

Određivanje artemisinina i profila isparljivih spojeva u ekstraktima slatkog pelina (*Artemisia annua* L.)

Medved, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:683113>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-07**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Marija Medved

**ODREĐIVANJE ARTEMISININA I PROFILA ISPARLJIVIH SPOJEVA U
EKSTRAKTIMA SLATKOG PELINA (*Artemisia annua* L.)**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2022.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za tehnološko projektiranje i farmaceutsko inženjerstvo
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija**Nastavni predmet:** Tehnološko projektiranje**Tema rada** je prihvaćena na IV. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2021./2022. održanoj 23-25. ožujka elektroničkim putem.**Mentor:** doc. dr. sc. *Krunoslav Aladić***Komentor:** prof. dr. sc. *Stela Jokić***Pomoć pri izradi:** dr. sc. *Marija Banožić***Određivanje artemisinina i profila isparljivih spojeva u ekstraktima slatkog pelina (*Artemisia annua* L.)***Marija Medved, 0113141884***Sažetak:**

Slatki pelin je biljka bogata bioaktivnim spojevima koji posjeduju jedinstvena farmakološka svojstva. Najpoznatiji spoj je artemisinin. Cilj ovog istraživanja bio je usporediti različite tehnike ekstrakcije: ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom (UAE), ekstrakciju sa superkritičnim CO₂ (SC-CO₂) te konvencionalne tehnike ekstrakcije (maceracija i infuzija) za dobivanje ekstrakata bogatih artemisininom. Kod UAE se ispitaio utjecaj vremena ekstrakcije (15-45 minuta) i otapala (70 %-tna vodena otopina etanola te čista voda) dok je ekstrakcija sa SC-CO₂ provedena pri tlaku od 300 bara, temperaturi od 40 °C, protoku CO₂ od 1,4 kg/h u trajanju od 15 minuta. Identifikacija i kvantifikacija artemisinina u ekstraktima slatkog pelina provedena je primjenom visokotlačne tekućinske kromatografije (HPLC). Sadržaj ukupnih fenola i antiradikalna aktivnost su određeni spektrofotometrijskim metodama. Budući da su ekstrakti dobiveni nepolarnim otapalom kao što je SC-CO₂, bogati isparljivim spojevima, utvrđen je i njihov profil primjenom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (GC-MS). Iz dobivenih ekstrakata u najvećoj količini su identificirani arteanuin b (15,29 %), kamfor (12,23 %), artemizija keton (10,97 %), 1,8-cineol (5,37 %) te artemisinska kiselina (4,95 %). Najviše artemisinina pronađeno je u ekstraktima dobivenim SC-CO₂ metodom, odnosno 1,39 %.

Ključne riječi: slatki pelin, *Artemisia annua*, artemisinin, ekstrakcija**Rad sadrži:** 36 stranica
9 slika
3 tablica
34 literaturnih referenci**Jezik izvornika:** Hrvatski**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

- | | |
|---|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Darko Velić</i> | predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. <i>Krunoslav Aladić</i> | član-mentor |
| 3. prof. dr. sc. <i>Stela Jokić</i> | član-komentor |
| 4. izv. prof. dr. sc. Maja Molnar | zamjena člana |

Datum obrane: 12.09.2022.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek

Faculty of Food Technology Osijek

Department of process engineering

Subdepartment of process design and pharmaceutical engineering

Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Food engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Technological design

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IV. 2021./2022. held on 23-25, March, 2022.

Mentor: *Krunoslav Aladić*, PhD, assistant prof.

Co-mentor: *Stela Jokić*, PhD, full prof.

Technical assistance: *Marija Banožić*, PhD

Determination of Artemisinin and Volatile Organic Compounds Profile in Extracts of Sweet Wormwood (*Artemisia annua* L.)

Marija Medved, 0113141884

Summary:

Sweet wormwood is a plant rich in bioactive compounds that possess an unique pharmacological properties. The widely known compound is artemisinin. The aim of this research was to compare different extraction techniques: ultrasound-assisted extraction (UAE), supercritical CO₂ extraction (SC-CO₂) and conventional extraction techniques (maceration and infusion) to obtain extracts rich in artemisinin. In UAE, the influence of extraction time (15-45 minutes) and solvent type (70% aqueous ethanol solution and pure water) was examined, while extraction with SC-CO₂ was carried out at a pressure of 300 bar, a temperature of 40 °C, a CO₂ flow of 1.4 kg/h for 15 minutes. Identification and quantification of artemisinin in extracts of sweet wormwood was performed using high-pressure liquid chromatography (HPLC). The content of total phenols and antiradical activity were also determined by spectrophotometric methods. Since the extracts obtained with non-polar solvent, such as SC-CO₂, are rich in volatile compounds, the profile of volatile compounds was determined using gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS). Arteannuin b (15,29 %), camphor (12,23 %), artemisia ketone (10,97%), 1,8-cineole (5,37 %) and artemisinic acid (4,95 %) were identified in the highest amount from the obtained extracts. The most artemisinin was found in the extracts obtained by SC-CO₂ method, i.e. 1,39 %.

Key words: sweet wormwood, *Artemisia annua*, artemisinin, extraction

Thesis contains: 36 pages
9 figures
3 tables
34 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. <i>Darko Velić</i> , PhD, Full prof. | chair person |
| 2. <i>Krunoslav Aladić</i> , PhD, assistant prof. | mentor |
| 3. <i>Stela Jokić</i> , PhD, Full prof. | co-mentor |
| 4. <i>Maja Molnar</i> , PhD, associate prof. | stand-in |

Defense date: 09. 12. 2022.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

Zahvaljujem se svom mentoru doc. dr. sc. Krunoslavu Aladiću i komentorici prof. dr. sc. Steli Jokić na ljubaznosti, pomoći i stručnim savjetima tijekom pisanja diplomskog rada. Također, veliko hvala dr. sc. Mariji Banožić na neizmjernom strpljenju, dijeljenju znanja te pomoći tijekom svih ovih mjeseci.

Veliko hvala mojim roditeljima i bratu koji su me podupirali na ovom putu. Hvala vam što ste vjerovali u mene, što ste mi bili podrška u svim trenutcima, dobrim i lošim. Bez vas ništa, volim vas!

Zahvaljujem se mom dečku Denisu koji je uvijek bio uz mene, od prvog do posljednjeg dana studiranja, bespogovorno slušajući sve „probleme“ jednog prosječnog studenta. Hvala ti na strpljenju, ljubavi i podršci koju mi oduvijek pružaš.

Hvala svim kolegama koji su ovo studentsko razdoblje učinili nezaboravnim, sigurna sam da ću cijeli život pamtiti sve one izlaske do jutra i kave u Merlonu.

Hvala mojim prijateljicama koje su sa mnom proživjele sve dobre i one malo manje dobre studentske dane. Hvala vam što ste ostale uz mene unatoč svim preprekama, vremenu i kilometrima koji su nas dijelili. Hvala što ste doprinijele da ovo studentsko razdoblje bude jedno od najljepših u mom životu.

Posebno hvala Ani koja mi je bila najveća pomoć oko tehničkih stvari koje su me mučile tijekom pisanja ovog rada.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. SLATKI PELIN (<i>ARTEMISIA ANNUA</i> L.)	4
2.2. ARTEMISININ	7
2.3. AKTIVNI SASTOJCI SLATKOG PELINA	10
2.3.1. Terpeni i terpenoidi	10
2.3.2. Flavonoidi	11
2.3.3. Fenoli	11
2.3.4. Kumarini	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. ZADATAK	14
3.2. MATERIJAL	14
3.3. METODE	16
3.3.1. Konvencionalne tehnike ekstrakcije: maceracija i infuzija	16
3.3.2. Ekstrakcija superkričnim CO ₂ (SC-CO ₂)	16
3.3.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	17
3.3.4. Određivanje profila isparljivih spojeva u CO ₂ ekstraktima primjenom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (GC-MS)	18
3.3.5. Identifikacija i kvantifikacija artemisinina primjenom visokotlačne tekućinske kromatografije (HPLC-DAD).....	20
3.3.6. Određivanje antiradikalne aktivnosti	21
3.3.7. Određivanje ukupnih fenola	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
5. ZAKLJUČCI	31
6. LITERATURA	33

Popis oznaka, kratica i simbola

DDT	Diklordifeniltrikloretan
HIV	Virus humane imunodeficijencije
HPV	Humani papiloma virus
GC-MS	Plinska kromatografija s masenom spektrometrijom
UAE	Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom
SC-CO ₂	Ekstrakcija sa superkričnim CO ₂
HPLC	Visokotlačna tekućinska kromatografija
DPPH	1,1-difenil-pikrilhidrazil
PTFE	Politetrafluoretilen
GAE	Ekvivalent galne kiseline
UPEC	Uropatogena <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoksigena <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropatogena <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvazivna <i>Escherichia coli</i>
STEC	Shiga-toksin producirajuća <i>Escherichia coli</i>
UV	Ultraljubičasto zračenje
SARS-CoV-2	Teški akutni respiratorni sindrom koronavirus 2

1. UVOD

Slatki pelin (*Artemisia annua* L.) je biljka koja se koristi u tradicionalnoj kineskoj medicini, a detaljno je istražena tijekom potrage za novim lijekovima protiv malarije (Chen Liu i sur., 1992). To je jednogodišnja biljka vrlo rasprostranjena u Aziji, ali je tijekom godina naturalizirana i u druge dijelove svijeta (Ćavar i sur., 2012).

Slatki pelin je najpoznatiji zbog seskviterpenskog laktona, artemisininina. Artemisinin je prvi put ekstrahiran 1970-ih godina (Schafer, 2014) te predstavlja dobro poznati prirodni lijek protiv malarije. Artemisinin se u biljci slatkog pelina može naći u udjelima od 0,01 do 1,4 % ovisno o biljnom organu (list, cvijet i pupoljci) (Nahar i sur., 2020). Osim antimalaričnog djelovanja, važno je naglasiti i protuupalne, antikarcinogene, antioksidativne te antimikrobne učinke artemisininina (Kim i sur., 2015). Osim artemisininina, slatki pelin je bogat raznim drugim spojevima, od kojih su najistaknutiji terpeni, flavonoidi, fenoli te kumarini.

U ovom radu, cilj je bio različitim metodama ekstrakcije odrediti artemisinin i potencijalne hlapljive spojeve koji se nalaze u slatkom pelinu. Ekstrakcije su provedene konvencionalnim (maceracija i infuzija) i suvremenim (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom i ekstrakcija sa superkritičnim CO₂) tehnikama. Nakon provedenih metoda ekstrakcije, provedena je identifikacija i kvantifikacija artemisininina u ekstraktima primjenom HPLC metode te određivanje profila isparljivih spojeva u CO₂ ekstraktima primjenom GC-MS metode. Na kraju su, pomoću spektrofotometrijskih metoda, određeni ukupni fenoli i antiradikalna aktivnost u dobivenim ekstraktima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. SLATKI PELIN (*ARTEMISIA ANNUA* L.)

Artemisia annua (Slika 1), biljka iz porodice *Asteraceae* je mirisna jednogodišnja biljka podrijetlom iz Kine te prirodno raste kao dio stepске vegetacije u sjevernim dijelovima provincije Chatar i Suiyan u Kini na 1000-1500 m nadmorske visine (Bilia i sur., 2014). Rod *Artemisia* se vrlo lako aklimatizira na bilo koji okoliš, od razine mora do velikih nadmorskih visina. Međutim, većina vrsta roda *Artemisia* raste na sjevernoj hemisferi i na nižim nadmorskim visinama na južnoj hemisferi (Septembre-Malaterre i sur., 2020). Ova biljka može narasti do 2,4 m i ima listove tamnozelenе ili smeđe-zelene boje. Miris slatkog pelina je karakterističan i aromatičan, a okus gorak. Karakteriziraju ga velike metlice malih, kuglastih, glavica (promjera 2-3 mm) s bjelkastim omotačima i listovima koji nestaju nakon razdoblja cvatnje (Bilia i sur., 2014).



Slika 1 Slatki pelin (izvor: Aromatica.ba)

Ova biljka je tijekom godina naturalizirana ili se uzgaja kao hortikultura ili ljekovita biljka u mnogim dijelovima svijeta. Tako se, osim u Aziji, može pronaći i u Africi, Europi, Americi i Australiji (Bilia i sur., 2008). Kako navodi Hulina (1997) u svom istraživanju, populacija *Artemisia annua* zabilježena je i u Hrvatskoj, a pronađena je uz nasip rijeke Drave u Donjem

Miholjcu. Također, ova biljka pronađena je i u susjednim državama Bosni i Hercegovini (Ćavar i sur., 2012) i Srbiji (Aćimović i sur., 2022).

Slatki pelin se koristi kao tradicionalna ljekovita biljka u Kineskoj medicini, a službeno se, na kineskom jeziku, naziva Qinghao, što znači zelena biljka. To je naziv koji se koristi za nadzemne dijelove ove biljke (Brown, 2010). Drugi nazivi su pelin, kineski pelin te jednogodišnji pelin. U SAD-u je ova biljka poznata kao slatka Annie jer se, nakon predstavljanja u devetnaestom stoljeću, koristila kao konzervans i aroma, a eterično ulje dobiveno iz cvjetnih vrhova koristilo se za aromatiziranje vermuta¹ (Bilia i sur., 2014). Podrijetlo znanstvenog imena roda *Artemisia* proizlazi iz dva glavna tumačenja. Prvi prijedlog odnosi se na ime „Artemisia“, prema grčkoj božici „Artemis“, Zeusovoj kćeri i Apolonovoj sestri, koja se smatrala zaštitnicom divljih životinja i božicom lova. Drugo tumačenje podrijetlo imena pripisuje sestri i supruzi kralja Mauzola, Artemiziji, koja je okrunjena za kraljicu nakon muževljeve smrti (Septembre-Malaterre i sur., 2020).

U svijetu se sve više preispituje tradicionalno ljekovito bilje, provode se opsežna istraživanja različitih biljnih vrsta i njihovih ljekovitih svojstava. Tradicionalne ljekovite biljke istaknute su kao alternativni lijekovi za koje je manje vjerojatno da će uzrokovati nuspojave, za razliku od sintetski proizvedenih kemijskih tvari (Kim i sur., 2015). Ono što karakterizira slatki pelin je proizvodnja seskviterpenskog laktona artemisinina. Artemisinin se koristi kao lijek protiv malarije, no učinkovit je i u liječenju drugih parazitskih bolesti, nekih virusnih infekcija (Weathers i sur., 2011), ima protuupalno, antikarcinogeno, antifungalno te antimikrobno djelovanje. Osim artemisinina, slatki pelin sadrži i mnoge druge bioaktivne komponente poput monoterpenoida, flavonoida, alkaloida, kumarina i dr. Zahvaljujući svom kemijskom sastavu, *Artemisia annua* je predmet opsežnih istraživanja od svoga otkrića, a ponovno je postao popularan tijekom pandemije COVID-19 jer navodno prevenira i pomaže u liječenju

¹ Vino aromatizirano raznim biljkama i začinima.

simptoma ove bolesti. Država Madagaskar preporučuje piće na bazi čaja slatkog pelina u mješavini s drugim biljkama u borbi protiv koronavirusa, no do danas nije dobila nikakvo odobrenje za stavljanje ovog pića u promet (Septembre-Malaterre i sur., 2020).

Slatki pelin najpoznatiji je po svom antimalarijskom djelovanju, a glavni sastojak u borbi protiv malarije je artemisinin (Chen Liu i sur., 1992). Oboljeli od malarije u srednjoj Africi liječeni čajem slatkog pelina, u dozi koja odgovara preporukama Kineske farmakopeje, pokazali su vrlo brz nestanak parazita *Plasmodium* u krvi. Pet pacijenata s malarijom liječenih ovim čajem pokazalo je brz nestanak parazitemije za dva do četiri dana. Dodatno ispitivanje s 48 pacijenata s malarijom pokazalo je nestanak parazitemije u 44 bolesnika (92 %) u četiri dana. Oba su ispitivanja pokazala jasno poboljšanje simptoma (Septembre-Malaterre i sur., 2020).

Hidrodestilacijom lišća i cvata slatkog pelina dobiva se eterično ulje. Ono bi moglo predstavljati još jedan potencijalno vrijedan proizvod (Bilia i sur., 2008). Ovo eterično ulje predmet je brojnih istraživanja koja za cilj imaju ispitati njegovo antibakterijsko i antifungalno djelovanje. U eteričnom ulju do danas je identificirano na stotine komponenti (Ćavar i sur., 2012), uglavnom monoterpena i seskviterpena, a razlike u sastavu najviše se pokazuju u tri glavne karakteristične komponente. To su artemizija keton 1,8-cineol i kamfor te se njihova zastupljenost razlikuje ovisno o geografskom podrijetlu, sezoni berbe, gnojivu, pH tla, metodi ekstrakcije i slično. Osim različitih kemijskih profila, eterično ulje slatkog pelina pokazalo je jaka antifungalna te antimikrobna svojstva prema brojnim bakterijskim sojevima, gram-pozitivnim i gram-negativnim (Bilia i sur., 2014). Svi mikroorganizmi na kojima se provodilo testiranje bili su inhibirani ovim eteričnim uljem. Gram-pozitivne bakterije koje eterično ulje *Artemisia annua* dokazano inhibira su: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumonia*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* i dr. Neke od gram-negativnih bakterija na koje ovo eterično ulje ima inhibitorno djelovanje su: *Escherichia coli* (uključujući uropatogenu *Escherichiu coli* – UPEC, enterotoksigenu *Escherichiu coli* – ETEC, enteropatogenu *Escherichiu coli* – EPEC, enteroinvazivnu *Escherichiu coli* – EIEC i Shiga-toksin producirajuću *Escherichiu coli* – STEC), *Shigella sp.*, *Salmonella enteridis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* i mnoge druge (Septembre-Malaterre i sur., 2020). Također, dokazano djeluje i na druge mikroorganizme poput *Candida*, *Saccharomyces* i *Aspergillus* spp. vrsta (Bilia i sur., 2014).

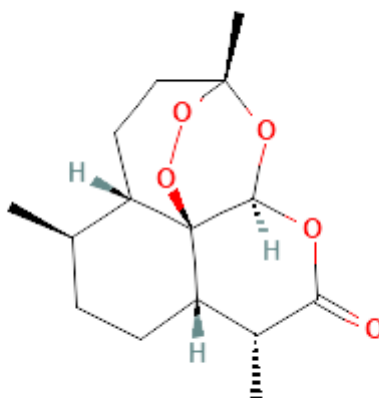
Isto tako, postoje dokazi o antivirusnom djelovanju ekstrakta slatkog pelina kao i artemisinina i njegovih derivata. *In vitro* istraživanja su pokazala da čaj slatkog pelina djeluje protiv HIV virusa (Septembre-Malaterre i sur., 2020).

Daljnja istraživanja provedena na glavnim komponentama prisutnim u eteričnom ulju *Artemisia annua* pokazuju da je artemizija keton komponenta ulja koja ima najveću antimikrobnu aktivnost. Zapravo, uvijek se pokaže učinkovitim protiv bakterija i nekih gljivica (*C. albicans* i *A. fumigatus*) u vrlo niskim koncentracijama (0,07-10 mg/mL). Ostali spojevi ispitani u studijama dali su različite rezultate (Bilia i sur., 2014).

Svi benefiti ove biljke dokazani provedbom prethodno navedenih istraživanja potvrđuju potencijal *Artemisia annua* kao kandidata za prehrambenu, farmaceutsku i kozmetičku industriju.

2.2. ARTEMISININ

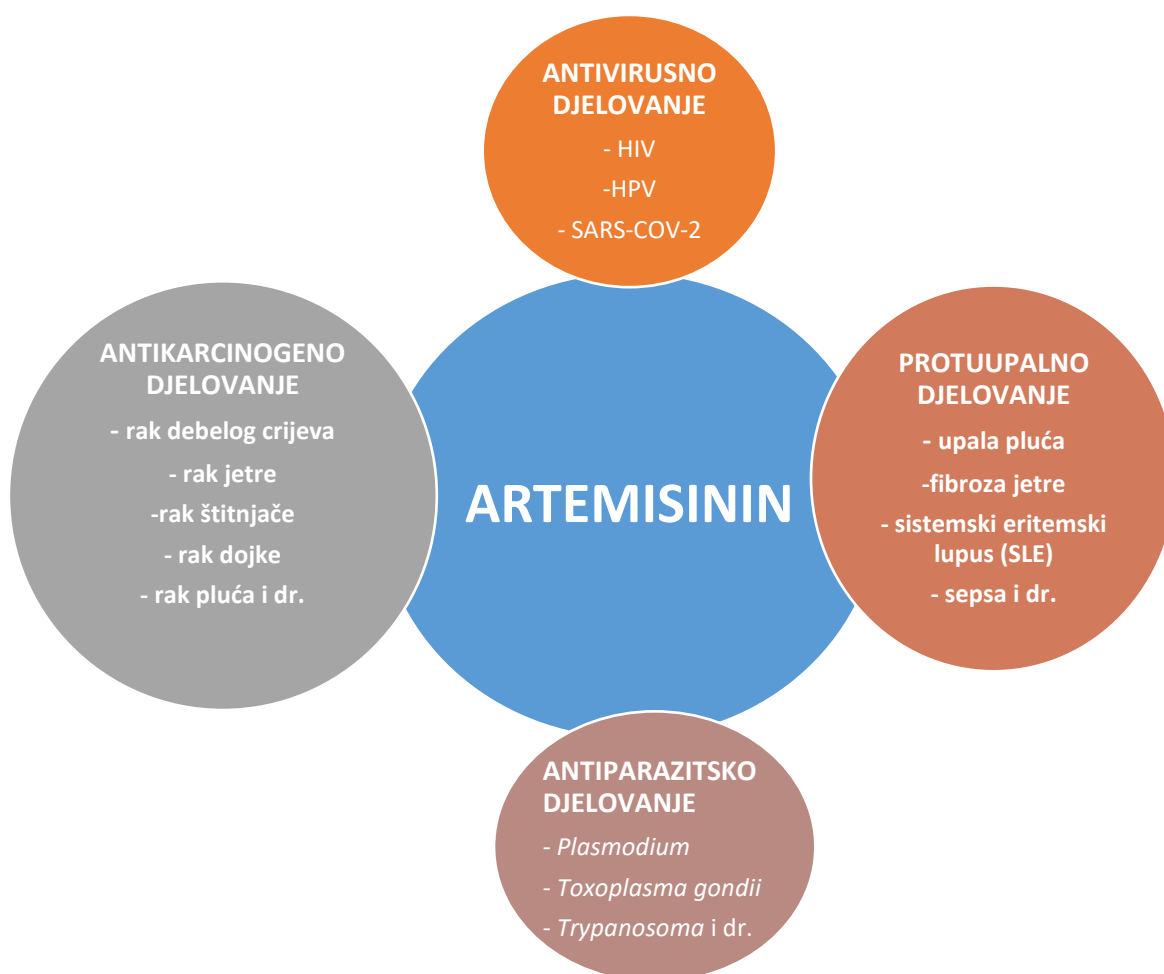
Artemisinin je seskviterpenski lakton izoliran iz slatkog pelina (**Slika 2**). Ima ulogu antimalarika i biljnog metabolita. Molekularna formula artemisinina je $C_{15}H_{22}O_5$ (PubChem, 2022). Ovaj spoj je visoko oksigenirani seskviterpen koji sadrži jedinstvenu prstenastu strukturu 1,2,4-trioksana, koja je odgovorna za njegovo antimalarično djelovanje (Brown, 2010.). Artemisinin je spoj bez boje i mirisa koji tvori kristale na temperaturi od 156-157°C (Aftab i sur., 2018)



Slika 2 Strukturna formula artemisinina (izvor: PubChem)

Artemisinin se može pronaći u mnogim dijelovima biljke *Artemisia annua* L. (Aftab i sur., 2018), a raspoređen je u rasponu od 0,01-1,4 % (Nahar i sur., 2020). Veće koncentracije ovog spoja mogu se pronaći u listovima koji su se formirali u kasnijim fazama razvoja biljke (Aftab i sur., 2018).

Artemisinin, osim antimalaričnog djelovanja, ima i brojna druga ljekovita svojstva (**Slika 3**). Tako su brojna istraživanja pokazala kako ovaj spoj ima antikarcinogena, protuupalna, antivirusna i druga svojstva.



Slika 3 Prikaz terapijskog djelovanja Artemisinina (Prilagođeno prema Meng i sur., 2021)

Malarija je zarazna bolest koja pogađa ljudska bića od davnina. Međutim, sredinom prošlog stoljeća mnogi su smatrali da se malarija povlači i da bi jednoga dana mogla biti pobijeđena. Smatralo se da su dva čimbenika primarno odgovorna za smanjenje ozbiljnosti ove bolesti. Prvo, komarac *Anopheles* koji prenosi bolest na ljude napokon se mogao kontrolirati širokom

primjenom insekticida diklordifeniltrikloretana (DDT). Drugo, parazit *Plasmodium* koji uzrokuje malariju (četiri člana ovog roda mogu zaraziti ljude: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* i *P. ovale*) također se mogao učinkovito kontrolirati upotrebom sintetskih analoga kinina (proizvod dobiven iz kore stabla kininovca), kao što je klorokin. No, kako su komarci polako razvijali otpornost na te spojeve, bolest se ubrzo ponovno raširila. Srećom, otkrićem artemisinina 1970-ih godina pokazalo se da on vrlo brzo može ubiti malaričnog parazita u fazi shizonta tj. u fazi kada parazit zarazi crvena krvna zrnca kod ljudi. Ovo otkriće privuklo je pozornost Svjetske zdravstvene organizacije te su slatki pelin i artemisinin vrlo brzo postali poznati i izvan Kine (Brown, 2010).

Antikarcinogena svojstva artemisinina otkrivena su 1993. godine nakon čega su opširno istražena. Pokazala su višestruke ključne aktivnosti u borbi protiv raka, uključujući poticanje staničnog odgovora na oksidativni stres, smanjenje proliferacije tumorskih stanica te sprječavanje angiogeneze tumora i stvaranja metastaza. Djeluju na različite vrste karcinoma, poput karcinoma pluća, debelog crijeva, dojke, jajnika, štitnjače, prostate i dr. Isto tako, utvrđeno je da artemisinini značajno poboljšavaju stopu uspjeha kemoterapije (Meng i sur., 2021).

Upala je složen biološki odgovor tkiva na različite štetne podražaje poput patogena ili iritansa. Jaka ili dugotrajna upala može dovesti do razaranja tkiva (Kim i sur., 2015). Artemisinin i njegovi derivati (dihidroartemisinin, artesunat i u vodi topljivi derivati artemisinina) poznati su po svom izvanrednom imunosupresivnom djelovanju na autoimune bolesti poput lupusa i reume. Također, nedavne studije su pokazale da artemisinini imaju korisnu ulogu kod akutnih ozljeda bubrega. Istraživanja su, isto tako, rasvijetlila protuupalni učinak artemisinina na druge upalne bolesti (Meng i sur., 2021).

Artemisinin posjeduje jako inhibitorno djelovanje protiv mnogih virusa. Djeluju protiv virusa hepatitisa B i C te inhibira virus gripe (Youyou, 2017). Također, vrlo je značajno njegovo djelovanje protiv denga groznice, herpes simpleks virusa (Aftab i sur., 2018), virusa humane imunodeficijencije (HIV) i humanog papiloma virusa (HPV) (Meng i sur., 2021).

Vrlo je važno spomenuti da artemisinin, osim što djeluje na parazite roda *Plasmodium*, djeluje i na mnoge druge parazitske vrste. Ranih 1980-ih otkriveno je da artemisinin ima antishistosomski učinak. Dakle, on može ubiti ličinke shistostoma, a ima i zaštitni učinak za ljude koji su bili u kontaktu s vodom kontaminiranom ovim parazitom. Ako se počne koristiti

u ranoj fazi razvoja parazita, može smanjiti stupanj infekcije te spriječiti pojavu shistosomijaze. Još jedan parazit čija se replikacija, rast i vezanje za stanice i tkiva čovjeka najvjerojatnije inhibira pomoću artemisininina je *Toxoplasma gondii*. Provedena su brojna istraživanja na ovu temu te svi rezultati upućuju na djelotvornost ovog spoja kod liječenja toksoplazmoze, no da bi mu se mogla pripisati potpuna ljekovitost potrebno je provesti dugotrajnija klinička ispitivanja i prikupiti više podataka (Youyou, 2017).

2.3. AKTIVNI SASTOJCI SLATKOG PELINA

Slatki pelin je biljka vrlo bogata aktivnim sastojcima od kojih su najvažniji sljedeći (Aftab i sur., 2018):

- Terpenoidi: seskviterpenoidi i monoterpenoidi,
- Flavonoidi,
- Fenoli,
- Kumarini.

2.3.1. Terpeni i terpenoidi

Terpeni su grupa spojeva opće formule $(C_5H_8)_n$, a izgrađeni su od 2-metilbutanske ili izoprenske jedinice. Terpenoidi su terpeni koji sadrže i kisik (alkoholi, ketoni, aldehidi). Oni su važna biološki aktivna komponenta prirodne medicine (Youyou, 2017), a možemo ih pronaći u različitim biljkama, gljivama, algama i spužvama. Značajnu farmaceutsku vrijednost stekli su još u prapovijesti zbog širokog spektra medicinske primjene (Jaeger i Cuny, 2016).

Terpenoidi se najčešće klasificiraju na monoterpenoide, seskviterpenoide, diterpenoide, itd. Gledajući kemijsku strukturu, sastoje se od pet ugljikovih izoprena ili njihovih polimera. Prema broju izoprenskih jedinica, mogu se podijeliti na monocikličke, bicikličke, tricikličke i druge (Youyou, 2017).

U slatkom pelinu najviše se može pronaći monoterpenoida i seskviterpenoida. Ove hlapljive komponente su prisutne u eteričnim uljima kojima daju aromatičnost (Wright, 2002).

Monoterpenoidi općenito sadrže deset ugljikovih atoma i glavne su komponente eteričnog ulja *A. annua* dobivenog destilacijom vodenom parom ili drugim tehnikama koje su

selektivne za hlapljivije spojeve (Brown, 2010). Najzastupljeniji su 1,8-cineol, pinen, kamfen, borneol, kamfor, karvon, limonen, terpinen i mirtenol (Septembre-Malaterre i sur., 2020).

Seskviterpenoidi čine najzastupljeniju i najraznovrsniju skupinu prirodnih spojeva u slatkom pelinu. Općenito, seskviterpeni su hlapljiviji od svojih analoga s visokom količinom kisika i prikladniji su za proučavanje pomoću GC-MS metode. Seskviterpeni s više kisika, poput artemisinina, najbolje se analiziraju tekućinskom kromatografijom (Brown, 2010). Više od trideset seskviterpena prisutno je u slatkom pelinu, uglavnom u nadzemnim dijelovima biljke. Glavni spojevi su artemisinin, arteanuin B i artemisinska kiselina (Septembre-Malaterre i sur., 2020).

2.3.2. Flavonoidi

U posljednje vrijeme, flavonoidi privlače puno pozornosti zbog svoje izvrsne antiradikalne i antioksidacijske aktivnosti. Istraživanja su pokazala da su odlični „hvatači“ slobodnih radikala, zbog čega imaju vrlo važnu ulogu u prehranbenoj i farmaceutskoj industriji kao antioksidansi i lijekovi (Kazazić, 2004).

Flavonoidi pripadaju skupini polifenolnih spojeva, a osim u ljekovitim biljkama, mogu se pronaći u sjemenkama, voću, drveću i cvijeću. Zbog njihove antioksidacijske i antiradikalne aktivnosti, pripisuju im se mnoga terapijska djelovanja (protuupalno, antialergijsko, antibakterijsko, antivirusno, antikarcinogeno i dr.) (Kazazić, 2004).

U slatkom pelinu je identificirano više od 40 flavonoida (Aftab i sur., 2014). Za neke od njih, poput artemetina i kasticina, se pokazalo da pojačavaju antimalaričnu aktivnost artemisinina (Wright, 2002). Ovo sinergijsko djelovanje između artemisinina i flavonoida sugerira da su flavonoidi vjerojatno važni za učinkovitu uporabu *A. annua* koja se konzumira kao čaj ili suho lišće (Aftab i sur., 2014).

2.3.3. Fenoli

Fenolni spojevi su organske molekule široko rasprostranjene u biljci. Ove molekule nemaju izravnu funkciju u osnovnim aktivnostima biljnog organizma poput rasta ili razmnožavanja. To su sekundarni metaboliti, produkti biljaka koji služe za zaštitu od UV zračenja i životinja, a ponekad i kao repelenti zbog gorčine. Fenoli su molekule koje imaju najmanje jedan aromatični prsten (benzen) na koji je vezana hidroksilna skupina. Nekoliko skupina fenolnih

spojeva pronađeno je u vodenim i alkoholnim ekstraktima slatkog pelina (kofeinska kiselina, kininska kiselina, luteolin, kvercetin, apigenin i dr.) (Septembre-Malaterre i sur., 2020).

2.3.4. Kumarini

Kumarini su prirodne tvari, derivati benzo- α -pirena. Ove tvari su široko rasprostranjene u biljkama, nastaju u lišću, a nakupljaju se u korijenu i kori biljke, kao i u starom i oštećenom tkivu. Kumarini štite biljku od biljojeda i patogenih mikroorganizama, a najviše ih se može pronaći na površini i u organima najviše izloženim predatorstvu (mladim listovima, voću i sjemenkama) da bi uspjeli sačuvati metaboličku energiju (Septembre-Malaterre i sur., 2020).

Većina *Artemisia* vrsta sadrži kumarin skopoletin. Skopoletin je poznat po svom antioksidacijskom i protuupalnom djelovanju. Kumarini mogu aktivirati limfocite, stimulirajući tako imunološki sustav (Aftab i sur., 2014). Skopoletin također može utjecati na interakciju između mokraćne kiseline i malarije. Malariju karakteriziraju ponavljajuće vrućice i jake upale. Dok rani odgovor na upalu pridonosi uklanjanju parazita, jaka i dugotrajna upala može dovesti do težih oblika bolesti. Eritrociti inficirani s *P. falciparum* sadrže ostatke mokraćne kiseline koja se oslobađa kada eritrociti puknu. Ostaci mokraćne kiseline uzrokuju upale te predstavljaju opasnost za urođeni imunitet, a mogu biti i uzročnici gihta (Clark i sur, 2004.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog rada bio je ekstrahirati artemisinin i ostale isparljive aktivne spojeve iz slatkog pelina (*Artemisia annua* L.) te usporediti učinkovitost različitih tehnika ekstrakcije. Provedene su dvije konvencionalne tehnike ekstrakcije, maceracija i infuzija te dvije suvremene tehnike, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE) i ekstrakcija sa superkritičnim CO₂ (SC-CO₂). U dobivenim ekstraktima određeni su ukupni fenoli i antiradikalna aktivnost, dok je u CO₂ ekstraktima određen profil isparljivih spojeva primjenom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (GC-MS).

Identifikacija i kvantifikacija artemisinina provedene su primjenom visokotlačne tekućinske kromatografije (HPLC) u ekstraktima prethodno dobivenim primjenom ultrazvuka i konvencionalnim metodama ekstrakcije.

3.2. MATERIJAL

Biljni materijal (*Artemisia annua* L.) kupljen je u suhom stanju od biljne ljekarne Vextra d.o.o. (Mostar, Bosna i Hercegovina) u siječnju 2021. godine. Biljni materijal (**Slika 4**) je samljeven do veličine čestica manje od 3 mm pomoću laboratorijskog mlina. Usitnjeni materijal je pohranjen bez izlaganja svjetlosti na temperaturi od 4°C.



Slika 4 Uzorak slatkog pelina korišten u istraživanju (izvor: Autor)

Kemikalije: etanol (Carlo Erba Reagents, Barcelona, Španjolska), ugljikov dioksid (CO₂) korišten za SC-CO₂ (Messer, Osijek, Hrvatska) s naznačenom čistoćom od 99,97 % (w/w).

Za spektrofotometrijske analize korišteni su:

- 1,1-difenil-pikrilhidrazil (DPPH), Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka),
- Folin-Ciocalteu reagens, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka),
- Na₂CO₃, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska),
- Galna kiselina, čistoće 97,5%, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka),

Za analizu isparljivih spojeva GC-MS-om korištena je smjesa alkana C₉-C₂₅ proizvođača Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Njemačka). Za pripremu uzoraka za GC-MS analizu korišten je heksan, HPLC čistoće, Carlo Erba Reagents (Val de Reuil Cedex, Francuska).

Za identifikaciju i kvantifikaciju artemisinina u ekstraktima HPLC-DAD metodom korišten je acetonitril, miliQ voda (Millipore Simplicity 185, Darmstadt, Njemačka) i acetonitril Carlo Erba Reagents (Val de Reuil Cedex, Francuska) te standard artemisinina.

Uređaji:

- Superkritični CO₂ ekstraktor (konstruiran na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek, Hrvatska),
- Ultrazvučna kupelj (ELMA, Elmasonic P 120 H),
- Uređaj za plinsku kromatografiju/masenu spektrometriju (GC/MS; Agilent Technologies, SAD; model: 7890B/5977A),
- Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC-DAD) (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD),
- UV/VIS spektrofotometar S-220 (Boeco, Njemačka)
- Mlin (Retsch GM 200, Njemačka)

3.3. METODE

3.3.1. Konvencionalne tehnike ekstrakcije: maceracija i infuzija

Maceracija je postupak ekstrakcije djelatnih tvari iz usitnjenog biljnog materijala (*Artemisia annua* L.) potapanjem biljnog materijala u otapalo, kako bi se u otapalo iscrpili aktivni sastojci kroz određeno vrijeme bez zagrijavanja. Stoga je u dvije laboratorijske čaše odvagano 5 g usitnjenog uzorka slatkog pelina. U jednu čašu dodano je 25 mL vode, dok je u drugu dodano 25 mL 70 %-tne vodene otopine etanola. Tako preliven uzorak je poklopljen i ostavljen stajati 10 dana nakon čega je filtriran kako bi se dobio ekstrakt koji se koristio za daljnje analize.

Infuzija je postupak ekstrakcije aktivnih tvari prelijevanjem osušenih i/ili usitnjenih biljaka kipućom vodom. U ovom slučaju, 1 g uzorka preliven je sa 100 mL kipuće vode, poklopljen i ostavljen stajati 10 minuta nakon čega je filtriran.

3.3.2. Ekstrakcija superkritičnim CO₂ (SC-CO₂)

Ekstrakcija je provedena u postrojenju za ekstrakciju SC-CO₂ konstruiranom na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku te prikazanom na **Slici 5**. Rashladna kupelj pothlađivala je CO₂ na -5°C koji se potom uvodio u pumpu, a visokotlačna pumpa pumpala je CO₂ na željeni tlak ekstrakcije i dovodila ga u ekstraktor. U ekstraktoru se nalazio usitnjeni biljni materijal. Tako stlačeni CO₂ zagrijavao se preko istostrujnog izmjenjivača topline na temperaturu ekstrakcije i uvodio u ekstraktor gdje se, prelazeći preko uzorka, provodila ekstrakcija topljivih spojeva.



Slika 5 Uređaj za SC-CO₂ (izvor: Autor)

Za ekstrakciju je korišteno 40 g slatkog pelina samljevenog na mlinu pri 4000 o/min. SC-CO₂ je provedena pri tlaku od 300 bara na temperaturi od 40 °C i protoku CO₂ od 1,4 kg/h. Vrijeme ekstrakcije bilo je 15 minuta, a tlak u separatoru 15 bara. Dobiveni ekstrakti čuvani su na 4 do 6 °C do analize.

3.3.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE) provedena je u ultrazvučnoj kupelji (ELMA, Elmasonic P 120 H) (**Slika 6**) bez zagrijavanja tijekom tri različita vremena ekstrakcije (15, 30 i 45 minuta). Omjer otapalo:materijal bio je 20:1 (u 1 g biljnog materijala dodano je 20 mL otapala).



Slika 6 Ultrazvučna kupelj ELMA, Elmasonic P 120 H (Katalog opreme Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, 2021)

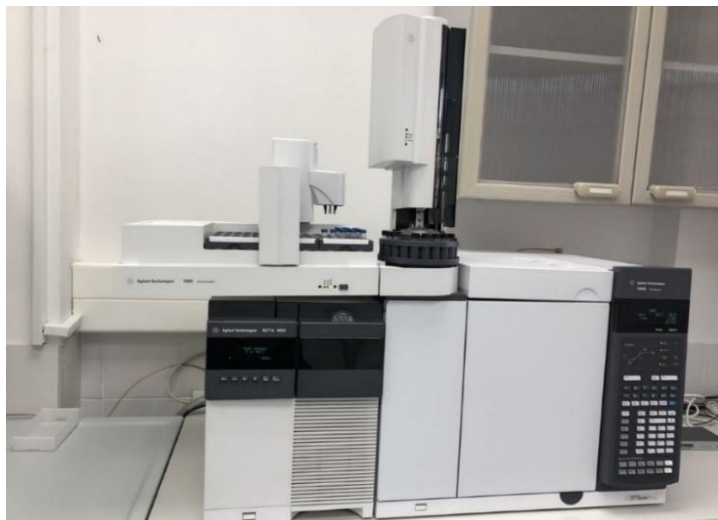
Ekstrakcija je provedena na frekvenciji od 37 kHz koristeći *pulse mode* koji omogućava ravnomjernu raspodjelu ultrazvučnih valova unutar vodene kupelji. Tikvice s materijalom i otapalom, označene brojevima od 1 do 6, postavljene su na istom razmaku te tijekom ekstrakcije nije primjenjivano dodatno miješanje (**Slike 6 i 7**). U tikvicama označenim brojevima 1, 2 i 3 nalazio se uzorak, a kao otapalo korištena je voda, dok se u tikvicama označenim brojevima 4, 5 i 6 nalazio uzorak i 70 %-tna vodena otopina etanola. Ekstrakti su filtrirani kroz filter papir i čuvani na 4 °C do analize.



Slika 7 Ekstrakcija uzoraka potpomognuta ultrazvukom (izvor: Autor)

3.3.4. Određivanje profila isparljivih spojeva u CO₂ ekstraktima primjenom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (GC-MS)

Za analizu nepolarnih (isparljivih) spojeva korišten je plinski kromatograf (Agilent technologies, SAD), model 7890B u kombinaciji s Agilent Technologies (SAD) masenim detektorom, model 5977A, spojenim na računalo (**Slika 8**). Separacija spojeva provedena je na kapilarnoj koloni H5-5MS. Dužina kolone je 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm, debljine sloja stacionarne faze 0,25 μm (J&W, SAD).



Slika 8 Prikaz uređaja za GC-MS analizu (izvor: Autor)

Prije provedbe GC-MS analize napravljena je priprema uzorka (10mg uzorka otopljeno je u 990 μ L heksana) nakon čega je uslijedila analiza provedena pri sljedećim uvjetima:

- Temperaturni program kolone: 2 min izotermno na 70 °C, zatim porast temperature od 3 °C/min do 200 °C te zadržavanje 18 min na 200 °C
- Energija ionizacije: 70 eV
- Temperatura ionskog izvora: 230 °C
- Plin nosač: helij
- Interval snimanja masa: 45-450 masenih jedinica

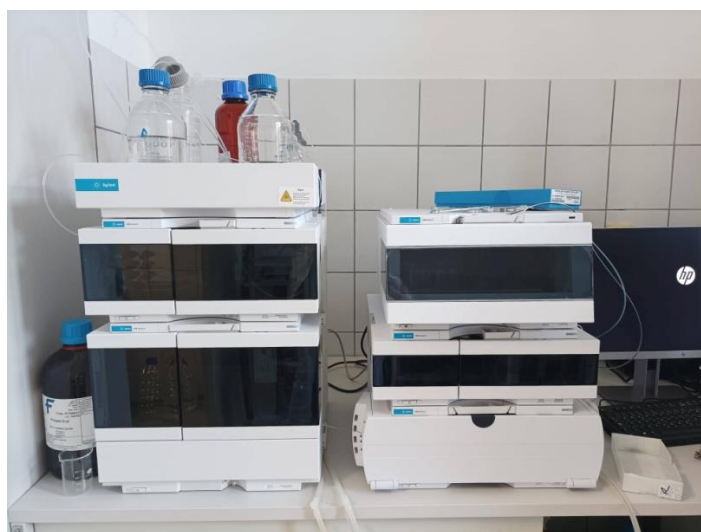
Kvalitativna analiza provedena je integriranjem površina ispod pikova primjenom metode normalizacije (bez korekcijskih faktora). Strukturna identifikacija spojeva dobivenih u ekstraktu provedena je usporedbom masenih spektara na odgovarajućem retencijskom vremenu i masenog spektra iz baze podataka masenih spektara. Isto tako, retencijska vremena spojeva u uzorku uspoređena su u odnosu na C9-C25 n-alkane za kolonu HP-5MS. Za svaki analizirani uzorak dobiven je kromatogram ukupne ionske struje, naziv spoja čiji je spektar najbližnji spektru nepoznate komponente pojedinog pika iz kromatograma ukupne ionske struje i vrijeme zadržavanja pojedine komponente te relativni udio pojedine komponente izražen u postotcima.

3.3.5. Identifikacija i kvantifikacija artemisinina primjenom visokotlačne tekućinske kromatografije (HPLC-DAD)

Za HPLC, 100 μ L ekstrakta je otopljeno u 1,9 mL acetonitrila. Uzorci su zatim filtrirani kroz politetrafluoretilen (PTFE) filtere s veličinom pora od 0,45 μ m.

Za analizu artemisinina u ekstraktima korišten je HPLC sustav Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD) opremljen kvarternom pumpom (G7111B), grijačem kolone (G7116A), temperaturnog raspona od 10 do 85 °C, DAD detektora (G7115A), autosamplera (automatskog uzorkivača) (G7129A) kapaciteta 36 viala i sakupljača frakcija (G1364E) (**Slika 9**). Obrada podataka i upravljanje sustavom napravilo se pomoću računalnog programa ChemStation.

Navedeni sustav korišten je za odvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju artemisinina iz ekstrakta. Kromatografsko razdvajanje postignuto je korištenjem kolone Cosmosil 5C18-MS-11, duljine 250 mm, unutarnjeg promjera 4,6 mm te veličinom čestica 5 μ m.



Slika 9 Prikaz uređaja za HPLC analizu (izvor: Autor)

Odvajanje analiziranog spoja provedeno je izokratnim eluiranjem pri brzini protoka 1 mL/min tijekom 10 minuta, u omjeru mobilnih faza A : B = 15 % : 85 % pri čemu je kao faza A korištena miliQ voda (Millipore Simplicity 185, Darmstadt, Njemačka), a kao faza B acetonitril. Volumen injektiranja bio je 20 μ L, valna duljina UV detekcije 216 i 254 nm, a temperatura analize 25 °C.

Identifikacija artemisinina provedena je usporedbom vremena zadržavanja u spektru pika sa standardom, a kvantifikacija je izvršena pomoću metode vanjskog standarda preko kalibracijske krivulje. Vrijeme zadržavanja artemisinina iznosilo je 4,349 minuta.

Standardna kalibracijska krivulja za artemisinin je izrađena u rasponu koncentracija 9,8-147 µg/mL. Linearnost kalibracijske krivulje potvrđena je s $R^2 = 0.99993$.

3.3.6. Određivanje antiradikalne aktivnosti

Za određivanje antiradikalne aktivnosti dobivenih ekstrakata korištena je DPPH metoda. Ova metoda detaljno je opisana u radu Jakobek i sur. (2007). Otopine za mjerenje pripremljene su dodatkom 1,2 mL ekstrakta (koncentracije 0,25 mg/mL) i 0,5 mL svježe pripremljene otopine DPPH. Mjerenje je provedeno u tri paralele pri valnoj duljini od 517 nm. Rezultati su izračunati pomoću Jednadžbe 1 i izraženi kao postotak DPPH radikala (% DPPH).

$$\% DPPH = \frac{(A_{DPPH} + A_b) - A_s}{A_{DPPH}} \times 100$$

gdje je: A_{DPPH} kontrola apsorbancije (umjesto uzorka dodan je metanol), A_b predstavlja apsorbanciju uzorka (umjesto DPPH otopine dodan je metanol), a A_s predstavlja apsorbanciju uzorka pomiješanog s DPPH otopinom.

3.3.7. Određivanje ukupnih fenola

Udio ukupnih fenola u ekstraktima određen je prema modificiranoj spektrofotometrijskoj metodi (Jakobek i sur., 2007) koristeći Folin-Ciocalteu reagens i galnu kiselinu kao kalibracijski standard. Otopine za mjerenje su pripremljene tako što je 20 µL uzorka koncentracije 1 mg/mL razrijeđeno s 1580 µL destilirane vode. Tim otopinama je dodano 100 µL nerazrijeđenog Folin Ciocalteu reagensa, a nakon tri minute dodano je još 300 µL Na_2CO_3 otopine. Pripremljeni uzorci su termostimirani na 40 °C tijekom 30 minuta nakon čega su mjereni. Rezultati su izračunati prema kalibracijskoj krivulji, konstruiranoj za različite koncentracije galne kiseline (5-500 µg/mL) te izraženi kao % ekvivalenta galne kiseline (GAE) po masi suhog ekstrakta. Mjerenje je provedeno u tri ponavljanja na valnoj duljini od 765 nm.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Nakon početne pripreme uzoraka (usitnjavanja) te provedbe prethodno opisanih metoda ekstrakcije, uslijedila je identifikacija i kvantifikacija artemisinina u svim dobivenim ekstraktima primjenom HPLC-a te određivanje profila isparljivih spojeva u CO₂ ekstraktima primjenom GC-MS tehnike. Ekstrakcija je provedena pomoću dvije inovativne, nekonvencionalne te dvije konvencionalne tehnike ekstrakcije. Nekonvencionalne tehnike upotrijebljene su UAE i ekstrakcija sa SC-CO₂, dok su od konvencionalnih tehnika provedene maceracija i infuzija. Za ekstrakcije su korištena otapala različite polarnosti, od najpolarnijih (voda) do izrazito nepolarnih otapala poput CO₂. Voda se kao otapalo koristila tijekom maceracije, infuzije i UAE, dok se 70 %-tna vodena otopina etanola koristila za maceraciju i UAE. CO₂ u superkričnom stanju korišten je tijekom provođenja SC-CO₂ metode. Sve to provedeno je u svrhu pronalaska najpogodnije tehnike ekstrakcije artemisinina iz slatkog pelina.

Iz **Tablice 1** vidljivo je kako su količina detektiranog artemisinina i vrijeme ekstrakcije obrnuto proporcionalni, odnosno što je dulje vrijeme ekstrakcije, u ekstraktu se nalazi manje artemisinina. Također, prema rezultatima je vidljivo da je otapalo korišteno tijekom ekstrakcije još jedan bitan faktor, tj. voda nije povoljan medij za ekstrakciju ovog spoja, dok se 70 %-tna vodena otopina etanola pokazala kao najpovoljnija. Vodene otopine etanola se vrlo često koriste na ekstrakciju polarnih spojeva iz biljnih materijala, a dodatna prednost je to što se smatraju zelenim otapalima (prihvatljivim za ljudsku prehranu) te niska cijena. Osim otapala, vrlo je važna i metoda ekstrakcije. U ovom slučaju, UAE metoda je najpogodnija u odnosu na klasične tehnike, maceraciju i infuziju. Artemisinin u dobivenim ekstraktima je detektiran u rasponu od 0 do 4,95 µg/mg (0 do 0,495 %). Uspješnost ove metode u ekstrakciji ciljnih spojeva može se pripisati mehaničkim učincima (turbulenciji i strujanju tekućine) koji olakšavaju prijenos mase između faza koje se ne miješaju uzrokujući kavitaciju. Tijekom kavitacije dolazi do pucanja stanične stijenke biljnog materijala i otpuštanja unutarstaničnih komponenti u otapalo (Haihui i sur., 2014). Postoji nekoliko prednosti korištenja UAE metode, uključujući manju opskrbu toplinom, kraće vrijeme trajanje, manju potrošnju energije i veće iskorištenje zbog čega je ovo jedna od najčešće korištenih nekonvencionalnih metoda ekstrakcije (Phongphat i sur., 2019).

Budući da je količina artemisinina pronađena u slatkom pelinu izuzetno niska, kombiniraju se različite tehnike kako bi se povećala učinkovitost ekstrakcije ovog spoja. Prema istraživanju

koje su proveli Dogan i sur. (2021) najefikasnija se pokazala kombinacija UAE u trajanju od 15 minuta i maceracije na sobnoj temperaturi tijekom 24 sata, dok je kao otapalo korišten 95 %-tni etanol. Količina artemisinina dobivenog kombinacijom ovih dvaju metoda iznosila je 0,065%.

Prema istraživanju koje su proveli Nahar i sur. (2020), količina artemisinina detektirana HPLC-UV metodom vrlo je slična količini navedenoj u **Tablici 1**, a kretala se od 0,07 % do 0,45 %.

Tablica 1 Sadržaj artemisinina u ekstraktima slatkog pelina dobivenim različitim tehnikama ekstrakcije

Otapalo	Metoda	Vrijeme ekstrakcije	Artemisinin ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Voda	UAE	15 min	0,00 \pm 0,00
Voda	UAE	30 min	0,54 \pm 0,06
Voda	UAE	45 min	0,00 \pm 0,00
70 % EtOH	UAE	15 min	4,95 \pm 0,35
70 % EtOH	UAE	30 min	4,34 \pm 0,30
70 % EtOH	UAE	45 min	3,40 \pm 0,08
Voda	Maceracija	2 tjedna	0,00 \pm 0,00
70 % EtOH	Maceracija	2 tjedna	0,85 \pm 0,01
Kipuća voda	Infuzija	10 min	0,00 \pm 0,00

U **Tablici 2** prikazani su spojevi identificirani pomoću GC-MS metode, izolirani iz ekstrakata dobivenih metodom SC-CO₂ ekstrakcije. Superkritični CO₂ posebno je ekstrakcijsko otapalo. Zbog svoje stlačivosti osjetljiv je na promjene tlaka i temperature. Njegova gustoća može se mijenjati s tlakom (povećanjem tlaka povećava se gustoća) i temperaturom (povećanjem temperature smanjuje se gustoća). Promjena gustoće može izmijeniti interakciju CO₂ sa spojevima u biljnom materijalu, a time i njihovu ekstrakciju. Ovo je visoko selektivna metoda ekstrakcije zbog brojnih parametara koji mogu utjecati na nju. No, baš zbog selektivnosti ovom metodom je moguće ekstrahirati veliku količinu spojeva, od hlapljivih terpena do nepolarnih voskova i polarnih ugljikohidrata (Lefebvre i sur., 2021).

Od četiri metode ekstrakcije koje su korištene u ovom radu, jedino je kod SC-CO₂ ekstrakcije korišteno nepolarno otapalo. Iz tog razloga je u tako dobivenom ekstraktu očekivano više isparljivih spojeva koji su potom identificirani na GC-MS-u. Detektirano je 53 spoja, od kojih

se najviše ističu arteanuin b (15,29 %), kamfor (12,23 %), artemizija keton (10,97 %), 1,8-cineol (5,37 %), artemisinska kiselina (4,95 %) te artemisinin (1,39 %).

Tablica 2 GC-MS analiza CO₂ ekstrakta slatkog pelina

R.br.	Kemijski spoj	Rt	RI	%
1.	3-metilbut-2-enoična kiselina	3,285	< 900	0,04
2.	α -pinen	4,146	942	0,76
3.	kamfen	4,456	958	0,48
4.	sabinen	4,976	980	0,14
5.	β -pinen	5,070	983	0,30
6.	β -mircen	5,348	993	0,30
7.	2,5,5-trimetilhepta-3,6-dien-2-ol (Yomogi alkohol)	5,547	1000	0,32
8.	<i>p</i> -cimen	6,274	1030	0,08
9.	limonen	6,389	1034	0,08
10.	1,8-cineol	6,470	1037	5,37
11.	artemizija keton	7,353	1066	10,97
12.	<i>trans</i> -sabinen hidrat	7,563	1072	0,36
13.	Artemizijaalkohol	8,075	1086	1,45
14.	<i>cis</i> -sabinen hidrat	8,586	1100	0,34
15.	nonanal	8,778	1106	0,10
16.	<i>trans</i> - <i>p</i> -menta-2,8-dienol	9,364	1124	0,16
17.	α -kamfolenal	9,561	1130	0,48
18.	<i>trans</i> -pinokarveol	10,028	1143	1,63
19.	kamfor	10,232	1148	12,23
20.	pinokarvon	10,913	1166	1,63
21.	borneol	11,038	1169	0,12
22.	terpinen-4-ol	11,488	1180	0,44
23.	α -terpineol	12,016	1192	0,26
24.	mirtenol	12,225	1197	0,72
25.	verbenon	12,745	1210	0,16
26.	<i>trans</i> -karveol	13,136	1221	0,14
27.	<i>trans</i> -anetol	15,834	1286	0,32
28.	<i>p</i> -cimen-7-ol	16,085	1292	0,08
29.	eugenol	18,816	1360	0,28
30.	α -kopaen	19,512	1376	1,87
31.	β -bourbonen	19,862	1384	0,08
32.	β -kubeben	20,117	1389	0,28
33.	<i>trans</i> - β -kariofilen	21,259	1417	2,68
34.	α -humulen	22,629	1452	0,24
35.	<i>trans</i> - β -farnezen	22,900	1459	1,23
36.	α -selinen	23,543	1475	0,12

37.	germakren D	23,754	1480	1,09
38.	β -selinen	23,950	1484	4,39
39.	δ -kadinen	25,475	1523	0,08
40.	dihidroaktinidiolid	25,579	1526	0,06
41.	spatulenol	27,521	1576	0,32
42.	kariofilen oksid	27,706	1580	3,86
43.	metil jasmonat	30,267	1649	0,28
44.	arteminska kiselina	37,295	1847	4,95
45.	nonadekan	39,100	1900	0,48
46.	heksadekanska kiselina	41,251	1967	2,05
47.	kontrunkulin-A	42,215	1996	4,93
48.	arteanuin b	44,036	2054	15,29
49.	Fitol	45,789	2107	2,23
50.	(Z,Z)-oktadeka-9,12-dienska kiselina (Linolna kiselina)	46,500	2128	1,49
51.	artemisinin	48,622	2187	1,39
52.	trikosan	53,583	2300	0,91
53.	tetrakosan	60,038	2400	0,93
Rt – retencijsko vrijeme				
RI – retencijski indeks				

Arteanuin b je prirodni spoj koji se može pronaći u *Artemisia apiacea*, *Artemisia annua* i *Artemisia carvifolia* vrstama. Prema istraživanju koje su proveli Hu i sur. (2021), ovaj spoj uspješno inhibira djelovanje virusa SARS-Cov-2. Kamfor pripada skupini monoterpenoida te ima ulogu biljnog metabolita. Pojavljuje se kao bezbojni ili bijeli kristalni prah s jakim mirisom na naftalin, a koristi se u sredstvima protiv moljaca, lijekovima i aromama. Artemizija keton je tekući, zapaljivi spoj koji se upotrebljava kao aditiv hrani, odnosno kao sredstvo za poboljšanje okusa. Monoterpenoid i ciklički eter 1,8-cineol je bezbojna tekućina koja se dodaje u vodice za ispiranje usta i sredstva za suzbijanje kašlja. Ovaj spoj kontrolira hipersekreciju sluzi u dišnim putevima, smanjuje upalu i bol kada se primjenjuje lokalno, a ima ljuti, rashlađujući okus. Artemisinska kiselina je seskviterpenoidni prekursor artemisinina. Dobiva se iz slatkog pelina, a može se pronaći i u *Artemisia apiaceae* vrsti (PubChem, 2022).

Rezultati istraživanja koje su proveli Dobrevi i sur. (2022), GC-MS analizom ekstrakta slatkog pelina, identificirano je ukupno 28 spojeva. U najvišem udjelu je u ekstraktima identificiran artemizija keton (26,2 %), zatim slijedi kamfor (10,7 %) te eukaliptol (9,1 %). Artemisinin je identificiran u količini od 1,28 %.

Slične rezultate dobili su i Vidić i sur. (2018) određivanjem kemijskog sastava eteričnog ulja slatkog pelina. Eterično ulje dobiveno je postupkom hidrodestilacije, a komponente od kojih se sastoji identificirane su GC-MS metodom. Točno 50 komponenata pronađeno je u pet analiziranih uzoraka od kojih su najzastupljeniji u svim uzorcima bili artemizija keton i kamfor.

Tablica 3 prikazuje sadržaj ukupnih fenola i antiradikalnu aktivnost. Ukupni fenoli izraženi su kao $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}$ suhe tvari, a antiradikalna aktivnost kao % DPPH. Određivanje ukupnih fenola i antiradikalne aktivnosti su metode koje se temelje na spektrofotometrijskim mjerenjima.

Određivanje ukupnih fenola napravljeno je pomoću Folin-Ciocalteu reagensa. Fenoli koji se nalaze u biljnom ekstraktu reagiraju sa Folin-Ciocalteu reagensom stvarajući pri tome plavi kompleks. Ova metoda daje vrlo točne i precizne podatke za mnoge skupine fenolnih spojeva (Blainski i sur., 2013). Određivanje je provedeno s ekstraktima dobivenim provedbom UAE metode, maceracije i infuzije. U ekstraktima dobivenim SC-CO₂ metodom nije određivana količina ukupnih fenola i antiradikalna aktivnost jer se u slučaju SC-CO₂ ekstrakcije radilo o nepolarnim ekstraktima koji nisu bili topljivi u 70 %-tnoj vodenoj otopini etanola. Isto tako, zbog prirode otapala očekivan je vrlo mali udio polifenola u takvim ekstraktima. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom trajala je u rasponu od 15-45 minuta, a ekstrakti su dobiveni primjenom vode te 70 %-tne vodene otopine etanola (70% EtOH) kao otapala. Ukupni fenoli u ekstraktima su u rasponu od 8,81 do 26,73 $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}$ suhe tvari, pri čemu je vidljivo da je najveća količina ukupnih fenola određena u ekstraktima kod kojih je kao otapalo korišten etanol u vremenu ekstrakcije od 45 minuta. Najmanje ukupnih fenola dobiveno je maceracijom sa vodom (4,55 $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}$ suhe tvari) te infuzijom (5,05 $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}$ suhe tvari).

Antiradikalna aktivnost biljnog materijala predstavlja sposobnost „hvatanja“ slobodnih radikala. Mnoge fitokemikalije koje se nalaze u biljkama imaju pozitivan utjecaj na zdravlje uslijed njihove antioksidativne aktivnosti te inhibicijskih učinaka protiv oksidativnog stresa koji je uključen u razvoj brojnih bolesti, posebice karcinoma i kardiovaskularnih bolesti (Sepahpour i sur., 2018). Korištenjem DPPH metode za određivanje antiradikalne aktivnosti vidljivo je da ekstrakti slatkog pelina, dobiveni prethodno opisanim metodama, posjeduju izrazitu antiradikalnu aktivnost. DPPH je u biljnom materijalu određen u rasponu od 15,53 do 32,05 %, pri čemu najveću radikalsku aktivnost ima ekstrakt dobiven UAE metodom kod koje

je kao otapalo korišten 70 %-tna vodena otopina etanola, tijekom vremena ekstrakcije od 45 minuta. Najmanja antiradikalna aktivnost zabilježena je kod ekstrakta dobivenog infuzijom.

S obzirom na visoku korelaciju ($R=0,971$) između količine ukupnih fenola u ekstraktima i antiradikalne aktivnosti, može se reći da su fenoli odgovorni za antiradikalnu aktivnost. Ovo su potvrdili i Carvalho i sur. (2011) u svom istraživanju provedenom na šest *Artemisia* vrsta. Korelacija između ukupnih fenola i antiradikalne aktivnosti iznosila je 0,968, što je vrlo slično rezultatima dobivenim u ovom radu.

Tablica 3 Prikaz sadržaja ukupnih fenola i antiradikalne aktivnosti ekstrakata slatkog pelina

	Otapalo	Metoda ekstrakcije	Vrijeme ekstrakcije	Ukupni fenoli (mg _{GAE} /g _{s.t.})	Standardna devijacija	DPPH (%)	Standardna devijacija
1.	Voda	UAE	15 min	8,81	0,02	18,23	0,99
2.	Voda	UAE	30 min	9,38	0,01	22,78	0,99
3.	Voda	UAE	45 min	10,78	0,01	21,56	0,99
4.	70%EtOH	UAE	15 min	20,73	0,01	26,10	0,93
5.	70%EtOH	UAE	30 min	25,23	0,01	31,11	1,36
6.	70%EtOH	UAE	45 min	26,73	0,02	32,05	1,56
7.	Voda	Maceracija	10 dana	4,55	0,02	16,56	0,58
8.	70%EtOH	Maceracija	10 dana	8,30	0,00	20,35	7,53
9.	Kipuća voda	Infuzija	10 min	5,05	0,01	15,53	0,98

*Korelacija između ukupnih fenola i antiradikalne aktivnosti 0,971

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Količina artemisinina identificiranog HPLC metodom kod UAE metode ekstrakcije opada s vremenom ekstrakcije. Isto tako, iz rezultata je vidljivo da voda nije pogodno otapalo za ekstrakciju artemisinina dok se tehnikom maceracije sa 70 %-tnom vodenom otopinom etanola ekstrahirala vrlo mala količina artemisinina.
2. Identifikacijom ekstrakata dobivenih SC-CO₂ ekstrakcijom, primjenom GC-MS metode, identificirano je 53 različita spoja, od kojih su najzastupljeniji arteanuin b, kamfor, artemizija keton, 1,8-cineol, artemisinska kiselina te artemisinin. Ovi rezultati potvrđuju činjenicu da je *Artemisia annua* biljka bogata terpenima.
3. Rezultati spektrofotometrijskih metoda za određivanje ukupnih fenola i antiradikalne aktivnosti potvrdili su činjenicu da je UAE, uz 70 %-tnu otopinu etanola kao otapala, vrlo povoljna za dobivanje ekstrakata bogatih fenolima i antioksidansima. Iako su fenoli i antiradikalna aktivnost identificirani u svim ekstraktima, rezultati dobiveni iz ekstrakata dobivenih metodama maceracije s vodom i infuzijom puno su niži u odnosu na ostale.

6. LITERATURA

- Aćimović M, Jeremić Stanković J, Todosijević M, Kiproovski B, Vidović S, Vladić J, Pezo L: Comparative study of the essential oil and hydrosol composition of Sweet Wormwood (*Artemisia annua* L.) from Serbia. *Chemistry and Biodiversity* 19 (3), 2022.
- Aftab T, Ferreira JFS, Masroor M, Khan A, Naeem M: *Artemisia annua* – Pharmacology and Biotechnology. Springer, Berlin, 2014.
- Aftab T, Naeem M, Masroor M, Khan A: *Artemisia annua* Prospects, Applications and Therapeutic Uses. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2018.
- Aladić K: Optimizacija procesa ekstrakcije konopljinog (*Cannabis Sativa* L.) ulja superkričnim CO₂ iz pogače nakon hladnog prešanja. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2015.
- Bilia AR, Flamini G, Morgenni F, Isacchi B, Vincieri FF: GC-MS Analysis of the volatile constituents of essential oil and aromatic waters of *Artemisia annua* L. at different developmental stages. *Natural Product Communications* 2: 2075-2078, 2008.
- Bilia AR, Santomauro F, Sacco C, Bergonzi MC, Donato R: Essential oil of *artemisia annua* L.: an extraordinary component with numerous antimicrobial properties. *Hindawi* 2014:1-7, 2014.
- Blainski A, Lopes GC, Joao Carlos PM: Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules* 18: 6852-6865, 2013.
- Brown GD: The biosynthesis of artemisinin (Qinghaosu) and the phytochemistry of *Artemisia annua* L. (Qinghao). *Molecules* 15: 7603-7698, 2010.
- Carvalho IS, Cavaco T, Brodelius M: Phenolic composition and antioxidant capacity of six *artemisia* species. *Industrial Crops and Products* 33: 382-388, 2011.
- Chen Liu KCS, Yang SL, Roberts MF, Elford BC, Phillipson JD: Antimalarial activity of *Artemisia annua* flavonoids from whole plants and cell cultures. *Plant cell reports* 11: 637-640, 1992.
- Clark IA, Alleva LM, Mills AC, Coeden WB: Pathogenesis of malaria and clinically similar conditions. *Journal of Clinical Microbiology* 17:509-539, 2004.
- Ćavar S, Maksimović M, Vidić D, Parić A: Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. *Industrial Crops and Products* 37: 470-485, 2012.
- Dobrova AM, Dincheva IN, Nenov NS, Trendafilova AB: Chemical characterization of *Artemisia annua* L. subcritical extract. *Bulgarian Chemical Communications* 54: 43-48, 2022.
- Dogan K, Erol E, Didem Orhan M, Degirmenci Z, Kan T, Gungor A, Yasa B, Avsar T, Cetin Y, Durdagi S, Guzel M: Instant determination of the artemisinin from various *Artemisia*

- annua* L. extracts by LC-ESI-MS/MS and their in-silico modelling and in vitro antiviral activity studies against SARS-CoV-2. *Phytochemical Analysis* 33: 303-319, 2022.
- Haihui Z, Li Z, Xigui H, Yonghong Z, Chunbang D, Ruiwu Y, Xiaoli W, Dengchao L: Optimization of ultrasound-assisted extraction of Artemisinin from *Artemisia annua* L. by response surface methodology. *Separation Science and Technology (Philadelphia)* 49: 673-681, 2014.
- Hu Y, Liu M, Qin H, Lin H, An X, Shi Z, Song L, Yang X, Fan H, Tong Y: Artemether, Artesunate, Arteannuin B, Echinatin, Licochalcone B and Andrographolide effectively inhibit SARS-CoV-2 and related viruses *In Vitro*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11: 680127, 2021.
- Hulina N: Nova nalazišta i rasprostranjenost nekih rijetkih biljnih vrsta u flori Hrvatske. *Acta Botanica Croatia* 55-56:41-51, 1997.
- Jaeger R, Cuny E: Terpenoids with special pharmacological significance: A Review. *Natural Product Communications* 11: 1373-1390, 2016.
- Jakobek L, Šeruga M, Novak I, Medvidovic-Kosanovic M: Flavonols, phenolic acids and antioxidant activity of some red fruits. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 103: 369-377, 2007.
- Katalog opreme (Equipment catalogue), Prehrambeno – tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2021. <http://www.ptfos.unios.hr/images/dokumenti/katalog-opreme-ptf-2021-01.pdf> [Pristupljeno 08.08.2022.]
- Kazazić SP: Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 55: 279-290, 2004.
- Kim WS, Choi WJ, Lee S, Kim WJ, Lee DC, Sohn UD, Shin HS, Kim W: Anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial effects of artemisinin extracts from *Artemisia annua* L. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology* 19: 21-27, 2015.
- Lefebvre T, Destandau E, Lesellier E: Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: A review. *Journal of Chromatography A* 1635: 461770, 2021.
- Meng Y, Ma N, Lyu H, Wong YK, Zhang X, Zhu Y, Gao P, Sun P, Song Y, Lin L, Wang J: Recent pharmacological advances in the repurposing of artemisinin drugs. *Medicinal Research Reviews* 41: 3156-3181, 2021.
- Nahar L, Guo M, Sarker SD: A review on the latest advances in extraction and analysis of artemisinin. *Phytochemical Analysis* 31: 5-14, 2020.
- Phongphat P, Yongqiang Z, Ying Z, Hui W: Ultrasonic assisted extraction of Artemisinin from *Artemisia annua* L. using poly(ethylene glycol): toward a greener process. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 58: 18320-18328, 2019.

- PubChem, *National Library of Medicine*, 2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> [Pristupljeno 08.08.2022.]
- Schafer B: A new drug for an old disease: Artemisinin. Part 2 of 2. *Chemie in Unserer Zeit* 48: 216-225, 2014.
- Sepahpour S, Selamat J, Mohd YAM, Alfi K, Ahmad FAR: Comparative analysis of chemical composition, antioxidant activity and quantitative characterization of some phenolic compounds in selected herbs and spices in different solvent extraction systems. *Molecules* 23: 402, 2018.
- Septembre-Malaterre A, Rakoto ML, Marodon C, Bedoui Y, Nakab J, Simon E, Hoarau L, Savriama S, Strasberg D, Guiraud P, Selambarom J, Gasque P: *Artemisia annua*, a traditional plant brought to light. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 1-34, 2020.
- Vidić D, Čopra-Janićljević A, Miloš M, Maksimović M: Effects of different methods of isolation on volatile composition of *Artemisia annua* L. *Hindawi* 2018:6, 2018.
- Weathers PJ, Arsenault PR, Covello PS, McMickle A, Teoh KH, Reed DW: Artemisinin production in *Artemisia annua*: Studies in planta and results of a novel delivery method for treating malaria and other neglected diseases. *Phytochemistry Reviews* 10: 173-183, 2011.
- Wright WC: *Artemisia*. *Taylor & Francis*, London, 2002.
- YouYou T: From *Artemisia annua* L. to artemisinins. *Chemical Industry Press*, China, 2017.