

Ispitivanje različitih tehnika ekstrakcije i otapala u svrhu dobivanja većeg prinosa ekstrakata s fenolnim spojevima iz vrsta *Veronica persica* L. i *Veronica anagalis-aquatica* L.

Sušić, Karolina

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:166:710980>

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

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

Karolina Sušić

**ISPITIVANJE RAZLIČITIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE I
OTAPALA U SVRHU DOBIVANJA VEĆEG PRINOSA
EKSTRAKATA S FENOLNIM SPOJEVIMA IZ VRSTA
Veronica persica L. I *Veronica anagallis-aquatica* L.**

Završni rad

Split, rujan 2023.

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za biologiju

Karolina Sušić

**ISPITIVANJE RAZLIČITIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE I
OTAPALA U SVRHU DOBIVANJA VEĆEG PRINOSA
EKSTRAKATA S FENOLNIM SPOJEVIMA IZ VRSTA
*Veronica persica L. I Veronica anagallis-aquatica L.***

Završni rad

Studentica:

Karolina Sušić

Mentorica:

prof. dr.sc. Valerija Dunkić

Split, rujan 2023.



Ovaj rad je izrađen u Splitu 2023. godine u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost: „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 prvostupnika biologije (*univ. bacc. biol.*).

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu

Završni rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za biologiju

Ruđera Boškovića 33, 21 000 Split, Hrvatska

ISPITIVANJE RAZLIČITIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE I OTAPALA U SVRHU DOBIVANJA FENOLNIH SPOJEVA IZ VRSTA *Veronica persica* L. I *Veronica anagallis-aquatica* L.

Karolina Sušić

Veronica persica i *V. anagallis-aquatica* su biljne vrste roda *Veronica*, taksonomski spadaju u porodicu Plantaginaceae. Rod *Veronica* je široko rasprostranjen s preko 200 biljnih vrsta. Karakterističan je zbog velikog broja sekundarnih biljnih metabolita koji imaju široku primjenu u zdravstvu i biotehnologiji. Cilj ovog rada je odrediti najbolje otapalo i najbolju tehniku ekstrakcije u svrhu dobivanja što boljeg prinosa fenolnih spojeva. Korištena su sljedeća otapala: destilirana voda, 80%-tni etanol i metanol. Tehnike ekstrakcije koje su korištene: ekstrakcija ultrazvukom pri 25 °C i 40 °C, ekstrakcija maceracijom te infuzijom.

Ključne riječi: *Veronica persica*, *V. anagallis-aquatica*, fenolni spojevi, ekstrakcija ultrazvukom, maceracija, infuzija, destilirana voda, 80%-tni etanol, metanol.

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

Rad sadrži: 31 stranica, 11 slika, 2 tablice, 4 grafa, 22 literaturna 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

izv. prof. Željana Fredotović

Rad prihvaćen: Rujan 2023.

Basic documentation card

University of Split

Undergraduate thesis

Faculty of science

Biology department

Ruđera Boškovića 33, 21 000 Split, Croatia

EXAMINATION OF DIFFERENT EXTRACTION TECHNIQUES AND SOLVENTS IN ORDER TO OBTAIN A HIGHER YIELD OF EXTRACTS WITH PHENOLIC COMPOUNDS FROM THE SPECIES *Veronica persica* L. AND *Veronica anagallis-aquatica* L.

Karolina Sušić

Veronica persica and *V. anagallis-aquatica* are plant species of the genus *Veronica*, taxonomically belonging to the Plantaginaceae family. The genus *Veronica* is widespread with over 200 plant species. It is characterized by a large number of secondary plant metabolites that are widely used in healthcare and biotechnology. The main goal of this work is to determine the best solvent and the best extraction technique in order to obtain the best possible yield of phenolic compounds. The following solvents were used: distilled water, 80% ethanol and methanol. Extraction techniques used: ultrasound extraction at 25 °C and 40 °C, extraction by maceration and infusion.

Key words: *V. persica*, *V. anagallis-aquatica*, phenolic compounds, ultrasound extraction, maceration, infusion, distilled water, 80% ethanol, methanol. Thesis deposited in the library of the Faculty of Science, University of Split.

Thesis consist of: 31 pages, 11 pictures, 2 tables, 4 graphs, 22 references. Original language is Croatian.

Supervisor: Prof. Valerija Dunkić, PhD

Assistant Supervisor: Ivana Vrca, PhD

Reviewers:

Valerija Dunkić, PhD. Full professor

Ivana Vrca, PhD. Senior assistant

Željana Fredotović, PhD. Associate professor

Thesis accepted: September 2023

Izjava

kojom izjavljujem pod punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam završni rad pod naslovom: **ISPITIVANJE RAZLIČITIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE I OTAPALA U SVRHU DOBIVANJA FENOLNIH SPOJEVA IZ VRSTA *Veronica persica* L. I *Veronica anagallis-aquatica* L.** samostalno izradila pod mentorstvom prof. dr. sc. Valerije Dunkić i neposrednim vodstvom dr. sc. Ivane Vrca. Rad sam izradila metodologijom znanstveno-istraživačkog rada i koristila sam literaturu navedenu na kraju završnog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući navela u završnom radu na uobičajen, standardan način sam citirala.

Studentica:

Karolina Sušić

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Porodica Plantaginaceae.....	2
2.1.1. Rod <i>Veronica</i>	2
2.1.1.1. <i>Veronica persica</i> L.....	2
2.1.1.2. <i>Veronica anagallis-aquatica</i> L.....	3
2.2. Sekundarni biljni metaboliti.....	4
2.2.1. Fenolni spojevi.....	5
2.3. Ekstrakcija.....	7
2.3.1. Tehnike ekstrakcije	7
2.3.1.1. Ultrazvučna ekstrakcija.....	7
2.3.1.2. Maceracija	7
2.3.1.3. Infuzija	8
2.4. Upotreba rotavapora i liofilizatora	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	9
3.1. Materijali i metode	9
3.1.1. Biljni materijal	9
3.1.2. Materijali.....	10
3.2. Ultrazvučna ekstrakcija	10
3.3. Maceracija	13
3.4. Infuzija	14
3.5. Uparavanje rotavaporom i liofilizacija.....	14
3.5.1. Uparavanje pomoću rotavapora	15
3.5.2. Liofilizacija.....	15
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	17
5. ZAKLJUČAK.....	22
6. LITERATURA	23

1. UVOD

Sekundarni biljni metaboliti su proizvodi biljnih metabolizama koji nisu esencijalni za njihovo preživljavanje, ali pridonose zaštiti od insekata, herbivora, mikroba i pomažu pri oporavku od mehaničkih oštećenja. Jedna vrsta sekundarnih biljnih metabolita su fenolni spojevi, a u ovom istraživanju su ekstrahirani njihovi ekstrakti iz vrsta *Veronica persica* L. i *Veronica anagallis-aquatica* L., a u svrhu određivanja optimalne tehnike ekstrakcije i samog otapala. Obje biljne vrste pripadaju porodici Plantaginaceae, rodu *Veronica* i prije ekstrahiranja su osušene bez utjecaja sunčeve svjetlosti i usitnjene. Ekstrakcija je provedena pomoću različitih metoda u tri otapala. Metode ekstrakcije su: 1) Ekstrakcija pomoću ultrazvuka pri 25 °C, 2) Ekstrakcija pomoću ultrazvuka pri 40 °C, 3) Maceracija i 4) Infuzija. Usitnjeni biljni materijal je otapan u sljedećim otapalima: destilirana voda, 80%-tni etanol i metanol. Prinos suhog ekstrakta s fenolnim spojevima izračunat je nakon uparavanja na rotavaporu i liofilizacije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Porodica Plantaginaceae

Porodica Plantaginaceae ili trpučevke spada u red Lamiales. Glavni predstavnik ove porodice je trputac po kojem je dobila ime. Rod *Veronica* spada pod porodicu Plantaginaceae s još preko 100 drugih rodova. Glavno svojstvo trpučevki je ljekovitost, to su kozmopolitske biljke koje uspijevaju na umjerenoj klimi. Porodica je iznimno raznovrsna, obuhvaća zeljaste biljke, grmove i nekoliko vodenih biljaka s korijenom. Najbrojniji rod je rod *Veronica* s oko 450 vrsta (Berry, 2021).

2.1.1. Rod *Veronica*

Rod *Veronica*, odnosno čestoslavica spada pod porodicu Plantaginaceae. Prepoznatljiv je po tome što cvjetovi izgledaju kao da imaju oči. Zbog toga su nazvani „verum icon“ što znači prava slika (Anon., 2021). Rod broji oko 500 vrsta zeljastih jednogodišnjih biljaka ili trajnica. U Hrvatskoj raste tridesetak vrsta roda *Veronica* (Anon., 2022). Stabljike biljnih vrsta ovog roda su najčešće polegnete. Listovi su smješteni nasuprotno, a ponekad mogu biti skupljeni u dnu stabljike poput rozete. Cvjetovi rastu iz pazušca listova u obliku grozdastih ili klasastih cvatova, a plod je tobolac (Anon., 2022). Rod čestoslavica je neotrovan.

2.1.1.1. *Veronica persica* L.

Perzijska čestoslavica, latinski naziv *Veronica persica* L., jednogodišnja je zeljasta biljka iz porodice Plantaginaceae (Slika 1). Stabljika može biti razgranata ili jednostavna, polegnuta uz tlo ili malo uzdignuta. Niskog je rasta, najviše naraste do 60 centimetara te je prekrivena kovrčavim dlačicama. Donji listovi su naizmjenični i s kratkim stapkama, a srednji i gornji su nasuprotni i sjedeći. Cvjetovi su pojedinačni, rastu do jednog centimetra (plantea, 2020). Blijedoplave su boje, imaju plave žile i 4 latice, a plava boja prelazi u bijelu u blizini žutog središta (Sunčica, 2021).

Porijeklom je iz jugozapadne Azije, a danas se može pronaći u čitavom svijetu. Proširila se tako što je pobjegla iz botaničkih vrtova. U Hrvatskoj je prvi put primijećena u Splitu 1847.

godine (Sunčica, 2021). Raste na prozračnim, blago kiselim tlima s osrednjom količinom humusa. Nalazimo je na livadama, pašnjacima, u vrtovima, na šumskim čistinama i travnjacima, raste od razine mora pa sve do 1800 metara nadmorske visine (plantea, 2020).



Slika 1. *Veronica persica* L.

(https://www.missouriplants.com/Veronica_persica_page.html, Pristupljeno: 10.6.2023.)

2.1.1.2. *Veronica anagallis-aquatica* L.

Poznata pod nazivom Vodena čestoslavica, svrstana je u porodicu Plantaginaceae. To je zeljasta trajnica koja naraste do 100 centimetara, stabljika joj je šuplja, razgranata, debela i na površini glatka. Gornji listovi su sjedeći, a ostali su nasuprotni, lancetasti i fino nazubljeni. Cvjetovi imaju 4 svijetloplave latice s ljubičastim žilama (Slika 2), rastu u pazušcima gornjih listova i gusto su skupljeni u grozdasti cvat (plantea, 2020). Porijeklo je nepoznato, a pretpostavlja se da je potekla iz Europe i Azije. Ova vrsta je rasprostranjena na svim kontinentima. Raste na blago kiselim i vlažnim tlima. Može se naći u potocima i plitkim dijelovima rijeka i jezera. Obitava na sunčanim ili polusjenovitim staništima (Walsh, 2021).



Slika 2. *Veronica anagallis-aquatica* L.

(<https://identify.plantnet.org/sr/the-plant-list/species/Veronica%20anagallis-aquatica%20L./data>,
Pristupljeno: 10.6.2023.)

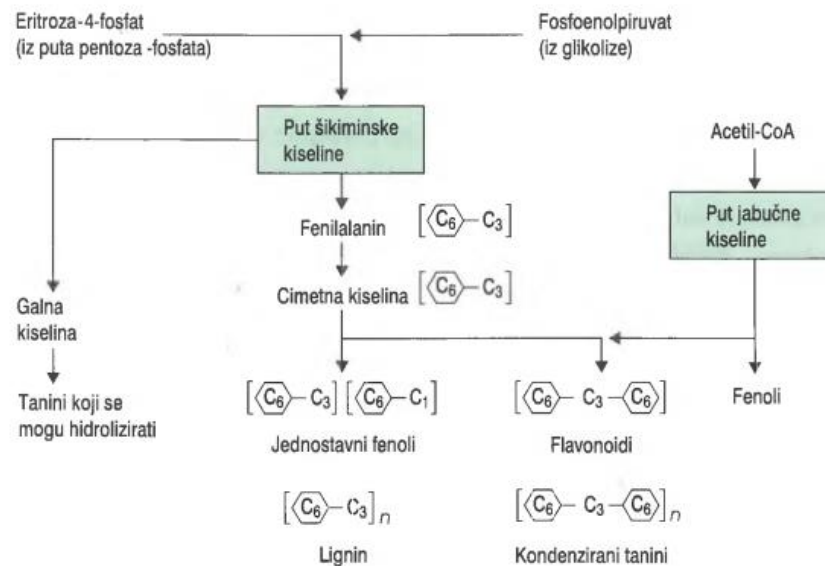
2.2. Sekundarni biljni metaboliti

Sekundarni biljni metaboliti su organski spojevi bez uloge u primarnom metabolizmu biljaka. Za razliku od primarnih metabolita (klorofila, aminokiselina, nukleotida i ugljikohidrata), sekundarni produkti nemaju ulogu u procesima fotosinteze, disanja, primanja hranjivih tvari, prijenosa otopljenih tvari te rasta i razvoja (Pevalek-Kozlina, 2003). Iako nemaju ulogu u primarnom metabolizmu, sekundarni metaboliti biljkama pomažu pri obrani od herbivora, štite ih od kukaca i mikroba. Osim u obrani, sekundarni biljni metaboliti pomažu biljkama privući oprašivače, zaslužni su za boju cvjetova ili miris koji će privući kukce (Guerriero, 2018). S obzirom na mjesto i način sinteze sekundarne biljne metabolite dijelimo na tri skupine: terpeni, fenolni spojevi i spojevi koji sadrže dušik. Terpeni se sintetiziraju iz acetyl-CoA putem mevalonske kiseline, a spojevi koji sadrže dušik se sintetiziraju iz aminokiselina (Pevalek-Kozlina, 2003).

2.2.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su mnogobrojni i pripadaju sekundarnim biljnim metabolitima. Na aromatskom prstenu imaju fenolnu skupinu. Nalaze se u vakuoli otopljeni u obliku glikozida ili kao esteri šećera (Galić, 2020). Biljni fenoli su heterogena smjesa spojeva, mogu biti topljivi u vodi, organskim otapalima ili netopljivi polimeri. Pomažu biljci u obrani od biljojeda, služe kao mehanička potpora, privlače kukce, odnosno oprašivače i rasprostranjivače plodova (Pevalek-Kozlina, 2003).

Fenolni spojevi se biosintetiziraju putem jabučne ili šikiminske kiseline (Slika 3). Put šikiminske kiseline je zaslužan za sintezu većine biljnih fenola, dok je put jabučne kiseline važniji za sintezu fenolnih spojeva kod gljiva i bakterija. Kod viših biljaka većina fenolnih spojeva nastaje iz fenilalanina i tirozina. Eritroza-4-fosfat i fosfoenolpiruvat koji u putu šikiminske kiseline služe za sintezu aromatskih aminokiselina dolaze iz ciklusa pentoza-fosfata i glikolize. Ključni korak sinteze fenolnih spojeva je pretvorba fenilalanina u cimetnu kiselinu uklanjanjem jedne molekule amonijaka (Galić, 2020).



Slika 3. Sinteza fenolnih spojeva

(Fiziologija bilja, Pevalek-Kozlina, 2003)

U jednostavne fenolne spojeve se ubrajaju: 1) jednostavni fenilpropani (trans-cimetna, kavina i ferulinska kiselina), 2) fenilpropanski laktoni ili kumarini (umbeliferon i psoralen) i 3) derivati benzojeve kiseline (Pevalek-Kozlina, 2003).

Lignin je visoko razgranat polimer fenilpropanskih skupina, nakon celuloze to je najzastupljenija organska tvar u biljkama. Nastaje dehidratacijskom polimerizacijom tri fenilpropanska alkohola (koniferila, kumarila i sinapila) koji se sintetiziraju iz cimetne kiseline. Kompleksna struktura lignina nije do kraja istražena zbog toga što je kovalentno vezan za celulozu u staničnoj stijenci. Lignin je prisutan u staničnim stijenkama provodnih i mehaničkih tkiva, a osobito u trahejama i traheidama. Najčešće se odlaže u zadebljanja sekundarne stanične stijenske, ali može biti i u primarnoj. Njegova čvrsta struktura daje tvrdoću biljkama i pomaže pri obrani od herbivora, lignifikacija je odgovor na oštećenja ili infekcije biljaka (Galić, 2020).

Flavonoidi su heterogena skupina polifenolnih spojeva niske molekulske mase. Postoji preko 6400 opisanih vrsta flavonoida i to ih čini najvećom skupinom biljnih fenola. Sastoje se od 15 ugljikovih atoma raspoređenih u dva aromatska prstena povezana s alifatskim mostom od 3 ugljikova atoma. Ako je kisik vezan na tu strukturu može doći do zatvaranja i stvaranja trećeg prstena (leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021). Flavonoidi se sintetiziraju spajanjem produkata putem šikiminske i jabučne kiseline. S obzirom na stupanj oksidacije mosta dijele se na: flavone, flavonole i izoflavone (Pevalek-Kozlina, 2003). Flavonoidi u biljkama imaju različite uloge: daju boju cvjetovima i plodovima, izoflavonoidi mogu imati antiestrogenu i insekticidnu aktivnost (Galić, 2020).

Tanini su polifenoli s obrambenim svojstvima. Oni na sebe vežu životinjske kolagene proteine te tako povećavaju otpornost na toplinu, vodu i mikrobe. Postoje dvije kategorije tanina: kondenzirani tanini i tanini koji se mogu hidrolizirati (Pevalek-Kozlina, 2003). Topljivi su u vodi, imaju kiseli okus i izazivaju opor osjećaj u ustima nakon konzumacije. Tanini se nalaze u lišću, sjemenkama, korijenu, izdancima, stabljikama te plodovima i šiškama (Antunović, 2022). Kondenzirani tanini nastaju vezanjem flavonoidnih jedinica, a tanini koji se mogu hidrolizirati su heterogeni polimeri s fenolnim kiselinama (galna kiselina) i jednostavnim šećerima. Tanini su većinom otrovi koji značajno reduciraju rast herbivora ako im se dodaju u hranu (Pevalek-Kozlina, 2003).

2.3. Ekstrakcija

Ekstrakcija je ravnotežno odvajanje jedne ili više tvari iz krute ili tekuće smjese. Odvajanje se provodi uz pomoć drugog otapala koji se neće miješati s prvim otapalom, ili druge sastavnice nisu u njemu topljive. Ekstrakcijom se ne dobiva čista tvar nego nova smjesa tvari. Primjenjuje se u laboratorijima, hidrometalurgiji, biotehnologiji, zaštiti okoliša i drugim istraživačkim poslovima (Anon., 2007).

2.3.1. Tehnike ekstrakcije

2.3.1.1. Ultrazvučna ekstrakcija

Ova tehnika se koristi za izolaciju biološki aktivnih spojeva iz biljaka. Sonikacijom se postiže potpuna ekstrakcija i time se štedi energija i vrijeme potrebno za ekstrakciju, a dobiveni ekstrakt, odnosno izolat je visoke kvalitete. Ultrazvučna ekstrakcija se zasniva na temelju ultrazvučne kavitacije i predstavlja mehanički tretman zbog djelovanja zvučnih valova. Niske frekvencije zvuka putuju preko kupelji do posude u kojoj se nalazi smjesa za ekstrakciju. Ti valovi uzrokuju pomicanje vode i otapala te se stvaraju mjehurići. Mjehurići dostižu kritičnu točku na kojoj dolazi do njihove implozije te se tako mehanički pomiču otopljene tvari i potiče ekstrakcija željenog spoja (Anon., 2022).

2.3.1.2. Maceracija

Maceracija je jednostavna metoda ekstrakcije gdje se suhi biljni materijal otapa u otapalima kao što su voda, etanol, metanol ili aceton. Ovo je popularna, jednostavna i jeftina metoda ekstrakcije biološki aktivnih spojeva u biljkama. Proces maceracije započinje usitnjavanjem biljnog materijala kako bi se povećala dodirna površina s otapalom i time povećala topljivost. Provodi se na sobnoj temperaturi gdje otopljeni materijal stoji od 3 do 7 dana u otapalu i nekoliko puta dnevno se promiješa staklenim štapićem. Bitno je da posuda u kojoj se radi maceracija bude zatvorena kako bi se spriječilo isparavanje hlapljivih otapala kao što je metanol (Farooq & Mir, 2022).

2.3.1.3. Infuzija

Infuzijom se iz biljaka ekstrahiraju kemijski spojevi u otapalima kao što su ulje, voda ili alkohol. Koristi se najčešće suho bilje za proces ekstrakcije i prelije ga se vrućim otapalom, recimo prokuhanom vodom. Tako preliven suhi, mljeveni biljni materijal mora odstajati neko vrijeme uz miješanje kako bi otpustio biološki aktivne tvari u otapalo. Nakon određenog vremena otopina se profiltrira kako bi biljni materijal ostao na filter papiru, a dobiveni filtrat se spremi u posudu s čepom kako bi se mogao skladištiti na hladnom (Hamlin, 1997).

2.4. Upotreba rotavapora i liofilizatora

Rotavapor je uređaj koji se u laboratorijima koristi za učinkovito i jednostavno uklanjanje otapala iz uzoraka isparavanjem. Rotavapor se sastoji od motora koji okreće tikvicu s uzorkom, parnu cijev, vakumski sustav koji snižava tlak, vodenu kupelj koja se grije na potrebnu temperaturu, kondenzator sa zavojnicom te tikvicu za skupljanje kondenzata (Hardwood, 1989).

Liofilizator provodi postupak uklanjanja otapala iz uzorka u tri koraka, prvo se uzorak zamrzne tekućim dušikom, zatim se smanji tlak i podizanjem temperature otapalo iz uzorka sublimira (Anon., 2020). Liofilizator se koristi za sušenje uzoraka i materijala osjetljivih na visoku temperaturu. Ovakvim načinom isušivanja se čuva aktivnost bioloških molekula i ostalih bitnih komponenti (Anon., 2021).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

3.1.1. Biljni materijal

Za ekstrakciju fenolnih spojeva su korištene biljke iz porodice Plantaginaceae: *Veronica persica* L. i *Veronica anagallis-aquatica* L. Obje biljke su ubrane i na sobnoj temperaturi sušene kako bi se mogle skladištiti. *V. persica* je ubrana na Hvaru, a *V. anagallis-aquatica* na Dujmovači 2021. godine (Slika 4).



Slika 4. Suhi biljni materijal: *V. persica* (desno) i *V. anagallis-aquatica* (lijevo)

(Vlastita fotografija, slikano 15.3.2023.)

3.1.2. Materijali

Za provedbu ovog istraživanja korišteni su sljedeći materijali:

Kemikalije:

- 80% etanol-pripremljen u laboratoriju od 96% etanola (GRAM-MOL.d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Metanol - 99,8+% (BDH PROLABO, Ru-Ve d.o.o., Sv. Nedjelja, Hrvatska)
- Destilirana voda
- Tekući dušik (Fox life, Omiš, Hrvatska)

Uredaji:

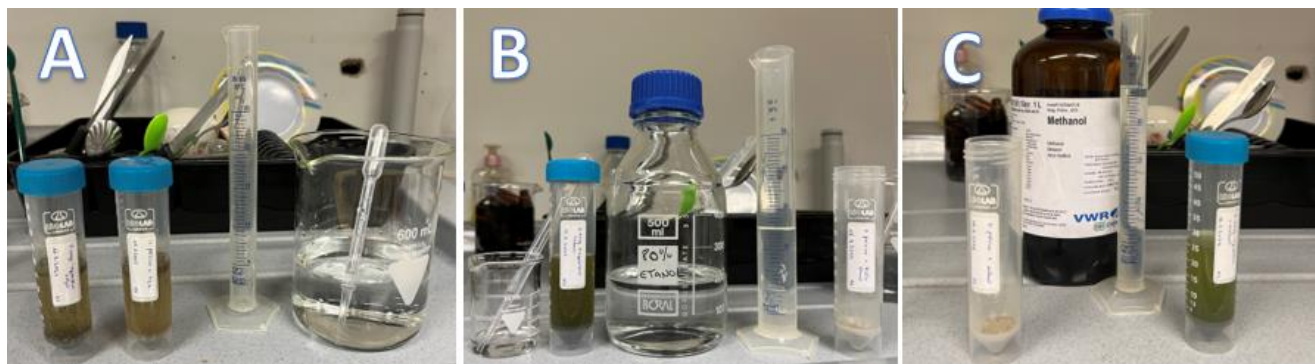
- Mlinac za kavu (Kaufland Stiftung & Co. KG, Njemačka)
- Tehnička vaga - Mettler toledo (Columbus, Ohio, SAD)
- Ultrazvučna kupelj - Bandelin sonorex (Meckenheim, Njemačka)
- Centrifuga- Hettich, universal 32 R (Kirchlengen, Njemačka)
- Rotavapor- Büchi rotavapor R-200 (Flawil, Švicarska)
- Liofilizator- Christ, Alpha 1-4 LSCplus (Osterode am Harz, Njemačka)

Za početak istraživanja osušeni biljni materijal je usitnjen mlincem za kavu (25 grama *V. persica* te isto toliko *V. anagallis-aquatica*). Mljeveni materijal se iz mlinca za kavu prebacivao u Falcon epruvetu (Slika 4) i vagan je na tehničkoj vagi. Ovako pripremljen biljni materijal je spreman za provedbu istraživanja i analize, ali i skladištenje do trenutka kada će zatrebati.

3.2. Ultrazvučna ekstrakcija

Ekstrakcija pomoću ultrazvučne kupelji (UAE) se radila pri dvije različite temperature i u tri vrste otapala. Prethodno pripremljeni biljni materijal se na tehničkoj vagi odvaži i prebaci u novu Falcon epruvetu s čepom. Važe se 0,5 grama usitnjenog biljnog materijala i dodaje 25 ml otapala. Koriste se destilirana voda, 80% etanol i metanol. U šest Falcon epruveta je izvagano 0,5 grama *V. persica* i *V. anagallis-aquatica* (tri za svaku vrstu). Nakon toga, u prve dvije Falcon

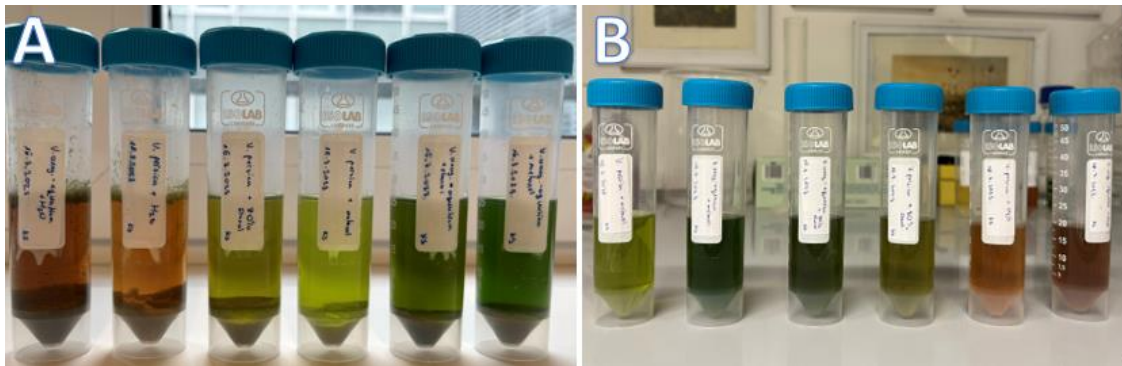
epruvete (s različitim biljnim materijalima) je dodano 25 ml destilirane vode, u sljedeće dvije je dodano isto toliko 80%-tnog etanola i u zadnje dvije metanol.



Slika 5. Otapanje biljnih materijala u: A- destiliranoj vodi, B- 80%-tnom etanolu i C- metanolu (Vlastita fotografija, slikano 15.3.2023.)

Pripremljene otopine su promiješane, začepljene čepom preko kojeg je nalijepljen parafilm kako ne bi došlo do isparavanja ili kontaminacije sadržaja. Otapanje biljnog materijala prikazano je na slici 5.

Prvih šest uzoraka je stavljeno u ultrazvučnu kupelj 60 minuta pri temperaturi od 25 °C. Nakon ekstrakcije ultrazvukom, Falcon epruvete s uzorcima se vade van i stavljaju na centrifugiranje u trajanju od 5 minuta na 4 000 rpm (Slika 6 A). Kada se talog u centrifugi slegne na dno Falcon epruveta, uzorci se filtriraju (Slika 6 B). Za filtraciju se koristi filter papir, lijevci i stalak za lijevke. Dobiveni filtrat prebacuje se u nove Falcon epruvete. Nakon filtriranja, uzorci se zatvaraju čepom i dodatno zaštićuju parafilmom te se skladište u hladnjaku do daljnje analize.



Slika 6. A- uzorci nakon centrifugiranja; B- uzorci nakon filtriranja
(Vlastita fotografija, slikano 15.3.2023.)

Ponavlja se postupak otapanja *V. persica* i *V. anagallis-aquatica* u istim otapalima, ali ekstrakcija se vrši tako što su uzorci stavljeni 60 minuta u ultrazvučnu kupelj na 40 °C kao što je prikazano na slici 7. Poslije ekstrakcije ultrazvukom, uzorci su centrifugirani na isti način kao i prethodni te su profiltrirani i skladišteni u Falcon epruvtama do daljnje analize.



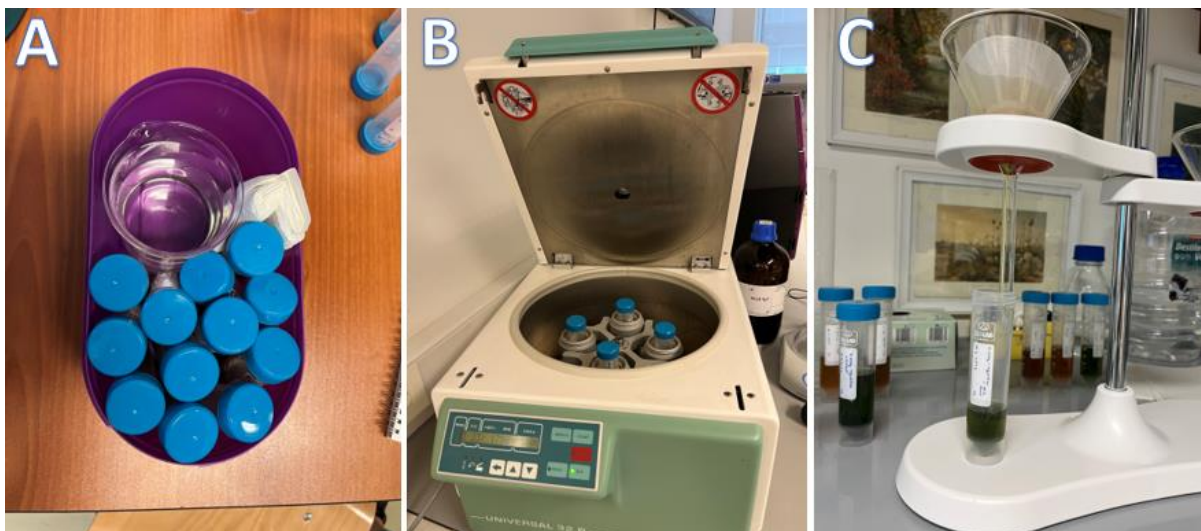
Slika 7. Ultrazvučna kupelj na 40°C

(Vlastita fotografija, slikano: 21.3.2023.)

3.3. Maceracija

Za ekstrakciju maceracijom potrebno je staviti vrste *V. persica* i *V. anagallis-aquatica* u destiliranu vodu, 80%-tni etanol i metanol. U svaku Falcon epruvetu dodaje se 0,5 grama usitnjenog biljnog materijala i 25 ml otapala. Tri falcon epruvete sadrže otopine od *V. persica*, a tri sadrže otopine *V. anagallis-aquatica*. Maceracija se vršila pri sobnoj temperaturi gdje su pripremljene otopine stajale tri dana te povremeno miješane staklenim štapićem kako bi maceracija bila što uspješnija (Slika 8 A).

Nakon tri dana Falcon epruvete se stavljaju na centrifugiranje 5 minuta na 4000 rpm-a. Centrifugiranjem se talog biljnog materijala sliježe na dno i olakšava filtriranje. Uzorci se filtriraju isto kao i u prethodnoj metodi ekstrakcije (Slika 8 B i C). Spremaju se u prethodno označenim Falcon epruvetama, čepovi se oblažu parafilmom i sve se skladišti u hladnjaku do daljnje analize.

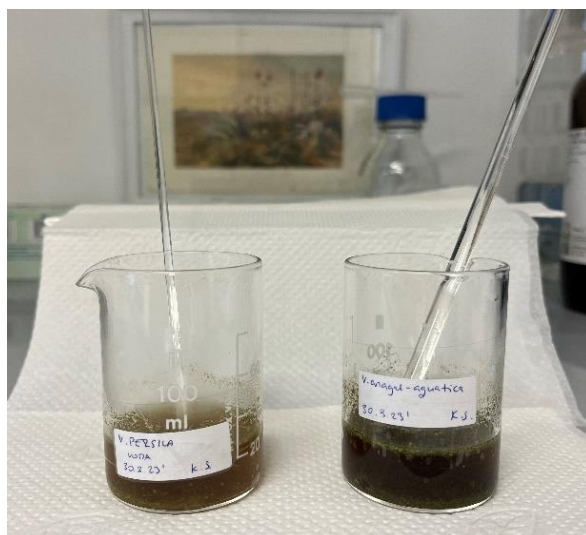


Slika 8. A- uzorci pripremljeni za maceraciju; B- centrifugiranje; C- filtriranje uzoraka nakon maceracije

(Vlastite fotografije, slikane 21.3.2023. i 24.3.2023.)

3.4. Infuzija

Za infuziju se od otapala koristila destilirana voda koju je prethodno bilo potrebno prokuhati. U jednu čašu je stavljeno 0,5 grama prethodno usitnjene *V. persica*, a u drugu čašu isto toliko *V. anagallis-aquatica*. Biljni materijal je preliven prokuhalom destiliranom vodom i 20 minuta je miješan staklenim štapićem kako bi se biljni materijal što bolje otopio i dao najbolji prinos fenolnih spojeva (Slika 9). Potrebno je pričekati 20 minuta da se otopina ohladi kako bi se mogla filtrirati. Kada je sve profiltrirano Falcon epruvete se zatvaraju i preko čepa se stavlja parafilm kako ne bi došlo do isparavanja filtrata.



Slika 9. Ekstrakcija infuzija

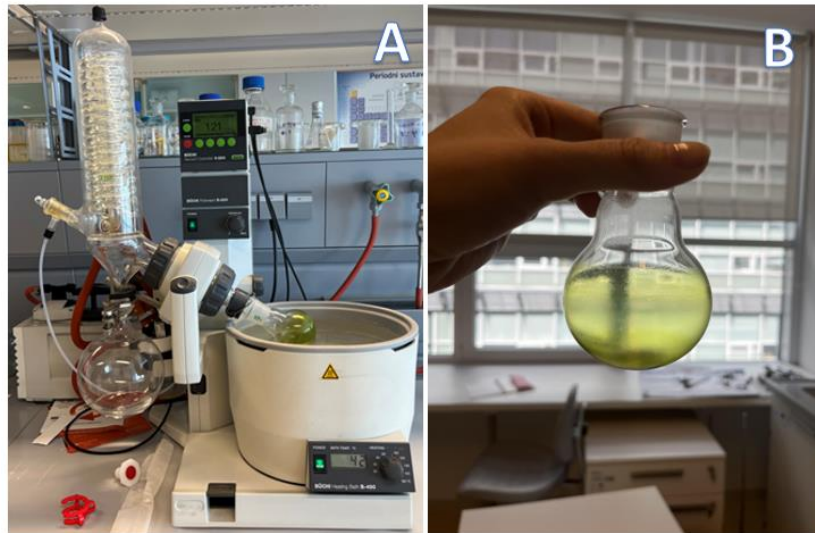
(Vlastita fotografija, slikano 30.3.2023.)

3.5. Uparavanje rotavaporom i liofilizacija

Kako bi se izdvojili čisti fenolni spojevi potrebno je ukloniti otapalo iz svih uzoraka koji su dobiveni. S obzirom da su korištena različita otapala, potrebne su i različite tehnike uklanjanja otapala. Za metanolne i etanolne uzorke korišten je rotavapor, a za vodene i za uzorke gdje je zaostala voda nakon uparenog etanola liofilizator.

3.5.1. Uparavanje pomoću rotavapora

Svi uzorci koji su otopljeni u metanolu se prebacuju u tikvice s okruglim dnom, prije prebacivanja tikvice su vagane na tehničkoj vagi i njihova masa je zapisana. Nakon vaganja i prebacivanja uzoraka u tikvice uzorci su upareni. Uparavanje se odvija pod tlakom (200 mbar u vremenu od ca 5min), a vodena kupelj u koju je uronjena tikvica mora biti oko 40°C kako bi otapalo moglo ispariti. Kroz nekoliko minuta na rotavaporu metanol i etanol ispare i na stijenki tikvice ostaje suhi ekstrakt koji sadrži fenolne spojeve (Slika 10). Tikvicu je nakon toga ponovno potrebno izvagati i zabilježiti masu. Razlika u masama tikvica je masa suhog ekstrakta koji sadrži fenolne spojeve.



Slika 10. A- uparavanje na rotavaporu; B- tikvica s fenolnim spojevima nakon uparavanja

(Vlastita fotografija, slikano 21.4.2023.)

3.5.2. Liofilizacija

Uzorci otopljeni u destiliranoj vodi i zaostaloj vodi nakon uparenog etanola idu na liofilizator. Tikvice s okruglim dnom su vagane i uzorci su prebačeni u njih. Tekući dušik je prvo potrebno uliti u stiropornu posudu, nakon toga se jedna po jedna tikvica s uzorkom uranja u tekući

dušik i brzim pokretima vrti kako bi zamrznuli otapalo u tikvici. Nakon zamrzavanja se tikvica stavlja na liofilizator koji je pod tlakom od 1,00 mbar-a i pri temperaturi od $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kada su sve tikvice postavljene kreće proces isušivanja.

Nakon isušivanja u tikvicama ostaje osušeni ekstrakt koji sadrži fenolne spojeve, a otapala su se pretvorila u paru (Slika 11). Tikvice se potom važu i razlika u masi predstavlja dobivenu količinu suhog ekstrakta s fenolnim spojevima.



Slika 11. Suhi ekstrakt s fenolnim spojevima nakon liofilizacije

(Vlastita fotografija, slikano 27.4.2023)

4. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati nakon uparavanja na rotavaporu i liofilizacije su dobiveni oduzimanjem mase prazne tikvice od mase tikvice u kojoj se nalazi suhi ekstrakt s fenolnim spojevima. Korištene su dvije biljne vrste, tri metode ekstrakcije, od toga jedna na dvije različite temperature i tri vrste otapala. Tablice 1 i 2 prikazuju prinose suhih ekstrakata s fenolnim spojevima u miligramima za *V. persica* i *V. anagallis-aquatica*. U prvom retku su navedene metode ekstrakcija onim redom kako su izvođene u laboratoriju, a u prvom stupcu su napisana otapala. U stupcu koji navodi prinose za ekstrakciju infuzijom se masa nalazi samo u prvom retku jer je za otapalo korištena jedino destilirana voda.

Tablica 1. Prinosi fenolnih spojeva (mg) za vrstu *V. persica* L.

Otapalo	UAE (25 °C)	UAE (40 °C)	Maceracija	Infuzija
d. H ₂ O	110 mg	80 mg	50 mg	90 mg
80%-tni etanol	100 mg	130 mg	90 mg	
Metanol	80 mg	80 mg	90 mg	

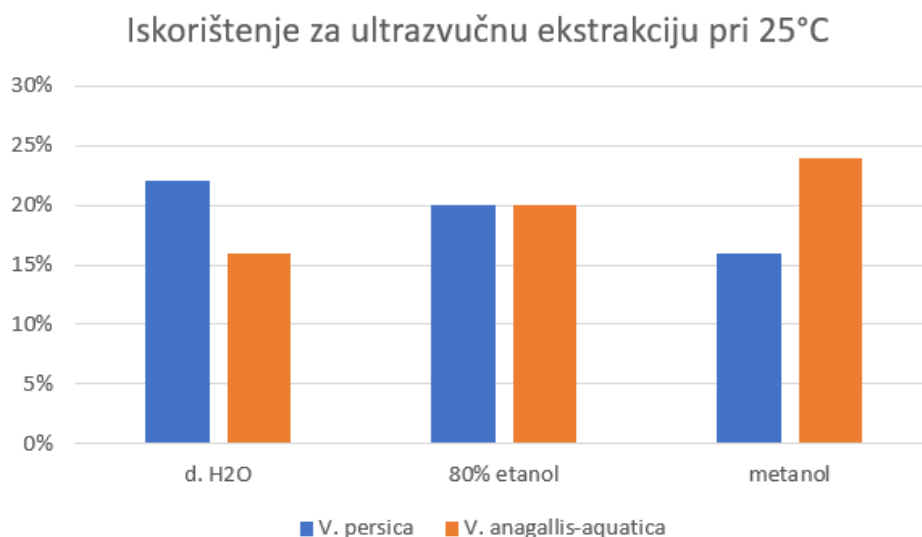
Tablica 2. Prinosi fenolnih spojeva (mg) za vrstu *V. anagallis-aquatica* L.

	UAE (25 °C)	UAE (40 °C)	Maceracija	Infuzija
d. H ₂ O	80 mg	60 mg	40 mg	110 mg
80%-tni etanol	100 mg	140 mg	160 mg	
Metanol	120 mg	140 mg	130 mg	

Vrste *V. persica* i *V. anagallis-aquatica* su davale različite prinose fenolnih spojeva ovisno o metodi ekstrakcije i otapalu, ali usporedbom tablice 1 i 2 možemo vidjeti da je generalno *V. persica* davala više suhog ekstrakta koji sadrži fenolne spojeve u 80%-tnom etanolu nakon ekstrakcije ultrazvukom pri 40°C, a *V. anagallis-aquatica* je veći prinos imala kada su za otapala korišteni i 80%-tni etanol i metanol korištenje tehnika ekstrakcije ultrazvukom pri 40°C i maceracije. Najveći prinosi dobiveni ekstrakcijom u 80%-tnom etanolu se poklapaju s rezultatima

Brezjan (2021). Ona je istraživala utjecaj koncentracije etanola u otapalu na prinos fenolnih spojeva iz lista lovora. U 70%-tnom etanolu je imala znatno veći prinos fenolnih spojeva nego u 50%-tnom etanolu (Brezjan, 2021).

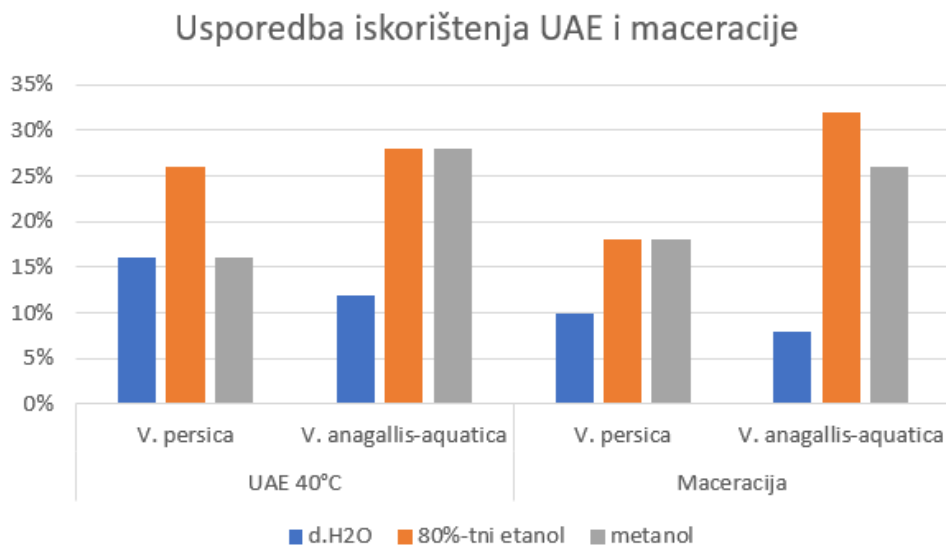
Iskorištenje se računa prema formuli $\eta = \frac{m_1}{m_2} \times 100$. Prikazuje se u formi postotka, m_1 je masa suhog ekstrakta s fenolnim spojevima, a m_2 je masa otopljenog biljnog materijala. Iskorištenje prikazuje koliki je postotak suhog ekstrakta s fenolnim spojevima u otopljenom materijalu. Što je m_1 veća to će i iskorištenje biti veće jer je prinos bolji. Graf 1 prikazuje usporedbu izračunatog iskorištenja za ekstrakciju ultrazvukom pri 25 °C za sva tri otapala. *V. persica* najveće iskorištenje ima kada je suhi biljni materijal otopljen u destiliranoj vodi, a *V. anagallis-aquatica* najveće iskorištenje ima otopljena u metanolu. S obzirom da je voda polarno otapalo, za *V. persica* to predstavlja najpogodnije otapalo za biološki aktivne fenolne spojeve (Butorac, 2018). Kada su *V. persica* i *V. anagallis-aquatica* otopljene u 80%-tnom etanolu iskorištenje je jednako što pokazuje da je i prinos fenolnih spojeva u miligramima bio isti.



Graf 1. Iskorištenje za ultrazvučnu ekstrakciju

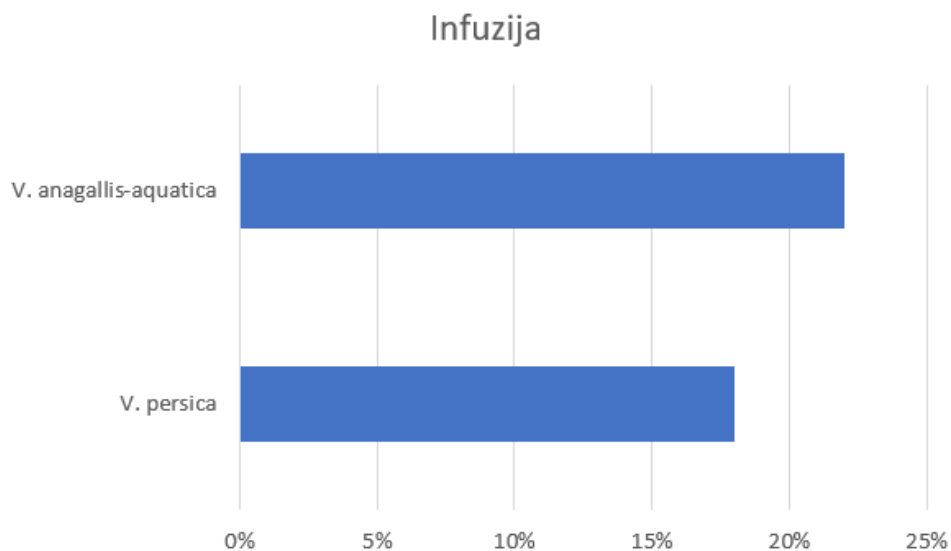
Na grafu 2 je prikazana usporedba iskorištenja za ultrazvučnu ekstrakciju pri 40°C i maceraciju pri sobnoj temperaturi. Kod *V. persice* općenito prinosi suhih ekstrakata s fenolnim spojevima su bolji nakon ultrazvučne ekstrakcije pri 40 °C, pogotovo u 80%-tnom etanolu. Najveći prinos suhog ekstrakta s fenolnim spojevima je kod *V. anagallis-aquatica*, ekstrahirano tehnikom

maceracije u 80%-tnom etanolu, dok je iskorištenje nakon ultrazvučne ekstrakcije pri 40°C neznatno slabije u istom otapalu.



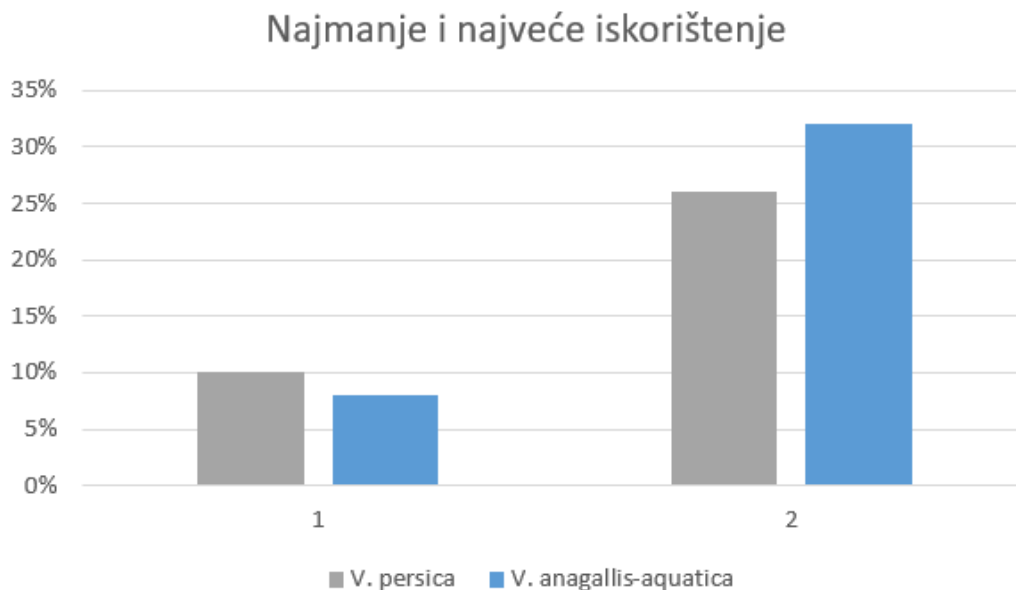
Graf 2. Usporedba iskorištenja ultrazvučne ekstrakcije pri 40 °C i maceracije

Graf 3 prikazuje iskorištenje za ekstrakciju infuzijom koja je rađena samo u destiliranoj vodi. Obje biljne vrste daju relativno visok prinos fenolnih spojeva.



Graf 3. Prikaz iskorištenja za ekstrakciju infuzijom

Graf 4 prikazuje usporedbu najmanjeg i najvećeg iskorištenja. Broj 1 označava najmanje iskorištenje, a broj 2 najveće iskorištenje.. Kod *V. persica* najmanje iskorištenje iznosi 10%. To iskorištenje je dobiveno otapanjem biljnog materijala u destiliranoj vodi i ekstrahiranjem maceracijom. Najmanje iskorištenje *V. anagallis-aquatica* iznosi 8%, a pojavljuje se kod ekstrakcije u istom otapalu te istom metodom. Ukupno gledano najmanje iskorištenje s najmanjim prinosom se pojavljuje kod *V. anagallis-aquatica* otopljenom u destiliranoj vodi, a najveći prinos sveukupno ima također *V. anagallis-aquatica* otopljena u 80%-tnom etanolu. Razlika najvećeg iskorištenja *V. persica* i *V. anagallis-aquatica* iznosi 6% odnosno 30 miligrama.



Graf 4. Usporedba najmanjeg i najvećeg iskorištenja

V. persica najveće iskorištenje ima kada se ekstrakcija provodi pomoću ultrazvučne kupelji na 40 °C i kada je otopljena u 80% etanolu. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjem Drmić i Režek Jambrak (2010). Istraživale su koliki utjecaj imaju duljina i temperatura ultrazvučne ekstrakcije u tri različita otapala (Drmić & Jambrak, 2010). Najveći prinos fenolnih spojeva iz *V. anagallis-aquatica* se dobiva otapanjem u 80%-tnom etanolu i tehnikama ultrazvučne ekstrakcije pri 40°C i maceracijom. Prinosi fenolnih spojeva iz *V. persica* idu od 50 mg do 130 mg, a kod *V. anagallis-aquatica* od 40 mg sve do 160 mg. Infuzija se također pokazala dobrom tehnikom što se tiče

prinosa kod obje vrste i s obzirom da je voda ekološki najprihvatljivije otapalo. Masa ekstrahiranih fenolnih spojeva varira ovisno o korištenom otapalu kao i o metodi ekstrakcije.

Ekološki najprihvatljivija metoda ekstrakcije fenolnih spojeva je maceracija, no ne znači da će zbog ekološke prihvatljivosti biti najbolja s količinom prinosa fenolnih spojeva. Destilirana voda je ekološki najprihvatljivije otapalo i u nekim slučajevima daje vrlo visok prinos fenolnih spojeva zbog svoje polarnosti. Metanol i 80%-tni etanol daju veće prinose fenolnih spojeva, ali zbog toksičnosti metanola prednost se daje etanolu kao otapalu (Dadić, 2016).

5. ZAKLJUČAK

Detaljnom analizom dobivenih rezultata može se vidjeti da će obje biljne vrste najveći prinos fenolnih spojeva imati kada je ekstrakcija provedena u 80%-tnom etanolu. Korištenjem 80%-tnog etanola mase suhих ekstrakata s fenolnim spojevima su preko 100 miligrama ili malo manje što ovo otapalo čini najoptimalnijim za korištenje. S obzirom da su najmanji prinosi dobiveni maceracijom u destiliranoj vodi ta metoda, iako je najjeftinija i najlakša nije najbolja što se tiče prinosa suhog ekstrakta s fenolnim spojevima. Infuzija se također pokazala dobrom tehnikom što se tiče prinosa i s obzirom da je voda ekološki najprihvatljivije otapalo. Voda i dalje ostaje kao ekološki najprihvatljivije i najjeftinije otapalo dok je metanol zbog svoje toksičnosti ekološki neprihvatljiv. Za izolaciju suhog ekstrakta s fenolnim spojevima iz vrste *V. persica* najbolje je otopiti ju u 80%-tnom etanolu i ekstrakciju provesti pomoću ultrazvučne kupelji na 40 °C jer će tada prinos biti najveći. Najbolja metoda ekstrakcije fenolnih spojeva za *V. anagallis-aquatica* je maceracija i ultrazvučna ekstrakcija pri 40°C u 80%-tnom etanolu. Glavna razlika u dobivenim fenolnim spojevima između dvije biljne vrste je ta što će *V. persica* imati manje prinose kada je otopljena u metanolu, a *V. anagallis-aquatica* će manje prinose imati otopljena u destiliranoj vodi.

Kako bi rezultati bili vjerodostojniji istraživanje bi trebalo ponoviti više puta u svim otapalima i usporediti sve rezultate. S obzirom da su mjerenja provedena samo jednom, postoji mogućnost da je negdje došlo do kontaminacije uzorka i da prinos nije onoliki koliki bi mogao biti. Ovo istraživanje se može smatrati preliminarnim koje omogućuje pregled koje otapalo i koja metoda ekstrakcije će dati najviše ekstrakta koji sadrži fenolne spojeve.

6. LITERATURA

1. Anon, (2021). *Rod Čestoslavica – Veronica / PLANTAGEA*. <https://www.plantagea.hr/botanicke-price/rod-cestoslavica-veronica/> [pristupljeno: 20.9. 2023].
2. Brejzan, P., (2021) Primjena ekstrakcije potpomognute ultrazvukom za izolaciju fenolnih spojeva lovora, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
3. Butorac, V., (2018) Utjecaj primijenjene metode ekstrakcije na izolaciju bioaktivnih komponenti iz lavande, Kemijsko- tehnološki fakultet, Split.
4. Dadić, M. (2016). Primjena ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku u izolaciji flavonoida iz organskog otpada od proizvodnje vina, završni rad.
5. Drmić, H., Jambrak, AR., (2010). Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 22-33.
6. Enciklopedije, U.H. tehničke (2022). *Tanini | Hrvatska Tehnička Enciklopedija*. <https://tehnika.lzmk.hr/tanin/> [pristupljeno: 20.9. 2023].
7. Encyclopedia Britannica. (n.d.). *Lamiales - Main families*. <https://www.britannica.com/plant/Lamiales/Main-families> [pristupljeno: 20.9. 2023].
8. Farooq, S., Mir, S.A., Shah, M.A. and Manickavasagan, A. (2022). Extraction techniques. *Plant Extracts: Applications in the Food Industry*, str. 23–37. doi.org/10.1016/b978-0-12-822475-5.00005-3.
9. Guerriero, G., Berni, R., Muñoz-Sanchez, J., Apone, F., Abdel-Salam, E., Qahtan, A., Alatar, A., Cantini, C., Cai, G., Hausman, J.-F., Siddiqui, K., Hernández-Sotomayor, S. and Faisal, M. (2018). Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists. *Genes*, 9(6), p.309. doi.org/10.3390/genes9060309.
10. Hamlin, S. (1997). Sips; In California, the Water May Taste Like a Cucumber. *The New York Times*. <https://www.nytimes.com/1997/10/08/dining/sips-in-california-the-water-may-taste-like-a-cucumber.html> [pristupljeno: 20.9. 2023].
11. Harwood, L.M. and Moody, C.J. (1996). *Experimental organic chemistry : principles and practice*. Australia: Blackwell Science.

12. Kaić, A. (2020). Liofilizacija ili sušenje proizvoda u smrznutom obliku - postupak. <https://gospodarski.hr/rubrike/ostalo/liofilizacija-tehnologija-koja-otvara-nove-mogucnosti-u-poljoprivredi/> [pristupljeno: 20.9. 2023].
13. Millrock Technology, Inc. (n.d.). *What Is a Lyophilizer? How Does It Work? Millrock Technology, Inc.* <https://www.millrocktech.com/lyosight/lyobrary/what-is-a-lyophilizer/>.
14. Pevalek-Kozlina, B. (2003). Fiziologija bilja. Zagreb: Profil-klett, p.566.
15. Galić, L. (2020). Fenolni spojevi u biljkama, diplomski rad, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek ,Osijek.
16. Sunčica (2021). Perzijska čestoslavica. prirodna.hr <https://prirodna.hr/perzijska-cestoslavica> [pristupljeno 20.9. 2023].
17. Ekstrakcija - Tehnički leksikon. <https://tl.lzmk.hr/clanak/ekstrakcija> [pristupljeno 20.9. 2023].
18. Plantea. <https://www.plantea.com.hr/cestoslavica/> [pristupljeno 20.9. 2023].
19. Plantea. <https://www.plantea.com.hr/perzijska-cestoslavica/> [pristupljeno: 20.9. 2023].
20. Walsh, N. (2021). Flora of Victoria. vicflora.rbg.vic.gov.au. <https://vicflora.rbg.vic.gov.au/flora/taxon/b3ae495b-9d11-4dbf-ad0b-a541e6b20265> [pristupljeno: 20.9. 2023].
21. www.enciklopedija.hr. (n.d.). *flavonoidi* / *Hrvatska enciklopedija*, <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=71558> [pristupljeno: 20.9. 2023].
22. www.enciklopedija.hr. (n.d.). *Liofilizacija* / *Hrvatska Enciklopedija*. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=36681> [pristupljeno: 20.9. 2023].