

Mladi za napredek Maribora 2018

35. srečanje

Artemisinin: procesi ekstrakcije, antioksidacijska učinkovitost in vsebnost skupnih fenolnih spojin

Raziskovalno področje: Kemija in kemijska tehnologija

Raziskovalna naloga

Avtor: JULIJA KOLETNIK

Mentor: DARIJA CÖR, MAŠA KNEZ HRNČIČ

Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

Maribor, februar 2018

Mladi za napredek Maribora 2018

35. srečanje

Artemisinin: procesi ekstrakcije, antioksidacijska učinkovitost in vsebnost skupnih fenolnih spojin

Raziskovalno področje: Kemija in kemijska tehnologija

Raziskovalna naloga

Maribor, februar 2018

KAZALO VSEBINE

Kazalo slik.....	5
Kazalo preglednic	5
Kazalo grafov	6
Kazalo organigramov	6
1 Uvod	9
1.1 Namen raziskave.....	9
1.2 Raziskovalno vprašanje.....	10
1.3 Hipoteze	10
1.4 Metode dela.....	11
2 Teoretični del	11
2.1 Malaria.....	11
2.1.1 Epidemiologija	12
2.1.2 Paraziti	13
2.1.3 Življenjski krog plazmodijev	14
2.1.4 Patogeneza	15
2.1.5 Obramba gostitelja	16
2.1.6 Antimalariki.....	16
2.1.6.1 Kinin.....	16
2.1.6.2 Klorokin.....	17
2.1.7 Cepiva	18
2.1.7.1 RTS,S/AS01.....	18
2.2 <i>Artemisia annua</i> L. (Sladki pelin).....	19
2.2.1 Kemijska sestava listov <i>Artemisia annua</i> L.	20
2.2.2 Artemisinin.....	21
2.2.2.1 Izolacija artemisinina.....	23
2.2.2.2 Derivati artemisinina.....	24
2.2.2.3 Uporaba artemisinina v medicinske namene	27
2.3 Opis metod dela.....	27
2.3.1 Testi za določanje antioksidativnih lastnosti spojin	27
2.3.2 Določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu jevim reagentom.....	28

2.3.3 Uporaba radikala DPPH' (2,2-difenil-1-dipikrilhidrazila) za določitev antioksidacijskih lastnosti	29
2.3.4 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti – HPLC.....	30
3 Empirični del	33
3.1 Priprava rastlinskega materiala.....	33
3.2 Ekstrakcija s superkritičnim CO ₂	34
3.2.1 Izvedba ekstrakcije s supekritičnim CO ₂	35
3.3 Ekstrakcija po Soxhletu	36
3.3.1 Ekstrakcija po Soxhletu s petroletrom	37
3.3.2 Ekstrakcija po Soxhletu z metanolom.....	38
3.4 Antioksidacijska učinkovitost ekstraktov	39
3.5 Določanje skupnih fenolnih spojin v ekstraktih	40
3.5.1 Umeritvena premica z galno kislino	41
3.5.2 Določanje vsebnosti skupnih fenolov v ekstraktih.....	42
3.6 HPLC analiza vzorcev	42
4 Rezultati meritev	43
4.1 Izkoristki ekstrakcij.....	43
4.2 Antioksidacijska učinkovitost ekstraktov	45
4.3 Vsebnost skupnih fenolnih spojin v ekstraktih <i>Artemisie annue</i> L.....	47
4.4 HPLC analiza vzorcev	49
5 Razprava	53
5.1 Izkoristki ekstrakcij	53
5.2 Antioksidacijska učinkovitost (AOU) ekstraktov in koncentracija skupnih fenolnih spojin	54
5.3 HPLC analiza.....	55
6 Zaključek.....	56
6.1 Potrditev/zavrnitev hipotez.....	56
6.2 Odgovor na raziskovalno vprašanje.....	57
6.3 Možnost nadaljnjih raziskav	58
7 Družbena odgovornost.....	58
8 viri in literatura.....	59

KAZALO SLIK

Slika 1: Razširjenost malarije	13
Slika 2: Življenjski krog plazmodijev	15
Slika 3: Skeletna formula kinina	17
Slika 4: Skeletna formula klorokina	18
Slika 5: <i>Artemisia annua</i> L.....	20
Slika 6: Skeletna formula artemisininina	21
Slika 7: Model reduktivnega razpada artemisininina do reduktivnih vrst (Starkl, 2012).....	22
Slika 8: Model odprtja edoperoksidnega obroča artemisininina (Starkl, 2012).....	22
Slika 9: Modeli delovanj artemisininina (Starkl, 2012)	23
Slika 10: Biološko aktivni in neaktivni analogi artemisininina (Starkl, 2012).....	24
Slika 11: Skeletna formula artemetra	25
Slika 12: Skeletna formula artesunata.....	26
Slika 13: Skeletna formula dihidroartemisininina.....	26
Slika 14: Struktura DPPH pred in po reakciji z antioksidantom.....	29
Slika 15: Spremembe v absorpcijskem spektru (od vijolične do rumene) v reakcijah DPPH z radikali reducenti.....	30
Slika 16: Značilen kromatogram večkomponentne mešanice	31
Slika 17: Shema HPLC sistema (Zabukovec, 2014).....	32
Slika 18: Priprava rastlinskega materiala.....	34
Slika 19: Proces ekstrakcije s superkritičnimi fluidi iz trdnega materiala (povzeto po Danielskem, 2007)	35
Slika 20: Ekstrakt v separatorju.....	36
Slika 21: Ekstrakcija po Soxhletu	37
Slika 22: Uparjanje topila z rotavaporjem	37

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Kemijska sestava listov <i>Artemisia Annua</i> L. (Iqbal et al., 2012)	20
Preglednica 2: Časi ciklov pri ekstrakciji po Soxhletu s Petroletrom	38
Preglednica 3: Časi ciklov pri ekstrakciji po Soxhletu z metanolom.....	39
Preglednica 4: Koncentracije standardnih raztopin galne kisline	41
Preglednica 5: Mase ekstraktov za pripravo raztopine za hplc analizo	42
Preglednica 6: Mase ekstraktov, pridobljenih s superkritičnim CO ₂	43
Preglednica 7: Masa produkta, pridobljenega z ekstrakcijo po Soxhletu po odstranitvi topila (petroletra)	43
Preglednica 8: Masa produkta, pridobljenega z ekstrakcijo po Soxhletu po odstranitvi topila (metanola).....	43
Preglednica 9: Primerjava izkoristkov ekstrakcij	44
Preglednica 10: Aniotioksidacijska učinkovitost ekstraktov	45
Preglednica 11: % inhibicije DPPH zaradi delovanja ekstraktov sladkega pelina	46
Preglednica 12: Absorbanca standardnih raztopin galne kisline pri λ_{754} nm.....	47
Preglednica 13: Absorbanca vzorcev pri $\lambda_{754\text{nm}}$	48
Preglednica 14: Koncentracija skupnih fenolnih spojin	48
Preglednica 15: Fenolne spojine v ekstraktih sladkega pelina.....	50

Preglednica 16: Prisotnost fenolnih spojin v posameznih vzorcih	52
---	----

KAZALO GRAFOV

Graf 1: VIS Spekter 4.0M raztopine DPPH	45
Graf 2: % Inhibicije DPPH v odvisnosti od časa	46
Graf 3: Umeritvena premica z galno kislino	47
Graf 4: Odvisnost med koncentracijo skupnih fenolnih spojin in AOU po 30 min	49
Graf 5: Kromatogrami HPLC analize (od zgoraj navzdol: V_1 , V_2 , V_3 in V_4).	51
Graf 6: Primerjava izkoristkov ekstrakcij	54
Graf 7: Primerjava AOU po 30 min	55

KAZALO ORGANIGRAMOV

Organigram 1: Načrt praktičnega dela.....	33
---	----

POVZETEK

V nalogi ugotavljamo, s katero metodo ekstrakcije (ekstrakcija z uporabo superkritičnega CO₂, ekstrakcija po Soxhletu) in pod katerimi pogoji (polarnost topila) je izkoristek fenolnih spojin z največjo antioksidacijsko učinkovitostjo v ekstraktu *Artemisia annua* L. največji. Primerjava izkoristkov ekstrakcij kaže, da je najoptimalnejša ekstrakcija po Soxhletu z uporabo metanola, katere izkoristek je za 5.36 % višji od izkoristka ekstrakta, pridobljenega z ekstrakcijo CO₂ pod tlakom 200 barov in pri temperaturi 50°C. Največ snovi z antioksidacijskim učinkom smo ekstrahirali z ekstrakcijo po Soxhletu z metanolom. Tej sledi ekstrakt, pridobljen s SFC pri tlaku 300 barov in 35°C, najmanj snovi z antioksidacijsko učinkovitostjo pa je bilo v ekstraktu, kjer smo kot topilo uporabili petroleter. Koncentracija skupnih fenolnih spojin, izraženih v mg EGK/L, pokaže, da so ekstrakti, pridobljeni s SFC-metodo, precej bogatejši kot ekstrakti, pridobljeni z ekstrakcijo po Soxhletu.

Ključne besede: *Artemisia annua* L., artemisinin, malarija, ekstrakcija, fenolne spojine

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentoricama ter moji šolski profesorici kemije za vso podporo, nasvete in pomoč pri nastajanju raziskovalne naloge. Prav tako se zahvaljujem vodstvu šole, da mi je omogočilo uporabo kemijskega laboratorija, vodji Laboratorija za separacijske procese na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Mariboru, kjer sem ne samo izvedla ekstrakcije, temveč pridobila tudi veliko novega znanja, Medicinski fakulteti v Mariboru, v katere laboratorijih sem izvedla HPLC analizo, in šolski koordinatorici za raziskovalno dejavnost.

1 UVOD

Kitajska rastlina *qinghao* z latinskim imenom *Artemisia annua* L, v slovenščini poimenovana enoletni ali sladki pelin, že več stoletij velja za eno najpomembnejših zdravilnih rastlin v tradicionalni kitajski medicini. Ta močno dišeča rastlina je postala na Zahodu cenjena zaradi vsebnosti artemisininina, aktivne spojine, nahajajoče se v listih rastline, ki je zadnjih trideset let predmet znanstvenih raziskav.¹ Artemisinin se je namreč izkazal za izjemno učinkovitega pri zdravljenju malarije. Strokovna literatura poroča, da je artemisinin učinkovit proti vsem okužbam s paraziti rodu *Plasmodium*, prav tako kaže antikancerogene in fungicidne učinke (O'Neill s sod., 2010). Leta 2016 je 91 držav poročalo o 216 milijonih primerov recidivnih okužb z malarijo, kar je 5 milijonov primerov več kot v letu 2015. Od tega je bilo 445 000 okužb smrtnih (World Malaria Report, 2016). V nalogi želimo ugotoviti, s katero metodo ekstrakcije (ekstrakcija z uporabo superkritičnega CO₂, ekstrakcija po Soxhletu) in pod katerimi pogoji (polarnost topila) je izkoristek fenolnih spojin z največjo antioksidativno učinkovitostjo v ekstraktu *Artemisie annue* L. največji. Izsledki te raziskave predstavljajo izhodišče za nadaljnje raziskave na živih kulturah (okužbe s paraziti rodu *Plasmodium*, rakasta tkiva). Za razumevanje delovanja artemisininina bomo v nalogi osvetlili problematiko malarije in mehanizem delovanja parazitov iz rodu *Plasmodium*.

1.1 NAMEN RAZISKAVE

V nalogi bomo ugotavljali, s katero metodo ekstrakcije (ekstrakcija z uporabo superkritičnega CO₂, ekstrakcija po Soxhletu) in pod katerimi pogoji (polarnost topila) je izkoristek fenolnih spojin z največjo antioksidativno učinkovitostjo v ekstraktu *Artemisie annue* L. največji. Primerjali bomo učinkovitost ekstrakcije po Soxhletu z uporabo dveh različnih topil, metanola in petroletra, ter dveh ekstraktij s superkritičnim CO₂ z variacijo tlaka in temperature. Z uporabo spektrofotometrične metode z reagentom Folin-Ciocalteu bomo določili vsebnost fenolnih spojin, rezultate analize pa podali kot masni odstotek, izražen v masi galne kisline, s katero bomo pripravili umeritveno krivuljo. Antioksidacijsko učinkovitost bomo določili s stabilnim prostim

¹ Če v iskalno vrstico spletne strani PubMed vnesemo geslo *artemisinin*, ugotovimo, da je bilo v zadnjih petih letih s to ključno besedo objavljenih 2869 člankov.

radikalom DPPH. S pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) bomo preučili sestavo pridobljenih ekstraktov.

1.2 RAZISKOVALNO VPRAŠANJE

Temeljno raziskovalno vprašanje naloge je, s katero metodo ekstrakcije (ekstrakcija z uporabo superkritičnega CO₂, ekstrakcija po Soxhletu) in pod katerimi pogoji (polarnost topila) je izkoristek fenolnih spojin z največjo antioksidativno učinkovitostjo v ekstraktu *Artemisie annue* L. največji.

1.3 HIPOTEZE

Na osnovi opredelitve problema in pregledane literature smo postavili naslednje hipoteze:

1. hipoteza: Izkoristek ekstrakcije po Soxhletu z metanolom bo višji kot izkoristek ekstrakcije, opravljene s petroletrom.

Razlaga hipoteze:

Fenoli so spojine, katerih polarnost je bližje metanolu kot petroletru.

2. hipoteza: Na izkoristek ekstrakcije artemisinina pri ekstrakciji s superkritičnim CO₂ bo v največji meri vplivala izbira ustreznega tlaka.

Razlaga hipoteze:

Že majhne spremembe tlaka lahko bistveno spremenijo polarnost CO₂ v superkritičnih pogojih, kar je bistveno za ekstrakcije polarnih in nizko polarnih snovi.

3. hipoteza: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v ekstraktih bo v korelaciji s polarnostjo topila.

Razlaga hipoteze:

V ekstraktih, kjer je polarnost topila višja, se bo ekstrahiralo večji delež fenolnih spojin.

4. hipoteza: Antioksidacijska učinkovitost ekstraktov bo višja v vzorcih, pridobljenih s superkritičnim CO₂, kot v vzorcih, pridobljenih z ekstrakcijo po Soxhletu.

Razlaga hipoteze:

Izbira dobrih pogojev za ekstrakcijo bo vplivala na večji izkoristek in čistočo snovi z antioksidacijskim učinkom.

1.4 METODE DELA

V nalogi bomo najprej preučili vzroke za nastanek malarije, načine zdravljenja in s pomočjo strokovne literature ocenili potencial artemisininina pri zdravljenju te smrtonosne bolezni. V empiričnem delu bomo uporabili naslednje analitične metode: ekstrakcijo po Soxhletu, ekstrakcijo s superkritičnim CO₂, z uporabo prostega radikala DPPH bomo določili antioksidacijsko učinkovitost pridobljenih ekstraktov, vsebnost skupnih fenolnih spojin bomo določili z uporabo Folin-Ciocalteuovega reagenta, ekstrakt bomo analizirali z metodo HPLC.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 MALARIJA

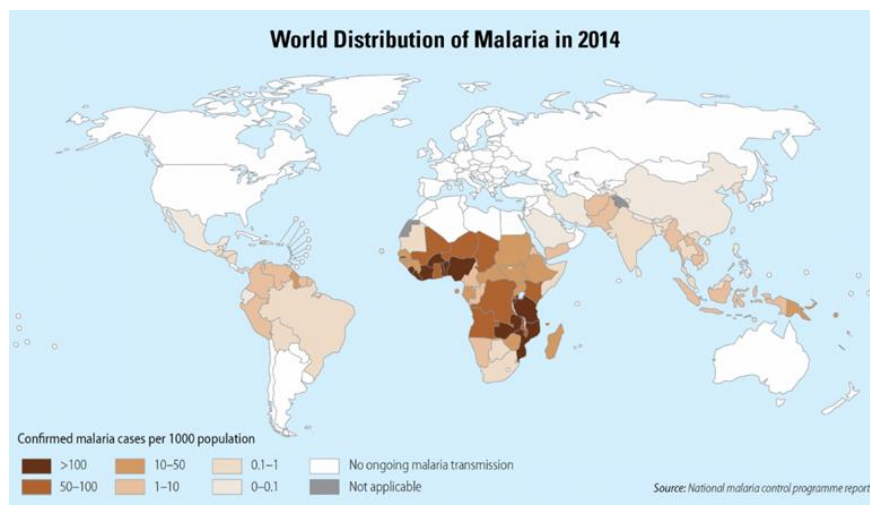
Malarija je smrtonosna recidivna okužba, za katero so značilni napadi mrzlice, vročine, zmanjšanje števila rdečih krvničk, abdominalne bolečine, bolečine v mišicah, povečanje vranice in drugi usodni zapleti. Prenaša se z ugrizi okuženih samic komarjev vrste *Anopheles*, ki prenašajo parazite vrste *Plasmodium*, ki se ob ugrizu sprostijo v krvni obtok.² Najstarejši opisi simptomov, značilnih za malarijo, segajo v leto 2700 pr. n. št. in predstavljajo del zapisov, imenovanih *Nei Ching*, na katerih temelji razvoj kitajske medicine. Omenjajo se značilni vročinskimi valovi, povečana vranica in drugi simptomi okužb, značilnih za parazita *P. vivax* in *P. malarie*. Iz mezopotamskih (2000 pr. n. št.) in egipčanskih zapisov (1570 pr. n. št.) je razvidna razširjenost bolezni. Malarija je postala širše razpoznavna v četrtem stoletju pred našim štetjem v antični Grčiji. Simptome bolezni je opisal Hipokrat; pri bolnikih je redno opravljal meritve telesne temperature in kot vzrok bolezni navedel postano pitno vodo. V času Perikleja (495–429

² Vir: <https://www.britannica.com/science/malaria#ref895845>; pridobljeno 27. 8. 2017.

pr. n. št.) je bila malarija zabeležena v večini medicinskih zapisov in pogosto prepoznana kot vzrok povišane smrtnosti na podeželju. V drugem stoletju pred našim štetjem se je na Kitajskem kot zdravilo proti tej bolezni pričela uporabljati rastlina *qinghao* (lat. *Artemisia annua* L.). Rastlina je bila prvič opisana v delu z naslovom *52 remedies*, ki je bilo najdeno v grobnici iz dinastije Mawangdujev. Njeno protivirusno delovanje je bilo prvič opisano v času dinastije Yin, leta 350 pr. n. št. Znanstvene raziskave povzročiteljev malarije so postale mogoče šele po letu 1880, ko je Charles Louis Alphonse Laveran odkril parazite v rdečih krvničkah bolnika. Leta 1897 je Ronald Ross objavil, da je odkril majhna telesca v črevesju komarjev vrste *Anopheles*, kar je v strokovni javnosti naletelo na skepticizem. Njegova premestitev v Kalkuto je upočasnila pričetke raziskave, tako da je končne rezultate, tj. odkritje vektorja (prenašalca) malarije, objavil šele leta 1889. Tako Laveran (1907) kot Ross (1902) sta za svoje delo prejela Nobelovo nagrado (<https://www.cdc.gov/malaria/about/history/>; pridobljeno 27. 8. 2017). Artemisinin je bil prvič izoliran leta 1971 na Kitajskem. Več o tem glej v poglavju 2.2.3.

2.1.1 EPIDEMIOLOGIJA

Malarija se pojavlja v predelih tropskega in subtropskega podnebja, najbolj razširjena je v podsaharski Afriki, državah Latinske Amerike ter v južni in jugozahodni Aziji, kjer je resnost okužbe precej podcenjena. Leta 2016 je Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) poročala, da je okužbam z malarijo izpostavljenih 106 držav. Leta 2015 so zabeležili 212 milijonov okužb, od tega se je 429 000 primerov končalo s smrtjo. Z malarijo se torej letno okuži približno 5 % svetovne populacije. Glavne prenašalke bolezni so samice komarjev *Anopheles*. Te so aktivne od mraka do zore, zato je v tem času je možnost okužbe najvišja (World Malaria Report, 2016).



SLIKA 1: RAZŠIRJENOST MALARIJE

Endemičnost malarije se najpogosteje meri s testom EIR³ ali z letnim številom okuženih komarjevih pikov na osebo (kar je zaradi težavnosti pri štetju zelo nenatančno). Tradicionalno se meri s stopnjo povečane vranice ali številom parazitov pri otrocih, starih med dve in devet let, kot sledi:

- hipoendemično: stopnja vranice ali parazitov 0 %–10 %;
- mezoendemično: stopnja vranice ali parazitov 10 %–50 %;
- hiperendemično: stopnja vranice ali parazitov 50 %–75 %;
- holoendemično: stopnja vranice ali parazitov presega 75 %.

2.1.2 PARAZITI

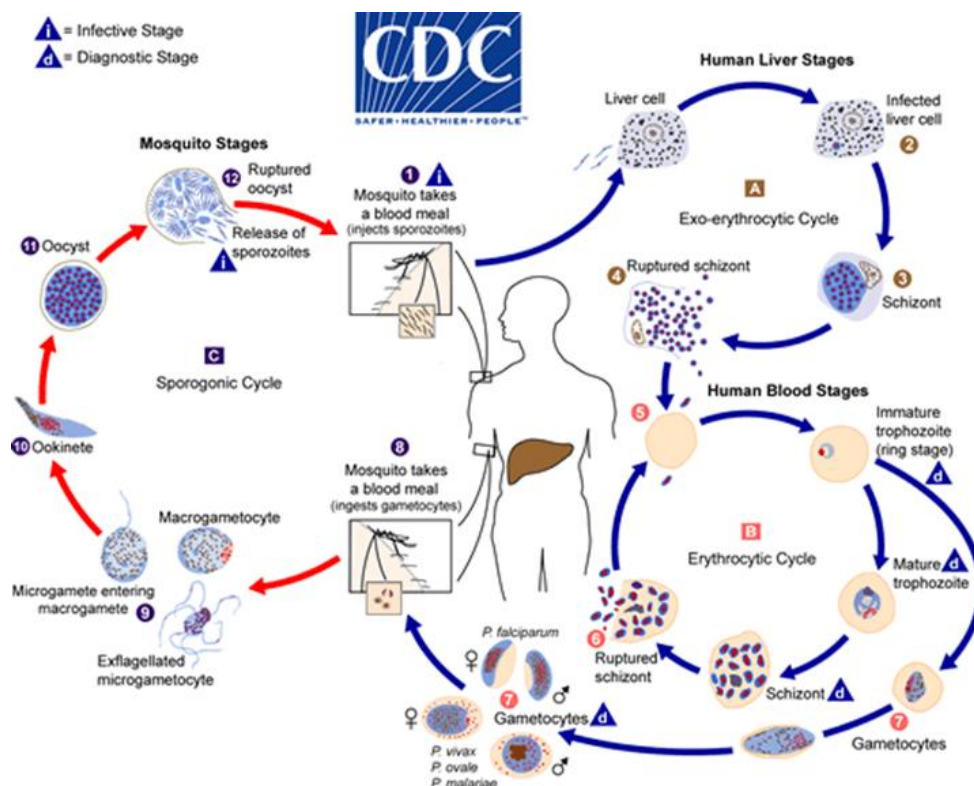
Malarijo prenašajo na ljudi štiri vrste parazitov iz rodu *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* in *P. ovale*. *P. falciparum*, povzročitelj največ smrti, povezanih z malarijo, je najbolj razširjen na afriškem kontinentu, Novi Gvineji ter Haitiju. Najbolj razširjen parazit izven Afrike je *P. vivax*, ki ga najdemo v srednji in južni Ameriki, Indiji ter na Bližnjem vzhodu. *P. ovale* se pojavlja le v zahodni Afriki, *P. malariae* pa najdemo v vseh afriških predelih, izven Afrike pa je relativno redek (White, 2014).

³ EIR je stopnja entomološke inokulacije, ki se določi kot količnik med številom ugrizov komarjev ljudi in številom okužb.

2.1.3 ŽIVLJENJSKI KROG PLAZMODIJEV

Razvojni krog plazmodija je sestavljen iz dveh ciklov: spolnega, ki poteka v samicah komarjev vrste *Anopheles*, in nespolnega, ki poteka v ljudeh. V komarju pride do združitve ženskih in moških celic ter s tem do nastanka šizontov,⁴ iz katerih se z delitvijo razvijejo trosi, ki potujejo iz črevesja komarjev do slinavke. S pikom okuženega komarja se skupaj s slino sprosti v krvni obtok med osem in petnajst trosov, ki v roku tridesetih minut vstopijo v hepatocyte, jetrne celice, kjer poteka prederitrocitna faza razvoja. V tej fazi se znotraj šizontov razvije med dva tisoč in štirideset tisoč merocitov (prederitrocitna faza). Inkubacijska doba jetrne faze je od pet do enaindvajset dni, odvisno od vrste plazmodija. *P. vivax* in *P. ovale* lahko tvorita spečo obliko parazita, imenovano hipnocit, ki se razvije in povzroči izbruhe šele čez eno ali dve leti po okužbi. Ko se jetrne celice razpočijo, se merociti sprostijo v krvni obtok. Posamezen merocit lahko okuži eno rdečo krvničko, kjer se razvije v trofocit. Trofociti se znotraj rdečih krvničk pospešeno množijo, govorimo o eritrocitni fazi razvoja. Paraziti znotraj okužene rdeče krvničke v roku dvanajstih ur tvorijo obroč, viden pod svetlobnim mikroskopom. Paraziti vrste *P. falciparum* zaužijejo notranjost eritrocita, največkrat hemoglobin. Celica dobi z rastjo sferično obliko, postane manj fleksibilna, na njeni površini se pojavi visokomolekularni antigen, imenovan *P. falciparum* eritrocitni membranski protein 1 ali na kratko PfEMP1. *P. vivax* z rastjo poveča celico, na površini se pojavijo rdeče granule, imenovane »Schuffner's dots«. Podobne granule se pojavijo tudi na eritrocitih, okuženih s *P. ovale*. Približno šestintrideset ur po okužbi pride do mitotske delitve jeder trofocitov. Nastane šizont, znotraj katerega se razvije med osem in šestintrideset merocitov, ki se ob razpoku eritrocita sprostijo nazaj v krvni obtok, napadejo naslednjo generacijo rdečih krvničk ter s tem ponovijo eritrocitno fazo. Iz nekaterih merocitov se po enem tednu v razmerju 1: 4 razvijejo moški in ženski gamociti, ki okužijo komarja, s čimer se plazmodijev razvojni krog sklene (Crutcher in Hoffman, 1996).

⁴ Šizont je celica, ki nastane z mitotsko delitvijo jedra trofocita.



SLIKA 2: ŽIVLJENJSKI KROG PLAZMODIJEV

2.1.4 PATOGENEZA

Prve simptome malarije povzroči pok eritrocitov in sprostitev šizontov v krvni obtok. To sproži imunski odziv gostitelja. Reaktivne kisikove spojine, citokini, in nekatere druge beljakovine, ki se sprostijo ob imunskem odzivu, so najverjetneje odgovorne za vročino, pot, oslabelost in mrzlico. V primerih malarije vrste *falciparum* se zlepljeni okuženi eritrociti pritrdijo na notranjo plast kapilar, kar ovira ali ustavi krvni obtok in vodi do nezadostne preskrbe lokalnih tkiv s kisikom. V možganih ta zaplet povzroči cerebralno malarijo (Crutcher in Hoffman, 1996). Vzrok za večjo patogenost *P. falciparum* je njegova sposobnost okužbe rdečih krvničk vseh starosti, kar povzroči velik porast parazitoze in hudo anemijo. Ostale vrste plazmodijev lahko okužijo le nezrele ali stare eritrocite, katerih membrana zaradi izteka 120-dnevnega življenjskega obdobja slabi. *P. vivax*, *P. ovale* in *P. malariae* povzročajo nizko stopnjo parazitemije, blago anemijo, redko tudi razpok vranice (White, 2013).

2.1.5 OBRAMBA GOSTITELJA

Srpaste celice, povzročiteljice srpastocelične anemije, so se razvile kot polimorfizem, ki ščiti organizem pred razvojem resnih okužb s *P. falciparumom*. Kljub temu, da se posamezniki s srpastocelično anemijo lahko okužijo s paraziti, le redko razvijejo bolezni, povezane z malarijo, saj se *P. falciparum* v njihovih eritrocitih težko razvija (<https://www.cdc.gov/malaria/about/index.html>; pridobljeno 28. 8. 2017). Odsotnost okužb s parazitom *P. vivax* v številnih predelih Afrike pojasni dejstvo, da večina temnopoltih ljudi nima antigena Duffy, ki na površini eritrocitov deluje kot receptor za merocite parazita *P. vivaxa*. Brez receptorja merociti ne morejo vstopiti v celico (Crutcher in Hoffman, 1996).

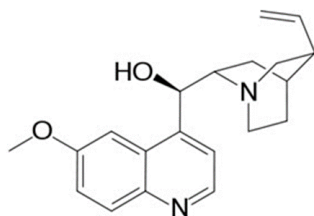
Posamezniki, ki so repetitivno izpostavljeni malariji, razvijejo protitelesa, odporna na večino trosov ter na parazite v eritrocitni in prederitrocitni fazi razvoja. Glede na to, bi lahko protitelesa, ki so odporna na parazite v spolnem ciklu, pomagala pri zaviranju oziroma znižanju prenosa malarije. Pridobljena imunost se med nosečnostjo preko placente prenese na zarodek. Pasivno prenesena imunska odpornost pade med šestim in devetim mesecem po rojstvu otroka. (Crutcher in Hoffman, 1996)

2.1.6 ANTIMALARIKI

Farmacevtski terminološki slovar (2018) navaja antimalarike kot zdravila ali učinkovine, ki se uporabljajo za zdravljenje malarije. Njihova uporaba se svetujem popotnikom, ki potujejo v tropske in subtropske kraje. Ti preventivno uživajo antimalarike v obliki tablet pred odhodom, med potovanjem in do dva tedna po vrnitvi domov. Tako se morebitni okužbi izognejo, aktivne učinkovine pa ubijejo ali ustavijo rast plazmodijev.

2.1.6.1 KININ

Kinin je kinolinski alkaloid v skorji kininovca (*Cinchona*), ki se uporablja kot grenčica (Botanični terminološki slovar, 2018). Sodi med bazične, slabo topne spojine, zato se uporablja v obliki soli. Posega v rast in razmnoževanje parazitov, ki se naselijo v rdečih krvničkah. Uporaba kinina močno izboljša stanje osebe z malarijo. Paraziti izginejo iz krvi, simptomi bolezni pa hitro izzvenijo. A ker kinin ne uniči plazmodijev v telesnih celicah, ki niso rdeče krvničke, mnogi bolniki nekaj tednov po končanem zdravljenju ponovno zbolijo za malarijo (Achen s sod., 2011).



SLIKA 3: SKELETNA FORMULA KININA

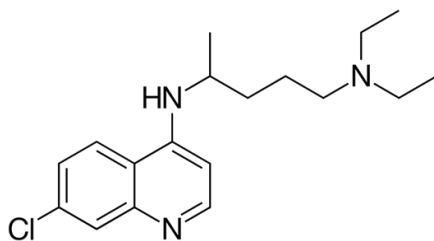
Zdravljenje malarije s kininom v začetku sedemnajstega stoletja je sploh prvi uspešen poskus zdravljenja te bolezni. Ekstrakt kinina, ki je zamenjal prah lubja, ki so ga uživali z izbrano tekočino, najpogosteje z vinom, sta leta 1820 pridobila francoska farmacevta Pierre Joseph Pelletier in Joseph Caventou. Leta 1944 so kinin uspešno sintetizirali v laboratoriju, vendar njegova sinteza za komercialne namene ni ekonomsko upravičena (Dobson SMaM, 2001).

Kinin se zaužije oralno. V času do treh ur doseže najvišjo koncentracijo, razporedi se po telesnih tekočinah in se veže na proteine. Njegovi stranski učinki so lahko blagi, npr. slabost, glavobol, oslabitev sluha, ki je odvisna od višine odmerka, ali hujši, npr. bruhanje, abdominalna bolečina, izguba vida, diareja. Če se odmerki zaužijejo v prekratnem časovnem intervalu, se zniža krvni tlak, ob intravenoznem injiciranju pa se lahko pojavi globoka venska tromboza. Pogost stranski učinek zdravljenja s kininom je še hipoglikemija, ki je posebej pogosta pri nosečnicah (Achan s sod., 2011). Kinin je bil vodilni antimalarik vse do leta 1920, ko so ga nadomestila učinkovitejša sintetična zdravila. Najpomembnejše med njimi je bil klorokin, ki pa se zaradi odpornosti parazitov nanj ni izkazal za pretirano učinkovitega.

2.1.6.2 KLOOROKIN

Leta 1934 je Hans Andersag sintetiziral spojini, imenovani resochin in sontochin, ki sta se uvrstili v nov razred antimalarikov, tj. k 4-aminokinolinom. Med II. svetovno vojno so francoski vojaki najdeno zalogo sontochina predali Američanom, ki so kemijsko formulo spojine priredili in izboljšali njeno učinkovitost. Nova formula, katere struktura je bila podobna resochinu, se je imenovala klorokin. Po koncu II. svetovne vojne je postal klorokin vodilni antimalarik. Zaradi pretirane uporabe je parazit *P. falciparum* pričel razvijat odpornost proti klorokinu. Leta 1957 so to najprej opazili na tajsko-kamboški meji, tri leta kasneje še v Venezueli in Kolumbiji, o

rezistenci so leta 1978 poročali iz Kenije, do leta 1983 pa se je ta razširila do Sudana, Ugande, Zambije in Malavija.



SLIKA 4: SKELETNA FORMULA KLOROKINA

Klorokin se uporablja oralno v obliki tablet klorokinfosfata ali intramuskularno z injekcijo klorokinhidroklorida. Učinkovito deluje proti okužbam s paraziti *P. vivax*, *P. ovale* in *P. falciparum*. Med njegove najpogostejše stranske učinke sodijo bolečine v mišicah, izguba apetita in diareja. Resne zaplete predstavljata izguba vida in epileptični napadi. Klorokin med nosečnostjo ne škoduje zarodku.

2.1.7 CEPIVA

Kljub dolgoletnim raziskavam in prizadevanjem, da bi odkrili cepivo proti malariji, to še vedno ni na voljo. Po podatkih WHO-ja iz leta 2016 je v fazi kliničnih preizkusov več kot 20 cepiv. Najobetavnejše⁵ med njimi naj bi bilo cepivo RTS,S/AS01.

2.1.7.1 RTS,S/AS01

Cepivo RTS,S so leta 1987 iznašli znanstveniki, zaposleni v laboratorijih GSK-ja.⁶ Leta 2001 sta GSK in PATH⁷ pričela z razvojem cepiva za dojenčke in otroke v pokrajinah podsaharske Afrike. Želja znanstvenikov je, da bi cepivo RTS,S sprožilo imunski sistem, s čimer bi se

⁵ Vir: <http://www.who.int/malaria/media/rtss-phase-3-trial-qa/en/>; 3. 1. 2018.

⁶ Farmacevtsko podjetje GalaxoSmithKline.

⁷ Mednarodna zdravstvena organizacija Program for Appropriate Technology in Health, ki se je leta 2014 preimenovala v PATH.

gostitelj obranil parazita *P. falciparum* že v njegovih začetnih stopnjah razvoja (tj. po njegovem vstopu v krvni obtok) preden bi okužil jetra.

Izvedba 1. in 2. faze razvoja cepiva je omogočila začetno oceno varnosti in učinkovitosti cepiva, sprva pri odraslih prostovoljcih v Ameriki in Belgiji, kasneje še pri odraslih, mladostnikih, otrocih in dojenčkih iz endemičnih regij Afrike. Rezultati 2. faze, objavljeni v reviji Lancet med leti 2004 in 2007, so nakazali, da je delna zaščita otrok s tem cepivom proti malariji mogoča (Alonso s sod., 2004). 3. faza, tj. najobsežnejše testiranja cepiva doslej, se je pričela maja 2009 in končala leta 2014. V raziskavi je sodelovalo 15 459 otrok iz sedmih afriških držav: Burkine Faso, Gabona, Gane, Kenije, Malavija, Mozambika in Tanzanije. Otroci, stari med pet in sedemnajst mesecev, so prejeli tri odmerke cepiva v enomesečnih intervalih in nato po osemnajstih mesecih še četrti odmerek. Cepivo je zmanjšalo obolelost za malarijo za 39 %, kar je skoraj enako preprečitvi bolezni pri štirih od desetih primerov. Četrti odmerek je zmanjšal možnost hude malarije za 31,5 %, zmanjšali pa sta se tudi potrebi po hospitalizaciji in transfuziji krvi. Otroci, ki četrte doze cepiva niso prejeli, so izgubili zaščito pred hudo obliko malarije, kar kaže na pomembnost prejema četrtega odmerka. Po poročanju organizacije WHO, cepivo med dojenčki ni bilo dovolj učinkovito, da bi upravičili njegovo nadaljnjo uporabo v tej starostni skupini (RTS,S Clinical Trials Partnership, 2015).

2.2 ARTEMISIA ANNUA L (SLADKI PELIN)

Rastlina *qinghao* z latinskim imenom *Artemisia annua* L. in slovenskim imenom sladki ali enoletni pelin že več stoletij velja za ključno rastlino kitajske medicine. Rod *Artemisia* po Mali flori Slovenije (1999) spada v družino nebinovk (Asteraceae). Rod zajema štirinajst rastlinskih vrst (prav tam: 570–571), med drugim tudi *Artemisia absinthium*, ki se je do leta 1920 uporabljala za pripravo močne in aromatične žgane pijače z visoko vsebnostjo alkohola (absint), in *Artemisia dracunculus*, znan tudi kot pehtran, ki se danes uporablja kot začimba. Čeprav obe rastlini vsebujeta artemisinin, so raziskave pokazale, da visoke količine te učinkovine vsebuje le *Artemisia annua* L (Tu, 2017).



SLIKA 5: *ARTEMISIA ANNUA* L.

2.2.1 KEMIJSKA SESTAVA LISTOV *ARTEMISIE ANNUE* L

Kemijska sestava listov sladkega pelina je prikazana v preglednici 1. Vidimo, da je delež hranilnih snovi, maščob in beljakovin manjši od deleža nehranilnih snovi, kot sta fitan in celo tanin. Vsebnost pepela nakazuje veliko količino anorganskih mineralov. Z različnimi metodami je bila potrjena tudi prisotnost skupnih fenolov, flavnoidov in antioksidantov (Iqbal s sod., 2012).

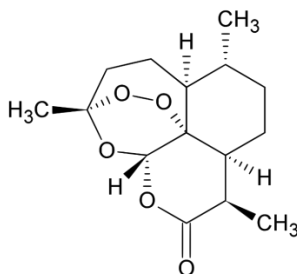
PREGLEDNICA 1: KEMIJSKA SESTAVA LISTOV *ARTEMISIE ANNUE* L. (IQBAL ET AL., 2012)

Contents	Amount (% dry weight basis)
Ash	7.5
Carbohydrate	8.3
Fat	6.07
Fiber	14.2
Moisture	11.4
Protein	24.37 mg/100g
Phytate	140.4 mg/100g
Total Tannins	0.61 mg/100g
Tocopherol	2.74 mg/100g

Kot vidimo, je glavna sestavina ekstraktov listov sladkega pelina kafa (48 %), sledi cineol (9 %), artemisinin je relativno malo – 2,7 %. Isti avtor poroča, da so izkoristki ekstrakcij običajno zelo nizki – od 0,4 % do 4,0 %.

2.2.2 ARTEMISININ

Leta 1971 je raziskovalna skupina kitajske znanstvenice Youyou Tu iz listov *Artemisie annue* L. uspešno izolirala spojino, ki je izkazala 100 % učinkovitost pri zaviranju širjenja plazmodijev. Leta 1972 so iz prej omenjenega ekstrakta izolirali seskviterpene lakton. Sprva so ga imenovali *qinghasou*, kasneje pa so ga po rodu Artemisija preimenovali v *artemisinine*. Ker je končnica “*ine*” rezervirana za poimenovanje dušikovih spojin, npr. alkaloidov in aminokislin, ta spojina pa dušika ne vsebuje, ga je Chemical Abstracts preimenoval v artemisinin (Tu, 2017).



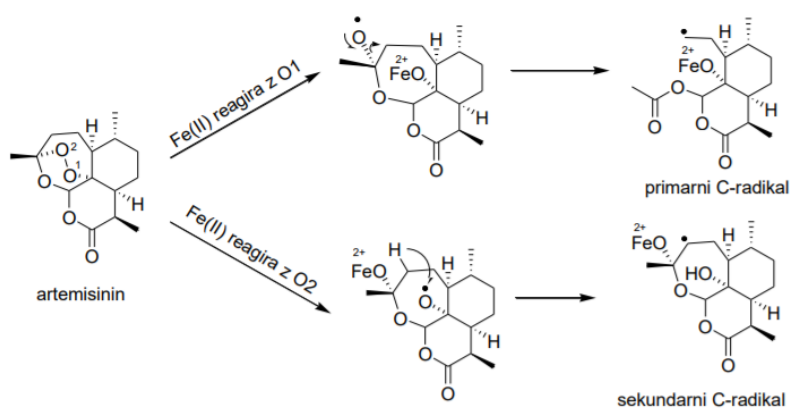
SLIKA 6: SKELETNA FORMULA ARTEMISININA

Zaradi svoje specifične strukture, razvidne iz slike 6, in vsebnosti aktivnih kisikovih funkcionalnih skupin, kot so peroksi, acetal, ketal in lakton, se njegov princip delovanja, ki po treh desetletjih raziskav še ni dorečen, razlikuje od vseh do sedaj znanih antimalarikov (Tu, 2017). Artemisinin v parazitovo celico vstopi skozi vezikel, ki povezuje parazitsko membrano z eritrocitom, kar je vzrok za selektivno toksičnost, saj artemisinin veliko bolj učinkuje na parazitske celice kot na človeške (Starkl, 2012). Bioaktivacijo artemisinina sproži divalentno železo, ki je lahko del hema ali pa je prosto v intercelularni tekočini. Mehanizem delovanja artemisinina opisujeta radikalni in ionski model, oba pa vodita do nastanka radikalov (O'Neill s sod., 2010).

Prvo hipotezo o delovanju artemisinina preko hema v hemoglobinu so znanstveniki izoblikovali na osnovi delovanja endoperoksida, ki je ključnega pomena za antimalarijsko delovanje artemisinina. Endoperoksid “aktivira” Fe^{2+} ione, ki so skoncentrirani v hemu, in tako uniči

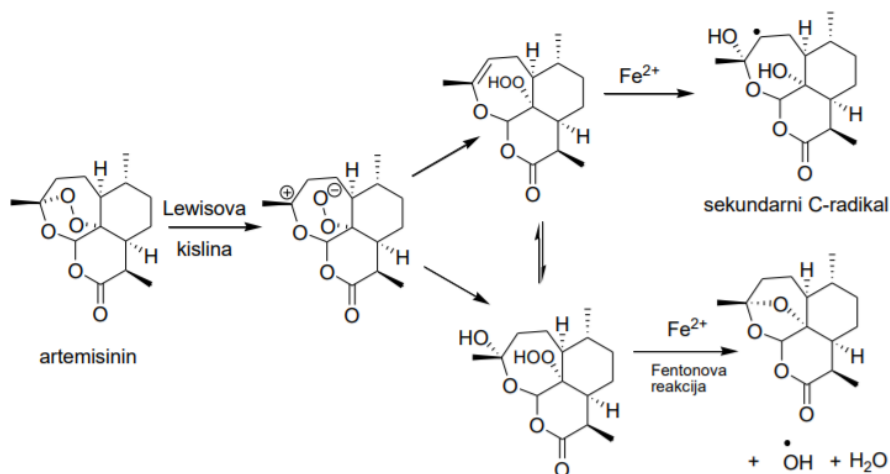
parazitarne beljakovine (Meshnick, 1993). Glavna ugotovitev, ki podpira to hipotezo, je, da lahko artemisinin reagira s hemom tako *in vitro* kot tudi *in vivo* (Pandey, 1999). Ker se po hemolizi okuženih rdečih krvničk sprosti v kri hemozoin, ni mogoče sklepati, da se interakcija med artemisininom in hemom dogaja izključno znotraj eritrocitov (Eckstein-Ludwig, 2003).

Vezava na Fe^{2+} sproži razpad endoperoksidnega mostu, kjer se nastali radikali premestijo v primarne in sekundarne ogljikove radikale. (Glej sliko 7.)



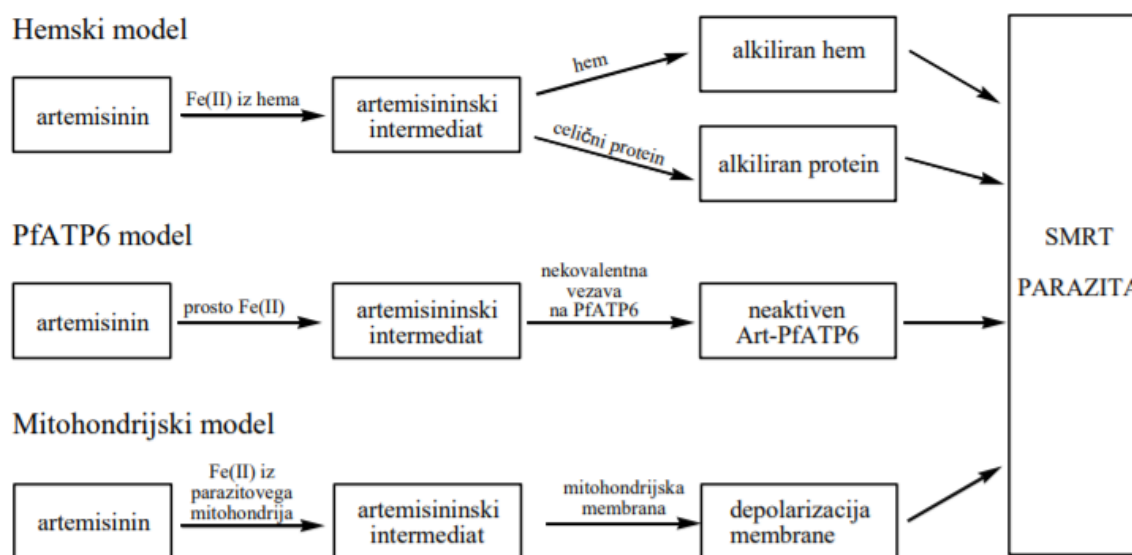
SLIKA 7: MODEL REDUKTIVNEGA RAZPADA ARTEMISININA DO REDUKTIVNIH VRST (STARKL, 2012)

Model odprtja endoperoksidnega obroča predvideva protonacijo peroksidne vezi, pri čemer Fe(II) deluje kot Lewisova kislina. Po reakciji z vodo nastane nenasičen hidroperoksid, ki povzroči reverzibilno spremembo proteinov. (Glej sliko 8.)



SLIKA 8: MODEL ODPRTJA EDOPEROKSIDNEGA OBROČA ARTEMISININA (STARKL, 2012)

Kot tretji model delovanja artemisininina se v literaturi opisuje mitohondrijski model delovanja. Vsi trije modeli so predstavljeni na sliki 9.



SLIKA 9: MODELI DELOVANJ ARTEMISININA (STARKL, 2012)

2.2.2.1 IZOLACIJA ARTEMISININA

Leta 1975 so na ICMM-CACMS⁸ določili kemijsko strukturo artemisininina, kar je omogočilo napredek v raziskovanju njegovih fizikalnih in kemijskih značilnosti. Na podlagi izsledkov raziskav je prišlo do napredka tako na tehnološkem področju kot tudi pri metodah ekstrahiranja te snovi.

Pri ekstrakciji artemisininina se soočamo z dvema velikima težavama. Vsebnost spojine v listih *Artemisiae Annuae* je nizka, zaloga rastline, namenjena za raziskovalne namene, pa je omejena. Drugi problem predstavlja dejstvo, da se aktivne komponente med ekstrakcijo sproščajo v medij počasi, kar zniža izkoristek, hkrati pa se zaradi daljšega poteka ekstrahiranj zvišuje njihova cena (Tu, 2017).

⁸ Institute of Chinese Materia Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences.

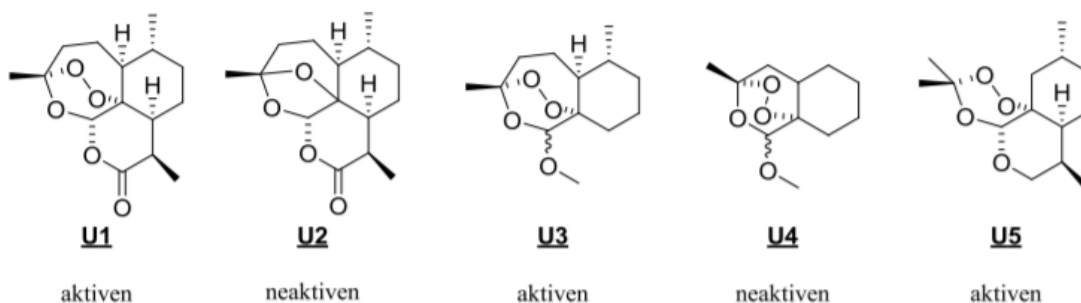
Ekstrakcije z uporabo organskih topil potekajo v ekstraktorju Soxhlet. Kot topilo se lahko izberejo topila z nizko polarnostjo, kot so eter, aceton in petroleter, pri čemer je slednji pokazal najboljše rezultate (Brown, 1994; Klayman, 1984).

Ekstrakcija s pomočjo mikrovalovne pečice (MAE) je relativno nova metoda ekstrahiranja, ki združuje mikrovalovno pečico in tradicionalno ekstrakcijo z organskimi topili. V MAE se ekstrakcija pojavlja kot posledica sprememb celične strukture, ki jo povzročajo mikrovalovi. Uporaba mikrovalov za segrevanje topil in rastlinskih tkiv povečuje kinetiko ekstrakcije, s čimer skrajšamo čas ekstrakcije, zvišamo stopnjo ekstrakcije, zmanjšamo stroške ekstrakcije in porabo topila. Primerjava MAE, superkritične in ekstrakcije po Soxhletu je pokazala, da absolutni etanol ali kloroform nista primerni topili (Hao, 2002).

Superkritična ekstrakcija tekočine (SFE) je postopek ločevanja ene komponente od druge z uporabo superkritičnih tekočin kot ekstrakcijskega topila. Metoda je primerna za ekstrakcijo vzorca, ki se bo kasneje uporabljal v analitične namene, ali pa za odstranitev neželenega materiala iz izdelka. Kot superkritična tekočina se najpogosteje uporablja CO₂. Pogoji ekstrakcije pri uporabi ogljikovega dioksida presegajo kritično temperaturo 31 °C in kritični tlak 74 barov (Knez in Škerget, 2003). Ge (2000) navaja, da lahko hitrost ekstrakcije artemisininina zelo dobro usmerjamo z izbiro prave temperaturne in tlaka.

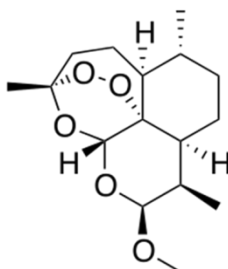
2.2.2.2 DERIVATI ARTEMISININA

Za medicinske namene se uporabljajo trije derivati artemisininina: artemeter, artesunate in dihidroartemisinin. Za njihovo delovanje je odločilna endoperoksidna skupina.



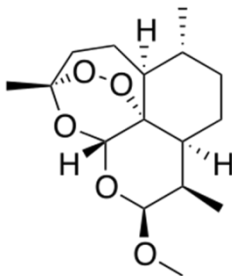
SLIKA 10: BIOLOŠKO AKTIVNI IN NEAKTIVNI ANALOGI ARTEMISININA (STARKL, 2012).

Artemeter



Artemeter je eter, pridobljen iz dihidroartemisina. Spojina je topna v olju, v velikih koncentracijah se nahaja predvsem v arašidovem olju. Aktivno deluje proti okužbam s paraziti vrst *P. vivax* in *P. falciparum*, vročino, ki jo povzroči slednji parazit, pomaga preboleti med tridesetimi in štiriinosemdesetimi urami. Artemeter uspešno deluje tako *in vitro* kot tudi *in vivo* (Kyu, 2009). V organizem se vnese intravenozno. Ker se absorbira zelo počasi, vrh koncentracije v krvi doseže šele v roku šestih ur. Intravenozna terapija z artemetrom sprva zahteva zaužitje 3.2 mg/kg, nato pa dnevno po 1.6 mg/kg. Poteka lahko največ sedem dni oziroma dokler pacient ne more zdravil zaužiti oralno. Kljub temu, da so terapije z artemetrom učinkovitejše od terapij s kininom, je slednji še zmeraj prva izbira. Injekcije artemetra se tako uporabljajo le v primerih, ko se terapija s kvininom odsvetuje ali pa je parazit nanj odporen (White, 2013).

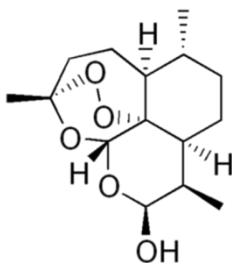
Artesunat



SLIKA 12: SKELETNA FORMULA ARTESUNATA

Artesunat je spojina, topna v vodi, vendar nestabilna v nevtralnih raztopinah. Uporablja se pri zdravljenju hudih oblik malarije, katere povzročitelji so paraziti *P. ovale* in *P. malarie*. Artesunat se največkrat uporablja v kombinaciji z drugimi spojinami. V organizem vstopi intravenozno, vsebina injekcije mora biti pripravljena tik pred uporabo in ne sme biti motna. Pripravi se z dodatkom 5 %-raztopine natrijevega hidrogenkarbonata (za razredčitev se uporablja 5 %-fiziološka raztopina). Zaužije se lahko tudi oralno, sprva 5 mg/kg, nato pa enkrat dnevno 2.5 mg/kg. Snov hidrolizira preden vstopi v krvni obtok (White, 2013). Nevrotoksičnost ni bila opažena, pogost stranski učinek zdravljenja pa je vročina, ki je ne smemo zamešati z vročino, ki je posledica malarije.

Dihidroartemisinin



SLIKA 13: SKELETNA FORMULA DIHIDROARTEMISININA

Dihidroartemisinin je aktiven metabolit, ki se nahaja v artemisininu in v vseh njegovih derivatih, uporablja pa se tudi kot samostojno zdravilo, najpogosteje v kombinaciji s *piperkinom*.

Omenjena kombinacija zdravil je po učinkovitosti enakovredna, v tretji fazi testiranja v Afriki je pokazala celo boljše rezultate kot terapija z artemetrom (White, 2013).

2.2.2.3 UPORABA ARTEMISININA V MEDICINSKE NAMENE

Danes je znano, da artemisinin učinkovito deluje proti vsem okužbam s paraziti rodu *Plasmodium*. Zdravilo je še posebej koristno pri zdravljenju okužb, ki vključujejo parazite, odporne proti klorokinu in kininu. Trenutno potekajo tudi zgodnje faze testiranja artemisinina za zdravljenje rakavih obolenj. Predvideva se, da ko peroksidni lakton pride v stik z visokimi koncentracijami železa v rakastih celicah, postane molekula nestabilna in prične sproščati reaktivne kisikove radikale. Dokazano je bilo, da zmanjša angiogenezo in sproščanje ravnega faktorja v nekaterih tkivnih kulturah (Ferreira, 2007). Artemisinin se lahko zaužije peroralno, intramuskularno ali kot svečka (supozitorij). Najvišjo koncentracijo v krvi doseže nekaj ur po zaužitju. Deluje zelo hitro, tako da število parazitov bliskovito zniža že v prvih nekaj dneh po pričetku zdravljenja. Kot izjemno učinkovit se je izkazal derivat artemisinina, imenovan artesunate, ki ga je mogoče injicirati intravenozno, kar pomeni, da takoj vstopi v krvni obtok. Uporablja se pri zdravljenju cerebralne malarije, akutne oblike bolezni, za katero je značilno hitro širjenje parazitov v možgane in ki povzroči smrt v 72 urah po okužbi, če se pacient ne zdravi⁹.

2.3 OPIS METOD DELA

2.3.1 TESTI ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI SPOJIN

Ker antioksidanti nimajo identičnega mehanizma delovanja, poznamo različne teste za določanje antioksidativnih lastnosti. Ker bomo v nalogi uporabili *in vitro* teste (poskusi v »epruvetah«), se bomo v nadaljevanju osredotočili samo nanje. Huang in sod. (2005) so *in vitro* teste razdelili v naslednje skupine:

1. Testi, ki merijo zmožnost antioksidanta, da odda vodikov atom, so:

- Zmogljivost absorpcije kisikovega radikala.

⁹ Vir: <https://www.britannica.com/science/artemisinin>; pridobljeno 27. 8. 2017.

- Skupni radikalni parameter za zatiranje antioksidantov.
- Preiskava za beljenje s Crocinom.
- Inhibicija oksidacije lipoproteina nizke gostote (zaviranje lipoproteinske oksidacije z nizko gostoto).
- Inhibirana absorpcija kisika.
- Inhibicija oksidacije linolenske kisline.

2. Testi, ki temeljijo na reakcijah prenosa elektrona in merijo stopnjo spremembe barve zaradi reduciranega oksidanta, so:

- Zmogljivost, izražena kot ekvivalent troloksne raztopine.
- Parameter antioksidanta za zniževanje železovega iona.
- Oksidacija bakra (II).
- Vsebnost skupnih fenolov, določenih s Folin-Ciocalteuevim reagentom.
- Določanje antioksidativnega delovanja z 2,2-difenil-1-dipikrilhidrazilom (DPPH).

3. Ostali *in vitro* testi za določanje antioksidativne zmožnosti so:

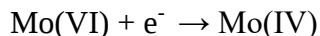
- Inhibicija Briggs-Rauscherjeve oscilirajoče reakcije.
- Merjenje kemiluminiscence.
- Merjenje elektrokemiluminiscence.

Sladki pelin vsebuje fenolne spojine, zato je smiselno izvesti test za vsebnost skupnih fenolov. To je tudi cenovno dostopen analizni postopek, ki je standardiziran in se s posameznimi modifikacijami rutinsko uporablja v laboratorijih (Huang in sod., 2005). Ker pa fenolne spojine verjetno niso edine spojine z antioksidacijsko sposobnostjo, bomo izvedli še DPPH test.

2.3.2 DOLOČANJE VSEBNOSTI SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN S FOLIN-CIOCALTEUJEVIM REAGENTOM

Folin-Ciocalteuev reagent (FCR) se je najprej uporabljal kot indikator za aminokislino tirozin in šele kasneje za analizo skupnih fenolov (Singleton in Rossi, 1965). Sestavljen je iz $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ in $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ kislin, ki v bazičnem okolju reagirata s fenolnimi spojinami. Za doseganje bazičnega pH se običajno uporablja raztopina natrijevega karbonata ($\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$). Bazične

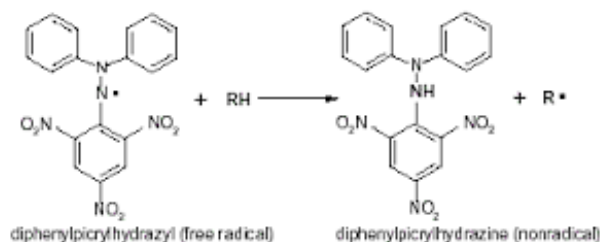
razmere so nujne za disociacijo fenolnega protona, kar vodi v nastanek fenolatnega iona. Ta lahko nato reducira FCR, kar povzroči nastanek modre barve raztopine. Predvideva se, da se znotraj tega kompleksa najlažje reducira molibden Mo(VI) (Huang in sodelavci, 2005).



Vsebnost skupnih fenolov določimo spektrofotometrično z merjenjem absorbance nastalega modrega kompleksa pri valovni dolžini 760 nm. Umeritvena krivulja se največkrat naredi z galno kislino, zato se vsebnost skupnih fenolov izraža kot ekvivalent galne kisline na ustrezno prostornino vzorca.

2.3.3 UPORABA RADIKALA DPPH[•] (2,2-DIFENIL-1-DIPIKRILHIDRAZILA) ZA DOLOČITEV ANTIOKSIDACIJSKIH LASTNOSTI

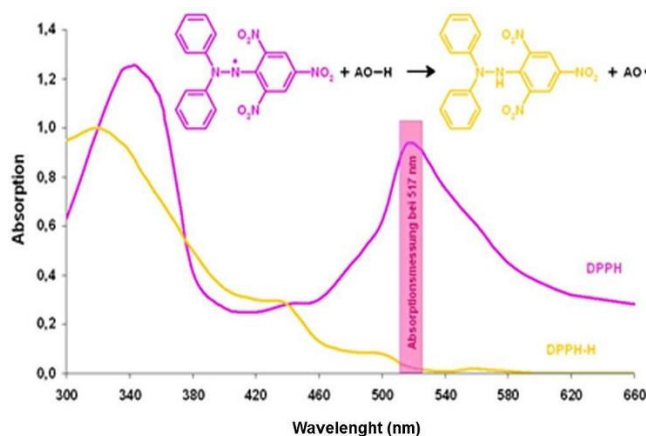
DPPH[•] je eden izmed stabilnejših in komercialno dostopnejših organskih dušikovih radikalov. Barva metanolne raztopine DPPH[•] je vijolična in ima absorpcijski maksimum pri 515 nm. Ko antioksidanti reagirajo z DPPH[•] radikali (po mehanizmu prenosa elektrona), nastane produkt difenildipikrilhidrazin – DPPH₂. To lahko opazimo kot spremembo barve raztopine, ki variira od vijolične do svetlo rumene, odvisno od tega, koliko DPPH-ja se je reduciralo (Škerget, 2012; Huang in sod., 2005).



SLIKA 14: Struktura DPPH pred in po reakciji z antioksidantom (Huang s sod., 2005)

Hitrost in s tem tudi učinkovitost lahko spremljamo s spremembo absorbance pri valovni dolžini z največjo absorbcijo (λ_{max}). Ob prisotnosti reducentov (antioksidantov) absorbanca po času

pada. Čeprav je radikal stabilen, ga pred uporabo hranimo v hladilniku in pazimo, da reagenčne stekleničke po nepotrebnem ne izpostavimo dnevni svetlobi.



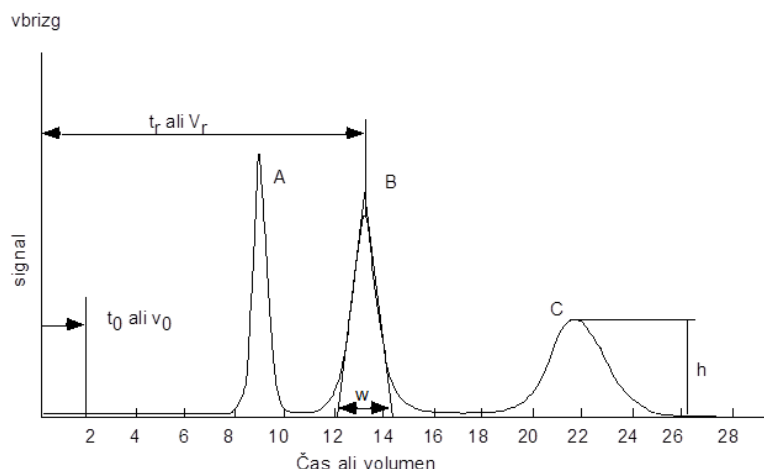
SLIKA 15: Spremembe v absorpcijskem spektru (od vijolične do rumene) v reakcijah DPPH z radikali reducenti

2.3.4 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI – HPLC

HPLC (High Pressure Liquid Chromatography oz. High Performance Liquid Chromatography) uporabljamo za kvalitativno in kvantitativno določitev in ločitev organskih spojin. S HPLC sistemom določamo retenzijske čase in s pomočjo umeritvene krivulje koncentracije enostavnih organskih spojin. Standardne vzorce visoke čistoče pripravimo v ustreznih koncentracijah tik pred meritvijo (Snyder s sod., 2012).

Proces ločitve na kromatografski koloni lahko opišemo z različnimi parametri: čas zadrževanja (retenzija) komponente na koloni (t_R), z ustreznim retenzijskim volumnom (V_R) mobilne faze, ki je potreben, da se komponenta eluira iz kolone, s številom teoretskih podov, ki ponazarjajo zmogljivost kolone (N), kapacitivnostjo ali porazdelitvenim razmerjem kolone (k') in njeno selektivnostjo (α). Vzrok zadrževanju določene komponente na koloni je porazdelitev topljenca med stacionarno in mobilno fazo (Agilent, 2016).

Retenzijski čas (t_R) komponente je čas, ki ga ta potrebuje za potovanje od injektorja do detektorja skozi kromatografsko kolono in je ob danih kromatografskih pogojih za posamezno substanco specifičen (Snyder s sod., 2012). (Glej sliko 16.)



SLIKA 16: ZNAČILEN KROMATOGRAM VEČKOMPONENTNE MEŠANICE

t_0 je čas, ki je potreben za prehod mobilne faze. Iz vrednosti za t_0 in t_r v kromatogramu lahko dobimo ustrezne volumne, če poznamo pretok q (ml/min), in sicer:

$$V_R = qt_r$$

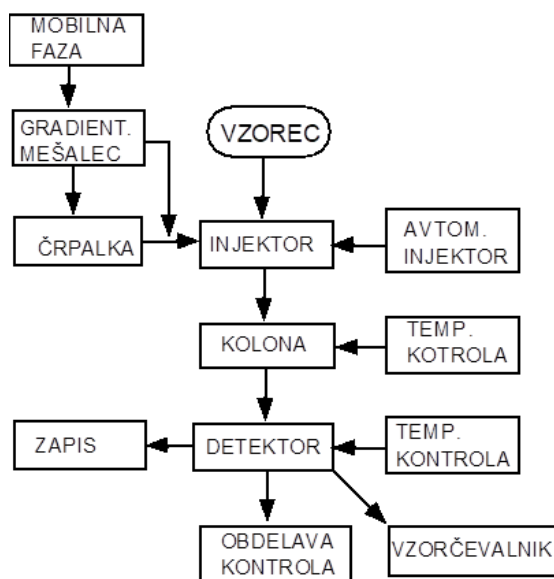
$$V_M = qt_0,$$

kjer je:

- V_R retenzijski volumen in
- $V_M = V_0$ intersticijski volumen mobilne faze ('void volume', 'dead volume').

V_0 dejansko predstavlja skupni volumen mobilne faze v koloni v slehernem trenutku (vključno z volumni injektorskega dela, priključkov in detektorja), medtem ko je V_R volumen mobilne faze, ki je potreben, da določeno komponento "izperemo" (eluiramo) iz stacionarne faze (Kolar, 2016).

Pri HPLC-ju je bistvenega pomena izbira stacionarne in mobilne faze. Sestavo (polarnost) mobilne faze lahko med separacijo tudi programirano spreminjamo. Ta način imenujemo gradientno izpiranje za razliko od izokratskega izpiranja, pri katerem ostane polarnost mobilne faze (lahko tudi večkomponentna) v času ločitve nespremenjena. Osnovne komponente HPLC sistema so: razervoar z mobilno fazo, črpalka, injektor, kolona z detektorjem in rekorder (Zabukovec, 2014). (Glej sliko 17.)



SLIKA 17: SHEMA HPLC SISTEMA (ZABUKOVEC, 2014)

Sestava mobilne faze je pri HPLC-ju bistvenega pomena za ločitev komponent v zmesi. Mobilna faza ne sme vplivati na lastnost kolone, topiti mora vzorec, kompatibilna mora biti z detektorjem (čista) in imeti mora nizko viskoznost (Synder s sod., 2012).

Značilna topila, ki jih upotabljamo kot mobilne faze v HPLC-ju, so po Zabukovčevi (2014) naslednja :

- ADSORPCIJA/PORAZDELITEV: heksan, metilenklorid, kloroform, metanol, acetonitril.
- REVERZNA FAZA: metanol/voda, acetonitril/voda, reagenti z ionskimi pari.
- IONSKA IZMENJAVA: vodne puferske raztopine.
- IZLOČITVENA KROMATOGRAFIJA: tetrahidrofuran, kloroform.

3 EMPIRIČNI DEL

Celoten potek praktičnega dela je prikazan na organigramu 1.



ORGANIGRAM 1: PRIKAZ POTEKA PRAKTIČNEGA DELA

3.1 PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA

Rastlinski material sladkega pelina *Artemisia annua* L. na slovenskem trgu ni dostopen, zato je bil naročen s Kitajske. Uporabljeni so bili listi in oleseneli deli, ki so bili pred uporabo shranjeni v hladilnici. Surov vzorec je bil sestavljen iz vijolično rjavih gladkih stebel in bazalnih listov. Dobavitelj vzorca je bilo podjetje Health Biochem Technology CO, LTD.

Za doseganje večjih izkoristkov ekstrakcij po Soxhletu je bil rastlinski material pred uporabo liofiliziran s tekočim dušikom. Zamrznjena voda v rastlinskem materialu sublimira in prispeva k

temu, da zaradi segrevanja in posledičnega hlapenja snovi med mletjem ne prihaja do izgub.¹⁰ Liofiliziran material smo nato zmleli s kavnim mlinčkom. Na ta način smo bistveno povečali prehodnost snovi skozi celične stene rastlin in s tem vplivali na večji izkoristek ekstrakcije. Dodatno je k temu prispevala odločitev, da bomo kot glavno metodo ekstrakcije uporabili superkritični CO₂, kjer vsebnost vlage bistveno zniža izkoristek ekstrakcije.



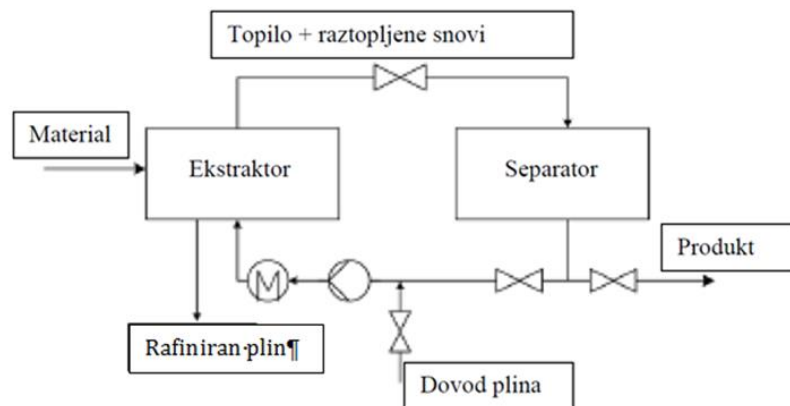
SLIKA 18: PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA

3.2 EKSTRAKCIJA S SUPERKRITIČNIM CO₂

Ekstrakcija iz trdnih delcev s superkritičnimi tekočinami (fluidi) – SFC je ena najpogostejših aplikacij superkritičnih tekočin, zato ni presenetljivo, da je ekstrakcija s superkritičnim CO₂ v zadnjih dvajsetih letih eden najbolj uveljavljenih industrijskih procesov za pridobivanje naravnih produktov visokih vrednosti. Z njo pridobivamo ekstrakte hmelja, brezkoфеinsko kavo in čaj, zeliščne in začimbne ekstrakte ter številne ekstrakte zdravilnih zelišč. CO₂ je zelo selektivno topilo za nepolarne oz. lipofilne snovi, zato ga ne moremo uporabiti za ekstrakcijo biomase z visokim deležem vlage. Posledično morajo biti surovi materiali pred ekstrakcijo posušeni in zmleti. Sušenje in mletje imata izjemno velik vpliv na končni izkoristek (maso ekstrakta), saj znižata razgradnjo ekstrakta (Catchpole et al., 2012).

Naprava, ki smo jo uporabili za ekstrakcijo *Artemisia annua* L. s superkritičnim CO₂, je imela eno ekstrakcijsko komoro ter dva separatorja (slika 19).

¹⁰ Liofilizacija ali sušenje z zamrzovanjem je postopek, s katerim se odstrani voda iz bioloških in organskih snovi, ki bi jih s segrevanjem poškodovali, hkrati pa se ohranjata njihova struktura in sestava. Čeprav je postopek energetsko potratnejši kot konvencionalno sušenje, se v praksi uporablja za občutljive produkte.



SLIKA 19: PROCES EKSTRAKCIJE S SUPERKRITIČNIMI FLUIDI IZ TRDNEGA MATERIALA (POVZETO PO DANIELSKEM, 2007)

Ekstrakcija se izvaja s konstantnim stikom med trdno matrico (rastlinskim materialom) in topilom (SCF). Trden material je naložen v ekstraktor, skozi katerega teče superkritičen fluid, ki omogoča raztapljanje zaželenih snovi (Danielski, 2007).

3.2.1 IZVEDBA EKSTRAKCIJE S SUPEKRITIČNIM CO₂

Prva ekstrakcija, pri kateri je bila količina vhodnega materiala 390 gramov (± 1 g), je potekala 2 uri in 30 minut pri tlaku 300 barov (± 0.1 bar) in temperaturi 35 °C (± 1 °C). Ekstrakt, ki smo ga pridobili, je označen z V₃.

Druga ekstrakcija s 682 (± 1 g) grami vhodnega materiala je potekala 2 uri pri tlaku 200 barov (± 0.1 bar) in temperaturi 50 °C (± 1 °C). Ekstrakt, ki smo ga pridobili, je označen z V₄.

Po končanih ekstrakcijah je bil produkt postrgan iz separatorja, stehtan in shranjen v temnih reagenčnih stekleničkah v hladilniku pri 6 °C. S tem smo preprečili izhlapevanje eteričnih olj in ohranili zgradbo ekstrakta do nadaljnjih testiranj.



SLIKA 20: EKSTRAKT V SEPARATORJU

3.3 EKSTRAKCIJA PO SOXHLETU

Vzporedno smo izvajali dve ekstrakciji po Soxhletu, in to z dvema različnima topiloma, ki sta se med seboj razlikovala po polarnosti:

- petroleter; dipolni moment $\approx 0,00$ D (Polarity index, 2018);¹¹
- metanol; dipolni moment $\approx 1,69$ D (National Center for Biotechnology Information, 2017).¹²

V obeh primerih smo aparaturi prekrili z aluminijevo folijo, da ni prišlo do nepotrebnih toplotnih izgub, obenem pa smo s tem preprečili kondenzacijo vzorca. Ekstrakcijsko topilo smo v bučki segrevali z grelno ploščo. Pare topila so potovale v ekstraktor s tulcem iz filtrirnega papirja, ki je bil pokrit z vato in v katerem je bil rastlinski material, ter se nato utekočinile v hladilniku. Kondenzat je kapljal na trdno zmes v tulcu, pri čemer je nastala raztopina spojin, ki smo jih ekstrahirali. Ko je raztopina napolnila nastavek do višine odtoka, je po principu natege stekla nazaj v bučko in postopek se je ponovil. Ekstrahirane spojine so se nabirale v bučki, v tulcu pa so

¹¹ Vir: <http://macro.lsu.edu/howto/solvents/Polarity%20index.htm>; pridobljeno 5. 1. 2018.

¹² Vir: "Methanol". The PubChemProject. USA: National Center for Biotechnology Information, 2017; pridobljeno 5. 1. 2018.

ostale netopne sestavine prvotne zmesi, Ko smo končali ekstrakcije, smo z uporabo rotavaporja Buechi R-114 iz ekstrakta odstranili topilo. Rotavapor je deloval pri 40 °C ter 445 obratov/min.



SLIKA 21: EKSTRAKCIJA PO SOXHLETU



SLIKA 22: UPARJANJE TOPILA Z ROTAVAPORJEM

3.3.1 EKSTRAKCIJA PO SOXHLETU S PETROLETROM

Ekstrakcija je potekla pri 65 °C. Po preteku 20 ciklov je bila zaustavljena. Ko smo odstranili topilo, smo ekstrakt označili kot V₂.

PREGLEDNICA 2: ČASI RECIKLOV PRI EKSTRAKCIJI PO SOXHLETU S PETROLETROM

Število nateg (reciklov)	Čas natege (recikla)/min ($\pm 0,01$)
1.	0,00
2.	4,56
3.	3,58
4.	4,49
5.	4,24
6.	4,58
7.	5,11
8.	4,25
9.	4,29
10.	7,32
11.	11,38

Število nateg (reciklov)	Čas natege (recikla)/min ($\pm 0,01$)
12.	5,21
13.	11,02
14.	06,22
15.	9,07
16.	7,12
17.	11,21
18.	11,29
19.	13,55
20.	10,56
21.	4,12

3.3.2 EKSTRAKCIJA PO SOXHLETU Z METANOLOM

Pri ekstrakciji z metanolom je bilo izvedenih 10 nateg (reciklov) pri temperaturi 40 °C. Vzorec, ekstrahiran z metanolom je v nadaljevanju označen z 'V1'.

PREGLEDNICA 3: ČASI RECIKLOV PRI EKSTRAKCIJI PO SOXHLETU Z METANOLOM

Število nateg	Čas natege (min) ± 0,01 min
1.	0,00
2.	12,04
3.	11,86
4.	11,83
5.	12,33

Število nateg	Čas natege (min) ± 0,01 min
6.	23,56
7.	11,376
8.	12,21
9.	11,55
10.	10,12
11.	11,08

3.4 ANTIOKSIDACIJSKA UČINKOVITOST EKSTRAKTOV

Ekstrakti so bili do časa, ko smo analizirali vsebnost skupnih fenolov (*Total Phenol Content* – TPC) ter antioksidativne učinkovitosti z DPPH[•] Testom, shranjeni v zamrzovalniku. Metoda TPC je bila povzeta po literaturi (Škerget in sodelavci, 2012) in je temeljila na modifikaciji metode Singletona in Rossija (1965).

Test DPPH[•] je sledil postopku, opisanem v literaturi (Masuda, 1999), ki teče tako:

V 100 mL merilno bučko smo zatehtali 0.0400 (± 0.0001) g DPPH, ga raztopili v 10 mL metanola (Merck, > 98 %) in nato do oznake dopolnili s topilom. Raztopina je bila močno vijolično obarvana.

VIS spekter DPPH je bil posnet z Vernierjevim spektrometrom (SpectroVIS plus), ki v območju okoli 500 nm meri z natančnostjo ± 5 nm; natančnost meritev absorbance je ± 13 %.

Najprej smo določili valovno dolžino, pri kateri je absorbanca najvišja ($\lambda_{\max}$). Pri tej valovni dolžini smo določili antioksidativno učinkovitost ekstraktov s pomočjo spodnje enačbe (Yen in Duh, 1994; Marković, Talić, 2013):

$$\% \text{ antioksidacijska učinkovitost (inhibicija)} = \frac{(A^{\circ} - A')}{A^{\circ}} \cdot 100,$$

kjer je:

A° ... absorbanca metanolne raztopine, ki je služila kot kontrola;

A' ... absorbanca ekstraktov po 5-minutnih časovnih intervalih (5, 10, 15, 20, 25 in 30 min).

0.500 mL ekstrakta smo z avtomatsko pipeto (± 0.008 mL) prenesli v kivete ter dodali 2.500 mL DPPH. Kot kontrolno smo namesto ekstrakta uporabili 50 μ L metanola. Meritve smo opravljali v časovnih intervalih 0, 5, 10, 15 in 30 minut.

3.5 DOLOČANJE SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN V EKSTRAKTIH

Kemikalije:

- Folin-Ciocalteujev reagent (FCR) (Merck, > 99,9 %),
- natrijev (V) karbonat (Na_2CO_3) (Kemika Zagreb, p.a.),
- galna kislina (GA) (Merck, > 98 %).

Laboratorijska oprema:

- merilne bučke: 10 mL ($\pm 0,01$ mL),
- stekleničke: 10 mL,
- avtomatska pipeta (5 mL ± 0.001 mL) in mikropipeta (100 μ L $\pm 0,8$ μ L),
- spatula,
- analitska tehtnica ($\pm 0,00001$ g) proizvajalca Mettler Toledo,
- UV-VIS spektrofotometer (Vernier SpectroVIS plus).

Reagenti:

- FCR-raztopina: FCR razredčen z Mili-Q vodo v razmerju 1 : 3,

- 20 % Na_2CO_3 raztopina,
- osnovna raztopina galne kisline s koncentracijo 0,8000 g/L-1. Priprava: 0,8000 g ($\pm 0,0001$ g) 98 % galne kisline smo zatehtali v 100 mL merilno bučko in do oznake dodali deionizirano vodo. Delež zreagirane zmesi lahko ugotovimo iz sprememb absorbance pri 754 nm (Francetič, 2006, povzeto po Zoecklein, 1995).

3.5.1 UMERITVENA PREMICA Z GALNO KISLINO

V štiri 10 mL merilne bučke smo s pomočjo 10.00 mL pipete (± 0.06) odpipetirali sledeče volumne osnovne raztopine galne kisline: 2.50 mL, 3.75 mL, 5.00 mL in 7.50 mL ter do meniska dopolnili bučke z deionizirano vodo in dobro premešali. Tako smo pripravili standardne raztopine naslednjih koncentracij:

PREGLEDNICA 4: KONCENTRACIJE STANDARDNIH RAZTOPIN GALNE KISLINE

Standardna raztopina	Koncentracija GA (mg/L)
1	200
2	300
3	400
4	600
5	800

V 100 mL merilne bučke smo s pomočjo mikropipete (± 0.008 mL) dodali 1.000 mL GA-raztopine ter s pomočjo birete še 5.00 mL FCR-raztopine in po 5–8 minutah 15.00 mL 20 %-raztopine Na_2CO_3 . Vsebino smo pretresli in do 100 mL dopolnili z deionizirano vodo. Nato smo bučke ovili z Al-folijo in jih 120 min pustili na sobni temperaturi. Sledila je meritev absorbance pri 754 nm.¹³ Na osnovi teh meritev smo izrisali graf (*Abs*) v odvisnosti od koncentracije GA (mg/L) (γ_{GAC}). Na osnovi grafa smo izračunali enačbo premice, s katero smo nato izračunali

¹³ To je valovna dolžina, pri kateri je spektrometer kazal najvišjo absorbanco. Literatura sicer navaja 760 nm. Proizvajalec opreme navaja, da je natančnost meritev v tem območju ± 7 nm, zato smo predvidevali, da izbira λ_{max} pri 754 nm ne bo vplivala na natančnost rezultatov.

vsebnost skupnih fenolnih spojin v ekstraktih, izraženo kot ekvivalent galne kisline/L (mgEGK/L).

3.5.2 DOLOČANJE VSEBNOSTI SKUPNIH FENOLOV V EKSTRAKTIH

Določanje vsebnosti skupnih fenolov v ekstraktih je potekalo po istem postopku, kot je opisano za galno kislino. V 100 mL bučke smo odmerili 1.00 mL ekstrakta, dodali približno 60 mL deionizirane vode, z bireto smo nato dodali 5.00 mL Folin-Ciocalteujevega reagenta (redčenje 1 : 3) in v časovnem intervalu med 30 sekund do 8 minut dodali še 15.00 mL 20 %-raztopine Na_2CO_3 . Raztopino smo premešali, dopolnili do oznake z deionizirano vodo in pustili stati na sobni temperaturi 2 uri. Nato smo raztopino ponovno premešali, nalili v kivete in izmerili njihovo absorbanco pri valovni dolžini 754 nm. Izmerili smo tudi absorbanco kontrolne raztopine, ki je bila pripravljena po enakem postopku, vendar brez dodatka vzorca.

3.6 HPLC ANALIZA VZORCEV

V štiri 25 mL bučke smo natehtali vzorec ekstraktov, kot je prikazano v preglednici 5.

PREGLEDNICA 5: MASE EKSTRAKTOV ZA PRIPRAVO RAZTOPINE ZA HPLC ANALIZO

Vzorec	Masa (mg) $\pm$ 0.01
V ₁	51,62
V ₂	18,24
V ₃	51,19
V ₄	11,82

Nato smo bučke do oznake napolnili z metanolom, jih pretresli in za 10 minut pustili v ultrazvočni kopeli, kjer se je ekstrakt dokončno raztopil v topilu. Raztopino smo nato prefiltrirali v dvo-mililitrske vialke. Kot mobilno fazo smo uporabili metanol. Za ločitev smo uporabili aparat Agilent 1200 HPLC s kvarterno črpalko (najvišji tlak 400 barov), avtomatskim vzorčevalnikom ter termostatom (najvišja temperatura 80 °C). Kot detektor smo uporabili masni spektrofotometer. Za analizo vzorca smo uporabili vir ionizacijske tehnologije Agilent JetStream. Napravo je kontrolirala programska oprema Agilent MassHunter Workstation, različica 6.0, s katero je bila izvedena kvalifikacija in kvantifikacija izbranih fenolov.

4 REZULTATI MERITEV

4.1 IZKORISTKI EKSTRAKCIJ

PREGLEDNICA 6: MASE EKSTRAKTOV, PRIDOBLENIH S SUPERKRITIČNIM CO₂

Separator	Masa ekstrakta (g ± 0.001 g)
Separator 1 (T= 35 °C)	7.740
Separator 2 (T= 50 °C)	15.370

PREGLEDNICA 7: MASA PRODUKTA, PRIDOBLENEGA Z EKSTRAKCIJO PO SOXHLETU PO ODSTRANITVI TOPILA (PETROLETRA)

Masa vhodnega materiala (g ± 0.001 g)	Masa ekstrakta (g ± 0.001 g)
5.028	0.0261

PREGLEDNICA 8: MASA PRODUKTA, PRIDOBLENEGA Z EKSTRAKCIJO PO SOXHLETU PO ODSTRANITVI TOPILA (METANOLA)

Masa vhodnega materiala (g ± 0.001 g)	Masa ekstrakta (g ± 0.001 g)
5.081	0.3866

Izkoristek ekstrakcije, izražen v odstotkih, je bil izračunan po naslednji formuli:

$$\% \text{ izkoristek} = \frac{\text{masa ekstrakta (g)}}{\text{masa liofiliziranega materiala (g)}} \times 100$$

Ekstrakciji z metanolom in petroletrom sta potekali istočasno in se istočasno tudi zaključili. Prva razlika je bila v številu nateg (reciklov), in sicer jih je pri ekstrakciji s petroletrom poteklo 21, torej 10 več kot pri ekstrakciji z metanolom, kar je glede na parni tlak topila pričakovano. Po končanih ekstrakcijah smo z uporabo rotavaporja iz ekstrakta odstranili topilo, nato smo vzorce prepihali z dušikom ter tako odstranili odvečno tekočino, ki je evaporirala. Trden vzorec smo stehtali in izračunali izkoristek ekstrakcije.

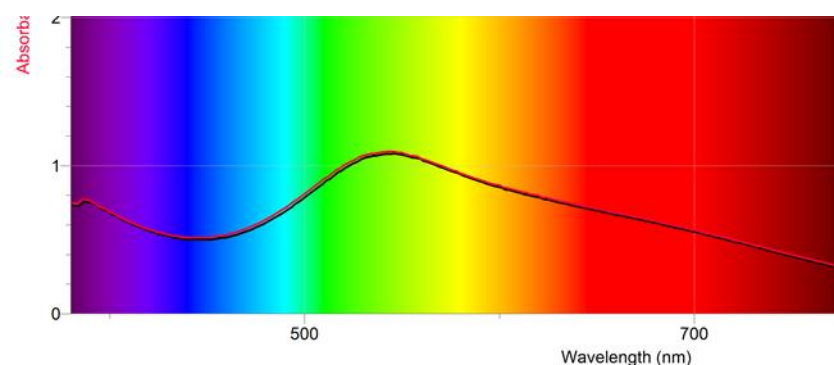
PREGLEDNICA 9: PRIMERJAVA IZKORISTKOV EKSTRAKCIJ

Ekstrakt	Izkoristek (%)
V ₁ (z metanolom)	7.61
V ₂ (s petroletrom)	0.52
V ₃ (separator 1)	1.98
V ₄ (separator 2)	2.25

Kot vidimo iz preglednice 9, je izkoristek pri ekstrakciji z metanolom (ekstrakciji po Soxhletu) v primerjavi z ekstrakcijo s petroletrom bistveno višji. Rezultat sovпада s podatki, ki jih navaja Iqbal s sod. (2012). Avtor trdi, da so izkoristki ekstrakcij vedno višji, če uporabljamo bolj polarna topila, pri čemer je metanol boljša izbira kot voda. Metanol je bil v naši raziskavi izbran z namenom:

1. da ekstrahiramo čim večjo količino fenolnih spojin;
2. ker so v metanolu dobro topne tudi nizko polarne spojine, smo pričakovali, da se bo ekstrahiralo tudi artemisinin.

4.2 ANTIOKSIDACIJSKA UČINKOVITOST EKSTRAKTOV



GRAF 1: VIS SPEKTER 4.0M RAZTOPINE DPPH

Iz spektra DPPH smo kot valovno dolžino z najvišjo absorbanco določili λ pri 515 nm.

V preglednici 10 so zbrani podatki sprememb absorbancc DPPH po dodatku 50 μ L ekstraktov. Kot kontrolo smo uporabili DPPH in metanol.

PREGLEDNICA 10: ANTIOKSIDACIJSKA UČINKOVITOST EKSTRAKTOV

Čas/min ($\pm 0,5$)	0	5	10	15	30
Vzorec ekstrakta					
V₁	0.950	0.935	0.790	0.777	0.770
V₂	0.950	0.950	0.900	0.855	0.810
V₃	0.950	0.860	0.810	0.720	0.700
V₄	0.950	0.700	0.650	0.535	0.520
Kontrola	0.950	0.950	0.951	0.950	0.945

Odstotek inhibicije po času je bil za V₁ po 10 min izračunan kot:

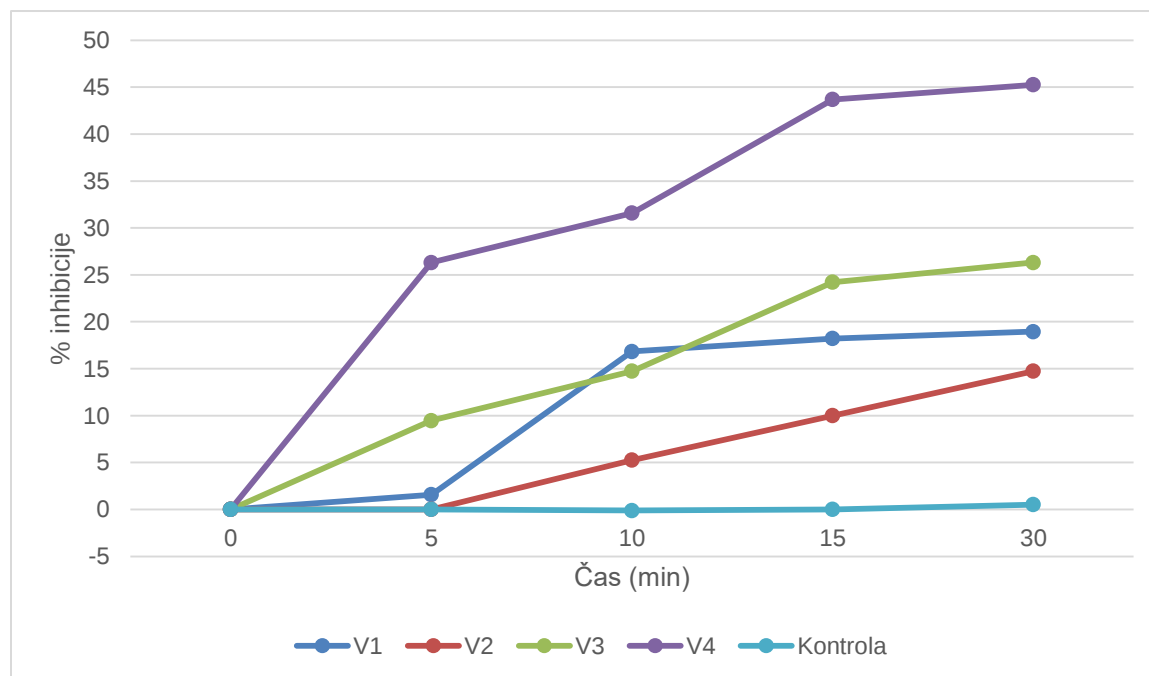
$$AOU(\%) = \frac{(0.950 - 0.790)}{0.950} \cdot 100$$

Rezultati izračunov so zbrani v preglednici 11, graf 2 pa prikazuje odstotek inhibicije DPPH v odvisnosti od časa.

PREGLEDNICA 11: % INHIBICIJE DPPH ZARADI DELOVANJA EKSTRAKTOV SLADKEGA PELINA

	% inhibicije DPPH			
Čas (min) Ekstrakt	5	10	15	30
V ₁	1,58	16,84	18,21	18,95
V ₂	0,00	5,26	10,00	14,74
V ₃	9,47	14,74	24,21	26,32
V ₄	26,32	31,58	43,68	45,26
Kontrola	0	- 0,10	0	0.53

GRAF 2: % INHIBICIJE DPPH V ODVISNOSTI OD ČASA



Podatki iz preglednice 11 in grafa 2 kažejo, da smo največ snovi z antioksidacijskim učinkom ekstrahirali pri uporabi metanola in s klasično ekstrakcijo po Soxhletu. Sledi ekstrakt, pridobljen s SFC pri tlaku 300 barov in 35 °C. Najmanj snovi z antioksidacijsko učinkovitostjo je bilo v ekstraktu, kjer smo kot topilo uporabili petroleter.

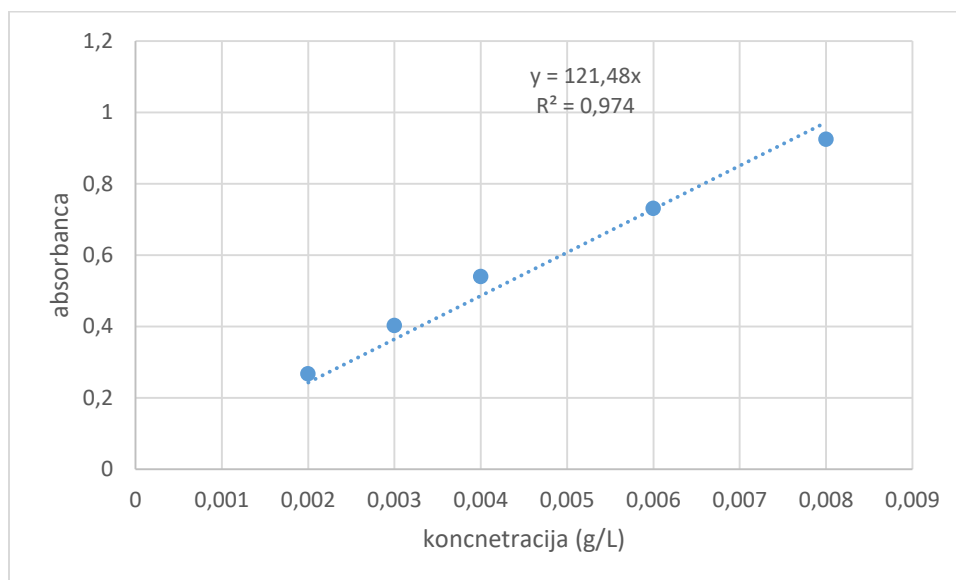
4.3 VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN V EKSTRAKTIH *ARTEMISIE ANNUE L.*

Izmerjeno absorbanco standardnih raztopin galne kisline pri λ_{754} prikazujemo v preglednici 12, z grafom 3 pa odvisnost absorbance vzorcev galne kisline od njihove koncentracije.

PREGLEDNICA 12: ABSORBANCA STANDARDNIH RAZTOPIN GALNE KISLINE PRI λ_{754} NM

Koncentracija (mg GA/mL)	Absorbanca pri λ_{754} nm ($\pm 13\%$)
0.002	0.266 ($\pm 0,035$)
0.004	0.539 ($\pm 0,070$)
0.008	0.924 ($\pm 0,120$)
0.003	0.403 ($\pm 0,052$)
0.006	0.730 ($\pm 0,095$)

GRAF 3: UMERITVENA PREMICA Z GALNO KISLINO



Korelacijski faktor (R^2) je 0.974, kar je dovolj visoko za natančno določitev vsebnosti fenolnih spojin v ekstraktih (mgGAE/L). Za izračun vsebnosti fenolnih spojin v ekstraktih smo uporabili

enačbo premice $y = 121,48x$, kjer y predstavlja absorbanco in x koncentracijo. Iz tega sledi izračun koncentracije skupnih fenolnih spojin v ekstraktih:

$$\text{koncentracija (gGAE/L)} = \frac{A}{121,48}$$

Preglednica 13 prikazuje absorbanco vzorcev ekstraktov pri λ_{754} .

PREGLEDNICA 13: ABSORBANCA VZORCEV PRI $\lambda_{754\text{NM}}$

Vzorec	Absorbanca pri $\lambda_{754\text{ nm}}$ ($\pm 13\%$)
V ₁	0.126 ($\pm 0,016$)
V ₂	0.092 ($\pm 0,012$)
V ₃	0.246 ($\pm 0,032$)
V ₄	0.322 ($\pm 0,042$)

Primer izračuna koncentracije skupnih fenolnih spojin v ekstraktu V₁:

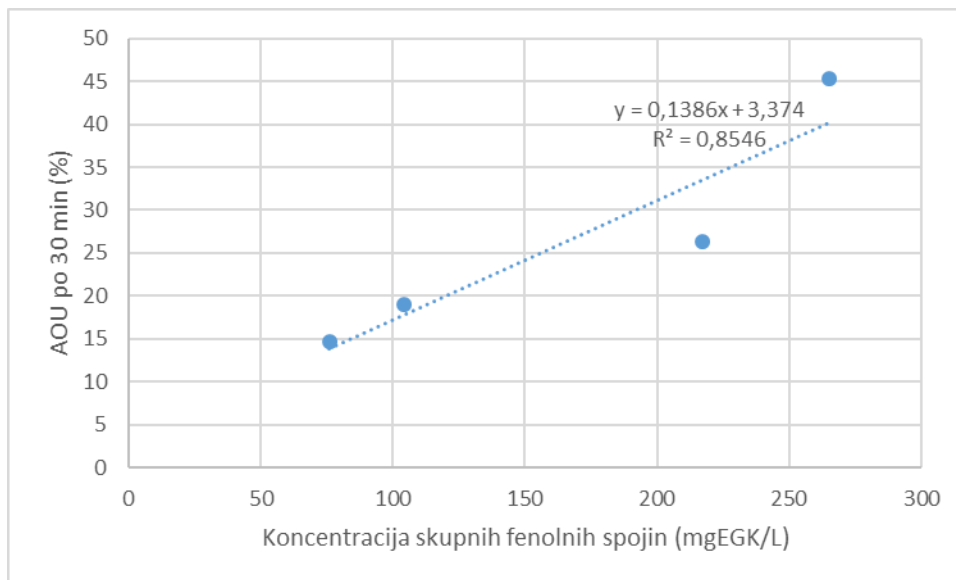
$$\text{koncentracija (gGAE/L)} = \frac{0.126}{121,48}$$

PREGLEDNICA 14: KONCENTRACIJA SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN

Vzorec	Koncentracija skupnih fenolnih spojin kot mgEGK/L
V ₁	104 ($\pm 13,5$)
V ₂	76 ($\pm 9,88$)
V ₃	217 ($\pm 28,21$)
V ₄	265 ($\pm 34,45$)

Koncentracija skupnih fenolnih spojin, izraženih v mg EGK/L, pokaže, da so ekstrakti, pridobljeni s SFC-metodo precej bogatejši kot ekstrakti, pridobljeni z ekstrakcijo po Soxhletu. Najnižjo vsebnost fenolnih spojin smo zabeležili pri ekstraktu, pridobljenem s petroletrom, najvišjo pa pri ekstraktu, kjer so bili pogoji za SFC tlak 200 barov (± 0.1 bar) in temperatura 50 °C (± 1 °C). Pri pogojih 300 barov (± 0.1 bar) in temperaturi 35°C (± 1 °C) je delež skupnih fenolnih spojin za približno 20 % nižji. Da bi preverili, kolikšna je korelacija med skupnimi fenolnimi spojinami in antioksidacijsko učinkovitostjo, ki jo te izkazujejo, smo izrisali graf % inhibicije DPPH proti koncentraciji skupnih fenolov, izraženih kot mgEGK/L (glej graf 4). Za izračun korelacije med antioksidacijsko učinkovitostjo in koncentracijo skupnih vsebnosti fenolnih spojin smo uporabili enačbo $r = \sqrt{R^2}$.

GRAF 4: ODVISNOST MED KONCENTRACIJO SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN IN AOU PO 30 MIN



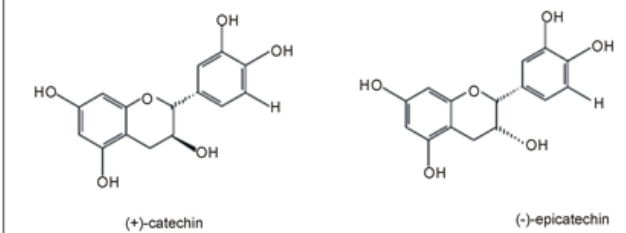
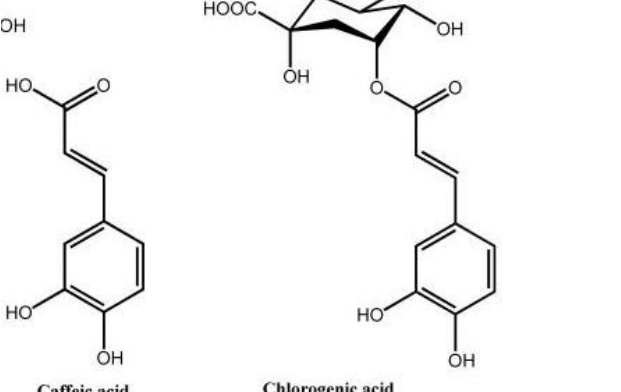
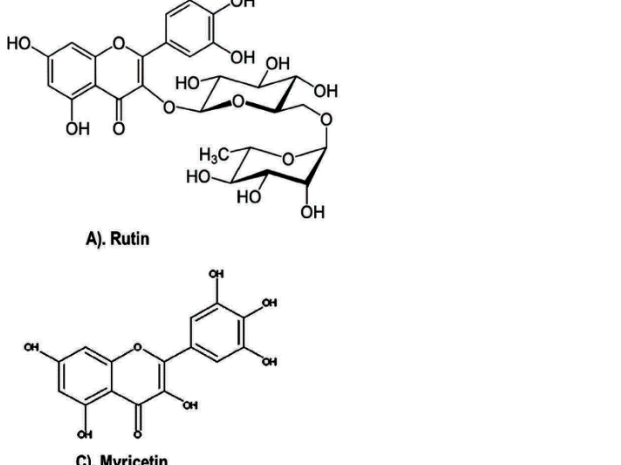
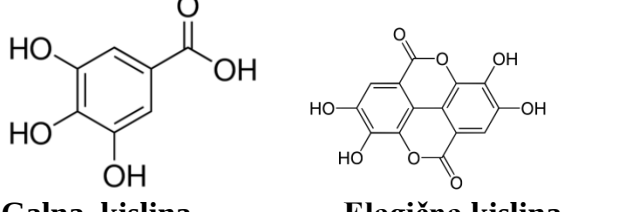
Korelacijski faktor (R^2) je 0.8546. (korelacija) $r = 92,4$

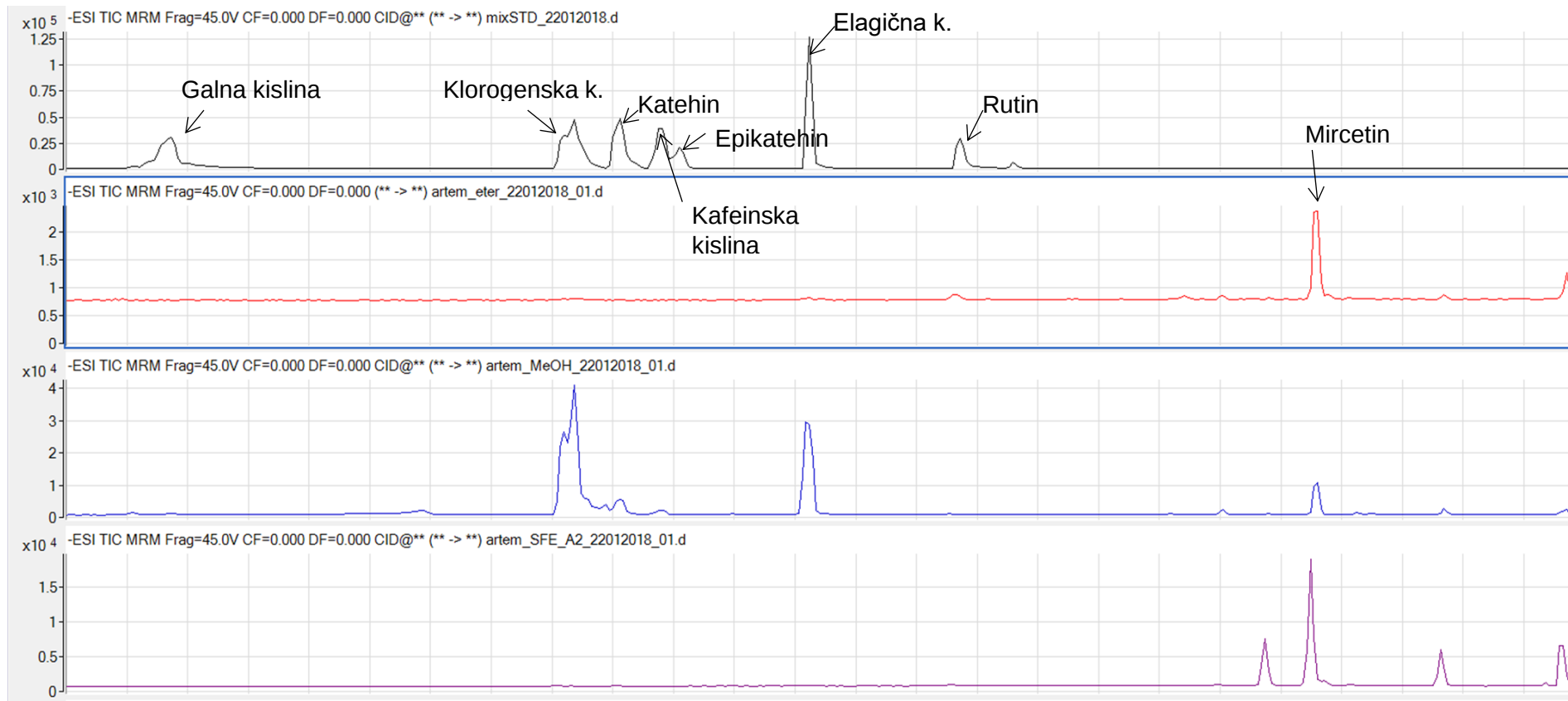
Zelo visoka korelacija med deležem fenolov in antioksidacijsko učinkovitostjo govori v prid hipotezi, da so za antioksidacijske lastnosti ekstraktov *Artemisie annue* L. v glavnem odgovorne fenolne spojine. Sovpadanje je zelo veliko pri klasični ekstrakciji po Soxhletu in precej manjše pri ekstrakciji s SFC-jem.

4.4 HPLC ANALIZA VZORCEV

S kromatografijo visoke ločljivosti smo dobili vpogled v sestavo ekstraktov. Analizirali smo jih glede na sledeče komponente: kavna kislina, katehin, epikatehin, klorogena kislina, elagična kislina, miricetin, galna kislina in rutin. Vse so predstavljene v preglednici 15, rezultati HPLC analize pa v grafu 5.

PREGLEDNICA 15: FENOLNE SPOJINE V EKSTRAKTIH SLADKEGA PELINA

Strukturne formule fenolnih spojin, najdenih v ekstraktih sladkega pelina	Vir slik:
 (+)-catechin (-)-epicatechin	Ramalho s sod., 2014
 Caffeic acid Chlorogenic acid	Nardini, 2002
 A). Rutin C). Myricetin	Kaliyaperumal, 2013
 Galna kislina Elagična kislina	PubChem, 2018



GRAF 5: KROMATOGRAMI HPLC ANALIZE (od zgoraj navzdol: V₁, V₂, V₃ in V₄).

Iz retenzijskih časov (x-os) lahko vidimo, da se je izločilo različno število spojin: največ v metanolnem ekstraktu, najmanj v petroletersem ekstraktu. Ekstrakta, pridobljena s SFC-ekstrakcijo, se precej razlikujeta v sestavi, zato tudi rezultati spektrofotometričnih raziskav (DPPH test in vsebnost skupnih fenolnih spojin) niso bili podobni. Ker artemisininina kot standarda nismo imeli, smo si pri analizi kromatogramov pomagali s podatki iz literature. Kim s sod. (2014) v svoji raziskavi ugotavlja, da se vrh za artemisinin pojavi po vrhu miricetina (odvisno od pogojev HPLC analize). Ker so pogoji, ki smo jih izbrali, zelo podobni navedbam v omenjeni raziskavi, predvidevamo, da bi artemisinin pri pogojih, ki smo jih uporabili, lahko vseboval samo ekstrakt V₄.

Spojine, ki smo jih določili v ekstraktih *Artemisie annue* L., so predstavljene v preglednici 16.

PREGLEDNICA 16: PRISOTNOST FENOLNIH SPOJIN V POSAMEZNIH VZORCIH

Ekstrakt	Kafeinska kislina	Katehin	Klorog. kislina	Elagična kislina	Galna kislina	Epikatehin	Miricetin	Rutin
V1	da	da	da	da	da	da	da	da
V2							da	
V3		da	da	da		da	da	
V4*							da	

* prisotni še trije vrhovi, ki jih nismo identificirali.

5 RAZPRAVA

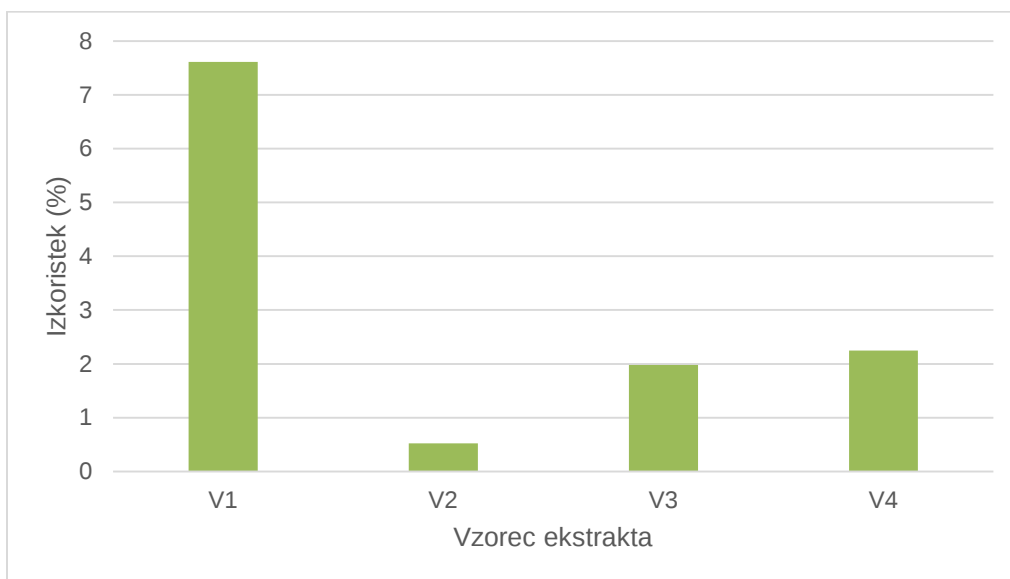
5.1 IZKORISTKI EKSTRAKCIJ

Pri ekstrakcijah po Soxhletu smo uporabili dve topili z različno polarnostjo. Izkoristek z metanolom je znašal 7.61 %, s petroletrom pa 0.52 %, iz česar lahko sklepamo, da so bile aktivne komponente bolj topne v bolj polarnem topilu – metanolu.

Ekstrakciji s superkritičnim CO₂ nista potekali le pri različnih temperaturah, temveč tudi pri različnem tlaku. Izkoristek prve, ki je potekala pri tlaku 300 barov in temperaturi 35 °C 2 uri in 30 minut, je bil 1.98 %. Izkoristek druge, ki je potekala dve uri pri nižjem tlaku (200 barov) in višji temperaturi (50 °C), je bil 2.25 %. Prednost ekstrakcij s superkritičnim CO₂ je, da na ta način pridobimo čiste snovi brez ekstrakcijskih topil, zato uporaba rotavaporja in podobnih tehnik za odstranjevanje topil ni potrebna.

Primerjava izkoristkov ekstrakcij kaže (glej graf 6), da je najoptimalnejša ekstrakcija ekstrakcija po Soxhletu z uporabo metanola. Izkoristek je za 5.36 % višji od izkoristka ekstrakta, pridobljenega z ekstrakcijo CO₂ pod tlakom 200 barov in pri temperaturi 50 °C, vendar je potrebno opozoriti, da ekstrahirane snovi po sestavi niso bile enake.

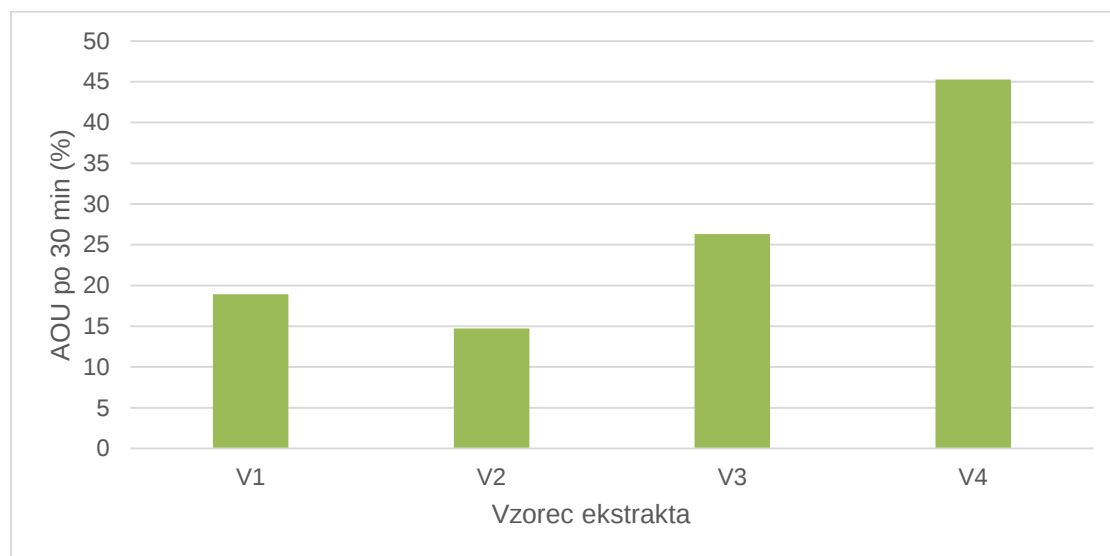
GRAF 6: PRIMERJAVA IZKORISTKOV EKSTRAKCIJ



5.2 ANTIOKSIDACIJSKA UČINKOVITOST (AOU) EKSTRAKTOV IN KONCENTRACIJA SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN

AOU smo določili s stabilnim prostim radikalom DPPH, ki ga spojine z antioksidacijsko učinkovitostjo reducirajo do DPPH₂. Ob prisotnosti reducentov, tj. antioksidantov, absorbanca vzorcev po času pada. Izkazalo se je, da je antioksidacijska učinkovitost zelo odvisna od vrste ekstrakcije in uporabljenega topila, saj so razlike med ekstrakti precejšnje, kar je razvidno iz grafa 7.

GRAF 7: PRIMERJAVA AOU PO 30 MIN



Največja razlika, 30.526 %, je med vzorcema V₂, čigar AOU je najnižja, in V₄, čigar AOU je najvišja. Sklepamo lahko, da se pri različnih pogojih ekstrakcije niso ekstrahirale iste spojine, kar je posredno potrdila tudi analiza vsebnosti skupnih fenolnih spojin v ekstraktih.

Za izračun vsebnosti skupnih fenolnih spojin smo kot standard uporabili galno kislino. Najvišja koncentracija se je ponovno pojavila v vzorcu V₄, in sicer 265 ($\pm$ 34,45) mg GAE/mL, pridobljenem s superkritično ekstrakcijo s CO₂; najnižjo koncentracijo smo zaznali v vzorcu V₂, pridobljenem z ekstrakcijo s petroletrom.

Izračun korelacije med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in antioksidacijsko učinkovitostjo ekstraktov pokaže vrednost 0,924 (92 %), kar je relativno visoko in potrjuje predvidevanja, da so za antioksidacijsko učinkovitost ekstraktov sladkega pelina odgovorne predvsem fenolne spojine. Glede na koncentracije posameznih fenolnih spojin v ekstraktih, pridobljenih s HPLC analizo, vidimo, da prevladujeta galna kislina in rutin.

5.3 HPLC ANALIZA

Rezultati HPLC analize vzorcev so potrdili prisotnost naslednjih fenolnih spojin: kavne kisline, katehina, klorogene kisline, elagične kisline, miricetina, epikatekina, galne kisline in rutina. Največ fenolnih spojin se pojavi v V₁, ekstrahiranem z metanolom. Ta podatek se izključuje s podatki o vsebnosti skupnih fenolnih spojin, kjer je bila najvišja koncentracija ugotovljena v V₄

in druga najnižja v V₁. Predvidevamo, da je do odstopanja prišlo zaradi izpisa samo tistih spojin, katerih standardi so bili predhodno uporabljeni. To pomeni, da so bile v ekstraktih prisotne še druge spojine (različni kumarini, aromatskiketoni, alkaloidi, artemisinin, itd), ampak njihovih vrhov v vzorcu 4 nismo identificirali. Žal med standardi, ki so nam bili na voljo, ni bilo čistega aretemisinina, čeprav primerjava s podatki iz literature (Kim s sod. 2014) kaže, da bi ta lahko bil v ekstraktu 4. Za potrditev te domneve bi morali vzorec analizirati še z drugimi, občutljivejšimi analitskimi metodami kot je npr. nuklearna magnetna resonanca (¹H NMR).

6 ZAKLJUČEK

6.1 POTRDITEV/ZAVRNITEV HIPOTEZ

1. hipoteza: Izkoristek ekstrakcije po Soxhletu z metanolom bo višji kot izkoristek ekstrakcije, opravljene s petroletrom.

Če ekstrakcije obravnavamo ločeno glede na uporabljene metode, lahko prvo hipotezo **potrdimo**. Izkoristek ekstrakcij po Soxhletu z metanolom je za 7.09 % višji od izkoristka ekstrakcije, opravljene s petroletrom, iz česar lahko sklepamo, da smo izolirali večje število aktivnih snovi, ki so bolj topne v polarnih topilih. Težavo pri ekstrakciji po Soxhletu predstavlja prisotnost topila, ki ga moramo naknadno odstraniti z različnimi metodami (rotavapor, prepih z dušikom).

2. hipoteza: Na izkoristek ekstrakcije artemisinina pri ekstrakciji s superkritičnim CO₂ bo v največji meri vplivala izbira ustreznega tlaka.

Pri ekstrakciji s superkritičnim CO₂ je potrebno upoštevati dva parametra, temperaturo in tlak. Ekstrakcija pri nižjem tlaku in višji temperaturi se je izkazala za uspešnejšo, vendar ne optimalno, kar zadeva izolacijo artemisinina. Druge hipoteze tako **ne moremo potrditi**, saj izkoristek ekstrakcije in tlak nista bila v pozitivni korelaciji.

3. hipoteza: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v ekstraktih bo v korelaciji s polarnostjo topila.

Tretjo hipotezo, da je vsebnost skupnih fenolnih spojin v korelaciji s polarnostjo topila, smo **potrdili**. Ugotovili smo, da so metanolni ekstrakti antioksidacijsko bolj učinkoviti kot ekstrakti, pridobljeni s petroletrom. Predvidevamo, da je razlog konjugacija preko vodikovih vezi. Korelacija med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in antioksidacijsko učinkovitostjo ekstraktov je visoka, kar pomeni, da slednja izvira v glavnem iz skupnih fenolnih spojin. S HPLC metodo smo ugotovili, da so te: kavna kislina, katehin, klorogena kislina, elagična kislina, miricetin, epikatekin, galna kislina in rutin.

4. hipoteza: Antioksidacijska učinkovitost ekstraktov bo višja v vzorcih, pridobljenih s superkritičnim CO₂, kot v vzorcih, pridobljenih z ekstrakcijo po Soxhletu.

Antioksidacijska učinkovitost vzorcev je pogojena z metodo ekstrakcije. V vzorcih, pridobljenih s superkritičnim CO₂, je občutno višja kot v vzorcih, pridobljenih z ekstrakcijami po Soxhletu. Vzrok je najverjetneje polarnost uporabljenih topil. S tem smo **potrdili** četrto hipotezo, da je antioksidacijska učinkovitost ekstrakta *Artemisie annue* L. višja v vzorcih, pridobljenih s superkritičnim CO₂, kot v vzorcih, pridobljenih z ekstrakcijo po Soxhletu.

6.2 ODGOVOR NA RAZISKOVALNO VPRAŠANJE

Odgovor na raziskovalno vprašanje, s katero metodo ekstrakcije (ekstrakcija z uporabo superkritičnega CO₂, ekstrakcija po Soxhletu) in pod katerimi pogoji (polarnost topila) je izkoristek fenolnih spojin z največjo antioksidativno učinkovitostjo v ekstraktu *Artemisie annue* L. največji, je jasen. To je pri ekstrakciji s supekrtičnim CO₂, ki ji sledi ekstrakcija po Soxhletu z metanolom. Pri tej je masa surovega ekstrakta sicer višja kot pri uporabi supekrtičnega CO₂, vendar je delež snovi z višjo antioksidacijsko učinkovitostjo nižji kot v ekstraktu, pridobljenem s CO₂.

Ugotavljamo, da je bil delež artemisinina, aktivne učinkovine *Artemisie annue* L., zelo nizek, kar pomeni, da bi morali v prihodnjih raziskavah vse pogoje ekstrakcije prilagoditi le lastnostim artemisinina. Razlog za veliko zdravilno učinkovitost artemisinina je potrebno iskati v kombinaciji z različnimi fenolnimi spojinami, prisotnimi tako v rastlini kot ekstraktih, ki se uporabljajo v medicini.

Zaključimo lahko, da sta bili tako ekstrakcija s superkritičnim CO₂ kot ekstrakcija po Soxhletu uspešni metodi za pridobitev ekstrakta iz rastline *Artemisia Annua* L., toda pogoji izvedbe ekstrakcije s superkritičnim CO₂ (tlak in temperatura) niso bili optimalni, zato so izkoristki relativno majhni, produkt pa ni povsem čist.

6.3 MOŽNOST NADALJNJIH RAZISKAV

Izsledki raziskave so ponudili odlično izhodišče za nadaljnje raziskovalno delo. Pogoje ekstrakcij bi lahko glede na dobljene rezultate optimizirali, s čimer bi maksimirali končni izkoristek. Ključna komponenta medicine je učinkovitost zdravil, zato bi v naslednjem koraku testirali delovanje optimalnega izvlečka na živih kulturah. Ker so plazmodiji *P. falciparum* težko dostopni, bi izvlečke testirali na rakastih tkivih in s tem raziskavo usmerili na antikancerogeno delovanje *Artemisia annua* L.

7 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Z raziskovalno nalogo bi širši javnosti radi približali problematiko recedivnih okužb z malarijo, mehanizem delovanja parazitov, ki bolezen širijo, in antimalarike. Pozornost posvečamo izvlečku *Artemisia annua* L., saj je njegova uspešnost pri zdravljenju malarije pogojena s poznavanjem njegove sestave. Poznavanje najučinkovitejših procesov ekstrakcij nam omogoča najmanjšo možno porabo vhodnega materiala, saj je njegov izkoristek pri optimalnih pogojih največji. Pri izdelavi naloge smo izkazali visoko stopnjo družbene odgovornosti, naloga je bila izvedena na okolju prijazen način z minimalnimi odpadki.

8 VIRI IN LITERATURA

KNJIŽNI VIRI

Achan et al. (2011). Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malaria Journal*, 10: 144.

After (2002). "Uric acid reaction with dpph radicals at the micellar interface". *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 47 (2): 145-149. DOI:10.4067/S0366-16442002000200010.

Agilent. Fundamentals of HPLC. Dostopno na: http://polymer.usc.edu.cn/xwxx_20/xw/201109/P020110906263097048536.pdf

Afonso A. (2006). Malaria parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in candidate genes *atp6* (encoding the sarcoplasmic and endoplasmic Ca^{2+} ATPase), *tctp*, *mdrl* and *cg10*. *Antimicrob. Agents Chemother* 50: 480–489.

Alonso P, Aponte J, Aide P, et al. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *The Lancet*. 2004; 364

Brown, G. D. (1994). Secondary metabolism in tissue culture of *Artemisia annua*. *J Nat Prod* 57: 975–977.

Catchpole, O. et al. (2012). Integrated supercritical fluid extraction and bioprocessing. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8 (4): 263-287

Crutcher, J. M and Hoffman, S. L. (1996). *Medical Microbiology*. 4th Edition. Galvestone: University of Texas Medical Branch at Galvestone; Chapter 83.

Danielski, L., et al. (2007). Marigold (*Calendula officinalis* L.) oleoresin: solubility in SC-CO₂ and composition profile. *Chem Eng Process* 46:99-106

Dobson SMaM (2001). The history of antimalarial drugs. In *Antimalarial Chemotherapy: Mechanisms of Action, Resistance, and new Directions in Drug Discovery*. New York: Human Press: 15–25.

Eckstein-Ludwig, U. (2003). Artemisinin target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. Nature: 957–961.

Ferreira, J. F. (2007). Nutrient deficiency in the production of artemisinin, dihydroartemisinic acid, and artemisinic acid in *Artemisia annua* L. J Agric Food Chem. 55(5):1686-94

Francetič V. (2006). Navodila za vaje pri predmetu Analizne metode pri pridelavi vina. Interno gradivo za laboratorijske vaje pri predmetu Analizne metode pri pridelavi vina. Visoka šola za vinogradništvo in vinarstvo. Univerza v Novi Gorici.

Ge, F. H., Zghang, J. C., Chen, L., Li, J., Huang, X. F. (2000). Supercritical-CO₂ fluid extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L. Chin J Pharm 31: 250–253.

Hao, J. Y., et al. (2002). Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L. Separation and Purification Technology: 191–196.

Huang, H. Y., et al. (2005). Analyses of phenolic compounds by microemulsion electrokinetic chromatography. Electrophoresis 26(16):3134-40.

Kyu, H. H. (2009). Artemisinin derivatives versus quinine for cerebral malaria in African children: a systematic review. Bulletin of the World Health Organization 87: 896-904

Iqbal, S. et al. (2012). Chemical Composition of *Artemisia annua* L. Leaves and Antioxidant Potential of Extracts as a Function of Extraction Solvents. Molecules 17: 6020–6032.

Kaliyaperumal, A. (2013). Reverse phase-high performance liquid chromatography-diode array detector (RP-HPLC-DAD) analysis of flavonoids profile from curry leaf (*Murraya koenigii*. L). Journal of medicinal plant research 7(47): 3393–3399.

Kim, W., et al. (2014). Anti-inflammatory, Antioxidant and Antimicrobial Effects of Artemisinin Extracts from *Artemisia annua* L., Korean J Physiol Pharmacol. 2015 Jan; 19(1): 21–27.

Klayman, D. L., Lin, A. J., Acton, N. et al. (1984): Isolation of artemisinin (Quinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the United States. J Nat Prod 47: 715.

Knez, Ž., Škerget, M. (2003). Termodifuzijski separacijski procesi: (zbrano gradivo). Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru.

Kolar, M. Osnove analizne kemije. FKKT, UM

Li, W. (2005). Yeast model uncovers dual roles of mitochondria in the action of artemisinin. PLoS Gent 1: e36.

Marković, M., Talić, S. (2013). Antioksidacijska aktivnost odabranih hercegovačkih vina. Kem.Ind. 62 (1-2), str. 7-1

Martinez-Correa, H. A., et al (2017). Integrated extraction process to obtain bioactive extracts of *Artemisia annua* L. leaves using supercritical CO₂, ethanol and water. Industrial Crops and Products 95: 535–542.

Martinčič, A., Wraber, T., Jogan, N., Ravnik, V., Podobnik, A., Turk, B., Vreš, B. (1999). Mala flora Slovenije: ključ za določanje praprotnic in semenk. Ljubljana: Tehniška založba Slovenije

Masuda, T., Yonemori, S., Oyama, Y., Takeda, Y., Tanaka, T., Andoh, T., Shinohara, A., Nakata, M. (1999). Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: activity of the leaf extracts from seashore plants. J Agric Food Chem 47: 1749–1754.

"Methanol". The PubChemProject. USA: National Center for Biotechnology Information, 2017; pridobljeno 5. 1. 2018.

Meshnick, S. R., et al. (1991). Artemisinin (qinghaosu): the role of intracellular hemin in its mechanism of antimalarial action. Molecular and Biochemical Parasitology 49: 181–190.

Meshnick, S. R. (1993). Iron-dependant free radical generation from the antimalarial agent artemisinin (qinghaosu). Antimicrob. Agents Chemother 37: 1108–1114.

Nardini, M. (2002). Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption, Journal of Agricultural Food Chemistry 50 (20): 5735–5741.

O'Neill, P. M., et al. (2010). The molecular mechanism of action of artemisinin - the debate continues. Molecules 15: 1705-1721

Pandey, A. V. (1999). Artemisinin, an endoperoxide antimalarial, disrupts the hemoglobin catabolism and heme detoxification systems in malarial parasite. *J. Biol. Chem.* 274: 19383–19388.

RTS, S Clinical Trial Partnership (2015). Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *The Lancet* 385: 1581.

Starkl, K. (2012). Sinteza potencialno biološko aktivnih hidroperoksidov z vodikovim peroksidom. Diplomaska naloga. Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani. Dostopno na: http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2012/Starkl_Katarina_dipl_nal_2012.pdf. Pridobljeno 21.1. 2018.

Singleton, V. L., Rossi J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* 16: 144-158.

Suyare, A. R., Nayjara, C. G., Santos, M. T., Neta, L., Batista, L. A., Araújo, S. M., e de Jesus da Silveira Moreira, J., Narain, N. (2014). Catechin and Epicatechin Contents in Wines Obtained from Brazilian Exotic Tropical Fruits *Food and Nutrition Sciences* Vol.5 No.5: 9 pages.

Škrget, M., Knez, Ž., Perko, T. (2012). Antioxidant and antimicrobial activity of PGSStm micronized curcuma powder. Dostopno na: http://issf2012.com/handouts/documents/343_000.pdf. Pridobljeno: 7. 1. 2018

Tu, Y. (2017). From *Artemisia annua* L. to Artemisinins: The Discovery and Development of Artemisinins and Antimalarial Agents. China: Chemical Industry Press.

White, N. (2013). Chapter 43: Malaria. In: Farrar, J., Hotez, P., Junghanss, T., Kang, G., Lalloo, D. (2013). *Manson's Tropical Diseases*: 23rd edition. China: Saunders ltd.

World Malaria Report 2016. Geneva: World Health Organization; 2016.

Yen, G. C., Duh, P. D. (1994). Scavenging Effect of Methanolic Extracts of Peanut Hulls on Free-Radical and Active-Oxygen Species. *J. Agric. Food Chem.* 42 (3): 629–632

Zabukovec, T. (2014). Razvoj in validacija HPLC analizne metode za določanje nesteroidnih protivnetnih učinkovin. Magistrsko delo. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru.

Zoecklein, B W, Fugelsang, K. C., Gump, B. H., and Nury, F. S. (1995) Phenolic compounds and wine color. In *Wine analysis and production*, (Ed.), pp. 115-151. New York: Chapman & Hall.

SPLETNI VIRI

<https://academic.oup.com/cid/article/35/12/1469/354485/Efficacy-and-Safety-of-Dihydroartemisinin>; pridobljeno 27. 8. 2017.

<https://www.britannica.com/science/artemisinin>; pridobljeno 27. 8. 2017.

<https://www.britannica.com/topic/antiprotozoal-drug>; pridobljeno 27. 8. 2017.

<https://www.britannica.com/science/malaria#ref895845>; pridobljeno 27. 8. 2017.

<http://cen.acs.org/articles/94/i1/Well-Known-Malaria-Drug-Artemisinin.html>; pridobljeno 23. 12. 2017.

<https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/>; pridobljeno 3. 9. 2017.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165614708001648>; pridobljeno 23. 12. 2017.

<http://www.who.int/malaria/media/rtss-phase-3-trial-qa/en/>; pridobljeno 3. 1. 2018.

<https://isjfr.zrc-sazu.si/sl/terminologisce/slovarji/farmacevtski/iskalnik?iztocnica=antimalarik#v>; pridobljeno 3. 1. 2018

<https://isjfr.zrc-sazu.si/sl/terminologisce/slovarji/botanicni/iskalnik?iztocnica=kinin#v>; 3. 1. 2018

<http://macro.lsu.edu/howto/solvents/Polarity%20index.htm>; pridobljeno 5. 1. 2018.

VIRI SLIK

Slika 1: http://www.rollbackmalaria.org/files/images/about/WMR2014_Figure1-1.png; pridobljeno 27. 8. 2017.

Slika 2: https://www.cdc.gov/malaria/images/graphs/life_cycle/malaria_lifecycle.gif; pridobljeno 27. 8. 2017.

Slika 3: <http://static.newworldencyclopedia.org/thumb/e/e4/Quinine-2D-skeletal.png/220px-Quinine-2D-skeletal.png>; pridobljeno 3. 9. 2017.

Slika 4: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/f1/Chloroquine.svg/1200px-Chloroquine.svg.png>; pridobljeno 3. 9. 2017.

Slika 5: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/db/Artemisia_annua.jpeg; pridobljeno 3. 9. 2017.

Slika 6: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/fb/Artemisinin.svg/1200px-Artemisinin.svg.png>; pridobljeno 3. 9. 2017.

Slika 7: http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2012/Starkl_Katarina_dipl_nal_2012.pdf; pridobljeno 23. 12. 2017.

Slika 8: http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2012/Starkl_Katarina_dipl_nal_2012.pdf; pridobljeno 23. 12. 2017.

Slika 9: http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2012/Starkl_Katarina_dipl_nal_2012.pdf; pridobljeno 23. 12. 2017.

Slika 10: http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2012/Starkl_Katarina_dipl_nal_2012.pdf; pridobljeno 23. 12. 2017.

Slika 11: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/f2/Artemether.svg/1200px-Artemether.svg.png>; pridobljeno 3. 9. 2017.

Slika 12: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/a5/Artesunate.svg/220px-Artesunate.svg.png>; pridobljeno 3. 9. 2017.

Slika 13: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/1e/Artenimol.png/220px-Artenimol.png>; pridobljeno 3. 9. 2017

Slika 14: http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/agronomija/dn_celigoj_alma.pdf; pridobljeno 10. 1. 2017 (str. 6)

Slika 15: <https://www.intechopen.com/source/html/43985/media/image4.jpeg>

Slika 16: http://studentski.net/gradivo/ulj_ffa_fa1_ank_sno_kromatografija_02?r=1; pridobljeno 7. 1. 2018

Slika 17: Zabukovec, T. (2014). Razvoj in validacija HPLC analizne metode za določanje nesteroidnih protivnetnih učinkovin. Magistrsko delo. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru.

Slika 18: Lastni arhiv.

Slika 19: Povzeto po: Danielski, L., et al. (2007). Marigold (*Calendula officinalis* L.) oleoresin: solubility in SC-CO₂ and composition profile. *Chem Eng Process* 46:99-106; dostopno 3. 1. 2018

Slika 20: Lastni arhiv.

Slika 21: Lastni arhiv.

Slika 22: Lastni arhiv.