

# Fenolne sastavnice i antioksidacijski učinak vrsta *Artemisia caerulescens* L., *Artemisia verlotiorum* Lamotte i *Artemisia vulgaris* L.

---

Čačko, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:163:044113>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



Ana Čačko

**Fenolne sastavnice i antioksidacijski učinak vrsta  
*Artemisia caerulescens* L., *Artemisia verlotiorum*  
Lamotte i *Artemisia vulgaris* L.**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

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 svojoj mentorici, doc. dr. sc. Maji Bival Štefan na odabiru teme, pomoći te savjetima tijekom izrade diplomskog rada.*

*Hvala Danijeli, Nini i Petri, kao i ostalim kolegama i prijateljima na potpori i savjetima te nezaboravnim zajedničkim uspomnama.*

*I na kraju, posebno hvala mojoj obitelji, Mami, Tati i Ivi te Luki na ljubavi, razumijevanju, podršci i strpljenju u posljednjih pet godina. Također im hvala što su uvijek vjerovali u mene. Veliko hvala Ivi na puno strpljenja prilikom napuštanja sobe radi mojeg učenja.*

## SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
1.1.	BOTANIČKI PREGLED .....	2
1.1.1.	Obilježja roda <i>Artemisia</i> .....	2
1.1.1.1.	<i>Artemisia caerulescens</i> L. ....	3
1.1.1.2.	<i>Artemisia verlotiorum</i> Lamotte .....	4
1.1.1.3.	<i>Artemisia vulgaris</i> L. ....	6
1.2.	SEKUNDARNI METABOLITI .....	7
1.2.1.	Fenolni spojevi .....	7
1.2.1.1.	Flavonoidi .....	8
1.2.1.2.	Neflavonoidni fenolni spojevi.....	10
1.3.	PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....	11
1.3.1.	Biološki učinci vrsta roda <i>Artemisia</i> .....	11
1.3.2.	Biološki učinci vrste <i>Artemisia caerulescens</i> L. ....	11
1.3.3.	Biološki učinci vrste <i>Artemisia verlotiorum</i> Lamotte. ....	11
1.3.4.	Biološki učinci vrste <i>Artemisia vulgaris</i> L.....	13
1.4.	OKSIDACIJSKI STRES I ANTIOKSIDANSI .....	15
1.4.1.	Oksidacijski stres.....	15
1.4.2.	Antioksidansi.....	16
1.4.3.	Antioksidansi u biljkama.....	17
2.	OBRAZLOŽENJE TEME .....	19
3.	MATERIJALI I METODE .....	20
3.1.	MATERIJALI .....	20
3.1.1.	Biljni materijal.....	20
3.1.2.	Kemijski reagensi .....	20
3.1.3.	Instrumenti i pribor.....	22
3.2.	ANALIZA POLIFENOLNIH SASTAVNICA METODOM TANKOSLOJNE KROMATOGRAFIJE.....	23
3.3.	SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE SADRŽAJA POLIFENOLA ....	23
3.3.1.	Određivanje sadržaja fenolnih kiselina .....	23
3.3.2.	Određivanje sadržaja flavonoida .....	25
3.3.3.	Određivanje sadržaja trjeslovina .....	26
3.4.	ISPITIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG UČINKA.....	27
3.4.1.	Priprema biljnih ekstrakata.....	27
3.4.2.	Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala.....	28
3.4.3.	Određivanje sposobnosti keliranja iona željeza(II) .....	29

3.4.4.	Određivanje sposobnosti redukcije .....	30
3.4.5.	Statistička obrada podataka .....	30
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	31
4.1.	ANALIZA TANKOSLOJNOM KROMATOGRFIJOM .....	31
4.1.1.	Fenolne kiseline.....	31
4.1.2.	Flavonoidni glikozidi .....	33
4.2.	ODREĐIVANJE SADRŽAJA FENOLNIH KISELINA, FLAVONOIDA I TRJESLOVINA .....	35
4.2.1.	Fenolne kiseline.....	35
4.2.2.	Flavonoidi.....	36
4.2.3.	Trjeslovine.....	37
4.3.	ISPITIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG UČINKA.....	38
4.3.1.	Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH radikala.....	38
4.3.2.	Određivanje sposobnosti keliranja iona željeza(II).....	41
4.3.3.	Određivanje sposobnosti redukcije .....	43
5.	ZAKLJUČCI.....	45
6.	LITERATURA.....	46
7.	SAŽETAK/SUMMARY .....	52
8.	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	

## 1. UVOD

Primjena biljaka i biljnih pripravaka u terapijske svrhe poznata je čovjeku od davnina. Razvojem znanosti omogućeno je otkrivanje sastavnica odgovornih za terapijski učinak biljaka, što je dovelo do boljeg uvida u mehanizam djelovanja i samu djelotvornost biljaka u liječenju. Napretkom kemije i industrije unazad nekoliko desetaka godina došlo je do sinteze velikog broja sintetskih lijekova. No, zbog ograničenja učinkovitosti, sigurnosti i primjene sintetskih lijekova, liječenje biljkama i biljnim preparatima u zadnje vrijeme ponovo dobiva na značaju. Prema anketi Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) oko 80% ljudi u svijetu koristi nekonvencionalne lijekove, posebice biljke i njihove preparate. Danas je poznato mnogo biljnih vrsta i biljnih preparata koji se koriste u liječenju i sprječavanju bolesti te očuvanju zdravlja. Jedan od načina očuvanja zdravlja je unos antioksidansa u organizam. Antioksidansi štite organizam od oksidacijskog stresa te posljedično mogu smanjiti pojavnost bolesti koje se s njim povezuju. Biljke su bogati izvor antioksidansa i često se koriste u te svrhe.

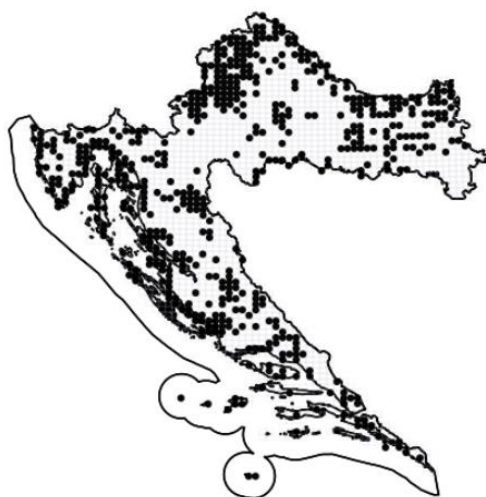
Neke od biljaka koje se koriste u fitoterapiji su i vrste obrađene u ovom diplomskom radu, a to su *Artemisia caerulescens* L., *Artemisia verlotiorum* Lamotte te *Artemisia vulgaris* L. iz porodice Asteraceae. Niti jedna od tih vrsta nema svoju monografiju u Europskoj farmakopeji, ali se opsežno istražuju njihovi biološki učinci.

## 1.1.BOTANIČKI PREGLED

### 1.1.1. Obilježja roda *Artemisia*

Rod *Artemisia* jedan je od najvećih i najrasprostranjenijih rodova porodice Asteraceae. On broji oko 500 vrsta. Neke od najpoznatijih vrsta su *A. absinthium*, *A. annua*, *A. afra*, *A. dracunculus*, *A. verlotiorum* te *A. vulgaris*. Biljne vrste ovog roda su jednogodišnji, dvogodišnji ili višegodišnji grmovi ili polugrmovi uspravnih stabljika. Naseljavaju sve kontinente osim Antartike, a najviše rastu u stepama umjerenog pojasa Azije ili planinskim i alpskim područjima Europe te u Sjevernoj Americi (Vallès i sur., 2011; Kreitschitza i Vallès, 2007).

Biljne vrste roda *Artemisia* rasprostranjene su po cijeloj Hrvatskoj. Rod je široko rasprostranjen, vrste se pojavljuju od razine mora do visokih planina te od sušnih zona do močvarnih područja. Listovi biljaka su naizmjenični, često podijeljeni, rijetko cijeli i cjelovitih rubova (Taleghani i sur., 2020). Cvjetovi su crvene, smeđe ili žute boje, uglavnom cjevasti i uski. Oni su skupljeni u glavice, a one izgrađuju cvat koji je najčešće metlica. Glavice su sitne, a mogu biti ovalne, sferične ili cilindrične. Broj cvjetova u cvatu je 4-7, a nekada i više od 40. Cvjetovi nisu jako upadljivi. Plod ovih biljaka je roška. Ona je ovalnog ili elipsastog oblika te može imati papus. Skoro sve vrste sadrže velik broj gorkih sastavnica i eterična ulja (Vallès i sur., 2011).



**Slika 1.** Rasprostranjenost vrsta roda *Artemisia* u Hrvatskoj (preuzeto s: <https://hirc.botanic.hr>).

#### 1.1.1.1. *Artemisia caerulescens* L.

*Artemisia caerulescens* L., odnosno morski pelin ili šantonik, grmolika je, pustenasta ili gola biljka koja prvenstveno naseljava područja uz europski dio morske obale središnjeg i zapadnog Mediterana, najčešće na najnižim muljevitim mjestima koja preplavljuje more. Morski pelin je polugrm visine do 50 cm (Kušan, 1956). Stabljika je drvenasta, razgranata i puna listova. Listovi su naizmjenični, linearni ili kopljasti te se razlikuju gornji od donjih. Gornji listovi su cjeloviti ili dlanasto rascijepljeni na 2, 3 ili 4 dijela, a donji su duboko dvostruko podijeljeni. Cvjetovi ove biljke su dvospolni, pentamerni i skupljeni u guste, uske i duguljaste glavice okružene s nekoliko redova pricvjetnih listova (Domac, 1973). Glavice čine metličasti cvat. Plod je roška bez papusa, duga 1,7-3 mm. Biljka ima karakterističan miris kao i pravi pelin te je gorkog okusa.



**Slika2.** *Artemisia caerulescens* L. (preuzeto s:<http://www.florasilvestre.es>).



### 1.1.1.2. *Artemisia verlotiorum* Lamotte

*Artemisia verlotiurum* L., poznata kao kineski pelin ili verlotov pelin, višegodišnja je zeljasta biljka porodice Asteraceae. Porijeklom je iz istočne Azije. Kineski pelin dobio je ime prema Jeanu Baptiste Verlotu, botaničaru koji ga je otkrio 1873. godine ([www.plantea.com](http://www.plantea.com)). U Hrvatskoj je prvi put zabilježen 1969. godine. On raste u toplijim područjima Europe. U Hrvatskoj nije jednolično rasprostranjen. Jasno se razabiru tri područja rasprostranjenosti te vrste: gornjoposavsko, sjevernoprimorsko te srednjeprimorsko. Kod nas najčešće raste na antropogenim staništima uz rubove cesta te drugim ruderalnim površinama unutar naselja. Može se naći i na obalama rijeka, kanala, šljunčara i drugih voda gdje obično raste na poluprirodnim vlažnim i sjenovitim staništima uz rubove vrbika i drugih tipova poplavnih šuma ili šikara (Smital i sur., 1997).



**Slika 3.** Rasprostranjenost vrste *Artemisia verlotiorum* Lamotte u Hrvatskoj (preuzeto s: <https://hirc.botanic.hr>).

Vrlo često raste na istim staništima kao i *A. vulgaris*. Te dvije vrste mogu se lako zamijeniti, no kineski pelin je prepoznatljiv po intenzivnom mirisu, kasnijem vremenom cvatnje, pojavi dugih podzemnih vriježa te obliku gornjih listova stabljike koji imaju linearno-suličaste liske cjelovitog ruba. Ova biljka raste do 2 metra visine. Ima čvrstu, uspravnu i dlakavu stabljiku. Prizemni listovi su skupljeni u rozetu, listovi na stabljici su naizmjenični, složeni, jednostruko perasto razdijeljeni na duguljaste i uske liske cjelovitih rubova, na licu zeleni, bjelkastog i dlakavog naličja, rub im je previnut te su aromatična mirisa.

Kineski pelin ima sitne cjevaste cvjetove skupljene u male, viseće, glavičaste cvatove. Pojavljuju se dvije vrste cvjetova, vanjski koji su ženski i nekad izostaju te središnji koji su dvospolni. Svaki cvijet ima pet prašnika, a prašnice su međusobno srasle. Plod kineskog pelina je sitna, glatka roška bez papusa duljine oko 1-1,5 mm (Smital i sur., 1997).



**Slika 4.** *Artemisia verlotiorum* Lamotte (preuzeto s: <https://visiani.botanic.hr>).

### 1.1.1.3. *Artemisia vulgaris* L.

*Artemisia vulgaris* L., u narodu poznata kao divlji pelin, crni pelin ili obični pelin je višegodišnja zeljasta biljka koja raste kao korov na zapuštenim površinama kao što su područja uz ceste i pruge, obale rijeka, živice te u voćnjacima i vinogradima. Brzo širenje vrste omogućuju dobro razvijeni podanci (Abiri i sur., 2018). Najbolje uspijeva na plodnom, ilovastom i pjeskovitom tlu Europe, Azije i Sjeverne Amerike (Glavaš, 2019).

Korijen je drvenast, iznutra bijele boje, do 1 cm u promjeru, mirisa na zemlju koji se na kraju dijeli u više dugih korjenčića. Divlji pelin raste do visine 30-200 cm. Stabljika je uspravna, izbrazdana, smeđa ili crvenkasta, dlakava, u donjem dijelu odrvenjela, obično metlasto razgranata. Listovi su sjedeći, naizmjenični, čvrsti, dugi 5-10 cm, u gornjem dijelu dvostruko, a ostali jednostruko perasto razdijeljeni, odozgo tamnozeleni i goli, a na naličju bijeli i pustenasti (Glavaš, 2019; Abiri i sur., 2018; Grlić, 1986; Domac, 1973).

Na vrhovima ogranaka razvijaju se brojne cvatne glavice skupljene u cvatove poput klasa ili metlice (Glavaš, 2019). Glavice su ovalne, 3-4 mm duge te 2 mm široke. Cvat čini do dvadesetak sitnih, žućkastih ili crvenkastih, cjevastih cvjetova od kojih su rubni cvjetovi samo ženski dok su ostali dvospolni. Biljka cvate od lipnja do rujna. Plod je roška, duga oko 1,5 cm, smeđa, izbrazdana, sužena pri bazi, s malom bodljom pri vrhu. Divlji pelin je aromatična biljka gorkog okusa (Glavaš, 2019; Abiri i sur., 2018).



**Slika 5.** *Artemisia vulgaris* L. (preuzeto s: <https://visiani.botanic.hr>).

## 1.2.SEKUNDARNI METABOLITI

Biljke tijekom života proizvode brojne tvari koje se mogu podijeliti u primarne i sekundarne metabolite. Za razliku od primarnih metabolita koji su bitni za ključne životne procese, sekundarni su važni u prevenciji i obrani biljke od biotičkog ili abiotičkog stresa. Biotički stres podrazumijeva oštećenje biljke mikroorganizmima, drugim biljkama, insektima te herbivorima, dok abiotički uključuje učinke temperature, suše, UV zračenja, pH vrijednosti tla i druge. Sekundarni metaboliti pridonose mirisu, okusu te boji biljaka i tako privlače kukce za oprašivanje i životinje rasprostrivače sjemena. Neke sekundarne metabolite biljke proizvode kontinuirano, dok druge sintetiziraju ovisno o okolišnim čimbenicima (Gómez-Caravaca i sur., 2014).

Sekundarni metaboliti pokazuju mnoge farmakološke učinke (Wink, 2015). Upravo se zbog toga izolirani sekundarni metaboliti ili biljke koje ih sadrže koriste u prevenciji i liječenju brojnih poremećaja i bolesti. Smatra se da dugoročno uzimanje malih količina određenih sekundarnih metabolita povoljno djeluje na zdravlje te smanjuje vjerojatnost razvoja karcinoma i mnogih kroničnih bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti i diabetes mellitus tip 2 (Crozier i sur., 2006). Uglavnom je nemoguće odrediti jedan sekundarni metabolit zaslužan za farmakološko djelovanje ekstrakta ili biljke. Moguće je da je farmakološko djelovanje posljedica sinergističkog djelovanja više sekundarnih metabolita.

Ovisno o kemijskoj strukturi i biosintetskom podrijetlu sekundarni metaboliti se najčešće dijele u 3 skupine: fenole, terpene te spojeve s dušikom ili sumporom (Crozier i sur., 2006). Vrste roda *Artemisia* bogate su flavonoidima, terpenima, seskviterpenskim laktonima te kumarinima (Taleghani i sur., 2020). Ovaj rad bavi se određivanjem fenolnih sastavnica stoga će one biti detaljnije opisane u nastavku.

### 1.2.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su spojevi koji imaju aromatski prsten supstituiran s barem jednom hidroksilnom skupinom. Fenoli obuhvaćaju jednostavne spojeve male molekulske mase s jednim aromatskim prstenom, npr. fenolne kiseline, ali i velike kompleksnije strukture kao što su trjeslovine. Često se mogu naći u obliku konjugata sa šećerima ili organskim kiselinama (Crozier i sur., 2006). Većina fenolnih sastavnica nastaje biosintetskim putem šikiminske kiseline. Pokazalo se da su upravo fenoli odgovorni za farmakološke učinke kao što su protuupalno, antioksidacijsko i antimikrobno djelovanje.

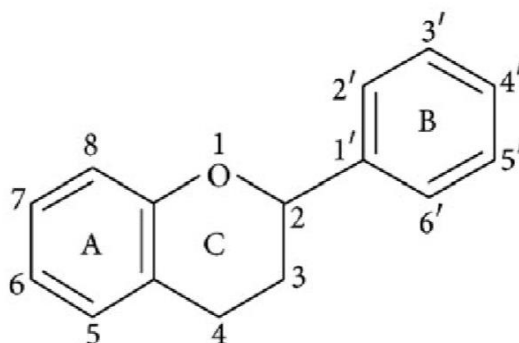
Ova skupina obuhvaća veliki broj različitih spojeva koji se dijele u podskupine ovisno o broju i razmješčaju ugljikovih atoma, kao što je prikazano u Tablici 1 (Crozier i sur., 2006).

**Tablica 1.** Podjela fenolnih spojeva prema broju i razmješčaju ugljikovih atoma.

Broj C atoma	Kostur	Fenolni spojevi
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	hidroksibenzojeve kiseline
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	acetofenoni
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	fenilacetati
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	fenilpropani
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	kumarini
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	naftokinoni
13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	ksantoni
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	stilbeni
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	flavonoidi

### 1.2.1.1. Flavonoidi

Flavonoidi su najbrojniji i najraznovrsniji fenolni spojevi. Oni čine gotovo 2/3 prehrambenih fenola. Do danas je poznato oko 8000 flavonoida (Croteau i sur., 2000). To su spojevi osnovne strukture C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> koji sadrže dvije aromatske jezgre (A i B) koje su preko prstena A povezane s piranskim prstenom C (Taleghani i sur., 2020).

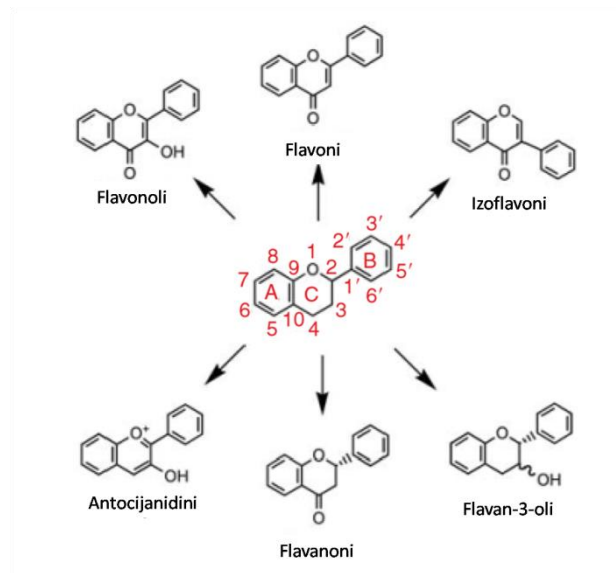


**Slika 6.** Osnovna struktura flavonoida (Jucá i sur., 2020).

Prisutni su u svim dijelovima biljke, a u nešto većim koncentracijama se mogu naći u epidermi listova te kori voća. Flavonoidi biljci pružaju zaštitu od UV zračenja, omogućuju pigmentaciju, zaštitu biljke od bolesti i stresnih uvjeta te fiksaciju dušika. Najčešće ih se može naći u obliku O-glikozida, kada se jedna ili više hidroksilnih skupina aglikona, najčešće na položajima 3 i 7, veže na šećer, no ponekad se mogu naći i u obliku čvrstih C-glikozida koji nastaju vezanjem šećera izravno na ugljikov atom aromatske jezgre, obično na položajima C6 i/ili C8. U glikozilaciju su najčešće uključeni glukoza, galaktoza, ramnoza i arabinoza. Flavonoidna jezgra može imati različite supstituente, a hidroksilna skupina se najčešće pojavljuje na položajima 3, 5, 7, 3', 4' i 5' (Feng i sur., 2017; Crozier i sur., 2006).

Flavonoidi se istražuju zbog svojih brojnih farmakoloških učinaka. Protuupalno i imunomodulatorno djelovanje, hepatoprotektivni i antivirusni te antibakterijski učinak, kao i zaštita kože od UV zračenja samo su neki od farmakoloških učinaka koji se pripisuju flavonoidima. Dodatno, izoflavoni imaju fitoestrogeni učinak koji može umanjiti simptome menopauze (Jucá i sur., 2020; Feng i sur., 2017).

Flavonoidi se dijele na flavone, flavonole, flavanone, antocijanidine, flavan-3-ole (katehine) i izoflavone. Postoje i druge, manje zastupljenije, podskupine flavonoida, primjerice flavan-3,4-dioli, dihidroflavonoli, kumarini i drugi (Crozier i sur., 2006).



**Slika 7.** Podjela flavonoida na osnovne podskupine (Crozier i sur., 2006).

### 1.2.1.2.Neflavonoidni fenolni spojevi

Skupina neflavonoidnih fenolnih spojeva uključuje fenolne kiseline i njihove derivate te stilbene (Crozier i sur., 2006).

Fenolne kiseline su fenolne sastavnice s jednom karboksilnom skupinom. One se mogu podijeliti na derivate benzojeve te cimetne kiseline. Cimetna kiselina i njezini derivati su fenilpropani koji mogu nastati iz aminokiseline fenilalanin. Najčešći derivati cimetne kiseline su 4-kumarna, kavena, ferulična i sinapna kiselina, koje iz nje nastaju naknadnim reakcijama hidroksilacije i metilacije. Ove kiseline mogu biti u slobodnom obliku ili esterificirane, npr. cimetna kiselina esterificirana s kina kiselinom daje klorogensku kiselinu (Kumar i Goel, 2019; Vladimir-Knežević, 2016; Crozier i sur., 2006).

Derivati benzojeve kiseline nastaju skraćivanjem postraničnog lanca fenilpropana, najčešće jedne od kiselina nastalih iz cimetne kiseline. Oni mogu biti slobodni ili esterificirani. Jedan od poznatijih derivata benzojeve kiseline je aldehid vanilin (Kumar i Goel, 2019; Vladimir-Knežević, 2016).

Neki od derivata benzojeve kiseline su i galna kiselina, koja esterificirana s glukozom daje galotanine, te elagna koja sa šećerima daje elagtanine. Galotanini uz elagtanine spadaju u trjeslovine koje hidroliziraju. Za razliku od trjeslovina koje hidroliziraju, kondenzirane trjeslovine (polimerni spojevi sastavljeni od flavon-3-ola) nisu podložne kiselinskoj ili enzimskoj hidrolizi. Trjeslovine imaju izražen adstringensni učinak, zbog čega se često koriste u farmakoterapiji. Stilbeni su fenolni spojevi strukture C6-C2-C6. Oni su fitoaleksini, a najpoznatiji stilben je resveratrol (Kumar i Goel, 2019; Vladimir-Knežević, 2016; Crozier i sur., 2006).

### **1.3.PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA**

#### **1.3.1. Biološki učinci vrsta roda *Artemisia***

Razne vrste roda *Artemisia* tradicionalno su se koristile kao karminativi, kolagozi, dijaforetici, digestivi, spazmolitici, antihelmintici, antireumatici, antioksidansi i kao antibakterijska i protuupalna sredstva te u liječenju menstrualnih poremećaja. Za većinu tih učinaka odgovorne su sastavnice eteričnih ulja, prvenstveno seskviterpenski laktoni. Najpoznatija primjena roda *Artemisia* je u liječenju malarije. Tu je prvenstveno bitna *A. annua* koja ima najveći antimalarijski potencijal. Spoj odgovoran za taj učinak je artemisinin. On se često koristi u kombinaciji s drugim antimalarijskim lijekovima za uspješno liječenje malarije. Vrste ovoga roda se u modernoj medicini koriste zbog učinka induciranja apoptoze, antitumorskog te antiplazmodijskog učinka (Taleghani i sur., 2020; Nigam i sur., 2019; Vallès i sur., 2011).

#### **1.3.2. Biološki učinci vrste *Artemisia caerulescens* L.**

Postoje zapisi da se ova biljna vrsta u tradicionalnoj medicini koristila kao antihelmintik (Kušan, 1956). Zadnjih nekoliko godina dobiva pozornost zbog potencijalnog citotoksičnog učinka (JoséAbad i sur., 2012). Najviše se istražuju učinci eteričnog ulja *A. caerulescens*. Eterično ulje te vrste pokazalo je citotoksičnu aktivnost na MDA-MB231, A375 i HCT116 staničnim linijama uz  $IC_{50}$  vrijednost od 5,20 do 7,61  $\mu\text{g/ml}$ . Citotoksična aktivnost posljedica je djelovanja (E)-nerolidola,  $\beta$ -oplopenona, cis-sabinen hidrata te terpinen-4-ola. U studijama je određen kemijski sastav eteričnog ulja *A. caerulescens*: (E)-nerolidol,  $\beta$ -oplopenon, cis-sabinen hidrat i terpinen-4-ol (Ornano i sur., 2016; JoséAbad i sur., 2012).

#### **1.3.3. Biološki učinci vrste *Artemisia verlotiorum* Lamotte.**

U tradicionalnoj se medicini kineski pelin koristio kao lijek za hipertenziju (Taleghani i sur., 2020; Singh Bora i Sharma, 2011). Također, kineski pelin se koristio za liječenje respiratornih, probavnih i urogenitalnih poremećaja te kod renalne insuficijencije (Suroowan i sur., 2019; Bittencourt De Souza i sur., 2010). U novije doba postoje istraživanja antiproliferativnog i genotoksičnog, repelentnog, larvicidnog te antimikotičkog učinka, no njih je potrebno dodatno istražiti (Bedini i sur., 2018; Barbosa i sur., 2013; Bittencourt de Souza i sur., 2010).



Bittencourt de Souza i suradnici su u studiji iz 2010. godine dokazali antiproliferativni i genotoksični učinak vodenog ekstrakta *A.verlotiorum* u tri koncentracije (6, 32 i 48 g/L) na staničnom ciklusu vrste *Allium cepa*. Marx i suradnici (2010) su pokazali da organski ekstrakt listova *A. verlotiorum* povećanjem oksidacijskog stresa inducira staničnu smrt u RXF-393 stanicama uz IC<sub>50</sub> vrijednost 21 µg/mL.

*A.verlotiorum* također je ispitivana za repelentnu upotrebu. *A.verlotiorum* pokazala je najdulji repelentni učinak od ostalih biljaka u istraživanju, što potvrđuje potpunu zaštitu tretirane kože od Azijskog tigrastog komarca, *Aedes albopictus*, u vremenskom razdoblju 60% duljem u odnosu na sintetički repelent DEET (Bedini i sur., 2018). Vodeni ekstrakt *A. verlotiorum* pokazao je učinak protiv plijesni *Saprolegnia ferax* u minimalnoj inhibitornoj koncentraciji (MIC) 1%, dok je metanolni ekstrakt pokazao učinkovitost u MIC 0,25% (Macchioni i sur., 1999). Također, heksanski ekstrakt listova *A. verlotiorum* u koncentraciji 100 ppm pokazao je 100 %-tni učinak protiv jajašaca *Biomphalaria glabrata*, dok su alkoholni ekstrakti ove biljke ubijali 90% odraslih jediniki *Biomphalaria glabrata*, vjerojatno zbog seskviterpenskih laktona i laktona u ovoj biljci. Ove sastavnice su također pokazale repelentni i insekticidni učinak na vrstu *Spodoptera littoralis Boisduval* (Barbosa i sur., 2013). Također, u studiji Chiarria i suradnika iz 2010. godine ispitano je inhibitorno djelovanje *A. verlotiorum* na enzim tirozinazu, prvi enzim u sintezi melanina. Kineski pelin pokazao je više od 90%-tnu inhibiciju tirozinazne monofenolazne aktivnosti u koncentraciji 1000 µg/ml. Studija Calderonea i suradnika (1999) pokazala je da osušeni vodeni ekstrakt kineskog pelina ima znatan hipotenzivni učinak na krvni tlak anesteziranih štakora i na in vitro izolirane aorte štakora.

#### 1.3.4. Biološki učinci vrste *Artemisia vulgaris* L.

Divlji pelin se prvenstveno koristi u liječenju tegoba gastrointestinalnog sustava. On potiče stvaranje probavnih sokova u želucu i crijevima, u jetri pojačava stvaranje žuči i poboljšava njen prelazak u crijevo. Divlji pelin također pojačava apetit (Marčinković, 2001; Pahlow, 1989). Posjeduje i diuretička, antioksidacijska, antitumorska, imunomodulatorna, spazmolitička, hipoglikemijska te ekspektoransna svojstva (Taleghani i sur., 2020; Abiri i sur., 2018). Slovi kao djelotvorni antiseptik s antibakterijskim i antimikotičkim svojstvima pa se koristio u liječenju groznice, upale kože te reumatizma. Svoju je upotrebu našao i kod živčanih oboljenja kao što su blaga depresija, stres ili napetost u menopauzi te kod opće slabosti s glavoboljom i mučninom, a može se koristiti i kao sedativ (Ašić, 1999). Također, u narodnoj medicini se primjenjivao u liječenju padavice (epilepsije) (Marčinković, 2001; Gursky, 1999; Zovkić, 1999; Pahlow, 1989).

Tradicionalno se koristio za poticanje menstruacije kod amenoreja, liječenja dismenoreja i regulaciju ciklusa kod menoreja te za indukciju poroda ili pobačaja (Marčinković, 2001; Ašić, 1999; Kušan, 1956). Smatra se da ima i antihistaminsko te antialergijsko djelovanje (Ogawa i sur., 2008). U novije doba, istražuju se potencijalni antitumorski, hepatoprotektivni, insekticidni i larvicidni te antioksidacijski učinci divljeg pelina (Hanh i sur., 2017; Rasheed i sur., 2017; Saleh i sur., 2014; Vahdati-Mashhadian i sur., 2009; Temraz i El-Tantawy, 2008). *A. vulgaris* je u zadnje vrijeme uglavnom istraživana zbog svojih citotoksičnih učinaka. Hanh i suradnici su u studiji iz 2017. dokazali slabi citotoksični učinak *A. vulgaris* na HepG2, KB, LNCaP, MCF7 i SK-Mel2 stanicama uz IC<sub>50</sub> vrijednost veću od 100 μM. Nađeno je da su za taj učinak odgovorna dva seskviterpenska laktone izolirana iz nadzemnih dijelova *A. vulgaris*, vulgarolidi A i B. Srebrne nanočestice ekstrakta listova vrste *A. vulgaris* pokazale su mogući citotoksični učinak protiv HeLa i MCF-7 staničnih linija uz preživljavanje stanica od 20%, odnosno 18% pri koncentraciji 140 μg/ml (Rasheed i sur., 2017). Studija Vahdati-Mashhadiana i suradnika (2009) je dokazala da etanolni ekstrakt *A. vulgaris* ima citotoksični učinak na HepG-2 stanice s IC<sub>50</sub> vrijednosti 41,0±1,0 μg/ml. Prema Salehu i suradnicima (2014) eterično ulje *A. vulgaris* pokazalo je citotoksični učinak na HL-60 stanicama leukemije u koncentraciji 2,0 μg/mL.

Ogawa i suradnici su u studiji iz 2008. godine pokazali da *A. vulgaris* može pomoći kod svrbeža povezanog s hipertrofičnim ožiljcima nakon opekline.

Istraživan je antinociceptivni i protuupalni učinak ove vrste. Fushiya i suradnici (2000) su uočili inhibitorni učinak *A. vulgaris* na proizvodnju NO u makrofagima i povezali taj učinak s

protuupalnim djelovanjem. Za razliku od njih, Pires i suradnici nisu u studiji iz 2009. godine dokazali protuupalni učinak vodenoalkoholnog ekstrakta *A.vulgaris*, ali jesu blagi antinociceptivni učinak vodenoalkoholnog ekstrakta *A.vulgaris*.

Veliki interes za antioksidacijsko djelovanje biljaka potaknuo je antiradikalna istraživanja. Vodeni ekstrakt *A.vulgaris* je u studiji Temraza i El-Tantawya (2008) pokazao znatan potencijal hvatanja DPPH radikala s  $IC_{50}$  vrijednosti 11.4  $\mu\text{g/ml}$ . Također, dokazan je i redukcijski potencijal ekstrakta koji ovisi o količini korištenog ekstrakta. Ista studija pokazala je da sadržaj fenolnih spojeva, iskazan kao ekvivalenti galne kiseline, iznosi  $19 \pm 0.16$  mg/g biljnog ekstrakta te da je sadržaj flavonoida i flavonolnih derivata, iskazanih kao ekvivalenti rutina,  $7.96 \pm 0.76$  mg/g biljnog ekstrakta, odnosno  $3.4 \pm 0.0$  mg/g biljnog ekstrakta. Studija je pokazala i da je primjena biljnog ekstrakta *A.vulgaris* na štakorima rezultirala značajnim povećanjem razine glutationa u krvi, aktivnosti superoksid dismutaze te serumske koncentracije askorbinske kiseline u štakora u odnosu na kontrolu. Rezultati ove studije pokazuju značajan antioksidacijski učinak *A. vulgaris*.

## 1.4.OKSIDACIJSKI STRES I ANTIOKSIDANSI

### 1.4.1. Oksidacijski stres

U organizmu u fiziološkim uvjetima postoji ravnoteža između oksidacijskog djelovanja te zaštitnog antioksidacijskog učinka. Narušavanje te ravnoteže u korist prooksidansa dovodi do oštećenja stanica i tkiva te posljedično brojnih poremećaja i bolesti, što se naziva oksidacijski stres. Za oksidacijsko djelovanje najčešće su zaslužne reaktivne kisikove vrste („reactive oxygen species“, ROS), ali i reaktivne dušikove vrste („reactive nitrogen species“, RNS) te brojni drugi oksidansi.

Reaktivne kisikove vrste obuhvaćaju slobodne radikale te čestice koje nisu radikali a imaju oksidacijsku moć. Slobodni radikali su ioni, atomi i molekule koji u vanjskoj ljusci imaju najmanje jedan nesporeni elektron. Zbog nesporenih elektrona, slobodni radikali su vrlo reaktivni. Najčešći slobodni radikali su superoksid anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksilni radikal ( $HO^{\cdot}$ ), peroksilni radikal ( $RO_2^{\cdot}$ ) te alkoksilni radikal ( $RO^{\cdot}$ ), dok su neke od neradikalnih čestica vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hipokloritna kiselina ( $HOCl$ ), ozon ( $O_3$ ) i jednostavni singletni kisik ( $^1O_2$ ). Te čestice mogu vrlo lako i brzo prijeći u reaktivne radikale kisika. Reaktivne dušikove vrste u svojem sastavu osim kisika sadrže i dušik. Dušikov monoksid ( $NO$ ), dušikov dioksid ( $NO_2$ ) te peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) su neke od njih. Neke RNS mogu dovesti do deaminacije i nitracije DNA (Štefan i sur., 2007).

Glavne karakteristike slobodnih radikala su vrlo kratak poluživot, niska specifičnost za reaktante i velika reaktivnost. Velika kemijska reaktivnost radikala posljedica je potrebe da postignu elektronsku stabilnost zbog čega reagiraju sa susjednom molekulom uzimajući joj elektrone. Susjedna molekula tako postaje novi radikal i dalje ulazi u istu reakciju s drugim molekulama u blizini, tvoreći lančanu reakciju stvaranja radikala. Slobodni radikali tako mogu reagirati i s biološkim makromolekulama kao što su nukleinske kiseline, proteini te lipidi stanične membrane i oštetiti ih. Oštećenje nukleinskih kiselina uzrokuje mutacije, oksidacijom proteini gube svoju funkciju, a lipidi podliježu lipidnoj peroksidaciji čiji su konačni produkti reaktivni aldehidi (Parčetić-Kostelac i sur., 2016). Takva oštećenja staničnih struktura mogu dovesti do stanične smrti. Reaktivne kisikove vrste dakle mogu uzrokovati brojna oštećenja stanica i tkiva te se povezuju s bolestima kao što su kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti (primjerice Alzheimerova bolest), starenje, astma, upalni procesi te mutacije i kancerogenost (Güneş, 2019; Temraz i El-Tantawy, 2008).

Reaktivne kisikove vrste u malim količinama normalno nastaju u organizmu aerobnim metabolizmom, no mogu nastati i pod utjecajem vanjskih čimbenika kao što su UV zračenje, X zračenje, brojne toksične kemikalije, aromatski nitro spojevi i drugi. Njihovo nastajanje promoviraju prijelazni metali, npr.  $Fe^{2+}$ , koji sudjeluju kao prijenosnici elektrona između kisika i bioloških molekula. ROS u organizmu imaju brojne uloge. Primjerice, sudjeluju u imunološkom odgovoru kao proizvod fagocitnih stanica poput makrofaga i neutrofila koji ih koriste kao jedan od načina ubijanja mikroorganizama nakon fagocitoze. Također, sudjeluju u apoptozi, proliferaciji te unutarstaničnoj signalizaciji (Štefan i sur., 2007).

#### **1.4.2. Antioksidansi**

Uz svakodnevno fiziološko nastajanje ROS izuzetno je bitna prisutnost obrambenih mehanizama u organizmu koji bi spriječili nastajanje štete te popravili uzrokovana oštećenja. Studija Khairul Alama i suradnika iz 2020. godine pokazala je da se povećani unos antioksidansa povezuje s manjom incidencijom bolesti u čovjeka.

Antioksidansi su tvari koje u malim koncentracijama brzo neutraliziraju štetne učinke radikala i drugih oksidansa. Oni djeluju sprječavanjem nastanka te neutralizacijom već nastalih slobodnih radikala, uklanjanjem ili popravkom oštećenih molekula te uklanjanjem prijelaznih metala i ciljnih ROS. Oni nastaju u stanicama ili se unose u organizam, najčešće hranom (Parčetić-Kostelac i sur., 2016; Štefan i sur., 2007).

Antioksidansi se mogu podijeliti na dvije skupine: enzimске i neenzimске antioksidanse. Najvažniji enzimski antioksidansi su superoksid-dismutaza, katalaza, glutation-peroksidaza, glutation-S-transferaza, glutation reduktaza te askorbat-oksidaza. Ovi enzimi nalaze se u različitim dijelovima stanice te imaju različite funkcije. Drugu skupinu antioksidansa čine brojne molekule koje pretvaraju vrlo reaktivne, nestabilne slobodne radikale u stabilnije čestice male reaktivnosti koje ne predstavljaju opasnost za organizam. Prilikom toga, stvaraju se stabilni, ne toliko kemijski reaktivni, radikali antioksidansa koji neće naštetiti organizmu. Također, antioksidansi ove skupine keliraju metalne ione i sprječavaju njihovu ulogu u stvaranju slobodnih radikala. Ova skupina obuhvaća bitne „čistače“ radikala: vitamin C, vitamin E, glutation, karotenoide, koenzim Q10, polifenole te brojne druge (Parčetić-Kostelac i sur., 2016).

### 1.4.3. Antioksidansi u biljkama

Biljke također mogu biti podložne oksidacijskom stresu. Ravnotežu između prooksidacijskih i antioksidacijskih čimbenika narušavaju okolišni stresni uvjeti. Jedan od njih je temperatura. Pokazalo se da smrzavanje, kao i zagrijavanje na određenu temperaturu, dovode do povećane produkcije ROS. Slanost, odnosno koncentracija NaCl kojem je biljka izložena, je još jedan od stimulusa oksidacijskog stresa. Suša, koja se smatra najštetnijim podražajem, kao i povećana koncentracija prijelaznih metala također dovode do pretjerane razine ROS. Povećane razine ROS u biljnoj stanici oštećuju makromolekule i narušavaju njihovu funkciju. Antioksidansi biljkama pružaju zaštitu od toksičnih učinaka radikala koji nastaju kao posljedica stresnih uvjeta iz okoline. Količina enzimskih i neenzimskih antioksidansa u biljci varira ovisno o stresnim uvjetima kojima je ona na svom staništu izložena (Rodrigo i Libuy, 2014).

Antioksidacijski učinak biljaka ne može se pripisati samo jednoj vrsti sastavnica, no smatra se da su najzaslužnije sastavnice flavonoidi i drugi fenolni spojevi (Mumivand i sur., 2017; Karabegović i sur., 2011). Mnoge studije pokazuju korelaciju između količine ukupnih fenola te antioksidacijskog učinka, kao i povezanost biljnih antioksidansa, prvenstveno flavonoida i drugih fenolnih spojeva, sa smanjenom incidencijom bolesti koje se povezuju s ROS (Mumivand i sur., 2017; Goncalves i sur., 2013; Wu i sur., 2011; Tohma i Gulçin, 2010).

Polifenoli biljaka svoje antioksidacijsko djelovanje ispoljavaju na nekoliko načina. Keliranjem prijelaznih metala te inhibicijom nekih oksidirajućih enzima sprječavaju nastanak novih ROS. Neki flavonoidi uključujući rutin, kvercetin te silibin imaju inhibitorno djelovanje na enzim ksantin oksidazu (Sanhueza i sur., 1992). Sposobnost doniranja elektrona ili protona im omogućuje da djeluju kao „čistači“ već nastalih slobodnih radikala. Polifenoli također vežu lipidne alkoksi radikale te modificiraju uređenost membrane i smanjuju fluidnost membrana te tako ometaju širenje lančane reakcije i ograničavaju lipidnu peroksidaciju. Antioksidacijski učinak duguju i međudjelovanju s drugim antioksidansima. Flavonoide i fenilpropane oksidira peroksidaza te tako sudjeluju u zajeničkom „čišćenju“ vodikovog peroksida sustavom fenola, askorbinske kiseline i peroksidaze (Rodrigo i Libuy, 2014). Flavonoidi su jedni od fenolnih sastavnica za koje je pokazano da imaju dobra antioksidacijska i kelirajuća svojstva.

Njihova djelotvornost protiv učinaka ROS leži u kemijskoj strukturi. Da bi molekula flavonoida mogla doniranjem protona djelovati kao „čistač“ radikala, mora imati određene strukturne karakteristike. One uključuju *orto*-dihidroksi supstituciju aromatskog prstena B te

C2-C3 dvostruku vezu i C4 karbonilnu skupinu na prstenu C. Slobodne hidroksilne skupine prstena B doniraju proton radikalima te ga tako inaktiviraju, a flavonoid postaje relativno stabilni flavonoid fenoksi radikal. C2-C3 dvostruka veza te C4 karbonilna skupina daju planarnu strukturu koja omogućuje delokalizaciju negativnog naboja, što utječe na konstantu disocijacije fenolne hidroksilne skupine te na stabilnost flavonoid fenoksi radikala. To u konačnici dovodi do jačeg antioksidacijskog djelovanja. Aglikoni su potentniji antioksidansi od pripadajućih glikozida (Wang i sur., 2018; Rodrigo i Libuy, 2014).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Oksidacijski stres povezan je s mnogim bolestima i poremećajima organizma. Različite biljne vrste sve se više istražuju kao prirodni izvor antioksidansa u odnosu na sintetske antioksidanse, koji se povezuju s brojnim neželjenim učincima.

*Artemisia* vrste imaju brojne terapijske učinke. Tradicionalno su se najviše koristile u liječenju gastrointestinalnih poremećaja, no počinju se istraživati i drugi učinci. Smatra se da zbog sadržaja fenolnih sastavnica vrste roda *Artemisia* posjeduju i antioksidacijsko djelovanje. Antioksidacijski učinak fenolnih sastavnica povezuje se sa smanjenom incidencijom karcinoma, ateroskleroze, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti te usporenim procesom starenja.

U okviru ovog rada provedena su istraživanja sa slijedećim ciljevima:

- fitokemijski karakterizirati zeleni odabranih vrsta roda *Artemisia*:
  - tankoslojnom kromatografijom provesti kvalitativnu analizu fenolnih kiselina i flavonoida,
  - spektrofotometrijski odrediti sadržaj fenolnih kiselina, flavonoida te trjeslovina,
- ispitati antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata odabranih vrsta spektrofotometrijskim određivanjem:
  - sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala,
  - sposobnosti keliranja iona željeza(II) te
  - sposobnosti redukcije.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1.MATERIJALI

##### 3.1.1. Biljni materijal

Za potrebe eksperimentalnog dijela rada korištena je na sobnoj temperaturi osušena, očišćena te usitnjena zelen sljedećih vrsta:

- *Artemisia caerulescens* L., skupljena 3. srpnja 2018. u Raškom zaljevu (Istra),
- *Artemisia verlotiorum* Lamotte, skupljena 10. srpnja 2018. u okolici Poreča,
- *Artemisia vulgaris* L., skupljena 10. srpnja 2018. na postaji Orjava.

##### 3.1.2. Kemijski reagensi

Za kvantitativno određivanje fenolnih kiselina korišteni su:

- kloridna kiselina 37% (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- destilirana voda
- etanol 96% p.a. (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev hidroksid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev molibdat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev nitrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Za kvantitativno određivanje flavonoida korišteni su:

- aceton (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- aluminijski klorid heksahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- bezvodni natrijev sulfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- destilirana voda
- etilacetat (POCH S. A., Gliwice, Poljska)
- heksametilentetramin (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kloridna kiselina 37% (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- metanol (T.T.T., Zagreb, Hrvatska)
- octena kiselina  $\geq 99,5\%$  (Lach-Ner, Neratovice, Češka)

Za kvantitativno određivanje trjeslovina korišteni su:

- destilirana voda
- Folin-Ciocalteu reagens (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- kožni prašak (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- natrijev karbonat dekahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Za određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala korišteni su:

- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- etanol 96% p.a. (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)

Za određivanje sposobnosti keliranja iona željeza(II) korišteni su:

- željezov(II) klorid tetrahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- etanol 96% p.a. (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- destilirana voda
- ferozin (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)

Za određivanje sposobnosti redukcije korišteni su:

- 0,2 M fosfatni pufer (pH 6,6)
- destilirana voda
- kalijev heksacijanoferat (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- trikloroctena kiselina (AcrosOrganics, Geel, Belgija)
- željezov(III) klorid (Fluka, Buchs, Švicarska)

Za tankoslojnu kromatografiju korišteni su:

- 2-aminoetil difenilborat (Fluka, Buchs, Švicarska)
- aceton (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- destilirana voda
- diizopropil-eter (T.T.T., Zagreb, Hrvatska)
- etil-acetat (POCH S. A., Gliwice, Poljska)
- metanol (T.T.T., Zagreb, Hrvatska)
- mravlja kiselina 98-100% (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- polietilenglikol 4000 (Fluka, Buchs, Švicarska)

### 3.1.3. Instrumenti i pribor

- ❖ analitička vaga (Mettler-Toledo, Švicarska-SAD)
- ❖ električni mlinac
- ❖ laboratorijska tresilica (GFL, Hannover, Njemačka)
- ❖ 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  $\gamma$  (Spectronic Unicam, Cambridge, Velika Britanija)
- ❖ vodena kupelj (Inko, Zagreb, Hrvatska)

### **3.2.ANALIZA POLIFENOLNIH SASTAVNICA METODOM TANKOSLOJNE KROMATOGRAFIJE**

Uzorak za tankoslojnu kromatografiju dobiva se desetominutnim ekstrahiranjem 1 g sakupljene, osušene te usitnjene zeleni odabranih vrsta s 10 mL metanola na vodenoj kupelji pri 60°C, uz povratno hladilo. Dobiveni filtrati korišteni su kao ispitivane otopine za kromatografska ispitivanja prisutnosti flavonoida i fenolnih kiselina. Otopine standardnih flavonoidnih glikozida (kvercitrin, izokvercitrin i rutin) te fenolnih kiselina (klorogenska i ružmarinska kiselina) pripremljene su otapanjem u metanolu kao 0,05% otopine. TLC analiza flavonoidnih glikozida i fenolnih kiselina provedena je na pločama s tankim slojem silikagela 60 F<sub>254</sub>, na koje su pomoću kapilare linijski naneseni uzorci i otopine standarda (10 µL).

Kao pokretna faza za određivanje flavonoidnih glikozida korištena je smjesa etil-acetata, mravlje kiseline i vode u volumnim omjerima 8:1:1 (V/V/V).

Kao pokretna faza za određivanje fenolnih kiselina korištena je smjesa diizopropil-etera, acetona, mravlje kiseline i vode u volumnim omjerima 5:3:1:1 (V/V/V/V).

Za detektiranje odijeljenih fenolnih sastavnica kromatografska je ploča prskana modificiranim Naturstoff-reagensom (1%-tna metanolna otopina 2-aminoetildifenilborata i 5%-tna etanolna otopina polietilenglikola 4000, NST/PEG) te promatrana pod UV svjetlom na 365 nm.

### **3.3.SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE SADRŽAJA POLIFENOLA**

#### **3.3.1. Određivanje sadržaja fenolnih kiselina**

Određivanje fenolnih kiselina provodi se spektrofotometrijskom metodom prema europskoj farmakopeji (EDQM 2019).

#### **Postupak**

Postupak se razlikuje ovisno o tome prema kojoj se fenolnoj kiselini, klorogenskoj ili ružmarinskoj, iskazuju rezultati. Glavna razlika je u valnoj duljini na kojoj se mjeri apsorbanacija ispitivane otopine. U nastavku se vrijednosti navedene u zagradama odnose na postupak kada se sadržaj izražava kao klorogenska kiselina.

#### Izrada ekstrakta:

0,200 (0,300) g suhog usitnjenog biljnog materijala se ekstrahira s 80 (95) mL 50%-tnog etanola zagrijavanjem 30 minuta u tikvici na kipućoj vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Nakon hlađenja, uzorak se filtrira te se filtrat u odmjerne tikvici razrijedi 50%-tnim etanolom do 100,00 mL.

#### Ispitivana otopina:

1 mL dobivenog ekstrakta se prebaci u odmjernu tikvicu od 10 mL i doda se redom: 2,0 mL 0,5 M kloridne kiseline, 2,0 mL nitrit-molibdat reagensa te 2,0 mL 8,5%-tne otopine natrijevog hidroksida. Tikvica se zatim nadopuni do oznake destiliranom vodom.

#### Poredbena otopina:

Ako se udio fenolnih kiselina izražava kao ružmarinska kiselina, 1,0 mL ekstrakta se razrijedi destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 10 mL. Ako se pak udio fenolnih kiselina izražava kao ružmarinska kiselina, potrebno je 1,0 mL ekstrakta pomiješati s 2,0 mL 0,5 M kloridne kiseline te 2,0 mL 8,5%-tne otopine natrijevog hidroksida i razrijediti destiliranom vodom do 10 mL.

Odmah se izmjeri apsorbancija ispitivanih otopina na 505 (525) nm u odnosu na poredbenu otopinu (ZERO BASE).

Maseni udio fenolnih kiselina (hidroksicimetnih derivata), izražen kao klorogenska kiselina, izračunat je prema izrazu:

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

gdje je  $A$  apsorbancija ispitivane otopine na 525 nm, a  $m$  je masa droge (g). Za određivanje je korištena specifična apsorbancija klorogenske kiseline na 525 nm koja iznosi 188.

Maseni udio fenolnih kiselina (hidroksicimetnih derivata), izražen kao ružmarinska kiselina, izračunat je prema izrazu:

$$\% \text{ fenolnih kiselina} = \frac{A \times 2,5}{m}$$

gdje je  $A$  apsorbancija ispitivane otopine na 505 nm, a  $m$  je masa droge (g). Za određivanje je korištena specifična apsorbancija ružmarinske kiseline na 505 nm koja iznosi 400.

### 3.3.2. Određivanje sadržaja flavonoida

Određivanje sadržaja flavonoida provodi se spektrofotometrijskom metodom prema europskoj farmakopeji (EDQM 2019).

#### Izrada ekstrakta:

0,600 g usitnjenog suhog biljnog materijala stavi se u tikvicu okruglog dna od 100 mL. Doda se 1 mL 5 g/L otopine heksametilentetramina, 20 mL acetona i 2 mL kloridne kiseline (250 g/L). Sadržaj tikvice zagrijava se 30 minuta na kipućoj vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Zatim se sadržaj tikvice filtrira preko malo pamuka, a ostatke biljne droge u tikvici i na pamuku (zajedno s pamukom) ponovo ekstrahira dva puta s po 20 mL acetona, zagrijavanjem tijekom 10 minuta. Filtrati se sjedine i ohlade te filtriraju preko filter-papira uz ispiranje tikvice u odmjernu tikvicu od 100,0 mL te nadopuni acetonom do oznake. Nakon toga, 20,0 mL acetonskog ekstrakta se prenese u lijevak za odjeljivanje i pomiješa s 20 mL vode. Sadržaj u lijevku se mućka najprije s 15 mL etilacetata, a zatim tri puta s po 10 mL etilacetata. Sjedinjeni etilacetatni ekstrakti se dodatno isperu u lijevku za odjeljivanje dva puta s po 50 mL vode. Na kraju se etilacetatni ekstrakti filtriraju preko 10 g bezvodnog natrijevog sulfata u odmjernu tikvicu od 50,0 mL i razrijede etilacetatom do oznake.

#### Ispitivana otopina:

U odmjernu tikvicu od 25 mL se prebaci 10,0 mL dobivenog ekstrakta, doda se 1,0 mL aluminijevog klorida i razrijedi 5%-tnom metanolnom otopinom octene kiseline do oznake.

#### Poredbena otopina:

10,0 mL etilacetatnog ekstrakta se razrijedi 5%-tnom metanolnom otopinom octene kiseline do 25 mL.

Apsorbancija ispitivane otopine mjeri se nakon 30 minuta na 425 nm u odnosu na poredbenu otopinu (ZERO BASE).

Sadržaj flavonoida, izražen kao izokvercetrozid, izračunat je pomoću specifične apsorbancije izokvercetrozida na 425 nm koja iznosi 500. Maseni udio flavonoida izračunat je prema izrazu:

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

gdje je  $A$  apsorbancija ispitivane otopine na 425 nm, a  $m$  je masa droge (g).

### 3.3.3. Određivanje sadržaja trjeslovina

Određivanje sadržaja trjeslovina provodi se spektrofotometrijski prema europskoj farmakopeji (EDQM 2019).

#### Izrada ekstrakta:

1,000 g praškasto usitnjene biljne droge prelije se u tikvici okruglog dna od 250 mL sa 150 mL vode i ekstrahira 30 minuta na vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Nakon hlađenja pod tekućom vodom, dobiveni ekstrakt se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 250 mL te nadopuni vodom do oznake. Potrebno je pustiti da se čestice istalože. Ekstrakt se zatim profiltrira preko filter-papira, a prvih 50 mL filtrata se odbaci.

#### Određivanje ukupnih polifenola:

5,0 mL filtrata je potrebno razrijediti vodom do 25,0 mL, a zatim 2,0 mL te otopine u odmjernoj tikvici od 25,0 mL pomiješati s 1,0 mL Folin-Ciocalteau reagensa i 10,0 mL vode. Sadržaj tikvice nadopuni se otopinom natrijevog karbonata (290 g/L) do oznake. Izmjeri se apsorbancija nakon 30 minuta na 760 nm uz vodu kao poredbenu otopinu (ZERO BASE).

#### Određivanje polifenola neadsorbiranih na kožni prašak (netaninski polifenoli):

U 10,0 mL filtrata doda se 0,10 g kožnog praška te se sadržaj tikvice snažno mućka 60 minuta na laboratorijskoj tresilici. Potom se sadržaj tikvice filtrira, a 5,0 mL dobivenog filtrata se razrijedi vodom do 25 mL. Zatim se 2,0 mL te otopine u odmjernoj tikvici od 25,0 mL pomiješa s 1,0 mL Folin-Ciocalteau reagensa te nadopuni do oznake otopinom natrijevog karbonata (290 g/L). Izmjeri se apsorbancija nakon 30 minuta na 760 nm uz vodu kao poredbenu otopinu (ZERO BASE).

#### Priprema standarda:

50,0 mg pirogalola se u odmjernoj tikvici od 100,0 mL otopi u vodi. Zatim se 5,0 mL dobivene otopine razrijedi vodom do 100,0 mL. 2 mL te otopine se u odmjernoj tikvici od 25,0 mL pomiješa s 1,0 mL Folin-Ciocalteau reagensa i 10,0 mL vode te nadopuni do oznake otopinom natrijevog karbonata (290 g/L). Izmjeri se apsorbancija nakon 30 minuta na 760 nm uz vodu kao poredbenu otopinu (ZERO BASE).

Sadržaj trjelsovina, izraženih kao pirogalol, računa se prema izrazu:

$$\% \text{ trjelsovina} = 6,25 \times \frac{(A_1 - A_2) \times m_2}{A_3 \times m_1}$$

gdje je  $m_1$  masa ispitivanog uzorka (g),  $m_2$  masa pirogalola (g),  $A_1$  apsorbancija uzorka s ukupnim polifenolima na 760 nm,  $A_2$  apsorbancija uzorka s polifenolima neadsorbiranim na kožni prašak na 760 nm te  $A_3$  apsorbancija pirogalola na 760 nm.

### **3.4. ISPITIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG UČINKA**

#### **3.4.1. Priprema biljnih ekstrakata**

Za određivanje antioksidacijskog učinka potrebno je pripremiti biljne ekstrakte.

20 g osušenih i praškasto usitnjenih nadzemnih dijelova ispitivanih vrsta potrebno je 30 minuta ekstrahirati s 200 mL 70%-tnog etanola na ultrazvučnoj kupelji. Dobivene ekstrakte treba filtrirati preko Whatman br. 1 filter-papira uz pomoć Büchnerovog lijevka. Biljni materijal zaostao na filter-papiru ponovno se ekstrahira na isti način. Sjedinjeni filtrati se upare uz rotacijski vakuum-uparivač pri 50°C, a dobiveni smolasti ostatak se liofilizira. Ovako dobiveni ekstrakti korišteni su za određivanja antioksidacijskog učinka.



### 3.4.2. 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).

#### Postupak:

Određivanje se provodi u duplikatu. Pripremi se niz serijskih razrjeđenja uzorka u 1,5 mL 96%-tnog etanola tako da konačni raspon koncentracija uzoraka bude 0,2-100 µg/mL. U kontrolne epruvete se umjesto uzorka stavi 1,5 mL 96%-tnog etanola. U svaku se epruvetu, koristeći repetitivnu pipetu, zatim doda po 0,5 mL svježe pripremljene 0,1 mM otopine DPPH radikala. Reakcijska smjesa inkubira se na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta. Nakon inkubacije, izmjeri se apsorbancija uzoraka na 517 nm uz 96%-tni etanol kao slijepu probu (ZERO BASE). Ukoliko su uzorci obojani, potrebno je prije mjerenja apsorbancije u epruvetu s 1,5 mL uzorka dodati 0,5 mL 96%-tnog etanola.

Postotak inhibicije radikala izračunat je prema izrazu:

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

gdje  $A_0$  predstavlja apsorbanciju kontrolne otopine koja je umjesto testiranog uzorka sadržavala jednaku količinu otapala, a  $A_1$  predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine umanjenu za apsorbanciju samog uzorka.

### 3.4.3. Određivanje sposobnosti keliranja iona željeza(II)

Sposobnost keliranja iona željeza(II) uzoraka vrste roda *Artemisia* određuje se spektrofotometrijskom metodom (Vladimir-Knežević i sur., 2011).

#### Postupak:

Određivanje se provodi u duplikatu. U epruvetama se pripremi niz serijskih razrjeđenja uzorka u 400  $\mu\text{L}$  prikladnog otapala tako da konačni raspon koncentracija uzoraka bude 25-800  $\mu\text{g/mL}$ . U kontrolne epruvete se umjesto uzorka stavi 400  $\mu\text{L}$  korištenog prikladnog otapala. U svaku se epruvetu doda 50  $\mu\text{L}$  2 mM otopine željezovog(II) klorida, a zatim 3,35 mL 96%-tnog etanola. Nakon 5 minuta, u svaku se epruvetu doda 200  $\mu\text{L}$  5 mM otopine ferozina i snažno promiješa automatskom pipetom. Reakcijska smjesa se inkubira 10 minuta na sobnoj temperaturi, a potom se izmjeri apsorbancija uzoraka na 562 nm uz 96%-tni etanol kao slijepu probu (ZERO BASE). U slučaju obojanih uzoraka, prije mjerenja apsorbancije se u epruvetu s 400  $\mu\text{L}$  uzorka doda 250  $\mu\text{L}$  vode i 3,35 mL 96%-tnog etanola.

Učinak keliranja metalnih iona izračunat je prema izrazu:

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

Gdje  $A_o$  predstavlja apsorbanciju kontrolne otopine bez uzorka, a  $A_I$  označava apsorbanciju ispitivane otopine korigiranu za vrijednost apsorbancije samog uzorka.

#### **3.4.4. Određivanje sposobnosti redukcije**

Sposobnost redukcije iona željeza(III) ekstrakata roda *Artemisia* ispituje se spektrofotometrijskom metodom (Vladimir-Knežević i sur., 2011).

##### Postupak:

Određivanje se provodi u duplikatu. U epruvetama se pripremi niz serijskih razrjeđenja uzorka u 1,0 mL prikladnog otapala tako da konačni raspon koncentracija uzoraka bude 0,78-100 µg/mL. U svaku se epruvetu doda 2,5 mL fosfatnog pufera (0,2 M, pH 6,6), a zatim 2,5 mL 1%-tne otopine kalijeva heksacijanoferata. Reakcijska smjesa se inkubira 20 minuta na 50°C u termostatu. Nakon inkubacije se u reakcijsku smjesu doda 2,5 mL 10%-tne otopine trikloroctene kiseline i po potrebi centrifugira. Potom se uzme 2,5 mL bistrog supernatanta te u drugoj epruveti pomiješa s 2,5 mL destilirane vode i 0,5 mL 0,1%-tne otopine željezovog(III) klorida. Izmjeri se apsorbancija uzoraka na 700 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu (ZERO BASE).

Redukcijska moć uzorka procjenjuje se pomoću  $IC_{50}$  vrijednosti, koja je određena interpolacijom iz odnosa srednje vrijednosti izmjerenih apsorbancija te pripadajućih koncentracija uzorka.

#### **3.4.5. Statistička obrada podataka**

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 ± 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.

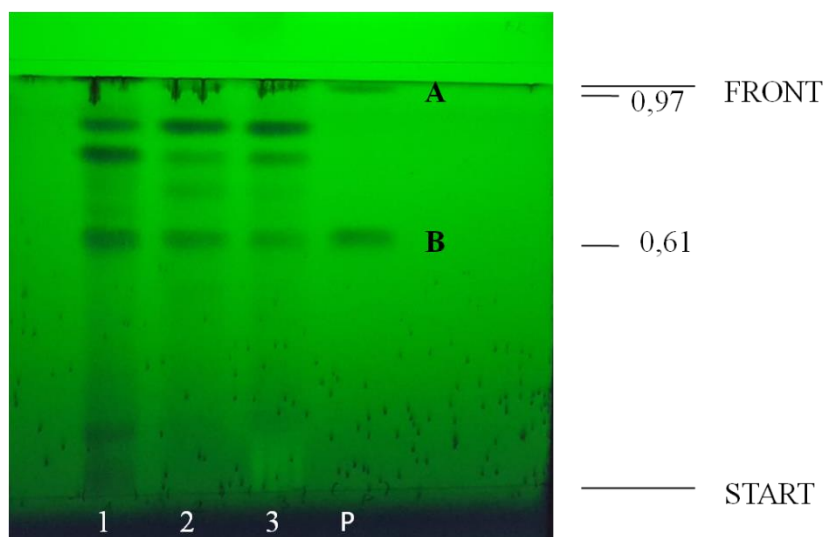
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. ANALIZA TANKOSLOJNOM KROMATOGRAFIJOM

Kvalitativna analiza fenolnih kiselina i flavonoidnih glikozida u zeleni odabranih vrsta roda *Artemisia* provedena je tankoslojnom kromatografijom. Ispitivanja su provedena korištenjem tankog sloja silikagela kao nepokretne faze, odgovarajućih smjesa otapala kao pokretne faze te odgovarajućih reagensa za detekciju. Promatranjem ploče pod UV svjetlom na 365 nm nakon prskanja Naturstoff-reagensom mogu se uočiti plave i zelene fluorescentne vrpce fenolnih kiselina, kumarina i flavonoida te narančaste vrpce flavonoida i njihovih glikozida (Wagner i Bladt, 1996). Fenolne sastavnice su karakterizirane položajem vrpce tj. Rf vrijednošću te bojom i intenzitetom vrpce u odnosu na vrpce poredbenih otopina.

#### 4.1.1. Fenolne kiseline

Metanolni ekstrakti odabranih vrsta nanoseni su na ploču s tankim slojem silikagela 60 F<sub>254</sub> te odijeljeni korištenjem smjese otapala diizopropil-etera, acetona, mravlje kiseline te vode u volumnim omjerima 5:3:1:1. Detektiranje odijeljenih sastavnica omogućeno je prskanjem Naturstoff-reagensa po ploči, koja je nakon toga promatrana pod UV svjetlom na 365 nm. Kod sva tri ispitivana uzorka vidljiva je vrpca koja po položaju tj. Rf vrijednosti te boji odgovara vrpce poredbene otopine klorogenske kiseline (Slika 8. i 9.). Prisutnost klorogenske kiseline u *A. vulgaris* dokazali su Güneş i suradnici (2019). Na dobivenom kromatogramu fenolnih kiselina odabranih vrsta nije moguće sa sigurnošću odrediti prisutnost ružmarinske kiseline u ispitivanim otopinama.



**Slika 8.** Zone gašenja fluorescencije na kromatogramu fenolnih kiselina u zeleni odabranih vrsta roda *Artemisia*.

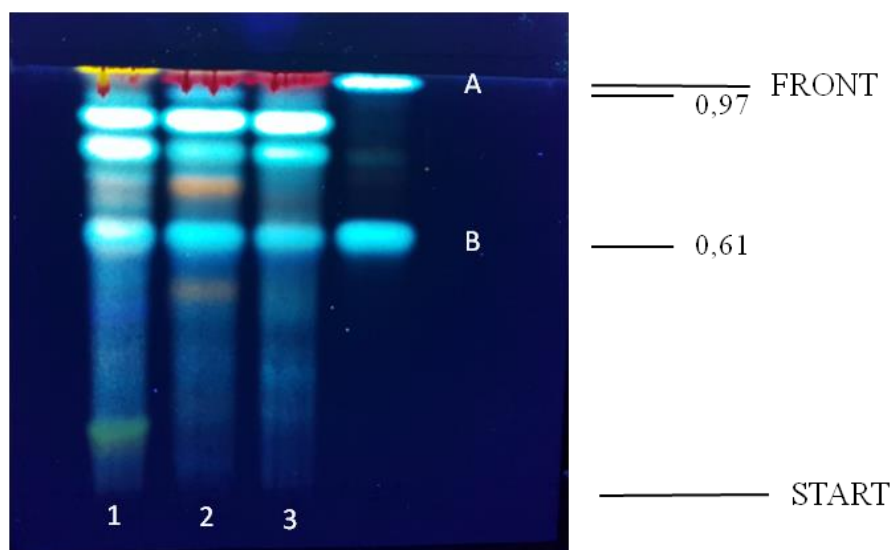
*POKRETNA FAZA:* diizopropil-eter : aceton : mravlja kiselina : voda = 5:3:1:1 (V/V/V/V)

*NEPOKRETNA FAZA:* Silikagel 60 F<sub>254</sub> TLC ploča

*DETEKCIJA:* UV lampa na 245 nm

*METANOLNI BILJNI EKSTRAKTI:* **1** *A.caerulescens*; **2** *A.verlotiorum*; **3** *A.vulgaris*

*POREDBENE OTOPINE:* **A** ružmarinska kiselina (Rf 0,97); **B** klorogenska kiselina (Rf 0,61).



**Slika 9.** Kromatogram fenolnih kiselina u zeleni odabranih vrsta roda *Artemisia*.

*POKRETNA FAZA:* diizopropil-eter : aceton : mravlja kiselina : voda = 5:3:1:1 (V/V/V/V)

*NEPOKRETNA FAZA:* Silikagel 60 F<sub>254</sub> TLC ploča

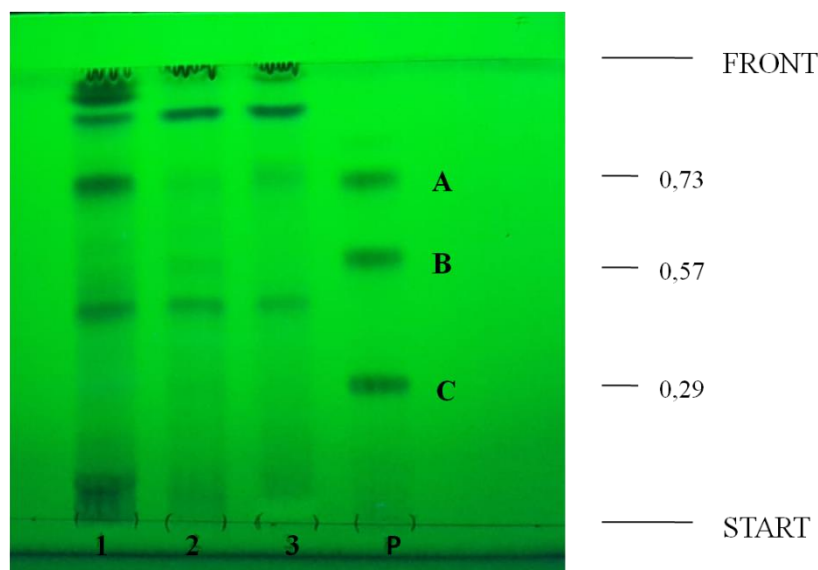
*DETEKCIJA:* UV lampa na 365 nm, NST/PEG

*METANOLNI BILJNI EKSTRAKTI:* **1** *A.caerulescens*; **2** *A.verlotiorum*; **3** *A.vulgaris*

*POREDBENE OTOPINE:* **A** ružmarinska kiselina (Rf 0,97); **B** klorogenska kiselina (Rf 0,61).

#### 4.1.2. Flavonoidni glikozidi

Na ploču s tankim slojem silikagela 60 F<sub>254</sub> su nanoseni metanolni ekstrakti odabranih vrsta roda *Artemisia* te odijeljeni korištenjem smjese otapala etil-acetata, mravlje kiseline te vode u volumnim omjerima 8:1:1. Za detektiranje odijeljenih sastavnica korišten je Naturstoff-reagens koji je prskan po ploči, koja je nakon toga promatrana pod UV svjetlom na 365 nm. Kod sva tri ispitivana uzorka (Slika 10. i 11.) vidljiva je narančasta vrpca koja po položaju tj. R<sub>f</sub> vrijednosti i boji odgovara vrpci poredbene otopine izokvercitrina. Kod uzorka 2, odnosno *A.verlotiorum*, vidljiva je još jedna narančasta vrpca koja po položaju i boji odgovara vrpci poredbene otopine rutina. Prema dobivenom kromatogramu flavonoidnih glikozida nije moguće dokazati prisutnost kvercitrina u ispitivanim uzorcima. Istraživanje Nikolove i suradnika iz 2014. također potvrđuje da kvercitrin nije prisutan u vrsti *A.vulgaris*. Pronađeno je da ova biljna vrsta sadrži dosta rutina i izokvercitrina. Karabegović i suradnici su u studiji iz 2011. godine također dokazali prisutnost rutina u vrsti *A.vulgaris*, no u našem uzorku na odgovarajućim R<sub>f</sub> vrijednostima vidljive su izrazito slabe zone fluorescencije. Kod *A.caerulescens* uočavamo zonu žute i zonu zelene fluorescencije koje vjerojatno odgovaraju flavonoidima s drugačijom aglikonskom strukturom.



**Slika 10.** Zone gašenja fluorescencije na kromatogramu flavonoidnih glikozida u zeleni odabranih vrsta roda *Artemisia*.

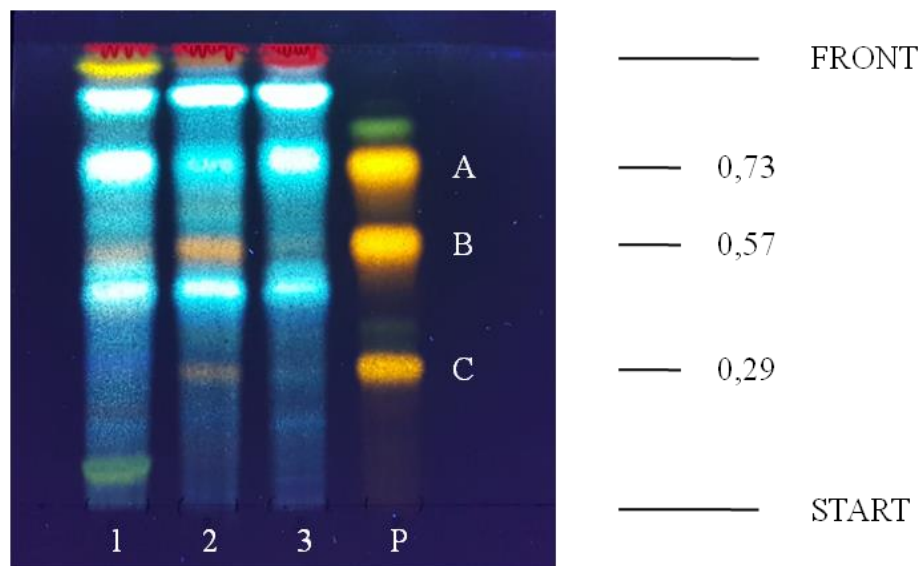
*POKRETNA FAZA:* etil-acetat : mravlja kiselina : voda = 8:1:1 (V/V/V/V)

*NEPOKRETNA FAZA:* Silikagel 60 F<sub>254</sub> TLC ploča

*DETEKCIJA:* UV lampa na 245 nm

*METANOLNI BILJNI EKSTRAKTI:* **1** *A.caerulescens*; **2** *A.verlotiorum*; **3** *A.vulgaris*

*POREDBENE OTOPINE:* **A** kvercitrin (Rf 0,73), **B** izokvercitrin (Rf 0,57), **C** rutin (Rf 0,29).



**Slika 11.** Kromatogram flavonoidnih glikozida u zeleni odabranih vrsta roda *Artemisia*.

*POKRETNA FAZA:* etil-acetat : mravlja kiselina : voda = 8:1:1 (V/V/V/V)

*NEPOKRETNA FAZA:* Silikagel 60 F<sub>254</sub> TLC ploča

*DETEKCIJA:* UV lampa na 365 nm, NST/PEG

*METANOLNI BILJNI EKSTRAKTI:* **1** *A.caerulescens*; **2** *A.verlotiorum*; **3** *A.vulgaris*

*POREDBENE OTOPINE:* **A** kvercitrin (Rf 0,73), **B** izokvercitrin (Rf 0,57), **C** rutin (Rf 0,29).

## 4.2.ODREĐIVANJE SADRŽAJA FENOLNIH KISELINA, FLAVONOIDA I TRJESLOVINA

### 4.2.1. Fenolne kiseline

Sadržaj fenolnih kiselina, odnosno hidroksicimetnih derivata, određen je spektrofotometrijski te se može izraziti kao klorogenska ili ružmarinska kiselina. Dobiveni rezultati sadržaja fenolnih kiselina u zeleni odabranih vrsta prikazani su u Tablici 2.

**Tablica 2.**Sadržaj fenolnih kiselina u zeleni odabranih vrsta roda *Artemisia*.

Vrsta	% fenolnih kiselina izraženih kao klorogenska kiselina	% fenolnih kiselina izraženih kao ružmarinska kiselina
<i>Artemisia caerulescens</i>	6,80	2,76
<i>Artemisia verlotiorum</i>	7,05	3,26
<i>Artemisia vulgaris</i>	6,62	2,80

Udio fenolnih kiselina izraženih kao klorogenska, odnosno ružmarinska kiselina, u zeleni odabranih vrsta je u rasponu od 6,62 do 7,05%, odnosno 2,76 do 3,26%. Rezultati pokazuju da najveći sadržaj fenolnih kiselina, izraženih kao klorogenska i ružmarinska kiselina, ima vrsta *A.verlotiorum*. Najmanje fenolnih kiselina, izraženih kao klorogenska kiselina, ima vrsta *A.vulgaris*, dok najmanji udio fenolnih kiselina, izraženih kao ružmarinska kiselina, ima vrsta *A.caerulescens*.



#### 4.2.2. Flavonoidi

Određivanje flavonoida u zeleni odabranih vrsta provedeno spektrofotometrijskom metodom. Sadržaj flavonoida, izražen kao izokvercetrozid, izračunat je pomoću specifične apsorbancije izokvercetrozida na 425 nm koja iznosi 500. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 3.

**Tablica 3.** Sadržaj flavonoida u zeleni odabranih vrsta roda *Artemisia*.

Vrsta	% flavonoida
<i>Artemisia caerulescens</i>	0,59
<i>Artemisia verlotiorum</i>	0,65
<i>Artemisia vulgaris</i>	0,78

Sadržaj flavonoida u zeleni odabranih vrsta roda *Artemisia* je u rasponu od 0,59 do 0,78%. Najveći udio flavonoida prisutan je u zeleni vrste *A. vulgaris*, dok najmanje flavonoida ima vrsta *A.caerulescens*. Studija Naqinezhada i suradnika iz 2012. godine proučavala je, između ostalog, sadržaj flavonoida u vrsti *Artemisia tschernieviana*. U toj je studiji sadržaj flavonoida izraženih kao kvercetin iznosio  $14,58 \pm 1,31\%$  za vodeni ekstrakt,  $7,628 \pm 0,54\%$  za etilacetatni ekstrakt te  $3,323 \pm 0,19\%$  za heksanski ekstrakt. Studija Karabegović i suradnika iz 2011. istraživala je sadržaj flavonoida ekstrakta *A.vulgaris* dobivenog trima različitim tipovima ekstrakcije. Postotak flavonoida izraženih kao ekvivalenti rutina dobivenih klasičnom ekstrakcijom u metanolu bio je  $11,09 \pm 0,22\%$ , ultrazvučnom ekstrakcijom  $10,37 \pm 0,04\%$ , a Soxhlet ekstrakcijom  $10,08 \pm 0,12\%$ . U studiji iz 2008. godine (Temraz i El-Tantawy) nađeno je da udio flavonoida izraženih kao rutin u metanolnom ekstraktu *A.vulgaris* iznosi  $0,796 \pm 0,076\%$ . Udio flavonoida istražen ovim diplomskim radom najbolje korelira sa rezultatima studije iz 2008. godine.

### 4.2.3. Trjeslovine

Sadržaj trjeslovina, izraženih kao pirogalol, određen je spektrofotometrijski. Dobiveni rezultati sadržaja trjeslovina u zeleni odabranih vrsta prikazani su u Tablici 4.

**Tablica 4.** Sadržaj trjeslovina u zeleni odabranih vrsta roda *Artemisia*.

Vrsta	% trjeslovina
<i>Artemisia caerulescens</i>	1,17
<i>Artemisia verlotiorum</i>	1,27
<i>Artemisia vulgaris</i>	1,36

Sadržaj trjeslovina u zeleni odabranih vrsta roda *Artemisia* je u rasponu od 1,17 do 1,36%. Rezultati sugeriraju da je *A.vulgaris* vrsta s najvećim sadržajem trjeslovina od triju ispitivanih vrsta. Vrsta sa najmanjim udjelom trjeslovina je *A.caerulescens*.

### 4.3. ISPITIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG UČINKA

U svrhu određivanja antioksidacijskog djelovanja etanolnih ekstrakata odabranih biljnih vrsta roda *Artemisia* provedena su slijedeća istraživanja: određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala, određivanje sposobnosti keliranja iona željeza(II) te određivanje sposobnosti redukcije.

#### 4.3.1. Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH radikala

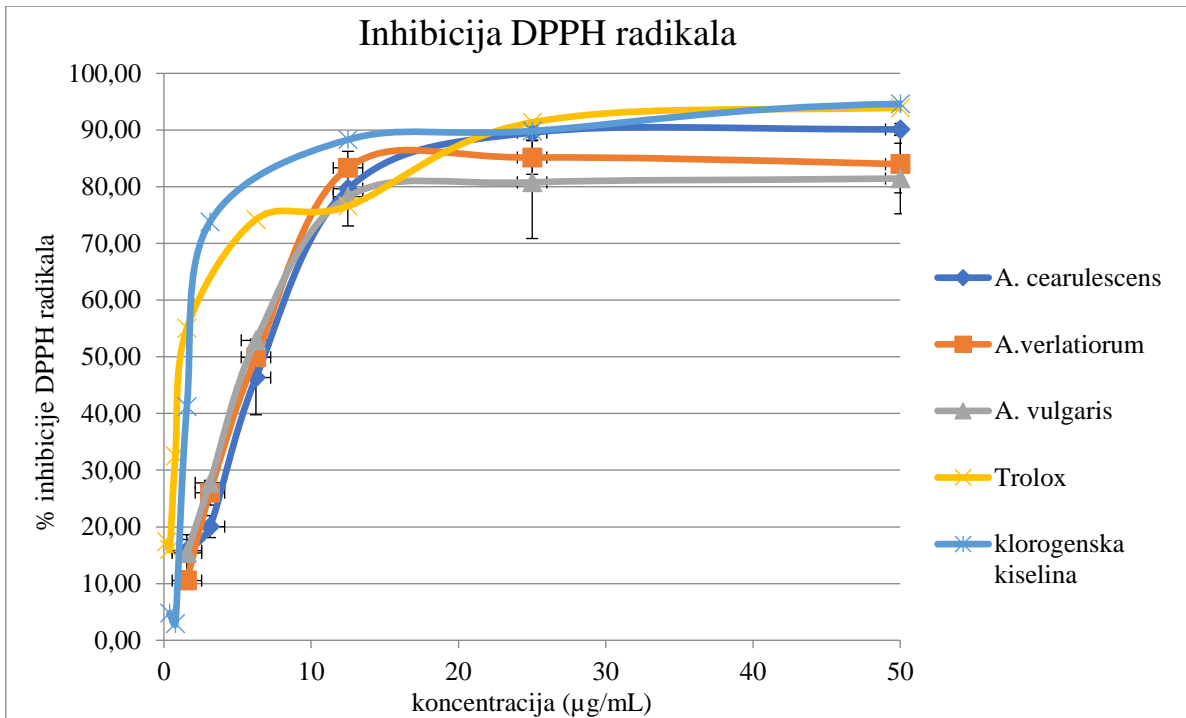
Za određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnih radikala pripravljene su otopine koncentracija 100 - 1,56 µg/mL. Izračunata je inhibicija slobodnih DPPH radikala za pojedine koncentracije uzoraka izražena je u postocima (%). Dobiveni rezultati mjerenja su prikazani u Tablici 5.

**Tablica 5.** Sposobnost hvatanja DPPH radikala u zeleni odabranih vrsta roda *Artemisia*. „/“ - nije mjereno. Rezultati su izraženi u postocima (%), kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Koncentracija (µg/mL)	Sposobnost hvatanja DPPH radikala (%)				
	<i>A.caerulescens</i>	<i>A.verlotiorum</i>	<i>A.vulgaris</i>	Trolox	Klorogenska kiselina
100	89,55 ± 2,50	80,16 ± 8,12	82,95 ± 0,46	94,57 ± 0,99	93,33 ± 1,43
50	90,11 ± 1,06	83,99 ± 5,08	81,45 ± 6,22	93,90 ± 1,88	94,62 ± 0,14
25	89,55 ± 1,31	85,15 ± 2,96	80,78 ± 9,91	91,36 ± 2,59	89,84 ± 4,76
12,5	79,66 ± 6,58	83,31 ± 1,30	78,24 ± 0,76	76,59 ± 0,62	88,30 ± 0,00
6,25	46,33 ± 6,55	49,92 ± 1,06	52,92 ± 0,19	74,21 ± 2,07	91,48 ± 1,91
3,13	20,06 ± 1,94	26,04 ± 2,18	27,76 ± 0,15	75,76 ± 4,90	73,80 ± 1,37
1,56	15,82 ± 1,97	10,52 ± 1,26	15,40 ± 3,23	55,06 ± 4,77	41,20 ± 10,24
0,78	/	/	/	32,51 ± 7,75	2,92 ± 20,42
0,39	/	/	/	16,03 ± 0,70	4,77 ± 19,41
0,19	/	/	/	17,37 ± 6,97	-21,41 ± 30,02

Sposobnost hvatanja DPPH radikala ne razlikuje se značajno između ispitivanih vrsta. Primjerice, pri koncentraciji uzoraka 12,5 µg/mL postotak inhibicije DPPH radikala iznosio je  $79,66 \pm 6,58\%$  za *A.caerulescens*,  $83,31 \pm 1,30\%$  za *A.verlotiorum* te  $78,24 \pm 0,76\%$  za *A.vulgaris*. Ipak, najveću sposobnost hvatanja DPPH radikala ima vrsta *A.vulgaris* ( $IC_{50}$  6,72 µg/mL), nešto slabiju ima *A.verlotiorum* ( $IC_{50}$  6,78 µg/mL), dok najmanju sposobnost između ispitivanih vrsta ima *A.caerulescens* ( $IC_{50}$  7,50 µg/mL). Antiradikalna aktivnost uglavnom opada smanjenjem koncentracije ispitivanih uzoraka. Vrijednosti inhibicije DPPH radikala korištenih standarda, troloxa ( $IC_{50}$  1,57 µg/mL) i klorogenske kiseline ( $IC_{50}$  1,76 µg/mL), su nešto veće od rezultata ispitivanih otopina pri istim koncentracijama. Primjerice, pri koncentraciji 6,25 µg/mL postotak inhibicije DPPH radikala ispitivanih uzoraka (*A.caerulescens*, *A.verlotiorum*, *A.vulgaris*) redom iznosi  $46,33 \pm 6,55\%$ ;  $49,92 \pm 1,06\%$  te  $52,92 \pm 0,19\%$ , dok postotci inhibicije standardnih otopina (trolox i klorogenska kiselina) iznose  $74,21 \pm 2,07\%$  te  $91,48 \pm 1,91\%$ . Sva tri ispitivana uzorka su pri koncentracijama višim od 25 µg/mL ušli u tzv. plato fazu, odnosno njihova sposobnost inhibicije nije se daljnjim rastom koncentracije značajno mijenjala ili je ostala nepromijenjena. Grafički prikaz ovisnosti postotka inhibicije DPPH radikala ispitivanih uzoraka i referentnih spojeva o koncentraciji prikazan je na Slici 12.

Temraz i El-Tantawy su 2008. godine ispitali sposobnost inhibicije DPPH slobodnog radikala *A.vulgaris*.  $IC_{50}$  vrijednost vodenog ekstrakta ove vrste je iznosila 11,4 µg/mL. U studiji Karabegović i suradnika iz 2011. godine  $IC_{50}$  vrijednosti inhibicije DPPH radikala u ekstraktu dobivenom klasičnom, ultrazvučnom i Soxhlet ekstrakcijom su iznosile redom  $22,2 \pm 0,3$ ;  $26,5 \pm 0,1$  te  $28,1 \pm 0,1$  µg/mL. Nikolova i suradnici su, pak, 2014. godine odredili  $IC_{50}$  vrijednost etil-acetatnog te metanolnog ekstrakta *A.vulgaris*. Vrijednosti su iznosile 11,96 te 114 µg/mL, što pokazuje da etil-acetatni ekstrakt ima mnogo veću antiradikalnu učinkovitost od metanolnog ekstrakta.



**Slika 12.** Usporedni grafički prikaz sposobnosti inhibicije DPPH radikala za različite koncentracije etanolnih ekstrakata zeleni odabranih vrsta roda *Artemisia* i referentnih otopina.

Moguće je zaključiti da ispitivane vrste imaju određenu sposobnost hvatanja DPPH radikala, no ona je manja u odnosu na sposobnost hvatanja DPPH radikala korištenih standarda.

#### 4.3.2. Određivanje sposobnosti keliranja iona željeza(II)

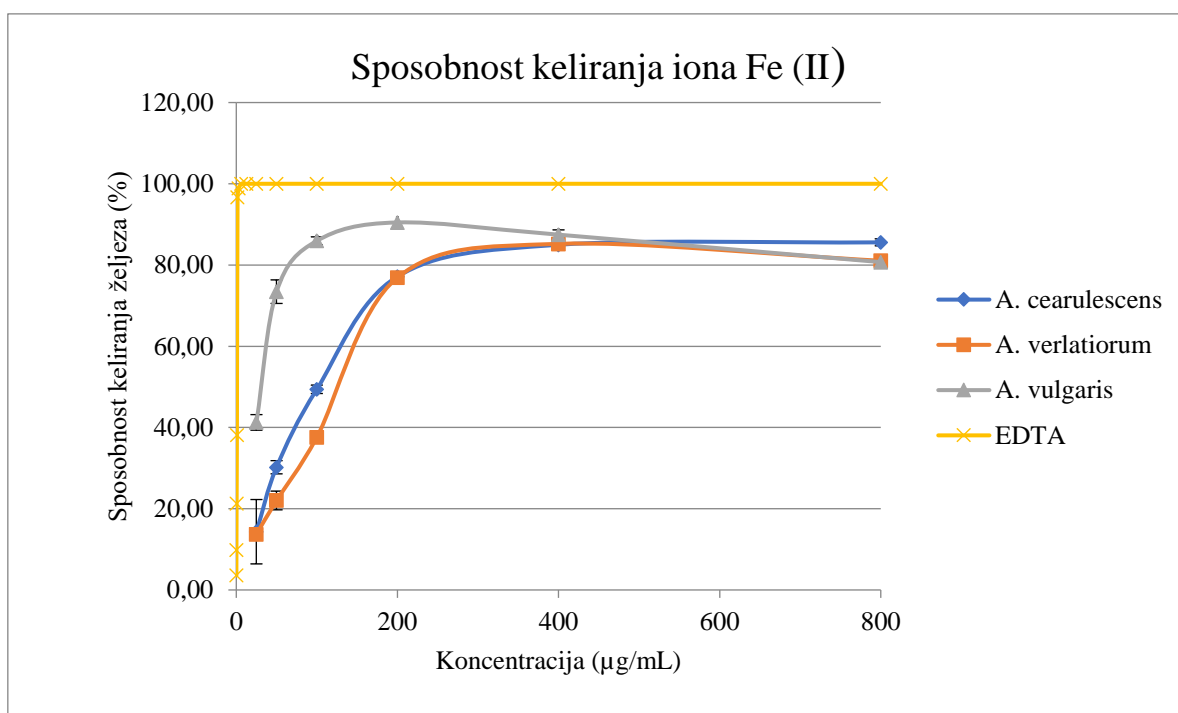
Za određivanje sposobnosti keliranja iona željeza(II) pripravljene su otopine uzoraka koncentracije 800-25 µg/mL. Izračunat je učinak keliranja željeznih iona te su rezultati navedeni u Tablici 6.

**Tablica 6.** Sposobnost keliranja iona Fe(II) zeleni odabranih vrsta roda *Artemisia* i referentnog spoja, EDTA. „/“ -nije mjereno. Rezultati su izraženi u postocima (%), kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Koncentracija(µg/mL)	Sposobnost keliranja iona Fe(II) (%)			
	<i>A.caerulescens</i>	<i>A.verlotiorum</i>	<i>A.vulgaris</i>	EDTA
800	85,57 ± 0,86	81,06 ± 0,45	80,71 ± 0,60	100 ± 0,00
400	84,99 ± 0,89	85,21 ± 0,12	87,47 ± 1,18	100 ± 0,00
200	77,15 ± 0,53	76,90 ± 0,41	90,48 ± 0,10	100 ± 0,00
100	49,41 ± 1,04	37,61 ± 0,90	85,95 ± 0,98	100 ± 0,00
50	30,21 ± 1,63	22,03 ± 2,31	73,43 ± 2,90	100 ± 0,00
25	14,34 ± 7,93	13,74 ± 0,81	41,26 ± 1,91	100 ± 0,00
12,50	/	/	/	100 ± 0,00
6,25	/	/	/	100 ± 0,00
3,13	/	/	/	98,90 ± 0,33
1,56	/	/	/	96,65 ± 1,17
0,78	/	/	/	38,09 ± 1,47
0,39	/	/	/	21,25 ± 0,99
0,20	/	/	/	9,80 ± 0,25
0,10	/	/	/	3,58 ± 0,06

Sposobnost keliranja iona željeza ne razlikuje se značajno između ispitivanih vrsta. Primjerice, pri koncentraciji 400 µg/mL sposobnost keliranja iona Fe(II) kod ispitivanih vrsta (*A.caerulescens*, *A.verlotiorum*, *A.vulgaris*) redom iznosi 84,99 ± 0,89%; 85,21 ± 0,12% te 87,47 ± 1,18%. Daleko najveću sposobnost keliranja metalnih iona pokazala je vrsta *A.vulgaris* s IC<sub>50</sub> vrijednošću 31,79 µg/mL. Vrste *A.caerulescens* i *A.verlotiorum* pokazale su 3 do 4 puta manju sposobnost keliranja metalnih iona s IC<sub>50</sub> vrijednostima 109,33 µg/mL, odnosno 128,79 µg/mL. EDTA (IC<sub>50</sub> 0,94 µg/mL) je pak, korištena kao referentni kelator, pokazala značajno veću sposobnost keliranja Fe(II) u odnosu na ispitivane uzorke sa čak 34 do 137 puta većom IC<sub>50</sub> vrijednošću. Pri koncentracijama od 800 do 6,25 µg/mL EDTA je pokazala 100%-tnu sposobnost keliranja iona Fe(II). Klorogenska kiselina, također korištena

kao referentna tvar, nije kelirala metalne ione. Sva tri uzorka su u koncentracijama većim od 400  $\mu\text{g/mL}$  ušla u tzv. plato fazu. Grafički prikaz ovisnosti sposobnosti keliranja metalnih iona ispitivanih uzoraka i referentnih spojeva o koncentraciji prikazan je na Slici 13. Naqinezhad i suradnici su 2012. godine ispitali sposobnost reduciranja dvovalentnog željeza vrste *Artemisia tschernieviana* Besser. U njihovoj je studiji  $\text{IC}_{50}$  vrijednost iznosila  $162 \pm 8,7$   $\mu\text{g/mL}$  za heksanski ekstrakt te  $1214,9 \pm 7,5$   $\mu\text{g/mL}$  za vodeni ekstrakt, dok je etil-acetatni ekstrakt ove vrste pokazao vrlo slabu antiradikalnu sposobnost sa samo 20%-tnom sposobnošću keliranja metalnih iona pri koncentraciji 800  $\mu\text{g/mL}$ .



**Slika 13.** Usporedni grafički prikaz sposobnosti keliranja metalnih iona za različite koncentracije etanolnih ekstrakata zeleni odabranih vrsta roda *Artemisia* i referentnih otopina. Iz iznesenih rezultata proizlazi zaključak da vrste *A. caerulea*, *A. verlotiorum* te *A. vulgaris* imaju sposobnost keliranja metalnih iona, ali je ona manja od sposobnosti keliranja korištenog referentnog spoja, EDTA.

### 4.3.3. Određivanje sposobnosti redukcije

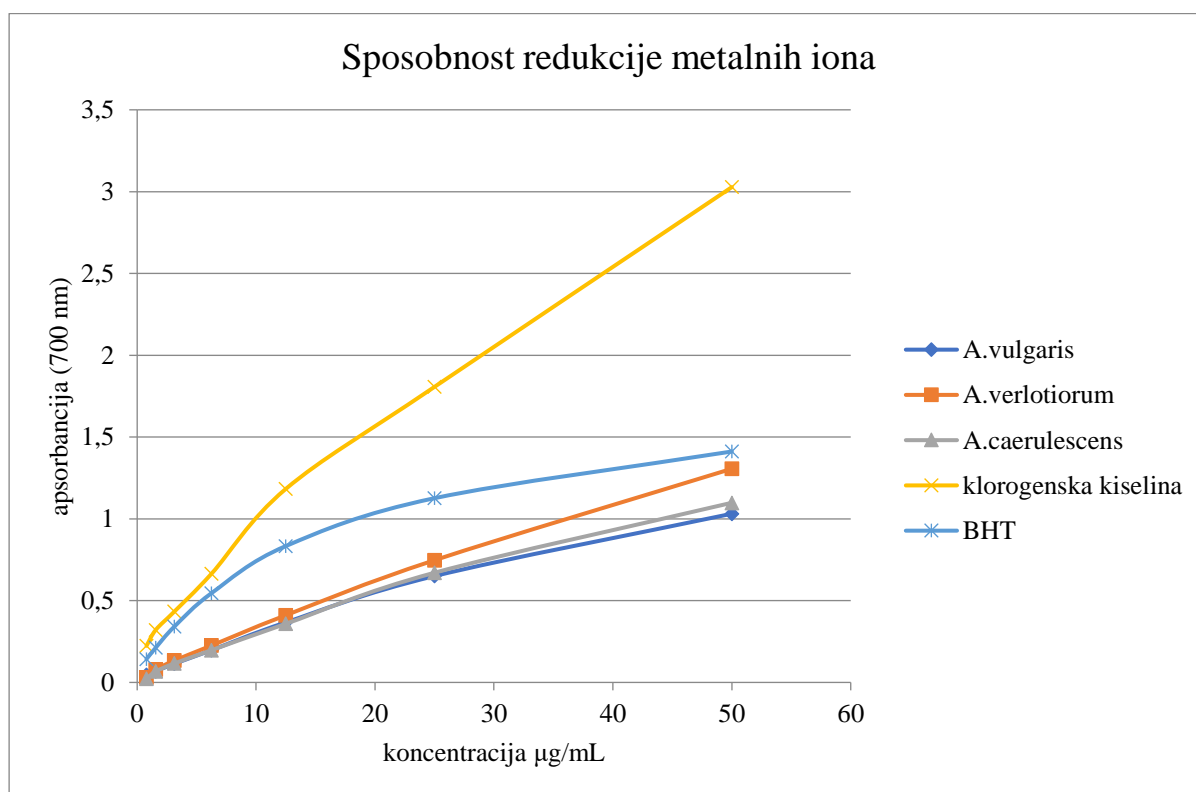
Za potrebe određivanja sposobnosti redukcije pripravljene su otopine uzoraka koncentracija 100-0,78 µg/mL. Redukcijska moć uzorka procijenjena je pomoću IC<sub>50</sub> vrijednosti dobivene interpolacijom iz odnosa srednje vrijednosti izmjerenih apsorbancija te pripadajućih koncentracija uzorka. Dobiveni rezultati izmjerene apsorbancije dani su u Tablici 7.

**Tablica 7.** Redukcijska sposobnost etanolnih ekstrakata zeleni odabranih vrsta roda *Artemisia* i referentnih spojeva, klorogenske kiseline i BHT. „/“ -nije mjereno. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost apsorbancije ± standardna devijacija.

Koncentracija (µg/mL)	Apsorbancija				
	<i>A.caerulescens</i>	<i>A.verlotiorum</i>	<i>A.vulgaris</i>	Klorogenska kiselina	BHT
100,00	2,13 ± 0,13	2,57 ± 0,13	2,26 ± 0,02	4,21 ± 0,04	1,80 ± 0,00
50,00	1,10 ± 0,01	1,31 ± 0,10	1,03 ± 0,05	3,03 ± 0,04	1,41 ± 0,15
25,00	0,67 ± 0,00	0,75 ± 0,02	0,65 ± 0,01	1,81 ± 0,05	1,13 ± 0,16
12,50	0,36 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,37 ± 0,00	1,18 ± 0,09	0,83 ± 0,09
6,25	0,20 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,20 ± 0,00	0,67 ± 0,05	0,55 ± 0,05
3,13	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,43 ± 0,02	0,34 ± 0,02
1,56	0,07 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,32 ± 0,03	0,21 ± 0,02
0,78	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,22 ± 0,03	0,14 ± 0,01
0,39	/	/	/	0,18 ± 0,01	0,09 ± 0,01
0,2	/	/	/	0,16 ± 0,00	/



Ispitivane vrste pokazuju međusobno sličnu sposobnost redukcije koja je kod sve tri vrste rasla porastom koncentracije. Najveću sposobnost redukcije pokazala je vrsta *A.verlotiorum* ( $IC_{50}$  17,32  $\mu\text{g/mL}$ ), dok najmanju sposobnost redukcije željeza ima vrsta *A.vulgaris* ( $IC_{50}$  21,36  $\mu\text{g/mL}$ ). Studijom Temraza i El-Tantawyja (2008) ispitivana vrsta *A.vulgaris* pokazala je, kako oni navode, značajnu sposobnost redukcije, koja je ipak bila manja od sposobnosti redukcije korištenog standarda, rutina.  $IC_{50}$  vrijednost za vrstu *A.caerulescens* iznosi 20,52  $\mu\text{g/mL}$ . Klorogenska kiselina ( $IC_{50}$  3,96  $\mu\text{g/mL}$ ) te BHT ( $IC_{50}$  10,61  $\mu\text{g/mL}$ ) pokazali su znatno veću sposobnost redukcije od ispitivanih uzoraka. Grafički prikaz ovisnosti sposobnosti redukcije o koncentraciji ispitivanih uzoraka te referentnih spojeva prikazan je Slikom 14.



**Slika 14.** Usporedni grafički prikaz sposobnosti redukcije metalnih iona za različite koncentracije etanolnih ekstrakata zeleni odabranih vrsta roda *Artemisia* i referentnih otopina.

Iz iznesenih rezultata vidljivo je da ispitivane vrste *A.caerulescens*, *A.verlotiorum* te *A.vulgaris* posjeduju sposobnost redukcije metalnih iona, no ona je nešto manja u odnosu na sposobnost redukcije korištenih referentnih otopina, klorogenske kiseline i BHT-a.

## 5. ZAKLJUČCI

Ovim diplomskim radom provedeno je određivanje fitokemijskog sastava te antioksidacijskog učinka zeleni vrsta *A.caerulescens*, *A.verlotiorum* te *A.vulgaris*. Tankoslojnom kromatografijom potvrđena je prisutnost klorogenske kiseline te izokvercitrina u svim ispitivanim vrstama. U vrsti *A.verlotiorum* tankoslojnom je kromatografijom dodatno utvrđena prisutnost rutina. Odabrane vrste roda *Artemisia* bogate su fenolnim sastavnica. Udio flavonoida, izraženih kao izokvercitrin, je u odabranim vrstama u rasponu 0,59-0,78%, dok je udio fenolnih kiselina 6,62-7,05% izraženih kao klorogenska, odnosno 2,76-3,26% izraženih kao ružmarinska kiselina. Trjeslovine su u ispitivanim vrstama prisutne u udjelu 1,17-1,36%. Vrsta najbogatija flavonoidima i trjeslovinama je *A.vulgaris*, dok najveći udio fenolnih kiselina sadrži *A.verlotiorum*. Antioksidacijski učinak ispitan je korištenjem triju metoda. Dvjema od tri korištenih metoda potvrđeno je da najjači antioksidacijski učinak od ispitivanih vrsta ima *A.vulgaris*. U određivanju sposobnosti hvatanja DPPH radikala dobivena  $IC_{50}$  vrijednost te vrste je 6,72  $\mu\text{g/mL}$ , a određivanjem sposobnosti keliranja iona željeza(II) dobivena je  $IC_{50}$  vrijednost 31,79  $\mu\text{g/mL}$ . Najveću sposobnost redukcije pokazala je vrsta *A.verlotiorum* s  $IC_{50}$  vrijednošću 17,32  $\mu\text{g/mL}$ . Prema rezultatima ovog diplomskog rada moguće je zaključiti da zeleni ispitivanih vrsta, *A.caerulescens*, *A.verlotiorum* te *A.vulgaris*, sadrže značajni udio fenolnih sastavnica te pokazuju antioksidacijske učinke. Iz toga proizlazi da upotreba zeleni odabranih vrsta roda *Artemisia* kao prirodnih izvora antioksidansa može pomoći u prevenciji bolesti i poremećaja koje se povezuju s oksidacijskim stresom. Također je, iz iznesenih rezultata, vidljivo da je *A.vulgaris*, od triju ispitivanih vrsta, vrsta s najvećim udjelom određenih fenolnih sastavnica i najjačim antioksidacijskim učinkom, čime se može zaključiti da udio fenolnih spojeva u biljnoj drogi korelira sa antioksidacijskim učinkom. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem mogu poslužiti kao polazna osnova za daljnja istraživanja fitokemijskog sadržaja i potencijalnog antioksidacijskog djelovanja zeleni vrsta *A.caerulescens*, *A.verlotiorum* te *A.vulgaris*.

## 6. LITERATURA

Abiri R, Macedo Silva AL, Silva de Mesquita LS, Carvalho de Mesquita JW, Atabaki N, Bezerra de Almeida E, Shaharuddin NA, Malik S. Towards a better understanding of *Artemisia vulgaris*: Botany, phytochemistry, pharmacological and biotechnological potential. *Food Res In*, 2018, 109, 403-415.

Ašić S. Ljekovito bilje. Rijeka, Dušević & Kršovnik d.o.o., 1999, str. 96-97.

Barbosa FS, Leite GLD, Martins ER, D'ávila VA, Cerqueira VM. Medicinal plant extracts on the control of *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Rev Bras de Plantas Medicinai*s, 2013, 142-149.

Bedini S, Flamini G, Ascrizzi R, Venturi F, Ferroni G, Bader A, Girardi J, Conti B. Essential oils sensory quality and their bioactivity against the mosquito *Aedes albopictus*. *Sci Rep*, 2018, 8, 1-10.

Bittencourt De Souza LF, Laughinghouse IV HD, Pastori T, Tedesco M, Wouters Kuhn A, Do Canto-Dorow TS, Bosio Tedesco S. Genotoxic potential of aqueous extracts of *Artemisia verlotorum* on the cell cycle of *Allium cepa*. *Int J Environ Stud*, 2010, 67, 871-877.

Calderone V, Martinotti E, Baragatti B, Cristina Breschi M, Morelli I. Vascular effects of aqueous crude extracts of *Artemisia verlotorum* Lamotte (Compositae): in vivo and in vitro pharmacological studies in rats. *Phytother Res*, 1999, 13, 645-648.

Chiari ME, Joray MB, Ruiz G, Palacios SM, Carpinella MC. Tyrosinase inhibitory activity of native plants from central Argentina: Isolation of an active principle from *Lithrea molleoides*. *Food Chem*, 2010, 120, 10-14.

Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. Natural Products (Secondary Metabolites). U: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Buchanan B, Grissem W, Jones R, urednici, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 2000, str. 1250-1251.

Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. U: *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Crozier A, Clifford MN, Ashihara H, urednici, Blackwell Publishing Ltd, 2006, 1-25.

Domac R. Mala flora Hrvatske i susjednih područja. Zagreb, Školska knjiga, 1973, str. 397.

EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care). European Pharmacopoeia, 9. izd., Strasbourg: Council of Europe, 2019, str. 288., 1376-1378., 1384-1385.

Feng W, Hao Z, Li M. Isolation and Structure Identification of Flavonoids. U: Flavonoids From biosynthesis to human health. Justino J, urednik, Rijeka, Intech, 2017, str.17-18.

Fushiya S, Batkhuu J, Takano F, Hayasaka H, Ohba K, Yoshizaki F, Dashi T, Batsuren D, Sanchir C. Effects of Mongolian plants on nitric oxide production in activated macrophages. *J Nat Med*, 2000, 6, 352-357.

Glavaš M. Enciklopedija domaćeg ljekovitog bilja. Zagreb, Naklada Ceres, 2019, str 1001.

Gómez-Caravaca AM, Verardo V, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Caboni MF. Phenolic Compounds and Saponins in Plants Grown Under Different Irrigation Regimes. U: Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation. Watson RR, urednik, Elsevier, 2014, str. 37-48.

Goncalves S, Gomes D, Costa P, Romano A. The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Ind Crops Prod*, 2013, 43, 465-471.

Grlić LJ. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. Zagreb, August Cesarec, 1986, str. 304-305.

Güneş A, Kordalib Ş, Turanc M, Usanmaz BozhüyükA. Determination of antioxidant enzyme activity and phenolic contents of some species of the Asteraceae family from medicinal plants. *Ind Crops Prod*, 2019, 137, 208-213.

Gursky Z. Zlatna knjiga ljekovitog bilja. Zagreb, Nakladni zavod Matice Hrvatske, 1999, str. 407-409.

Hanh TTH, Hang LTT, Huong PTT, Trung NQ, Cuong TV, Thanh NV, Cuong NX, Nam NH, Minh CV. Two new guaiane sesquiterpene lactones from the aerial parts of *Artemisia vulgaris*. *J Asian Nat Prod Res*, 2017, 1-5.

JoséAbad M, Bedoya LM, Apaza L, Bermejo P. The *Artemisia* L. Genus: A Review of Bioactive Essential Oils. *Molecules*, 2012, 17, 2542-2566.

Jucá MM, Cysne Filho FMS, de Almeida JC, da Silva Mesquita D, Rodrigues de Moraes Barriga J, Ferreira Dias KC, Matias Barbosa T, Costa Vasconcelos L, Almeida Moreira Leal LK, Ribeiro JE, Mendes Vasconcelos SM. Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. *Nat. Prod. Res.*, 2020, 34, 692-705.

Karabegović I, Nikolova M, Veličković D, Stojičević S, Veljković V, Lazić M. Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Methanolic Extracts of the *Artemisia* sp. Recovered by Different Extraction Techniques. *Chin J Chem Eng*, 2011, 19, 504-511.

Khairul Alam M, Hasan Rana Z, Nazrul Islam S, Akhtaruzzaman M. Comparative assessment of nutritional composition, polyphenol profile, anti-diabetic and antioxidative properties of selected edible wild plant species of Bangladesh. *Food Che.*, 2020, 130.

Kineski pelin, <https://www.plantea.com.hr>, pristupljeno 15.04.2020.

Kreitschitza A, Valle's J. Achene morphology and slime structure in some taxa of *Artemisia* L. and *Neopallasia* L. (Asteraceae). *Flora*, 2007, 202, 570-580.

Kumar N, Goel N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol Rep*, 2019, 241, 1-10.

Kušan F. Ljekovito i drugo korisno bilje. Zagreb, Poljoprivredni nakladni zavod, 1956, str.530.

Macchioni F, Perrucci S, Flamini G, Cioni PL, Morelli I. Antimycotic Activity against *Saprolegnia ferax* of Extracts of *Artemisia verlotorum* and *Santolina etrusca*. *Phytother Res*, 1999, 13, 242-244.

Marčinković J. Božja biljna ljekarna. Zagreb, Školska knjiga, 2001, str.148-149.

Marx C, Kayser GB, Schunemann DP, Regner A, da Rocha AB, Grivicich I. Cytotoxic effect and oxidative damage of organic extract from *Artemisia verlotorum* in human cancer cell lines. *Lat Am J Pharm*, 2010, 29, 1061-1066.

Mumivand H, Babalar M, Tabrizi L, Craker LE, Shokrpour M, Hadian J. Antioxidant Properties and Principal Phenolic Phytochemicals of Iranian Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) Accessions. *Hortic. Environ. Biotechnol.*, 2017, 58, 414-422.

- Naqinezhad A, Nabavi SM, Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant and antihemolytic activities of flavonoid rich fractions of *Artemisia tschernieviana* Besser. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2012, 16, 88-94.
- Nigam M, Atanassova M, Mishra AP, Pezzani R, Devkota HP, Plygun S, Salehi B, Setzer WN, Sharifi-Rad J. Bioactive Compounds and Health Benefits of *Artemisia* Species. *Nat Prod Commun*, 2019, 14, 1-17.
- Nikolova M, Gussev C, Nguyen T. Evaluation of the Antioxidant Action and Flavonoid Composition of *Artemisia* Species Extracts. *Biotechnol Equip*, 2014, 24, 101-103.
- Ogawa R, Hyakusoku H, Ogawa K, Nakao C. Effectiveness of mugwort lotion for the treatment of post-burn hypertrophic scars. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2008, 61, 210-236.
- Ornano L, Venditti A, Ballero M, Sanna C, Yuri Y, Quassinti L, Bramucci M, Vitali LA, Petrelli D, Tirillini B, Papa F, Maggi F, Bianco A. Essential oil composition and biological activity from *Artemisia caerulescens* subsp. *densiflora* (Viv.) Gamisans ex Kerguelen & Lambinon (Asteraceae), an endemic species in the habitat of La Maddalena Archipelago. *Nat Prod Re.*, 2016, 30, 1802-1809.
- Pahlow M. Velika knjiga ljekovitog bilja. Ljubljana- Zagreb, Cankarjeva založba, 1989, str. 231-232.
- Parčetić-Kostelac I, Bešlo D, Šperanda M, Kopačin T, Jozinović A, Jović T, Đidara M. Oksidacijski stres u uvjetima intenzivnog fizičkog napora u ljudi i životinja. *Stočarstvo*, 2016, 70, 71-92.
- Pires JM, Mendes FR, Negri G, Duarte-Almeida JM, Carlini EA. Antinociceptive Peripheral Effect of *Achillea millefolium* L. and *Artemisia vulgaris* L.: Both Plants known popularly by Brand Names of Analgesic Drugs. *Phytother Res* 2009, 23, 212-219
- Rasheed T, Bilal M, Iqbal HMN, Li C. Green biosynthesis of silver nanoparticles using leaves extract of *Artemisia vulgaris* and their potential biomedical applications. *Colloids Surf B*, 2017, 158, 408-415.

Rodrigo R, Libuy M. Modulation of Plant Endogenous Antioxidant Systems by Polyphenols. U: Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation. Watson RR, urednik, Elsevier, 2014, str. 65-78.

Saleh AM, Aljada A, Rizvi SAA, Nasr A, Alaskar AS, Williams JD. In vitro cytotoxicity of Artemisia vulgaris L. essential oil is mediated by a mitochondria-dependent apoptosis in HL-60 leukemic cell line. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14, 1-15.

Sanhueza J, Valdes J, Campos R, Garrido A, Valenzuela A. Changes in the xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase ratio in the rat kidney subjected to ischemia–reperfusion stress: preventive effect of some flavonoids. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1992, 78, 211-218.

Singh Bora K, Sharma A. The Genus Artemisia: A Comprehensive Review. *Pharm Biol*, 2011, 49, 101-109.

Smital A, Marković LJ, Ruščić M. O širenju vrste Artemisia verlotiorum Lamotte u Hrvatskoj. *Acta Bot Croat*, 1997, 55/56, 53-63.

Suroowan S, Pynee KB, Mahomoodally MF. A comprehensive review of ethnopharmacologically important medicinal plant species from Mauritius. *S Afr J Bot*, 2019, 122, 189-213.

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

Taleghani A, Emami SA, Tayarani-Najaran Z. Artemisia: a promising plant for the treatment of cancer. *Bioorg Med Chem*, 2020, 28.

Temraz A, El-Tantawy W. Characterization of antioxidant activity of extract from Artemisia vulgaris. *Pak J Pharm Sci*, 2008, 21, 321-326.

Tohma HS, Gulçin I. Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Aerial Parts and Roots of Turkish Liquorice (*Glycyrrhiza Glabra* L.). *Int J Food Prop.*, 2010, 13, 657-671.

Vahdati-Mashhadian N, Emami S, Oghazian M, Vosough R. The cytotoxicity evaluation of seven species of Artemisia on human tumor cell lines. *Pharmacologyonline*. 2009, 1, 229-242.

Vallès J, Garcia S, Hidalgo O, Martín J, Pellicer J, Sanz, M, Garnatje T. Biology, Genome Evolution, Biotechnological Issues and Research Including Applied Perspectives in Artemisia (Asteraceae). *Adv Bot Res*, 2011, 60, 349-419.

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.

Vladimir-Knežević S. Farmakognozija I, Eterična ulja. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2016.

Vladimir-Knežević S. Farmakognozija I, Fenolni spojevi I i II. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2016.

Wagner H, Bladt S. Flavonoid Drugs Including Ginkgo Biloba and Echinaceae Species. U: Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas. Wagner H, Bladt S, urednici, Berlin, Springer, 1996, str. 195-244.

Wang T, Li Q, Bi K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian J Pharm*, 2018, 13, 12-23.

Wink M. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Medicines* 2015, 2, 251-286.

Wu CR, Lin WH , Hseu YC, Lien JC, Lin YT, Kuo TP, Ching H. Evaluation of the antioxidant activity of five endemic Ligustrum species leaves from Taiwan flora in vitro. *Food Chem*, 2011, 127, 564-571.

Zovkić I. Naše ljekovito bilje i fitoterapija, Đakovo, Karitativni fond UPT „Ne živi čovjek samo o kruhu“, 1999, str. 174-175.



## 7. SAŽETAK/SUMMARY

### SAŽETAK

Vrste roda *Artemisia* tradicionalno se najviše koriste za liječenje gastrointestinalnog te urogenitalnog trakta. Međutim, sve veće razumijevanje oksidacijskog stresa i njegovih posljedica na organizam potaknulo je istraživanja antioksidacijskog djelovanja brojnih biljnih vrsta, pa tako i odabranih vrsta roda *Artemisia*. U okviru ovog diplomskog rada ispitan je fitokemijski sastav te antioksidacijsko djelovanje zeleni vrsta *A.caerulescens*, *A.verlotiorum* te *A.vulgaris*. Tankoslojnom je kromatografijom u zeleni odabranih vrsta utvrđena prisutnost klorogenske kiseline, izokvercitrina te rutina. Fitokemijski sastav fenolnih kiselina, flavonoida i trjeslovina utvrđen je spektrofotometrijskim metodama. Udio flavonoida u zeleni odabranih vrsta iznosi 0,59-0,78%, dok je sadržaj trjeslovina u rasponu 1,17-1,36%. Sadržaj fenolnih kiselina izražen je kao ekvivalenti klorogenske te ružmarinske kiseline. Dobiven je sadržaj fenolnih kiselina u rasponu od 6,62 do 7,05%, odnosno od 2,76 do 3,26%.

Antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata zeleni odabranih vrsta određen je trima spektrofotometrijskim metodama. Određivanjem sposobnosti hvatanja DPPH radikala ( $IC_{50}$  6,72-7,50  $\mu\text{g/mL}$ ), određivanjem sposobnosti keliranja iona željeza(II) ( $IC_{50}$  31,79-128,79  $\mu\text{g/mL}$ ) te određivanjem sposobnosti redukcije ( $IC_{50}$  17,32-21,36  $\mu\text{g/mL}$ ) pokazano je značajno antioksidacijsko djelovanje odabranih vrsta roda *Artemisia*.

## SUMMARY

Species of the genus *Artemisia* are traditionally used to treat the gastrointestinal and genitourinary systems. However, the understanding of oxidative stress and its effects on the body has prompted research into the antioxidant effects of many plant species, including selected species of the genus *Artemisia*. Within this diploma thesis, the phytochemical composition and antioxidant activity of *A.caerulescens*, *A.verlotiorum* and *A.vulgaris* herb were examined. Thin layer chromatography of selected species revealed the presence of chlorogenic acid, isoquercitrin and rutin. The phytochemical composition of phenolic acids, flavonoids and tannins was determined by spectrophotometric methods. The amount of flavonoids in the selected species is 0.59-0.78%, while the tannin content is in the range of 1.17-1.36%. The content of phenolic acids is expressed as equivalents of chlorogenic and rosemarinic acids. The content of phenolic acids ranges from 6.62 to 7.05% and from 2.76 to 3.26%. The antioxidant effect of ethanolic extracts of selected species was determined by three spectrophotometric methods. By determining DPPH radical scavenging activity ( $IC_{50}$  6.72-7.50  $\mu\text{g/mL}$ ), metal chelating activity ( $IC_{50}$  31.79-128.79  $\mu\text{g/mL}$ ) and reducing power ( $IC_{50}$  17.32-21.36  $\mu\text{g/mL}$ ) it was shown that selected species of the genus *Artemisia* have significant antioxidant activity.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### FENOLNE SASTAVNICE I ANTIOKSIDACIJSKI UČINAK VRSTA *ARTEMISIA CAERULESCENS* L., *ARTEMISIA VERLOTIORUM* LAMOTTE I *ARTEMISIA VULGARIS* L.

Ana Čačko

#### SAŽETAK

Vrste roda *Artemisia* tradicionalno se najviše koriste za liječenje gastrointestinalnog te urogenitalnog trakta. Međutim, sve veće razumijevanje oksidacijskog stresa i njegovih posljedica na organizam potaknulo je istraživanja antioksidacijskog djelovanja brojnih biljnih vrsta, pa tako i odabranih vrsta roda *Artemisia*. U okviru ovog diplomskog rada ispitan je fitokemijski sastav te antioksidacijsko djelovanje zeleni vrsta *A.caerulescens*, *A.verlotiorum* te *A.vulgaris*. Tankoslojnom je kromatografijom u zeleni odabranih vrsta utvrđena prisutnost klorogenske kiseline, izokvercitrina te rutina. Fitokemijski sastav fenolnih kiselina, flavonoida i trjeslovina utvrđen je spektrofotometrijskim metodama. Udio flavonoida u zeleni odabranih vrsta iznosi 0,59-0,78%, dok je sadržaj trjeslovina u rasponu 1,17-1,36%. Sadržaj fenolnih kiselina izražen je kao ekvivalenti klorogenske te ružmarinske kiseline. Dobiven je sadržaj fenolnih kiselina u rasponu od 6,62 do 7,05%, odnosno od 2,76 do 3,26%.

Antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata zeleni odabranih vrsta određen je trima spektrofotometrijskim metodama. Određivanjem sposobnosti hvatanja DPPH radikala ( $IC_{50}$  6,72-7,50  $\mu\text{g/mL}$ ), određivanjem sposobnosti keliranja iona željeza(II) ( $IC_{50}$  31,79-128,79  $\mu\text{g/mL}$ ) te određivanjem sposobnosti redukcije ( $IC_{50}$  17,32-21,36  $\mu\text{g/mL}$ ) pokazano je značajno antioksidacijsko djelovanje odabranih vrsta roda *Artemisia*.

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

Rad sadrži: 53 stranice, 14 grafičkih prikaza, 7 tablica i 61 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Artemisia*, fenolne kiseline, flavonoidi, trjeslovine, 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. Jasna Jablan**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2020.

## 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

### PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT EFFECT OF *ARTEMISIA CAERULESCENS* L., *ARTEMISIA VERLOTIORUM* LAMOTTE I *ARTEMISIA VULGARIS* L.

Ana Čačko

#### SUMMARY

Species of the genus *Artemisia* are traditionally used to treat the gastrointestinal and genito-urinary systems. However, the understanding of oxidative stress and its effects on the body has prompted research into the antioxidant effects of many plant species, including selected species of the genus *Artemisia*. Within this diploma thesis, the phytochemical composition and antioxidant activity of *A.caerulescens*, *A.verlotiorum* and *A.vulgaris* herb were examined. Thin layer chromatography of selected species revealed the presence of chlorogenic acid, isoquercitrin and rutin. The phytochemical composition of phenolic acids, flavonoids and tannins was determined by spectrophotometric methods. The amount of flavonoids in the selected species is 0.59-0.78%, while the tannin content is in the range of 1.17-1.36%. The content of phenolic acids is expressed as equivalents of chlorogenic and rosmarinic acids. The content of phenolic acids ranges from 6.62 to 7.05% and from 2.76 to 3.26%.

The antioxidant effect of ethanolic extracts of selected species was determined by three spectrophotometric methods. By determining DPPH radical scavenging activity ( $IC_{50}$  6.72-7.50  $\mu\text{g/mL}$ ), metal chelating activity ( $IC_{50}$  31.79-128.79  $\mu\text{g/mL}$ ) and reducing power ( $IC_{50}$  17.32-21.36  $\mu\text{g/mL}$ ) it was shown that selected species of the genus *Artemisia* have significant antioxidant activity.

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

Thesis includes: 53 pages, 14 figures, 7 tables and 61 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Artemisia*, phenolic acids, flavonoids, tannins, antioxidant 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  
**Jasna Jablan, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Marijana Zovko Končić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2020.