

Usporedba učinkovitosti ultrazvučne ekstrakcije i maceracije u ekstrakciji fenolnih spojeva iz različitih vrsta roda Veronica

Peranović, Dominik

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:166:540540>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-09**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za biologiju

Dominik Peranović

Usporedba učinkovitosti ultrazvučne ekstrakcije i maceracije u ekstrakciji
fenolnih spojeva iz različitih vrsta roda *Veronica*

Završni rad

Split, 2024.



Ovaj rad izrađen je u Splitu 2024. godine u sklopu HrZZ projekta „Hrvatske vrste roda *Veronica*: fitotaksonomija i biološka aktivnost“ (CROVeS-PhyBA), pod mentorstvom prof. dr. sc. Valerije Dunkić i komentorstvom dr. sc. Ivane Vrca. Završni rad je predan na ocjenu Odjelu za biologiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnik biologije (univ. bacc. biol.).

Izjava

Izjava kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam završni rad s naslovom „Usporedba učinkovitosti ultrazvučne ekstrakcije i maceracije u ekstrakciji fenolnih spojeva iz različitih vrsta roda *Veronica*“ izradio samostalno pod mentorstvom prof. dr. sc. Valerije Dunkić i komentorstvom dr. sc. Ivane Vrca. U radu sam primijenio metodologiju znanstveno-istraživačkog rada i koristio literaturu koja je navedena na kraju završnog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući naveo u završnome radu na uobičajen, standardan način citirao i povezao fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.

Student Dominik Peranović

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu

Završni rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za biologiju

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

Usporedba učinkovitosti ultrazvučne ekstrakcije i maceracije u ekstrakciji fenolnih spojeva iz različitih vrsta roda *Veronica*

Dominik Peranović

Sažetak: U ovom završnom radu ekstrahirani su fenolni spojevi iz tri vrste biljaka roda *Veronica* (*Veronica officinalis*, *Veronica beccabunga* i *Veronica austriaca* ssp. *jacquinii*) koristeći klasičnu (maceracija) i naprednu (ultrazvučna ekstrakcija) metodu ekstrakcije, u razrjeđenjima 1:50 i 1:25 te s različitim otapalima (voda, 80%-tni etanol i metanol). Fenoli su biljni spojevi od izuzetne važnosti s raznovrsnim učincima na biljne organizme i šire. Rezultati su pokazali da su organska otapala, osobito metanol, puno učinkovitija od vode, naročito kada se koristi ultrazvučna ekstrakcija. Najbolji rezultati postignuti su s razrjeđenjem 1:50, a metanol je dao najbolje rezultate za sve korištene biljne vrste. Ultrazvučna ekstrakcija pokazuje najbolje rezultate za *V. officinalis* i *V. jacquinii*, dok za *V. beccabunga* maceracija daje bolje prinose. Dobiveni rezultati daju smjernice za daljnja biološka istraživanja fenolnih spojeva izoliranih iz roda *Veronica*.

Ključne riječi: Specijalizirani biljni metaboliti, fenoli, rod *Veronica*, *V. officinalis*, *V. beccabunga*, *V. jacquinii*, maceracija, ultrazvučna ekstrakcija, voda, 80%-tni etanol, metanol, razrjeđenje

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

Rad sadrži: 36 stranica, 3 tablice, 14 slika i 40 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Mentor: prof. dr. sc. Valerija Dunkić

Komentor: dr. sc. Ivana Vrca

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Valerija Dunkić

dr. sc. Ivana Vrca

dr. sc. Marija Nazlić

Rad prihvaćen: Rujan, 2024.

Basic documentation card

University of Split

B. Sc. Thesis

Faculty of Science

Department of Biology

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

Comparison of the Efficiency of Ultrasound-Assisted Extraction and Maceration in Extracting Phenolic Compounds from Different Species of the Genus *Veronica*

Dominik Peranović

Summary: In this paper, phenolic compounds were extracted from three plant species of the genus *Veronica* (*V. officinalis*, *V. beccabunga*, and *V. austriaca* ssp. *jacquinii*) using both classical (maceration) and advanced (ultrasonic extraction) methods, with dilutions of 1:50 and 1:25 and different solvents (water, 80% ethanol, and pure methanol). Phenols are significant plant compounds with diverse effects on plant organisms and beyond. The results showed that organic solvents, especially methanol, are much more effective than water, particularly when ultrasonic extraction is used. The best results were achieved with a dilution of 1:50, and methanol yielded the best results for all plant species tested. Ultrasound extraction shows the best results for *V. officinalis* and *V. jacquinii*, while maceration yields better results for *V. beccabunga*. The obtained results provide guidelines for further biological research on phenolic compounds isolated from the *Veronica* genus.

Keywords: Specialized plant metabolites, phenolics, genus *Veronica*, *V. officinalis*, *V. beccabunga*, *V. jacquinii*, maceration, ultrasonic extraction, water, 80% ethanol, methanol, dilution

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

Thesis consists of: 36 pages, 3 tables, 14 figures and 40 references. Original language: Croatian.

Supervisor: Full prof. Valerija Dunkić, PhD

Assistant supervisor: Ivana Vrca, PhD

Reviewers: Valerija Dunkić, PhD. Full professor

Ivana Vrca, PhD. Senior assistant

Marija Nazlić, PhD. Senior assistant

Thesis accepted: September, 2024.

Sadržaj

1	Uvod.....	1
2	Opći dio.....	2
2.1	Botanika, sistematika, fiziologija bilja i fitofarmacija	2
2.1.1	Porodica Plantaginaceae.....	2
2.1.2	Rod <i>Veronica</i>	2
2.1.2.1	Vrsta <i>Veronica officinalis</i> L.....	3
2.1.2.2	Vrsta <i>Veronica beccabunga</i> L.....	4
2.1.2.3	Vrsta <i>Veronica austriaca</i> L. spp. <i>jacquinii</i> (Baumg.) Watzl	5
2.2	Fiziologija.....	5
2.2.1	Specijalizirani biljni metaboliti	5
2.2.2	Fenolni spojevi	7
2.2.2.1	Lignin.....	8
2.2.2.2	Flavonoidi	8
2.2.2.3	Antocijanini.....	9
2.2.2.4	Flavoni i flavonoli.....	9
2.2.2.5	Izoflavonoidi	9
2.2.2.6	Tanini	9
2.2.2.7	Fenolne kiseline	10
2.3	Ekstrakcija	10
2.3.1	Tehnike ekstrakcije i identifikacije	10
2.3.1.1	Klasične tehnike ekstrakcije.....	11
2.3.1.2	Moderne tehnike ekstrakcije	12
2.3.2	Tehnike uparavanja	13
3	Eksperimentalni dio	14
3.1	Biljni materijal.....	14
3.2	Kemikalije i uređaji	14
3.3	Priprema uzoraka	14
3.4	Ekstrakcija ultrazvukom	15
3.5	Ekstrakcija maceracijom.....	17
3.6	Uparavanje otapala	18
4	Rezultati i rasprava	20
4.1	Rezultati.....	20
4.2	Rasprava	25
5	Zaključak.....	27
6	Literatura.....	28

1 Uvod

Čovječanstvo od svojih početaka koristi biljke u prehrambene i medicinske svrhe, a posljedično i za estetske, energetske i industrijske namjene. Zbog svog sastava biljke su prve korištene kao izvor ljekovitih tvari koje su pridonijele ljudskoj dobrobiti. Botanika, uz interdisciplinarni pristup, danas predstavlja čvrsti temelj biologije, a uz morfološke i anatomske karakteristike biljaka bavi se i fiziologijom bilja. Biljke su živi organizmi koji su sastavni dio ekosustava i nerijetko definiraju karakteristike većine ekosustava svojom biomasom i brojnošću. Nadalje, predstavljaju temelj hranidbene mreže ekosustava i primarni izvor iskoristive energije i hranjivih tvari za ostale članove ekoloških mreža. Kako je jedno od osnovnih svojstava živih organizama metabolizam, tako biljke uz osnovne metaboličke produkte imaju i sekundarne ili specijalizirane koji su ime dobili zbog činjenice da nastaju iz primarnih. Specijalizirani biljni metaboliti nisu esencijalni za život biljke, jer nemaju ulogu u rastu, razmnožavanju i održavanju života, ali biljci pomažu u prilagodbi na uvjete okoliša prilikom uspostavljanja interakcija s drugim organizmima, kao što su predatori ili simbionti. Jedna od skupina specijaliziranih biljnih metabolita su i fenolni spojevi, koji su bili u središtu ovog završnog rada. Uporabom maceracije i ultrazvučne ekstrakcije dobiveni su rezultati prinosa suhih ekstrakata s fenolnim spojevima uz primjenu tri različita otapala (voda, 80%-tni etanol, čisti metanol) pri dva različita razrjeđenja (1:25 i 1:50).

Cilj ovog završnog rada bio je određivanje optimalne metode, otapala i razrjeđenja, kojim se dobiva najveći prinos suhog ekstrakta koji sadrži fenolne spojeve.

2 Opći dio

2.1 Botanika, sistematika, fiziologija bilja i fitofarmacija

2.1.1 Porodica Plantaginaceae

Porodica Plantaginaceae (trpučevke) pripada biljnom redu Lamiales. Rasprostranjena je od sjeverne do južne polutke Zemlje i s pravom se može reći da je riječ o kozmopolitskoj porodici. Ekološki je raspodijeljena unutar različitih klimatskih i stanišnih tipova. Vrste ove porodice imaju ekonomsko značenje budući da se koriste kao hrana ili u obliku medicinskih pripravaka. Srodstveni odnosi unutar porodice su predmet brojnih znanstvenih rasprava. Određeni rodovi porodica Scropuliaceae, Callitriaceae, Hippurdiaceae i dr. prebačeni su u porodicu Plantaginaceae. Porodici Scropuliaceae pripadao je i rod *Veronica*, danas svrstavan porodici Plantaginaceae, koja posljedično broji više od 1800 vrsta u preko 90 rodova. Većina rodova prebačenih u porodicu Plantaginaceae najvjerojatnije predstavlja različite prijelazne forme porodica u redu Lamiales [1].

2.1.2 Rod *Veronica*

Rod *Veronica* (čestoslavice) pripada spomenutoj porodici trpučevki. Čestoslavice su poznate kao ljekovite biljke još od rimskog doba i koriste se za liječenje gotovo svih oboljenja. Ime im dolazi od latinskog jezika „*vera unica medica*“, što prevodimo kao „*jedini pravi lijek*“. Prilikom skupljanja, sabire se cijela biljka u vrijeme cvatnje, a sušenje se provodi na zraku, bez utjecaja direktnog sunca. Nakon sušenja, biljku se usitni i spremi do korištenja. Pripravci biljaka ovog roda sadrže brojne ljekovite spojeve, kao što su glikozidi, tanini, eterična ulja, saponini, voskovi, šećeri, flavonoidi, organske kiseline, kalcij i dr. Osim za ljudsku upotrebu, pripravci od biljaka iz ovog roda koriste se u veterinarstvu za liječenje otekline i šuge životinja [2].

Rod broji oko 500 vrsta koje naseljavaju obje zemljine polutke, s tim da je brojnost vrsta veća na sjevernoj polutci. Kozmopoliti su i najbrojniji rod unutar porodice trpučevki. O važnosti vrsta roda *Veronica* govore mnogobrojna istraživanja njihove upotrebe, sastava, djelovanja, a najčešće je riječ o antioksidativnom, protuupalnom, antikancerogenom, antibakterijskom, antineurodegenerativnom i hepatoprotektivnom učinku [3,4]. Naposljetku, nezavisnim istraživanjima od 1970. do 2018. godine izolirano je više od 260 kemijskih tvari ovoga roda.

Svako istraživanje roda *Veronica* zasebno predstavlja potencijal u razumijevanju njihove kompleksnosti te pruža mogućnost unapređenja kvalitete čovjekova života [5, 6].

2.1.2.1 Vrsta *Veronica officinalis* L.

Vrsta *Veronica officinalis* L. u Republici Hrvatskoj poznata je po mnogim različitim imenima, kao što su čestoslavica pozemljuša, puzava čestoslavica, ljekovita čestoslavica, zmijina čestoslavica, razgon i dr. (Slika 1), što i ne začuđava s obzirom da je najpoznatija biljka roda *Veronica* s najvećim poznatim brojem ljekovitih tvari. Rasprostranjena je po Aziji i Europi, a udomaćena je u Sjevernoj Americi. Stanište su joj šume, šikare, nizine, livade, vrištine brdskih i gorskih predjela do otprilike 1400 mnv [7].

Višegodišnja je biljka i razvija karakteristični glavni korijen s tanjim bočnim korijenjem. Puzeća stabljika zakorjenjuje se na mjestu koljenaca, a stabljika je okrugla ili četverobridna s dlakama. Biljke ove vrste dosežu visinu od 10 do 20 cm, a maksimalna visina je oko 50 cm. Sukladno veličini biljke listovi su maleni, nasuprotni, nazubljeni (pilasti), dlakavi, jajoliki s bazom koja se sužava u peteljku lista. Biljka razvija cvatove na vrhu stabljike u grozdastoj formi koji se razvijaju u pazušcima listova na uspravnim stabljikama. Boja cvjetova je od svijetloplave, roze pa do ljubičaste s tamnoplavim žilicama. Prašnici su duži od vjenčića. Vrijeme cvjetanja je od svibnja do kolovoza. Vrsta ploda je tobolac srcolikog izgleda, koji je spljošten i obrastao dlakama dužine i širine 4 mm dok su sjemenke duge 1 mm [2,7].



Slika 1. *Veronica officinalis* L. (Web 1)

Pripravci ove vrste sadrže djelatne tvari (iridoglikozide, flavonoide, saponine, eterična ulja i dr.) te je dokazano da pripravci ove vrste imaju učinak kao blagi ekspanzori, antidiaroi, a u narodnoj medicini koriste se kao lijek protiv dijareje, bronhitisa, katara želuca i crijeva, gihta i drugih reumatskih bolesti. Također, ova biljka uzgaja se u vrtovima kao ukrasna, a služi i kao pokrivač tla. Stoka ju izbjegava zbog specifičnih dlaka, a ukoliko njena koncentracija u krmi prekoračuje 3% izaziva vrtoglavicu i proljeve [7].

2.1.2.2 Vrsta *Veronica beccabunga* L.

Do prije tri desetljeća vrlo malo se znalo o ljekovitosti vrsta iz roda *Veronica*, izuzev *V. beccabunga* i *V. officinalis* [7]. Ova biljna vrsta poznata je pod nazivom bobak, bobovnjak, bobunjak, trava od razgona, runje, potočnih i dr. (Slika 2). Nastanjuje mokra, izrazito vlažna staništa, potoke, izvore, jarke, obale rijeka i stajačica. Riječ je o trajnoj vodenoj biljci s dugim podankom koji puzi. Za razliku od prethodno spomenute *V. officinalis*, ova biljka ima golu okruglu stabljiku koja je pri dnu polegnuta, a pri vrhu povijena. Maksimalna visina je također do 50 cm. Listovi su nasuprotno raspoređeni po stabljici, sjajni i goli, lisne peteljke su kratke, a oblik lista jajast ili okruglast te uz to uzak i pilast s tupim vrhovima. Cvatovi su rahli i grozdasti te također smješteni u pazušcima listova, a latice su žućkastobijele, nešto rjeđe ružičaste boje. Vrijeme cvjetanja je od svibnja do rujna, a plod je srcoliki tobolac dužine do 4 cm.



Slika 2. *Veronica beccabunga* (Web 2)

Zanimljivo, ova se biljka u Francuskoj uzgaja kao povrće [2], a u Njemačkoj se poslužuju listovi isjeckani na maslacu s kruhom. Listovi ove biljke mogu sadržavati 30 – 60%

vitamina C i oko 5% karotena. Za jelo mogu služiti izdanci ili listovi mladih biljaka koje nisu procvjetale jer kad procvjeta sadrži otrovni termolabilni glikozid aukubin. Dakle, listove razvijene biljke ne treba jesti neprokuhane. Biljka se jede u obliku salate ili kao dodatak jelima [8].

2.1.2.3 Vrsta *Veronica austriaca* L. spp. *jacquinii* (Baumg.) Watzl

Vrsta *Veronica austriaca* ssp. *jacquinii* ili hrvatskog naziva tankolisna čestoslavica jedna je od vrsta roda *Veronica* koja nastanjuje Hrvatsku (Slika 3). Područja koja nastanjuje su sunčana i suha mjesta, kamenjari i pašnjaci. Riječ je o višegodišnjoj biljci koja je trajnica, a naraste do 70 cm. Stabljika je češće uspravna, a rjeđe puzeća te prekrivena trihomima. Listovi rasperani, okrugli do lancetasti, nazubljeni, obrasli dlakama. Cvatovi rastu u grozdastim nakupinama, a cvjetne stapke polaze iz pazuška na gornjim listovima stabljike. Vjenčić je izrazito plave boje, a latice nejednake te jajaste. Plod je tobolac okrugao i obrnuto srcast sa usječenim vrhom, dužine do 5 mm na bazi zaobljen pokriven dlakama ili gol. Vrijeme cvjetanja je od lipnja do srpnja [9].



Slika 3. *Veronica jacquinii* L. spp. *jacquinii* (Web 3)

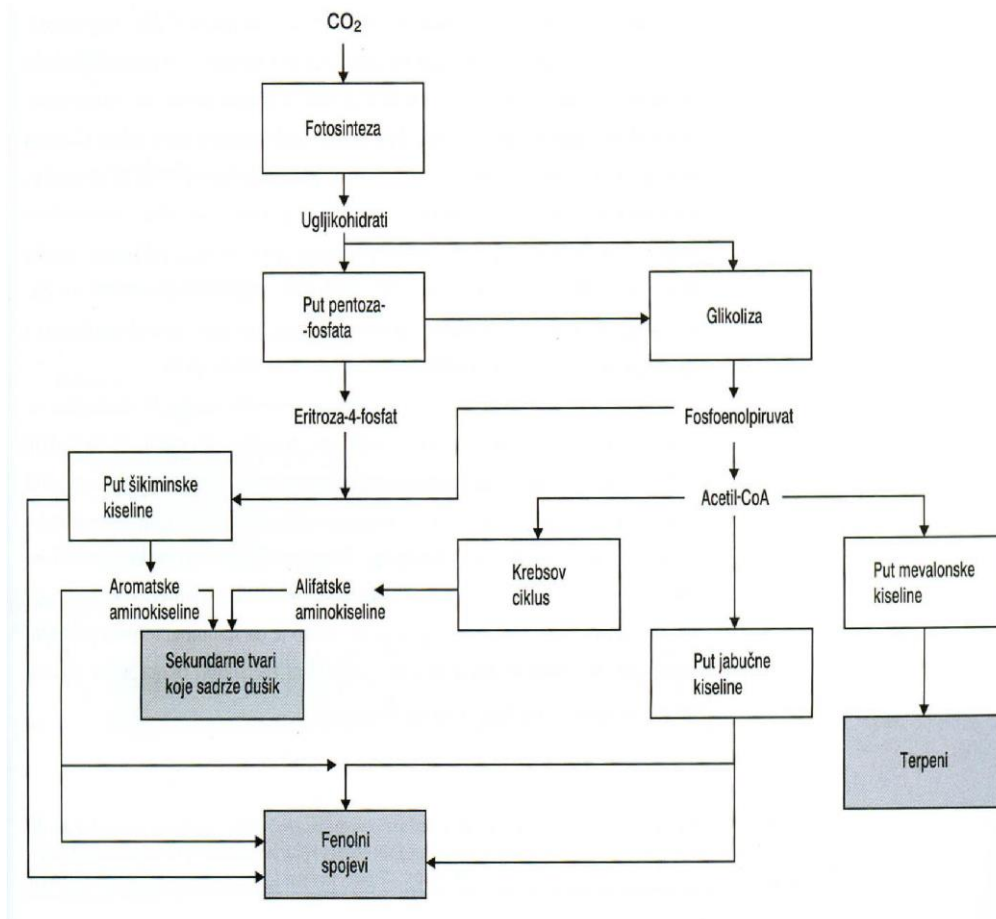
2.2 Fiziologija

2.2.1 Specijalizirani biljni metaboliti

Specijalizirani biljni metaboliti (SBM-i) su proizvodi metabolizma koji nemaju ulogu u primarnom metabolizmu biljaka, odnosno u procesima fotosinteze, staničnog disanja, apsorpcije hranjivih tvari, prenošenja hranjivih spojeva i diferencijacije. Jedna od najvažnijih

funkcija ove skupine spojeva za biljku je obrana od potencijalnih neprijatelja, a mogu služiti i kao strukturne tvari (npr. lignin) ili pigmenti (npr. antocijanini). Ulogu SBM-a najbolje je objasniti preko ekološke funkcije koja se očituje u zaštiti od biljojeda i infekcije mikroorganizmima. Dakle, biljka sintetizira tvari koje joj pomažu u preživljavanju nepovoljnih uvjeta okoliša kao što je npr. predacija. Međutim, biljke SBM-e koriste i kao atraktante za oprašivače i prenositelje sjemena.

SBM nisu prisutni u svih vrsta biljaka, već su neke biljke evoluirale u tom smjeru. Smjer evolucije najvjerojatnije je tekao kroz mutacije u temeljnim metaboličkim putevima koji su rezultirali produktom s novim osobinama koji je mogao biti bezopasan za domaćina, ali štetan za konzumenta ili bolje reći predatora. Prema načinu sinteze razlikujemo tri skupine specijaliziranih biljnih metabolita: terpene, fenolne spojeve i spojeve koji sadrže dušik (Slika 4).



Slika 4. Putevi biosinteze sekundarnih metabolita [10].

Terpeni su zapravo lipidi, a sintetiziraju se putem mevalonske kiseline iz Acetil-CoA. Fenoli su tvari koje sadrže aromatski prsten s hidroksilnom skupinom, a mogu nastati kroz dva

puta: putem šikiminske ili jabučne kiseline. Spojevi s dušikom nastaju iz (aromatskih ili alifatskih) aminokiselina [10].

2.2.2 Fenolni spojevi

Kao što samo ime govori, fenolni spojevi sadrže aromatski prsten s neposredno povezanom hidroksilnom (-OH) skupinom. Riječ je o raznolikoj skupini spojeva koji u viših biljaka najčešće nastaju dijelom iz fenilalanina koji je produkt puta šikiminske kiseline. Lokalizirani su u citosolu stanice u obliku glikozida ili šećernih estera. Biljka sintetizira različite fenolne spojeve od kojih neki mogu biti topljivi isključivo u organskim ili anorganskim otapalima (voda), a drugi spojevi su veliki polimeri te posljedično netopivi. Uloga im je zaštita od predacije biljojeda, mehanička potpora biljnoj strukturi, privlačenje organizama koji za ulogu imaju oprašivanje i rasprostranjivanje i nepovoljan utjecaj na rast susjednih biljaka. Ovi spojevi sintetiziraju se kroz dva moguća puta: put šikiminske ili jabučne kiseline. Za biljke je za većinu fenolnih spojeva važniji put šikiminske kiseline, a kod gljiva i bakterija za sintezu fenola važniji je put jabučne kiseline. Uz aminokiselinu fenilalanin fenoli najčešće nastaju i iz tirozina. U većini biljnih vrsta ključni korak za sintezu fenolnih spojeva je pretvorba fenilalanina u cimetnu kiselinu otklanjanjem jedne molekule amonijaka. U jednostavne fenole prisutne u biljkama ubrajaju se:

- 1) jednostavni fenil propani (npr. trans-cimetna, kavina ili ferulinska kiselina),
- 2) fenilpropanski laktoni (ciklički esteri) i
- 3) derivati benzojeve kiseline [10].

U ovisnosti kako biljke koriste fenole u svojoj interakciji s okolišem možemo zaključiti da fenolni spojevi biljkama koriste na dvije razine, kao pasivna (statička) zaštita i kao obrambeni odgovor na podražaj. Pasivna zaštita očituje se na tri različita nivoa kojima se biljka pasivno brani od potencijalnih nepovoljnih uvjeta, očituje se u vidu anatomskih (građa lista, debljina kutikule), kemijskih (sastav tvari koji se izlučuju na površini biljke) i morfoloških karakteristika (trihomi oko puči) biljke. Nama je najzanimljivija kemijska otpornost biljke prema bolestima jer su najčešće za nju odgovorni fenolni spojevi. Fenoli topivi u vodi putem difuzije dopijevaju na površinu biljke i tako sprječavaju klijanje štetnih spora. Biljke se mogu potaknuti da izlučuju fenolne spojeve tako da im se daje dohrana bogata aminokiselinom fenilalaninom te se na taj način izravno doprinosi većoj koncentraciji fenola. Najčešće je riječ

o pozitivnoj korelaciji između visokog sadržaja fenola i visokog potencijala biljke u obrani od štetnika. Sadržaj kutikule kod nekih biljaka također može sadržavati fenolne spojeve te tako utjecati na pasivnu obranu biljke [11].

Aktivna otpornost biljaka javlja se nakon infekcije mikroorganizmom i naziva se obrambena reakcija. Najčešći fiziološki odgovor biljaka na zarazu je povećanje biosinteze fenola. Kada je prisutna veća količina fenola aktiviraju se i enzimi koji kataliziraju oksidaciju fenola jer su oksidirani fenoli toksičniji od reduciranih. Potaknute prisutnošću patogena biljke sintetiziraju fitoaleksine, heterogenu skupinu fenolnih spojeva koje biljka luči da inhibiraju širenje patogena [Web 4].

2.2.2.1 Lignin

Druga najzastupljenija organska tvar u biljkama je lignin. Lignin je zbog specifičnog grananja pomoću kovalentnih veza trodimenzionalni polimer s nerazjašnjenom i kompleksnom strukturom. Sastav lignina je različitog sadržaja kod jednosupnica, dvospunica i golosjemenjača. Prisutan je u staničnim stijenkama biljnih stanica u različitim vrstama tkiva (mehaničko, provodno i sl.) te se najčešće odlaže u zadebljale sekundarne stijenke, ali može biti dio i primarne stanične stijenke te lamela. Osobina lignina je mehanička čvrstoća te svojom ugradnjom doprinosi učvršćivanju stabljike i provodnih tkiva, dopušta uspravan rast i provođenje tvari ksilemom uz negativan tlak pri čemu tkivo ne kolabira. Zaštitna uloga odlikuje se u tvrdoći i kemijskom sastavu koji se očituje neprobavljivošću. Lignifikacija biljke čest je dogovor na infekcije i oštećenja [13].

2.2.2.2 Flavonoidi

Mnogobrojna skupina fenolnih spojeva s osnovom građenom od petnaest ugljikovih atoma raspoređenih u dva aromatska prstena koja su povezana mostom od tri ugljikova atoma. Struktura je posljedica dva različita metabolička puta (put šikiminske i jabučne kiseline). Klasifikacija flavonoida određena je oksidacijskim stupnjem mosta te razlikujemo antocijanine, flavone, flavonole i izoflavone. U biljaka flavonoidne funkcije su različite (pigmentacija i obrana) [14].

2.2.2.3 Antocijanini

To su obojeni flavonoidi i prisutni su u biljnim organima kao što su cvjetovi i plodovi. Uloga je privlačenje životinja koje oprašuju i rasprostranjuju sjeme. Kada gledamo u crvenu, plavu ili ružičastu boju biljke najčešće je riječ o boji koja je posljedica antocijanina [10].

2.2.2.4 Flavoni i flavonoli

Riječ je o glavnim skupinama flavonoida. Ove dvije skupine spojeva apsorbiraju svjetlost kratkih valnih duljina u usporedbi s antocijaninima i zbog toga nisu vidljivi čovjeku. Međutim, kukci poput pčela ili nekih drugih oprašivača imaju sposobnost da vide UV svjetlost pa ovi pigmenti ne ostaju skriveni njihovoj percepciji. Nerijetko čine i specifične oblike na biljkama te nisu ograničeni na biljne organe poput cvijeta i ploda već su prisutni u listovima svih zelenih biljaka. Tako nakupljeni spojevi u listu štite biljku od štetnog utjecaja UV-B zračenja. To čine na način da apsorbiraju štetne valne duljine, a propuštaju one koje su fotosintetski aktivne. Dodatne uloge su posredovanje u simbiotskoj interakciji mahunarki i simbiotskih bakterija koje fiksiraju dušik te regulacija u hormonskom prijenosu biljnog hormona auksina [15].

2.2.2.5 Izoflavonoidi

Skupina spojeva s mnogobrojnim ulogama najčešće prisutna u mahunarki. Utjecaj ovih spojeva može biti insekticidni ili antiestrogeni čime posljedično utječe na neplodnost u sisavaca. Prethodno spomenuti fitoaleksini spadaju u skupino izoflavonoida [10].

2.2.2.6 Tanini

Tanini su polimeri fenola kojima je glavna funkcija obrambena. Razlikujemo dvije vrste tanina, kondenzirane (nerijetko u drvenih biljka) i one koji se mogu hidrolizirati (heterogena skupina spojeva). Tanini su otrovni i imaju utjecaj na biljojede (konzumente) tako što im svojim utjecajem smanjuju rast i preživljavanje, a poznati takav primjer u prirodi je onaj između ciganskog moljca i hrasta. Naime, nakon što ličinke pojedu listove hrasta, biljka razvija nove s

većom količinom tanina i manjom količinom vode zbog čega ličinke sporije napreduju i na taj se način hrast štiti od štetnika. Mehanizam djelovanja tanina je zapravo vezanje proteina na sebe zbog čega enzimi sisavaca ili nekih drugih konzumenata ne mogu obavljati svoje funkcije čime se utječe na njihov metabolizam [10].

2.2.2.7 Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su SBM-i koji u svojoj strukturi sadrže aromatski prsten i karboksilnu -COOH skupinu. Kada se gledaju sistematske skale ovi spojevi su široko prisutni u carstvu biljaka [16] i drugim carstvima poput gljiva [17]. Podjela spojeva je jednostavna, fenolne kiseline mogu biti ili derivati benzojeve ili cimetine kiseline. Netopljive komponente smještene su unutar hidrofobne sredine stanične membrane, a topljive komponente unutar vakuole. Tijekom rasta i razvoja biljke, sadržaj fenolnih kiselina varira, uglavnom vezan u biljci na celulozu, tanine i dr. spojeve esterskom, eterskom ili acetalnom vezom. Manjina fenolnih kiselina postoji kao samostalne molekule unutar biljke. Unos hranjivih tvari, sinteza proteina, aktivnost enzima, fotosinteza, strukturna potpora i alelopatija samo su od nekih uloga koje fenolne kiseline imaju u biljnom organizmu [16].

Također, fenolne kiseline pronalazimo u biljnim proizvodima koje upotrebljavamo za prehranu kao što su voće, povrće i žitarice [16]. Konzumacija prirodnih proizvoda koji sadrže fenolne kiseline može imati antioksidativni [18], antibakterijski i antitumorski učinak [17].

Ono što je važno naglasiti, fenoli su raznolika skupina spojeva s različitim funkcijama u biljnom organizmu zbog čega su od posebnog interesa za proučavanje. Za izolaciju fenola mogu se koristiti raznolike tehnike ekstrahiranja i otapala. Proučavanjem fenolne strukture, funkcije, biološke aktivnosti i sl., možemo doći do boljeg razumijevanja njihove uloge i potencijala koji imaju.

2.3 Ekstrakcija

2.3.1 Tehnike ekstrakcije i identifikacije

Tehnike ekstrakcije najjednostavnije rečeno dijele se na klasične i napredne. Podjela se temelji na čimbenicima kao što su tehnologija, oprema, vrsta otapala, trajanje procesa i razini selektivnosti i učinkovitosti. Klasične metode podrazumijevaju tradicionalno korištene metode koje u svom radu koriste relativno jednostavne principe i opremu za rad. Temelje se na fizikalno

kemijskim čimbenicima kao što su toplina i tlak te vrsti otapala. Najčešće upotrebljavane klasične tehnike su: maceracija, digestija, infuzija, perkolacija, dekokcija te Soxhletova ekstrakcija. Kontrastno, napredne metode razvijene su kako bi se mogle ekstrahirati one komponente koje klasičnim metodama se ne uspijeva. Zbog toga klasične metode podrazumijevaju specifično razvijene tehnologije i opremu, kontrolirane uvjete, a sve kako bi se smanjila upotreba velikih količina otapala i povećala efikasnost ekstrakcije. Tehnike koje se učestalo koriste iz ove grupe su ubrzana ekstrakcija otapalom, ekstrakcija pomoću mikrovalova, ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka, superkritična ekstrakcija te ekstrakcija uz pomoć enzima. Obje grupe metoda imaju svoje pozitivne i negativne strane. Na primjer, iako su napredne metode efikasnije i ekološki prihvatljivije, one podrazumijevaju troškove edukacije i kupnje uređaja. Međutim, iako su klasične metode dostupne za rad zbog svoje jednostavnosti, njihovom primjenom ne dobivamo iste rezultate kao što bismo ih dobili primjenom naprednih tehnika. Zaključno, svaki je eksperimentalni rad specifičan, a ovisno o ciljevima, vremenskim rokovima, materijalu, opremi te drugim čimbenicima bira se neka od metoda koje su prethodno nabrojane uzimajući u obzir njihove specifičnosti [19].

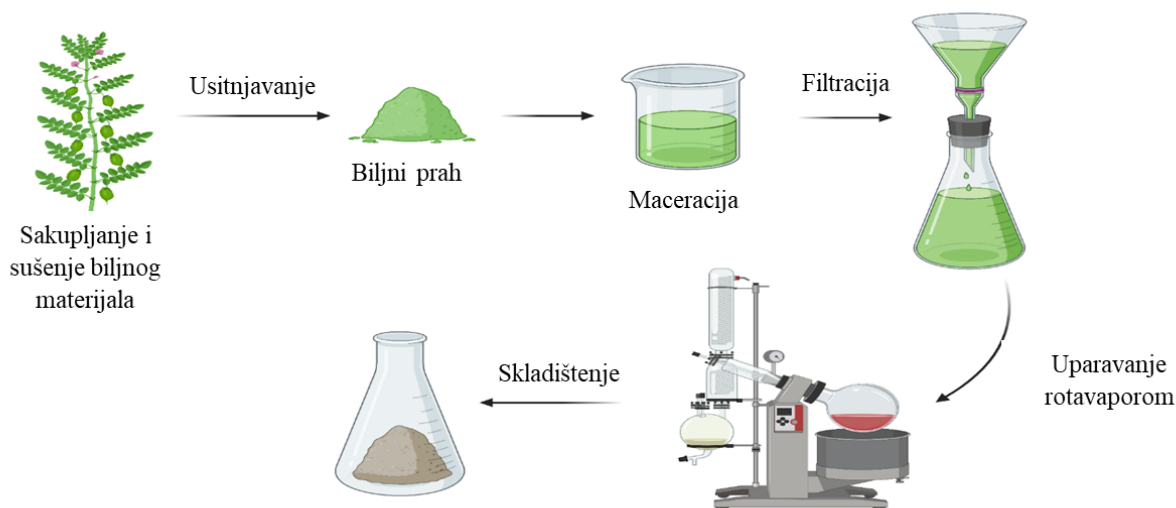
Ultrazvučna ekstrakcija, uz mikrovalnu ekstrakciju, jedna je od najčešćih tehnika koje se koriste za dobivanje fenolnih prinosa. Odabir otapala bitan je korak u ekstrakciji fenolnih komponenti, a ovisi o onome što želimo izolirati. U ekstrahiranju fenolnih spojeva danas se koriste otapala poput vode, etanola, metanola, heksana, acetona i dr., a svako otapalo ima različitu učinkovitost na ekstrakciju spojeva iz biljnog materijala. Za analize i identifikacije izoliranih spojeva najčešće se koriste tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s masenom spektrometrijom (*High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* - HPLC-MS), plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry* - GC-MS), nuklearna magnetska rezonancija (*Nuclear Magnetic Resonance* - NMR), ultraljubičasta spektroskopija (*Ultraviolet Spectroscopy* - UV) i infracrvena spektroskopija (*Infrared Spectroscopy* - IR) [20].

2.3.1.1 Klasične tehnike ekstrakcije

2.3.1.1.1 Maceracija

Maceracija je postupak iscrpljivanja ili ekstrakcije biljnih komponenti iz biljnog materijala pri sobnoj temperaturi (Slika 5). Biljni materijal se prije maceracije usitni te u otapalu

stoji minimalno 24 h. Upotrebljavaju se različita otapala poput vode, etanola, etera, metanola, octa, vina i smjesa otapala, ovisno o onome što želimo izolirati. Nakon određenog vremena ekstrakcije, biljni materijal potrebno je odvojiti filtracijom od tekućeg djela i ekstrakt čuvati na hladnom mjestu [21].



Slika 5. Shematski prikaz postupka maceracije (Web 4)

2.3.1.1.2 Infuzija

Infuzija je tehnika ekstrakcije u kojoj se biljni materijal uranja u kipuće otapalo i ostavlja se da stoji u zatvorenoj posudi oko 15 minuta. Otapalo je najčešće voda. Nakon toga se ekstrakt koji nazivamo čaj procijedi i odvađa od ostataka uz pomoć filtracije. Čaj je najbolji primjer infuzije. Na primjer, kofein je ekstrahiran iz osušenih zdrobljenih listova čajeva. Neke infuzije su propisane za liječenje zdravstvenih problema poput dijareje, bronhitisa i astme. Na primjer, antioksidansi, fenoli i flavonoidi ekstrahirani su iz rizoma đumbira u kipućoj vodi [19].

2.3.1.2 Moderne tehnike ekstrakcije

2.3.1.2.1 Ekstrakcija pomoću mikrovalova

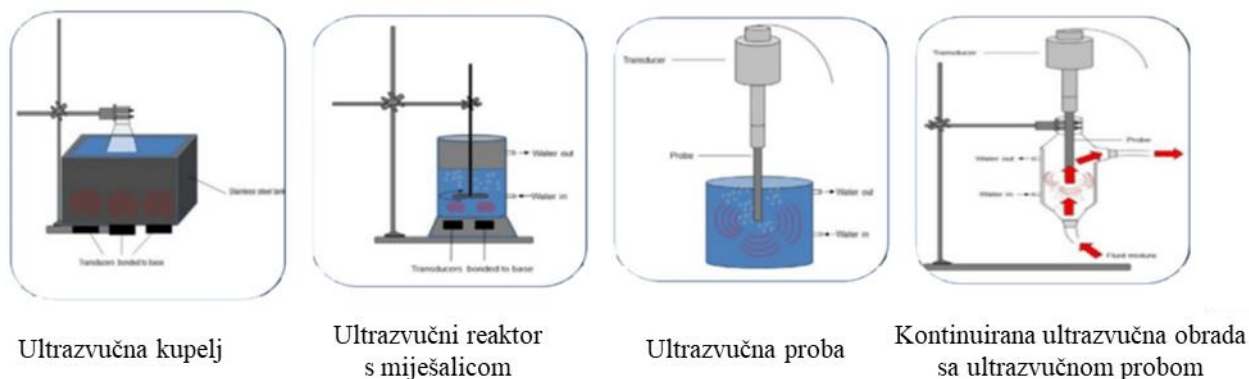
Ekstrakcija pomoću mikrovalova je tehnika u kojoj se biljni materijal stavlja u posudu s otapalom i izlaže mikrovalnom zračenju. Mikrovalovi brzo zagrijevaju otapalo i materijal, što omogućava bržu ekstrakciju željenih tvari. Ova metoda skraćuje vrijeme obrade i može

povećati učinkovitost ekstrakcije. Na primjer, aktivni sastojci iz bilja ili začina mogu se brzo ekstrahirati pomoću mikrovalova [22].

2.3.1.2.2 Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučna ekstrakcija jedna je od čestih metoda kojom se dobije prinos ekstrakata iz biljnog materijala. Princip rada temelji se na „putovanju“ ultrazvučnih valova kroz otapalo gdje visokoenergetski valovi stvaraju izmjenično cikluse visokog i niskog tlaka. Dakle mehaničkim djelovanjem UZV valova dolazi do pucanja biljnih stanica i prodiranja otapala u unutrašnjost stanice čime se tvar iz stanice ekstrahira u otapalo [23].

Postoje različite izvedbe aparata koji radi po principu ultrazvučne ekstrakcije kao što su ultrazvučna kupelj, ultrazvučni reaktor, ultrazvučna proba i dr. (Slika 6).



Slika 6. Sheme različitih izvedbi aparata za ultrazvučnu ekstrakciju (Web 5)

2.3.2 Tehnike uparavanja

Kod izolacija organskih spojeva često se koristi metoda uparavanja otapala rotavaporom. Ona služi kako bi tvar od interesa odvojili od otapala. Na aparat se pričvrsti tikvica s uzorkom koji je otopljen najčešće u nekom organskom otapalu. Pomoću pumpe snižava se tlak, istovremeno tikvica se rotira u vodenoj kupelji koja ima mogućnost namještanja određene temperature. Naposljetku naše otapalo ispari, a na stjenkama tikvice preostaju izolirane tvari [24].

Liofilizator pod visokim vakuumom uklanja vodu sublimacijom iz smrznutih materijala. Najčešće se koristi za termolabilne spojeve jer temperatura materijala dolazi do temperature od 40 °C [25,26]. Voda iz smrznutog materijala sublimira u vodenu paru direktno iz krutog stanja [27].

3 Eksperimentalni dio

3.1 Biljni materijal

Biljke *Veronica officinalis*, *V. beccabunga* i *V. jacquinii* korištene u ovom radu sabrane su na različitim lokalitetima Hrvatske. *V. officinalis* sabrana je 29.05.2021. na lokalitetu Trakošćan, *V. beccabunga* 29.05.2021. na lokalitetu Pedevčevo i *V. jacquinii* 16.06.2021. na lokalitetu Duboke jasle, Velebit. Nakon sabiranja biljke su osušene na zraku pri sobnoj temperaturi bez utjecaja sunca. Sušenjem biljaka otklanja se većinski sadržaj vode u biljci i time se sprječava kvarenje, kontaminacija i gubitak materijala. Osušene biljke označene su, spremljene u kartonske vrećice na suho i tamno mjesto unutar kartonskih kutija do daljnjih analiza.

3.2 Kemikalije i uređaji

Kemikalije:

- 80%-tni etanol pripremljen u labosu od 96%-tnog etanola (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- 99.8%-tni metanol (BDH PROLABO, Ru-Ve d.o.o., Sv. Nedjelja, Hrvatska)
- Destilirana voda (MiliQ water)
- Tekući dušik (Fox life, Omiš, Hrvatska)

Uređaji:

- Tehnička vaga, Mettler Toledo (Columbus, Ohio, SAD),
- Mlinac za kavu (Kaufland Stiftung & Co. KG, Njemačka),
- 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).

3.3 Priprema uzoraka

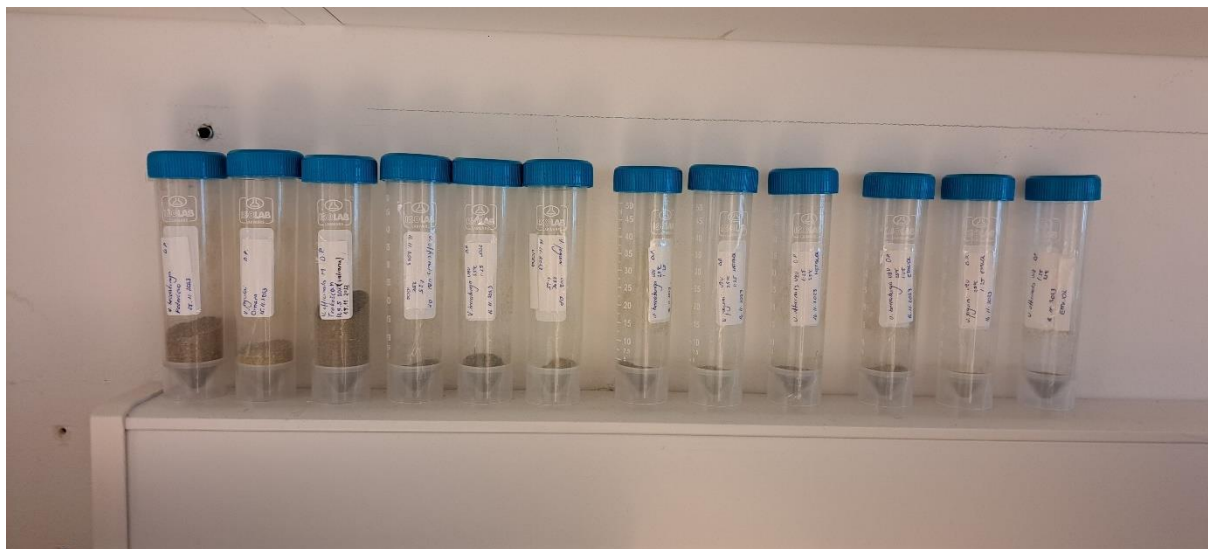
Za svaku vrstu *Veronica* biljni je materijal usitnjen pomoću mlinca za kavu do praškaste forme, a potom spremljen u označene falkonice volumena od 50 ml (Slika 7). Usitnjavanje

uzorka do što sitnije forme pospješuje ekstrakciju tvari iz materijala. Spomenute epruvete smještene su na suho i tamno mjesto i kao takve mogu stajati za buduće analize duže vremena. Neke od tehnika kojima se fenolni spojevi mogu ekstrahirati iz biljnog materijala, a korištene su u ovom radu su ultrazvučna ekstrakcija i maceracija.

3.4 Ekstrakcija ultrazvukom

U prethodno označene falkonice od 50 ml izvavano je na analitičkoj vagi 0.5 g biljnog materijala. Za svaku od tri korištene vrste biljaka roda *Veronica* (*V. officinalis*, *V. beccabunga*, i *V. jacquini*) pripremljeno je šest uzoraka. Od navedenih šest uzoraka tri su bila razrjeđenja 1:50, a ostala tri 1:25 razrjeđenja koristeći tri različita otapala (80%-tni etanol, čisti metanol i destilirana voda).

Razrjeđenje 1:50 podrazumijeva dodavanje 25 ml otapala u prethodno izvagani biljni materijal, dok 1:25 dvostruko manje otapala, dakle 12,5 ml. U svaki od tri uzorka iste vrste i istog razrjeđenja dodane su pripadajuće količine tri različita otapala (80%-tni etanol, čisti metanol i destilirana voda). Tako je napravljeno za svaku biljnu vrstu, sveukupno osamnaest uzoraka.

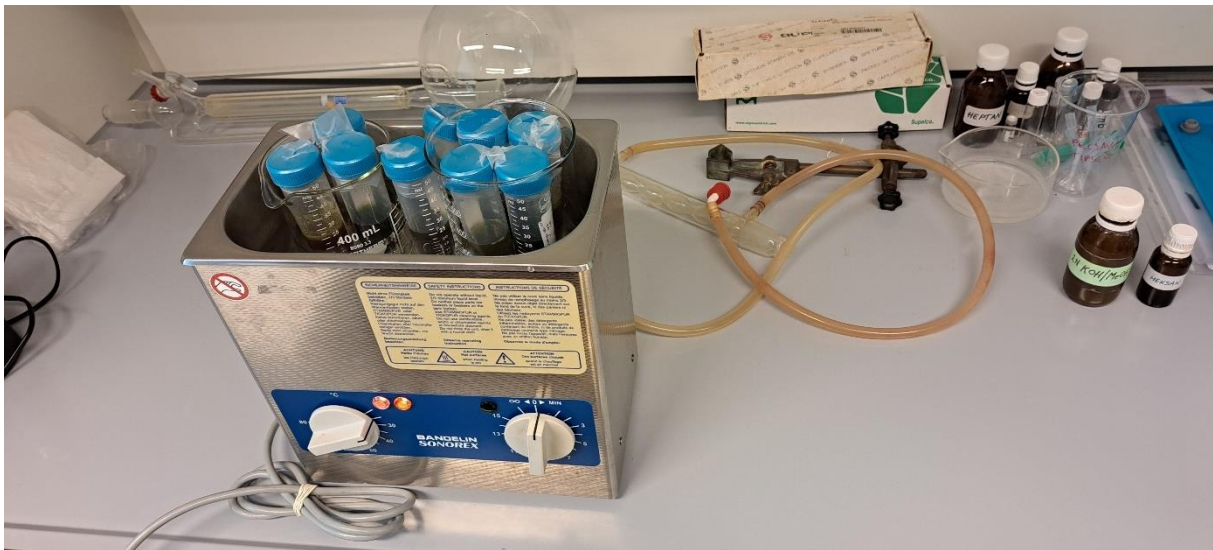


Slika 7. Dio izvaganih i označenih uzoraka u falkonicama (Vlastita fotografija, studeni 2023.)

Nakon što su svi uzorci pripremljeni svaki je promiješan staklenim štapićem i zatvoren pripadajućim čepom koji je potom obložen parafilmom koji ima ulogu sprječavanja

kontaminacije i isparavanje uzorka u vremenskom periodu trajanja tehnike ultrazvučne ekstrakcije.

Pripremljeni uzorci stavljeni su u ultrazvučnu kupelj pri temperaturi od 25 °C u vremenskom trajanju od 60 min (Slika 8). Nakon ekstrakcije svi uzorci su centrifugirani u trajanju od 10 min pri 4000 rpm kako bi se odvojio talog od supernatanta i time olakšala filtracija.



Slika 8. Uzorci u ultrazvučnoj vodenoj kupelji (Vlastita fotografija, studeni 2023.)

Filtracija je izvršena pomoću filter papira s plavom trakom, staklenog lijevka i stalka za filtraciju (Slika 9). Dobiveni filtrat spremljen je u prethodno označene epruvete. Potom, sve epruvete su obložene parafilmom i spremljene u zamrzivač do daljnje analize te kao takve mogu stajati duže vremena pošto hladnoća inhibira mikrobiološku aktivnost, odnosno, ostavljanjem uzoraka u hladnjaku na niskim temperaturama spriječen je rast i razvitak mikroorganizama koji bi mogli dovesti do kontaminacije uzorka.



Slika 9. Aparatura za filtraciju (Vlastita fotografija, studeni 2023.)

3.5 Ekstrakcija maceracijom

Priprema uzoraka za maceraciju podrazumijeva sve identične korake kao i za pripremu uzoraka za ultrazvučnu ekstrakciju koji su opisani u prethodnom dijelu eksperimentalnog rada. Jedina razlika je što umjesto da se uzorci stavljaju u ultrazvučnu kupelj gdje željene komponente ekstrahiraju ultrazvukovi, oni su ostavljeni tri dana pri sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje. Uzorci se miješaju staklenim štapićem što je zasnovano na različitim činjenicama. Stalnim miješanjem sprječavaju se lokalna zasićenja u otopini i time pospješuje ekstrakcija tvari u otapalo. Miješanjem se sprječava taloženje biljnog materijala na dno epruvete koji se prirodno pod utjecajem gravitacije istaloži na dnu. Osim navedenog, miješanjem smjese omogućuje se otapalu da brže ekstrahira tvari iz materijala i omogućuje se ravnomjieran kontakt materijala i otapala. Tako je napravljeno za svaku biljnu vrstu, sveukupno osamnaest uzoraka. Cjelokupni broj uzoraka napravljenih za cijeli rad je 36.

Temelj postupka maceracije zapravo je zasnovan na prirodnim svojstvima čestica u fizikalnom smislu. Čestice se gibaju iz područja više u područje niže koncentracije. Dakle, tvari iz biljnog materijala prelaze u otapalo difuzijom, a u otapalu se otapaju ovisno o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima. Stoga i ne čudi da ovaj proces traje duži vremenski period od ekstrakcije koje je potpomognuta ultrazvučnim valovima koji neposredno utječu na razbijanje biljnih stanica i otpuštanje sadržaja u otapalo.

3.6 Uparavanje otapala

Iz prethodno dobivenih filtrata potrebno je ukloniti otapalo kako bi se dobila masa prinosa ekstrahiranih spojeva. Za uparavanje uzoraka za koje je kao otapalo korištena voda upotrijebljen je liofilizator, dok je za metanolne i etanolne uzorke korišten rotavapor (Slika 10). Razlika u pristupu uparavanja uzoraka s anorganskim otapalom (voda) i organskim otapalima (etanol i metanol) zasnovana je na činjenicama o fizikalno-kemijskim svojstvima otapala.

Rotavapor radi pri sniženom tlaku i povišenoj temperaturi (40-50 °C) što omogućuje snižavanje točke vrenja otapala pri kojoj on isparava. Zbog toga se uzorci izlažu nižim temperaturama i manja je vjerojatnost da će termolabilni spojevi biti uništeni te je zbog toga pogodan za uparavanje organskih otapala.



Slika 10. Uparavanje uzoraka na rotavaporu (Vlastita fotografija, veljača 2024.)

S druge strane, liofilizator je pogodan za vodene uzorke jer radi na principu zamrzavanja uzoraka u tikvici uz pomoć tekućeg dušika i potom uređaj ukloni otapalo sublimacijom pomoću vakuuma (Slika 11). Time je također spriječen gubitak termolabilnih komponenti uzoraka.



Slika 11. Uzorci na liofilizatoru (Vlastita fotografija, veljača 2024.)

4 Rezultati i rasprava

4.1 Rezultati

U ovom završnom radu izolirali su se suhi ekstrakti koji sadrže fenolne komponente iz tri biljne vrste roda *Veronica* (*V. officinalis*, *V. beccabunga* i *V. jacquinii*) koristeći tri različita otapala (voda, 80%-tni etanol i čisti metanol) pri dva različita razrjeđenja (1:50 i 1:25) koristeći jednu klasičnu tehniku ekstrakcije (maceracija) i jednu naprednu tehniku ekstrakcije (ekstrakcija ultrazvukom). I maceracija i ultrazvučna ekstrakcija provedene su pri sobnoj temperaturi (25 °C) u kontroliranim laboratorijskim uvjetima. Sveukupno 36 uzoraka.

Prikazani i navedeni podaci organizirani su u obliku tri tablice i tri slike. Tablice i grafovi sadržavaju informacije o prinosima suhih ekstrakata s fenolnim spojevima izraženim kao postotak. U radu su korištene okrugle tikvice koje su prvo izvagane i njihova masa zabilježena je kao masa prazne tikvice (m_1). U izvagane tikvice prebačeni su uzorci i uparena otapala ovisno o prirodi otapala (uparavanje rotavaporom i liofilizacija). Na stijenkama tikvica zaostali su suhi ekstrakti koji predstavljaju izolirane fenolne spojeve. Zatim, tikvice su opet vagane i njihove mase zabilježene su kao mase tikvice sa suhim ekstraktima nakon uparavanja (m_2). Rezultati ovog eksperimentalnog rada prikazuju razlike između masa m_2 i m_1 koje predstavljaju mase suhih ekstrakata s fenolnim komponentama. Formulom $\left(\frac{m_2}{m_1}\right) \cdot 100\% = \text{prinos} [\%]$ izračunat je ostvareni prinos suhog ekstrakta s fenolnim spojevima koji se izražava kao postotak.

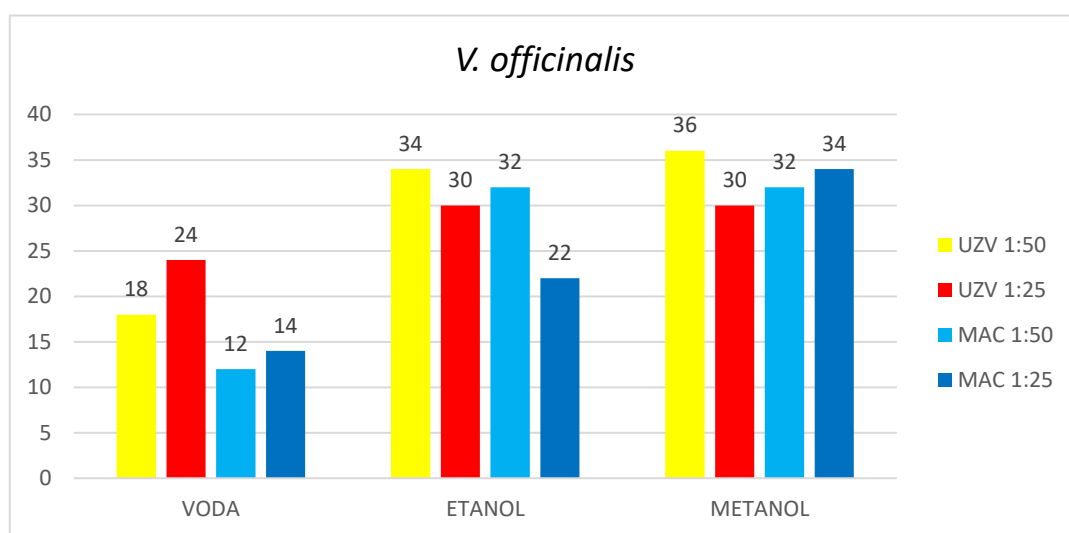
Za *V. officinalis*, najbolji prinos suhog ekstrakta s fenolnim spojevima postignut je ultrazvučnom ekstrakcijom (UZV) s metanolom kao otapalom pri razrjeđenju 1:50, gdje je prinos iznosio 36%. Sličan rezultat dobiven je s 80%-tnim etanolom pri istom razrjeđenju, s prinosom od 34%.

Kada je korištena metoda maceracije, prinosi su bili nešto manji. S 80%-tnim etanolom i metanolom u razrjeđenju 1:50, prinos je bio 32%. Pri razrjeđenju 1:25, metanol je ponovo dao najbolji prinos s 34%, dok su drugi rezultati bili niži.

Voda kao otapalo pokazala je znatno slabije rezultate. Samo pri ultrazvučnoj ekstrakciji i razrjeđenju 1:25 postignut je prinos od 24%, dok su ostali uzorci gdje je korištena voda kao otapalo imali puno niže prinose u usporedbi s organskim otapalima (Tablica 1, Slika 12).

Tablica 1. Prinosi za *V. officinalis*

METODA	RAZRJEĐENJE	OTAPALO	PRINOS [%]
UZV ekstrakcija	1:50	Voda	18
		80%-tni etanol	34
		Metanol	36
	1:25	Voda	24
		80%-tni etanol	30
		Metanol	30
Maceracija	1:50	Voda	12
		80%-tni etanol	32
		Metanol	32
	1:25	Voda	14
		80%-tni etanol	22
		Metanol	34



Slika 12. Prinosi za *V. officinalis*

Kada se radi o ekstrakciji suhih ekstrakata s fenolnim spojevima iz biljne vrste *V. beccabunga*, metanol se pokazao kao najučinkovitije otapalo. Pri ultrazvučnoj ekstrakciji (UZV) s razrjeđenjem 1:50, metanol je pružio najbolji rezultat s prinosom od 36%. Kada se

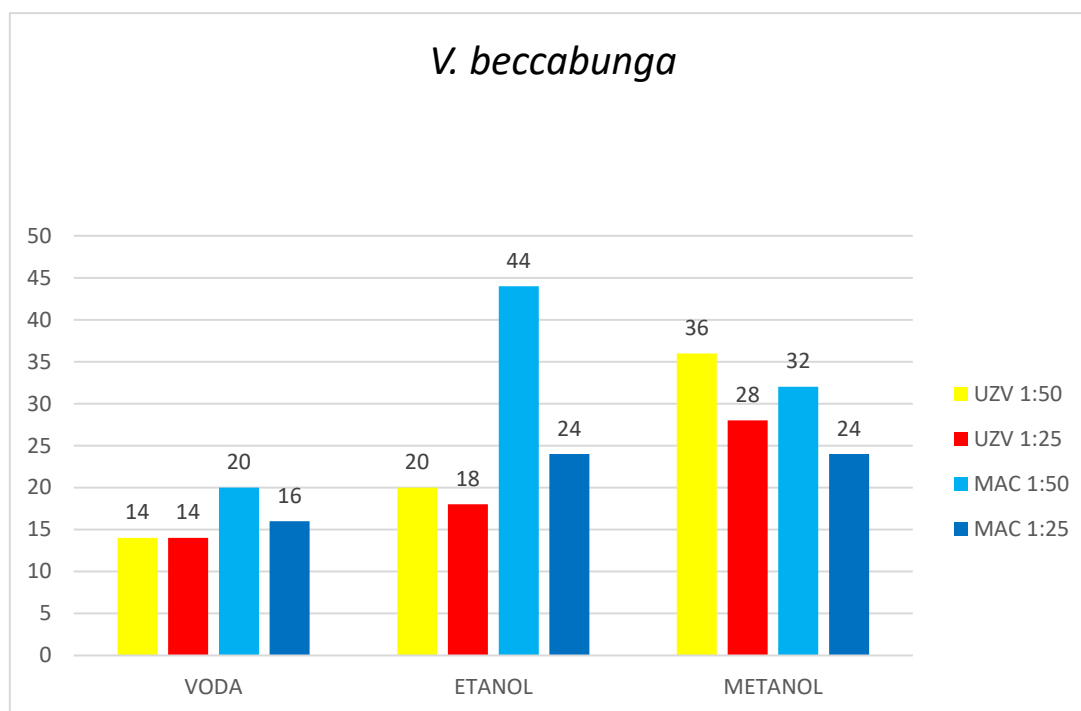
koristi razrjeđenje 1:25, metanol je i dalje bio najuspješniji, s prinosom od 28%. Za usporedbu, 80%-tni etanol je dao nešto slabije rezultate – 20% pri razrjeđenju 1:50 i 18% pri razrjeđenju 1:25. Voda je bila najmanje učinkovita, s prinosom od samo 14% za oba razrjeđenja.

U rezultatima maceracije, 80%-tni etanol je bio najuspješniji pri razrjeđenju 1:50, s najvećom vrijednošću od 44%. Metanol je bio nešto slabiji s 32%, dok je voda imala prinos od 20%. Pri razrjeđenju 1:25, svi su rezultati bili niži; voda je dala 16%, dok su 80%-tni etanol i metanol imali jednak prinos od 24%.

Ovi rezultati jasno pokazuju da metanol često daje najbolje rezultate u ultrazvučnoj ekstrakciji, dok je 80%-tni etanol najbolji izbor za maceraciju. Voda, s druge strane, ne pruža dobre rezultate u usporedbi s organskim otapalima (Tablica 2, Slika 13).

Tablica 2. Prinosi za *V. beccabunga*

METODA	RAZRJEĐENJE	OTAPALO	PRINOS [%]
UZV ekstrakcija	1:50	Voda	14
		80%-tni etanol	20
		Metanol	36
	1:25	Voda	14
		80%-tni etanol	18
		Metanol	28
Maceracija	1:50	Voda	20
		80%-tni etanol	44
		Metanol	32
	1:25	Voda	16
		80%-tni etanol	24
		Metanol	24



Slika 13. Prinosi za *V. beccabunga*

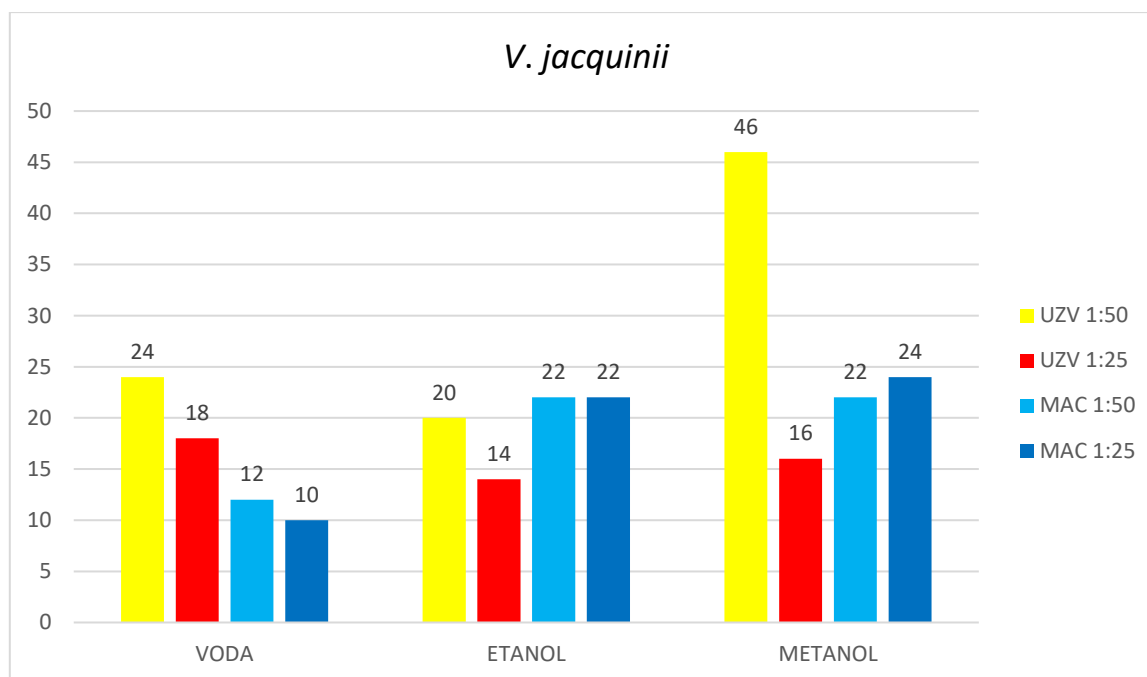
Kad se pogledaju rezultati za ekstrakciju suhih ekstrakata s fenolnim spojevima kod vrste *V. jacquinii*, metanol kao otapalo se ističe kao najbolji izbor. Pri ultrazvučnoj ekstrakciji (UZV) s razrjeđenjem 1:50, metanol je dao najviši prinos od 46%. U usporedbi s njim, 80%-tni etanol i voda su imali niže prinose – 20%, odnosno 24%. Kada se koristi razrjeđenje 1:25, metanol je i dalje imao nizak prinos od 16%, dok su voda i 80%-tni etanol također dali niske prinose, to jest 18% i 14%.

Kad se primjeni metoda maceracije, situacija je malo drugačija. Pri razrjeđenju 1:50, metanol i 80%-tni etanol dali su jednake rezultate od 22%, dok je voda imala prinos od samo 12%. Kod razrjeđenja na 1:25, metanol je postigao bolji rezultat od 24%, dok su voda i 80%-tni etanol imali prinos od 10% i 22%.

Ovi podaci pokazuju da metanol najbolje funkcionira pri ultrazvučnoj ekstrakciji, dok je 80%-tni etanol najbolji u maceraciji. Voda, u usporedbi s ovim otapalima, pokazuje slabije rezultate u svim testiranim uvjetima (Tablica 3, Slika 14).

Tablica 3. Prinosi za *V. jacquinii*

METODA	RAZRJEĐENJE	OTAPALO	PRINOS [%]
UZV ekstrakcija	1:50	Voda	24
		80%-tni etanol	20
		Metanol	46
	1:25	Voda	18
		80%-tni etanol	14
		Metanol	16
Maceracija	1:50	Voda	12
		80%-tni etanol	22
		Metanol	22
	1:25	Voda	10
		80%-tni etanol	22
		Metanol	24



Slika 14. Prinosi za *V. jacquinii*

4.2 Rasprava

Rezultati ovoga završnoga rada pokazuju kako je ultrazvučna ekstrakcija najefikasnija metoda za ekstrakciju suhih ekstrakata s fenolnim spojevima iz vrsta roda *Veronica*, osobito kada se upotrebljava metanol kao otapalo, što je u skladu s istraživanjem Menalo (2016) [28], koja je utvrdila da ultrazvučna ekstrakcija s većim koncentracijama organskih otapala rezultira višim prinosima fenola. Iako je metanol pokazao najveći prinos suhog ekstrakta s fenolnim spojevima u ovom istraživanju, Sušić (2023) [29] i Bačić (2024) [30] upozoravaju na toksičnost metanola i sugeriraju da je 80%-tni etanol ekološki prihvatljivija i sigurnija opcija, što također podržavaju rezultati ovog završnog rada gdje je 80%-tni etanol kao otapalo postigao gotovo jednake ili neznatno niže prinose od čistog metanola.

Usporedimo li istraživanje Lučića (2018) [31], gdje je metoda ekstrakcije refulksiranjem pokazala najbolje rezultate za ekstrakciju ukupnih fenola iz lista kadulje, naši rezultati sugeriraju da bi ultrazvučna ekstrakcija mogla biti optimalna metoda za korištenje kada je riječ o rodu *Veronica*. S druge strane, nalazi Burilo (2023) [32] također podržavaju korištenje ultrazvučne ekstrakcije za optimalnu izolaciju fenola, ali pod određenim uvjetima kao što su visoka amplituda i impuls. Ova dva faktora nisu značajno istražena u radu, ali bi mogli biti važni za daljnja istraživanja.

Što se tiče maceracije, dobiveni rezultati u ovom radu pokazuju da ova metoda daje niže prinose suhih ekstrakata s fenolnim spojevima u usporedbi s ultrazvučnom ekstrakcijom, što je u skladu s nalazima Sušić (2023) [29], koja je utvrdila da je maceracija manje učinkovita tehnika. Međutim, Lauc (2023) [33] je otkrila da maceracija može biti bolja od dekokcije za određene vrste *Veronica* kada su u pitanju klasične tehnike ekstrakcije, a što također može upućivati da učinkovitost metode može ovisiti i o specifičnim karakteristikama biljne vrste.

Rezultati Butorac (2018) [34] također su relevantni jer ukazuju na to da temperatura i trajanje ekstrakcije igraju značajnu ulogu u izolaciji fenola. Iako u ovom završnom radu nije specifično ispitivan utjecaj temperature i vremena, dobiveni rezultati sugeriraju da bi ove varijable mogle dodatno optimizirati prinos fenola, posebno kada se koristi metanol i etanol kao otapalo.

Istraživanje Vrca i sur. (2024) [35] potvrđuje da ultrazvučna ekstrakcija daje bolje rezultate od klasičnih metoda poput maceracije. Oni su pokazali da ultrazvučna ekstrakcija ne samo da povećava količinu fenolnih spojeva, već i poboljšava kvalitetu ekstrakata. Ovo je u

skladu s dobivenim rezultatima, koji također pokazuju da metanol u ultrazvučnoj ekstrakciji daje najbolje rezultate. Također, Vrca i sur. [35] naglašavaju važnost kontrole temperature i vremena, što je značajno za naše istraživanje i može pomoći u daljnjem poboljšanju metoda.

Nakon analize rezultata, jasno je da upravo različite metode ekstrakcije utječu na kvalitetu i količinu fenolnih spojeva iz biljaka roda *Veronica*. Ultrazvučna ekstrakcija se pokazala kao izuzetno učinkovita tehnika, posebno kada se koristi metanol, dok 80%-tni etanol također pokazuje dobre rezultate, ali ne toliko visoke kao metanol. Također, nikako manje važno, pravilan odabira otapala ne može se zanemariti, budući da se kvaliteta ekstrakta može značajno razlikovati ovisno o korištenom otapalu. U budućim istraživanjima moglo bi biti korisno dodatno istražiti kako različite varijacije u postupku ekstrakcije, poput vremena i temperature, mogu utjecati na učinkovitost i sastav izoliranih fenolnih spojeva.

5 Zaključak

Na temelju ovog završnog rada doneseni su sljedeći zaključci:

1. Vrste *V. officinalis* i *V. beccabunga* daju rezultate na istom tragu, organska otapala poput metanola i 80%-tnog etanola učinkovitija su u ekstrakciji suhih ekstrakata s fenolnim spojevima u odnosu na vodu posebno kada se koriste uz ultrazvučnu ekstrakciju. Maceracija daje nešto niže prinose, ali rezultati s organskim otapalima su i dalje bolji od onih postignutih vodom. Voda kao otapalo pokazuje znatno slabije rezultate.
2. Kod *V. jacquini*, metanol se također pokazao kao najbolje otapalo skupa s tehnikom ultrazvučne ekstrakcije kao i metanol s tehnikom maceracije. Voda se pokazala kao najmanje učinkovito otapalo u svim uvjetima ekstrakcije.
3. Najbolji prinos suhih ekstrakata s fenolnim spojevima za sve tri biljne vrste postignut je pri razrjeđenju 1:50, što ga čini najučinkovitijim za ekstrakciju. Smanjenje razrjeđenja na 1:25 rezultiralo je nižim prinosima za sve vrste.
4. Metanol se pokazao kao najučinkovitije otapalo za ekstrakciju fenolnih spojeva za sve tri biljne vrste, dok su prinosi s 80%-tnim etanolom bili nešto niži, a značajno mali prinosi su bili kada je voda upotrijebljena kao otapalo. *V. officinalis* i *V. beccabunga* imale su najveći prinos s metanolom, dok je *V. jacquini* postigla najbolji rezultat s 80%-tnim etanolom.
5. Ultrazvučna ekstrakcija generalno daje najbolje rezultate za sve tri biljne vrste u ekstrakciji fenolnih spojeva, s najvišim prinosom kod *V. officinalis*. Ipak, za *V. beccabunga*, maceracija pokazuje bolji prinos, dok je za *V. jacquini* ultrazvučna ekstrakcija također učinkovitija od maceracije.

Rezultati ovog znanstvenog rada samo su preliminarni rezultati. Rad se može produbiti statistički, izradom replikata, računanjem pogreške, srednjih vrijednosti i ostalih čimbenika.

6 Literatura

1. Nikolić, T. (2013). Sistematska botanika. Alfa, Zagreb.
2. Glavaš, M. (2019). Enciklopedija domaćeg ljekovitog bilja. Ceres, Zagreb.
3. Nazlić, M., Fredotović, Ž., Vuko, E., Fabijanić, L., Kremer, D., Stabentheiner, E., Ruščić, M., & Dunkić, V. (2021). Wild species *Veronica officinalis* L. and *Veronica saturejoides* vis. ssp. *saturrejoides*—biological potential of free volatiles. *Horticulturae*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/horticulturae7090295>
4. Beara, I., Živković, J., Lesjak, M., Ristić, J., Šavikin, K., Maksimović, Z., & Janković, T. (2015). Phenolic profile and anti-inflammatory activity of three *Veronica* species. *Industrial Crops and Products*, 63, 276–280. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.034>
5. Xue, H., Chen, K. X., Zhang, L. Q., & Li, Y. M. (2019). Review of the Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Pharmacology of the Genus *Veronica*. *American Journal of Chinese Medicine*, 47, 1193–1221. <https://doi.org/10.1142/S0192415X19500617>
6. Salehi, B., Shetty, M. S., Anil Kumar, N. V., Živković, J., Calina, D., Docea, A. O., Emamzadeh-Yazdi, S., Kılıç, C. S., Goloshvili, T., Nicola, S., Pignata, G., Sharopov, F., Del Mar Contreras, M., Cho, W. C., Martins, N., & Sharifi-Rad, J. (2019). *Veronica* plants—drifting from farm to traditional healing, food application, and phytopharmacology, *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules24132454>
7. Gelenčir J., Gelenčir J. (1991). Atlas ljekovitog bilja. Prosvjeta, Zagreb.
8. Grlić, Lj. (1986) Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. ITRO August Cesarec, Zagreb.
9. Nazlić, M. (2023). Identifikacija i biološka aktivnost slobodnih hlapljivih spojeva roda *Veronica* L. (Plantaginaceae), Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:996836>
10. Pevalek-Kozlina, B. (2003). Fiziologija bilja. Profil, Zagreb.
11. Dubravec D.K., Regula I. (1995). Fiziologija bilja. Školska knjiga, Zagreb.
12. <https://www.enciklopedija.hr/clanak/fitoaleksini> pristupljeno 19.03.2024.
13. Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher, M. (2003). Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 519–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938>

14. Dias, M. C., Pinto, D. C. G. A., & Silva, A. M. S. (2021). Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules*, 26, 17. <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>
15. Brahmachari, G., & Gorai, D. (2006). Progress in the Research on Naturally Occurring Flavones and Flavonols: An Overview. In *Current Organic Chemistry* (Vol. 10).
16. Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* 30, 18, 3268–3295. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700261>
17. Heleno, S. A., Martins, A., João, M., Queiroz, R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (n.d.). Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds.
18. Kiokias, S., Proestos, C., & Oreopoulou, V. (2020). Phenolic acids of plant origin-a review on their antioxidant activity in vitro (O/W emulsion systems) along with their in vivo health biochemical properties, *Foods*, 9, 4. <https://doi.org/10.3390/foods9040534>
19. Chibuye, B., Singh, S. I., Chimuka, L., & Maseka, K. K. (2023). A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants, *Scientific African*, 19, e01585. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01585>
20. Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D. G., & Lightfoot, D. A. (2017). Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts, *Plants*, 6, 4. <https://doi.org/10.3390/plants6040042>
21. <https://www.enciklopedija.hr/clanak/maceracija> pristupljeno 20.03.2024
22. Ormeño, E., Goldstein, A., & Niinemets, Ü. (2011). Extracting and trapping biogenic volatile organic compounds stored in plant species, *Trends in Analytical Chemistry*, 30, 978–989. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.04.006>
23. <https://www.hielscher.com/hr/ultrasonic-extraction-and-its-working-principle.htm> pristupljeno 20.3.24
24. Odžak, R., Interna skripta iz Opće kemije (2024)
25. <https://www.enciklopedija.hr/clanak/liofilizacija> pristupljeno 20.03.2024.
26. <http://struna.ihjj.hr/naziv/liofilizator/42736/> pristupljeno 20.03.2024.
27. Gaidhani, K.A., Harwalkar, M., Bhambere, D., Nirgude, P.S. (2015). Lyophilization/ freeze drying, *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(8), str.516-543.
28. Menalo, M. (2016). Utjecaj ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na izolaciju fenolnih spojeva trnine (*Prunus spinosa* L.)', Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu,

Prehrambeno-biotehnološki fakultet, citirano: 29.08.2024.,
<https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:092925>

29. Sušić, K. (2023). 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., Završni rad, Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet, citirano: 29.08.2024., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:166:710980>
30. Bačić, K. (2024). Ispitivanje optimalnog prinosa fenolnih spojeva iz roda *Veronica* primjenom različitih tehnika ekstrakcije i otapala, Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 29.08.2024. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:166:645054>
31. Lučić, D. (2018). 'Priprema ekstrakata lista kadulje (*Salvia officinalis* L.) i određivanje polifenolnih spojeva', Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:095966>
32. Burilo, A. (2023). 'Ekstrakcija ciljanih bioaktivnih komponenti iz unutarnjih pregrada oraha', Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 29.08.2024. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:863058>
33. Lauc, M. (2023). Određivanje najučinkovitije metode ekstrakcije te otapala za izolaciju fenolnih spojeva iz vrsta *Veronica polita* L. i *Veronica chamaedrys* L., Završni rad, Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:166:331389>
34. Butorac, V. (2018). Utjecaj primijenjene metode ekstrakcije na izolaciju bioaktivnih komponenti iz lavande. Završni rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet.
35. Vrca, I.; Orhanović, S.; Pezelj, I.; Sušić, K.; Dunkić, V.; Kremer, D.; Nazlić, M. Identification of Phenolic Compounds Present in Three Speedwell (*Veronica* L.) Species and Their Antioxidant Potential. *Antioxidants* 2024, 13, 738. <https://doi.org/10.3390/antiox13060738>

Web stranice (slike)

Web 1: <https://gobotany.nativeplanttrust.org/species/veronica/officinalis/>

Web 2: <https://www.britishflora.co.uk/full-index/wetlands-marshes/brooklime/>

Web 3: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Veronica_jacquinii_%28habitus%29.jpg

Web 4: <https://www.biorender.com/template/plant-phytochemical-extraction>

Web 5: https://www.researchgate.net/figure/Figure2-Commonly-used-ultrasonic-systems-A-Ultrasound-bath-B-Ultrasound-bath-equipped_fig1_346051081