

Mladi za napredek Maribora 2014
31. srečanje

**Vpliv sorte in starosti poganjkov melise (*Melissa officinalis* L.) ter
postopka ekstrakcije na količino rožmarinske kisline**

Biotehnologija, kmetijstvo, živilstvo

Raziskovalna naloga

0€ d | ~~WWW~~UCVŠC P CZ V# OS

T ^} d | ~~WWW~~UCVŠC P CZ V# OS

¥ [| ~~WWW~~UCVŠC P CZ V# OS

Maribor, februar 2014

Mladi za napredek Maribora 2014
31. srečanje

**Vpliv sorte in starosti poganjkov melise (*Melissa officinalis* L.) ter
postopka ekstrakcije na količino rožmarinske kisline**

Biotehnologija, kmetijstvo, živilstvo

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO



Maribor, februar 2014

POVZETEK

Rožmarinska kislina (RK) je pomemben naravni aditiv. Najdemo jo kot eno izmed aktivnih sestavin številnih zdravilnih rastlin. Pri našem raziskovanju smo se osredotočili na meliso (*Melissa officinalis*), ker ima visoko vsebnost RK in je primerna za gojenje v našem klimatskem področju. Glavni namen raziskave je bil ovrednotenje vpliva sorte in starosti poganjkov na vsebnost RK v posušenem rastlinskem materialu. Primerjali smo tudi dva različna postopka ekstrakcije. Za določevanje vsebnosti RK smo uporabili tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Rastline za analize smo nabrali na dveh lokacijah.

Z raziskavo ugotavljamo, da med analiziranimi sortami obstajajo razlike v vsebnosti rožmarinske kisline. Najprimernejša za gojenje je sorta Lorelei, katere povprečna vsebnost rožmarinske kisline glede na lokacijo je 3,26 % in 3,66 %. Velik vpliv na vsebnost rožmarinske kisline v drogi ima tudi starost poganjkov. S starostjo poganjkov vsebnost učinkovine pada. Na učinkovitost ekstrakcije vpliva izbira topila. Za pridobivanje rožmarinske kisline je etanol primernejše topilo kot voda.

ZAHVALA

Za strokovno pomoč, usmerjanje in nasvete pri izdelavi raziskovalne naloge se zahvaljujem obema mentorjema.

Najlepša hvala tudi podjetju, ki je omogočilo raziskovanje v njihovih prostorih, in vsem ostalim, ki so sodelovali pri nastajanju naloge.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	3
ZAHVALA	4
KAZALO VSEBINE	5
KAZALO SLIK.....	6
KAZALO PREGLEDNIC	6
1 UVOD	7
1.1 Namen in cilj raziskovalne naloge	9
1.2 Hipoteze.....	10
2 TEORETIČNO OZADJE	11
2.1 Aditivi za živila	11
2.1.1 Fenolne spojine in flavonoidi	12
Rožmarinska kislina	13
2.2 Pridobivanje naravnih aditivov.....	14
2.2.1 Pridelava zelišč.....	14
Melisa in njene morfološke lastnosti.....	15
2.3. Ekstrakcija rožmarinske kisline.....	16
2.4 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti	17
3 MATERIALI IN METODE.....	18
3.1 Material	18
3.1.1 Rastlinski material	18
3.1.2 Laboratorijski material	19
3.2 Metode dela	20
3.2.1 Priprava rastlinskih vzorcev	20
3.2.2 Določanje vsebnosti rožmarinske kisline v rastlinskem materialu in v suhem ekstraktu.....	21
3.2.3 Metoda ekstrakcije	22
3.3 Posamezni izračuni in statistična obdelava podatkov	24
3.3.1 Izračun vsebnosti rožmarinske kisline.....	24
3.3.2 Izračun izkoristka rožmarinske kisline iz droge.....	24
3.3.3 Ekonomski vidik primernosti ekstrakcijske metode.....	25
4 REZULTATI	26
4.1 Vpliv sorte melise na vsebnosti RK	26
4.2 Vpliv starosti poganjkov na vsebnost rožmarinske kisline	27
4.3 Vpliv metode ekstrakcije na količino RK	28
5 RAZPRAVA	30
6 ZAKLJUČEK.....	32
8 VIRI IN LITERATURA	33

KAZALO SLIK

Slika 1: Pridobivanje aditivov	12
Slika 2: Strukturna formula rožmarinske kisline.....	13
Slika 3: Mlada rastlina melise	15
Slika 4: Diagram komponent izokratskega HPLC sistema	17
Slika 5: Poskusni nasad melise na kmetiji – lokacija 1	18
Slika 6: Poskusni nasad melise na kolekcijskem polju – lokacija 2.....	19
Slika 7: Rastlinski vzorci melise pripravljene za sušenje	21
Slika 8: Kromatogram standarda rožmarinske kisline	22
Slika 9: Etanolni ekstrakt po uparjanju z vakuumskim uparjalnikom	23
Slika 10: Suhi ekstrakt po vodni ekstrakciji.....	23
Slika 11: Kromatogram rožmarinske kisline v vzorcu sorte Erfurter z lokacije 1	26

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Tip rasti preučevanih sort in njihov izvor	18
Preglednica 2: Čas sajenja in nabiranja posameznih rastlinskih vzorcev	20
Preglednica 3: Povprečna vsebnost rožmarinske kisline in minimalne ter maksimalne vsebnosti učinkovine v proučevanih sortah gojenih na dveh lokacijah	26
Preglednica 4: Primerjava povprečnih vsebnosti rožmarinske kisline v pridelku melise sorte Lorelei glede na termin žetve	27
Preglednica 5: Povprečna vsebnost rožmarinske kisline v suhem ekstraktu, izkoristek ekstrakcije in rožmarinske kisline glede na metodo ter finančno ovrednotenje postopka	29

1 UVOD

Hrana je za življenje nujno potrebna. Je vir energije in hranil, ki jih naše telo potrebuje za rast, razvoj, gibanje, delovanje, igranje, razmišljanje in učenje. Prehrambni, kozmetični, farmacevtski izdelki, živalska krma, ki vsebujejo maščobe, so pred in med uporabo izpostavljeni svetlobi, toploti in kisiku. Pod vplivom teh faktorjev nenasičene maščobne kisline oksidirajo, s čimer se bistveno zmanjša prehrabna in fiziološka vrednost izdelkov. Ker jih človeško telo ne more tvoriti, jih pa nujno potrebuje za svoj razvoj in normalno delovanje, je tem bolj pomembno, da so v hrani prisotne nenasičene maščobne kisline čim manj pokvarjene oz. oksidirane. Poleg visoke energetske vrednosti so maščobe tudi glavni vir vitaminov A, D, E in K (Rižner Hraš, 2000).

Osnovno načelo živilske industrije je proizvodnja hrane, ki je zdrava in ima daljši čas uporabnosti. Za podaljševanje obstojnosti hrane, kozmetičnih in farmacevtskih izdelkov in živalske krme se že tisočletja uporabljajo razni aditivi. To so snovi, ki se dodajajo proizvodom za izboljšanje kakovosti in varnosti, podaljšujejo rok uporabe, izboljšujejo organoleptične lastnosti ali pa nadomeščajo sestavine (Hlastan Ribič s sod., 2009).

Po izvoru ločimo naravne in sintetične aditive. Ljudje s hrano vsako leto zaužijemo veliko aditivov. V razvitih državah je še posebej v zadnjih 30 letih zaznati močan porast uporabe sintetičnih aditivov. Danes bi jih naj letno porabili preko 200 000 ton. Vsak človek povprečno poje 3,6–4,5 kg aditivov na leto (Wroblewska, 2009). Z večanjem uporabe aditivov v prehrabni industriji se pojavlja tudi vedno več znanstvenih raziskav v zvezi z njihovimi vplivi na fizične in mentalne bolezni pri človeku (Wroblewska, 2009; Tuormaa, 1994; McCann s sod., 2007)..

Zaradi zdravju škodljivih učinkov nekaterih sintetičnih aditivov ter posledično zakonskih omejitev pri njihovi uporabi obstaja velik interes za pridobivanje aditivov iz naravnih materialov. Tako predstavljajo aditivi izolirani iz naravnih materialov vse pomembnejšo alternativo sintetično pridobljenim aditivom.

Pomemben vir naravnih aditivov so zelišča. Znano je, da zelišča vsebujejo veliko učinkovin, ki jih uporabljamo kot aditive. Ena takih spojin je rožmarinska kislina, ki jo najdemo predvsem v rastlinah iz družine ustnatic (Laminaceae). Poleg antioksidativnega delovanja deluje tudi

protivnetno, antivirusno in antibakterijsko (Rižner Hraš, 2000).

Pri našem raziskovanju smo se osredotočili za meliso (*Melissa officinalis* L.). Melisa se kot droga v zdravilstvu uporablja že več kot dve tisočletji, predvsem kot zdravilo za srce in želodec (Grunwald in Janicke, 2004). Znana je zaradi njenih nežnih, pomirjevalnih, spazmolitičnih, antimikrobnih in antioksidativnih učinkov.

Ekstrakt, ki ga dobimo iz droge (posušениh rastlin ali delov rastlin), je skupek različnih učinkovin, kot so: eterična olja, diterpenski fenoli, fenolne kisline, triterpenske kisline idr. Učinkovina melise pa je tudi rožmarinska kislina, ki jo pridobimo z izolacijo iz melisnega ekstrakta.

Podjetje v severovzhodni Sloveniji se ukvarja s pridobivanjem rožmarinske kisline iz naravnih ekstraktov. Večino rožmarinske kisline danes pridobijo iz rožmarina (*Rosmarinus officinalis* L.), ki ga kupujejo na svetovnem trgu (predvsem v Španiji in na Kitajskem). Zaradi velikega povpraševanja po njihovih izdelkih jim primanjkuje surovine, katere nabave je zaradi omejene količine in tudi zaradi oddaljenosti trga otežena.

Melisa je lahko pomemben vir za pridobivanje rožmarinske kisline, saj ima dovolj visoko vsebnost rožmarinske kisline, da je njena izolacija oz. pridobivanje rentabilno. Zelo pomembno je tudi, da je gojenje melise mogoče na področjih s kontinentalnim podnebjem, ki je značilno za SV Slovenijo.

Melisa bi lahko postala pomembna kultivirana vrsta za kmetovalce na področju SV Slovenije in širše. Z njenim gojenjem bo mogoče povečati biološko pestrost polj in na ta način zmanjšati pojavnost bolezni in škodljivcev. Gojenje v neposredni bližini tovarne za predelavo omogoča konkurenčno prednost pred nabavo surovine na mednarodnih trgih in s tem ustvarja ugodno odkupno ceno, ki bo povečala prihodke na kmetijah.

1.1 Namen in cilj raziskovalne naloge

Veliko raziskav potrjuje, da ima ekstrakt melise in rožmarinska kislina različne biološke učinke. Tudi Tumpa (2013) v raziskovalni nalogi (v okviru projekta Mladi za napredek Maribora) ugotavlja, da ima ekstrakt melise antimikrobno delovanje. Ekstrakt je skupek različnih učinkovin. Z izolacijo rožmarinske kisline iz melisinega ekstrakta dobimo produkt, ki je pomemben in zelo iskan naravni aditiv. Namen raziskovalne naloge je raziskati nekatere dejavnike, ki vplivajo na količino rožmarinske kisline v ekstraktu.

Na rentabilnost pridelave melise, poleg čim večjega pridelka, vpliva tudi kvaliteta pridelane droge. Odkupna cena melise je namreč odvisna od vsebnosti rožmarinske kisline v pokošenih rastlinah, saj je od te odvisen strošek ekstrakcije oz. pridobivanja rožmarinske kisline. Za kmetovalca je izjemnega pomena, da pozna dejavnike, ki vplivajo na količino učinkovine v pridelani drogi. Prav tako obstaja več postopkov izolacije rožmarinske kisline.

Namen raziskovalne naloge je bil raziskati ali obstajajo razlike v vsebnosti rožmarinske kisline med sortami melise, ki so primerne za gojenje. Med sortami ločimo dva tipa: pokončni tip in polegli tip. Cilj tega dela raziskave je bil ugotoviti, katera izmed preučevanih sort ima najvišjo vsebnost rožmarinske kisline.

Meliso kosimo večkrat v enem letu. Čas košnje je odvisen od prirasta poganjkov. Mladi poganjki imajo veliko listov in manj stebel. Cilj raziskave je bil ugotoviti, ali se s starostjo poganjkov spreminja vsebnost rožmarinske kisline.

Na količino rožmarinske kisline v melisinem ekstraktu vpliva tudi postopek ekstrakcije. Namen raziskave je bil primerjati dva postopka ekstrakcije s ciljem, da se ugotovi, kateri postopek je učinkovitejši.

1.2 Hipoteze

1. Genska zasnova rastline ima pomembno vlogo pri sestavi in količini posameznih učinkovin v ekstraktu. Domnevamo, da sorta melise vpliva na vsebnost rožmarinske kisline v pridelani drogi ne glede na vplive okolja (mikro in makro okolja).
2. Vsebnost rožmarinske kisline se v poganjkih melise spreminja. Predpostavljamo, da pri določeni starosti (dozorelosti) poganjkov začne vsebnost rožmarinske kisline upadati.
3. Proučili smo dva postopka pridobivanja melisinega ekstrakta. Domnevamo, da je količina ekstrahirane rožmarinske kisline odvisna od topila, ki ga uporabljamo v postopku ekstrakcije.

2 TEORETIČNO OZADJE

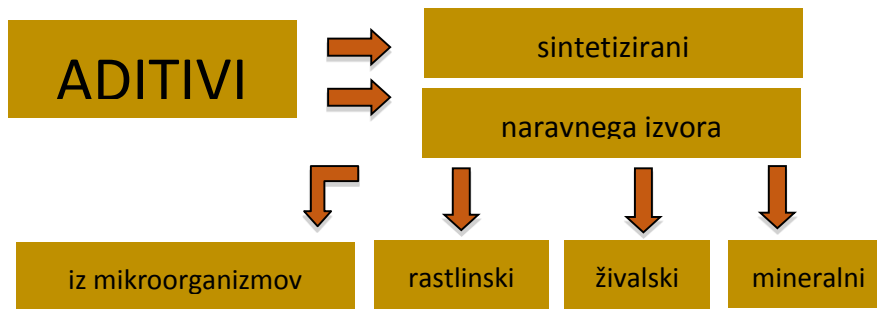
2.1 Aditivi za živila

Aditiv pomeni vsako snov, ki se doda živilu z namenom, da z njo dosežemo specifične lastnosti živila, kot so izboljšanje tehnoloških postopkov in fizikalno-kemijskih lastnosti, povečanje hranilne vrednosti živila, podaljšanje dolgotrajnosti živila (konzervacija živila), delujejo kot antioksidanti in inhibitorji mikroorganizmov, omogočajo mešanje sestavin, obarvajo, zgostijo ali okrepijo aromo. Aditivi torej služijo več namenom in pomagajo pri predelavi osnovnih surovin v izdelke. Z aditivi dosežemo lažjo predelavo živil, manjše izgube tekom predelave in skladiščenja, nižjo ceno izdelkov, ob tem pa količinsko pestro ponudbo le-teh (Murn, 2012).

Danes živilska industrija uporablja veliko aditivov, ki ob ogromni ponudbi hrane pri potrošnikih lahko povzročijo pravo zmedo. Med aditive, ki se smejo uporabljati v živilih, štejemo konzervanse, antioksidante, nosilce, kisline, sredstva za uravnavanje kislosti, sredstva proti sprijemanju, sredstva proti penjenju, sredstva za povečanje prostornine, emulgatorje, emulgirne soli, utrjevalce, ojačevalce arome, sredstva za penjenje, želirna sredstva, sredstva za glaziranje, sredstva za ohranjanje vlage, modificirane škrobe, pline za pakiranje, potisne pline (razen zraka), sredstva za vzhajanje, veziva, stabilizatorje, sredstva za zgostitev (gostila) in sredstva za obdelavo moke.

Uporaba aditivov je zakonsko omejena, prav tako je nadzorovana kakovost in varnost aditivov (Murn, 2012). V Sloveniji uporabo aditivov ureja Pravilnik o aditivih (ULRS, 2010), in sicer predpisuje, katere aditive in v katerih živilih se smejo uporabljati, kakšne kakovosti morajo biti aditivi, kako jih označujemo, opredeljujejo pa tudi njihovo čistost. Vsak izdelek mora imeti zapisane vse uporabljene aditive na deklaraciji, in sicer s črko E in številko aditiva, ki je povezana z njegovo čistostjo in kemijsko sestavo (ULRS, 2010).

Aditivi se v prehrani uporabljajo že več tisoč let. Ljudje so že od nekdaj poznali naravne sestavine, ki so jih uporabljali pri konzerviranju hrane, čeprav niso poznali njihovega delovanja. Danes se poleg naravnih uporablja veliko sintetično pridobljenih aditivov. Zaradi potencialne strupenosti sintetičnih aditivov in posledično zakonski omejitvi njihove uporabe, obstaja velik interes za pridobivanje aditivov iz naravnih materialov. Aditive naravnega porekla pridobivamo iz rastlin, živali, mineralov in s pomočjo mikroorganizmov (Slika 1).



Slika 1: Pridobivanje aditivov

Pomemben vir naravnih aditivov so zelišča, ki vsebujejo učinkovine, kot so: eterična olja, diterpenski fenoli, fenolne kisline, flavani, triterpenske kisline, lipide, ogljikove hidrate idr.

2.1.1 Fenolne spojine in flavonoidi

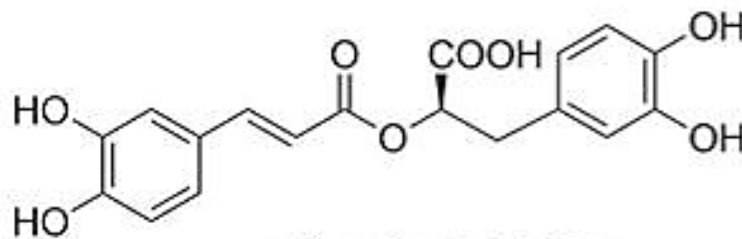
Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, ki so prisotne v vseh rastlinah in nastanejo iz primarnih metabolitov. V naravi so običajno spojine z več OH-skupinami in zato se je zanje uveljavilo tudi drugo ime – polifenoli. Polifenoli so zelo heterogena skupina organskih spojin, ki v rastlinskem svetu opravljajo funkcijo barvil, koencimov, odvrčal, protimikrobnih agensov in fitoalkesinov (spojine, ki se pojavijo v rastlinah kot odgovor na infekcije). Rastlinam dajo karakteristični okus, prehransko vrednost, farmakološke in toksične učinke (Kure, 2006).

Fenolne spojine tudi prispevajo k barvi, aromi in ostalim karakteristikam določenega prehranskega izdelka. Vsebnost fenolnih spojin je odvisna od vrste rastlin, sorte (pri sadju), deloma tudi od rastišča (vsebnost hranljivih snovi v zemlji), podnebnih razmer (temperature, svetlobe, količine padavin), agrotehničnih dejavnikov in od načine pridelave (Kure, 2006).

Rastline in sadje vsebujejo vitamin C, vitamin E, kartenoide ter različne fenolne snovi, zlasti flavonoide. Do sedaj je poznanih že več kot 5000 različnih flavonoidov. V rastlinah so flavonoidi rdeči, beli in rumeni pigmenti cvetov, sadežev, lubja in korenin. So grenkega okusa, zato odganjajo parazite. Zaradi zmožnosti absorpcije UV-svetlobe delujejo kot zaščita rastlin pred vplivi UV žarkov (Kure, 2006).

Rožmarinska kislina

Rožmarinska kislina (Slika 2) je ester kofeinske kisline in 3,4-dihidroksifenilmlečne. Je drugi najpogostejši ester kofeinske kisline. Zaradi njene polifenolne strukture jo uvrščamo med čreslovine oziroma tanine. Med rastlinami se rožmarinska kislina najpogosteje pojavlja pri dvokaličnicah v družinah Boraginaceae in Lamiaceae, najdemo pa jo tudi v številnih drugih družinah, celo pri praprotilih in nižjih mahovih (Sova, 2012). Vsebnost rožmarinske kisline v rastlinah je med 0,07 in 0,84 % (Rižner Hraš, 2000).



Slika 2: Strukturna formula rožmarinske kisline

Zančilnosti rožmarinske kisline:

- Kemijsko ime:
3-(3,4-dihidroksifenil)-2-[[3-(3,4-dihidroksifenil)prop-2-enoil]oksi]propanojska kislina
- Molekulska formula: $C_{18}H_{16}O_8$
- $M = 360 \text{ g/mol}$
- $T \text{ (tališča)} = 174 \text{ }^\circ\text{C}$

Kemično strukturo sta najprej opisala italijanska kemika Scarpati in Oriente leta 1958. Izolirala sta jo iz rožmarina in jo po njem tudi poimenovala (Sova, 2012). Čista rožmarinska kislina je v obliki belega prahu in je dobro topna v vodi, zato deluje antioksidativno predvsem v vodnih medijih in emulzijah.

Rožmarinska kislina je aktivna sestavina zelišč, kot so žajbelj (*Salvia officinalis* L.), poprova meta (*Mentha × piperita* L.), vrtni timijan (*Thymus vulgaris* L.), melisa (*Melissa officinalis* L.) in navadni gabez (*Symphytum officinale* L.) (Martinčič s sod., 2010). Kot sestavina začimb se uporablja v vsakodnevni prehrani. V literaturi pa so opisani številni biološki učinki rožmarinske kisline. Predvsem je poznana po svojem antioksidativnem, protivnetnem, antikarcenogenem,

antiangiogenem in protimikrobnem delovanju, zato jo najdemo v številnih prehranskih dopolnilih, farmacevtskih in kozmetičnih pripravkih (Sova, 2012).

2.2 Pridobivanje naravnih aditivov

Naravna zelišča vsebujejo različne kemične snovi, ki jim omogočajo lažje preživetje (se ščitijo pred UV-žarki, pred bakterijami itn.). Te snovi so zanimive tudi za človeka, saj jih lahko ob primerni pridelavi uporabi tudi za svoje potrebe. Zelišča se že stoletja uporabljajo kot začimbe ali zdravilne rastline. Njihove učinkovine pa lahko uporabljamo tudi kot dodatke v živilih, kozmetičnih preparatih in parfumi, kjer nadomeščajo sintetično pridobljene aditive. Prve raziskave, v okviru katerih so raziskali antioksidativno aktivnost 32 različnih zelišč, so na tem področju opravili Chipault in sod. (1952). Od takrat je bilo opravljenih mnogo raziskav, še posebej v zadnjih letih, ko je znano, da so nekateri sintetičnih aditivi zdravju škodljivi (Rižner Hraš, 2000).

2.2.1 Pridelava zelišč

Zelišča so rastline, ki se uporabljajo v živilstvu kot dodatki za aromo in okus (začimbe), veliko pa se jih uporablja tudi za dišave (aromatična zelišča) in v zdravstvene namene (zdravilna zelišča). Zapisi kažejo, da so zelišča uporabljali že antični Egipčani in Kitajci in so v zgodovini človeštva imela pomembno vlogo. Tudi danes se zelišča uvrščajo med zelo uporabne rastline (Copsey in Norman, 2002; Grunwald, 2004)

Pridelava zdravilnih rastlin v Sloveniji se kot kmetijska dejavnost do sedaj ni razmahnila v večjem obsegu – kljub različnim in zelo dobrim naravnim razmeram. Zelišča se pridelujejo na 20 ha, od tega je pridelava pri tržnih pridelovalcih stabilna na 12 ha. Glavni vzrok je neorganiziran odkup pridelka. V Sloveniji ni organiziranega odkupa (razen redkih izjem), kjer bi potencialni pridelovalec vedel kdaj, kje in po kakšni ceni se odkupuje droga (Ferant, 2008).

Pogoji za pridelavo zelišč v Sloveniji so dobri, saj najdemo različna agroekološka območja, različne tipe tal, različna mikroklimatska območja. Pridelava v relativno majhni obremenjenosti okolja obrobni predelov omogoča gojenje ekološko neoporečnih zelišč (Ferant, 2008).

Melisa in njene morfološke lastnosti

Melisa (*Melissa officinalis* L.) spada v družino ustnatic (Lamiaceae). Nekatere najbolj znane rastline te družine so: rožmarin, žajbelj, timijan, origano, sivka, poprova meta in melisa. Melisa je trajno, močno razraščeno zelišče, ki zraste do 80 cm. Steblo je močno razraslo, pokončno, na prerezu kvadratne oblike. Jajčasti do skoraj rombasti listi so pecljati, precej pravilno grobo nazobčani, na kratko priostreni in po zgornji strani dlakavi (Slika 3). Beli, včasih rahlo rožnati cvetovi so nekoliko kimajoči in združeni v 3–6-cvetna socvetja v zalistjih zgornjih listov (Wagner, 1997).

Rastlina izvira iz območij Sredozemskega morja. Pri nas uspeva samoniklo, na Primorskem na posekah, med grmovjem, po starih zidovih in obdelanih tleh. Drugod po Sloveniji raste kultivirano in tudi samoniklo. Med kultivarji oziroma izvori ločimo dva tipa: pokončno rastoči – erfurtski, in položno rastoči – kvedlinburški. Položno rastoči tip rastline se posebej v prvem letu težko kosi, v poznejših letih zraste pokončno in je drobnolistnat. Nasprotno ima pokončno rastoči tip visoke liste, je pa tudi bolj grob, saj ima večji delež stebel v zeliščni drogi (Wagner, 1997).

Že sama naravna rastišča nam povedo, da ima rastlina rada veliko toplote. Ugaja ji polsenčna lega ter dobra, s humusom bogata vrtna zemlja. Dobro uspeva na sončnih in polsenčnih legah. Primerna je za gojenje v vrtovih. Ker ni občutljiva, jo lahko gojimo povsod, od Primorja do višje ležečih leg, do 1000 m nadmorske višine (Wagner, 1997).



Slika 3: Mlada rastlina melise

Nasad lahko traja 3–5 let, a običajno se po 2–3 letih obnovi. Zelišče kosimo ročno ali strojno, 10 cm nad zemljo. V prvem letu dvakrat kosimo: sredi julija in sredi septembra. Od drugega leta naprej kosimo štirikrat. Sveže zelišče je občutljivo na pritisk in porjavi, kar je znak slabše kakovosti. Pogosta košnja da več listja in manj stebel (Wagner, 1997).

Melisa je že dolgo znana zdravilna rastlina, saj so jo poznali že stari Grki, Rimljani in Arabci (Wagner, 1997). Danes jo uporabljamo kot zdravilno, aromatično, industrijsko, okrasno in medonosno rastlino. Melisa vsebuje fenolne kisline in flavonoidne sestavine, kot je rožmarinska kislina. Zaradi teh sestavin jo poznamo po pomirjevalnem, antibakterijskem, antivirusnem, protivnetnem in antioksidativnem delovanju (Toth, 2003; Marongiu s sod., 2004; Koksal s sod., 2011).

2.3. Ekstrakcija rožmarinske kisline

Ekstrakcija je postopek, s katerim odstranjujemo iz trdnih ali tekočih zmesi topne komponente s topilom. Ekstrakcija sestoji iz dveh zaporednih operacij. V prvi spravimo zmes v intenzivni stik s topilom, v drugi pa obe fazi ločimo. Postopek uporabljamo predvsem za pridobivanje olj iz plodov in semen ter za pridobivanje arom, začimb in farmacevtskih substanc iz rastlin in sadežev. Kot topilo uporabljamo lahko hlapna organska topila, v določenih primerih pa tudi vodo (Škerget in Perko, 2012).

Običajna metoda z ekstrakcijo je sestavljena iz naslednjih korakov:

1. Nabiranje rastlinskega materiala in sušenje
2. Mletje
3. Ekstrakcija
4. Filtracija
5. Zgoščevanje
6. Sušenje

Kvaliteta ekstrakta je odvisna od več faktorjev, kot so: rastlinski deli, ki smo jih uporabili kot začetni material, od topila, uporabljenega za ekstrakcijo, postopka ekstrakcije in razmerja med rastlinskim materialom in topilom (Gupta s sod., 2012).

2.4 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

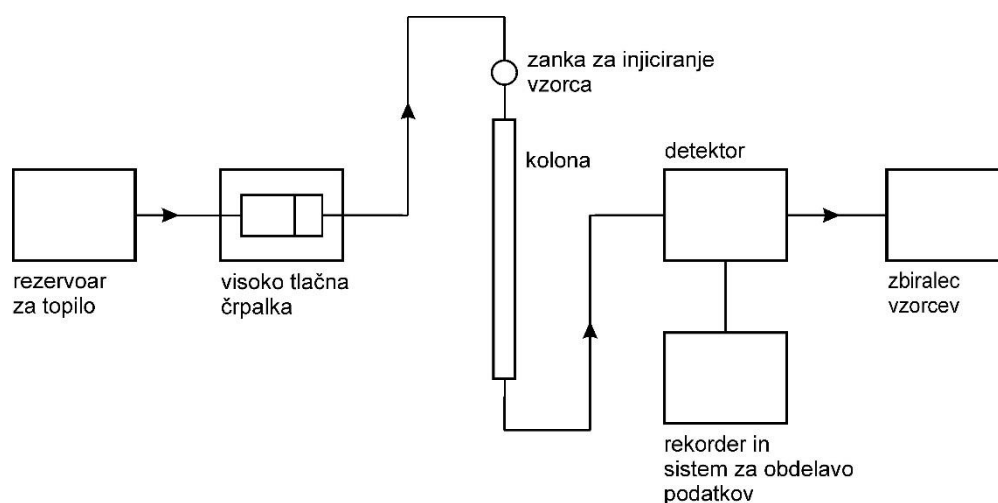
Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti – HPLC (High performance liquid chromatography) je metoda, s katero ločimo zmesi na posamične komponente in določimo njihovo koncentracijo.

Zmes raztopimo v ustreznem topilu, ki je mobilna faza. Tekoča zmes se pod tlakom pretaka preko kolone, kjer je stacionarna faza. Komponente se porazdelijo med mobilno in stacionarno fazo. Ker se komponente razlikujejo po tem, kako močno se lahko adsorbirajo na stacionarno fazo, se različno dolgo zadržujejo v kromatografskem sistemu. Vsaka komponenta ima torej svoj značilni retenzijski čas.

Za analize običajno uporabljamo kolone premera 2–8 mm in dolžine 5–30 cm. Tradicionalna stacionarna faza (»normalna faza«) je običajno silikagel – SiO_2 , ki je polaren in zahteva uporabo nepolarne mobilne faze (Repnik, 2012).

Glavni deli tekočinskega kromatografa so (Slika 4):

- rezervoar za mobilno fazo,
- črpalka,
- injektor za vzorec,
- kromatografska kolona,
- detektor.



Slika 4: Diagram komponent izokratskega HPLC sistema

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Material

3.1.1 Rastlinski material

V raziskavo smo vključili tri sorte melise (Preglednica 1). Za sorti Quedlinburger in Lorelei je značilna pokončna rast, za sorto Erfurter Aufrechte pa je značilna polegla rast. Sorte izvirajo iz Evropske unije. Quedlinburger in Erfurter Aufrechte izvirata iz Nemčije (žlahtnitelj je Chrestensen N.L.) sorta Lorelei pa iz Švice (žlahtnitelj je Agrscope ACW/DSP).

Rastline so bile gojene na dveh lokacijah. Na lokaciji 1 so rastline rastle na kmetiji. Posajene so bile 15. junija 2013 in smo jih pokosili samo enkrat (Slika 5). Na lokaciji 2 so rastline rastle na kolekcijskem polju. Posajene so bile 15. maja 2013 in košnja je potekala dvakrat. (Slika 6).

Preglednica 1: Tip rasti preučevanih sort in njihov izvor

Sorta	Tip rasti	Žlahtnitelj	Država
Quedlinburger	pokončen	N.L. Chrestensen	Nemčija
Erfurter Aufrechte	polegel	N.L. Chrestensen	Nemčija
Lorelei	pokončen	Agroscope ACW/DSP	Švica



Slika 5: Poskusni nasad melise na kmetiji – lokacija 1



Slika 6: Poskusni nasad melise na kolekcijskem polju – lokacija 2

3.1.2 Laboratorijski material

Steklovina:

- bučke (100 mL, 1000 mL),
- merilna bučke, 50 mL
- erlenmajerice, 1000 mL,
- merilni valji, 1000 mL.

Kemikalije:

- etanol, 55 %
- destilirana voda,
- rožmarinska kislina, standard (min. 97 %),
- topilo za vzorce in standard (acetonitril in 0,03 % trifluoroacetna kislina v vodi zmešamo v volumskem razmerju 25:75).

Aparature:

- sušilnik, model VDL-115, proizvajalca WTB Binder,
- kuhinjski mešalnik-rezalnik, Philips HR 2860,
- magnetno mešalo, tipa IKA RCT Standard, proizvajalca IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG iz Nemčije,
- vakuumski uparjalnik, Heidolph[®] LABOROTA Collegiate[®],

- tekočinski kromatograf visoke učinkovitosti – HPLC (High performance liquid chromatograph), AGILENT 1100 SERIES HPLC/UV-VIS, proizvajalca Agilent technologies iz Amerike (Slika 13).

Sestavljen je iz:

- črpalke Spectra-Physics, model Spectra system P1500 V3.02.;
- detektorja Spectra-Physics, model Spectra Focus;
- injektorja Rheodyne, model 7725i;
- enote za ovrednotenje rezultatov: software PC 1000, V3 (Termo separation products).

3.2 Metode dela

3.2.1 Priprava rastlinskih vzorcev

Na kolekcijskem polju (lokaciji 2) smo rastline kosili dvakrat. Prvo košnjo smo opravili 81 dni po saditvi (5. 8. 2103), drugo košnjo pa 41 dni po prvi (15. 9. 2013). Na kmetiji (lokacija 1) smo nabirali rastlinski material 15. septembra, isti dan kot smo opravili dugo košnjo na kolekcijskem polju – lokaciji 2 (Preglednica 2).

Preglednica 2: Čas sajenja in nabiranja posameznih rastlinskih vzorcev

Sorta	Lokacija gojenja	Sajenja	1. vzorčenje	2. vzorčenje
Quedlinburger	Lokacija 1	15. 6. 2013	15. 9. 2013	/
Erfurter Aufrechte	Lokacija 1	15. 6. 2013	15. 9. 2013	/
Lorelei	Lokacija 1	15. 6. 2013	15. 9. 2013	/
Quedlinburger	Lokacija 2	15. 5. 2013	5. 8. 2013	15. 9. 2013
Erfurter Aufrechte	Lokacija 2	15. 5. 2013	5. 8. 2013	15. 9. 2013
Lorelei	Lokacija 2	15. 5. 2013	5. 8. 2013	15. 9. 2013

Poganjke rastlin smo rezali v dopoldanskem času, s škarjami, 10 cm nad tlemi. Rastlinski material za en vzorec smo narezali iz večjega števila rastlin iste sorte. Nabran rastlinski material smo dali v papirnate vreče, ki smo jih ustrezno označili. Vzorce smo sušili v prostorih podjetja (Slika 7). Sušenje je potekalo pri 50 °C, 72 ur.



Slika 7: Rastlinski vzorci melise pripravljene za sušenje

3.2.2 Določanje vsebnosti rožmarinske kisline v rastlinskem materialu in v suhem ekstraktu

Za vrednotenje vsebnosti rožmarinske kisline v gojenih sortah smo uporabili posušen rastlinski material. Analize smo opravili v laboratoriju po protokolu, ki ga uporablja podjetje, s katerim smo sodelovali.

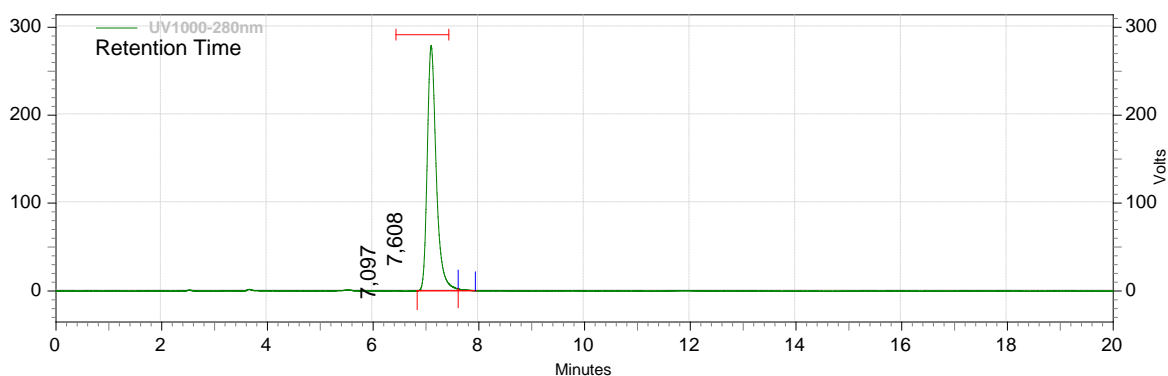
Vsebnost rožmarinske kisline določimo s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti. Detektor nastavimo na valovno dolžino 280 ± 1 nm. Mobilno fazo, ki jo uporabljamo pri analizi rožmarinske kisline, pripravimo tako, da v vodi zmešamo acetonitril (0,03%) s trifluoroacetno kislino v volumskem razmerju 25:75.

Zatehtamo $10 \text{ mg} \pm 1 \text{ mg}$ zmletih delov melise, jih damo v 50 mL merilno bučko in dopolnimo s topilom do oznake. Topilo, ki se pri tej metodi uporablja, je enako uporabljeni mobilni fazi. Dobljeno raztopino za 15 minut postavimo na ultrazvočno kopel. Nato zmes prefiltriramo in $10 \mu\text{L}$ pripravljene raztopine injiciramo.

Postopek določanja vsebnosti rožmarinske kisline v suhem ekstraktu je podoben postopku določanja vsebnosti rožmarinske kisline v rastlinskem materialu. Razlikuje se v tem, da pri določanju vsebnosti rožmarinske kisline v suhem ekstraktu (namesto zmletih listov melise) v

merilno bučko (50 mL) zatehtamo $10 \text{ mg} \pm 1 \text{ mg}$ suhega ekstrakta posameznega vzorca in z enakim topilom dopolnimo do oznake. $10 \text{ }\mu\text{L}$ pripravljene raztopine nato injiciramo.

Enota za ovrednotenje rezultatov, ki je sestavni del HPLC, nam na računalniku izriše kromatogram vsebnosti rožmarinske kisline in iz dobljenih podatkov izračuna vsebnost rožmarinske kisline v posameznem vzorcu. Kromatogram standarda rožmarinske kisline je prikazan na sliki 8.



Slika 8: Kromatogram standarda rožmarinske kisline

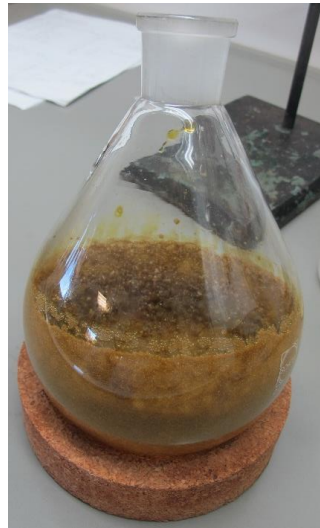
3.2.3 Metoda ekstrakcije

Posušene rastlinske vzorce smo uporabili za pridobivanje njihovih ekstraktov. Uporabili smo dva postopka ekstrakcije: etanolno in vodno. Primerjava učinkovitosti dveh metod ekstrakcije, etanolne in vodne, je bila narejena na sorti Lorelei, ker smo pri njej s kontrolno metodo izmerili najvišjo vsebnost rožmarinske kisline. Postopka ekstrakcije smo opravili v laboratoriju podjetja, s katerim smo sodelovali.

Etanolna ekstrakcija

Postopek etanolne ekstrakcije smo prilagodili protokolu, ki ga uporablja podjetje. Posušene rastline zmeljemo v prah in nato dodamo topilo. Držali smo se razmerja 1:10, pri katerem je količina topila desetkratna masi materiala. Za topilo pri tej ekstrakciji smo uporabljali 55 % etanol. Uporabili smo 30 g materiala in dodali 300 mL, 55 % etanola. Zmes smo s pomočjo magnetnega mešalnika mešali 3 ure, pri $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Z metodo nučiranja smo s pomočjo vakuuma vodne črpalke zmes prefiltrirali. Nato smo jo uparili z vakuumskim uparjalnikom, tako da je

topilo izparelo (Slika 9). Ostal je le suh ekstrakt, ki smo ga dokončno posušili v sušilniku. Sledila je kontrolna metoda, s katero smo izmerili vsebnost rožmarinske kisline v suhem ekstraktu.



Slika 9: Etanolni ekstrakt po uparjanju z vakuumskim uparjalnikom

Vodna ekstrakcija

Sam postopek vodne ekstrakcije je enak etanolni, vendar smo tukaj kot topilo uporabili vodo, v razmerju 1:10. K uporabljenim 30 g materiala smo dodali 300 mL vode. Z vakuumskim uparjalnikom smo iz zmesi izločili topljenec. Ostal je le suh ekstrakt (Slika 10).



Slika 10: Suhi ekstrakt po vodni ekstrakciji

3.3 Posamezni izračuni in statistična obdelava podatkov

3.3.1 Izračun vsebnosti rožmarinske kisline

Vsebnost rožmarinske kisline v analiziranem vzorcu izračunamo tako, da produkt koncentracije standarda, mase standarda in površino vzorca delimo s produktom mase vzorca in površine standarda.

$$\text{Vsebnost (RK)} = \frac{\text{konc. (standarda, \%)} \times m(\text{standarda, mg}) \times S(\text{vzorca})}{m(\text{vzorca, mg}) \times S(\text{standarda})} ; \text{ kjer je}$$

konc. (standarda (%)) = koncentracija standarda

m (standarda (mg)) = masa standarda je konstanta, ki se preračuna pred meritvami

S (vzorca) = površina vzorca (izmerjena površina vrha na kromatogramu)

m = masa vzorca

S (standarda) = površina standarda je konstanta, ki se dnevno poda

3.3.2 Izračun izkoristka rožmarinske kisline iz droge

Izkoristek rožmarinske kisline se naredi na kilogram droge, ki jo pomnožimo s vsebnostjo rožmarinske kisline in produkt delimo s produktom deleža izkoristka ekstrakcije in vsebnostjo rožmarinske kisline pred ekstrakcijo.

$$\text{Izkoristek RK (\%)} = \frac{1 \text{ kg} \times \text{vsebnost RK (\%)}}{(100 \text{ kg}) / (\text{izkoristek (ekstr.)} \times \text{vsebnost RK (pred ekstr.)})} ; \text{ kjer je}$$

1 kg = izračun se naredi na 1kg vzorca droge

vsebnost RK (%) = vsebnost rožmarinske kisline v ekstraktu

izkoristek (ekstr.) = izkoristek ekstrakcije, ki nam pove koliko suhega ekstrakta smo pridobili glede na začetno količino uporabljenega materiala

vsebnost RK (pred ekstr.) = vsebnost rožmarinske kisline v rastlinskem materialu

3.3.3 Ekonomski vidik primernosti ekstrakcijske metode

Postopek ekstrakcije smo finančno ovrednotili tako, da smo seštevek produkta 1 (izkoristek ekstrakcije in cene droge) in produkta 2 (izgube topila in ceno topila) delili z vsebnostjo rožmarinske kisline v ekstraktu.

Finančno ovrednotenje postopka

$$\text{Strošek postopka} = \frac{(\text{izkoristek (ekstrak.)} \times \text{cena droge}) + (\text{izguba (topila)} \times \text{cena (topila)})}{\text{vsebnost rožmarinske kisline v ekstraktu (\%)}}$$

Količina topila, ki ga porabimo pri eni ekstrakciji izračunamo:

$$\text{Izguba (topila)} = \frac{\text{količ. (topila)} \times \text{povpr. izguba (topila)}}{m(\text{eksrakta})}; \text{ kjer je}$$

količ. (topila) = količina uporabljenega topila

povpr. izguba (topila) = povprečna izguba topila pri eni ekstrakciji v % (etanola se izgubi 30 %, vode pa 100 %) (Vitiva d.d., 2013)

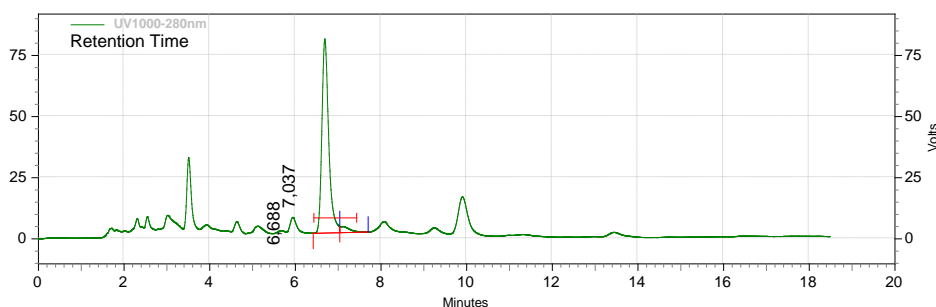
m (ekstrakta) = masa suhega ekstrakta

4 REZULTATI

V poglavju so prikazani rezultati meritev vsebnosti rožmarinske kisline v treh sortah melise, (ki so bile gojene na dveh lokacijah) in v poganjkih različne starosti. Ovrednoteni so podatki o vplivu metode ekstrakcije na vsebnost učinkovine v ekstraktu in narejena je tudi primerjava ekonomičnosti obeh postopkov.

4.1 Vpliv sorte melise na vsebnosti RK

Vsebnost rožmarinske kisline smo določali v posušenem rastlinskem materialu. Za izračun vsebnosti rožmarinske kisline smo uporabili rezultate kromatograma analiziranega vzorca (Slika 11).



Slika 11: Kromatogram rožmarinske kisline v vzorcu sorte Erfurter z lokacije 1

Iz podatkov o vsebnosti rožmarinske kisline v treh sortah melise, ki so bile gojene na dveh lokacijah, smo izračunali aritmetične sredine. Ugotovili smo, da med obravnavanimi sortami obstajajo razlike (Preglednica 3).

Preglednica 3: Povprečna vsebnost rožmarinske kisline in minimalne ter maksimalne vsebnosti učinkovine v proučevanih sortah gojenih na dveh lokacijah

Lokacija	Sorta	Vsebnost RK (%) ¹ (N = 4)	Min. vsebnost RK (%)	Mak. vsebnost RK (%)
Lokacija 1	Lorelei	3,26	2,89	3,60
	Erfurter	2,45	2,36	2,58
	Quendlingburg	2,55	2,41	2,68
Lokacija 2	Lorelei	3,66	3,38	3,97
	Erfurter	2,83	2,67	3,02
	Quendlingburg	3,50	3,28	3,65

¹RK (%) – povprečna vsebnost rožmarinske kisline v rastlinskem materialu

Na kmetiji – lokaciji 1, je pri sorti Lorelei povprečna vsebnost rožmarinske kisline višja v primerjavi s sortama Erfurter in Quendlingburg. Pri sorti Lorelei smo v povprečju izmerili 3,26 % rožmarinske kisline, kar je za 33 % več kot pri sorti Erfurter in za 28 % več, kot smo izmerili rožmarinske kisline pri sorti Quendlingburg. Minimalna izmerjena vsebnost rožmarinske kisline je bila 2,36 pri sorti Erfurter. Maksimalna vsebnost rožmarinske kisline je bila na tej lokaciji izmerjena pri sorti Lorelei in je znašala 3,6 % v posušenem rastlinskem materialu.

Pri analizi vsebnosti rožmarinske kisline v posameznih sortah, gojenih na kolekcijem polju – lokaciji 2, smo ugotovili, da imata sorti Lorelei in Quendlingburg višjo vsebnost učinkovine kot sorta Erfurter. Najvišja povprečna vsebnost rožmarinske kisline je bila izmerjena pri sorti Lorelei. V posušenem rastlinskem materialu smo izmerili 3,66 % rožmarinske kisline. Pri sorti Lorelei smo izmerili tudi maksimalno vsebnost, ki je bila 3,97 %. Sorta Erfurter je imela najnižjo povprečno vsebnost in pri njej je prav tako bila izmerjena minimalna vsebnost rožmarinske kisline.

4.2 Vpliv starosti poganjkov na vsebnost rožmarinske kisline

Vpliv starosti poganjkov na vsebnost rožmarinske kisline smo proučevali v sortah melise, gojenih na kolekcijem polju – lokaciji 2. Vsebnost rožmarinske kisline smo določali v posušenem rastlinskem materialu. Pri primerjavi vsebnosti rožmarinske kisline v pridelku dveh žetev proučevanih sort melise smo ugotovili, da obstajajo razlike (Preglednica 4).

Preglednica 4: Primerjava povprečnih vsebnosti rožmarinske kisline v pridelku melise sorte Lorelei glede na termin žetve

Sorta	Žetev	Število rastnih dni	RK (%) ¹
Lorelei	1. košnja (5. avgust)	81	1,26
	2. košnja (15. september)	41	3,66
Erfurter	1. košnja (5. avgust)	81	1,10
	2. košnja (15. september)	41	2,82
Quendlingburg	1. košnja (5. avgust)	81	1,70
	2. košnja (15. september)	41	3,50

¹RK (%) – vsebnost rožmarinske kisline v rastlinskem materialu

Pri sorti Lorelei smo z izračunom povprečij ugotovili, da je vsebnost rožmarinske kisline v pridelku druge košnje višja, v primerjavi s vsebnostjo, ki smo jo izmerili v pridelku prve košnje. V pridelku druge košnje, kjer so bili poganjki stari 41 dni smo izmerili v povprečju 3,66 % rožmarinske kisline, kar je bilo za 190 % več učinkovine, v primerjavi s pridelkom prve košnje, kjer so bili poganjki stari 81 dni.

Po analizi smo pri sorti Erfurter ugotovili, da je vsebnost rožmarinske kisline v pridelku druge košnje, kjer so bili poganjki stari 41 dni, višja v primerjavi s pridelkom prve košnje, ki je potekala 81 dni po saditvi. Pri pridelku druge košnje smo izmerili v požetih poganjkih povprečno vsebnost 2,82 % rožmarinske kisline, kar je v primerjavi s poganjki prve košnje, kjer je bila vsebnost rožmarinske kisline 1,10 %, za 156 % več.

Prav tako je analiza rezultatov pri sorti Quendlingburg pokazala, da je vsebnost rožmarinske kisline pri poganjkih starih 41 dni višja, kot smo jo izmerili pri poganjkih starih 81 dni. V pridelku druge košnje smo izmerili 3,5 % rožmarinske kisline, kar je za 106 % več v primerjavi z drugo košnjo, kjer je bila vsebnost 1,7 %, več.

4.3 Vpliv metode ekstrakcije na količino RK

Proučevali smo dve metodi ekstrakcije rožmarinske kisline: etanolno in vodno. Vsebnost rožmarinske kisline smo določali v suhem ekstraktu. Po analizi rezultatov je bilo ugotovljeno, da med metodama obstaja razlika (Preglednica 5).

Pri postopku kjer smo kot topilo uporabljali etanol, je prišlo do višje vsebnosti rožmarinske kisline v ekstraktu. Izkoristek ekstrakcije nam pove, koliko suhega ekstrakta smo pridobili glede na začetno količino uporabljenega materiala. Kjer smo kot topilo uporabili vodo, je izkoristek ekstrakcije znašal 28,15 %, kjer pa smo uporabili etanol pa 26,95 %. Izkoristek rožmarinske kisline pa je količina pridobljene učinkovine iz kg droge glede na izkoristek ekstrakcije in začetno vsebnost rožmarinske kisline v drogi. Z analizo je bilo ugotovljeno, da je izkoristek rožmarinske kisline v primeru, če za topilo uporabimo etanol 65,83 %, za vodo pa znaša le 4,48 %.

Preglednica 5: Povprečna vsebnost rožmarinske kisline v suhem ekstraktu, izkoristek ekstrakcije in rožmarinske kisline glede na metodo ter finančno ovrednotenje postopka

Metoda ekstrakcije	RK¹ (%)	Izkoristek ekstrakcije (%)	Izkoristek (%)²	RK	Ekonomičnost postopka na % RK (EUR)³
Etanol	8,95	26,95	65,83		1,9
Voda	0,57	28,15	4,48		21,8

¹RK (%) - vsebnost rožmarinske kisline v rastlinskem materialu

²Izkoristek RK (%) – izkoristek rožmarinske kisline iz droge

³Ekonomičnost postopka na % RK (EUR) – strošek postopka za pridobitev enega % rožmarinske kisline v evrih

Pri finančnem ovrednotenju postopka smo za vrednost rožmarinske kisline povzeli ceno, ki jo navaja vodilno podjetje na področju proizvodnje in prodaje zelišč MB-Holding GmbH & Co. KG (Nemčija). Cena za kilogram suhe droge znaša 3,5 EUR. Vrednost etanola, ki ga uporabimo kot topilo znaša 0,64 EUR/liter (Vitiva d.d., 2013). Strošek vode, ki jo potrebujemo pri postopku smo zanemarili. Po izračunu je razvidno, da obstaja velika razlika v strošku za pridobitev % rožmarinske kisline v ekstraktu, glede na postopek ekstrakcije. Če v postopku kot topilo uporabljamo etanol, znaša strošek za pridobitev 1 % rožmarinske kisline 1,9 EUR. Če uporabimo za topilo vodo, pa je strošek bistveno višji in znaša 21,8 EUR. Do tako velike razlike pride zaradi zelo nizke vsebnosti rožmarinske kisline v suhem ekstraktu, v primeru ko za topilo uporabimo vodo.

5 RAZPRAVA

Zelišča postajajo pomemben vir za pridobivanje aditivov naravnega izvora, ki so zaradi škodljivosti nekaterih sintetičnih aditivov zelo iskani na tržišču. Droga melise vsebuje veliko rožmarinske kisline, ki se uporablja v farmaciji, živilski industriji, kozmetiki, kot dodatek živalski krmi idr.

Pridelovanje zelišč v Sloveniji ni razširjeno, čeprav za to obstajajo ugodni pogoji. Še posebej to velja za meliso, ki jo lahko uspešno gojimo v severovzhodni Sloveniji. Poleg tega v tem delu Slovenije deluje podjetje, ki se ukvarja s pridelovanjem naravnih aditivov rastlinskega izvora. Imajo veliko povpraševanje po rožmarinski kislini. Pridelovanje v neposredni bližini predelovalnega obrata bi kmetovalcem omogočalo konkurenčno prednost v smislu nižje prodajne cene droge, in sicer zaradi bližine in nizkih transportnih stroškov.

Podatki o vsebnosti rožmarinske kisline v drogi melise so zelo pomembni za pridelovalce zelišč in proizvajalce ekstraktov. Izbira primerne sorte in določitev primerne časa žetve mora temeljiti na vsebnosti učinkovine, ki jo želimo pridelati, saj je od tega odvisna odkupna cena za kg droge in ekonomičnost proizvodnje ekstrakta.

Na učinkovitost ekstrakcije naravnih ekstraktov vpliva tudi vrsta in polarnost topila, ki ga uporabljamo v postopku. Ekstrakcija naj bi bila ključni korak pri pridobivanju naravnih ekstraktov s sprejemljivim donosom. Za vsako učinkovino, ki jo želimo ekstrahirati, je potrebno posebej izbrati najprimernejše topilo.

Cilji naše raziskave so bili: (1) ugotoviti, kakšna je vsebnost rožmarinske kisline v sortah, ki so v preizkušanju glede primernosti za gojenje na prostem na dveh lokacijah; (2) kako se vsebnost rožmarinske kisline spreminja glede na starost poganjkov in (3) kateri postopek ekstrakcije je primernejši za pridobivanje rožmarinske kisline.

Za doseg prvega cilja smo analizirali na dveh lokacijah tri sorte melise: Lorelei, Erfurter in Quedlinburger. Na obeh lokacijah je sorta Lorelei imela višjo vsebnost rožmarinske kisline v primerjavi z ostalima sortama. Za to, da je sorta Lorelei imela najvišjo vsebnost rožmarinske kisline na obeh lokacijah, je pomembno, kot navaja Kure (2006), da na vsebnost učinkovine poleg sorte vpliva tudi rastišče (rodovitnost tal idr.), podnebne razmere (temperatura, svetloba

idr.), agrotehnični dejavniki (gnojenje, namakanje idr.). Sorta Erfurter se je izkazala kot neprimerna zaradi nizke vsebnosti rožmarinske kisline in tudi zaradi polegla rasti, ki otežuje košnjo.

Za dosego drugega cilja smo analizirali vsebnost rožmarinske kisline v pridelku dveh košenj pri sortah Lorelei, Erfurter in Quedlinburger, ki se gojijo na kolekcijskem polju – lokacija 2. Prva košnja je bila opravljena 81 dni po sajenju, druga pa 41 dni po prvi košnji. Ugotovili smo, da je vsebnost učinkovine višja pri drugi košnji pri vseh sortah. Velik vpliv na vsebnost rožmarinske kisline v drogi ima pogostost košnje. Kot navaja Wagner (1997), pogosta košnja da manj stebel in več listja, ki pa v primerjavi s stebli vsebujejo veliko več učinkovin kot stebela.

Naredili smo primerjavo med ekstrahiranjama, kjer smo uporabili dve topili: etanol in vodo. V postopku ekstrakcije rožmarinske kisline, kjer smo uporabili etanol, smo dobili signifikantno večjo vsebnost rožmarinske kisline, kar potrjuje ugotovitve predhodnih raziskav, da na učinkovitost ekstrakcije v veliki meri vpliva izbira topila, ki ga uporabimo v postopku ekstrakcije (Gupta, 2012). Za pridobivanje rožmarinske kisline iz melise je etanol primernejše topilo kot voda. Prav tako je postopek, kjer uporabimo etanol, finančno rentabilnejši.

6 ZAKLJUČEK

V okviru raziskovalne naloge smo si postavili tri hipoteze. Na osnovi analize rezultatov lahko pridemo do naslednjih zaključkov.

- Genska zasnova rastline ima pomembno vlogo pri sestavi in količini posameznih učinkovin v ekstraktu, zato lahko prvo hipotezo potrdimo in trdimo, da sorta melise vpliva na vsebnost rožmarinske kisline v pridelani drogi ne glede na vplive okolja. Glede na rezultate priporočamo za gojenje sorto Lorelei.
- Vsebnost rožmarinske kisline v poganjkih melise se spreminja, zato lahko tudi drugo hipotezo, da pri določeni starosti (dozorelosti) poganjkov začne vsebnost rožmarinske kisline upadati, potrdimo. Pridelovalci naj kosijo meliso večkrat v letu. Za določitev optimalnih terminov košnje bi bilo treba narediti dodatne analize. Spremljati bi morali vsebnost rožmarinske kisline v času rasti rastlin. Ko bi začela vsebnost v listih padati, bi določili okvirni termin košnje glede na morfološke znake rastlin (število razvitih listov, olesenost poganjkov, višina poganjkov idr.).
- Učinkovitost ekstrakcije rožmarinske kisline je odvisna od topila, ki ga uporabimo v postopku ekstrakcije, zato lahko potrdimo trejo hipotezo in trdimo, da je količina ekstrahirane rožmarinske kisline odvisna od postopka ekstrakcije.

8 VIRI IN LITERATURA

- Copsey K., Lerner R. B., Growing Herbs, Purdue University Cooperative Extension Service, Department of Horticulture, West Lafayette. <http://www.hort.purdue.edu/ext/HO-28.pdf> (januar 2014)
- E-dodatki v prehrani. Zbornik. 2007. Živilska šola Maribor: str. 7 Cit po: Mastnak K., Novačan S. 2008. Aditivi v živilih. Raziskovalna naloga. Osnovna šola Vojnik.
- Ferant N. 2008. Ali je sedaj pravi trenutek za razmah pridelave zdravilnih rastlin v Sloveniji?/ Is now the right moment for expansion of a cultivation of medicinal plants in Slovenia? Hmeljarski bilten, 15: 101-104
- Grunwald J., Janicke C. 2004. Grune apotheke. Grfe und Unzer Verlag GmbH, Munchen
- Grušovnik M. 2012. Vpliv procesnih pogojev na ekstrakcijo polifenolov iz listov olke (*Olea Europaea L.*) s subkritično vodo. Diplomsko delo. Maribor, Fakulteta za kemijo in kmetijsko tehnologijo, str: 4-8.
- Gupta A., Naraniwal M., Kothari V. 2012. Modern Extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. International Journal of Applied and Natural Sciences (IJANS): vol. 1, iss. 1
- Hlastan Ribič C., Adlešič B., Agovič A., Belščak A., Brandner T., Carli K., Golobič J., Muha J., Nahtigal M., Natek N., Plavec G., 2008/2009. Aditivi v živilih. Seminarska naloga. Univerza v Ljubljani. Medicinska fakulteta. Katedra za javno zdravje
- Koksal E., Bursal E., Dikici E., Tozoglu F., Gulcin I. 2011. Antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves. Journal of Medicinal Plants Research: vol. 5(2). p. 217-222
- Kitzler M. 2008. Effects of harvesting and post harvest treatments on yield and quality of essential oils of *Melissa officinalis* and *Solidago puberula*. Diplomarbeit. Der Universität Wien. Fakultät für Lebenswissenschaften.
- Kure S. 2006. Fenolne spojine in fluidnost celičnih membran. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: str. 23, 24.
- Marongiu B., Porcedda S., Piras A., Rosa A., Deiana M., Dessi M. A. 2004. Antioxidant Activity of Supercritical Extract of *Melissa officinalis* Subsp. *officinalis* and *Melissa officinalis* Subsp. *indora*. Phytotherapy research. Wiley Interscience: Res. 18. p. 789-792
- Martinčič A., Wraber, T., Jogan, J., Podobnik, A., Turk B., Vreš B., Ravnik V., Frajman, B. in sod. 2010. Mala flora Slovenije: ključ za določanje praprotnic in semenk. 4., dopolnjena in spremenjena izd., Ljubljana: Tehniška založba Slovenije.

- McCann D., Barrett A., Cooper A., Crumpler D., Dalen L., Grimshaw K., Kitchin E., Lok K., Porteous L., Prince E., Sonuga-Barke E., Warner, J.O., Stevenson J. 2007. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet* 370(9598): 1560-1567
- Murn M, Kovač M., Malovrh Š., Ložar K., Žemva M. 2012. Aditivi in njihova uporaba v mesnih izdelkih. Spreminjanje proizvodnosti prašičev. *Zv. 8. str. 71-82*
- Norman J. 2002. *Herbs & Spices: The Cook's Reference*. Dorling Kondersley Publishing.
- Republika Slovenija: Ministrstvo za kmetijstvo in okolje. *Sadje in zelenjava*. 2011
http://www.mko.gov.si/si/delovna_podrocja/kmetijstvo/kmetijski_trgi/sadje_in_zelenjava/
 (januar 2014)
- Repnik A. 2012. Tekočinska kromatografija z masno detekcijo za določanje glukozinolatov. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. Univerza v Mariboru.
- Rižner Hraš A. 2000. Izolacija aktivnih učinkovin rožmarina. Doktorska disertacija. Univerza v Mariboru. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor
- Sova M. 2012. Rožmarinska kislina/Rosmarinic acid. Pregledni znanstveni članki. *Farm vestn*, 63: 312-315
- Škerget M., Perko T. 2012. Živilska tehnologija, Navodila za vaje, Fakulteta za kemijo in kmetijsko tehnologijo, Maribor.
- Toth J., Mrljanova M., Tekelova D., Korenova M. 2003. Rosmarinic acid – an important phenolic active compound of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Acta facultatis pharmaceuticae universitatis comenianaе. Tomus L. Bratislava*
- Tumpa S. 2013. Protimikrobni učinek rastlinskih etanolnih in vodnih ekstraktov na *Escherichia coli* in *Candida albicans*. Raziskovalna naloga. *Mladi za napredek Maribora 2013*.
- Tuormaa T.E. 1994. The Adverse Effects of Food Additives on Health: A Review of the Literature with Special Emphasis on Childhood Hyperactivity. *Journal of Orthomolecular Medicine* 9(4): 225-243
- ULRS 2010. Pravilnik o aditivih za živila. Ur.l. RS št. 100-2010 (14.08.2012): 15516 - 15612. <http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=2010100&stevilka=5134>
- Vitiva d.d..2013. Nova vas pri Markovcih 98. 2281 Markovci. Metode določanja vsebnosti rožmarinske kisline in metode ekstrakcije učinkovine iz droge. dr. Andreja Rižner Hraš
- Wagner T., 1997. Pridelovanje zelišč. Maribor: Fakulteta za kmetijstvo: str. 168-170

Wroblewska B. 2009, Influence of food additives and contaminants (nickel and chromium) on hypersensitivity and other adverse health reactions. Polish journal of food and nutrition sciences: vol. 59. no. 4. p. 287-294.