

57. državno srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2023



**FORMULACIJA NARAVNEGA EKSTRAKTA *Hyssopus officinalis*
KOT PODPORNA TERAPIJA PRI COVIDU-19 Z UPORABO
ZELENIH TEHNOLOGIJ**

Raziskovalno področje: KEMIJA ALI KEMIJSKA TEHNOLOGIJA

Raziskovalna naloga

Avtor: Matic Mohorko, 2. letnik

Mentorica: Anita Mustač, prof. kemije

Somentorica: dr. Taja Žitek, mag. inž. kem. teh.

Šola: II. gimnazija Maribor,

Trg Miloša Zidanška 1, Maribor

Maribor, 2023

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	11
1.1	Opredelitev problema	11
1.2	Pregled literature.....	12
1.3	Namen, hipoteze in cilji.....	13
2	TEORETIČNI DEL	15
2.1	<i>Hyssopus officinalis</i>	15
2.1.1	Uporaba	15
2.2	Antioksidanti	16
2.3	Totalni fenoli	17
3	METODE DELA	18
3.1	Ekstrakcijske metode	18
3.1.1	Ultrazvočna ekstrakcija	18
3.1.1.1	Ultrazvok.....	18
3.1.1.2	UZE.....	19
3.1.1.3	Prednosti UZE.....	19
3.1.2	Filtracija	20
3.1.3	Uparjanje	20
3.2	Spektrofotometrične metode.....	21
3.2.1	Spektrofotometrija.....	21
3.2.2	Določanje vsebnosti totalnih fenolov s Folin-Ciocalteujevim reagentom	22
4	EKSPERIMENTALNI DEL.....	24
4.1	Načrt	24
4.2	Materiali.....	25

4.3	Inventar in kemikalije	25
4.4	Priprava rastlinskega materiala za postopek ekstrakcije	27
4.5	Proces ekstrahiranja	27
4.5.1	Ultrazvočna ekstrakcija	28
4.5.2	Filtracija	30
4.5.3	Uparjanje	30
4.5.4	Izkoristek ekstrakcije	32
4.6	Analiza ekstrakta	33
4.6.1	Določanje vsebnosti totalnih fenolov s Folin-Ciocalteujevim reagentom	33
4.6.1.1	Priprava raztopin in reagentov	33
4.6.1.2	Umeritvena krivulja z galno kislino	33
4.6.1.3	Potek analize	34
4.6.1.4	Izračun vsebnosti totalnih fenolov	35
4.7	Formulacija naravnega ekstrakta v produkt	37
4.7.1	Nosni inhalator	37
4.7.1.1	Sestava produkta	37
4.7.1.2	Potek formulacije	37
4.7.2	Krema	39
4.7.2.1	Sestava produkta	39
4.7.2.2	Potek formulacije	39
5	REZULTATI	43
5.1	Postopek ultrazvočne ekstrakcije	43
5.2	Določanje vsebnosti totalnih fenolov s Folin-Ciocalteujevim reagentom	44
5.2.1	Umeritvena krivulja z galno kislino	44

5.2.2	Vsebnost totalnih fenolov.....	44
6	RAZPRAVA	47
6.1	Ovrednotenje rezultatov in metod	47
6.1.1	Izkoristek ultrazvočne ekstrakcije.....	47
6.1.2	Vsebnost totalnih fenolov.....	47
6.2	Ovrednotenje hipotez.....	48
6.3	Ovrednotenje ciljev.....	49
6.4	Možne izboljšave.....	50
7	DRUŽBENA ODGOVORNOST	51
8	ZAKLJUČEK	52
8.1	Možnost nadgradnje	52
9	VIRI IN LITERATURA	54
9.1	Bibliografija.....	54
9.2	Viri slik	59

KAZALO SLIK

Slika 1: <i>Hyssopus officinalis</i> (Vrtnarstvo Breskvar)	15
Slika 2: Živila, bogata z antioksidanti (Getty Images).....	17
Slika 3: UV-VIS spektrofotometer (lasten vir)	21
Slika 4: Načrt eksperimentalnega dela (lasten vir).....	24
Slika 5: Posušen zmlet material navadnega ožepka (lasten vir).....	27
Slika 6: Zmes materiala ožepka in etanola pred ekstrakcijo (lasten vir).....	28
Slika 7: Ultrazvočna kopel (lasten vir).....	29
Slika 8: Zmes, preostala po UZ kopeli (lasten vir)	29
Slika 9: Filtracija s podtlakom (lasten vir)	30
Slika 10: Uparjanje na rotavaporju (lasten vir)	31
Slika 11: Hramba ekstrakta (lasten vir).....	31
Slika 12: Priprava vzorcev za analizo (lasten vir).....	34
Slika 13: Kivete z vzorci za analizo (lasten vir).....	35
Slika 14: Homogena zmes ekstrakta, olja iz grozdnih pešk, emulgatorja in konzervansa (lasten vir)	38
Slika 15: Formulacija nosnega inhalatorja (lasten vir).....	38
Slika 16: Priprava oljne faze kreme (lasten vir)	40
Slika 17: Priprava vodne faze kreme (lasten vir)	41
Slika 18: Formulacija kreme (lasten vir).....	41
Slika 19: Končna produkta (lasten vir)	42

KAZALO GRAFIKONOV

Grafikon 1: Masni odstotki posameznih komponent kreme	40
Grafikon 2: Vsebnosti totalnih fenolov, izražene v mg GA na g ekstrakta	46
Grafikon 3: Vsebnosti totalnih fenolov, izražene v mg GA na g materiala	46

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Umeritvena krivulja GA za določanje vsebnosti totalnih fenolov.....	44
---	----

KAZALO TABEL

Tabela 1: Rezultati ultrazvočne ekstrakcije	43
Tabela 2: Rezultati določanja vsebnosti totalnih fenolov	45

POVZETEK

V okviru raziskovalne naloge smo se ukvarjali z medovito rastlino *Hyssopus officinalis*, imenovano tudi navadni ožepek, ki se že iz antičnih časov uporablja v namene tradicionalne zeliščne medicine. Po pregledu literature in izbiri ustreznih metod smo naravni ekstrakt ožepka pridobili z ultrazvočno ekstrakcijo z uporabo etanola kot topila. Sledila je spektrofotometrična analiza ekstraktov, kjer smo jim z uporabo Folin-Ciocalteujevega reagenta in UV-VIS spektrofotometra izmerili vsebnost biološko aktivnih komponent, natančneje totalnih fenolov. Vsebnost slednjih je znašala $(47,3 \pm 0,3)$ mg galne kisline (GA) na g ekstrakta oz. $(2,7 \pm 0,3)$ mg GA na g materiala. V končni fazi smo ekstrakt formulirali v nosni inhalator in univerzalno kremo, ki ju lahko ljudje uporabljajo kot podporno terapijo pri težavah dihal pri ali po covidu-19, saj ožepek na podlagi pregledane literature vsebuje zdravilne snovi, ki delujejo pomirjevalno in protivnetno, pomagajo pri boleznih dihal ter zavirajo kašelj.

Ključne besede: *Hyssopus officinalis*, ultrazvočna ekstrakcija, spektrofotometrična metoda, totalni fenoli, covid-19, nosni inhalator, krema

ABSTRACT

My research paper focuses on the evergreen plant *Hyssopus officinalis*, also known as hyssop, which has been used in traditional herbal medicine since the ancient times. After reviewing the literature and selecting the appropriate methods, I obtained the natural extract of hyssop by ultrasonic extraction using ethanol as the solvent. The extraction was followed by the spectrophotometric analysis of the extracts using the Folin-Ciocalteu reagent and a UV-VIS spectrophotometer, with which I measured the content of biologically active components, specifically total phenols. The content of the latter was $(47,3 \pm 0,3)$ mg of gallic acid (GA) per g of extract or $(2,7 \pm 0,3)$ mg of GA per g of material. In the final stage, I formulated the extract into a nasal inhaler and an all-purpose cream that can be used as supportive therapy for respiratory problems during or after COVID-19, since hyssop, based on the reviewed literature, contains several medicinal substances that have a soothing and anti-inflammatory effect. In addition, it helps with respiratory diseases and inhibits coughing.

Key words: *Hyssopus officinalis*, ultrasonic extraction, spectrophotometric method, total phenols, COVID-19, nasal inhaler, cream

ZAHVALA

“Skrivnost uspeha ni v tem, da pred problemom bežimo in se ga skušamo znebiti, skrivnost uspeha je, da se problemu zoperstavimo, se z njim soočimo in ga skušamo rešiti.”

Ko želim izreči zahvalo vsem, ki so pripomogli pri ustvarjanju raziskovalne naloge, se beseda »hvala« zdi preskromna, da bi lahko vanjo vlil vse svoje misli in občutke.

Posebno zahvalo namenjam svoji zunanji mentorici dr. Taji Žitek za strokovno pomoč, usmerjanje in hkrati veliko spodbudo pri izvedbi raziskovalnega dela. Nepogrešljiva pri poteku dela je bila tudi moja šolska mentorica Anita Mustač. Zahvaljujem se Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru za možnost izvedbe eksperimentalnega dela.

Iskrena hvala tudi lektorici Tini Mojzer za jezikovni pregled dela, staršem in vsem, ki so na kakršenkoli način pripomogli k uresničitvi zastavljenih ciljev.

UPORABLJENI SIMBOLI IN KRATICE

Simboli

Abs	absorbanca raztopine vzorca, izmerjena pri določeni valovni dolžini
a	naklon premice umeritvene krivulje GA [mL mg ⁻¹]
b	odsek premice umeritvene krivulje GA na osi absorbance
c	množinska koncentracija absorbirajoče snovi [mol L ⁻¹]
l	dolžina optične poti [cm]
$m_{bučka}$	masa bučke [g]
$m_{ekstrakt}$	masa pridobljenega ekstrakta [g]
$m_{ekstrakt+bučka}$	masa pridobljenega ekstrakta in bučke [g]
$m_{material}$	masa zatehtanega materiala [g]
V_{GA}	volumen GA [mL]
$V_{raztopina}$	volumen raztopine [mL]
$W_{GA(ekstrakt)}$	vsebnost totalnih fenolov, izražena v mg GA na g ekstrakta
$W_{GA(material)}$	vsebnost totalnih fenolov, izražena v mg GA na g materiala

Grški simboli

$\gamma_{ekstrakt}$	masna koncentracija ekstrakta v raztopini vzorca [mg mL ⁻¹]
γ_{GA}	masna koncentracija GA v raztopini ekstrakta [mg mL ⁻¹]
ε	molarni absorpcijski koeficient [L mol ⁻¹ cm ⁻¹]
$\eta_{ekstrakcija}$	izkoristek ekstrakcije [%]

Kratice

FC	Folin-Ciocalteujev reagent
GA	galna kislina
SCE	superkritična ekstrakcija
UV	ultravijolično
UZ	ultrazvok
UZE	ultrazvočna ekstrakcija
VIS	vidni spekter

1 UVOD

1.1 Opredelitev problema

Narava je bila od nekdaj glavni vir živil in snovi, ki so koristne za človekovo zdravje. Naravni proizvodi, kot so rastlinski ekstrakti, imajo zelo raznoliko kemijsko sestavo, ki omogoča neomejene možnosti za odkrivanje novih načinov njihove uporabe. Zaradi vsebnosti mnogoterih biološko aktivnih komponent, ki sicer niso ključne za preživetje, a lahko v veliki meri izboljšajo zdravstveno stanje organizma, postajajo vedno bolj pomemben del našega vsakdana.

Pripisujejo jim ogromno pozitivnih lastnosti, kot so antioksidativni potencial, antikancerogeno, antidiabetično in protivnetno delovanje. Zaradi naravnega izvora pa so tudi odlični kandidati za nadomestitev sintetičnih spojin. Prav zato naravne alternative v medicini in farmaciji vzbujajo veliko zanimanje, saj človeško telo iz dneva v dan pridobiva vedno večjo odpornost na uveljavljena zdravila [1].

Zdi se, kot da se človeštvo vrača k svojim začetkom. Po eni strani se nadejamo umetno sintetizirati nova zdravila in stremimo k njihovi široki uporabi v prihodnosti, po drugi pa na svojem pomenu ponovno pridobiva tradicionalna, zlasti zeliščna medicina, katere korenine segajo že v antične čase. Na njej je vedno večji poudarek tudi pri virusnih okužbah dihal, ki spadajo med najpogosteje bolezni pri ljudeh. Njihov delež se je znatno povečal s pandemijo koronavirusa SARS-CoV-2, povzročitelja bolezni covid-19, ki je v preteklih letih postala glavna javnozdravstvena globalna katastrofa [2].¹

Glavni organ, ki ga prizadene okužba z omenjenim virusom, so pljuča. Dolgoročno se pričakuje, da se bodo težave z dihali, ki se pojavijo bodisi med boleznijo bodisi po prebolelem covidu-19 (splošne težave pri dihanju, pogosta zasoplost, utrujenost in kašelj), znatno povečale [4,5].

¹ Spletni portal Jezikovna svetovalnica v okviru Inštituta za slovenski jezik Frana Ramovša na SAZU navaja, da sta pravilna zapisa za ime bolezni dva – covid-19 in COVID-19, medtem ko je, sicer pogosto uporabljen, zapis Covid-19 napačen [3]. Zaradi večje preglednosti bomo v okviru raziskovalne naloge uporabljali zapis z malimi črkami.

V splošnem je prednost večine zelišč, da imunskemu sistemu pomagajo pri soočanju z virusnimi okužbami [6]. *Hyssopus officinalis*, imenovan tudi navadni ožepek, vsebuje biološko aktivne komponente (npr. fenolne spojine), ki na človeško telo delujejo pomirjevalno, pomagajo pri boleznih dihal in zavirajo kašelj [7]. Zato je cilj raziskovalne naloge pripraviti naravno formulacijo ekstrakta ožepka v produkt, ki bi lahko bil uporabljen kot podpora terapiji pri težavah dihal kot posledica covida-19.

1.2 Pregled literature

Tradicionalna zeliščna medicina trdi, da ožepek na človeško telo deluje pomirjujoče, blagodejno vpliva na dihalne poti, pomaga pri izkašljevanju in zavira kašelj [8]. Že stoletja se uporablja v tradicionalni medicini za izboljšanje krvnega obtoka in za zdravljenje številnih stanj, kot sta kašelj in vneto grlo, prav tako pa stimulira gastrointestinalni sistem [9]. Komponente ožepka, še posebej eterična olja, se pogosto uporabljajo kot dodatek v pijačah, hrani in kozmetiki. Vsebujejo namreč mnoge pomembne bioaktivne sestavine, kot so terpenoidi, flavonoidi, fenolne spojine in drugi sekundarni metaboliti. Sharifi-Rad in sodelavci so raziskali, da je pri izolaciji biološko aktivnih komponent uporaba nekonvencionalnih ekstrakcijskih metod, kot sta superkritična in ultrazvočna ekstrakcija, v primerjavi z uporabo konvencionalnih učinkovitejša in ustreznejša, saj omogoča ohranitev potencialno termolabilnih in nestabilnih komponent v ekstraktih [10]. Rashidi, S. idr. so izvedli ekstrakcijo navadnega ožepka z različnimi ekstrakcijskimi metodami, vključno z UZE. Izkoristek slednje je znašal 1,58 % [11]. Tungmannithum, D. in sodelavci pa so z UZE ekstrahirali rožmarinsko kislino iz *Plectranthus scutellarioides* – rastline, ki spada v isto družino kot navadni ožepek (*Lamiaceae*). Pri ekstrakciji so kot topilo uporabili etanol, njen izkoristek pa je znašal $8,21 \% \pm 0,65\%$ [12]. Nile, S. idr. so izvedli različne ekstrakcijske metode več rastlin, vključno z navadnim ožepkom. Ekstrakte so v nadaljevanju analizirali in jim s FC-reagentom določili vsebnost totalnih fenolov, ki je pri njihovi raziskavi znašala 64,40 mg GA/g ekstrakta [13]. Tudi Moulodi, F. idr. pa so preučevali kemično sestavo ter antioksidativne in protimikrobnne lastnosti eteričnega olja navadnega ožepka. Vsebnost totalnih fenolov slednjega je znašala $23,16 \pm 0,05$ mg GA/g eteričnega olja [14].

1.3 Namen, hipoteze in cilji

Namen raziskovalne naloge je pridobiti naravni ekstrakt navadnega ožepka po optimalnem postopku z uporabo zelenih tehnologij, ga analizirati ter izvesti formulacijo ekstrakta, katere produkt bi lahko ljudje uporabljali kot podporno terapijo pri težavah dihal pri covidu-19.

Cilj naloge je raziskati:

- S katero ekstrakcijsko metodo glede na literaturo je optimalno pridobiti naravni ekstrakt ožepka in pri tem uporabiti zelene tehnologije?
- Ali ekstrakt vsebuje fenolne spojine, tj. biološko aktivne komponente, ki lahko pomagajo pri boleznih dihal?
- Kolikšna je vsebnost fenolnih spojin v ekstraktu?
- Kako lahko ekstrakt formuliramo v produkt, potencialen kot podpora terapija pri covidu-19?

Na podlagi pregledane literature smo si pred izvedbo eksperimentalnega dela postavili naslednje hipoteze:

Hipoteza 1: Predviedvamo, da bo izkoristek ekstrakcije navadnega ožepka okoli 5 %.

Argumentacija hipoteze: Hipotezo smo postavili na podlagi izsledkov raziskav, pri katerih so bile uporabljene enake ekstrakcijske metode kot v okviru naše naloge. Izkoristek UZE navadnega ožepka, ki so jo izvedli Rashidi, S. idr., je znašal 1,58 %, izkoristek UZE Tungmannithum, D. in sodelavcev pa $8,21 \% \pm 0,65\%$ [11,12].

Hipoteza 2: Predviedvamo, da je vsebnost totalnih fenolov v ekstraktu okoli 45 mg GA/g ekstrakta.

Argumentacija hipoteze: Hipotezo smo postavili na podlagi izsledkov raziskav, pri katerih so ekstrakt navadnega ožepka pridobili s podobnimi ekstrakcijskimi metodami in vsebnost prevladujočih bioaktivnih komponent, tj. totalnih fenolov, določili z enakimi analiznimi metodami kot mi. Vsebnost fenolnih spojin je v raziskavi, ki so jo izvedli Nile, S. idr., znašala 64,40 mg GA/g ekstrakta, v raziskavi Moulodi, F. idr. pa $23,16 \pm 0,05$ mg GA/g eteričnega olja [13,14].

Hipoteza 3: Predvidevamo, da se bo ekstrakt homogeno pomešal z oljem brez dodatka emulgatorja.

Argumentacija hipoteze: Hipotezo smo postavili na podlagi dejstev, da se iz posušenega materiala ožepka v prvi vrsti pridobivajo eterična olja le-tega [15]. Zaradi njihovega hidrofobnega značaja predvidevamo, da dodatek emulgatorja pri mešanju z drugimi olji ne bo potreben.

Hipoteza 4: Predvidevamo, da bo naš produkt po dveh mesecih izgubil vonj.

Argumentacija hipoteze: Hipotezo smo postavili na podlagi pričakovanj glede lastnosti produktov.

Hipoteza 5: Predvidevamo, da bo masno razmerje med vodno in oljno fazo kreme 7:2.

Argumentacija hipoteze: Hipotezo smo postavili na podlagi pregledanih receptur za različne vlažilne kreme [16–19].

2 TEORETIČNI DEL

2.1 *Hyssopus officinalis*

Zimzeleno zelišče *Hyssopus officinalis*, bolj znano kot navadni ožepek iz družine mete (*Lamiaceae*), je aromatična, zimzelena, olesenela, grmičasta trajnica, ki zraste v pokončnem grmastem šopku do 24 centimetrov visoko. Ima tanka olesenela steba in ozke eliptične lise s pikami. V poletnih mesecih zacvetijo dolgi, listnati cvetovi, ki so vijolično-modri, rožnati ali beli. Najbolje uspeva v srednje suhih, sončnih tleh ob obali Sredozemskega morja in v Zahodni Aziji [8].

Ožepek z vijolično-modrimi cvetovi prikazuje Slika 1.



Slika 1: *Hyssopus officinalis* (Vrtnarstvo Breskvar)

2.1.1 Uporaba

Listje, cvetovi in rastlinska olja ožepka imajo dolgo zgodovino uporabe v kulinariki in tradicionalni medicini, ki sega že v antične čase. Omenja ga tudi Sveti pismo.

V srednjem veku je predstavljal zelišče za kuhanje, danes pa se uporablja kot začimba za meso, ribe, zelenjavno, juhe, solate, sladkarije in likerje, kot je npr. absint, kateremu daje zeleno barvo. Čebelarji ga uporabljajo za proizvodnjo aromatičnega medu, zaradi vsebnosti aromatičnih olj pa se ožepkovi listi pogosto uporabljajo tudi pri izdelavi parfumov [20].

V tradicionalni medicini se domneva, da rastlina vsebuje zdravilne snovi, ki delujejo pomirjevalno, pomagajo pri boleznih dihal in zavirajo kašelj. Močan čaj, pripravljen iz listov ožepka, je tradicionalno zdravilo za bolezni nosu, grla in pljuč, včasih pa ga zaradi domnevnih protivnetnih učinkov uporablja tudi za odpravljanje modric [15].

2.2 Antioksidanti

Večina organizmov za svoj obstoj potrebuje kisik. Slednji je pomemben element, ki sodeluje pri različnih fizioloških presnovnih procesih, potrebnih za pravilno delovanje našega telesa. Hkrati velja za zelo reaktivno molekulo in predstavlja vir prostih radikalov, ki nastanejo kot stranski produkt oksidativnih presnovnih procesov [21].

Prosti radikali so delci z vsaj enim samskim elektronom, ki je vzrok za njihovo visoko reaktivnost. V primerjavi z radikali se pojavljajo samostojno, torej v osnovi niso vezani na neko drugo spojino [22].

Zaradi svoje reaktivnosti prosti radikali v našem telesu pogosto sprožajo številne neželene kemijske reakcije in s tem poškodujejo celice, kar pa lahko vodi do nastanka številnih bolezni, kot so diabetes, rakaste tvorbe, imunska pomanjkljivost, infarkt in različne vnetne bolezni, npr. arthritis [23].

Naše telo je ustvarilo precej mehanizmov, ki zavirajo nastajanje prostih radikalov. Pri tem imajo ključno vlogo antioksidanti. Antioksidanti nase vežejo škodljive proste radikale, jih stabilizirajo in tako preprečijo nadaljnje reakcije oksidacije v celicah. Zato veljajo za snovi, ki zavirajo oksidacijske procese in jih pogosto imenujemo tudi inhibitorji oksidacijskih reakcij [24].

Stanje, ko se ravno vesje med količino prostih radikalov in učinkovitostjo antioksidativnih obrambnih sistemov poruši, imenujemo oksidativni stres. Antioksidanti pomagajo preprečevati takšno stanje z lovljenjem prostih radikalov in s popravilom ali odstranjevanjem poškodovanih biomolekul v našem telesu [24].

V organizmih lahko najdemo dve vrsti antioksidantov: endogene, ki jih tvori organizem sam, in eksogene, ki jih zaužijemo s hrano. Zaradi tega je pomembno uživanje uravnotežene prehrane, bogate z antioksidanti, ki omogoča pridobitev oz. izgradnjo obeh vrst antioksidantov [25].

Nekatera živila, bogata z antioksidanti, prikazuje Slika 2.



Slika 2: Živila, bogata z antioksidanti (Getty Images)

Med znane antioksidante spadajo vitamin C, vitamin E in karoteni, ki jih naše telo samo pretvori v vitamin A [26].

2.3 Totalni fenoli

Antioksidativno delovanje pripisujejo tudi fenolnim spojinam [27].

V splošnem so fenoli aromatske organske spojine, ki imajo na aromatski obroč vezano eno ali več hidroksilnih ($-OH$) skupin. Najenostavnnejši fenol vsebuje benzenski obroč in le eno hidroksilno skupino. Je bela, hlapna in v vodi topna trdna snov, pogosto uporabljena v organski in polimerni kemiji za sintezo drugih spojin [28].

Totalni fenoli so pomembni proizvodi sekundarnega metabolizma v rastlinah. Slednjim zagotavljajo bistvene funkcije pri razmnoževanju in rasti, delujejo kot obrambni mehanizmi proti parazitom in patogenom ter prispevajo tudi k barvi rastlin. Vključujejo fenolne kislune, flavonoide, kumarine, lignine in nekatere druge spojine. V vedno večji meri so deležni velikega zanimanja zaradi svojih zdravstvenih koristi, najdemo pa jih predvsem v sadju, zelenjavi, zeliščih, začimbah in oreščkih [29].

Poleg vloge, ki jo imajo v rastlinah, pa jim pripisujejo tudi druge biološke učinke, vključno z antioksidativno aktivnostjo – njihovo delovanje ima mnoge antikancerogene, protivnetne in protimikrobne lastnosti, prav tako pa preprečujejo bolezni srca, delujejo pomirjujoče in lajšajo dihalne stiske. Hidroksilne skupine v njih namreč omogočajo lažje odstranjevanje prostih radikalov [30,31].

3 METODE DELA

3.1 Ekstrakcijske metode

Ekstrakcija je prvi kritični korak ločevanja in pridobivanja bioaktivnih spojin iz rastlin. Je separacijska metoda, s pomočjo katere ločujemo komponente iz zmesi na osnovi topnosti v ekstrakcijskem topilu. Ekstrakcija naravnih produktov v splošnem obsega štiri faze: prodom topila v material, razapljanje topljenca v topilu, difuzijo topljenca iz materiala in zbiranje ekstrahirane raztopine. Sledi še postopek ločevanja ekstrakta iz nastale raztopine [32].

Učinkovitost ekstrakcije je odvisna od več faktorjev [32]:

- ustrezne izbire ekstrakcijskega topila,
- velikosti delcev surovine,
- razmerja med topilom in trdno snovjo, kjer se z večanjem razmerja povečuje izkoristek ekstrakcije;
- temperature ekstrakcije, kjer se z višanjem temperature povečujeta topnost in difuzivnost, vendar lahko postopek ob previsokih temperaturah vodi do razgradnje termolabilnih komponent, in
- časa ekstrakcije.

Pri mnogih ekstrakcijskih metodah je kljub visoki porabi energije in količine topila izkoristek pogosto majhen, negativen vpliv na okolje pa velik. Zelene ekstrakcijske metode, med katere spada tudi ultrazvočna ekstrakcija, pa imajo nekatere prednosti pred konvencionalnimi metodami, predvsem z vidika manjše porabe energije in topil, večjega izkoristka ekstrakcije ter kakovosti pridobljenih ekstraktov [33,34].

3.1.1 Ultrazvočna ekstrakcija

3.1.1.1 Ultrazvok

Beseda ultrazvok se nanaša na vse zvočne valove s frekvenco, višjo od zgornje meje slišnega območja, kar je pri človeku pribl. 20 kHz ($20 \cdot 10^3$ s⁻¹). Pri nekaterih živalih (npr. pri psih, delfinih in netopirjih) je zgornja meja slišnega območja višja kot pri človeku, kar jim omogoča, da slišijo tudi ultrazvok [35].

Zelo pogosto je uporabljen v medicinske namene, kjer je znan tudi pod imenom sonografija. Gre za neinvazivne slikovne preiskave oz. medicinsko tehniko, s katero lahko pregledajo notranjost mehkih tkiv, pogosto pa se uporablja tudi za pregledne ploda med nosečnostjo. Diagnostični ultrazvočni aparati običajno delujejo s frekvencami med 3 in 10 MHz [36,37].

3.1.1.2 UZE

Ultrazvočna ekstrakcija (UZE) je tehnika izolacije bioaktivnih spojin iz rastlin z aplikacijami v različnih vejah industrije, mdr. v živilski in farmacevtski. Velja za preprosto, hitro in učinkovito ekstrakcijsko tehniko [32].

Pri posredni UZE se ultrazvočno sevanje na zmes topljenca in topila nanaša preko ultrazvočne kopeli. Na vzorce delujemo z mehansko energijo, ki jo ustvarjajo ultrazvočni valovi. Le-te oddaja pretvornik, ki se nahaja pod rezervoarjem iz nerjavečega jekla. Energija ultrazvočnega valovanja v topilu povzroča kavitacijo, pospešuje raztplavljanje, difuzijo topljenca in prenos toplote, kar pozitivno vpliva na izkoristek ekstrakcije [38].

Ultrazvok visoke frekvence (28-100 kHz) pri procesu kavitacije ustvarja izmenične visoko- in nizkotlačne valove, ki so razlog za nastanek majhnih vakuumskih mehurčkov. Ta fizikalno-kemijski proces povzroča rast mehurčkov (in posledično kopiranje energije) do kritične točke, kjer ti ob udaru na površino predmeta (oz. topljenca) implodirajo, sprostijo energijo in povzročijo pritisk. Energija kavitacijskih mehurčkov povzroči trke in razbitja delcev ter turbulentno mešanje topila. Tako razbijajo celično steno, kar omogoča dostop delcev topila v notranjost vzorca oz. ekstrakcijo znotrajceličnega materiala. Posledično pride do visokega prenosa snovi med notranjostjo celice in topilom, topljenec pa tako difundira v okolico [34,39].

3.1.1.3 Prednosti UZE

Ekstrakcija s pomočjo ultrazvoka lahko ekstrahirja bioaktivne komponente v kratkem časovnem obdobju, pri nizki temperaturi ter z manjšo porabo energije in topil. Prav zato velja za ekonomsko ugodno metodo, zlasti v laboratorijskem merilu. Istočasno zagotavlja tudi višjo čistost končnega izdelka in večjo prepustnost topila v celice. Kot tehnika netermične ekstrakcije pa je v prvi vrsti primerna za ohranitev funkcionalnosti bioaktivnih ter potencialno termolabilnih in nestabilnih spojin [38].

3.1.2 Filtracija

Filtracija je fizikalna tehnika ločevanja v tekočinah ali v plinih suspendiranih delcev snovi od topil, v katerih se nahajajo, s pomočjo ustreznega ločilnega medija. Pogoj za uspešno filtracijo je ustrezeni filtrirni sloj oziroma filtrirni medij, ki prepušča tekočino ali pline, ki jih želimo ločiti, zadržuje pa suspendirane delce. V namene le-tega morajo biti pore filtrirnega medija manjše od velikosti delcev [40].

Za filtracijo se v splošnem uporablja [40]:

- filtrirni liji z različnimi vrstami specialnih filtrirnih papirjev, ki se med seboj razlikujejo predvsem po velikosti por;
- filtrirni lončki s poroznim dnom (vakumska filtracija) in
- filtrirne nuče (filtracija s podtlakom).

V okviru našega eksperimentalnega dela smo izvedli filtracijo s podtlakom. Pri izvedbi slednjega se na filtrirne nuče, ki so običajno iz porcelana in imajo na dnu luknjice, namesti filtrirni papir. Podtlak ustvarimo, ko erlenmajerico za nučiranje s cevjo povežemo na vodovodno omrežje.

Hitrost in uspešnost filtracije sta odvisni od vrste suspenzije, viskoznosti tekočine, v kateri je suspenzija suspendirana; temperature in koncentracije, najbolj pa vpliva predvsem izbira filtrirnega medija [40].

3.1.3 Uparjanje

Uparjanje je proces, pri katerem koncentriramo praktično nehlapne topljence z odvajanjem topila iz vrele raztopine. Zelo pogosto se kot topilo uporablja voda ali hlapna topila, kot so etanol, metanol in heksan [41].

Posebna vrsta uparjanja pod znižanim tlakom je vakuumsko uparjanje s t. i. rotacijskim vakuumskim uparjalnikom ali rotavaporjem. Le-tega v splošnem uporabimo tedaj, ko želimo tekočino upariti pri nižji temperaturi, kot je njeno normalno vrelišče, kar dosežemo z uporabo vakuuma. Navadno je razlog za to neobstojnost spojine pri temperaturi vrelišča. Prednost njegove uporabe pa je tudi funkcija vrtenja. Le-to poveča površino vzorca ter tako izboljša prenos toplotne [42].

3.2 Spektrofotometrične metode

Za karakterizacijo ekstrakta, ki smo ga pridobili z ultrazvočno ekstrakcijo, smo v nadaljevanju izvedli analize ekstrakta. Na podlagi predhodno pregledane literature, omenjene v podpoglavlju 1.2, smo izvedli spektrofotometrično metodo določanja vsebnosti totalnih fenolov. Za slednjo je značilna enostavna uporaba ter visoka selektivnost in točnost.

3.2.1 Spektrofotometrija

Spektrofotometrijo uvrščamo med absorpcijsko spektrometrijo. Metoda temelji na merjenju absorpcije svetlobe pri prehodu skozi raztopino vzorca. V okviru našega eksperimentalnega dela smo uporabili UV-VIS spektrofotometer, prikazan na Sliki 3, pri katerem ločimo ultravijolično (UV) in vidno (VIS) spektrometrijo, ki ju uporabljam za kvantitativno določanje analitov, tj. komponent, ki jih določamo. Ultravijolično območje (UV) med 200 in 400 nm ter vidno območje oz. spekter (VIS) med 400 in 800 nm sicer predstavlja zelo ozek del spektra elektromagnetskoga valovanja, vendar v tem območju absorbira svetlogo večina organskih, biološko aktivnih in koordinacijskih spojin [43,44].



Slika 3: UV-VIS spektrofotometer (lasten vir)

Spektrofotometer primerja delež svetlobe, ki preide skozi referenčno raztopino (slepi vzorec) in skozi merjeni vzorec. Ko svetloba potuje skozi vzorec, se del nje pri tem namreč absorbira, preostala, prepuščena svetloba pa pride do detektorja [44].

Valovna dolžina in količina absorbirane svetlobe sta odvisni od molekularne strukture snovi in njene koncentracije. To opisuje Beer-Lambertov zakon, ki pravi, da je absorbanca odvisna od valovne dolžine, vrste raztopine, debeline kivete z raztopino in koncentracije iskane snovi. Posledično je absorbanca (Abs) premo sorazmerna s koncentracijo (c) absorbirajoče snovi. Omenjeni zakon opisuje enačba 3.1. Uporabimo ga pri interpretaciji rezultatov, pridobljenih z uporabo računalniškega programa. Slednjemu podatke posreduje detektor na spektrofotometru na podlagi intenzitete prepuščene svetlobe skozi vzorec [43,44].

$$Abs = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (3.1)$$

Kjer je:

ε molarni absorpcijski koeficient [$L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$],

l dolžina optične poti [cm] in

c množinska koncentracija absorbirajoče snovi [mol L^{-1}].

Pri merjenju absorbance smo uporabili kivete. Te morajo biti iz materiala, ki prepušča sevanje željene valovne dolžine in je inerten za merjenje raztopin. Kivete, uporabne za UV-območje, so narejene iz kvarčnega stekla, za VIS-področje pa iz navadnega stekla [44].

3.2.2 Določanje vsebnosti totalnih fenolov s Folin-Ciocalteujevim reagentom

Za določanje koncentracije totalnih fenolov smo izbrali metodo s Folin-Ciocalteujevim reagentom, saj se je v preteklosti uveljavila kot natančna metoda za analizo tovrstnih spojin [29].

Folin-Ciocalteujev (FC) reagent se je sprva uporabljal kot indikator proteina tirozina, ki vsebuje fenolno skupino, leta 1965 pa sta ga Vernon Singleton in Joseph Rossi uporabila za analizo vsebnosti totalnih fenolov v vinu [45]. Danes je metoda s FC-reagentom ena izmed najpogosteje izvedenih metod za izvajanje fenolnih analiz oz. za kvantifikacijo totalnih fenolov. Je tudi cenovno dostopen analizni postopek, ki je že precej standardiziran in se rutinsko uporablja v laboratorijsih [46].

FC-reagent, ki je značilne rumene barve, vsebuje kompleks fosfowolframove ($H_3PW_{12}O_{40}$) in fosfomolibdenove ($H_3PMo_{12}O_{40}$) kisline, ki v alkalnem (bazičnem) okolju reagira s fenolnimi spojinami. Bazično okolje se predhodno ustvari s prisotnostjo raztopine natrijevega karbonata (Na_2CO_3). Reakcija temelji na prenosu elektronov iz fenolnih spojin na FC-reagent. Slednji se po oksidaciji s fenolnimi spojinami v alkalnih pogojih reducira v okside. Pri tem nastane moder kompleks, reakcija nastanka in struktura kompleksa pa nista popolnoma znana. Kljub nepoznavanju celotnega ozadja je nastali kompleks zaradi modre barve zelo uporaben za določanje koncentracije totalnih fenolov v vzorcu. Velja namreč naslednje: večja, kot je koncentracija fenolnih spojin v vzorcu, intenzivnejša je modra barva raztopine [47].

Zmes nastalih volframovih (W_8O_{23}) in molibdenovih (Mo_8O_{23}) oksidov se izmeri z UV-VIS spektrofotometrom pri valovni dolžini 760 nm [48,49].

Na podlagi izmerjenih vrednosti absorpcije bi lahko s pomočjo Beer-Lambertovega zakona, navedenega v enačbi 3.1, izračunali koncentracijo totalnih fenolov. Ker pa vrednosti molarnega absorpcijskega koeficiente (ε) ne poznamo, za referenčni standard uporabljamo galno kislino (GA). Le-ta ima namreč podobno strukturo in oksidativni potencial kot totalni fenoli. Predhodno pripravljenim standardnim raztopinam GA izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 760 nm, s pridobljenimi podatki pa pripravimo umeritveno krivuljo. Vsebnost totalnih fenolov tako podajamo kot ekvivalenco GA.

Pri izvedbi FC-metode in nadaljnji interpretaciji rezultatov je potrebno biti pozoren na dejstvo, da reakcije s fenoli niso popolnoma specifične. Hitro lahko pride do poteka stranskih reakcij z drugimi oksidativnimi spojinami, kar zviša ali tudi zniža izmerjeno vrednost.

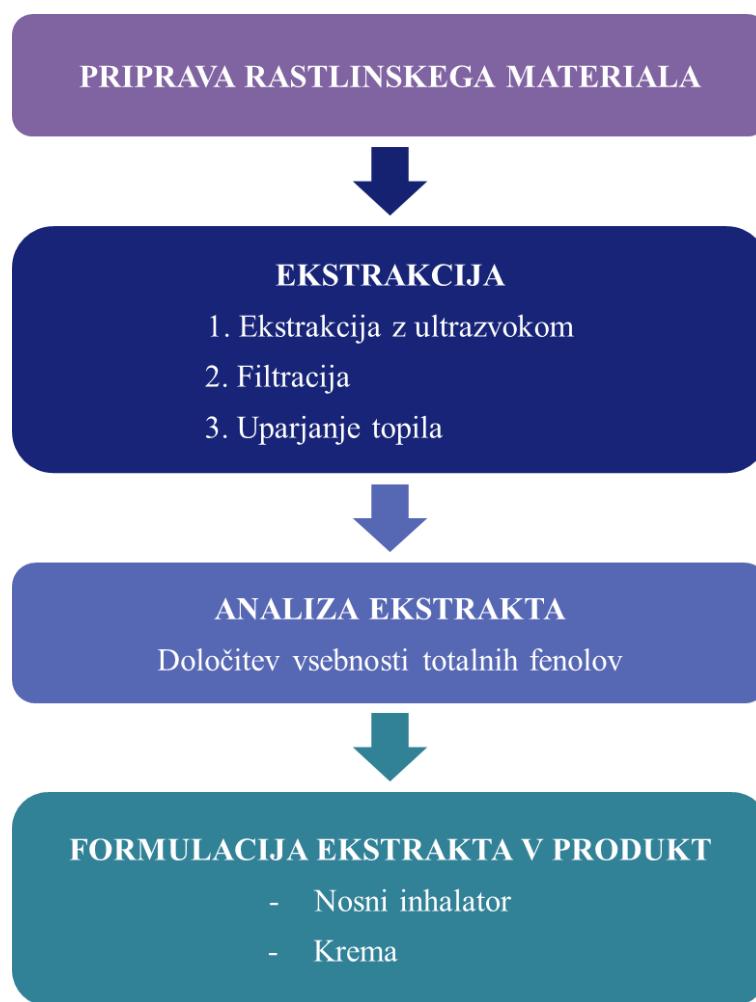
Da preprečimo to reakcijo, FC-reagent dodamo v raztopino vzorca pred dodatkom natrijevega karbonata, ki deluje kot baza. Prav tako pa čas za pripravo vzorca ne sme biti daljši od dveh minut [48].

4 EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 Načrt

Eksperimentalni del raziskovalne naloge smo opravili v Laboratoriju za separacijske procese in produktne tehnike na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru. Iz varnostnih in higieniskih razlogov smo pri delu nosili zaščitni plašč, očala in rokavice, vso uporabljeno steklovino pa smo pred uporabo umili in razkužili.

Zastavitev načrta eksperimentalnega dela prikazuje organigram na Sliki 4.



Slika 4: Načrt eksperimentalnega dela (lasten vir)

4.2 Materiali

- navadni ožepek (*Hyssopus officinalis*)

4.3 Inventar in kemikalije

Inventar, ki smo ga uporabili pri delu:

- analitska tehnica (Mettler Toledo XP205)
- bučka z obrusom
- čaša
- erlenmajerica za postopek nučiranja
- filtrirni papir
- homogenizator (IKA® T10 Basic ULTRA-TURRAX)
- kapalka
- kivete
- magnet
- magnetni mešalec (Tehnica)
- merilni valj
- mikropipeta
- nuča
- palični mešalnik
- parafilm
- pinceta
- rotacijski vakuumski uparjalnik (Buch Rotavapor R-114)
- spatula

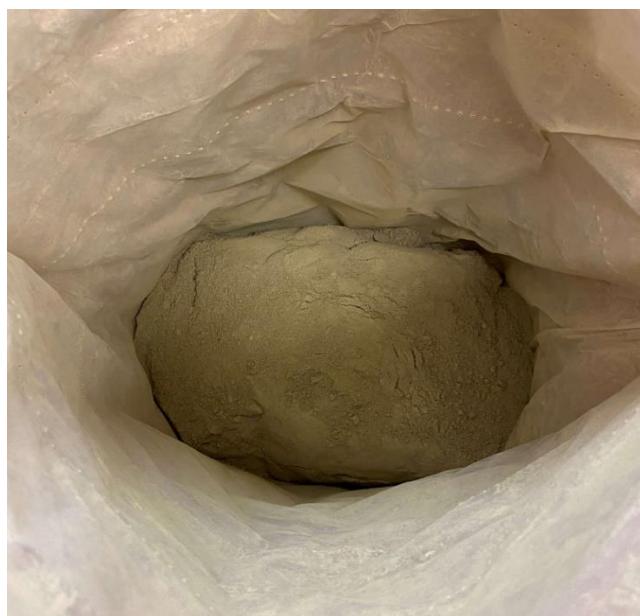
- steklena palčka
- steklenička
- termometer
- ultrazvočna kopel (VEVOR Digital Ultrasonic Cleaner Digital Pro+)
- urno steklo
- UV-VIS spektrofotometer (Varian Cary 50 UV-VIS)
- žlička

Kemikalije, ki smo jih uporabili pri delu:

- emulgator Montanov™
- emulgator Tween™ 23
- etanol (Carbo Elba, 96 %)
- Folin-Ciocalteujev (FC) reagent (Sigma-Aldrich)
- galna kislina (GA) (Sigma-Aldrich, 97,5 % čistost)
- konzervans Cosgard®
- natrijev karbonat (Na_2CO_3) (Sigma-Aldrich)

4.4 Priprava rastlinskega materiala za postopek ekstrakcije

Posušen zmlet material navadnega ožepka, pridelanega na Madžarskem, smo pridobili od podjetja Alfred Galke GmbH (Bad Grund, Nemčija). Material prikazuje Slika 5.



Slika 5: Posušen zmlet material navadnega ožepka (lasten vir)

4.5 Proses ekstrahiranja

Po pregledu literature [50–52] smo prišli do zaključka, da je najbolj primerna metoda za pridobitev naravnega ekstrakta navadnega ožepka metoda ultrazvočne ekstrakcije z uporabo ultrazvočne kopeli pri sobni temperaturi, saj omogoča ohranitev potencialno termolabilnih komponent ekstrakta in visoke izkoristke ekstrakcije, hkrati pa velja za okolju prijazno metodo. Za topilo smo izbrali 96 % etanol, saj le-ta po »*Direktivi Evropskega parlamenta in Sveta z dne 23. aprila 2009 o približevanju zakonodaj držav članic na področju ekstrakcijskih topil, ki se smejo uporabljajo pri predelavi surovin proizvodnji živil in njihovih sestavin*«, nima omejitev [53]. Prav tako se je v pregledani literaturi [51] v okviru UZE izkazal kot topilo z visokim izkoristkom ekstrakcije.

4.5.1 Ultrazvočna ekstrakcija

Navadni ožepek je bil ekstrahiran po sledečem postopku: pri vsaki ekstrakciji smo na analitski tehničici najprej v čašo zatehtali 20,0 g posušenega materiala. V merilni valj smo nalili 150 mL 96 % etanola, ga dolili k zatehtam ter premešali s stekleno palčko. Nastalo zmes prikazuje Slika 6.



Slika 6: Zmes materiala ožepka in etanola pred ekstrakcijo (lasten vir)

Čašo smo nato prekrili s parafilmom, da smo preprečili izhlapevanje topila. Tako pripravljene vzorce smo za 30 min izpostavili ultrazvočnim valovom v UZ kopeli pri sobni temperaturi.

Na Sliki 7 je prikazana ultrazvočna kopel in metoda ultrazvočne ekstrakcije, kot smo jo izvajali v laboratoriju. Po izvedbi le-te je v čaši nastala zmes, prikazana na Sliki 8, pri kateri se je na dno čaše usedla gošča.



Slika 7: Ultrazvočna kopel (lasten vir)



Slika 8: Zmes, preostala po UZ kopeli (lasten vir)

4.5.2 Filtracija

UZ kopeli je sledila filtracija s podtlakom, kjer nam je predhodno nučiranje zadržalo goščo, tekočina pa se je zbrala na dnu erlenmajerice, s cevjo povezane na vodovodno omrežje. Po filtraciji je v njej ostalo 125 mL tekoče raztopine. Omenjeni postopek filtracije prikazuje Slika 9.



Slika 9: Filtracija s podtlakom (lasten vir)

4.5.3 Uparjanje

Preostalo raztopino smo prelili v predhodno stehtano bučko z maso 135,4 g z okroglim dnom in obrusom ter na rotavaporju uparili topilo. Postopek prikazuje Slika 10.



Slika 10: Uparjanje na rotavaporju (lasten vir)

V zadnji fazi smo bučko, v kateri se je nahajal naš ekstrakt, zatehtali in po enačbah 4.1 ter 4.2 izračunali izkoristek ekstrakcije. Za nadaljnje analize ekstraktov smo le-te z žličko postrgali s sten bučke ter jih prenesli v manjše stekleničke, jih označili ter shranili v zamrzovalniku. S tem smo preprečili potencialno razgradnjo bioaktivnih komponent v vzorcih pri sobni temperaturi. Hrambo ekstrakta prikazuje Slika 11.



Slika 11: Hramba ekstrakta (lasten vir)

4.5.4 Izkoristek ekstrakcije

Maso ekstrakta, ki smo ga pridobili, smo izračunali po enačbi 4.1, izkoristek ekstrakcije pa po enačbi 4.2:

$$m_{ekstrakt} = m_{bučka+ekstrakt} - m_{bučka} \quad (4.1)$$

$$\eta_{ekstrakcija} = \frac{m_{ekstrakt}}{m_{material}} \cdot 100 \quad (4.2)$$

Kjer je:

$m_{ekstrakt}$ masa pridobljenega ekstrakta [g]

$m_{ekstrakt+bučka}$ masa pridobljenega ekstrakta in bučke [g]

$m_{bučka}$ masa bučke [g]

$\eta_{ekstrakcija}$ izkoristek ekstrakcije [%]

$m_{material}$ masa zatehtanega materiala [g]

4.6 Analiza ekstrakta

4.6.1 Določanje vsebnosti totalnih fenolov s Folin-Ciocalteujevim reagentom

Za karakterizacijo ekstrakta smo v nadaljevanju izvedli analizo vsebnosti biološko aktivnih komponent. Na osnovi predhodno pregledane literature [13–15] smo kot analizno metodo izbrali spektrofotometrično metodo določanja vsebnosti totalnih fenolov z uporabo Folin-Ciocalteujevega reagenta, saj totalni fenoli prevladujejo v ekstraktu navadnega ožepka, sama metoda pa je cenovno ugodna in standardizirana.

4.6.1.1 Priprava raztopin in reagentov

V okviru analizne metode smo si predhodno pripravili naslednje raztopine oz. reagente:

- **raztopina Folin-Ciocalteujevega reagenta**

Osnovno raztopino FC-reagenta smo razredčili z destilirano vodo v razmerju 1:10. Pri tem smo upoštevali, da je volumna obeh tekočin zaradi velikih razlik v velikosti molekul najprej potrebno posamično izmeriti v merilnih valjih.

- **raztopina Na_2CO_3 masne koncentracije $75,0 \text{ g L}^{-1}$**

V 500 mL merilno bučko smo zatehtali 37,5 g Na_2CO_3 , dolili destilirano vodo do oznake, dobro premešali s stekleno palčko ter postavili v UZ kopel, da se je Na_2CO_3 v celoti raztoplil.

- **raztopina galne kisline (GA) masne koncentracije $0,40 \text{ mg mL}^{-1}$**

V 25 mL merilno bučko smo zatehtali 10 mg GA, razredčili z destilirano vodo do oznake in dobro premešali s stekleno palčko.

4.6.1.2 Umeritvena krivulja z galno kislino

Po pripravi osnovne raztopine GA s koncentracijo $0,40 \text{ mg mL}^{-1}$ smo v 10 mL merilne bučke odpipetirali različne količine le-te in razredčili do oznake. Raztopine smo dobro premešali.

V stekleničke smo z mikropipeto odpipetirali 0,5 mL posameznih raztopin GA, dodali 2,5 mL raztopine FC-reagenta ter 2,0 mL raztopine Na_2CO_3 . Nato smo raztopine premešali in 5 minut

termostatirali v UZ kopeli pri temperaturi 50 °C. Pri slepem vzorcu smo namesto GA uporabili destilirano vodo.

Raztopine smo nato ohladili in z UV-VIS spektrofotometrom vsakemu vzorcu trikrat izmerili absorbanco pri 760 nm. Na osnovi izmerjenih absorbanc smo narisali diagram odvisnosti absorbance (Abs) od koncentracije GA (γ_{GA}) v raztopinah ($Abs = f(\gamma_{GA})$) [54].

4.6.1.3 Potek analize

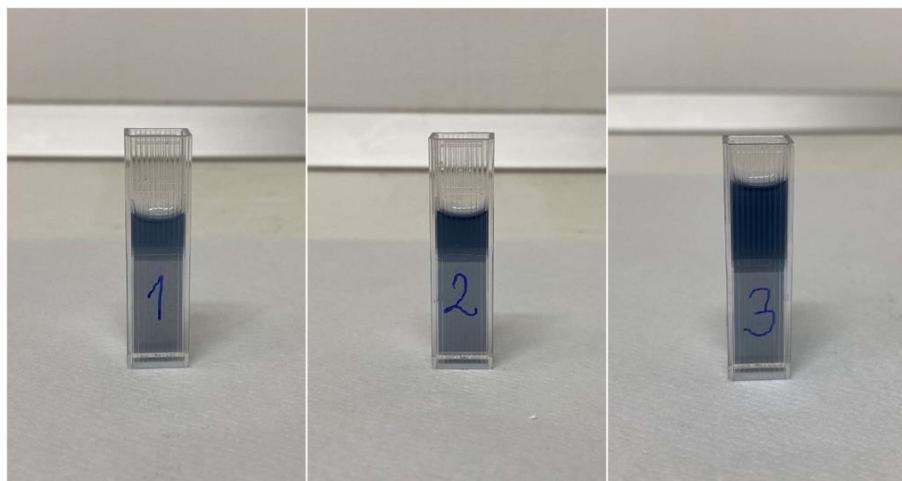
Za določanje vsebnosti totalnih fenolov v ekstraktu smo v 10 mL merilno bučko zatehtali 20 mg ekstrakta in ga z destilirano vodo razredčili do oznake. Raztopino smo nato dobro premešali in jo za 10 min postavili v ultrazvočno kopel, da se je ekstrakt popolnoma raztopil.

Sledila je priprava vzorcev za analizo. V stekleničko smo odpipetirali 0,5 mL raztopine ekstrakta, dodali 2,5 mL predhodno pripravljene raztopine FC-reagenta in 2,0 mL raztopine Na_2CO_3 . Pri tem smo bili pozorni, da je bil čas za pripravo vzorca krajši od 2 minut. Po enakem principu smo si pripravili tudi slepi oz. kontrolni vzorec, pri katerem smo namesto raztopine ekstrakta v stekleničko odpipetirali destilirano vodo. Pripravo vzorcev prikazuje Slika 12.



Slika 12: Priprava vzorcev za analizo (lasten vir)

Tako pripravljene vzorce smo 5 minut termostatirali v UV kopeli na 50 °C. Raztopine smo nato ohladili in odpipetirali v ustrezne kivete, prikazane na Sliki 13.



Slika 13: Kivete z vzorci za analizo (lasten vir)

Vzorcem smo nato z UV-VIS spektrofotometrom, ki smo ga umerili s slepim vzorcem, izmerili absorbanco pri valovni dolžini 760 nm [54].

4.6.1.4 Izračun vsebnosti totalnih fenolov

Z enačbami 4.3, 4.4, 4.5 in 4.6 smo izračunali končne vsebnosti totalnih fenolov, izražene v mg GA na g ekstrakta oz. materiala.

$$Abs = a \cdot \gamma_{GA} + b \quad \Rightarrow \quad \gamma_{GA} = \frac{Abs - b}{a} \quad (4.3)$$

Kjer je:

Abs absorbanca raztopine vzorca, izmerjena pri 760 nm []

a naklon premice umeritvene krivulje GA [mL mg^{-1}]

b odsek premice umeritvene krivulje GA na osi absorbance []

γ_{GA} koncentracija GA v raztopini ekstrakta [mg mL^{-1}]

Rezultate vsebnosti totalnih fenolov smo izrazili v mg GA na g ekstrakta ($w_{GA(ekstrakt)}$) oz. mg GA na g materiala ($w_{GA(material)}$). Končne vrednosti smo izračunali z naslednjimi enačbami:

$$w_{GA(ekstrakt)} = \frac{\gamma_{GA}}{\gamma_{ekstrakt}} \cdot 1000 \quad (4.4)$$

$$w_{GA(material)} = w_{GA(ekstrakt)} \cdot \frac{\eta_{ekstrakcija}}{100} \quad (4.5)$$

Kjer je:

$\gamma_{ekstrakt}$ koncentracija ekstrakta v raztopini vzorca [mg mL^{-1}], izračunana na osnovi mase ekstrakta, ki smo ga zatehtali za analizo ($m_{ekstrakt}$ [mg]), po enačbi 4.6:

$$\gamma_{ekstrakt} = \frac{m_{ekstrakt}}{V_{raztopina}} \quad (4.6)$$

kjer je $V_{raztopina} = 10 \text{ mL}$ [54].

4.7 Formulacija naravnega ekstrakta v produkt

Po izvedeni ekstrakciji in analizi pridobljenega ekstrakta smo izvedli še formulacijo tega v produkt, ki bi ga lahko ljudje uporabljali kot podporno terapijo pri težavah dihal pri covidu-19.

V okviru raziskovalne naloge smo formulirali dva produkta: nosni inhalator in kremo, ki si jo lahko ljudje nanesejo pod nos. Namen obeh je enak, saj zaradi vsebnosti naravnega ekstrakta navadnega ožepka, ki vsebuje veliko totalnih fenolov, delujeta pomirjujoče, lajsata izkašljevanje in sproščata dihalne poti.

4.7.1 Nosni inhalator

Formulacija prvega produkta, nosnega inhalatorja, je bila po pridobitvi naravnega ekstrakta preprosta.

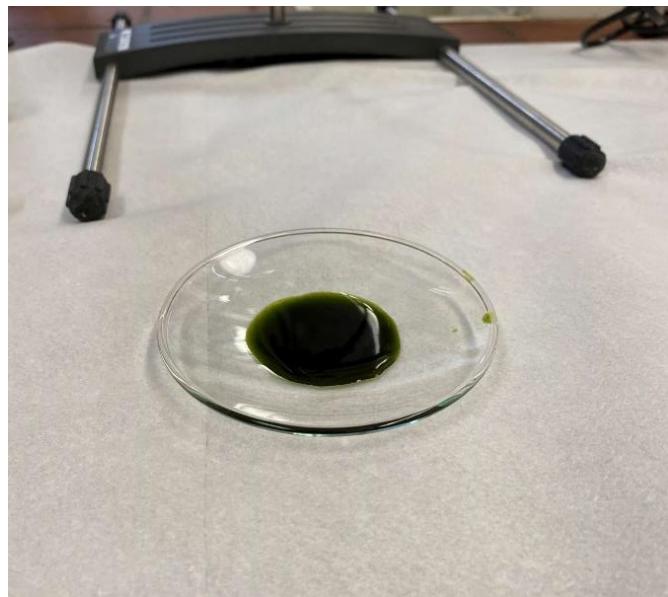
4.7.1.1 Sestava produkta

Materiali, ki smo jih uporabili pri izdelavi inhalatorja, so:

- embalaža nosnega inhalatorja iz biorazgradljive plastike z vpojnim vatnim vložkom
- konzervans Cosgard®
- naravni ekstrakt navadnega ožepka (*Hyssopus officinalis*)
- olje iz grozdnih pešk

4.7.1.2 Potek formulacije

Stekleničko s pridobljenim naravnim ekstraktom ožepka smo v UZ kopeli najprej segreli na 30 °C. Nato smo ekstrakt z žličko nanesli na urno steklo, za lažji nanos pa dodali nekaj kapljic olja iz grozdnih pešk. Za pridobitev homogene zmesi ekstrakta in olja je bilo potrebno dodati še 3 kapljice emulgatorja Tween™ 23 ter konzervansa Cosgard®, ki preprečuje razvoj mikroorganizmov. Dobljena zmes je prikazana na Sliki 14.



Slika 14: Homogena zmes ekstrakta, olja iz grozdnih pešk, emulgatorja in konzervansa (lasten vir)

Vatni vložek smo nato prepojili z našim pripravkom, počakali 10 minut in ga vstavili v embalažo nosnega inhalatorja, kot prikazuje Slika 15.



Slika 15: Formulacija nosnega inhalatorja (lasten vir)

4.7.2 Krema

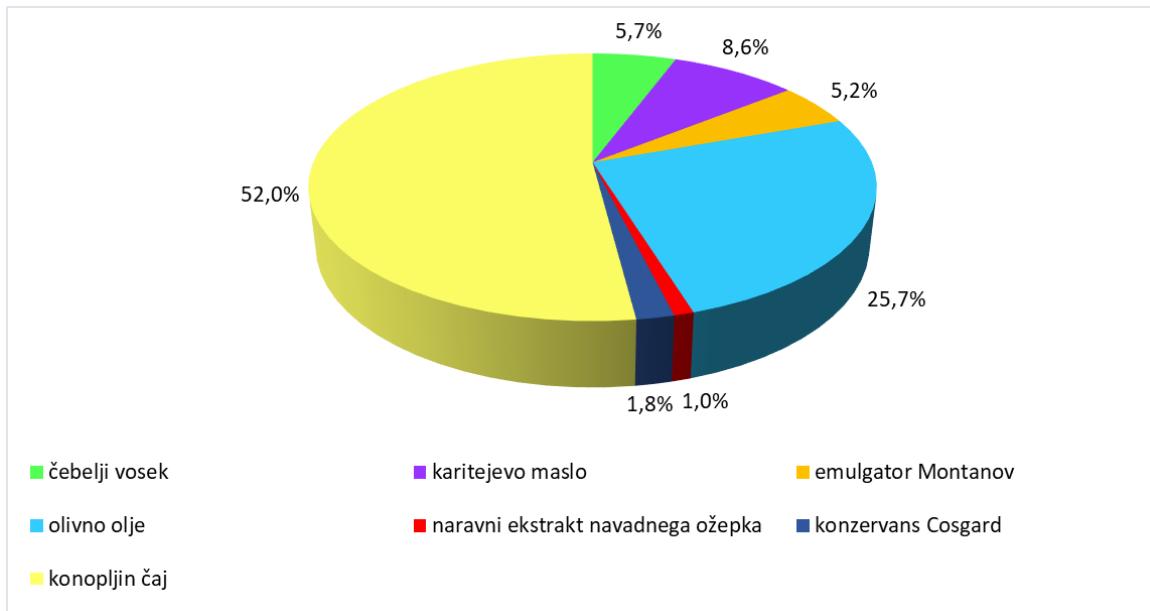
4.7.2.1 Sestava produkta

Materiali, ki smo jih uporabili za izdelavo kreme, so:

- čebelji vosek
- emulgator Montanov™
- karitejevo maslo
- konopljin čaj
- konzervans Cosgard®
- kozmetična embalaža iz biorazgradljive plastike
- naravni ekstrakt navadnega ožepka (*Hyssopus officinalis*)
- olivno olje

4.7.2.2 Potek formulacije

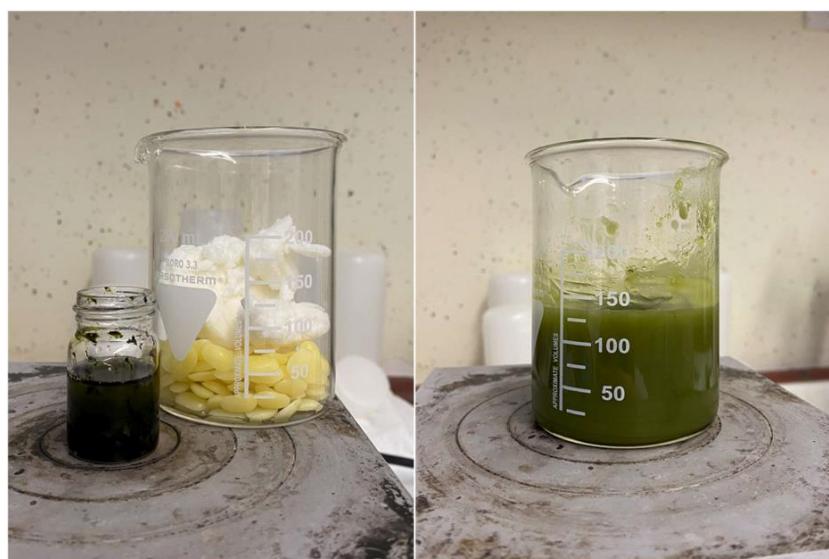
Formulacija kreme je potekala v dveh fazah: oljni in vodni. Na podlagi literature oz. znanih receptur [16–19] smo pripravo kreme izvedli z različnimi masnimi razmerji glede na obe fazi, dokler nismo dobili ustrezne tekture. Razmerja masnih odstotkov posameznih komponent naše kreme prikazuje Grafikon 1.



Grafikon 1: Masni odstotki posameznih komponent kreme

Oljna faza

Pri pripravi oljne faze smo v čašo natehtali ustrezone mase posameznih komponent: čebelji vosek, karitejevo maslo in olivno olje. Čašo smo segrevali na grelni plošči pri temperaturi 50 °C, hkrati pa smo v stekleničko z zamrznjenim ekstraktom ožepka dodali del mase olivnega olja in magnet ter jo z magnetnim mešalcem segrevali, dokler se ekstrakt ni v celoti raztopil. Vsebini čaše in stekleničke smo nato zmešali. Pripravo oljne faze prikazuje Slika 16.



Slika 16: Priprava oljne faze kreme (lasten vir)

Vodna faza

Na grelni plošči smo pri temperaturi 50 °C v čaši pripravili 2 dL konopljinega čaja, ki smo ga pred dodatkom k oljni fazi prefiltrirali z lijem. Pripravo vodne faze prikazuje Slika 17.



Slika 17: Priprava vodne faze kreme (lasten vir)

V obeh fazah smo zmesi segreli do temperature 50 °C, nakar smo ju združili ter premešali s paličnim mešalnikom in homogenizatorjem. Čebelji vosek je obe fazi povezal že sam po sebi, a smo za čim daljšo obstojnost kreme v čašo dodali še emulgator Montanov™, ki je nastalo emulzijo stabiliziral, za preprečitev razvoja mikroorganizmov pa tudi konzervans Cosgard®.

Dobljeno zmes smo prelili v predhodno pripravljene sterilne kozmetične embalaže, kar prikazuje Slika 18, ter pustili, da se je krema počasi ohladila, da ni prišlo do nastanka grudic. Posodice s kremo smo shranili v hladilnik.



Slika 18: Formulacija kreme (lasten vir)

Krema je po sestavi vlažilna, zaradi vsebnosti totalnih fenolov iz ekstrakta ožepka pa deluje tudi protivnetno in je primerna za nanos na poškodovano povrhnjico kože.

Končna produkta smo poimenovali po junakih iz pravljice Janko in Metka ter ju opremili z navodili za uporabo. Prikazana sta na Sliki 19.



Slika 19: Končna produkta (lasten vir)

5 REZULTATI

Ker je bila pri izvedbi eksperimentalnega dela uporabljena laboratorijska oprema z veliko natančnostjo (npr. napaka analitske tehtnice znaša $\pm 0,00001$ g), raztopine in reagente pa smo pripravljali s precejšnjo točnostjo, se pri zapisovanju rezultatov nismo osredotočili na same sistematične in slučajne napake, saj so, glede na natančnost zapisovanja rezultatov, zanemarljive.

Da bi bili končni rezultati čim bolj realni, smo postopek ekstrakcije ponovili trikrat. Tako smo pridobili tri samostojne ekstrakte, ki smo jih označili s številkami 1, 2 in 3. Vsaki izvedeni ekstrakciji smo izračunali izkoristek, posameznim ekstraktom pa določili vsebnost totalnih fenolov.

5.1 Postopek ultrazvočne ekstrakcije

Tabela 1 prikazuje podatke, zbrane pri izvedbi posameznih ekstrakcij.

Tabela 1: Rezultati ultrazvočne ekstrakcije

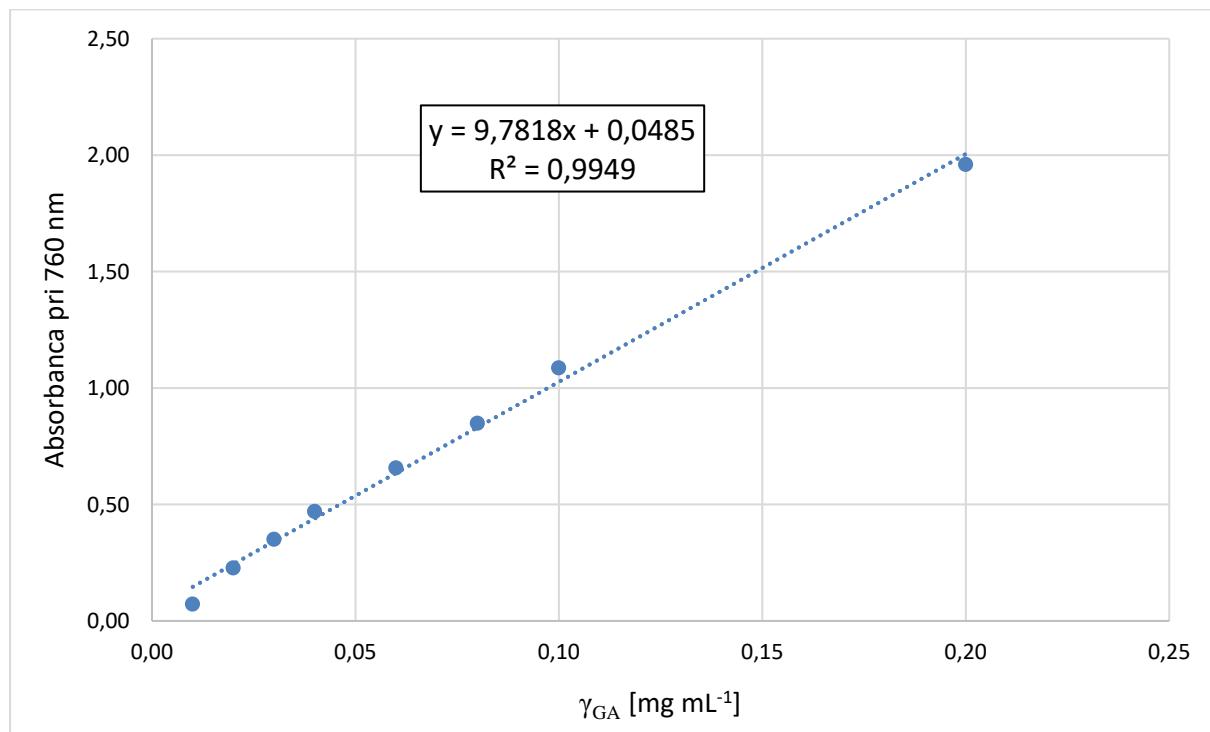
ekstrakt rezultati	1	2	3
$m_{material}$ [g]	20,0	20,0	20,0
$m_{bučka}$ [g]	135,4	135,4	135,4
$m_{bučka + ekstrakt}$ [g]	136,3	136,7	136,5
$m_{ekstrakt}$ [g]	0,9	1,3	1,1
$\eta_{ekstrakcija}$ [%]	4,5	6,5	5,5

Na podlagi pridobljenih in izračunanih podatkov smo določili povprečno maso pridobljenega ekstrakta, ki znaša $1,1 \text{ g} \pm 0,2 \text{ g}$, in povprečen izkoristek UZE ožepka, ki znaša $5,5 \% \pm 1,0 \%$.

5.2 Določanje vsebnosti totalnih fenolov s Folin-Ciocalteujevim reagentom

5.2.1 Umeritvena krivulja z galno kislino

Na osnovi izmerjenih absorbanc vzorcev raztopin galne kisline smo narisali diagram odvisnosti absorbance (Abs) od koncentracije GA (γ_{GA}) v raztopinah ($Abs = f(\gamma_{GA})$). Umeritvena krivulja s premico z najboljšim potekom in vrednost R^2 sta predstavljena na Grafu 1.



Graf 1: Umeritvena krivulja GA za določanje vsebnosti totalnih fenolov

5.2.2 Vsebnost totalnih fenolov

Po reakciji ekstraktov s FC-reagentom in določitvi njihovih absorbanc z UV-VIS spektrofotometrom smo s pomočjo umeritvene krivulje izračunali njihove vsebnosti totalnih fenolov in jih izrazili kot mg GA na g ekstrakta ($w_{GA(ekstrakt)}$) oz. mg GA na g materiala ($w_{GA(material)}$).

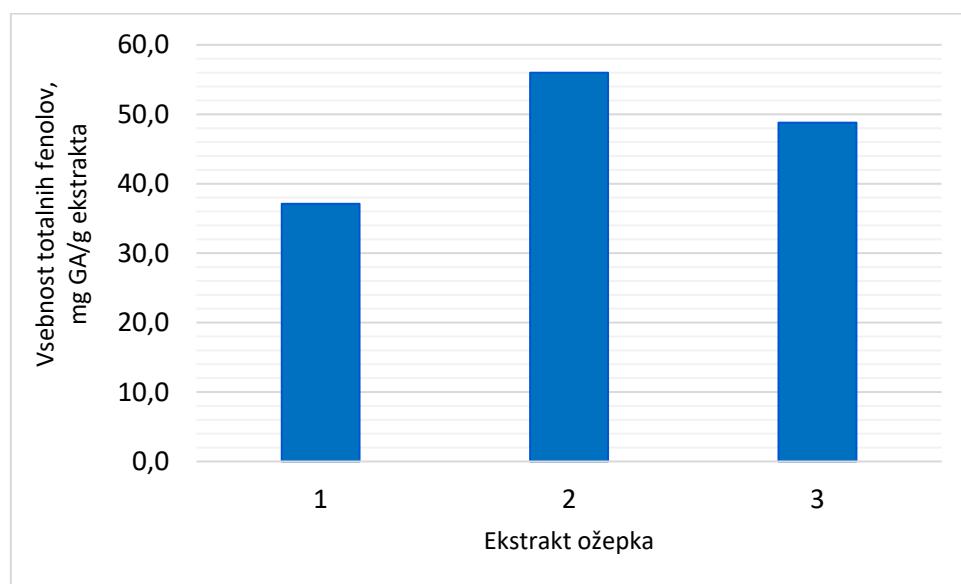
Pri tem smo upoštevali, da je a (naklon premice umeritvene krivulje) enak 9,7818 in b (odsek premice umeritvene krivulje na osi absorbance) enak 0,0485. Posameznemu vzorcu vsakega ekstrakta smo s spektrofotometrom absorbanco izmerili trikrat, računalniški program pa nam je na osnovi izmerjenih vrednosti izpisal povprečne absorbance vzorcev, ki so skupaj z drugimi rezultati navedene v Tabeli 2. V namene razprave smo vanjo vnesli že prej navedene izkoristke posameznih ekstrakcij.

Tabela 2: Rezultati določanja vsebnosti totalnih fenolov

ekstrakt rezultati	1	2	3
$m_{ekstrakt}$ [mg]	20	20	20
$\gamma_{ekstrakt}$ [mg mL⁻¹]	2,0	2,0	2,0
Abs	0,7746	1,1443	1,0034
γ_{GA} [mg mL⁻¹]	0,0742	0,1120	0,0976
$\eta_{ekstrakcija}$ [%]	4,5	6,5	5,5
$w_{GA(ekstrakt)}$ [mg GA/g ekstrakta] $\pm 0,1$	37,1	56,0	48,8
$w_{GA(material)}$ [mg GA/g material] $\pm 0,1$	1,7	3,6	2,7

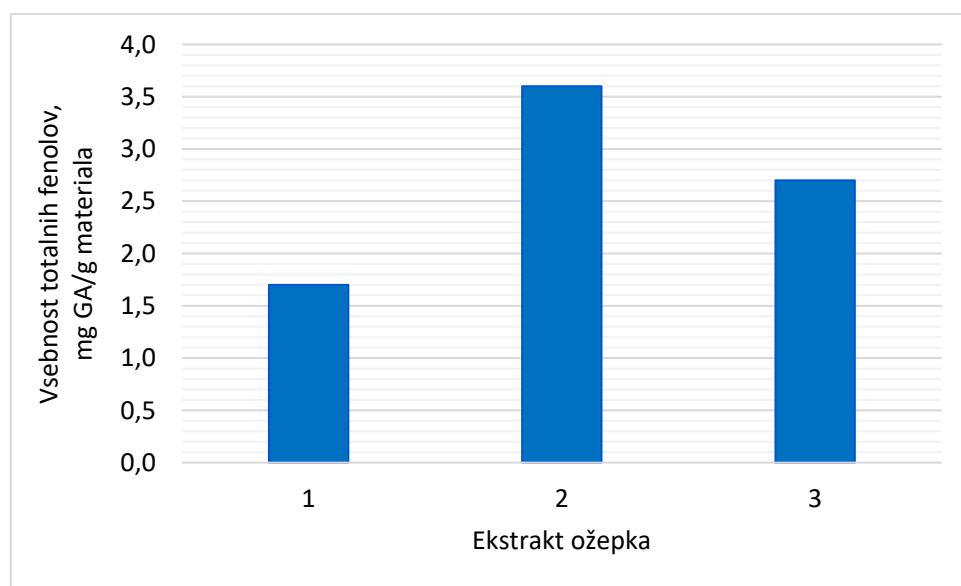
Na podlagi izračunanih vrednosti smo določili povprečno vsebnost totalnih fenolov v pridobljenih ekstraktih. Le-ta znaša $(47,3 \pm 0,3)$ mg GA na g ekstrakta oz. $(2,7 \pm 0,3)$ mg GA na g materiala.

Izračunane vsebnosti totalnih fenolov v posameznem ekstraktu, izražene v mg GA na g ekstrakta, smo prikazali v Grafikonu 2.



Grafikon 2: Vsebnosti totalnih fenolov, izražene v mg GA na g ekstrakta

Grafikon 3 pa prikazuje vsebnosti totalnih fenolov, izražene v mg GA na g materiala.



Grafikon 3: Vsebnosti totalnih fenolov, izražene v mg GA na g materiala

6 RAZPRAVA

6.1 Ovrednotenje rezultatov in metod

6.1.1 Izkoristek ultrazvočne ekstrakcije

V primerjavi z UZE ekstrakcijo ožepka, ki so jo izvedli Rashidi, S. in sodelavci, pri kateri je izkoristek znašal 1,58 %, smo ugotovili, da je izkoristek naše ekstrakcije znatno večji. Sklepamo, da je glavni dejavnik, ki je vplival na to, uporaba različnih topil. V omenjeni študiji so kot topilo namreč uporabili mešanico vode in etanola v razmerju 8:2, sami pa smo uporabili 96 % etanol, ki ga nismo dodatno redčili z vodo. Posledično se je zmlet posušen material ožepka v danem topilu bolje raztopil oz. se vanj ekstrahiral [11].

Če izkoristek naše ekstrakcije primerjamo še z UZE v okviru študije Tungmannithum, D. idr., kjer je izkoristek znašal $8,21\% \pm 0,65\%$, vidimo, da poročajo o večjem izkoristku v primerjavi z našim. Sklepamo, da je do razlike prišlo predvsem iz naslednjega razloga: v omenjeni študiji so pridobivali ekstrakt rožmarinske kisline iz rastline *Plectranthus scutellarioides*, ki sicer spada v isto družino (*Lamiaceae*) kot navadni ožepek, a ima drugačne značilnosti kot slednji. Manjši odgon pa je možen tudi zaradi drugačne izbire topila, saj so v okviru omenjene študije uporabili nekoliko bolj koncentriran, tj. čisti etanol (99-100%) [12].

6.1.2 Vsebnost totalnih fenolov

Primerjajmo še naše rezultate vsebnosti totalnih fenolov z izsledki študij iz poglavja 1.2 (Pregled literature).

Nile, S. idr. so pri analizi ekstrakta navadnega ožepka izmerili vsebnost 64,40 mg GA/g ekstrakta. Pred analizo so UZE optimizirali z uporabo etanola kot topila, zmes materiala in slednjega pa so v ultrazvočni kopeli pustili 1 uro. Sklepamo, da je prav slednji parameter, torej daljši čas ekstrahiranja v primerjavi z našim (30 min), glavni vzrok za razliko vrednosti njihove in naše vsebnosti totalnih fenolov v ekstraktu [13].

Moulodi, F. idr. so pri preučevanju kemične sestave eteričnega olja navadnega ožepka s FC-reagentom določili vsebnost totalnih fenolov, ki je znašala $23,16 \pm 0,05$ mg GA/g eteričnega olja, torej bistveno manj v primerjavi z našo vrednostjo. Na podlagi preučitve njihove študije sklepamo, da je do odstopanja v prvi vrsti prišlo zaradi drugačne metode ekstrakcije – eterično

olje so v omenjeni študiji namreč pridobili z uporabo Clevengerjevega aparata in z vodno destilacijo [14].

Rezultati naše ekstrakcije in analize kažejo vidno korelacijo med izkoristkom posamezne ekstrakcije in vsebnostjo totalnih fenolov v pridobljenem ekstraktu. Iz tega sklepamo, da sta omenjeni količini premo sorazmerni.

6.2 Ovrednotenje hipotez

Hipoteza 1: Predvidevamo, da bo izkoristek ekstrakcije navadnega ožepka okoli 5 %.

Na podlagi pridobljenih ekstraktov smo izračunali povprečen izkoristek ekstrakcij, ki je znašal $5,5 \% \pm 1,0 \%$. Zaradi napake se vrednost izkoristka, navedena v prvi hipotezi, nahaja znotraj intervala vrednosti izračunanega izkoristka, zato je hipoteza 1 **potrjena**.

Hipoteza 2: Predvidevamo, da je vsebnost totalnih fenolov v ekstraktu okoli 45 mg GA/g ekstrakta.

S pomočjo umeritvene krivulje z galno kislino in vrednosti absorbanc, izmerjenih z UV-VIS spektrofotometrom, smo izračunali povprečno vsebnost totalnih fenolov v ekstraktih. Le-ta je znašala $(47,3 \pm 0,3)$ mg GA na g ekstrakta. Vsebnost, predvidena v drugi hipotezi, nekoliko odstopa od intervala izračunane vrednosti, zato je hipoteza 2 **delno potrjena**.

Hipoteza 3: Predvidevamo, da se bo ekstrakt homogeno pomešal z oljem brez dodatka emulgatorja.

Pri formulaciji nosnega inhalatorja smo segret ekstrakt ožepka pomešali z nekaj kapljicami olja iz grozdnih pešk. Za pridobitev homogene zmesi smo morali dodati še 3 kapljice emulgatorja TweenTM 23, saj v nasprotnem primeru zmes ne bi bila enotna, zato je hipoteza 3 **zavrnjena**.

Hipoteza 4: Predvidevamo, da bo naš produkt po dveh mesecih izgubil vonj.

Prvi produkt – nosni inhalator – smo formulirali decembra 2022. V času ovrednotenja hipotez, tj. marca 2023, je inhalator še vedno imel izrazit vonj po ožepku, zato je hipoteza 4 **zavrnjena**.

Hipoteza 5: Predvidevamo, da bo masno razmerje med vodno in oljno fazo kreme 7:2.

Za pridobitev ustrezne tekture kreme smo preizkusili kombinacije različnih masnih razmerij vodne in oljne faze. Pri tem se je izkazalo, da je tekstura kreme najboljša, kadar je omenjeno razmerje pribl. 13:12, zato je tudi hipoteza 5 **zavrnjena**.

6.3 Ovrednotenje ciljev

Na samem začetku ustvarjanja raziskovalne naloge smo si zadali cilj raziskati naslednje:

- S katero ekstrakcijsko metodo glede na literaturo je optimalno pridobiti naravni ekstrakt ožepka in pri tem uporabiti zelene tehnologije?
- Ali ekstrakt vsebuje fenolne spojine, tj. biološko aktivne komponente, ki lahko pomagajo pri boleznih dihal?
- Kolikšna je vsebnost fenolnih spojin v ekstraktu?
- Kako lahko ekstrakt formuliramo v produkt, potencialen kot podpora terapiji pri covidu-19?

Z eksperimentalnim delom in pregledom literature smo prišli do odgovorov na vsa zastavljena vprašanja.

Na podlagi literature smo v namene čim večjega izkoristka, kvalitete pridobljenih ekstraktov in uporabe zelenih tehnologij za ekstrakcijsko metodo izbrali ultrazvočno ekstrakcijo z etanolom kot topilom.

Vsebnost totalnih fenolov smo določili s spektrofotometrično metodo, pri čemer smo uporabili Folin-Ciocalteujev reagent in UV-VIS spektrofotometer. V pomoč nam je bila tudi umeritvena ali kalibracijska krivulja z galno kislino, s pomočjo katere smo izračunali omenjeno vsebnost totalnih fenolov, ki je znašala $(47,3 \pm 0,3)$ mg GA na g ekstrakta.

Pridobljen naravni ekstrakt ožepka smo formulirali v dva produkta – nosni inhalator in univerzalno kremo, ki sta potencialno uporabna kot podpora terapija pri boleznih dihal, zlasti pri covidu-19.

Celostno gledano smo v okviru raziskovalne naloge realizirali zadane cilje.

6.4 Možne izboljšave

Primerjava rezultatov raziskovalne naloge z izzledki drugih kaže, da bi lahko v okviru naših eksperimentalnih metod izkoristek UZE povečali z uporabo bolj koncentriranega oz. čistejšega etanola. S tem bi povečali tudi vsebnost totalnih fenolov v ekstraktu. Smiselno pa bi bilo tudi podaljšati čas ultrazvočne kopeli s 30 minut na vsaj 1 uro.

7 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Celotna raziskovalna naloga je bila zastavljena v zavedanju družbene odgovornosti. Njen osnovni cilj je bil na podlagi literature izbrati ustrezen ekstrakcijsko metodo, s katero bi lahko dosegli visok izkoristek, pri tem pa uporabili okolju prijazne, t. i. zelene tehnologije. Za izvedbo eksperimentalnega dela smo se zato odločili za ultrazvočno ekstrakcijo – metodo, ki bioaktivne komponente ekstrahirja v kratkem časovnem obdobju, pri nizki temperaturi ter z manjšo porabo energije in kemičnih reagentov oz. topil, kar pozitivno vpliva na produktivnost procesa, ohranitev potencialno termolabilnih in nestabilnih spojin ter zmanjšanje stroškov. Hkrati predstavlja tudi skrb za okolje, saj je količina odpadnega materiala majhna. Družbena odgovornost se v nalogi kaže tudi pri formulaciji ekstrakta v produkta (nosni inhalator in krema). Pri obeh smo uporabili biorazgradljivi embalaži, njuna uporabna vrednost pa ima širši družbeni pomen, saj predstavlja podporno terapijo pri boleznih dihal, tudi pri covidu-19, ki je v zadnjih letih pustil velik pečat na ljudeh. Pri tem naj poudarimo, da namen naših produktov ni zdravljenje covida-19, temveč pomagati ljudem pri lajšanju težav z dihali po preboleli bolezni.

8 ZAKLJUČEK

Naravni ekstrakti so zaradi številnih zdravilnih lastnosti, ki jim jih pripisujejo, odličen nadomestek sintetičnih spojin, kar v medicini in farmaciji vzbuja veliko zanimanje, saj človeško telo iz dneva v dan pridobiva vedno večjo odpornost na uveljavljena zdravila. Napredne tehnike ekstrahiranja zato iščejo načine, s katerimi bi povečali izkoristke in kvalitete ekstraktov.

V raziskovalni nalogi smo z uporabo okolju prijaznih, zelenih tehnologij uspešno pridobili naravni ekstrakt medovite rastline *Hyssopus officinalis*, bolj znane kot navadni ožepek. Uporabili smo metodo ultrazvočne ekstrakcije z etanolom kot topilom, filtracijo s podtlakom in uparjanje z rotavaporjem. Povprečen izkoristek izvedenih ekstrakcij je znašal $5,5 \% \pm 1,0 \%$. Pridobljenim ekstraktom smo s spektrofotometrično metodo, tj. z uporabo Folin-Ciocalteujevega reagenta in UV-VIS spektrofotometra, določili vsebnost biološko aktivnih komponent, natančneje totalnih fenolov. Vsebnost le-teh je znašala ($47,3 \pm 0,3$) mg galne kisline (GA) na g ekstrakta oz. ($2,7 \pm 0,3$) mg GA na g materiala. Iz ekstrakta smo formulirali nosni inhalator in univerzalno kremo, ki ju lahko ljudje uporablajo kot podporno terapijo pri težavah dihal pri covidu-19, saj ožepek, kot navaja literatura, vsebuje zdravilne snovi, ki delujejo pomirjevalno in protivnetno, pomagajo pri boleznih dihal ter zavirajo kašelj.

V okviru raziskovalnega dela smo tako izvedli in predstavili celoten proces nastanka produktov – od priprave rastlinskega materiala, ekstrakcijskih metod in analize ekstrakta, do končne formulacije. S tem smo uspešno realizirali vse zastavljene cilje.

8.1 Možnost nadgradnje

Na tržišču obstajajo različni izdelki, ki vsebujejo navadni ožepek. Med njimi prevladujejo eterična olja in kreme za roke, medtem ko produktov, ki bi lajšali kašelj in sproščali dihalne poti, razen čaja, nismo zasledili. Pomanjkanje le-teh odpira nove možnosti za nadgradnjo in razširitev uporabe naših produktov.

Nosni inhalator in krema bi v prihodnosti lahko patentirali, predhodno pa izvedli ustrezne klinične študije. Potrebno bi bilo testirati tudi njuno toksičnost na človeških celicah. Dodatno razširitev predstavlja tudi možnost formulacije drugih izdelkov, npr. mila z ekstraktom navadnega ožepka.

V raziskovalni nalogi smo pokazali, da je iz ožepka z uporabo zelenih tehnologij mogoče pridobiti kvaliteten ekstrakt, ki vsebuje mnoge biološko aktivne in človeku koristne komponente. Možnosti njegove uporabe v namene tradicionalne in zeliščne medicine je ogromno. Le znati jih je potrebno izkoristiti. Naj bo naša naloga dodatna spodbuda za nadaljnji razvoj uporabe navadnega ožepka, predvsem pa pokazatelj, da lahko z uporabo naravnih produktov izboljšamo kvaliteto življenja in zdravljenja.

9 VIRI IN LITERATURA

9.1 Bibliografija

- [1] C. Proestos, The Benefits of Plant Extracts for Human Health, Foods. 9 (2020) 1653. <https://doi.org/10.3390/foods9111653> (datum dostopa: 8. 11. 2022).
- [2] H.M. Al-kuraishy, O.M. Al-Fakhrany, E. Elekhnawy, A.I. Al-Gareeb, M. Alorabi, M. De Waard, S.M. Albogami, G.E.-S. Batiha, Traditional herbs against COVID-19: back to old weapons to combat the new pandemic, European Journal of Medical Research. 27 (2022) 186. <https://doi.org/10.1186/s40001-022-00818-5> (datum dostopa: 18. 11. 2022).
- [3] Inštitut za slovenski jezik Frana Ramovša, ZRC SAZU, Zapis in sklanjanje bolezni covid-19, Jezikovna svetovalnica. (2020). <https://svetovalnica.zrc-sazu.si/topic/4235/kako-pisati-in-sklanjati-izraze-koronavirus-in-bolezen-covid-19-ali-koronavirusna-bolezen-2019> (datum dostopa: 8. 2. 2023).
- [4] I. Al-Jahdhami, A. Al-Mawali, S.M. Bennji, Respiratory Complications after COVID-19, Oman Med J. 37 (2022) e343. <https://doi.org/10.5001/omj.2022.52> (datum dostopa: 8. 2. 2023).
- [5] J.E. Dee, Despite Recovering from COVID-19, Shortness of Breath Persists, Yale School of Medicine. (2022). <https://medicine.yale.edu/news-article/despite-recovering-from-covid-19-shortness-of-breath-persists/> (datum dostopa: 8. 2. 2023).
- [6] Eric Yarnell, Herbs for Viral Respiratory Infections | Alternative and Complementary Therapies, Mary Ann Liebert. (2018). <https://www.liebertpub.com/doi/full/10.1089/act.2017.29150.eya> (datum dostopa: 9. 2. 2023).
- [7] Hyssop, in: LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, 2012. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548391/> (datum dostopa: 10. 11. 2022).
- [8] Missouri Botanical Garden, Hyssopus officinalis - Plant Finder, Plant Finder. <https://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?kempercode=b939> (datum dostopa: 10. 11. 2022).
- [9] National Institute od Diabetes and Kidney Diseases, LiverTox - Hyssopus. (2012) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547852/> (datum dostopa: 9. 11. 2022).
- [10] J. Sharifi-Rad, C. Quispe, M. Kumar, M. Akram, M. Amin, M. Iqbal, N. Koirala, O. Sytar, D. Kregiel, S. Nicola, A. Ertani, M. Victoriano, N. Khosravi-Dehaghi, M. Martorell, M.M. Alshehri, M. Butnariu, M. Pentea, L.S. Rotariu, D. Calina, N. Cruz-Martins, W.C. Cho, Hyssopus Essential Oil: An Update of Its Phytochemistry, Biological Activities, and Safety Profile, Oxid Med Cell Longev. 2022 (2022) 8442734. <https://doi.org/10.1155/2022/8442734> (datum dostopa: 11. 11. 2022).
- [11] S. Rashidi, M.H. Eikani, M. Ardjmand, Extraction of Hyssopus officinalis L. essential oil using instant controlled pressure drop process, Journal of Chromatography A. 1579 (2018) 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.10.020> (datum dostopa: 11. 11. 2022).

- [12] D. Tungmannithum, L. Garros, S. Drouet, S. Renouard, E. Lainé, C. Hano, Green Ultrasound Assisted Extraction of trans Rosmarinic Acid from *Plectranthus scutellariooides* (L.) R.Br. Leaves, *Plants*. 8 (2019) 50. <https://doi.org/10.3390/plants8030050> (datum dostopa: 11. 11. 2022).
- [13] S.H. Nile, A.S. Nile, Y.-S. Keum, Total phenolics, antioxidant, antitumor, and enzyme inhibitory activity of Indian medicinal and aromatic plants extracted with different extraction methods, *3 Biotech.* 7 (2017) 76. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0706-9> (datum dostopa: 11. 11. 2022).
- [14] F. Moulodi, A. Khezerlou, H. Zolfaghari, A. Mohamadzadeh, F. Alimoradi, Chemical Composition and Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Essential Oil of *Hyssopus officinalis* L., *J Kermanshah Univ Med Sci.* 22 (2018). <https://doi.org/10.5812/jkums.85256> (datum dostopa: 11. 11. 2022).
- [15] Fathiazad, Fatemeh, Hamedeyazdan, Sanaz, A review on *Hyssopus officinalis* L.: Composition and biological activities, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 5.17. (2011) https://www.researchgate.net/publication/229432286_A_review_on_Hyssopus_officinalis_L_Composition_and_biological_activities (datum dostopa: 12. 11. 2022).
- [16] Svetek Tina, Emulzije • Kremica, Kremica. (2015). <https://www.kremica.si/emulzije/> (datum dostopa: 5. 11. 2022).
- [17] N. Medved, Prva pomoč pri izdelavi krem, Magnolija. (2013). <https://www.magnolija.si/blog/2013/03/prva-pomoc-pri-izdelavi-krem/> (datum dostopa: 5. 11. 2022).
- [18] Maja Vodan, Vlažilna krema za suho kožo, Aromika. (2018). <https://www.aromika.si/recept-domaca-vlazilna-krema-za-suho-kozo/> (datum dostopa: 5. 11. 2022).
- [19] Ceglar Špela, Izdelava mazil in emulzij, Milnica.si. (2019). <https://www.milnica.si/blog/izdelava-mazil-emulzij-pogosta-vprasanja-odgovori/> (datum dostopa: 5. 11. 2022).
- [20] Britannica, T. Editors of Encyclopaedia, Hyssop | Definition, Uses, In the Bible, Smell, & Facts | Britannica, (2022). <https://www.britannica.com/plant/hyssop> (datum dostopa: 11. 11. 2022).
- [21] A. Chandrasekara, F. Shahidi, Herbal beverages: Bioactive compounds and their role in disease risk reduction - A review, *Journal of Traditional and Complementary Medicine.* 8 (2018) 451–458. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.08.006> (datum dostopa: 10. 11. 2022).
- [22] P. Mucha, A. Skoczyńska, M. Małecka, P. Hikisz, E. Budzisz, Overview of the Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Selected Plant Compounds and Their Metal Ions Complexes, *Molecules.* 26 (2021) 4886. <https://doi.org/10.3390/molecules26164886> (datum dostopa: 15. 11. 2022).
- [23] Andrew Allott, David Mindorff, Biology, 2014th ed., Oxford University Press, Oxford, 2014.

- [24] V. Manzin, Vsebnost fenolnih spojin in antioksidativna učinkovitost ekstraktov listov in plodov oljke (*Olea europaea*), Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 2010. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=1352> (datum dostopa: 4. 2. 2023).
- [25] Mark Percival, Antioxidants, Advanced Nutrition Publication. (1998). <http://acudoc.com/Antioxidants.PDF> (datum dostopa: 25. 11. 2022).
- [26] N. Zupanič, Antioksidanti, Prehrana.si. (2017). <https://prehrana.si/clanek/181-antioksidanti> (datum dostopa: 25. 11. 2022).
- [27] A. Zeb, Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods, *J Food Biochem.* 44 (2020) e13394. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13394> (datum dostopa: 25. 11. 2022).
- [28] Phenol | Definition, Structure, Uses, & Facts | Britannica, (n.d.). <https://www.britannica.com/science/phenol> (datum dostopa: 26. 11. 2022).
- [29] G. Agbor, J.A. Vinson, P.E. Donnelly, Folin-Ciocalteau Reagent for Polyphenolic Assay, *IJFS.* (2014) 147–156. <https://doi.org/10.19070/2326-3350-1400028> (datum dostopa: 26. 11. 2022).
- [30] S. Aryal, M.K. Baniya, K. Danekhu, P. Kunwar, R. Gurung, N. Koirala, Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal, *Plants (Basel).* 8 (2019) 96. <https://doi.org/10.3390/plants8040096> (datum dostopa: 26. 11. 2022).
- [31] L.G. Malta, R.H. Liu, Analyses of Total Phenolics, Total Flavonoids, and Total Antioxidant Activities in Foods and Dietary Supplements, in: Encyclopedia of Agriculture and Food Systems, 2014: pp. 305–314. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00058-9> (datum dostopa: 26. 11. 2022).
- [32] Q.-W. Zhang, L.-G. Lin, W.-C. Ye, Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review, *Chin Med.* 13 (2018) 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x> (datum dostopa: 26. 11. 2022).
- [33] F. Chemat, M.A. Vian, G. Cravotto, Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles, *International Journal of Molecular Sciences.* 13 (2012) 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615> (datum dostopa: 26. 11. 2022).
- [34] A. Carreira-Casais, C. Lourenço-Lopes, P. Otero, M.C. Rodriguez, A.G. Pereira, J. Echave, A. Soria-Lopez, F. Chamorro, M.A. Prieto, J. Simal-Gandara, A. Carreira-Casais, C. Lourenço-Lopes, P. Otero, M.C. Rodriguez, A.G. Pereira, J. Echave, A. Soria-Lopez, F. Chamorro, M.A. Prieto, J. Simal-Gandara, Application of Green Extraction Techniques for Natural Additives Production, IntechOpen, 2021. <https://doi.org/10.5772/intechopen.100320> (datum dostopa: 23. 11. 2022).
- [35] Arthur Au, Michael Zwank, Ultrasound Physics and Technical Facts for the Beginner, American College of Emergency Physicians. (2020). <https://www.acep.org/sonoguide/basic/ultrasound-physics-and-technical-facts-for-the-beginner/> (datum dostopa: 26. 11. 2022).

- [36] Ultrasound: What It Is, Purpose, Procedure & Results, Cleveland Clinic. (2022). <https://my.clevelandclinic.org/health/diagnostics/4995-ultrasound> (datum dostopa: 26. 11. 2022).
- [37] A. Carovac, F. Smajlovic, D. Junuzovic, Application of Ultrasound in Medicine, *Acta Inform Med.* 19 (2011) 168–171. <https://doi.org/10.5455/aim.2011.19.168-171> (datum dostopa: 26. 11. 2022).
- [38] K. Kumar, S. Srivastav, V.S. Sharanagat, Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review, *Ultrasonics Sonochemistry.* 70 (2021) 105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325> (datum dostopa: 28. 11. 2022).
- [39] Jaísa Oliveira Chaves, Mariana Corrêa de Souza, Laise Capelasso da Silva, Extraction of flavonoids from natural sources using modern techniques, *Frontiers in Chemistry* 8. 2020 (2020) 2 (datum dostopa: 28. 11. 2022).
- [40] Vojko Ozim, Željko Knez, Mehanska tehnika: zbrano gradivo, Založniško tiskarska dejavnost Tehniških fakultet, Maribor, 1995.
- [41] Željko Knez, Mojca Škerget, Termodifuzijski separacijski procesi: zbrano gradivo, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor, 1999.
- [42] University of California, Department of Chemistry and Biochemistry, How to use a Rotary Evaporator, UCLA – Chemistry and Biochemistry. (2010). <https://www.chem.ucla.edu/~bacher/Specialtopics/rotavap.html> (datum dostopa: 29. 11. 2022).
- [43] Islamčević Razboršek, Maša, Kolar, Mitja, Analizna kemija II in industrijska analiza: navodila za vaje, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor, 2016. http://www.fkkt.um.si/egradiva/fajli/Navodila_za_eksperimentalno_delo_AK_II_Industrijska_analiza.pdf (datum dostopa: 29. 11. 2022).
- [44] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, Fundamentals of analytical chemistry, 7., Saunders College Pub., Fort Worth, 1996. <http://catdir.loc.gov/catdir/enhancements/fy1514/95067683-b.html> (datum dostopa: 29. 11. 2022).
- [45] V.L. Singleton, J.A. Rossi, Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdc-Phosphotungstic Acid Reagents, *Am J Enol Vitic.* 16 (1965) 144–158 (datum dostopa: 1. 12. 2022).
- [46] D. Huang, B. Ou, R.L. Prior, The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c> (datum dostopa: 1. 12. 2022).
- [47] E.A. Ainsworth, K.M. Gillespie, Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent, *Nat Protoc.* 2 (2007) 875–877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102> (datum dostopa: 1. 12. 2022).
- [48] J.D. Everette, Q.M. Bryant, A.M. Green, Y.A. Abbey, G.W. Wangila, R.B. Walker, A thorough study of reactivity of various compound classes towards the Folin-Ciocalteu

- reagent, J Agric Food Chem. 58 (2010) 8139–8144. <https://doi.org/10.1021/jf1005935> (datum dostopa: 1. 12. 2022).
- [49] N. Hudz, O. Yezerska, M. Shanaida, V.H. Sedláčková, P.P. Wieczorek, Application of the Folin-Ciocalteu method to the evaluation of Salvia sclarea extracts, Pharmacia. 66 (2019) 209–215. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.66.e38976> (datum dostopa: 1. 12. 2022).
- [50] A.Z. Sulaiman, N. Idris, Ts.Dr.A. Ajit, Comparison between conventional extraction and ultrasound assisted extraction (UAE) of Labisia pumila sp.in 25-L mobile extractor using water as solvent of extraction, Chemical Engineering Transactions. 56 (2017). <https://doi.org/10.3303/CET1756131> (datum dostopa: 2. 12. 2022).
- [51] S. Sedonja, Izolacija učinkovin industrijske konoplje ter sinergistični učinek mešanic materialov družine Zingiberaceae, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor, 2022. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=81819> (datum dostopa: 15. 12. 2022).
- [52] T. Žitek, Optimizacija procesa izolacije učinkovin iz industrijske konoplje v kombinaciji z ingverjem ter biološki učinki mešanic, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor, 2022. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=83237> (datum dostopa: 5. 1. 2023).
- [53] European Parliament and Council, Directive 2009/32/EC of the European Parliament and of the Council of 23 April 2009 on the approximation of the laws of the Member States on extraction solvents used in the production of foodstuffs and food ingredients, 2016. <http://data.europa.eu/eli/dir/2009/32/2016-11-09/eng> (datum dostopa: 5. 1. 2023).
- [54] M. Škerget, P. Kotnik, M. Hadolin, A.R. Hraš, M. Simonič, Ž. Knez, Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities, Food Chemistry. 89 (2005) 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.025> (datum dostopa: 5. 1. 2023).

9.2 Viri slik

Slika 1: *Hyssopus officinalis* (Vrtnarstvo Breskvar, dostopno na <https://shop-drevesnica.eu/izdelek/hyssopus-officinalis/>, datum dostopa: 10. 11. 2022)

Slika 2: Živila, bogata z antioksidanti (Getty Images, dostopno na <https://www.gettyimages.com/detail/photo/fresh-vegetables-fruits-and-nuts-royalty-free-image/943001868?adppopup=true>, datum dostopa: 17. 11. 2022)

Slika 3: UV-VIS spektrofotometer (osebni arhiv avtorja)

Slika 4: Načrt eksperimentalnega dela (osebni arhiv avtorja)

Slika 5: Posušen zmlet material navadnega ožepka (osebni arhiv avtorja)

Slika 6: Zmes materiala ožepka in etanola pred ekstrakcijo (osebni arhiv avtorja)

Slika 7: Ultrazvočna kopel (osebni arhiv avtorja)

Slika 8: Zmes, preostala po UZ kopeli (osebni arhiv avtorja)

Slika 9: Filtracija s podtlakom (osebni arhiv avtorja)

Slika 10: Uparjanje na rotavaporju (osebni arhiv avtorja)

Slika 11: Hramba ekstrakta (osebni arhiv avtorja)

Slika 12: Priprava vzorcev za analizo (osebni arhiv avtorja)

Slika 13: Kivete z vzorci za analizo (osebni arhiv avtorja)

Slika 14: Homogena zmes ekstrakta, olja iz grozdnih pešk, emulgatorja in konzervansa (osebni arhiv avtorja)

Slika 15: Formulacija nosnega inhalatorja (osebni arhiv avtorja)

Slika 16: Priprava oljne faze kreme (osebni arhiv avtorja)

Slika 17: Priprava vodne faze kreme (osebni arhiv avtorja)

Slika 18: Formulacija kreme (osebni arhiv avtorja)

Slika 19: Končna produkta (osebni arhiv avtorja)