

Fitokemijski sastav i antioksidacijsko djelovanje etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Artemisia*

Canjuga, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:388791>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Marija Canjuga

**Fitokemijski sastav i antioksidacijsko djelovanje
etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Artemisia***

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmakognozija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Maje Bival Štefan.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Maji Bival Štefan što mi je pomogla pri odabiru teme za diplomski rad te na stručnom vodstvu, savjetima i razumijevanju tijekom izrade istog.

Zahvaljujem se i ostalim djelatnicima Zavoda za farmakognoziju, posebno Mateji i Luciji.

Hvala mojoj obitelji na strpljivosti, podršci i pomoći pruženoj tijekom cijelog studija.

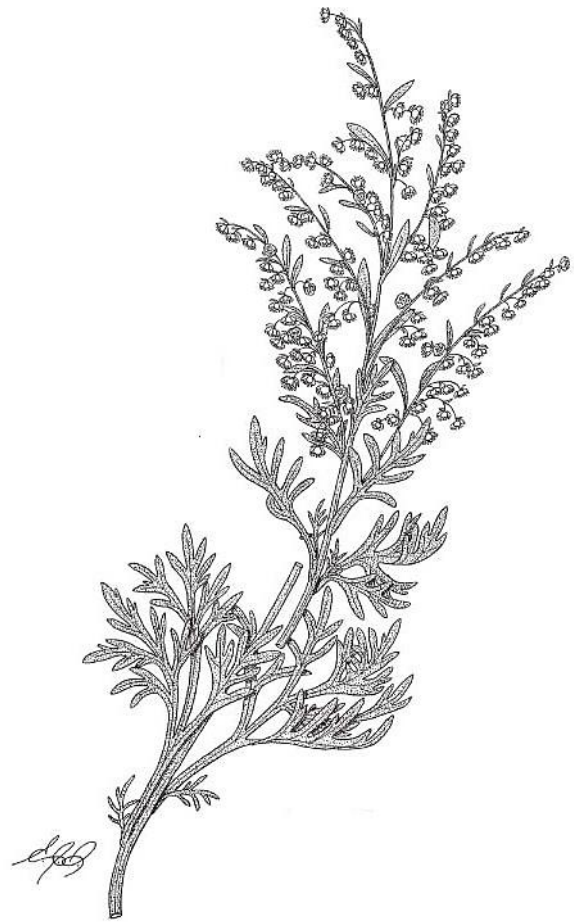
Posebno hvala mojim prijateljima, kolegama iz moje V2 grupe i kolegama iz NSBa, na potpori i svim zajedničkim trenucima.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Botanička obilježja vrsta roda <i>Artemisia</i> L.	2
1.1.1. <i>Artemisia alba</i> Turra	3
1.1.2. <i>Artemisia arborescens</i> (Valill.) L.	4
1.1.3. <i>Artemisia absinthium</i> L.	5
1.2. Pregled dosadašnjih istraživanja odabranih vrsta roda <i>Artemisia</i> L.	6
1.3. Polifenoli kao bioaktivne sastavnice roda <i>Artemisia</i> L.	8
1.4. Oksidacijski stres i antioksidansi	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME	12
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Istraživani biljni materijal	15
3.2. Instrumenti i pribor	15
3.3. Reagensi, kemikalije i ostali standardi	15
3.4. Analiza polifenolnih sastavnica metodom tankoslojne kromatografije	17
3.4.1. Priprema uzoraka i standarda	17
3.4.2. Ispitivanje flavonoidnih glikozida	17
3.4.3. Ispitivanje fenolnih kiselina	18
3.4.4. Ispitivanje seskviterpenskih laktona	18
3.4.5. Ispitivanje diterpena	18
3.5. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja polifenola	18
3.5.1. Određivanje flavonoida	18
3.5.2. Određivanje fenolnih kiselina	20
3.6. Istraživanje antioksidacijskog djelovanja	21
3.6.1. Priprema uzoraka i standarda	21
3.6.2. Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala	21
3.6.3. Određivanje sposobnosti redukcije iona željeza(III)	22
3.6.4. Određivanje sposobnosti keliranja iona željeza (II)	22
3.7. Statistička analiza	23

4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. TLC karakterizacija polifenolnih sastavnica	25
4.1.1. Flavonoidi	25
4.1.2. Fenolne kiseline	30
4.1.3. Seskviterpenski laktoni	31
4.1.4. Diterpeni	34
4.2. Sadržaj polifenolnih sastavnica određen spektrofotometrijskim metodama	36
4.2.1. Flavonoidi	36
4.2.2. Fenolne kiseline	36
4.3. Antioksidacijsko djelovanje	37
4.3.1. Sposobnost hvatanja DPPH radikala	37
4.3.2. Redukcijska sposobnost	40
4.3.3. Kelirajuća aktivnost	42
5. ZAKLJUČCI	44
6. LITERATURA	46
7. SAŽETAK/SUMMARY	50
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD



Rod *Artemisia* L. obuhvaća oko 500 vrsta i je jedan od najvećih rodova porodice glavočika (Asteraceae, prije Compositae). Vrste roda *Artemisia* prevladavaju uglavnom u suhim područjima sjevernog umjerenog pojasa s godišnjom količinom padalina manjom od 500 mm/m². Ljudi su od antičkih vremena mnoge vrste koristili kao narodne lijekove za smanjenje sluzi, ublažavanje kašlja, poboljšanje cirkulacije krvi, zaustavljanje boli, izazivanje znojenja, poticanje diureze, kao antihipertenzive, antihelmintike i antialergijske tvari. Za mnoge vrste roda *Artemisia* je dokazano da sadrže više vrsta sekundarnih metabolita kao što su monoterpeni, seskviterpeni, flavonoidi, kumarini, fenolne kiseline i steroli (Tan i sur., 1998). U Europskoj farmakopeji svoju monografiju ima samo droga *Absinthii herba*, koju čine listovi ili vršni dijelovi vrste *Artemisia absinthium* L., a koristi se kod privremenog gubitka apetita ili za liječenje blage žgaravice i poremećaja želuca/crijeva (www.ema.europa.eu). Danas se pojedine vrste koriste u proizvodnji likera (*A. absinthium*), začina (*A. dracunculus*), u medicini kao antihelmintici (*A. santonicum*) i novi, obećavajući izvor tvari s antimalarijskim učinkom (*A. annua*), te kao stočna hrana, kao ukras (*A. absinthium*, *A. caucasica*, *A. stelleriana* itd.) i kao sredstva za stabilizaciju tla na zemljištima kao što su autoceste, željeznice i rudnici (Vallès i McArthur, 2001). U okviru ovog diplomskog rada istražit će se fitokemijski sastav i antioksidacijski učinak vrsta *Artemisia alba* Turra (sivkasti pelin), *Artemisia arborescens* (Vaill.) L. (grmoliki pelin) i *Artemisia absinthium* L. (gorski pelin).

1.1. Botanička obilježja vrsta roda *Artemisia* L.

Vrste roda *Artemisia* pripadaju porodici Asteraceae i najčešće su višegodišnji grmovi (samo 5 % roda su jednogodišnje ili dvogodišnje vrste). Listovi su izmjenični, jednostruko ili višestruko perasti (iznimno cjeloviti, kao u *A. dracunculus* i *A. cana*), veoma raznolikih oblika i veličina. Cvjetnih glavica je mnogo, ali su male, obično viseće u grozdovima, klasovima ili metlicama, a često su i pognute, u vlatastom ili glavičastom cvatu. Plodovi su valjkasti ili spljošteni, često sluzavi. Cvjetovi su cjevasti (Vallès i McArthur, 2001; Domac 1994; Tutin i sur., 1976).

1.1.1. *Artemisia alba* Turra

Sivkasti pelin (Slika 1) je polugrm visine 30-100 cm koji miriše na kamfor. Stabljike su uspravne ili povijene, gole ili obrasle pahuljasto-pustenastim dlakama. Listovi su na peteljka, dugi 2-4 cm, malo dlakavi ili obrasli sivo do bijelo pustenastim dlakama. Donji listovi su dvostruko, a gornji jednostruko perasti. Cvjetne glavice su na kratkim stapkama, gotovo kuglaste, promjera do 0,5 cm, pognute, skupljene u jednostavnu metlicu. Cvjetovi su žuti. Plod je obrnuto jajolika roška. Biljka raste na suhim livadama i stjenovitim padinama do 1300 m nadmorske visine (Forenbacher, 1990; Younsi i sur., 2016).



Slika 1. *Artemisia alba* L. (preuzeto s <http://www.deeprooot.co.uk> i <https://commons.wikimedia.org>)

1.1.2. *Artemisia arborescens* (Vaill.) L.

Grmoliki pelin (Slika 2) je višegodišnji, gusti, žbunjasti grm, aromatičnog mirisa, visok 50-100 cm. Stabljike su uspravne, vrlo razgranate, bijele od pustenastih dlaka koje ih prekrivaju, lignificirane u podnožju. Listovi (3-5 cm) su naizmjenični, svilenobijeli, trostruko perasto razdijeljeni, dugih peteljki, s linearnim segmentima, tupi na vrhu, širine 1-2 mm. Gornji listovi su manji i sitniji, dvostruko perasto razdijeljeni. Kuglaste, polukružne (6-7 mm) cvjetne glave na peteljkama, viseće prije cvatnje, su raspoređene unilateralno u guste metlice. Cvjetovi su cjevasti (2 mm), svijetlo žute boje, kasnije smečkasti, ženski su na periferiji, a na disku dvospolni. Ovojni listići su linerani, svilenkasti i suhokožičasti na rubu. Plod je roška, klinasta, prekrivena žutim žlijezdama (Tutin i sur, 1976).



Slika 2. *Artemisia arborescens* (Valill.) L. (preuzeto s <https://www.morningsunherbfarm.com> i <http://temperate.theferns.info>)

1.1.3. *Artemisia absinthium* L.

Gorki pelin (Slika 3) je višegodišnja, zeljasta, aromatična, u donjem dijelu drvenasta trajnica ili polugrm visine 30-90 cm sa svilenastom, dlakavom, uzdužno izbrazdanom stabljikom sa svijetlom srčikom. Podanak je odrvenjeo, jako razgranat. Listovi su s peteljkom, dvostruko ili trostruko perasto razdijeljeni do rascijepljeni, najčešće tupa vrha, s gornje strane sivozeleni, s donje sivkasti, s obje strane (osobito s donje) svilenasto dlakavi. Donji listovi ogranaka su na peteljci, perasto razdijeljeni do rascijepljeni, dok su listovi cvata sjedeći, suličasti, cjeloviti. Polukuglaste glavice (3 mm) su na kratkoj stapci, viseće, skupljene u rahle, dugačke metlice. Ovoj je dug 2-3 mm, s duguljastim, zeljastim vanjskim ovojnim listićima, dok su unutarnji listići jajasti, zeljasti, sa širokim suhokožičastim rubom. Os cvata je dlakava, a cvjetovi cjevasti, plodni (rubni ženski, a ostali dvospolni), s golim, žućkastim vjenčićem. Roška je gola. Cijela biljka je jakog mirisa. Raste na suhim, kamenitim staništima, uz rubove putova i šuma te na neobrađenim površinama (Grdinić i Kremer, 2009).



Slika 3. *Artemisia absinthium* L. (preuzeto s <https://www.plantea.com.hr>)

1.2. Pregled dosadašnjih istraživanja odabranih vrsta roda *Artemisia* L.

Trendafilova i suradnici (2018.) su ispitali polifenolni sastav metanolnog ekstrakta cvjetova i listova vrste *A. alba*, te njihovu antioksidacijsku učinkovitost. Ekstrakt cvjetova je sadržavao više fenolnih spojeva i flavonoida te je pokazao bolju antioksidacijsku aktivnost. UPLC-PDA-MS metodom analizirani su ekstrakti koji su pokazali sličan sastav pri čemu je identificirana 31 komponenta.

Elsharkawy i Shiboob (2017.) su proučavali fitokemijski sastav i antioksidativni učinak biljne vrste *A. herba alba* koja raste u Egiptu i Saudijskoj Arabiji. GC-MS metodom su analizirali metanolni ekstrakt vršnih dijelova biljke. Došli su do rezultata da *A. herba alba* sadržava visoke koncentracije fenolnih sastavnica i flavonoida, umjereno su prisutni steroli i alkaloidi, a tanina nema. Najviši udio u sastavu *A. herba alba* iz Saudijske Arabije čini metil-cinamat s 8,2%. Takav sastav fenolnih kiselina biljke javlja se kao prilagodba na promjene u okolišu i visoke temperature staništa. Antioksidacijski potencijal droga je procijenjen DPPH metodom. Dobiven je IC_{50} 0,122 mg/mL za *A. herba alba* iz Saudijske Arabije, i IC_{50} 1,7 mg/mL za uzorak iz Egipta.

Skupina znanstvenika je 2016. okarakterizirala fenolni sastav, sastav eteričnog ulja i antioksidacijski kapacitet četiri uzorka vrste *A. herba alba*, koji su sakupljeni u sjevernoj i središnjoj regiji Tunisa, u svrhu pronalaženja vrste s optimalnim sastavom bioaktivnih spojeva. Kvantitativna analiza metanolnih ekstrakata ispitivanih vrsta provedena je RP-HPLC metodom. Ukupni udio polifenola iznosio je 9-18 mg GAE/g (miligrami ekvivalenata galne kiseline/g), a ukupni udio flavonoida 16-44 mg CE/g (miligrami ekvivalenata katehina/g). Udio fenolnih kiselina iznosio je 45-65 %, a udio flavonoida 24-42%. Kemferol (12%), apigenin (11%), naringenin (20%), p-kumarinska kiselina (23%), trans-cimetna kiselina (11%) i kavena kiselina (14%) bile su najzastupljenije sastavnice. Utvrđene su značajne razlike u prinosima eteričnih ulja (0,4-1,2%) između proučavanih vrsta i razlučena su tri različita kemotipa ulja: kamfor, fenhol/ α -tujon i α -tujon/kamfor. Opaženo je da je viši udio polifenolnih sastavnica nađen u vrstama koje rastu u središnjem Tunisu što se povezuje sa višim temperaturama i manjom količinom oborina u usporedbi sa sjeverom. Antioksidacijski potencijal je određen dvjema metodama, sposobnošću hvatanja DPPH radikala i redukcijskom sposobnošću. U prvoj navedenoj metodi je IC_{50} iznosio 3 μ g/mL, a u drugoj se IC_{50} kretao 0,10-0,36 μ g/mL, ovisno o promatranoj vrsti. Zaključak studije je da geografsko podrijetlo biljaka ima utjecaj na fitokemijski sastav, odnosno da su biljke na sjeveru Tunisa

bogate eteričnim uljima, dok biljke u središnjem dijelu Tunisa obiluju polifenolima i flavonoidima (Bourgou i sur., 2016).

Younsi i sur. (2016.) su LC-PDA/ESI-MS metodom analizirali metanolni ekstrakt vršnih dijelova vrste *A. alba* iz Tunisa. Svrha istraživanja bila je analizirati eterično ulje biljke i polifenolni sastav metanolnog ekstrakta te odrediti njegovu antioksidacijsku, antiacetilkolinesteraznu i antibakterijsku aktivnost. Identificirani su glikozidi apigenina i kvercetina te klorogenska kiselina i derivati klorogenske kiseline. Udio ukupnih fenola iznosio je 27,65 mg GAE/g DW (mg ekvivalenta galne kiseline po gramu suhe tvari), flavonoida 13,96 mg RE/g DW (mg ekvivalenta rutina po gramu suhe tvari), flavonola 0,085 mg QE/g DW (mg ekvivalenta kvercetina po gramu suhe tvari), a flavanola 1.68 mg CE/g DW (mg ekvivalenta katehina po gramu suhe tvari). Udio ukupnih fenola i flavonoida bio je viši nego u drugim studijama koje su proučavale vrstu *A. herba alba* iz južnih dijelova Tunisa. Pronađeno je da eterično ulje pokazuje vrlo visoku inhibitornu aktivnost na acetilkolinesterazu. Antioksidacijski potencijal metanolnog ekstrakta vrste *A. alba* je određen mjerenjem aktivnosti uklanjanja DPPH radikala, testom inhibicije izbjeljivanja β -karotena, testom sposobnosti redukcije iona željeza (FRAP) i sposobnosti keliranja iona željeza. Dobivene IC₅₀ vrijednosti iznosile su 100, 524 i 1720 μ g/mL za DPPH metodu, test izbjeljivanja β -karotena i metodu keliranja iona željeza, a sposobnost redukcije iona željeza iznosila je 372 μ mol Fe²⁺/g. Osnovne sastavnice koje pridonose visokom antioksidacijskom potencijalu promatrane vrste su flavonoidni glikozidi te fenolne kiseline, posebno derivati klorogenske kiseline. Ispitivanje antibakterijskog učinka pokazalo je da su metanolni ekstrakt i eterično ulje vrste *A. herba-alba* učinkoviti protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija.

Araniti i sur. (2016.) su analizirali fitotoksičnu aktivnost i fitokemijski sastav otpalih listova vrste *A. arborescens*. Uzorci listova odabrane vrste su sakupljeni na jugu Italije. Bioaktivne molekule su karakterizirane pomoću GC-MS i HPTLC metode. Ukupni udio polifenola u metanolnom ekstraktu bio je 110,67 mg/g (ekvivalentno oko 25 mg klorogenske kiseline/g DW) čiji je sadržaj flavonoida oko 40 % (ekvivalentno oko 10 mg kvercetina/g DW). Dokazana je prisutnost rutina i kvercetina, klorogenske kiseline, katehina, luteolina, kavene i p-kumarinske kiseline. U najvišim količinama javile su se klorogenska kiselina (55,09 mg/g ekstrakta), kvercitrin (49,65 mg/g) i katehin (41,76 mg/g) zajedno s rutinom (36,84 mg/g ekstrakta). U manjim količinama nađene su kavena kiselina (28,83 mg/g), p-kumarinska kiselina (27,76 mg/g) i luteolin (20,89 mg/g).

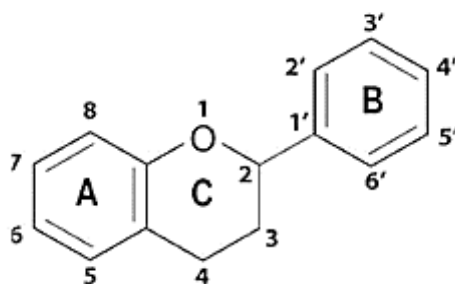
Skupina znanstvenika je analizirala uzorke vršnih dijelova vrste *A. arborescens* s planine Nebrodi (Messina, Italija). Dvodimenzionalnom plinskom kromatografijom (GCxGC) analiziran je sastav eteričnog ulja te je dokazana prisutnost kamazulena, kamfora, β -tujona, mircena i α -pinena. Ujedno je provedena analiza diklormetanskog ekstrakta odabrane biljne vrste HPLC-PDA i HPLC-APCI-MS metodama. Identificirano je 6 polimetoksiflavona, a tri od njih, krizosplenetin, eupatin i kirsilineol, su opisani prvi put u ovoj vrsti. Antiangiogena aktivnost ispitivana je u diklormetanskom ekstraktu pomoću dva in vivo modela, a rezultati su pokazali da je ekstrakt prouzrokovao smanjenje formiranja krvnih žila (Costa i sur., 2016). Koyuncu (2018.) je ispitao antikarcinogeni i antioksidacijski učinak metanolnog ekstrakta vrste *A. absinthium* te odredio fenolne sastavnice prisutne u ekstraktu. Ekstrakt je pokazao dobar antioksidacijski učinak te citotoksični učinak na staničnim linijama DLD-1 i ECC-1. LC-MS/MS metodom određene su polifenolne sastavnice metanolnog ekstrakta pri čemu su najzastupljenije bile klorogenska kiselina, kina kiselina, cimetna kiselina i roifolin. Msaada i sur. (2015.) su također dokazali da metanolni ekstrakt vrste *A. absinthium* sadržava veliki udio fenolnih kiselina kao što su galna, klorogenska, kavena i ružmarinska kiselina.

1.3. Polifenoli kao bioaktvine sastavnice roda *Artemisia* L.

Polifenoli su široko rasprostranjeni u biljnom svijetu. Imaju veoma bitnu ulogu u fiziologiji biljaka jer su uključeni u različite funkcije kao što su struktura, pigmentacija, oprašivanje, otpornost na patogene i biljojede, te rast i razvoj. Netopljivi fenoli se nalaze u sastavu staničnog zida te doprinose mehaničkoj čvrstoći staničnog zida i imaju regulatornu ulogu u rastu biljke i njezinoj morfogenezi. Topljivi fenoli se nalaze u vakuolama i sudjeluju u odgovoru na oksidacijski stres i patogene.

Za strukturu biljnih polifenola karakteristična je prisutnost hidroksi-supstituiranog benzenskog prstena, tj. da ima više od jedne fenolne hidroksilne skupine vezane na jedan ili više benzenskih prstena. Ovisno o broju prisutnih fenolnih prstenova i strukturnim elementima koji povezuju te prstenove međusobno, možemo ih podijeliti u nekoliko skupina: flavonoidi, fenolne kiseline, stilbeni i lignani (Vladimir-Knežević i sur., 2012).

Flavonoidi predstavljaju najveću skupinu biljnih polifenola s više od 6000 identificiranih struktura. Osnovnu strukturu flavonoida čine dvije benzenske jezgre (A i B) povezane s propanskim lancem ($C_6-C_3-C_6$) koji uglavnom s atomom kisika čini piranski prsten (C) (Slika 4).



Slika 4. Osnovna struktura flavonoida

Uzevši u obzir strukturne razlike uvjetovane stupnjem oksidacije heterocikličkog prstena, te brojem i položajem hidroksilnih skupina na benzenskim jezgrama, razlikujemo šest podtipova flavonoida: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli, antocijani i izoflavonoidi. Flavonoidi se rjeđe javljaju u slobodnom obliku, uglavnom su glikozidno vezani i dolaze kao O-glikozidi, a ponekad i kao C-glikozidi. Šećerna komponenta O-glikozida vezana je na hidroksilnu skupinu aglikona u položaju C3 ili C7. Šećernu komponentu najčešće čine monosaharidi glukoza, ramnoza, galaktoza i arabinoza ili disaharid rutinoza (Vladimir-Knežević i sur., 2012).

S obzirom na široku rasprostranjenost i raznolikost kemijske strukture flavonoida, dokazani su i brojni biološki učinci na kojima se temelji uporaba droga s flavonoidima. Za pojedine flavonoide znanstveno je dokazano antioksidacijsko, protuupalno, antimikrobno, antivirusno, protutumorsko, antidijabetičko, kardioprotektivno, antitrombozno, estrogeno te spazmolitičko djelovanje (Chen i sur., 2015; Kumar i Pandey, 2013; Romano i sur., 2013).

Fenolne kiseline strukturno pripadaju skupini fenolnih spojeva koji nastaju kao sekundarni metaboliti biljaka te imaju najmanje jednu karboksilnu funkcionalnu skupinu (Robbins, 2003). Iako bi se u navedenu skupinu mogli uvrstiti svi organski spojevi s najmanje jednom karboksilnom i jednom fenolnom hidroksilnom skupinom, fitokemičari tako nazivaju isključivo derivate benzojeve i cimetne kiseline (Slika 5a i 5b). Prema strukturi fenolne kiseline svrstavaju se u dvije skupine: hidroksibenzojeve kiseline i hidroksicimetne kiseline. Hidroksibenzojeve kiseline predstavljaju skupinu hidroksiliranih derivata benzojeve kiseline s osnovnom strukturnom jedinicom C₆-C₁, a međusobno se razlikuju u hidroksilaciji i metilaciji benzenskog prstena. Rasprostranjene su najčešće u slobodnom obliku, a mogu biti i u obliku estera i glikozida. Poznati su i njihovi aldehidi: vanilin (najrašireniji), anisaldehyd i salicilaldehid.

Hidroksicimetne kiseline s osnovnom strukturnom jedinicom C₆-C₃ su hidroksilirani derivati cimetne kiseline (Bruneton, 1999). Nastaju kao produkti metabolizma fenilalanina i rjeđe tirozina. U biljkama su češće prisutne nego hidroksibenzojeve kiseline, a mnoge od njih su široko rasprostranjene (o-kumarinska, kavena, ferulična i sinapna kiselina) u žitaricama, mahunarkama, sjemenkama, voću i povrću (Shahidi i Nazck, 2004). Rijetko su prisutne u slobodnom obliku, a češće u obliku estera s alifatskim alkoholima ili kina kiselinom. Također se nalaze u obliku amida ili u kombinaciji sa šećerima, kao što su glukozni esteri ili eteri. Hidroksicimetne kiseline često stvaraju estere s hidroksilnim skupinama drugih sekundarnih metabolita (Bruneton, 1999).



Slika 5. Osnovne strukture hidroksibenzojevih (a) i hidroksicimetnih kiselina (b)

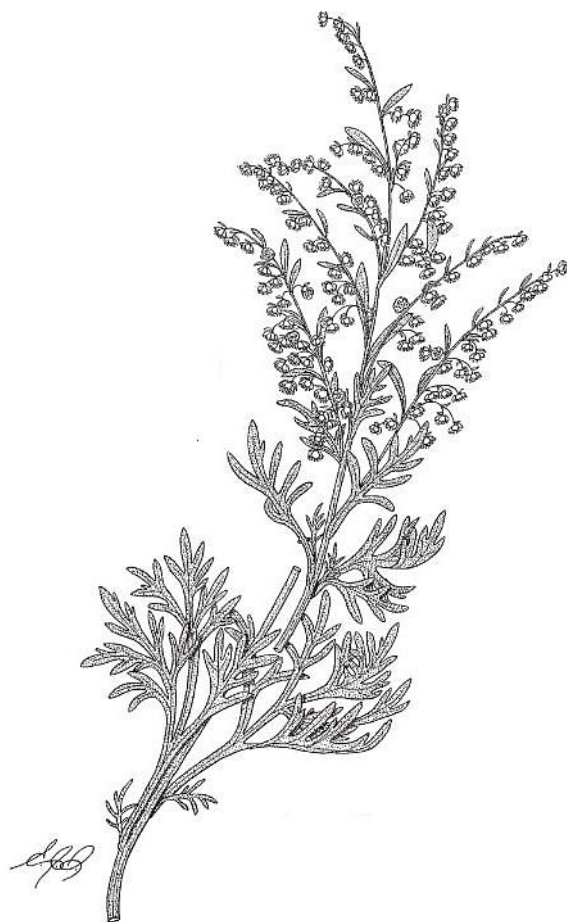
1.4. Oksidacijski stres i antioksidansi

U ljudskim stanicama se normalno, usred reakcija metaboliziranja, odvijaju i redoks reakcije tijekom kojih nastaju slobodni radikali, ali oni mogu nastati i kao rezultat negativnih utjecaja vanjskih čimbenika. Pod pojmom oksidacijskog stresa podrazumijeva se stanje u kojem su oksidoreduktivni procesi pomaknuti prema oksidaciji, tj. prema prekomjernom stvaranju kisikovih spojeva, a previše slobodnih radikala nadmašuje mogućnost njihova uklanjanja. Oksidacijski stres ima važnu ulogu u nastanku i razvoju brojnih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativne bolesti, upalne bolesti, karcinomi, dijabetes te sami proces starenja. S obzirom da je incidencija takvih bolesti danas povećana zbog stresnog i užurbanog stila života sve više se radi na istraživanju ljekovitih biljaka kao izvora prirodnih antioksidansa.

Sustavi antioksidacijske obrane u ljudskom tijelu su enzimski (superoksid dismutaza, katalaza, glutathion peroksidaza) i neenzimski (vitamini C i E, glutathion). Endogeni zaštitni sustav nije uvijek dovoljan za obranu organizma od oksidacijskog stresa kojem je izložen pa stoga u novije vrijeme veliku popularnost stječu egzogeni antioksidansi prirodnog porijekla. Antioksidansi su raznorodna skupina molekula koje, prisutne u niskim koncentracijama u usporedbi s koncentracijama oksidativnog supstrata, značajno odgađaju ili sprječavaju oksidaciju tog supstrata (Halliwell i Gutteridge, 1995). Glavni mehanizmi antioksidacijskog i

protektivnog djelovanja polifenola na važne biološke molekule ostvaruju se uklanjanjem slobodnih radikala, sprječavanjem njihovog nastajanja putem keliranja metalnih iona, njihovom redukcijskom sposobnošću, inhibicijom lipidne peroksidacije, regulacijom obrambenih enzima i djelovanjem na stanične signalne puteve i ekspresiju gena (Kindl i sur., 2015).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

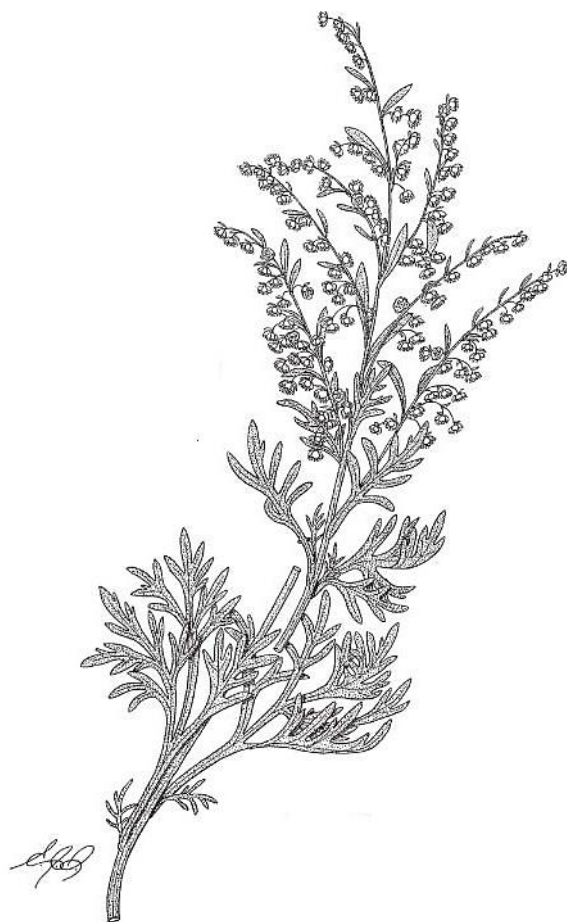


Zbog rastućeg znanstvenog interesa za istraživanje učinka polifenola na prevenciju i liječenje brojnih bolesti raste i broj istraživanja biljnih vrsta kao novih izvora polifenolnih spojeva. U okviru ovog diplomskog rada istražene su tri vrste roda *Artemisia*: *A. alba*, *A. arborescens* i *A. absinthium*. U Europskoj farmakopeji (EDQM, 2018). zastupljena je samo monografija droge *Absinthii herba*, koju čine listovi ili zeleni vršni dijelovi vrste *A. absinthium* L., a smatra se učinkovitom za terapiju privremenog gubitka apetita ili za blage žgaravice i poremećaje želuca/crijeva (www.wma.europea.eu). Ljekovita svojstva drugih vrsta iz tog roda su od davnina prepoznata među brojnim narodima te su tako našla svoje mjesto u tradicionalnoj medicini. Upravo zato je cilj ovog diplomskog rada analizirati fitokemijski sastav i antioksidacijsko djelovanje listova i grančica odabranih vrsta roda *Artemisia* te procijeniti njihov biomedicinski potencijal.

Provedena su istraživanja sa sljedećim ciljevima:

- ✓ provesti usporednu fitokemijsku analizu polifenolnih sastavnica u listovima i grančicama odabranih vrsta roda *Artemisia*,
- ✓ primjenom tankoslojne kromatografije (TLC) provesti kvalitativnu analizu polifenola i terpena,
- ✓ različitim spektrofotometrijskim metodama analizirati sadržaj polifenolnih bioaktivnih sastavnica,
- ✓ ispitati antioksidacijsko djelovanje etanolnih ekstrakata listova i grančica odabranih vrsta roda *Artemisia*, primjenom različitih spektrofotometrijskih metoda:
 - odrediti sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala,
 - ispitati moć redukcije iona željeza (III),
 - istražiti sposobnost keliranja iona željeza (II).

3. MATERIJALI I METODE



3.1. Istraživani biljni materijal

U eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada korišteni su listovi i grančice triju vrsta roda *Artemisia* sakupljenih u nacionalnom parku Majella u Italiji u lipnju i srpnju 2018. godine. Identifikacija biljnog materijala provedena je na Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta prema dostupnim literaturnim podacima (Domac, 1994; Tutin i sur., 1976). Prikupljeni biljni materijal osušen je na zraku pri sobnoj temperaturi, uz zaštitu od svjetlosti.

3.2. Instrumenti i pribor

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su sljedeći instrumenti:

- ✓ analitička vaga (Mettler-Toledo, Švicarska-SAD)
- ✓ ploče za tankoslojnu kromatografiju silikagel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ✓ rotacijski vakuum uparivač Büchi (Büchi Labortechnik AG, Postfach, Švicarska)
- ✓ termostat (Inko, Zagreb, Hrvatska)
- ✓ ultrazvučna kupelj Sonorex Digital 10 P (Bandelin, Berlin, Njemačka)
- ✓ UV lampa (Camag, Muttenz, Švicarska)
- ✓ UV-Vis spektrofotometar Helios γ (Spectronic Unicam, Cambridge, Velika Britanija)
- ✓ vodena kupelj (Inko, Zagreb, Hrvatska)

3.3. Reagensi, kemikalije i ostali standardi

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su sljedeći reagensi, standardi i ostale kemikalije:

- ✓ aceton (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- ✓ aluminijev klorid heksahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ✓ 2-aminoetil-difenilborat (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ✓ anisaldehyd (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- ✓ butanol (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- ✓ butil-hidroksitoluen (BHT) (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ✓ 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- ✓ diizopropil-eter (T.T.T., Zagreb, Hrvatska)
- ✓ diklormetan (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ✓ etanol 96 % p.a. (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- ✓ etil-acetat (POCH S. A., Gliwice, Poljska)
- ✓ etil-formijat (Fluka, Buchs, Švicarska)

- ✓ etilendiamin tetraoctena kiselina (EDTA) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ✓ etil-formijat ≥ 97 % (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ✓ ferozin (dinatrijeva sol 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazin-4',4''-disulfonske kiseline) (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- ✓ Folin-Ciocalteu reagens (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ✓ heksametilentetramin (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ✓ kalijev heksacijanoferat (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ✓ kloridna kiselina 37 % (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- ✓ klorogenska kiselina 98% (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- ✓ kožni prašak (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- ✓ metanol (T.T.T., Zagreb, Hrvatska)
- ✓ mravlja kiselina 98-100 % (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ✓ natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ✓ natrijev hidrogenfosfat dihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ✓ natrijev karbonat dekahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ✓ natrijev molibdat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ✓ natrijev nitrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ✓ natrijev sulfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ✓ octena kiselina $\geq 99,5$ % (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- ✓ polietilenglikol 4000 (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ✓ sulfatna kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ✓ toluen (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- ✓ trikloroctena kiselina (Acros Organics, Geel, Belgija)
- ✓ troloks ≥ 98 % (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ✓ vanilin ≥ 98 % (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ✓ željezov(III) klorid heksahidrat (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ✓ željezov(II) klorid (Fluka, Buchs, Švicarska)

3.4. Analiza polifenolnih sastavnica metodom tankoslojne kromatografije

3.4.1. Priprema uzoraka i standarda

Biljni materijal se suši na zraku te samelje u prah. Uzima se po 1 g praškastog uzorka i ekstrahira 10 minuta s 10 mL metanola na vodenoj kupelji pri 60 °C, uz povratno hladilo.

Dobiveni filtrati (Slika 6) koriste su kao ispitivane otopine za kromatografska ispitivanja prisutnosti flavonoida, fenolnih kiselina, seskviterpenskih laktona i diterpena. Otopine standardnih flavonoidnih glikozida (kvercitrin, izokvercitrin i rutin), flavonoidnih aglikona (luteolin i apigenin) i fenolnih kiselina (klorogenska i ružmarinska kiselina) pripremaju su otapanjem u metanolu u koncentraciji od 0,05 % (Wagner i Bladt, 2009).



Slika 6. Filtriranje metanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Artemisia*

3.4.2. Ispitivanje flavonoidnih glikozida

TLC analiza flavonoidnih glikozida provodi se na pločama s tankim slojem silikagela 60 F₂₅₄, na koje se pomoću kapilare linijski (10 mm duljine) nanose uzorci i otopine poredbenih supstancija (10 µL). Kao pokretna faza za odjeljivanje flavonoidnih glikozida koristi se smjesa etil-acetata, mravlje kiseline i vode u volumnim omjerima 8:1:1 (V/V/V) (Blažeković i sur., 2006). Uz navedeno, izvode se dva ispitivanja prisutnost flavonoidnih aglikona korištenjem različitih pokretnih faza. Prva korištena pokretna faza je smjesa otapala toluena, etil-formijata i mravlje kiseline u volumnim omjerima 5:4:1 (V/V/V), a druga je smjesa kloroforma i etila-acetata u volumnom omjeru 6:4 (V/V). Odijeljene sastavnice detektiraju se nakon prskanja kromatograma modificiranim Naturstoff-reagensom (1 %-tna metanolna otopina 2-aminoetil-difenilborata i 5 %-tna etanolna otopina polietilenglikola 4000, NST/PEG) i promatranjem ploče pod UV svjetlom na 365 nm (Wagner i Bladt, 2009).

3.4.3. Ispitivanje fenolnih kiselina

Dokazivanje fenolnih kiselina provodi se TLC analizom na pločama s tankim slojem silikagela 60 F₂₅₄, na koje se pomoću kapilare linijski (10 mm duljine) nanose uzorci i otopine standarda (10 µL). Kao pokretna faza za odjeljivanje fenolnih kiselina koristi se smjesa otopina diizopropil-etera, acetona, mravlje kiseline i vode u volumnim omjerima 5:3:1:1 (V/V/V/V). Za detektiranje odijeljenih sastavnica se kromatografska ploča prska modificiranim Naturstoff-reagensom (1 %-tna metanolna otopina 2-aminoetildifenilborata i 5 %-tna etanolna otopina polietilenglikola 4000, NST/PEG) i promatra pod UV svjetlom na 365 nm (Wagner i Bladt, 2009).

3.4.4. Ispitivanje seskviterpenskih laktona

TLC analiza seskviterpenskih laktona provodi se na pločama s tankim slojem silikagela 60 F₂₅₄, na koje se pomoću kapilare linijski (10 mm duljine) nanose uzorci (10 µL). Pokretna faza je smjesa diklormetana i acetona u volumnom omjeru 85:15 (V/V). Za detekciju odijeljenih sastavnica kod prvog ispitivanja se kromatogram prska 50%-tnom otopinom sulfatne kiseline (50% H₂SO₄) i promatra pod UV svjetlom na 365 nm, a kod drugog ispitivanja se kromatogram prska vanilin-sulfatnom kiselinom i promatra na vidljivom svjetlu (Wagner i Bladt, 2009).

3.4.5. Ispitivanje diterpena

Dokazivanje diterpena provodi se TLC analizom na pločama s tankim slojem silikagela 60 F₂₅₄, na koje se pomoću kapilare linijski (10 mm duljine) nanose uzorci (10 µL). Kao pokretna faza koristi se smjesa otopina metanola i vode u volumnom omjeru 90:10 (V/V). Detekcija se vrši prskanjem kromatografske ploče anisaldehyd sulfatnom kiselinom i promatra pod UV svjetlom na 254 nm (Shami AMM, 2016).

3.5. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja polifenola

3.5.1. Određivanje flavonoida

Određivanje sadržaja flavonoida u istraživanim biljnim uzorcima provodi se spektrofotometrijskom metodom prema farmakopejskom postupku (EDQM, 2018). 0,600 g suhog biljnog materijala usitnjenog u prah prenese se u tikvicu okruglog dna od 100 mL. Zatim se dodaje 1 mL 5 g/L otopine heksametilentetramina, 20 mL acetona i 2 mL kloridne kiseline (250 g/L), te se sadržaj zagrijava 30 minuta na vodenoj kupelji (70 °C), uz povratno

hladilo (Slika 7a). Hidrolizat se filtrira preko malo pamuka (Slika 7b), a ostaci droge u tikvici i na pamuku (zajedno s pamukom) se ponovno ekstrahiraju dva puta s 20 mL acetona, zagrijavanjem tijekom 10 minuta. Nakon hlađenja, sjedinjeni filtrati se filtriraju preko filter papira uz ispiranje tikvice i filter papira te se otopina razrjeđuje acetonom do 100,0 mL. 20,0 mL acetonskog ekstrakta se prenese u lijevak za odjeljivanje i pomiješa s 20 mL vode. Sadržaj u lijevku se izmućkava s 15 mL etilacetata, a potom tri puta s po 10 mL etil-acetata (Slika 7c). Etil-acetatni slojevi se sjedinjuju i ispiru dva puta s 50 mL vode te filtriraju preko 10 g bezvodnog natrijevog sulfata u odmjerne tikvici od 50,0 mL (Slika 7d). Sadržaj tikvice se nadopunjuje etil-acetatom do oznake.

Za pripremu ispitivane otopine uzima se 10,0 mL dobivenog etilacetatnog ekstrakta, pomiješa s 1,0 mL reagensa aluminijevog klorida (2,0 g aluminijskog klorida heksahidrata otopljen u 100 mL 5 %-tne metanolne otopine octene kiseline) u odmjerne tikvici od 25,0 mL i razrijedi s 5 %-tnom metanolnom otopinom octene kiseline do oznake. Za pripremu poredbene otopine se 10,0 mL etilacetatnog ekstrakta razrijedi do 25,0 mL s 5 %-tnom metanolnom otopinom octene kiseline. Apsorbancija ispitivane otopine izmjeri se nakon 30 minuta na 425 nm u odnosu na poredbenu otopinu. Maseni udio flavonoida, izražen kao hiperozid, izračunava se prema izrazu:

$$\% \text{ flavonoida} = \frac{A \times 1,25}{m}$$

gdje je A apsorbancija ispitivane otopine na 425 nm, a m masa droge u gramima.



Slika 7. Određivanje flavonoida (a) ekstrakcija na vodenoj kupelji uz povratno hladilo (b) filtriranje preko pamuka (c) izmučkivanje s etilacetatom (d) filtriranje preko bezvodnog natrijevog sulfata

3.5.2. Određivanje fenolnih kiselina

Određivanje fenolnih kiselina provodi se spektrofotometrijski, a udio ukupnih fenolnih kiselina izražava se kao klorogenska kiselina (EDQM, 2018). Biljni materijal se usitni u prah. Uzima se 0,300 g praškastog uzorka i ekstrahira s 95 mL 50%-tnog etanola zagrijavanjem 30 minuta u tikvici na kipućoj vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Ekstrakt se zatim hladi i filtrira, a filtrat se u odmjernoj tikvici razrijedi 50%-tnim etanolom do 100,0 mL. Za dobivanje ispitivane otopine uzima se 1,0 mL dobivene otopine i prebaci u odmjernu tikvicu od 10 mL. Zatim se redom dodaju: 2,0 ml 0,5 M kloridne kiseline, 2,0 mL nitrit-molibdat reagensa (otopiti 10 g natrijeva nitrata i 10 g natrijeva molibdata u 100 mL vode), te 2,0 mL 8,5%-tne otopine natrijevog hidroksida. Sadržaj tikvice se dopuni vodom do oznake. Za poredbenu otopinu se pomiješa 1,0 mL ekstrakta s 2,0 mL 0,5 M kloridne kiseline i 2,0 mL 8,5%-tne otopine natrijevog hidroksida te se razrijedi destiliranom vodom do 10,0 mL. Apsorbancija ispitivane otopine se izmjeri odmah na 525 nm u odnosu na poredbenu otopinu. Maseni udio fenolnih kiselina (hidroksicimetnih derivata) izračunava se prema izrazu:

$$\% \text{ fenolnih kiselina} = \frac{A \times 5,3}{m}$$

uzimajući u obzir da je specifična apsorbancija klorogenske kiseline na 525 nm 188. Slovo A u jednadžbi predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine na 525 nm, a m predstavlja masu droge u gramima.

3.6. Istraživanje antioksidacijskog djelovanja

3.6.1. Priprema uzoraka i standarda

U svrhu ispitivanja antioksidacijskog učinka 10,00 g praškasto usitnjenog biljnog materijala ekstrahirano je sa 100 mL 70 %-tnog etanola i na ultrazvučnoj kupelji na 30 °C tijekom 30 minuta. Nakon filtriranja, biljnom materijalu je dodano novih 100 mL 70 %-tnog etanola te je ekstrakcija ponovljena. Dobiveni filtrati su sjedinjeni i upareni do suha pomoću rotacijskog vakuum-uparivača. Tikvica s ekstraktima ostavljene su 24 sata u eksikatoru a zatim izvagana te suhi ekstrakt čuvan u hladnjaku na 4 °C. Iskorištenja dobivenih ekstrakata bila su : *A. alba* – 14,31% i *A. arborescens* – 21,47%, *A. absinthium* – 29,82%.

3.6.2. Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala

Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala (antiradikalna aktivnost) ispituje se spektrofotometrijskom metodom opisanom u radu Vladimir-Knežević i sur. (2011). Suhi ekstrakti te klorogenska kiselina i troloks, kao referentni antioksidansi, otapaju se u etanolu te se serijskim razrjeđivanjem dobivaju nizovi testiranih koncentracija u rasponu koncentracija 0,2-100 µg/mL. Određivanja se provode u triplicatu. U kontrolne epruvete se umjesto uzorka stavlja 1,5 mL 96%-tnog etanola. Epruvetama s 1,5 mL etanolnih otopina uzoraka različitih koncentracija dodaje se po 0,5 mL svježe pripremljene 0,1 mM etanolne otopine DPPH radikala i sadržaj se snažno promućka. Reakcijska smjesa se inkubira na sobnoj temperaturi na tamnom mjestu tijekom 30 min, a zatim se mjeri apsorbancija ispitivanih otopina na valnoj duljini od 517 nm, uz 96 % etanol kao slijepu probu. Niža vrijednost apsorbancije upućuje na veće antioksidacijsko djelovanje. Sposobnost hvatanja DPPH radikala, izražena u postocima, izračunava se prema izrazu:

$$\% \text{ DPPH antiradikalne sposobnosti} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

gdje A_0 predstavlja apsorbanciju kontrolne otopine (etanola), dok A_1 predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine umanjenu za apsorbanciju samog uzorka.

3.6.3. Određivanje sposobnosti redukcije iona željeza(III)

Sposobnost redukcije iona željeza (III) ekstrakata roda *Artemisia* te klorogenske kiseline i referentnog antioksidansa butil-hidroksitoluena (BHT) u 96%-tnom EtOH ispituje se spektrofotometrijskom metodom (Vladimir-Knežević i sur., 2011). Priređuje se koncentracijski niz serijskim razrjeđivanjem uzoraka u rasponu koncentracija 0,2-100 µg/mL. Određivanje se provodi u triplicatu. U 1,0 mL uzorka dodaje se 2,5 mL fosfatnog pufera (0,2 M, pH 6,6) i 2,5 mL 1 %-tne otopine kalijeva heksacijanoferata. Smjesa se inkubira 20 minuta na 50 °C. Potom se u reakcijsku smjesu dodaje 2,5 mL 10 %-tne trikloroctene kiseline te po potrebi centrifugira. Uzima se 2,5 mL bistre otopine, prebacuje u drugu epruvetu i pomiješa s 2,5 mL destilirane vode i 0,5 mL 0,1 %-tne otopine željezovog (III) klorida. Apsorbancija dobivene otopine se mjeri na 700 nm, uz destiliranu vodu kao slijepu probu. Koncentracije ispitivanih uzoraka koje uzrokuju apsorbanciju od 0,500 odgovaraju 50 %-tnoj redukcijskoj sposobnosti (IC₅₀).

3.6.4. Određivanje sposobnosti keliranja iona željeza (II)

Sposobnost keliranja iona željeza (II) uzoraka vrste roda *Artemisia* određuje se spektrofotometrijskom metodom (Vladimir-Knežević i sur., 2011). Niz ispitivanih uzoraka se pripravlja serijskim razrjeđivanjem u 70 %-tnom etanolu u rasponu koncentracija 0,1-800 µg/mL. Određivanje se provodi u triplicatu. U kontrolne epruvete se umjesto uzorka stavlja 400 µL 70 %-tnog etanola. Ispitivanje se provodi u duplikatu. U 400 µL ispitivanog uzorka dodaje se 50 µL 2 mM otopine željezovog (II) klorida, a zatim 3,35 mL 96 % etanola te ostavi stajati 5 min. Potom se dodaje 200 µL 5mM otopine ferozina, otopina se snažno promućka i ostavi 10 minuta stajati na sobnoj temperaturi. Apsorbancija otopine mjeri se na 562 nm, uz etanol kao slijepu probu. Usporedno se testira EDTA kao referentni kelator. Postotak inhibicije formiranja ferozin-Fe²⁺ kompleksa, odnosno učinak keliranja metalnih iona, izračunava se prema izrazu:

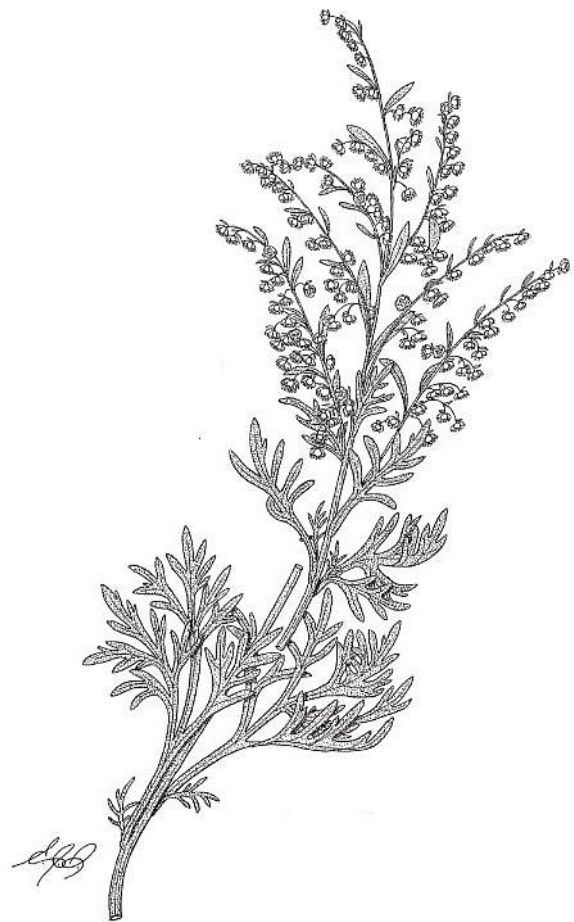
$$\% \text{ keliranja željeza (II)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

gdje je A₀ apsorbancija kontrolne otopine bez uzorka, a A₁ apsorbancija ispitivane otopine korigirana za vrijednost absorbancije samog uzorka.

3.7. Statistička analiza

Za statističku obradu dobivenih rezultata korišten je računalni program Microsoft Excel programskog paketa Microsoft Office 365 (Microsoft, SAD). Dobiveni podaci prikazani su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija dva određivanja. Koncentracije uzoraka koje ostvaruju 50 %-tni učinak (IC_{50}) dobivene su interpolacijom na temelju linearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

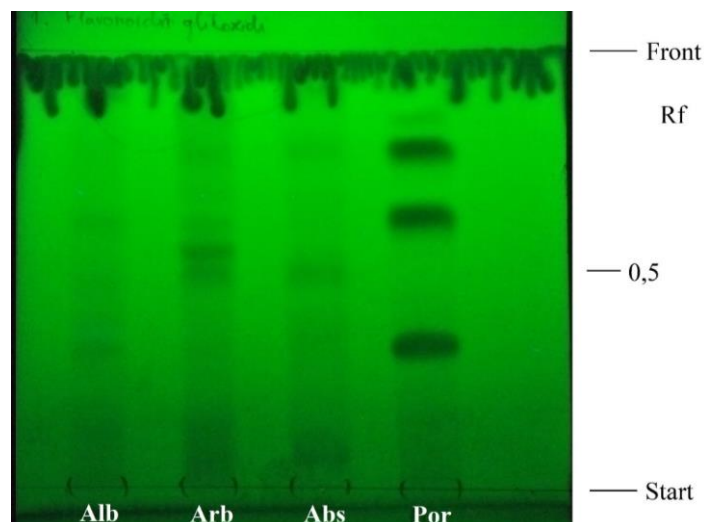


4.1. TLC karakterizacija polifenolnih sastavnica

Kvalitativna analiza polifenolnih sastavnica odabranih vrsta roda *Artemisia* provedena je tankoslojnom kromatografijom. Ispitana je prisutnost flavonoida (glikozida i aglikona), fenolnih kiselina, seskviterpenskih laktona i diterpena, uz silikagel ploče kao nepokretne faze, odgovarajuće pokretne faze te reagense za detekciju. Bioaktivne sastavnice su karakterizirane položajem odijeljenih zona, tj. faktorom zaostajanja (R_F), te bojom i intenzitetom obojenja tih zona u usporedbi s odgovarajućim referentnim spojevima (Kaštelan-Macan i sur., 2006).

4.1.1. Flavonoidi

Ispitivanje prisutnosti flavonoidnih glikozida provedeno je kromatografskim odjeljivanjem metanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Artemisia* na tankom sloju silikagela uz primjenu smjese otapala etilacetat-mravlja kiselina-voda u volumnim omjerima 8:1:1 (V/V/V). Sastavnice su vizualizirane pod UV lampom na 254 nm i 365 nm prije i nakon prskanja ploče NST/PEG reagensom. Kod vrste *A. alba* moguće je uočiti dvije zone slabe narančaste fluorescencije koje položajem i bojom odgovaraju poredbenim supstancijama rutinu ($R_F = 0,30$) i izokvercitrinu ($R_F = 0,58$). Navedena opažanja u skladu su s predhodnim istraživanjima vrste *A. alba* u kojima je potvrđeno prisustvo kvercetinskih glikozida (Terndafilova i sur., 2018; Radović Jakovljević i sur., 2019). Vrsta *A. arborescens* sadrži zonu slabe narančaste fluorescencije za koju se usporedbom sa zonama poredbene otopine može zaključiti da označava prisutnost izokvercitrina ($R_F = 0,58$) i jedva vidljivu zonu narančaste fluorescencije koja prema faktoru zaostajanja odgovara rutinu čije su prisustvo u metanolnom ekstraktu *A. arborescens* potvrdili Benyahia i suradnici (2014). Kod vrste *A. absinthium* nisu prisutne zone narančaste fluorescencije usporedive sa sastavnicama poredbene otopine. Kvercitrin ($R_F = 0,75$) nije opažen u sastavu nit jedne od promatranih biljnih vrsta. Prema dobivenom kromatogramu može se zaključiti da je udio flavonoidnih glikozida, rutina i izokvercitina, u sastavu vrsta *A. alba* i *A. arborescens* veoma mali, dok ih kod *A. absinthium* gotovo nema (Slika 8 i 9).



Slika 8. Zone gašenja fluorescencije na kromatogramu flavonoidnih glikozida u listovima i grančicama vrsta roda *Artemisia*

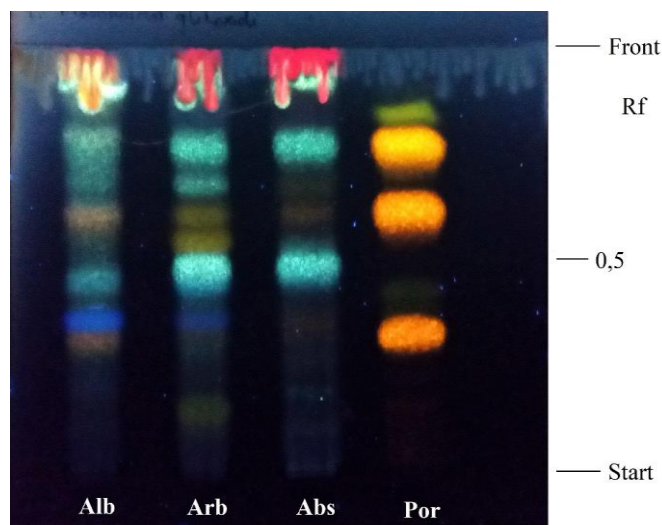
Nepokretna faza: Silikagel 60 F₂₅₄ TLC ploča

Pokretna faza: etil-acetat-mravlja kiselina-voda 8:1:1 (V/V/V)

Detekcija: UV-254 nm

Metanolni biljni ekstrakti: **Alb** - *A. alba*, **Arb** - *A. arborescens*, **Abs** - *A. absinthium*

Poredbene supstancije: (**Por**)-rutin ($R_F = 0,30$), izokvercitrin ($R_F = 0,58$), kvercitrin ($R_F = 0,75$)



Slika 9. Kromatogram flavonoidnih glikozida u listovima i grančicama vrsta roda *Artemisia*

Nepokretna faza: Silikagel 60 F₂₅₄ TLC ploča

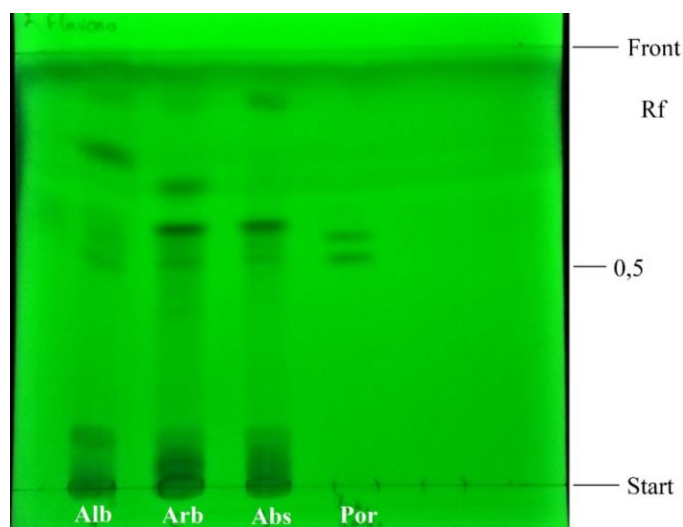
Pokretna faza: etil-acetat-mravlja kiselina-voda 8:1:1 (V/V/V)

Detekcija: NST/PEG, UV-365 nm

Metanolni biljni ekstrakti: **Alb** - *A. alba*, **Arb** - *A. arborescens*, **Abs** - *A. absinthium*

Poredbene supstancije: (**Por**)- rutin ($R_F = 0,30$), izokvercitrin ($R_F = 0,58$), kvercitrin ($R_F = 0,75$)

Ispitivanje prisutnosti flavonoidnih aglikona provedeno je kromatografskim odjeljivanjem metanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Artemisia* na tankom sloju silikagela uz dvije različite pokretne faze. Kod prvog ispitivanja kao pokretna faza je korištena smjesa otapala toluen, etil-formijat i mravlja kiselina u volumnim omjerima 5:4:1 (V/V/V). Sastavnice su vizualizirane pod UV svjetlom na 254 nm i 365 nm prije i nakon prskanja ploče NST/PEG reagensom. Iz dobivenih kromatograma usporedbom položaja zona poredbenih supstancija i analiziranih uzoraka vidljiva je žuta fluorescencija kod *A. alba* koja položajem odgovara luteolinu ($R_F = 0,52$) dok kod drugih ispitivanih vrsta ne nalazimo ispitivane flavonoidne aglikone (Slika 10 i 11).



Slika 10. Zone gašenja fluorescencije na kromatogramu flavonoidnih aglikona u listovima i grančicama vrsta roda *Artemisia*

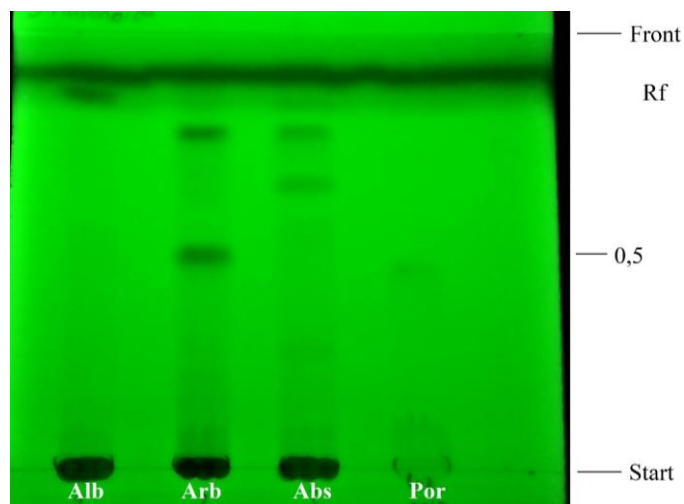
Nepokretna faza: Silikagel 60 F₂₅₄ TLC ploča

Pokretna faza: toluen-etil-formijat-mravlja kiselina 5:4:1 (V/V/V)

Detekcija: UV-254 nm

Metanolni biljni ekstrakti: **Alb** - *A. alba*, **Arb** - *A. arborescens*, **Abs** - *A. absinthium*

Poredbene supstancije : (**Por**)- luteolin ($R_F = 0,52$), apigenin ($R_F = 0,61$)



Slika 12. Zone gašenja fluorescencije na kromatogramu flavonoidnih aglikona u listovima i grančicama vrsta roda *Artemisia*

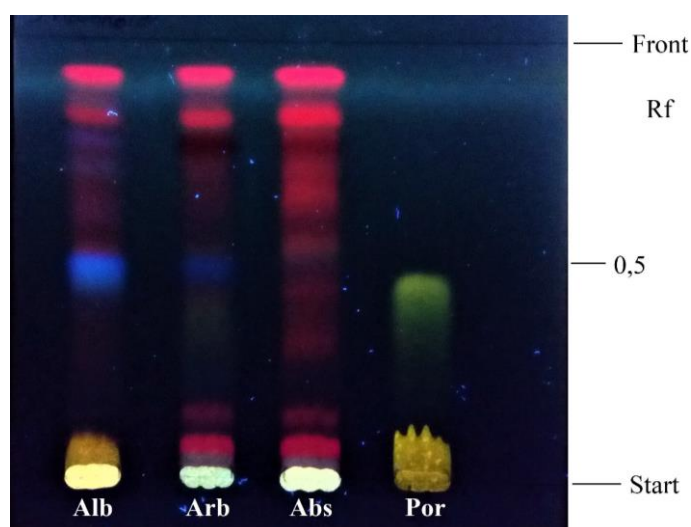
Nepokretna faza: Silikagel 60 F₂₅₄ TLC ploča

Pokretna faza: kloroform-etil-acetat 6:4 (V/V)

Detekcija: UV-254 nm

Metanolni biljni ekstrakti: **Alb** - *A. alba*, **Arb** - *A. arborescens*, **Abs** - *A. absinthium*

Poredbene supstancije: (**Por**)-luteolin ($R_F = 0,15$), apigenin ($R_F = 0,4$)



Slika 13. Kromatogram flavonoidnih aglikona u listovima i grančicama vrsta roda *Artemisia*

Nepokretna faza: Silikagel 60 F₂₅₄ TLC ploča

Pokretna faza: kloroform-etil-acetat 6:4 (V/V)

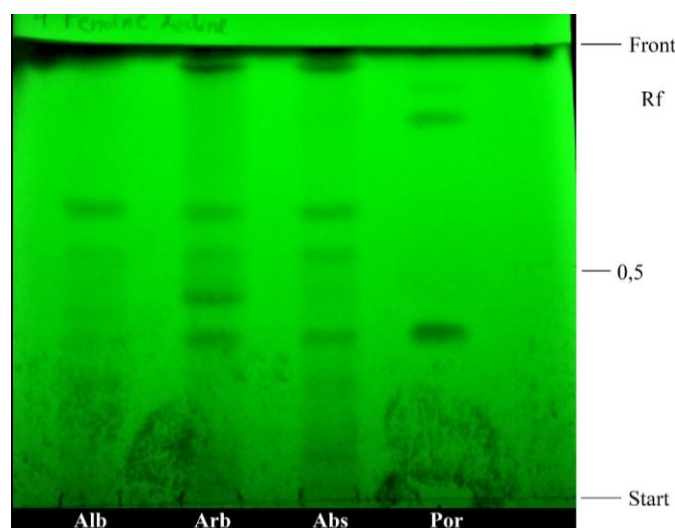
Detekcija: NST/PEG, UV-365 nm

Metanolni biljni ekstrakti: **Alb** - *A. alba*, **Arb** - *A. arborescens*, **Abs** - *A. absinthium*

Poredbene supstancije: (**Por**)-luteolin ($R_F = 0,15$), apigenin ($R_F = 0,4$)

4.1.2. Fenolne kiseline

Dokazivanje fenolnih kiselina provedeno je kromatografskim odjeljivanjem metanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Artemisia* na tankom sloju silikagela uz smjesu otapala diizopropil-eter, aceton, mravlja kiselina i voda u volumnim omjerima 5:3:1:1 (V/V/V/V) kao pokretna faza. Sastavnice su vizualizirane pod UV svjetlom na 254 nm i 365 nm prije i nakon prskanja ploče NST/PEG reagensom. Iz dobivenih kromatograma usporedbom položaja zona poredbenih supstancija i analiziranih uzoraka vidljiva je plava fluorescencija kod svih ispitivanih *Artemisia* vrsta. Zona koja odgovara klorogenskoj kiselini ($R_F = 0,36$) izraženija je u vrstama *A. arborescens* i *A. absinthium*, dok ružmarinska kiselina nije dokazana u ispitivanim vrstama (Slika 14 i 15). Navedeni rezultati u skladu su s predhodnim istraživanjima ispitivanih vrsta roda *Artemisia* (Younsi i sur., 2016; Aranti i sur., 2016; Koyoncu i sur., 2018).



Slika 14. Zone gašenja fluorescencije na kromatogramu fenolnih kiselina u listovima i grančicama vrsta roda *Artemisia*

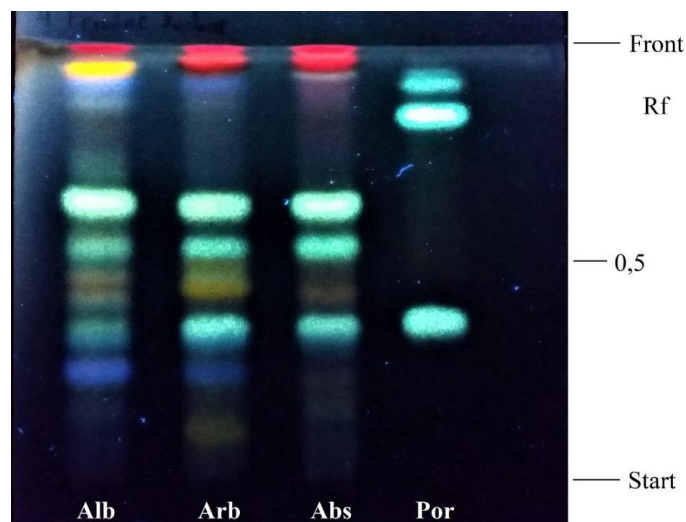
Nepokretna faza: Silikagel 60 F₂₅₄ TLC ploča

Pokretna faza: diizopropileter, aceton, mravlja kiselina, voda 5:3:1:1 (V/V/V/V)

Detekcija: NST/PEG, UV 365 nm

Metanolni biljni ekstrakti: **Alb** - *A. alba*, **Arb** - *A. arborescens*, **Abs** - *A. absinthium*

Poredbene fenolne kiseline: (**Por**)-klorogenska kiselina ($R_F = 0,36$), ružmarinska kiselina ($R_F = 0,81$)



Slika 15. Kromatogram fenolnih kiselina u listovima i grančicama vrsta roda *Artemisia*

Nepokretna faza: Silikagel 60 F₂₅₄ TLC ploča

Pokretna faza: diizopropileter, aceton, mravlja kiselina, voda 5:3:1:1 (V/V/V/V)

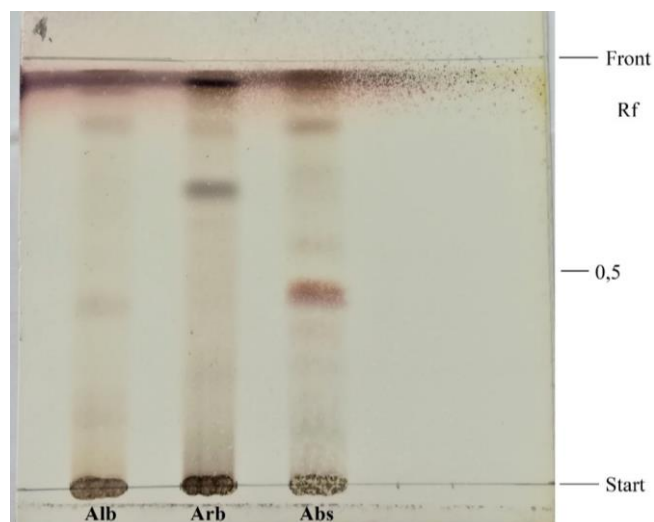
Detekcija: NST/PEG, UV 365 nm

Metanolni biljni ekstrakti: **Alb** - *A. alba*, **Arb** - *A. arborescens*, **Abs** - *A. absinthium*

Poredbene fenolne kiseline: (**Por**)-klorogenska kiselina ($R_F = 0,36$), ružmarinska kiselina ($R_F = 0,81$)

4.1.3. Seskviterpenski laktoni

Dokazivanje seskviterpenskih laktona provedeno je trima različitim kromatografskim sustavima. Prvo odjeljivanje metanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Artemisia* na tankom sloju silikagela provedeno je uz pokretnu fazu diklormetan i aceton u volumnim omjerima 85:15 (V/V). Rezultati su vizualizirani prskanjem kromatografskih ploča 50%-tnim H₂SO₄ te promatranjem na vidljivom svjetlu i pod UV svjetlom na 254 nm i 365 nm (Slika 16, 17 i 18). Ljubičasto-sive zone vidljive u ispitivanim vrstama odgovaraju seskviterpenskim spojevima. Izražena zona kod *A. absinthium* ($R_F = 0,40$) prema literaturnim podacima odgovara absintinu (Wagner, 2009).



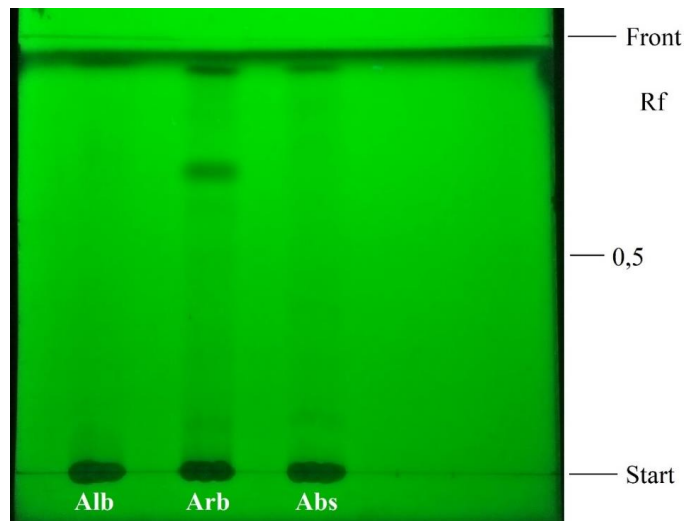
Slika 16. Kromatogram seskviterpenskih laktona u listovima i grančicama vrsta roda *Artemisia*

Nepokretna faza: Silikagel 60 F₂₅₄ TLC ploča

Pokretna faza: diklormetan-aceton 85:15 (V/V)

Detekcija: 50% H₂SO₄

Metanolni biljni ekstrakti: **Alb** - *A. alba*, **Arb** - *A. arborescens*, **Abs** - *A. absinthium*



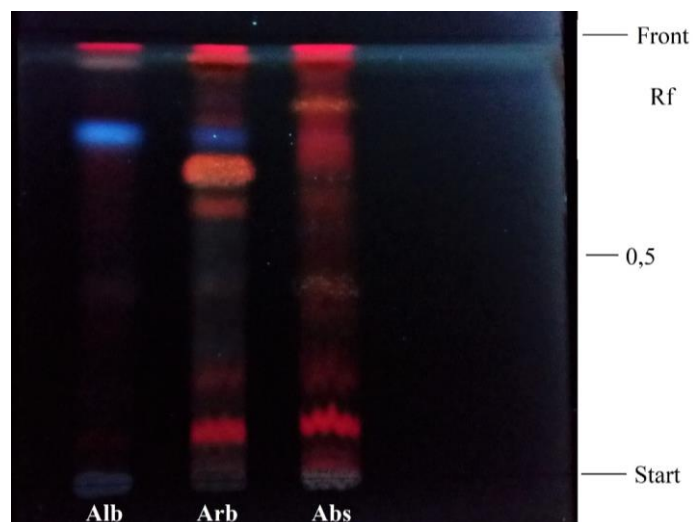
Slika 17. Zone gašenja fluorescencije na kromatogramu seskviterpenskih laktona u listovima i grančicama vrsta roda *Artemisia*

Nepokretna faza: Silikagel 60 F₂₅₄ TLC ploča

Pokretna faza: diklormetan-aceton 85:15 (V/V)

Detekcija: 50% H₂SO₄, UV 254 nm

Metanolni biljni ekstrakti: **Alb** - *A. alba*, **Arb** - *A. arborescens*, **Abs** - *A. absinthium*



Slika 18. Kromatogram seskviterpenskih laktona u listovima i grančicama vrsta roda *Artemisia*

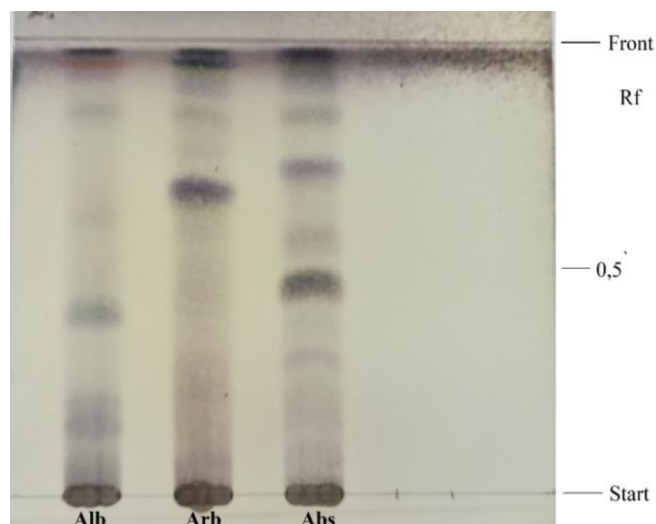
Nepokretna faza: Silikagel 60 F₂₅₄ TLC ploča

Pokretna faza: diklormetan-aceton 85:15 (V/V)

Detekcija: 50% H₂SO₄, UV 365 nm

Metanolni biljni ekstrakti: **Alb** - *A. alba*, **Arb** - *A. arborescens*, **Abs** - *A. absinthium*

Drugo kromatografsko ispitivanje seskviterpenskih laktona metanolnih ekstrakta vrsta *Artemisia* provedeno je također na tankom sloju silikagela uz pokretnu fazu diklormetan i aceton u volumnim omjerima 85:15 (V/V), ali su rezultati vizualizirani prskanjem ploče vanilin-sulfatnom kiselinom i promatranjem pod vidljivim svjetlom.



Slika 19. Kromatogram seskviterpenskih laktone u listovima i grančicama vrsta roda *Artemisia*

Nepokretna faza: Silikagel 60 F₂₅₄ TLC ploča

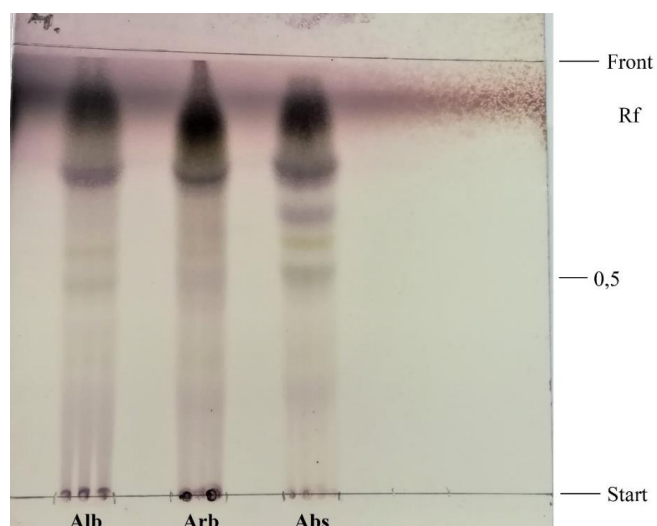
Pokretna faza: diklormetan-aceton 85:15 (V/V)

Detekcija: Vanilin-sulfatna kiselina

Metanolni biljni ekstrakti: **Alb** - *A. alba*, **Arb** - *A. arborescens*, **Abs** - *A. absinthium*

4.1.4. Diterpeni

Dokazivanje diterpena provedeno je kromatografskim odjeljivanjem metanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Artemisia* na tankom sloju silikagela uz smjesu otapala metanol i voda u volumnom omjeru 90:10 (V/V) kao pokretna faza. Vizualizacija rezultata provedena je prskanjem kromatografske ploče anisaldehyd sulfatnom kiselinom i promatranjem pod UV svjetlom na 254 nm. Ljubičasto-plave zone odgovaraju diterpenskim spojevima prisutnim u ispitivanim vrstama roda *Artemisia*.



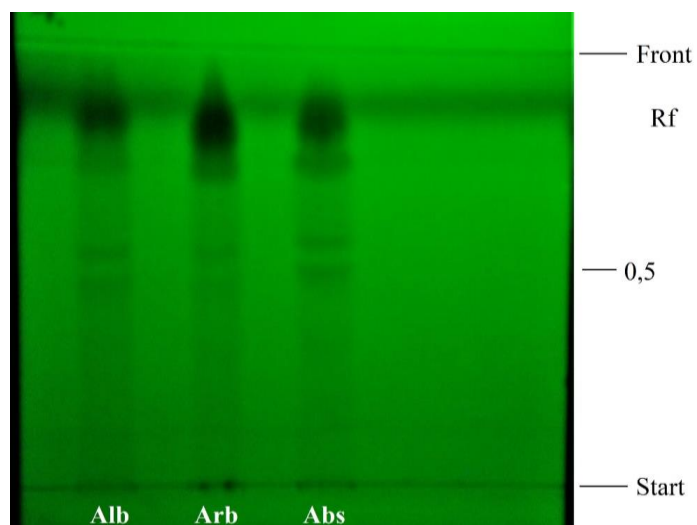
Slika 20. Kromatogram diterpena u listovima i grančicama vrsta roda *Artemisia*

Nepokretna faza: Silikagel 60 F₂₅₄ TLC ploča

Pokretna faza: metanol-voda 90:10 (V/V)

Detekcija: anisaldehyd sulfatna kiselina

Metanolni biljni ekstrakti: **Alb** - *A. alba*, **Arb** - *A. arborescens*, **Abs** - *A. absinthium*



Slika 21. Zone gašenja fluorescencije na kromatogramu diterpena u listovima i grančicama vrsta roda *Artemisia* L.

Nepokretna faza: Silikagel 60 F₂₅₄ TLC ploča

Pokretna faza: metanol-voda 90:10 (V/V)

Detekcija: anisaldehyd sulfatna kiselina, UV 254 nm

Metanolni biljni ekstrakti: **Alb** - *A. alba*, **Arb** - *A. arborescens*, **Abs** - *A. absinthium*

4.2. Sadržaj polifenolnih sastavnica određen spektrofotometrijskim metodama

Kvantitativna fitokemijska analiza polifenolnih spojeva u listovima i grančicama odabranih vrsta roda *Artemisia* provedena je primjenom odgovarajućih spektrofotometrijskih metoda, te je određeni sastav flavonoida i fenolnih kiselina.

4.2.1. Flavonoidi

Sadržaj flavonoida određen je spektrofotometrijskom metodom. Provedena je hidroliza flavonoidnih glikozida nakon čega su aglikoni odijeljeni izmućkivanjem s etilacetatom. Otopini aglikona dodan je aluminijev klorid te je nastalo žuto obojeni kompleksni spoj s maksimumom apsorbancije u vidljivom području (425 nm). Sadržaj flavonoida, izražen kao izokvercitrin, izračunat je pomoću specifične apsorbancije koja za izokvercitrin iznosi 500. Dobiveni rezultati prikazani u Tablici 1 pokazali su da je sadržaj flavonoida u analiziranim vrstama bio u rasponu 0,19-0,59 %. Najviše flavonoida je određeno u listovima i grančicama vrste *A. absinthium* (0,59 %), dok je vrsta *A. alba* sadržavala najmanje flavonoida (0,19 %).

Tablica 1. Sadržaj flavonoida u listovima i grančicama vrsta roda *Artemisia*

Biljna vrsta	Flavonidi (%)
<i>A. alba</i>	0,19 ± 0,02
<i>A. arborescens</i>	0,28 ± 0,01
<i>A. absinthium</i>	0,59 ± 0,00

4.2.2. Fenolne kiseline

Određivanje fenolnih kiselina (hidroksicimetnih derivata) provedeno je spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na stvaranju žuto obojenih kompleksa između *o*-dihidroksifenolne skupine i nitrit-molibdatova reagensa. Žuta boja otopine zalučivanjem prelazi u narančastocrvenu. Udio ukupnih fenolnih kiselina, izražen kao klorogenska kiselina, izračunat je pomoću specifične apsorbancije koja za klorogensku kiselinu iznosi 188. Dobiveni rezultati prikazani u Tablici 2 pokazali su da se sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u istraživanim vrstama kreće 1,74-1,99 %, od kojih najniži udio fenolnih kiselina ima vrsta *A. alba* (1,74%), a najviši udio ima vrsta *A. arborescens* (1,99 %).

Tablica 2. Sadržaj fenolnih kiselina u listovima i grančicama vrsta roda *Artemisia*

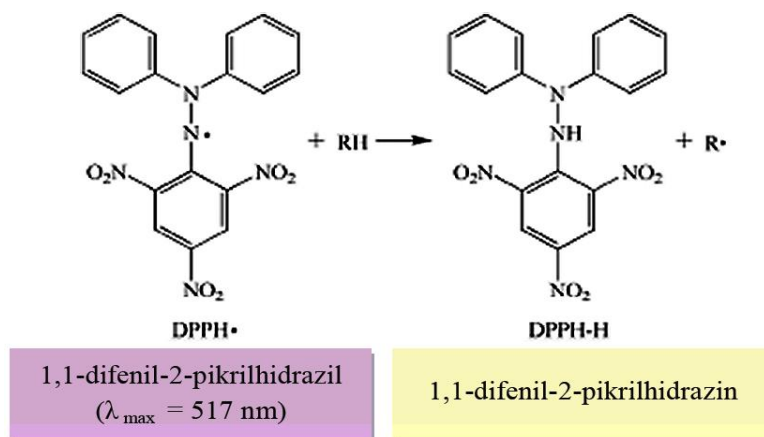
Biljna vrsta	Fenolne kiseline (%)
<i>A. alba</i>	1,74 ± 0,12
<i>A. arborescens</i>	2,00 ± 0,04
<i>A. absinthium</i>	1,84 ± 0,14

4.3. Antioksidacijsko djelovanje

Ispitan je antioksidacijski potencijal etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Artemisia* i referentnih antioksidansa korištenjem tri različite spektrofotometrijske metode, da bi se mogli pretpostaviti mogući mehanizmi njihovog djelovanja.

4.3.1. Sposobnost hvatanja DPPH radikala

DPPH metoda je spektrofotometrijska metoda korištena za određivanje sposobnosti neutraliziranja slobodnih radikala ispitivanih ekstrakata biljnih vrsta roda *Artemisia*. Navedena metoda se vrlo često koristi u znanstvenim istraživanjima za vrednovanje antiradikalne aktivnosti biljnih ekstrakata i njihovih polifenolnih sastavnica. DPPH• (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) je komercijalno dostupan stabilni slobodni radikal koji zbog svog nesparenog elektrona značajno apsorbira u vidljivom dijelu spektra pri valnoj duljini od 517 nm, dajući ljubičasto obojenje. U reakciji s DPPH radikalima antioksidansi doniraju ili atom vodika ili elektron, reduciraju DPPH radikale te nastaju stabilne dijamagnetične molekule 1,1-difenil-2-pikrilhidrazina svijetlo žute boje (Slika 22). Antioksidacijska aktivnost ispitivanog spoja očituje se obezbojenjem otopine DPPH• koje nastaje kao posljedica njegove redukcije. Upravo smanjenje intenziteta obojenja reakcijske smjese očituje se smanjenjem apsorbancije koja se mjeri spektrofotometrijski i direktno je proporcionalna antiradikalnoj aktivnosti ispitivanog uzorka (Kindl i sur., 2015).



Slika 22. Prikaz reakcije DPPH radikala i antioksidansa (preuzeto iz Wang i sur., 2016.)

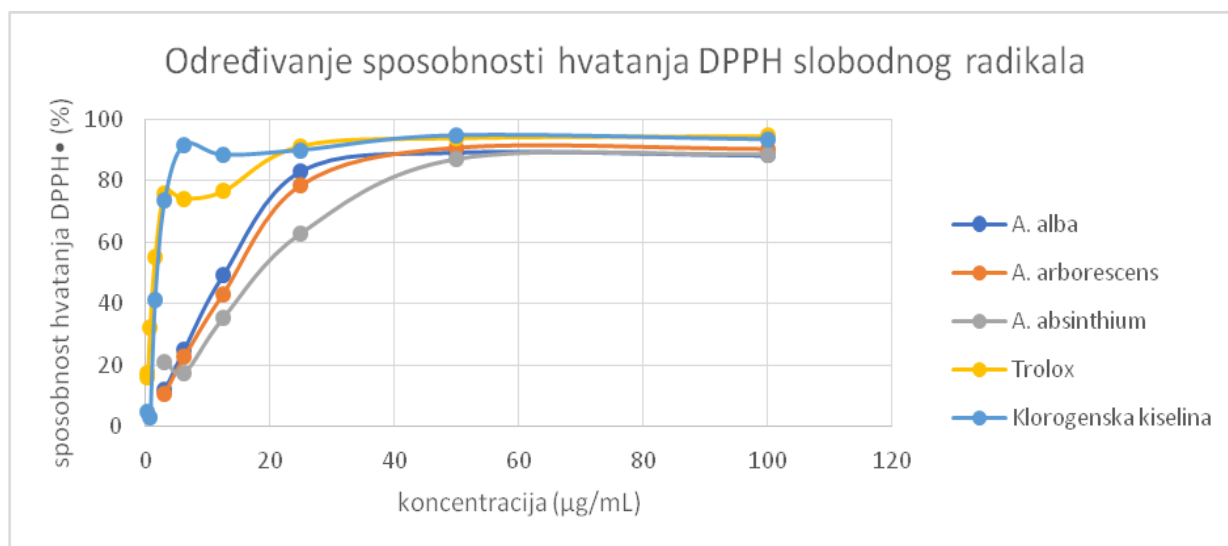
Za ispitivanje antiradikalne aktivnosti ekstrakata biljnih vrsta roda *Artemisia*, klorogenske kiseline i referentnog antioksidansa, troloksa, pripremljeni su koncentracijski nizovi u rasponu od 0,2 µg/mL do 100 µg/mL, a apsorbancija je mjerena na valnoj duljini od 517 nm. Izračunata je inhibicija slobodnih DPPH radikala za pojedine koncentracije uzoraka i izražena je u postocima (%). Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 3. Vidljivo je da ekstrakti biljnih vrsta roda *Artemisia* posjeduju sposobnost hvatanja DPPH radikala, a određena aktivnost bila je ovisna o primijenjenoj koncentraciji. Aktivnosti ekstrakata u koncentracijama 3,1 µg/mL, 6,253 µg/mL, 12,5µg/mL i 25,0 µg/mL iznosile su 11-21%, 17-25%, 35-49% i 62-83%. Najjaču sposobnost hvatanja DPPH• pokazao je ekstrakt biljne vrste *A. alba* (IC₅₀ = 13,73µg/mL), slijedi ga ekstrakt vrste *A. arborescens* (IC₅₀ = 15,21µg/mL) dok je najslabiju sposobnost imao ekstrakt biljne vrste *A. absinthium* (IC₅₀ = 20,25µg/mL). Pri koncentracijama iznad 50 µg/mL svi ispitivani uzorci su ušli u tzv. plato-fazu, tj. daljnjim povećanjem koncentracije uzoraka sposobnost hvatanja DPPH radikala nije se značajno mijenjala ili je ostala nepromijenjena. Troloks i klorogenska kiselina pokazali su bolju antioksidativnu aktivnost u odnosu na analizirane ekstrakte s IC₅₀ vrijednostima od 1,57 µg/mL i 1,76 µg/mL. Troloks je već pri koncentraciji od 1,6 µg/mL, a klorogenska kiselina pri koncentraciji od 3,1 µg/mL, neutralizirao više od 50 % slobodnih DPPH radikala. Kod koncentracije od 6,3 µg/mL, oba referentna antioksidansa imala su učinak veći od 90 %.

Tablica 3. Spособnost hvatanja DPPH• etanolnih ekstrakata listova i grančica vrsta roda *Artemisia* i referentnih antioksidansa, troloksa i klorogenske kiseline

koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	Spособnost hvatanja DPPH• (%)				
	<i>A. alba</i>	<i>A.arborescens</i>	<i>A.absinthium</i>	Troloks	Klorogenska kiseline
100	88,3 $\pm$ 0,3	90,3 $\pm$ 0,6	88,6 $\pm$ 1,2	94,6 $\pm$ 1,0	93,3 $\pm$ 1,4
50	89,3 $\pm$ 0,0	90,7 $\pm$ 0,0	87,0 $\pm$ 1,8	93,9 $\pm$ 1,9	94,6 $\pm$ 0,1
25	83,2 $\pm$ 0,2	78,5 $\pm$ 2,3	62,9 $\pm$ 1,0	91,4 $\pm$ 2,6	89,8 $\pm$ 4,8
12.5	49,4 $\pm$ 1,5	43,2 $\pm$ 1,7	35,4 $\pm$ 0,7	76,9 $\pm$ 0,62	88,3 $\pm$ 0,0
6.3	25,2 $\pm$ 2,6	22,7 $\pm$ 0,9	17,7 $\pm$ 3,4	74,2 $\pm$ 2,0	91,5 $\pm$ 1,9
3.1	12,0 $\pm$ 1,0	11,0 $\pm$ 0,3	21,2 $\pm$ 0,6	75,8 $\pm$ 4,9	73,8 $\pm$ 1,4
1.6	-	-	-	55,1 $\pm$ 4,8	41,2 $\pm$ 10,2
0.8	-	-	-	32,5 $\pm$ 7,8	2,9 $\pm$ 20,4
0.4	-	-	-	16,0 $\pm$ 0,7	4,8 $\pm$ 19,4
0.2	-	-	-	17,4 $\pm$ 7,0	-

-: nije aktivno; Rezultati su izraženi u postotcima (%), kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija triju određivanja

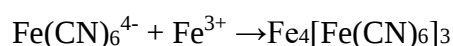
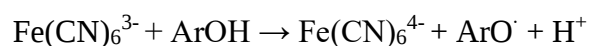
Na Slici 23 dan je grafički prikaz antioksidacijske aktivnosti ekstrakata biljnih vrsta roda *Artemisia* u usporedbi s referentnim antioksidansima. Troloks i klorogenska kiselina su već pri koncentraciji od 6,3 $\mu\text{g/mL}$ postigli značajan antioksidacijski učinak, dok im se antioksidativni učinak ekstrakata vrsta roda *Artemisia* približio tek pri koncentraciji od 50 $\mu\text{g/mL}$.



Slika 23. Usporedni grafički prikaz sposobnosti hvatanja DPPH• za različite koncentracije etanolnih ekstrakata listova i grančica vrsta roda *Artemisia*, te troloksa i klorogenske kiseline

4.3.2. Redukcijska sposobnost

Redukcijska sposobnost neke supstancije, odnosno njena sposobnost da donira elektrone, može služiti kao značajni indikator njezine potencijalne antioksidacijske sposobnosti. Doniranjem elektrona zaustavlja lančane reakcije stvaranja štetnih slobodnih radikala. Također, u reakcijama s određenim prekursorima peroksida, reducirajuće tvari sprječavaju nastanak reaktivnih kisikovih spojeva (Kindl i sur., 2015). U okviru ovog diplomskog rada istražena je redukcijska moć ekstrakata biljnih vrsta roda *Artemisia* primjenom metode redukcije kalijevog heksacijanoferata. Redukcijska moć ekstrakata biljnih vrsta roda *Artemisia* je uspoređena s aktivnošću klorogenske kiseline i referentnog antioksidansa butilhidroksitoluena. Korištena metoda temeljila se na redukciji željezovog(III) iona u željezo(II) oblik, nastalog u prisutnosti reducensa u reakcijskoj smjesi s kalijevim heksacijanoferatom u kiselom mediju, pri čemu dodatak soli trovalentnog željeza stvara plavu otopinu (Berlinsko modriilo). Navedena reakcija se može prikazati na sljedeći način:

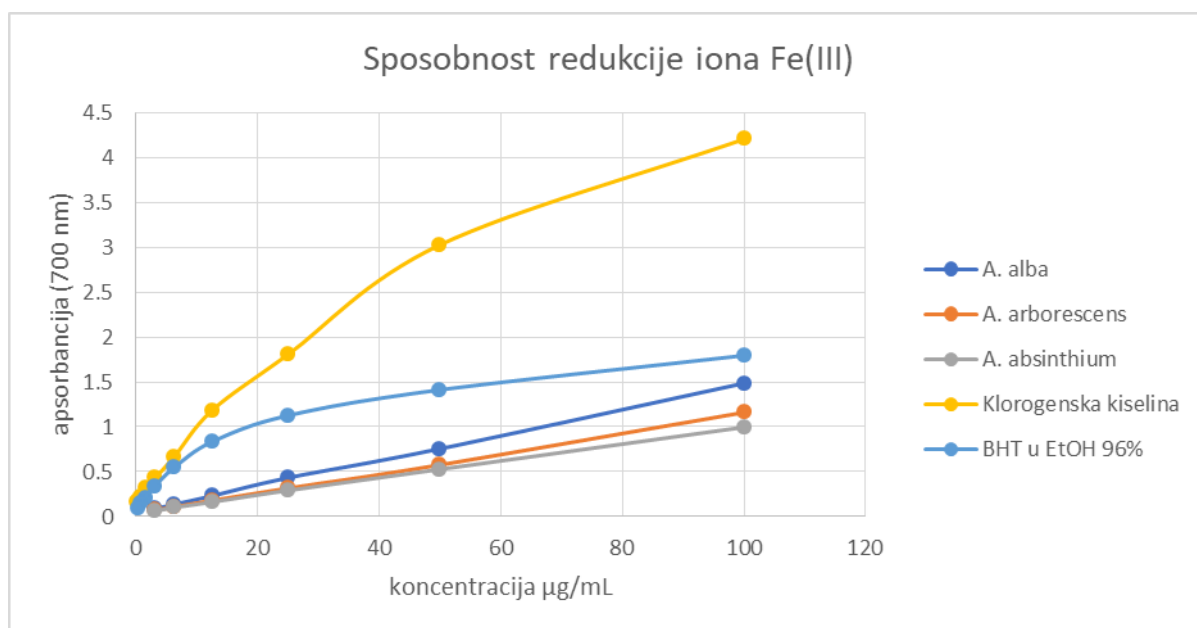


Redukcijska sposobnost ekstrakata ispitana je u koncentracijskom nizu od 0,2-100 µg/mL. Najbolju sposobnost redukcije pokazao je ekstrakt vrste *A. alba* (IC₅₀ = 31,34 µg/mL), a zatim *A. arborescens* (IC₅₀ = 41,61 µg/mL) i *A. absinthium* (IC₅₀ = 47,81 µg/mL) koji je imao najslabiji učinak. Sva tri ekstrakta su pri koncentraciji od 50 µg/mL imala apsorbanciju veću od 0,5. Klorogenska kiselina (IC₅₀ = 3,96 µg/mL) te BHT (IC₅₀ = 10,61 µg/mL) pokazali su znatno veću sposobnost redukcije. Na slici 24 grafički je prikazana ovisnost sposobnosti redukcije o koncentraciji ispitivanih ekstrakata i poredbenih tvari.

Tablica 4. Redukcijska sposobnost etanolnih ekstrakata listova i grančica vrsta roda *Artemisia* i referentnih antioksidansa, klorogenske kiseline i BHT

Konc. ($\mu\text{g/mL}$)	Sposobnost redukcije iona Fe (III)				
	<i>A. alba</i>	<i>A. arborescens</i>	<i>A. absinthium</i>	Klorogenska kiseline	BHT
100	$1,485 \pm 0,049$	$1,160 \pm 0,000$	$0,996 \pm 0,025$	$4,205 \pm 0,035$	$1,795 \pm 0,001$
50	$0,756 \pm 0,021$	$0,577 \pm 0,019$	$0,527 \pm 0,019$	$3,028 \pm 0,039$	$1,412 \pm 0,153$
25	$0,433 \pm 0,018$	$0,316 \pm 0,016$	$0,291 \pm 0,006$	$1,807 \pm 0,050$	$1,126 \pm 0,160$
12.5	$0,230 \pm 0,007$	$0,179 \pm 0,007$	$0,162 \pm 0,007$	$1,183 \pm 0,089$	$0,834 \pm 0,090$
6.3	$0,136 \pm 0,001$	$0,108 \pm 0,004$	$0,101 \pm 0,000$	$0,665 \pm 0,049$	$0,546 \pm 0,053$
3.1	$0,088 \pm 0,000$	$0,071 \pm 0,004$	$0,062 \pm 0,000$	$0,433 \pm 0,024$	$0,341 \pm 0,020$
1.6	-	-	-	$0,321 \pm 0,027$	$0,212 \pm 0,016$
0.8	-	-	-	$0,224 \pm 0,028$	$0,143 \pm 0,011$
0.4	-	-	-	$0,184 \pm 0,013$	$0,093 \pm 0,009$
0.2	-	-	-	$0,157 \pm 0,002$	-

:- nije aktivno; Rezultati su izraženi u postocima (%), kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija triju određivanja



Slika 24. Usporedni grafički prikaz sposobnosti redukcije iona željeza(III) za različite koncentracije etanolnih ekstrakata listova i grančica vrsta roda *Artemisia* i referentnih antioksidansa

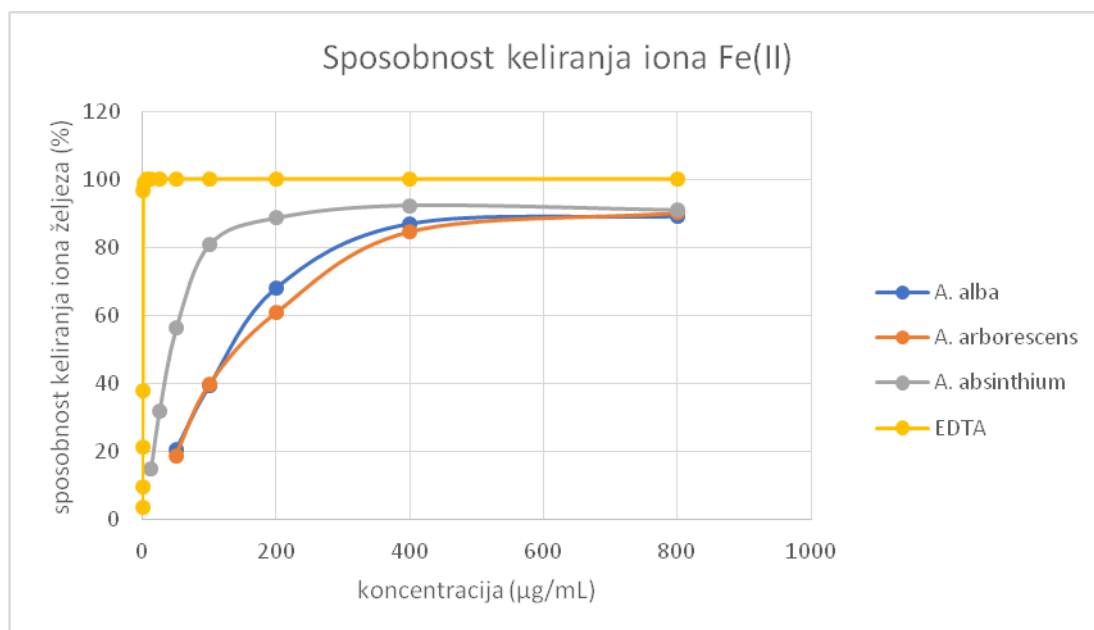
4.3.3. Kelirajuća aktivnost

Ioni željeza(II) i bakra(I) su ioni prijelaznih metala koji pokazuju izravno prooksidativno djelovanje katalizirajući stvaranje visoko reaktivnih kisikovih spojeva. Zbog svoje visoke reaktivnosti željezo je najvažniji prooksidans lipidne oksidacije. Fe^{2+} stanje željeza ubrzava lipidnu oksidaciju pretvarajući vodikove i lipidne perokside u reaktivne slobodne radikale prema Fentonovoj reakciji. U navedenoj reakciji nastaje hidroksilni radikal ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$), koji ima izraženu sposobnost uzrokovanja lipidne peroksidacije u organizmu. Nadalje, željezo reagira i s lipidnim hidroperoksidima dajući reaktivne lipidne alkoksilne radikale koji dalje mogu sudjelovati u širenju oksidativnih oštećenja lipida ($\text{Fe}^{2+} + \text{LOOH} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{LO}^\bullet + \text{OH}^-$) (Štefan i sur., 2007). Kompleksacija metalnih iona predstavlja jedan od mogućih mehanizama antioksidacijskog djelovanja polifenola. U Tablici 5 prikazani su rezultati kelirajuće sposobnosti za ispitivane ekstrakte i poredbene tvari.

Tablica 5. Sposobnost keliranja etanolnih ekstrakata listova i grančica vrsta roda *Artemisia* i referentnog antioksidansa EDTA

koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	Sposobnost keliranja iona Fe (II)			
	<i>A. alba</i>	<i>A. arborescens</i>	<i>A. absinthium</i>	EDTA
800	89,157 $\pm$ 0,426	90,261 $\pm$ 0,907	91,038 $\pm$ 0,173	100,000 $\pm$ 0,000
400	86,982 $\pm$ 0,991	84,748 $\pm$ 0,894	92,377 $\pm$ 0,232	100,000 $\pm$ 0,000
200	68,131 $\pm$ 0,550	60,852 $\pm$ 2,227	88,704 $\pm$ 0,543	100,000 $\pm$ 0,000
100	39,319 $\pm$ 0,861	39,775 $\pm$ 0,012	80,848 $\pm$ 2,410	100,000 $\pm$ 0,000
50	20,552 $\pm$ 0,241	18,855 $\pm$ 0,627	56,250 $\pm$ 0,733	100,000 $\pm$ 0,000
25	-	-	31,928 $\pm$ 4,266	100,000 $\pm$ 0,000
12,50	-	-	15,119 $\pm$ 0,887	100,000 $\pm$ 0,000
6,25	-	-	-	100,000 $\pm$ 0,000
3,13	-	-	-	98,900 $\pm$ 0,330
1,56	-	-	-	96,650 $\pm$ 1,170
0,78	-	-	-	38,090 $\pm$ 1,470
039	-	-	-	21,250 $\pm$ 0,990
0,20	-	-	-	9,800 $\pm$ 0,250
0,10	-	-	-	3,580 $\pm$ 0,060

-: nije aktivno; Rezultati su izraženi u postotcima (%), kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija triju određivanja

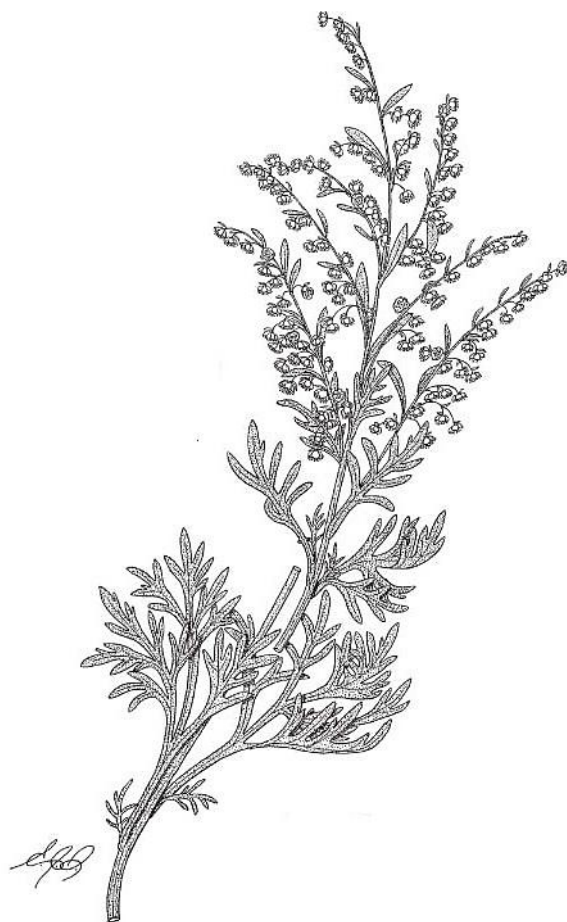


Slika 25. Usporedni grafički prikaz sposobnosti keliranja iona željeza(II) za različite koncentracije metanolnih ekstrakata listova i grančica vrsta roda *Artemisia* i referentnog antioksidansa EDTA

Slika 25 prikazuje ovisnost sposobnosti keliranja željeza(II) o koncentraciji ispitivanih ekstrakata i referentnog kelatora EDTA. Ekstrakti vrsta *A. alba* i *A. arborescens* pokazali su sličnu sposobnost keliranja pri ispitivanim koncentracijama, dok se ekstrakt vrste *A. absinthium* istaknuo s znatno boljim učinkom pri istim koncentracijama. Pri testiranoj koncentraciji od 100 µg/mL ekstrakti vrsta *A. alba* i *A. arborescens* nisu uspjeli kelirati 50% iona željeza(II), dok je pri navedenoj koncentraciji ekstrakt vrste *A. absinthium* kelirao 80% iona željeza(II).

Najbolju kelirajuću aktivnost pokazao je ekstrakt vrste *A. absinthium* ($IC_{50} = 48,25$), dok su ekstrakti vrsta *A. alba* ($IC_{50} = 134,40$) i *A. arborescens* ($IC_{50} = 152,28$) pokazali vrlo sličan kelirajući učinak. EDTA kao referentni kelator je pokazala znatno bolji učinak od ekstrakata, dok klorogenska kiselina nije uopće pokazala sposobnost keliranja Fe^{2+} iona.

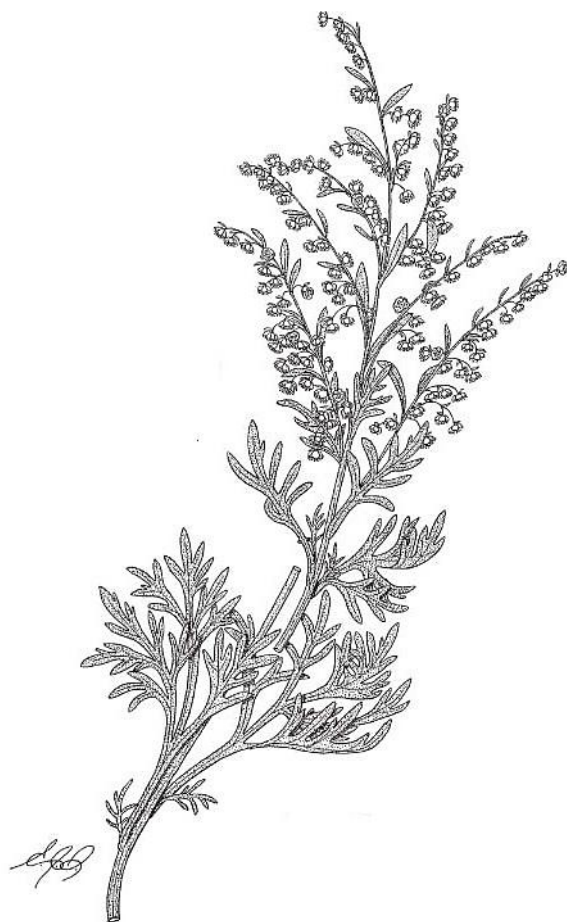
5. ZAKLJUČCI



U okviru ovog diplomskog rada provedeno je istraživanje fitokemijskog sastava i antioksidacijskog učinka listova i grančica odabranih vrsta roda *Artemisia* (*A. alba*, *A. arborescens* i *A. absinthium*). Prisutnost flavonoida, fenolnih kiselina, seskviterpenskih laktona i diterpena u metanolnim ekstraktima ispitivanih vrsta roda *Artemisia* potvrđena je tankoslojnom kromatografijom. Navedene vrste nisu bogate kvercetinским glikozidima, ali su bogat izvor fenolnih kiselina uključujući i klorogensku kiselinu. Utvrđena je prisutnost seskviterpenskih laktona i diterpena. Spektrofotometrijskim metodama određen je udio flavonoida i fenolnih kiselina u listovima i grančicama odabranih vrsta roda *Artemisia*. Udio flavonoida iznosio je 0,19–0,59 %, dok je udio fenolnih kiselina iznosio 1,74–2,0 %. *A. absinthium* istaknula se kao vrsta najbogatija flavonoidima, a *A. arborescens* je sadržavala najveći udio fenolnih kiselina. Antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata ispitan je primjenom triju spektrofotometrijskih metoda, a rezultati su uspoređeni s učinkom klorogenske kiseline kao visoko zastupljene sastavnice ispitanih ekstrakata, te referentnim antioksidansima, troloksom i buti-hidroksitoluenom. Istraživanim biljnim ekstraktima ustanovljena je sposobnost hvatanja DPPH radikala (IC_{50} : 13,73–20,25 $\mu\text{g/mL}$), redukcije iona željeza(III) (IC_{50} : 31,34–47,81 $\mu\text{g/mL}$) i keliranja iona željeza(II) (IC_{50} : 48,25–152,28 $\mu\text{g/mL}$). Ekstrakt vrste *A. alba* pokazao je najbolju sposobnost hvatanja DPPH radikala i najbolju redukcijsku sposobnost, dok se kao najbolji kelator željezo(II) iona istaknuo ekstrakt vrste *A. absinthium*.

Istraživanja provedena u okviru ovog diplomskog rada potvrdila su da su vrste roda *Artemisia* bogat izvor fenolnih kiselina te da imaju dobar antioksidacijski učinak. Navedena svojstva ispitanih vrsta dobar su temelj za daljna ispitivanja ekstrakata vrsta *A. alba*, *A. arborescens* i *A. absinthium* vezana za prevenciju i liječenje oboljenja u čijoj je podlozi oksidacijski stres.

6. LITERATURA



Absinthii herba, 2017., <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/herbal/absinthii-herba>, pristupljeno 6.5.2019.

Araniti F, Gulli T, Marrelli M, Statti G, Gelsomino A, Abenavoli MR. *Artemisia arborescens* L. leaf litter: phytotoxic activity and phytochemical characterization. *Acta Physiol Plant*, 2016, 38, DOI 10.1007/s11738-016-2141-7.

Benyahia S, Benayache F, Benayache S. Flavonoids from *Artemisia arborescens*. *Chem Nat Compd*, 2014, 49, 1132-1133.

Blažeković B, Stanić G, Vladimir-Knežević S. Morfološko-anatomska i fitokemijska obilježja biljnih vrsta *Thymus vulgaris* L. i *Thymus pulegioides* L. *Farm Glas*, 2006; 62, 121-130.

Bourgou S, Tammar S, Salem N, Mkadmini K, Msaada K. Phenolic Composition, essential oil and antioxidant activity in the aerial part of *Artemisia herba-alba* from several provenances: A comparative study. *Int Jour Food Prop*, 2016, 19, 549-563.

Bruneton J. Pharmacognosy (Phytochemistry, Medicinal Plants). Paris-New York, Lavoisier Publishing, 1999, str. 240-243.

Chen J, Mangelinck S, Adams A, Wang ZT, Li WL, De Kimpe N. Natural flavonoids as potential herbal medication for the treatment of diabetes mellitus and its complications. *Nat Prod Commun*, 2015, 10, 187-200.

Costa R, Ragusa S, Russo M, Certo G, Franchina FA, Zanutto A, Grasso E, Mondello L, Germanò MP. Phytochemical screening of *Artemisia arborescens* L. by means of advanced chromatographic techniques for identification of health-promoting compounds. *J Pharm Biomed Anal*, 117, 2016, 499-509.

Domac R. Flora hrvatske. Zagreb, Školska knjiga, 1994, str. 332, 333, 352.

Deeproute Plant base, 2015., <http://www.deeproute.co.uk>, pristupljeno 15.05.2019.

EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care). European Pharmacopoeia, 9. izd., Strasbourg: Council of Europe, 2018, str. 288., 1376-1378., 1384-1385.

Elsharkawy ER, Shiboob MH. Antioxidant activity of phenolic and alkaloid fractions accumulated in *Artemisia Judaica* and *Artemisia Herba Alba*. *Jour Nat Rem*, 2017, 17, 154-164.

Forenbacher S. Velebit i njegov biljni svijet. Zagreb, Školska knjiga, 1990, str. 662.

Grdinić V, Kremer D. Ljekarnički priručnik 1: „Ljekovito bilje i ljekovite droge: farmakoterapijski, botanički i farmaceutski podaci”. Zagreb, Hrvatska ljekarnička komora, 2009, str. 231.

Halliwell B, Gutteridge JM. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med*, 1995, 18, 125-126.

Kaštelan-Macan M, Medić-Šarić M, Turina S. Plošna kromatografija, Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2006, str. 51.

Kindl M, Blažeković B, Bucar F, Vladimir-Knežević S. Antioxidant and anticholinesterase potential of six *Thymus* species. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, ID 403950.

Koyuncu I. Evaluation of anticancer, antioxidant activity and phenolic compounds of *Artemisia absinthium* L. extract. *Cell Mol Biol*, 2018, 6, 25-34.

Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci World J*, 2013, ID 162750.

Msaada K, Salem N, Bachrouch O, Bousselmi S, Tammar S, Alfaify A, Al Sane K, Ben Ammar W, Azeiz S, Brahim AH, Hammami M, Selmi S, Limam F, Marzouk B. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) essential oils and phenolics. *J Chem*, 2015, DOI 10.1155/2015/804658.

Morningsunherbalfarm, 2018, <https://www.morningsunherbalfarm.com>, pristupljeno 21.04.2019.

Peron G, Baldan V, Sut S, Faggian M, Roccabruna L, Zanini D, Manzini P, Maggi F, Dall'Acqua S. Phytochemical investigations on *Artemisia alba* Turra growing in the North-East of Italy. *Nat Prod Res*, 2017, 31, 1861-1868.

Pravi pelin, 2017., <https://www.plantea.com.hr/pravi-pelin>, pristupljeno 4.5.2019.

Radović Jakovljević M, Grujičić D, Živanović M, Stanković M, Ćirić A, Djurdjević P, Todorović Ž, Živančević-Simonović S, Mihaljević O, Milošević-Djordjević O. Ethyl acetate extracts of two *Artemisia* species: Analyses of phenolic profile and anticancer activities against SW-480 colon cancer cells. *Nat Prod Com*, 2019, 5, 1-6.

Robbins RJ. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem*, 2003, 51, 2866-2887.

Romano B, Pagano E, Montanaro V, Fortunato AL, Milic N, Borrelli F. Novel insights into the pharmacology of flavonoids. *Phytother Res*, 2013, 27, 1588-1596.

Shami AMM. Isolation and identification of diterpenes extracted from *Annona Squamosa*. *SM J Biol*, 2016, 2, 1010.

Shahidi F, Nazck M. Phenolics in Food and Nutraceuticals. Boca Raton, Florida, CRC press LLC, 2004. str. 1-82.

Štefan L, Tepšić T, Zaviđić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Medicina*, 2007, 43, 84-93.

Tan RX, Zheng WF, Tang HQ. Biologically Active Substances from the Genus *Artemisia*. *Planta Med*, 1998, 64, 295-301.

Trendafilova A, Todorova M, Genova V, Peter S, Wolfram E, Danova K, Evstatievac L. Phenolic Profile of *Artemisia alba* Turra. *Chem Biodiversity*, 2018, 15, 1-8.

Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. Flora Europaea, Vol 3., Cambridge, Cambridge University Press, 1976, str. 178-181.

Useful Temperate Plants, 2017, <http://temperate.theferns.info>, pristupljeno 15.5.2019.

Vallès J, McArthur ED. *Artemisia* systematics and phylogeny: cytogenetic and molecular insights. Provo, USDA Forest Service Proceedings, 2001, str. 67-68.

Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Bival Štefan M, Babac M. Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. U: Phytochemicals as nutraceuticals – global approaches to their role in nutrition and health. Venketeshwer Rao A, urednik, Rijeka, InTech, 2012, str. 155-158.

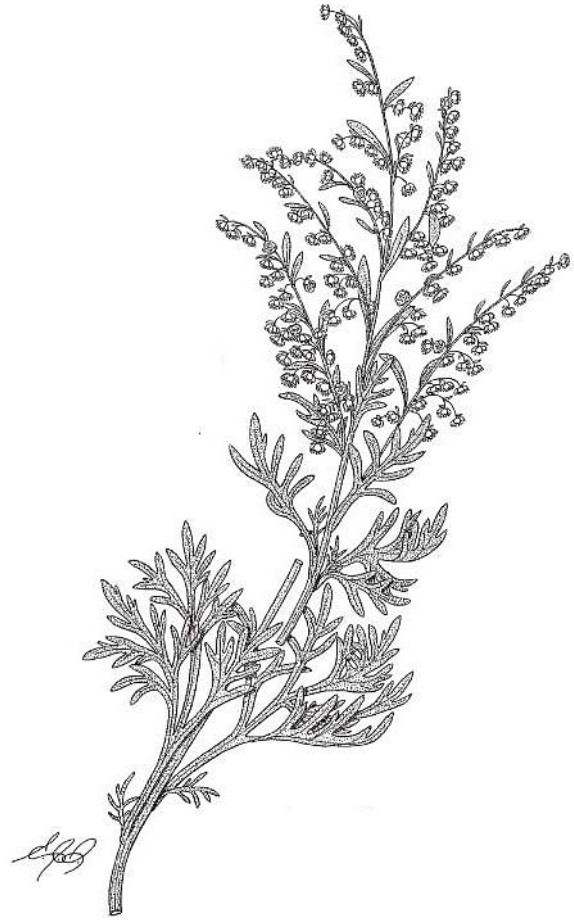
Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Bival Štefan M, Alegro A, Kőszegi T, Petrik J. Antioxidant Activities and Polyphenolic Contents of Three Selected Micromeria Species from Croatia. *Molecules*, 2011, 16, 1454-1470.

Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas, Berlin-Heidelberg: Springer, 2009, str. 195-197, 362.

Wang G, Huang X, Pei D, Duan W, Quan K, Li X, Di D. DPPH-HPLC-DAD analysis combined HSCCC for screening and identification of radical scavengers in *Cynomorium songaricum* Rupr. *New J Chem*, 2016, 40, 3885-3891.

Younsi F, Trimech R, Boulila A, Ezzine O, Dhahri S, Boussaid M, Messaoud C. Essential oil and Phenolic compounds of *Artemisia herba-alba* (Asso.): composition, antioxidant, antiacetylcholinesterase, and antibacterial activities. *Int J Food Prop*, 19, 2016, 1425-1438.

7. SAŽETAK/SUMMARY



U okviru ovog diplomskog rada istražen je fitokemijski sastav i antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata listova i grančica odabranih vrsta roda *Artemisia* (*A. alba*, *A. arborescens*, *A. absinthium*) Metodom tankoslojne kromatografije dokazana je prisutnost flavonoida, fenolnih kiselina, seskviterpenskih laktona i diterpena. Ispitane vrste istaknule su se kao bogat izvor fenolnih kiselina. Primjenom spektrofotometrijskih metoda određen je sadržaj flavonoida i fenolnih kiselina u ispitanim etanolnim ekstraktima koji je iznosio 0,19-0,59 % i 1,74–2,0 %.

Antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata ispitan je različitim spektrofotometrijskim metodama u usporedbi s troloksom i butil-hidroksitoluenom. Istraživanjem biljnim ekstraktima ustanovljena je sposobnost hvatanja DPPH radikala (IC_{50} : 13,73–20,25 $\mu\text{g/mL}$), redukcije iona željeza(III) (IC_{50} : 31,34–47,81 $\mu\text{g/mL}$) i keliranja iona željeza(II) (IC_{50} : 48,25–152,28 $\mu\text{g/mL}$). Dobiveni rezultati potvrđuju da su ispitane vrste bogat izvor fenolnih kiselina te da imaju dobru antioksidacijsku aktivnost.

The phytochemical composition and the antioxidant activity of ethanolic extracts of leaves and branches of selected *Artemisia* species (*A. alba*, *A. arborescens*, *A. absinthium*) were studied in this thesis. Flavonoids and phenolic acids were detected with thin-layer chromatography. The content of flavonoids (0,19–0,59 %) and phenolic acids (1,74–2,0 %.) were determined spectrophotometrically. The antioxidant activity of the ethanolic extracts was tested using various spectrophotometric methods in comparison with trolox and butylhydroxytoluene. Tested extracts possessed DPPH free-radical scavenging activity (IC_{50} : 13.73–20.2 $\mu\text{g/mL}$), ferric reducing ability (IC_{50} : 31.34–47.81 $\mu\text{g/mL}$) and ferrous chelating activity (IC_{50} : 48.25–152.28 $\mu\text{g/mL}$). Obtained results confirm that *Artemisia* species are a rich source of phenolic acids and possess antioxidant activity.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmakognozu
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

FITOKEMIJSKI SASTAV I ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE ETANOLNIH EKSTRAKATA ODABRANIH VRSTA RODA *ARTEMISIA*

Marija Canjuga

SAŽETAK

U okviru ovog diplomskog rada istražen je fitokemijski sastav i antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata listova i grančica odabranih vrsta roda *Artemisia*. Metodom tankoslojne kromatografije dokazana je prisutnost flavonoida, fenolnih kiselina, seskviterpenskih laktona i diterpena. Ispitane vrste istaknule su se kao bogat izvor fenolnih kiselina. Primjenom spektrofotometrijskih metoda određen je sadržaj flavonoida i fenolnih kiselina u ispitanim etanolnim ekstraktima koji je iznosio je 0,19–0,59 % i 1,74–2,0 %.

Antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata ispitan je različitim spektrofotometrijskim metodama u usporedbi s troloksom i butil-hidroksitoluenom. Istraživanjem biljnim ekstraktima ustanovljena je sposobnost hvatanja DPPH radikala (IC_{50} : 13,73–20,25 $\mu\text{g/mL}$), redukcije iona željeza(III) (IC_{50} : 31,34–47,81 $\mu\text{g/mL}$) i keliranja iona željeza(II) (IC_{50} : 48,25–152,28 $\mu\text{g/mL}$). Dobiveni rezultati potvrđuju da su ispitane vrste bogat izvor fenolnih kiselina te da imaju dobru antioksidacijsku aktivnost.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 51 stranicu, 25 slika, 5 tablica i 39 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Artemisia*, fenolne kiseline, antioksidacijski učinak

Mentor: **Dr. sc. Maja Bival Štefan**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Bival Štefan**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Marija Kindl, *viši asistentica-poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Jasna Jablan, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmacognosy
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

PHYTOCHEMICAL PROPERTIES AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF METHANOLIC EXTRACTS OF SELECTED ARTEMISIA SPECIES

Marija Canjuga

SUMMARY

The phytochemical composition and the antioxidant activity of ethanolic extracts of leaves and branches of selected *Artemisia* species (*A. alba*, *A. arborescens*, *A. absinthium*) were studied in this thesis. Flavonoids and phenolic acids were detected with thin-layer chromatography. The content of flavonoids (0,19–0,59 %) and phenolic acids (1,74–2,0 %.) were determined spectrophotometrically. The antioxidant activity of the ethanolic extracts was tested using various spectrophotometric methods in comparison with trolox and buthylhydroxytoluene. Tested extracts possessed DPPH free-radical scavenging activity (IC₅₀: 13.73–20.2 µg/mL), ferric reducing ability (IC₅₀: 31.34–47.81 µg/mL) and ferrous chelating activity (IC₅₀: 48.25–152.28 µg/mL). Obtained results confirm that *Artemisia* species are a rich source of phenolic acids and possess antioxidant activity.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 51 pages, 25 figures, 5 tables and 39 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Artemisia*, phenolic acid, antioxydant activity

Mentor: **Maja Bival Štefan, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Maja Bival Štefan, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marija Kindl, Ph.D. Assistant-postdoctorand, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Jasna Jablan, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2019.