. Most i aromatski prsten B sintetiziraju se iz fenilalanina putem šikiminske kiseline, a prsten A dolazi iz puta jabučne kiseline. Spajanje prstenova katalizira enzim halkon-sintetaza. Na osnovni kostur flavonoida često dolaze i hidroksilne skupine ili šećeri koji povećavaju topljivost flavonoida u vodi, dok prisutnost npr. metil etera ili modificiranih izopentenilnih jedinica povećava lipofilnost (Pevalek-Kozlina, 2003). Zbog različitog stupnja oksidacije mosta flavonoide dijelimo na flavone, izoflavone, flavanole, flavonole, flavanone, flavan-3-ole i antocijani (Sun i sur., 2023), od kojih su značajniji:

- Antocijani: obojeni flavonoidi sa šećerom na položaju tri. Bez šećera su poznati kao antocijanidini. Nalaze se u cvjetovima i plodovima kojima daju crvenu, ružičastu i plavu boju ovisno o broju hidroksilnih i metoksilnih skupina u prstenu B, prisutnost helatnih metala, flavona i flavonskih kopigmenata te Ph vakuole u kojoj su pohranjeni (Pevalek-Kozlina, 2003). Biljci služe za primamljivanje životinja za oprašivanje te rasprostranjivanje sjemena.
- Flavoni i flavonoli: biljkama služe za apsorpciju kraćih valnih duljina, nalaze se u cvjetovima te listovima svih zelenih biljaka gdje su nakupljeni u epidermi i štite biljku od UV-B zračenja. Poznatiji su flavon apigenin te flavonol kvercetin koji imaju bitnu ulogu u prijenosu auksina (Pevalek-Kozlina, 2003).
- Izoflavonoidi: imaju izmijenjen položaj prstena B. Imaju različite uloge, rotenoidi imaju insekticidnu aktivnost, fitoaleksini, inače spojevi male molekulske mase od kojih je najpoznatiji antioksidans resveratrol pokazuje protuupalno, antivirusno, antikancerogeno i antioksidativno djelovanje (Sun i sur., 2023). U biljkama se pojačano sintetiziraju nakon bakterijske ili gljivične infekcije (Pevalek-Kozlina, 2003).

2.2.3.4 Tanini

Tanini su polifenolni spojevi velike molekulske mase koji se sintetiziraju u biljci kao odgovor na napad patogena ili abiotičkih stresova (UV zračenje) (Sun i sur., 2023). Povećavaju otpornost na toplinu, vodu i mikrobe te su otrovni i reduciraju rast herbivora jer na sebe vežu proteine i izazivaju smrt organizma koji ih konzumira. Neki organizmi kao npr. zečevi su razvili obrambene mehanizme za uklanjanje tanina iz probavila jer proizvode proteine bogate prolinom koji imaju visok afinitet za tanin (Pevalek-Kozlina, 2003). Možemo ih podijeliti na kondenzirane i hidrolizabilne tanine:

- Kondenzirani: nastaju vezanjem flavonoidnih jedinica, također poznati i kao proantocijanini (Sun i sur., 2023). Djelovanjem jakih kiselina mogu se hidrolizirati do antocijanina. Česti su u drvenastim biljkama.
- Hidrolizabilni: su heterogeni polimeri izgrađeni na baze galne kiseline te se dijele na galotanine i elagitanine (Sun i sur., 2023).

Za izolaciju fenolnih spojeva, koriste se različite tehnike ekstrakcije i vrste otapala.

2.3 Ekstrakcija otapalima

Za izolaciju pojedinih komponenti iz biljnog materijala potrebno je poznavati polarnost komponente kako bi se sukladno tome odabralo prikladno otapalo (Khoddami i sur., 2013). Sukladno tome, tvar će se bolje otopiti u otapalu koje mu je sličnije polarnosti. Voda i alkoholi nazivaju se protičnim otapalima jer imaju parcijalno pozitivno nabijene atome vodika koji reagiraju s nukleofilima ili bazama (Bliznac, 2020). Od jednake važnosti je i priprema materijala koji može biti svjež ili osušen. U većini slučajeva prilikom ekstrakcije preferira se suhi biljni materijal, jer je svježiji lomljiviji i brže propada (Poljanec, 2017). Važno je da materijal bude što bolje usitnjen i homogeniziran kako bi se stvorila veća površina i bolji kontakt sa otapalom. Još neki parametri mogu utjecati na prinos željene komponente, a to su: vrijeme ekstrakcije, temperatura, omjer uzorka i otapala te broj ponavljanja ekstrakcije (Khoddami i sur., 2013).

2.4 Tehnike izolacije i identifikacije

Neke od najčešćih tehnika izolacije fenolnih komponenti iz biljnog materijala su: maceracija, digestija, infuzija, dekokcija, perkolacija, vodeno-alkoholna ekstrakcija fermentacijom, protustrujna ekstrakcija, ekstrakcija ultrazvukom ili ekstrakcija superkričnim tekućinama (Sun i sur., 2023). Kao tehnike identifikacije i kvantificiranje pojedinog spoja se koriste spektrofotometrijske i kromatografske metode, od kojih najčešće tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, HPLC (eng. *High-liquid chromatography*) i plinska kromatografija, GC (eng. *Gas chromatography*) (Khoddami i sur., 2013).

2.4.1 Maceracija

Jedan od najstarijih načina pripreme ekstrakata je klasična maceracija. Radi na principu da se biljni materijal ostavi u otapalu uz povremeno miješanje. Provođi se u zatvorenoj posudi kako ne bi došlo do isparavanja otapala, na sobnoj temperaturi, najmanje tri dana. Nakon završene ekstrakcije potrebno je filtriranje kako bi se odvojio ekstrakt s željenim komponentama od netopivog biljnog materijala kojeg nazivamo tropom (Poljanec, 2017). Zasniva se na principu molekularne difuzije koja se pospješuje povremenim miješanjem kako bi se izmijenilo svježe i zasićeno otapalo. Jedan od nedostataka metode je duže vrijeme trajanja, dok su prednosti njezina jednostavnost i povoljnost jer nije potrebna skupa oprema. Kvaliteta ekstrakta i spektar dobivenih sastojaka također je uvjetovan omjerom biljnog materijala i otapala. Količina ekstrahiranog materijala se proporcionalno povećava sa povećanjem volumena otapala (Poljanec, 2017).

2.4.2 Dekokcija

Dekokcija je metoda koja se provodi iskuhavanjem biljnog materijala u vodi 20 do 30 minuta. Metoda je pogodna za drvenaste dijelove kojima je potrebno duže vrijeme da voda prodre u unutrašnjost biljnih dijelova i ekstrahira aktivne tvari. Također, služi za ekstrahiranje komponentni koji su topivi u vodi i termostabilni. Važno je odrediti i početni omjer volumena vode i biljnog materijala, te njegovu promjenu nakon završenog iskuhavanja. Na samom kraju dobiveni dekokoct je potrebno ohladiti te filtrirati (Poljanec, 2017). Prednost metode je uporaba

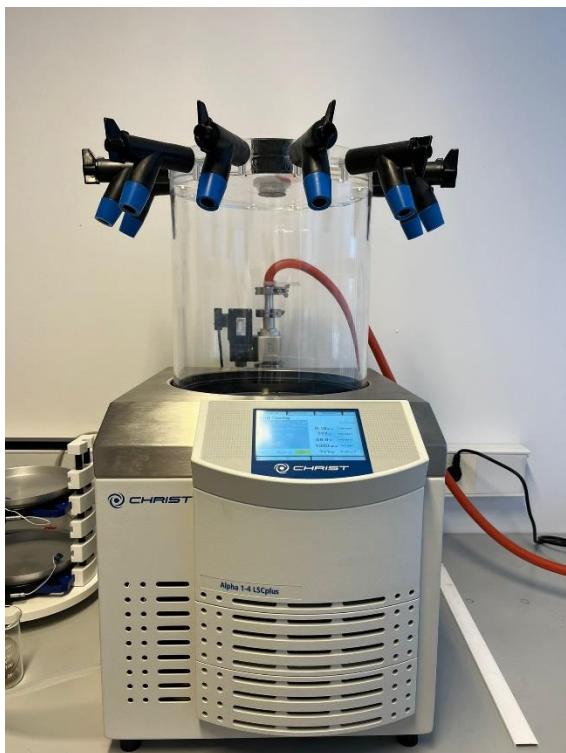
hladnog otapala što smanjuje vjerojatnost razgradnje aktivnih tvari, dok se za nedostatak metode smatra duže vrijeme trajanja metode (Lukežić, 2015).

2.4.3 Ekstrakcija ultrazvukom

Ova metoda ima veliki potencijal pri ekstrakciji organskih i anorganskih komponenti iz biljnih materijala. Prednosti metode su pristupačne cijene instrumenta te jednostavnost izvedbe. Ultrazvučna ekstrakcija se provodi na način da se usitnjeni biljni materijal miješa sa otapalom te stavlja u ultrazvučnu kupelj s postavljenom temperaturom i vremenom ekstrakcije (Oršolić, 2019). Ultrazvučna radijacija veća od 20 kHz koju stvara ovaj uređaj, pogodna je za ekstrakciju organskih i anorganskih komponenti iz biljnih materijala koristeći tekuća otapala. Mehanizam djelovanja ultrazvuka temelji se na stvaranju kavitacijskih mjehurića u blizini biljnog tkiva, te nakon nekog vremena mjehurić implodira stvarajući udarni val koji uzrokuje velike temperature (do 5500 K) i tlakove (do 100 MPA). Povišena temperatura i tlak dovode do oštećenja stanične stijenke što dovodi do ispuštanja staničnog sadržaja u otapalo. Na uspješnost ekstrakcije utječu vrijeme ekstrakcije, temperatura te vrsta otapala (Khoddami, 2013).

2.5 Tehnike uparavanja

Za uklanjanje otapala u prehrambenim, farmakološkim i biotehnološkim industrijama koriste se liofilizator (Slika 5) i rotavapor (Slika 6). Liofilizacija je metoda uklanjanje vode sublimacijom iz prethodno smrznutog materijala. Za smrzavanje materijala se može koristiti tekući dušik. Stavljanjem pod vakuum voda iz krutog stanja direktno prelazi u vodenu paru. Cijeli proces se odvija pod niskim tlakom i temperaturom stoga je ova metoda pogodna za sušenje termolabilnih spojeva. Ostale prednosti ove metode su dobra zaštićenost onih tvari koje mogu oksidirati, mala mogućnost kontaminacije, velika mogućnost uklanjanja vode, dok je glavni nedostatak velika cijena uređaja (Gaidhani i sur., 2015). Uparavanje rotavaporom je proces koji podrazumijeva smanjenje volumena otapala unutar tikvice pri sniženom tlaku i povećanoj temperaturi. Sve to dovodi do brzog uklanjanja viška otapala iz manje hlapljivih uzoraka. (https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Demos_Techniques_and_Experiments/General_Lab_Techniques/Rotary_Evaporation)



Slika 5. Liofilizator (izvor: vlastita izrada)



Slika 6. Rotavapor (izvor: vlastita izrada)

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Biljni materijal

Za biljni materijal u ovom radu korišteni su nadzemni dijelovi biljaka *V. polita* (ubrana 14. svibnja 2022. godine na lokaciji Potjanska) i *V. chamaedrys* (ubrana 10. travnja 2021. godine na lokaciji Samoborsko gorje). Svježe biljke su sušene na zraku i na tamnom mjestu.

3.2 Uređaji i kemikalije

Kemikalije:

- 80% etanol (pripremljen iz 96%-og etanola (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Croatia)
- Metanol 99,8%-tni (BDH PROLABO, Ujedinjena Kraljevina)
- Destilirana voda
- Tekući dušik (Fox Life, Omiš, Hrvatska)

Uređaji:

- Tehnička vaga METTLER TOLEDO (Columbus, Ohio, SAD)
- Ultrazvučna kupelj BANDELIN SONOREX (Meckenheim, Njemačka)
- Centrifuga UNIVERSAL 32 R (Kirchlengern, Njemačka)
- Staklene tikvice (KEFO d.o.o., Sisak, Hrvatska)
- Liofilizator CHRIST Alpha 1-4 LSCplus (Osterode am Harz, Njemačka)
- Rotavapor BUCHI ROTAVAPOR R-200 (Flawil, Švicarska)
- Kuhinjski električni štednjak (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- Ručni mikser Kauflad Stiftung & Co. KG, Njemačka

3.3 Priprema biljnog materijala za tehnike ekstrakiranja

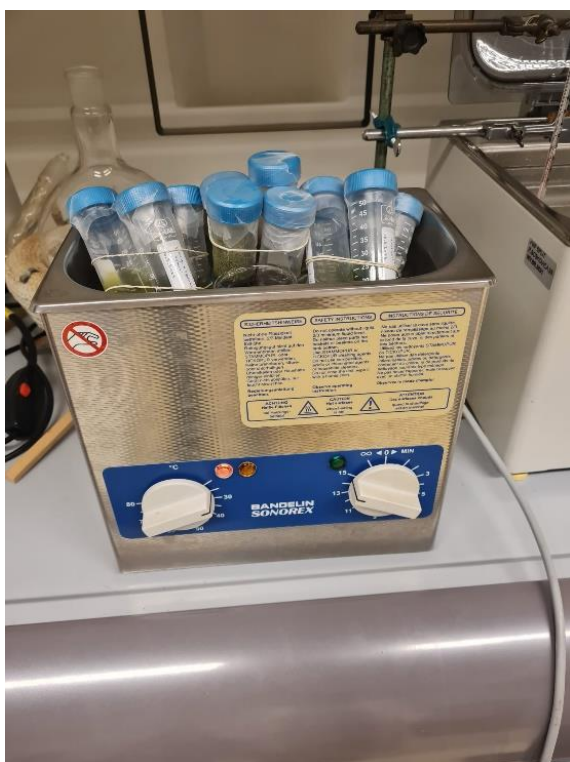
Osušeni biljni materijal (*V. Chamaedrys* i *V. polita*) samljeven je uz pomoć ručnog miksera za kavu (Slika 7). Samljeven je do finog praha, prebačen u dvije Falcon epruvete te pohranjen na suhom i tamnom mjestu. Za ekstrakciju u ovom radu korištena su tri različita otapala: destilirana voda, 80%-tni etanol te metanol (99,8%). Fenolni spojevi su ekstrahirani iz obiju biljnih vrsta uz pomoć ultrazvučne kupelji na dvije različite temperature: 25 °C te na 40 °C u trajanju od 60 minuta. Ekstrakcija je također provedena i postupkom maceracije te dekokcije.



Slika 7. Samljeveni biljni materijal (izvor: vlastita izrada)

3.3.1 Ekstrahiranje fenolnih spojeva ultrazvukom

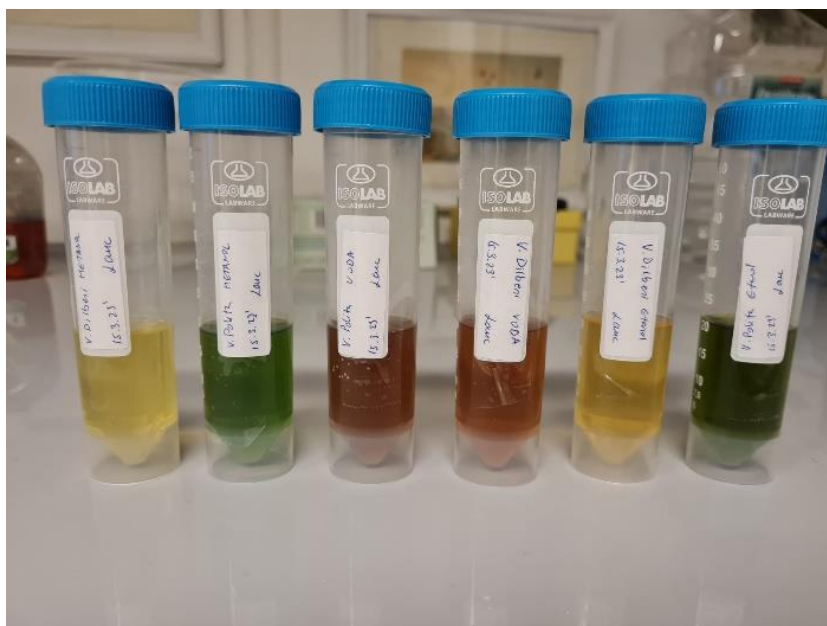
Na tehničkoj vagi je odvagana masa od 0,5 grama usitnjenog biljnog materijala i prebačena je u Falcon epruvete te je dodano po 25 ml otapala (destilirana voda, 80%-tni etanol i metanol). Zaštićeni parafilmom uzorci su stavljeni u ultrazvučnu kupelj s temperaturom namještenom na 25 °C i 40 °C u trajanju od 60 minuta (Slika 8). Nakon ekstrakcije epruvete su stavljene na centrifugu namještenu na 4000 rpm-ova u trajanju od 5 minuta (Slika 9). Uzorci su nakon toga filtrirani uz pomoć filter papira te je supernatant prebačen u nove Falcon epruvete (Slika 10). Naposljetku, uzorci su stavljeni u hladnjak sve do daljnje analize (postupka određivanja prinosa suhog ekstrakta s fenolnim spojevima i njihove identifikacije i kvantifikacije).



Slika 8. Ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji
(izvor: vlastita izrada)



Slika 9. Centrifugiranje nakon ekstrakcije
(izvor: vlastita izrada)



Slika 10. Uzorci nakon filtracije (izvor: vlastita izrada)

3.3.2 Maceracija

Biljni materijal mase 0,5 grama preliven je sa 25 ml otapala (destilirana voda, 80 %-tni etanol i metanol) te u epruветama ostavljen stajati 3 dana pri sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje staklenim štapićem (Slika 11).



Slika 11. Maceracija (izvor: vlastita izrada)

3.3.3 Dekokcija

Za postupak dekokcije korišteno je 25 ml destilirane vode s kojom je preliveno 0,5 g suhog biljnog uzorka u čaši te stavljeno na kuhinjski električni štednjak (Slika 12). Nakon što je smjesa prokuhala, biljni materijal je kuhan još 20 minuta. Potom je procesom filtracije uz filter papir i stakleni štapić odvojen biljni talog od supernatanta koji je potom prebačen u čiste epruvete te zaštićen parafilmom. Uzorci su stavljeni u hladnjak do daljnje analize.



Slika 12. Dekokcija (izvor: vlastita izrada)

3.4 Uparavanje otapala

Za dobivanje konačne suhe mase iz uzoraka nakon postupaka ekstrahiranja korišteni su rotavapor i liofilizator. Na rotavaporu su uparavani metanolni uzorci zbog svojstva metanola koji ima vrelište na 64 °C i etanolni uzorci (etanol s temperaturom vrelišta 77,0-78,5 °C) (Slika 13). Vodeni uzorci i 80%-etanolni uzorci (nakon uparavanja etanola na rotavaporu) zbog veće temperature vrelišta vode uparavani su na liofilizatoru (vrelište vode 100 °C) (Slika 14). Nakon završenog uparavanja (Slika 15), suha masa je izvagana te je izračunato iskorištenje za svaku vrstu otapala. Iskorištenje je izračunato prema formuli (1):

$$\text{Postotak iskorištenja (\%)} = \frac{m(\text{suhi biljni materijal})}{m(\text{ukupno})} \times 100 \quad (1)$$



Slika 13. Uparavanje rotavaporom (izvor: vlastita izrada)



Slika 14. Liofilizacija (izvor: vlastita izrada)



Slika 15. Suhi biljni materijal (izvor: vlastita izrada)

4. Rezultati i rasprava

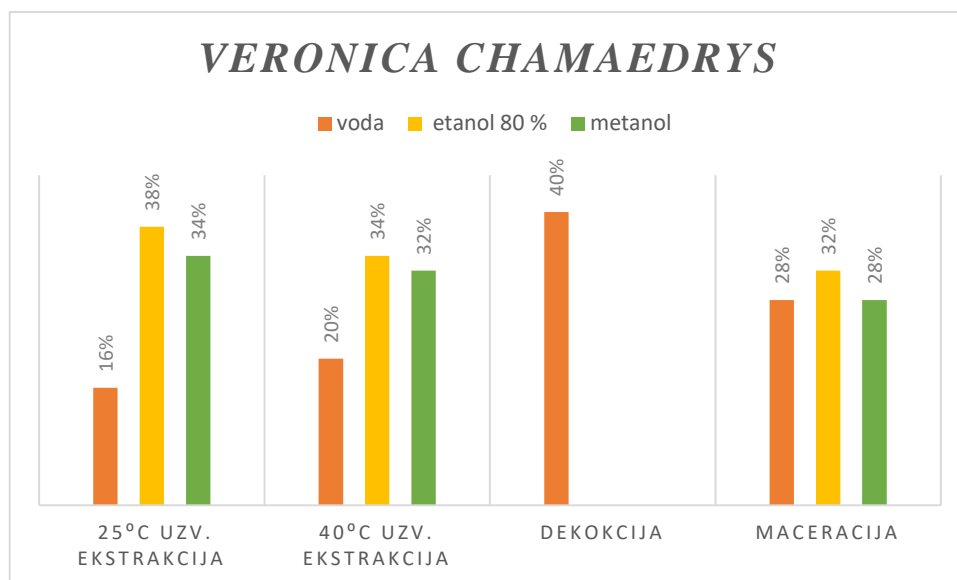
U ovom radu opisan je postupak ekstrakcije fenolnih spojeva iz dvije vrste roda *Veronica* (*V. polita* i *V. chamaedrys*) korištenjem tri različita otapala (destilirana voda, 80 %-tni etanol i metanol) i tri različite metode ekstrakcije (ultrazvučna ekstrakcija na 25 °C i 40 °C, maceracija i dekokcija). Uparavanjem uzoraka na rotavaporu i liofilizatoru dobivena je suha masa (mase prikazane u tablicama 1 i 2) koja sadrži fenolne spojeve prema kojoj se izračunao postotak iskorištenja. Na slikama 16. i 17. prikazani su rezultati istraživanja.

Tablica 1. Prikaz suhe mase (mg) za *Veronicu chamaedrys*

	Voda	80%-tni etanol	Metanol
UZV ekstrakcija na 25 °C	80	190	170
UZV ekstrakcija na 40 °C	100	170	160
Maceracija	140	160	140
Dekokcija	200	/	/

Tablica 2. Prikaz suhe mase (mg) za *Veronicu polita*

	Voda	80%-tni etanol	Metanol
UZV ekstrakcija na 25 °C	70	60	90
UZV ekstrakcija na 40 °C	60	80	60
Maceracija	80	70	60
Dekokcija	90	/	/



Slika 16. Rezultati ekstrakcije *Veronice chamaedrys*

Ultrazvučnom ekstrakcijom *V. chamaedrys* na 25° C najveće iskorištenje prinosa suhog ekstrakta s fenolnim spojevima postignuto je u 80 %-tnom etanolu (38%), zatim u metanolu (34%), a najmanje iskorištenje dobiveno je ekstrakcijom u destiliranoj vodi (16%).

Nakon ultrazvučne ekstrakcije na 40 °C najbolje iskorištenje prinosa suhog ekstrakta s fenolnim spojevima dobiveno je ekstrakcijom u 80%-tnom etanolu (34%), nešto manje u metanolu (32%), dok je ekstrakcija s vodom pokazala najmanje iskorištenje (20%).

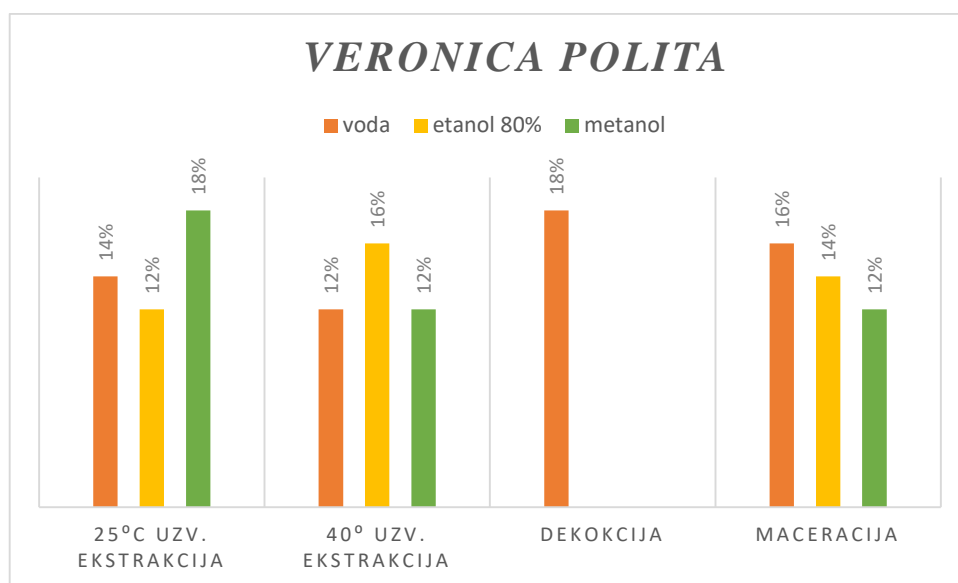
Dekokcija se od svih metoda kada se govori o vodi kao otapalu pokazala najboljom te je iskorištenje suhog ekstrakta koji sadrži fenolne spojeve kod ove metode iznosilo 40%.

Kod metode maceracije najveće iskorištenje postignuto je u 80 %-tnom etanolu (32%) dok su maceracija u destiliranoj vodi i metanolu pokazali jednako iskorištenje (28%).

Općenito, kada se usporede rezultati svih provedenih metoda (ultrazvučna ekstrakcija na 25 °C i 40 °C, maceracija i dekokcija) i njihovih otapala (destilirana voda, 80 %-tni etanol i metanol) za dobivanje što većeg prinosa suhog ekstrakta s fenolnim spojevima, može se uvidjeti kako se 80%-tni etanol pokazao kao najbolje otapalo, a ekstrakcija ultrazvukom pri 25 °C i maceracija najboljim tehnikama ekstrakcije.

Iskorištenje prema vrsti metode i otapalu za vrstu *V. chamaedrys* najučinkovitijom se pokazala metoda dekokcije, a za otapalo voda. No, ipak za vodu se ne može sigurno tvrditi najboljim

otapalom za ekstrakciju fenolnih spojeva kod *V. chamaedrys* iz razloga što je metoda dekokcije provedena samo pri tom otapalu i nije poznato kakve bi rezultate postigli da su korištena ostala dva otapala (80%-tni etanol i metanol).



Slika 14. Rezultati ekstrakcije *Veronice polite*

Ultrazvučnom ekstrakcijom fenolnih spojeva iz *V. polita* na 25 °C se najbolja ekstrakcija dobila u metanolnom otapalu (18%), zatim u vodi (14%) a najmanja u 80%-tnom etanolu (12%).

Kod ultrazvučne ekstrakcije na 40 °C najbolje iskorištenje postignuto je u 80%-tnom etanolu (16%) a iskorištenje od 12% dobiveno je u vodenom i metanolnom otapalu.

Dekokcijom je postignuto iskorištenje od 18% što odgovara iskorištenju dobivenom ultrazvučnom ekstrakcijom na 25 °C u metanolu. To je ujedno i najveći postotak iskorištenja koji je dobiven u ekstrakcijama *V. polita*.

Kod maceracije najveći postotak iskorištenja dobiven je u vodenom otapalu (16%), zatim u etanolnom (14%), a najmanji u metanolnom (12%).

U ukupnoj ekstrakciji fenolnih spojeva prema otapalu kod *V. polite* najboljim se pokazala voda kao otapalo, dok su približno jednaku djelotvornost pokazali 80%-tni etanol i metanol. To je u

skladu s rezultatima koje je dobila Butorac (2018), u kojima je dokazala kako je udio izoliranih fenolnih spojeva bio veći u vodenim ekstraktima nego li u etanolnim, zbog veće polarnosti vode nego etanola, što se pokazalo kao pogodnije otapalo za ekstrakciju fenolnih spojeva iz lavande (Butorac, 2018).

Promatrajući rezultate ultrazvučnom ekstrakcijom na različitim temperaturama možemo primijetiti kako je bolja ekstrakcija postignuta na nižoj temperaturi, osim za etanolne uzorke koji su iznimka, kod *V. polite*, te vodene uzorke kod *V. chamaedrys*. Takve rezultate potvrđuje i Brejzan (2021), koja je za cilj imala izolirati fenolne spojeve iz ekstrakta lovorovog lista koristeći ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom, promatrajući različite vrijednosti amplituda i temperature. Razlog tomu navodi se veće zagrijavanje što dovodi do razgradnje fenolnih spojeva (Brejzan, 2021). Iz rada Drmić i Jambrak (2010) vidljivo je kako se metodom ultrazvučne ekstrakcije u kraćem vremenskom roku postižu puno veći ekstrakcijski prinosi nego koristeći standardnu ekstrakciju (Drmić i Jambrak, 2010). Prema Vinatoru (2001) isti prinos ekstrakcije je nakon sonifikacije (15 min) i maceracije (8 sati) kod korijenja *Rauwolfia*. Prema Kamran Khan i sur. (2010) sličan prinos fenolnih kiselina je iz mandarine postignut ultrazvučnom ekstrakcijom (10–40 min) i maceracijom (8 h).

Gledajući tehnike izolacije kod obiju vrsta uočeno je kako se najboljom pokazala tehnika ultrazvučne ekstrakcije na 25 °C i maceracija, dok malo lošiji rezultati postignuti tehnikom ultrazvučne ekstrakcije na 40 °C. Prednost ekstrakcije ultrazvukom u odnosu na maceraciju je svakako vrijeme trajanja same tehnike.

Promatrajući obje vrste biljaka možemo uočiti kako je puno bolje ukupno iskorištenje postignuto kod *V. chamaedrys* gdje iskorištenja idu i preko 50% više u odnosu na konačne rezultate *V. polite*, iako su se kod obje vrste koristile iste metode ekstrakcije te ista otapala. Buduće istraživanje usredotočeno je na identifikaciju i kvantifikaciju dobivenih fenolnih spojeva iz dobivenog suhog ekstrakta i kako pojedina tehnika ekstrakcije i otapalo utječe na njihovo dobivanje.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu provedeno je istraživanje u kojem je cilj bio odrediti najučinkovitiju metodu ekstrakcije te otapala s kojim će se postići najveća ekstrakcija suhog ekstrakta koji sadrži fenolne spojeve iz vrsta roda *V. polita* i *V. chamaedrys*. Provedene su tri metode (ultrazvučna ekstrakcija na 25 °C i 40 °C, maceracija i dekokcija) te su korištena tri otapala (destilirana voda, 80 %-tni etanol i metanol). Iz rezultata je vidljivo kako se kao najbolja metoda ekstrakcije u obje vrste pokazala metoda ultrazvučne ekstrakcije na 25 °C i maceracije, dok kao otapalo kod *V. chamaedrys* pokazao 80%-tni etanol te kod *V. polite* voda.

S obzirom na ograničenu količinu uzoraka i mjerenja, ove rezultate možemo uzeti kao preliminarna. Da bi se ovi rezultati potvrdili, trebalo bi napraviti veći broj mjerenja, s više otapala i s ispitivanjem većeg broja parametara pojedine tehnike ekstrakcije.

LITERATURA:

1. Akrap, K. (2021) Usporedba sastava slobodnih hlapljivih spojeva vrste *Veronica chamaedrys* L. izoliranih mikrovalnom ekstrakcijom i vodenom destilacijom; diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Splitu.
2. Bliznac, M. (2020) Otapala u organskoj sintezi; završni rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
3. Brejzan, P. (2021) Primjena ekstrakcije potpomognute ultrazvukom za izolaciju fenolnih spojeva lovora; završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
4. Butorac, V. (2018) Utjecaj primijenjene metode ekstrakcije na izolaciju bioaktivnih komponenti iz lavande; završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu.
5. Drmić, H., Jambrak, A.R., (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, *Croatian journal of food science and technology*, 2(2), str. 22-33.
6. 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. (2022). Hydrodistillation and Microwave Extraction of Volatile Compounds: Comparing Data for Twenty-One *Veronica* Species from Different Habitats, *Plants*, 11(7):902.
7. Dunkić, V. (2013). Interna prezentacija „Fiziologija bilja“, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Splitu.
8. Gaidhani, K.A., Harwalkar, M., Bhambere, D., Nirgude, P.S. (2015). Lyophilization/ freeze drying, *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(8), str.516-543.
9. <https://www.plantea.com.hr/dvorednodlakava-cestoslavica/>, pristupljeno: 17. lipnja 2023.
10. <https://onlineherbar.bio.bg.ac.rs/181.html/>, pristupljeno: 20.06.2023.
11. https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Demos_Techniques_and_Experiments/General_Lab_Techniques/Rotary_Evaporation, pristupljeno:03.09.2023.
12. Jia, S., Chen, W., Zhao, G., Wang, S., Xu, Z., Li, Q. (2022). Characterization of the complete chloroplast genome of the medicinal herb *Veronica polita* Fr. 1819 (Lamiales: Plantaginaceae), *Mitochondrial DNA*, 7(6), str. 1078-1080.
13. Kamran Khan M., Abert-Vian M., Fabiano-Tixier A.S., Dangles O., Chemat F. (2010): Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel, *Food Chemistry*, 119, 851–858.

14. Khoddami, A.; Wilkes, M.A., Roberts, T.H. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds, *Molecules*, 18 (2), str. 2328-2375.
15. Kwak, J.H., Kim, H.J., Lee, K., Kang, S.C. (2009). Antioxidative iridoid glycosides and phenolic compounds from *Veronica peregrina*, *Archives of pharmacal research*, 32(2), str. 207-213.
16. Lukežić, M. (2015) Sadržaj flavonoida i antioksidativni učinak *in vitro* vrsta roda *Globularia*; diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
17. Oršolić, Ivan. (2019) Optimiranje ultrazvučne ekstrakcije fenolnih kiselina iz pljevice ječma metodom odzivnih površina; diplomski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište u Osijeku.
18. Pevalek-Kozlina, B. (2003). Fiziologija bilja. Profil, Zagreb.
19. Poljanec, K. (2017) Proizvodnja biljnih ekstrakata; završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
20. Rogošić, J., Šarić, T., Župan, I. i Šikić, Z. (2013) Uloga i značenje sekundarnih biljnih metabolita u ishrani biljojeda, *Stočarstvo*, 67(2), str. 51-68.
21. Rosenkranz, M., Chen, Y., Zhu, P., Vlot, A.C. (2021) Volatile terpenes - mediators of plant-to-plant communication, *The plant journal*, 108 (3), str. 617-631.
22. Salehi, B., Shetty, S., V. Anil Kumar, N., Živković, J., Calina, D., Docea, A.O., Emamzadeh-Yazdi, S., Kılıç, S., Goloshvili, T., Nicola, S., Pignata, G., Sharopov, F., Contreras del Mar, M., C. Cho, W., Martins, N., Sharifi-Rad, J. (2019) *Veronica* Plants- Drifting from Farm to Traditional Healing, Food Application, and Phytopharmacology, *Molecules*, 24(13):2454.
23. Sharifi-Rad, J., Tayeboon, G.S., Niknam, F., Sharifi-Rad, M., Mohajeri, M., Salehi, B., Iriti, M., Sharifi-Rad, M., (2018) *Veronica persica* Poir. Extract-antibacterial, antifungal and scolicidal activities, and inhibitory potential on acetylcholinesterase, tyrosinase, lipoxygenase and xanthine oxidase, *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 64(8), str. 50-56.
24. Sun, W., Shahrajabian, M.H. (2023) Therapeutic Potential of Phenolic Compounds in Medicinal Plants-Natural Health Products for Human Health, *Molecules*, 28(4):1845.
25. Teoh, E.S. (2015) Secondary Metabolites of Plants, *Medicinal Orchids of Asia*, str. 59-73.

26. Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W.(2010) Lignin Biosynthesis and Structure, *Plant physiology*, 153(3), str 895-905.
27. Vinatoru, M. (2001): An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303-313.
28. Xue, H., Chen, K.X., Zhang, L.Q., Li, Y.M. (2019) Review of the Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Pharmacology of the Genus *Veronica*, *The American Journal of Chinese Medicine*, 47(6), str. 1193-1221.