

Mladi za napredek Maribora
36. srečanje

**Biološka aktivnost ekstraktov sladkega pelina (*Artemisia annua* L.) ob nanosu
na humane celice**

Raziskovalno področje: Interdisciplinarno področje (kemija, kemijska tehnologija in
biologija)

Raziskovalna naloga

Avtor: JULIJA KOLETNIK

Mentor: UROŠ MAVER, KATJA HOLNTHANER ZOREC, PETRA KOTNIK

Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

Število točk: 165

Mesto: 1

Priznanje: zlato

Maribor, februar 2019

Mladi za napredek Maribora

36. srečanje

Biološka aktivnost ekstraktov sladkega pelina (*Artemisia annua* L.) ob nanosu na humane celice

Raziskovalno področje: Interdisciplinarno področje (kemija, kemijska tehnologija in biologija)

Raziskovalna naloga

Maribor, februar 2019

ZAHVALA

V prvi vrsti se zahvaljujem svojim mentorjem in profesorici kemije za vso pomoč in vse nasvete pri nastajanju naloge. Hkrati bi se zahvalila vodji Laboratorija za separacijske procese na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Mariboru, kjer sem izvedla ekstrakcije, Medicinski fakulteti v Mariboru, ki mi je omogočila uporabo svojih laboratorijev in s tem udejanjenje zamišljene raziskave, in šolski koordinatorici za raziskovalno dejavnost, ki nas je dosledno opominjala na bližajoče se roke.

POVZETEK

V nalogi primerjamo biološko aktivnost ekstraktov sladkega pelina (*Artemisia annua* L.) ob nanosu na humane črevesne epitelne celice. Surov rastlinski material je obdelan s superkričnim CO₂ in nato ekstrahiran z ekstrakcijo po Soxhletu ali z ultrazvočno ekstrakcijo. Po določitvi antioksidacijske učinkovitosti ekstraktov in njihove količinske vsebnosti izbranih spojin smo vodne raztopine ekstraktov nanесли na celice HUIEC in preverili njihovo obnašanje ob prisotnosti raztopin. Najvišjo antioksidacijsko učinkovitost so izkazali ekstrakti, ekstrahirani z uporabo topila 50 % etanola. Ob nanosu na črevesne celice pri razredčini 1:32 je ekstrakt, ekstrahiran z uporabo ultrazvočne kopeli s 50 % etanolom, izkazal najpozitivnejši učinek na povečano viabilnost celične kulture (126,26 %). Ugotavljamo, da so ekstrakti sladkega pelina z visokimi vrednostmi antioksidacijske učinkovitosti ob nanosu na humane črevesne celice HUIEC najbolj vzpodbujali celično rast.

KAZALO VSEBINE

Zahvala.....	3
Povzetek.....	4
Kazalo slik.....	6
Kazalo preglednic.....	7
Kazalo grafov.....	8
Kazalo organigramov.....	8
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.....	12
2.1 <i>Artemisia annua</i> L (Sladki pelin).....	12
2.1.1 Kemijska sestava listov <i>Artemisie annue</i> L.....	13
2.1.2 Artemisinin.....	14
2.1.2.1 Izolacija artemisininina.....	16
2.1.2.2 Derivati artemisininina.....	17
2.1.2.3 Uporaba artemisininina v medicinske namene.....	19
2.2 Fenoli.....	20
2.2.1 Fenolne kisline.....	21
2.2.2 Flavonoidi.....	22
2.3 <i>In vitro</i> testiranja.....	23
2.4 Metode.....	26
2.4.1 Ekstrakcije.....	26
2.4.1.1 Superkritična ekstrakcija.....	26
2.4.1.1.1 Visokotlačna ekstrakcija na pilotni aparaturi UHDE.....	26
2.4.1.1.2 Ekstrakcija po Soxhletu.....	27
2.4.1.1.3 Ultrazvočna ekstrakcija.....	28
2.4.2 Tekočinska kromatografija / masna spektrometrija (LC / MS).....	28
2.4.3 Testi za določanje antioksidacijske učinkovitosti.....	29
2.4.3.1 Uporaba DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil).....	30
2.4.4 Celice.....	31
2.4.4.1 HUIEC priprava.....	31

2.4.4.2 MTT test.....	32
3 Empirični del	33
3.1 Izvedba ekstrakcije s superkritičnim CO ₂	33
3.2 Izvedba ekstrakcije po Soxhletu	34
3.3 Izvedba ekstrakcije z uporabo ultrazvočne kopeli	35
3.4 Tekočinska kromatografija / masna spektrometrija	36
3.5 Določitev antioksidacijske učinkovitosti.....	37
3.6 Priprava celic	38
3.6.1 MTT test	40
4 Rezultati	41
4.1 Izkoristki ekstrakcij.....	41
4.2 Tekočinska kromatografija in masna spektrometrija	43
4.3 Antioksidacijska učinkovitost.....	47
4.4 Viabilnost celic HUIEC.....	50
5 Razprava.....	59
5.1 Izkoristki ekstrakcij.....	59
5.2 Tekočinska kromatografija z masno spektroskopijo.....	61
5.3 Antioksidacijska učinkovitost.....	62
5.4 MTT test	64
6 Zaključek.....	66
6.1 Potrditev / zavrnitev hipotez.....	67
6.2 Odgovor na raziskovalno vprašanje.....	69
6.3 Nadaljnje raziskave	70
7 Družbena odgovornost.....	70
8 Viri in literatura	Error! Bookmark not defined.
9 Priloga	75

KAZALO SLIK

SLIKA 1: <i>ARTEMISIA ANNUA</i> L.....	13
SLIKA 2: STRUKTURNA FORMULA ARTEMISININA	14
SLIKA 3: MODEL REDUKTIVNEGA RAZPADA ARTEMISININA DO REDUKTIVNIH VRST (STARKL, 2012)	15
SLIKA 4: BIOLOŠKO AKTIVNI IN NEAKTIVNI ANALOGI ARTEMISININA (STARKL, 2012).	17
SLIKA 5: STRUKTURNA FORMULA ARTEMETRA	17
SLIKA 6: STRUKTURNA FORMULA ARTESUNATA.....	18

SLIKA 7: STRUKTURNA FORMULA DIHIDROARTEMISININA	19
SLIKA 8: RAZDELITEV FENOLOV GLEDE NA KEMIJSKE LASTNOSTI (NIJVELDT, 2001).....	20
SLIKA 9: STRUKTURNA FORMULA KLOGROGENSKE KISLINE (WIKIPEDIA, 2018)	21
SLIKA 10: STRUKTURNA FORMULA KATEHINA (WIKIPEDIA, 2018).....	22
SLIKA 11: PRIMER <i>IN VITRO</i> TESTA	23
SLIKA 12: SHEMA PILOTNE APARATURE ZA EKSTRAKCIJO - UHDE (ŠKERGET ET AL., 1998).....	27
SLIKA 13: SHEMA SOXHLET-OVEGA APARATA (PETROVIČ, 2013)	28
SLIKA 14: STRUKTURA DPPH PRED IN PO REAKCIJI Z ANTIOKSIDANTOM (HUANG ET AL., 2005)....	30
SLIKA 15: SPREMEMBE V ABSORBCIJSKEM SPEKTRU (OD VIJOLIČNE DO RUMENE) V REAKCIJAH DPPH Z RADIKALI REDUCENTI	31
SLIKA 16: CELIČNA KULTURA HUIEC UPORABLJENA V EMPIRIČNEM DELU.....	32
SLIKA 17: ULTRAZVOČNA KOPEL	36
SLIKA 18: KROMATOGRAM LOČITVE KOMPONENT V EKSTRAKTU IZ PELINA.....	37
SLIKA 19: CELICE HUIEC POD INVERTNIM SVETLOBNIM MIKROSKOPOM	39
SLIKA 20: MIKROTETRSKA PLOŠČICA S 96 VODNJAKI PO INKUBACIJI.....	40
SLIKA 21: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN EKSTRAKTA V ₁ NA VIABILNOST CELIC.	54
SLIKA 22: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN EKSTRAKTA V ₂ NA VIABILNOST CELIC.	55
SLIKA 23: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN EKSTRAKTA V ₅ NA VIABILNOST CELIC.	56
SLIKA 24: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN EKSTRAKTA V ₆ NA VIABILNOST CELIC.	57
SLIKA 25: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN STANDARDOV MIX 1 NA VIABILNOST CELIC.	58
SLIKA 26: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN STANDARDOV MIX 3 NA VIABILNOST CELIC.	59
SLIKA 27: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN EKSTRAKTA V ₃ NA RAST CELIC.....	79
SLIKA 28: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN EKSTRAKTA V ₄ NA RAST CELIC.....	80
SLIKA 29: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN EKSTRAKTA V ₇ NA RAST CELIC.....	80
SLIKA 30: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN EKSTRAKTA V ₈ NA RAST CELIC.....	81
SLIKA 31: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN EKSTRAKTA MIX 3 NA RAST CELIC	82
SLIKA 32: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN SPOJINE S ₁ NA RAST CELIC.....	82
SLIKA 33: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN SPOJINE S ₂ NA RAST CELIC	83
SLIKA 34: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN SPOJINE S ₃ NA RAST CELIC	84

KAZALO PREGLEDNIC

PREGLEDNICA 1: KEMIJSKA SESTAVA LISTOV SLADKEGA PELINA (<i>ARTEMESIA ANNUA</i> L.) (IQBAL ET AL, 2012).....	13
PREGLEDNICA 3: SISTEM OZNAČEVANJA VZORCEV EKSTRAKTOV.....	41
PREGLEDNICA 4: MASA VHODNEGA MATERIALA IN EKSTRAKTA, SOXHLET	42
PREGLEDNICA 5: MASA VHODNEGA MATERIALA IN EKSTRAKTA, ULTRAZVOČNA EKSTRAKCIJA	42
PREGLEDNICA 6: VSEBNOSTI KOMPONENT V VODNIH RAZTOPINAH EKSTRAKTOV	43
PREGLEDNICA 7: VSEBNOSTI KOMPONENT V METANOLNIH RAZTOPINAH EKSTRAKTOV.....	44
PREGLEDNICA 8: ODSOTEK INHIBICIJE VZORCEV PO 5 MINUTAH.....	47
PREGLEDNICA 9: POVPREČNA VSEBNOST SPOJIN V VODNIH RAZTOPINAH EKSTRAKTOV	76
PREGLEDNICA 10: POVPREČNA VSEBNOST SPOJIN V METANOLNIH RAZTOPINAH EKSTRAKTOV	76
PREGLEDNICA 11: ABSORBANCA VZORCEV PRI KONCENTRACIJI 5.00 MG	77
PREGLEDNICA 12: ABSORBANCA VZORCEV PRI KONCENTRACIJI 2,50 MG/ML	77

PREGLEDNICA 13: ABSORBANCA VZORCEV PRI KONCENTRACIJI 1,50 MG/ML	77
PREGLEDNICA 14: ABSORBANCA VZORCEV PRI KONCENTRACIJI 1,00 MG/ML	77
PREGLEDNICA 15: ODSOTOK INHIBICIJE VZORCEV PRI KONCENTRACIJI 5 MG/ML	78
PREGLEDNICA 16: ODSOTOK INHIBICIJE VZORCEV PRI KONCENTRACIJI 2,5 MG/ML	78
PREGLEDNICA 17: ODSOTOK INHIBICIJE VZORCEV PRI KONCENTRACIJI 1,50 MG/ML	78
PREGLEDNICA 18: ODSOTOK INHIBICIJE VZORCEV PRI KONCENTRACIJI 1,00 MG/ML	78

KAZALO GRAFOV

GRAF 1: PRIMERJAVA VSEBNOSTI ARTEMISININA V VODNIH IN METANOLNIH RAZTOPINAH	45
GRAF 2: PRIMERJAVA VSEBNOSTI KATEHINA V VODNIH IN METANOLNIH RAZTOPINAH.....	46
GRAF 3: PRIMERJAVA VSEBNOSTI KLOOROGENSKE KISLINE V VODNIH IN METANOLNIH RAZTOPINAH	46
GRAF 4: ODVISNOST ODSOTKA INHIBICIJE OD ČASA PRI KONCENTRACIJI 5,00 MG/ML.	48
GRAF 5: ODVISNOST ODSOTKA INHIBICIJE OD ČASA PRI KONCENTRACIJI VZORCEV 2,50 MG/ML. .	49
GRAF 6: ODVISNOST ODSOTKA INHIBICIJE OD ČASA PRI KONCENTRACIJI 1,50 MG/ML.	49
GRAF 7: ODVISNOST ODSOTKA INHIBICIJE OD ČASA PRI KONCENTRACIJI 1,00 MG/ML.	50
GRAF 8: PRIMERJAVA VPLIVA EKSTRAKTOV, PRIDOBLENIH Z EKSTRAKCIJO PO SOXHLETU, NA VIABILNOST CELIC HUIEC.	52
GRAF 9: PRIMERJAVA VPLIVA EKSTRAKTOV, EKSTRAHIRANIH Z EKSTRAKCIJO Z UPORABO ULTRAZVOČNE KOPELI, NA VIABILNOST CELIC HUIEC.	53
GRAF 10: PRIMERJAVA IZKORISTKOV EKSTRAKTOV.	61
GRAF 11: PRIMERJAVA % INHIBICIJE VZORCEV MED KONCENTRACIJAMI.....	64
GRAF 12: PRIMERJAVA NAJPOZITIVNEJŠIH UČINKOV EKSTRAKTOV NA VIABILNOST CELIC.....	65
GRAF 13: UMERITVENA KRIVULJA ZA ARTEMISININ	75
GRAF 14: UMERITVENA KRIVULJA ZA KLOOROGENSKO KISLINO	75
GRAF 15: UMERITVENA KRIVULJA ZA KATEHIN.....	76

KAZALO ORGANIGRAMOV

ORGANIGRAM 1: POTEK LABORATORIJSKEGA DELA	33
---	----

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 artemisinina, aktivne spojine, nahajajoče se v listih rastline, ki je zadnjih trideset let predmet številnih 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). Zaradi učinkovitosti in vse pogostejše rabe *in vitro* testov v medicinske namene smo se v raziskavi odločili nanesti ekstrakte rastline *Artemisia annua* L. na humane celice in tako ovrednotiti njihove biološke učinke. V teoretičnem delu naloge podrobneje predstavljamo aktivno komponento rastline *Artemisia annua* L., artemisinin, flavonoide, ki lahko delujejo kot modulatorji oksidativnega stresa proti raku ter razvoj in pomen *in vitro* testov. V empiričnem delu naloge raziskujemo, kateri od fenolnih ekstraktov *Artemisia annua* L, pridobljenih z različnimi metodami ekstrakcije in z uporabo različnih organskih topil, bo ob nanosu na humane celice izkazali biološko aktivnost.

1.1 NAMEN RAZISKAVE

V nalogi raziskali biološko aktivnost različnih fenolnih ekstraktov *Artemisia annua* L. ob nanosu na humane celice. Surov rastlinski material bo obdealan s superkritičnim CO₂, z namenom, da iz vzorcev izločimo nepolarne oz. lipofilne snovi. Za izolacijo fenolnih ekstraktov iz obdelanega materiala bodo izvedene različne metode ekstrakcije. Pri prvi metodi, ekstrakcija po Soxhletu, bomo primerjali razlike med učinkovitostjo dveh topil: metanola in 50 % etanola. Druga metoda bo ekstrakcija aktivnih spojin z uporabo ultrazvočne kopeli. Dobljene ekstrakte bomo raztopili v metanolu in vodi ter opravljali analize na vsebnost katehina, klorogenske kisline in artemisinina ter določili antioksidacijsko učinkovitost (AOU) s stabilnim prostim radikalom 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Ekstrakte, raztopljene v vodi, bomo nato v nanosli na črevesne epitelne

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.

celice, da preverimo obnašanje celic v prisotnosti raztopin ter s tem določili varnost ekstraktov za preoralno uporabo.

1.2 RAZISKOVALNO VPRAŠANJE

Temeljno raziskovalno vprašanje naloge je, kateri ekstrakt *Artemisia annua* L., pridobljen z različnimi metodami ekstrakcije (z ekstrakcijo po Soxhletu z uporabo metanola ali 50 % etanola ali z ekstrakcijo z uporabo ultrazvočne kopeli), bo ob nanosu na humane celice izkazal največjo biološko aktivnost (tj. kateri ekstrakt določeno antioksidacijsko učinkovitostjo, bo izkazal največjo mero varnosti ter učinkovitosti ob nanosu na celično kulturo),

1.3 HIPOTEZE

Na osnovi opredelitve problema smo postavili naslednje hipoteze:

1. hipoteza: Ultrazvočni ekstrakti, pridobljeni s topilom 50 % etanol, izkazujejo višji izkoristek kot ekstrakti ekstrahirani z metanolom.

Razlaga hipoteze:

Temperatura vrelišča se zanemari pri ultrazvočni ekstrakciji, saj vse ekstrakcije potekajo pri enaki temperaturi. Predpostavljamo, da bo izkoristek višji pri uporabi 50 % etanola, ker se bodo ekstrahirale tako polarne kot tudi nepolarne snovi.

2. hipoteza: Sočasno pri ekstrakciji po Soxhletu ekstrakti pridobljeni z metanolom izkazujejo višji izkoristek kot ekstrakti, pridobljeni s topilom 50 % etanol.

Razlaga hipoteze:

Metanol doseže temperaturo vrelišča pri 64 °C, etanol pri temperaturi 78 °C, voda pa pri 100 °C. Iz tega sklepamo, da bo v primeru Soxhlet ekstrakcije z uporabo metanola poteklo več ciklov, kot pri uporabi 50 % etanola, posledično bo izkoristek višji.

3. hipoteza: Več snovi z visoko antioksidacijsko učinkovitostjo je ekstrahiranih z ultrazvočno ekstrakcijo, pri kateri je kot topilo uporabljen 50 % etanol.

Razlaga hipoteze:

Predvidevamo, da se bodo v primeru ultrazvočne ekstrakcije s 50 % etanolom ekstrahirale polarne in nepolarne komponente.

4. hipoteza: Pri analizi s tekočinsko kromatografijo z masno spektrometrijo metanolne raztopine ekstraktov izkazujejo večjo vsebnost katehina, klorogenske kisline in artemisinina.

Razlaga hipoteze:

Fenolne snovi so spojine, katerih polarnost je bližja polarnosti metanola kakor vode.

5. hipoteza: Vzorci, ki izkazujejo najvišjo antioksidacijsko učinkovitost, izkazujejo tudi največjo vsebnost katehina, klorogenske kisline in artemisinina.

Razlaga hipoteze:

Glede na rezultate lanske raziskave (Koletnik, 2018) in druge literature predvidevamo, da antioksidacijska učinkovitost v veliki meri izvira iz fenolnih spojin, med katere spadata tudi klorogenska kislina in katehin ter artemisinina.

6. hipoteza: Ekstrakti z najvišjo vsebnostjo fenolov vzpodbujajo rast celične kulture HUIEC bolj kakor ekstrakti, katerih antioksidacijska učinkovitost je nižja.

Razlaga hipoteze:

Oksidacijska reakcija lahko vodi do nastanka prostih radikalov, ki veržino reagirajo in lahko poškodujejo celice. Antioksidanti so spojine, ki oksidacijo zavirajo, zato nas zanima antioksidacijska učinkovitost ekstraktov, tj. zmožnost preprečevanja nastanka prostih radikalov. Predpostavljamo, da bodo torej (med drugim tudi) antioksidacijsko učinkovitejši ekstrakti vzpodbujali celično rast.

1.4 METODE DE LA

V nalogi bomo najprej preučili rastlino *Artemisia annua* L., njeno aktivno spojino artemisinin, fenolni spojini katehin in klorogensko kislino, ki sta bili izbrani glede na rezultate tekočinske kromatografije visoke ločljivosti opravljene v sklopu lanske raziskave (Koletnik, 2018). Zaradi aplikacije pridobljenih ekstraktov na celične kulture, se bomo posvetili tudi tako imenovanim *in vitro* testom. V empiričnem delu bomo uporabili naslednje metode: obdelava surovega materiala

z uporabo superkritičnega CO₂, ekstrakcijo po Soxhletu, ekstrakcijo z uporabo ultrazvočne kopeli, z uporabo prostega radikala DPPH bomo določili antioksidativno učinkovitost pridobljenih ekstraktov, ekstrakt bomo analizirali z uporabo analizne metode tekočinske kromatografije z masno spektrometrijo ter ekstrakte v izbranih koncentracijah nanесли na humane črevesne celice.

2 TEORETIČNI DEL

V teoretičnem delu bomo opravili pregled literature v povezavi z izbrano rastlino, *Artemisia annua* L. ali sladkega pelina, njene aktivne komponente artemisinina, flavonoidov ter pomena *in vitro* testov pri testiranju bioloških učinkov novih ekstraktov.

2.1 ARTEMISIA ANNUA L (SLADKI PELIN)²

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 dracuncululus*, znanao 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).

² Podpoglavje 2.1 je povzeto po Koletnik, 2018 (19-27)



SLIKA 1: *ARTEMISIA ANNUA* L.

2.1.1 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 tanin. Vsebnost pepela, nastalega med sušenjem, nakazuje veliko količino anorganskih mineralov. Z različnimi metodami je bila potrjena tudi prisotnost skupnih fenolov, flavnoidov in antioksidantov (Iqbal et al, 2012).

PREGLEDNICA 1: KEMIJSKA SESTAVA LISTOV SLADKEGA PELINA (*ARTEMESIA ANNUA* L.) (IQBAL ET AL, 2012)

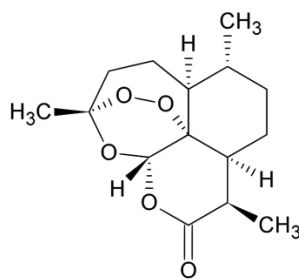
Snov	Količina (% suhe mase)
Pepel	7,5
Ogljikovihidrati	8,3
Maščobe	6,07
Vlaknine	14,2
Tekočine	11,4

Proteini	24,37 mg/100 g
Fitat	140,4 mg/100 g
Skupni tanini	0,61 mg/100 g
Vitamin B	2,74 mg/100 g

V raziskavi je predstavljeno, da je glavna sestavina ekstraktov listov sladkega pelina kafa (48 %), sledi cineol (9 %), artemisinin je relativno malo – 2,7 %. Avtor pravitako poroča, da so izkoristki ekstrakcij običajno zelo nizki – od 0,4 % do 4,0 %.

2.1.2 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 seskviterpen lakton. Sprva so ga imenovali *qinghasou*, kasneje pa so ga po rodu Artemisija preimenovali v artemisinine (angl. *Artemisinine*). Ker je končnica “*ine*” rezervirana za poimenovanje dušikovih spojin, npr. alkaloidov in aminokislin, ta spojina pa dušika ne vsebuje, so ga v okviru Chemical Abstracts preimenoval v artemisinin (Tu, 2017).



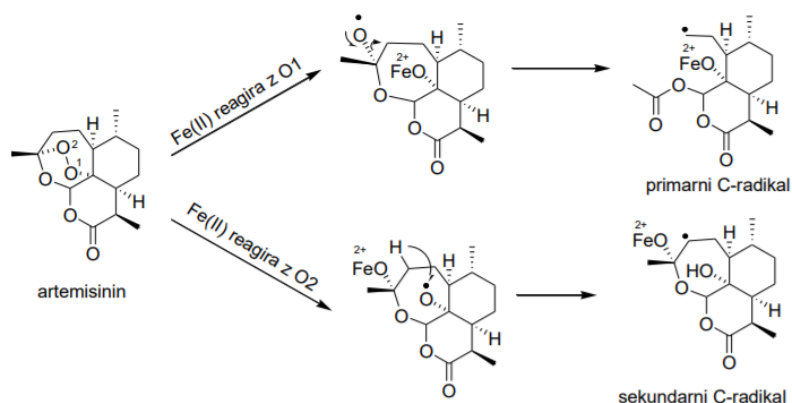
SLIKA 2: STRUKTURNA FORMULA ARTEMISININA

Zaradi svoje specifične strukture, razvidne iz slike 2, in vsebnosti aktivnih kisikovih funkcionalnih skupin, kot so peroksi, acetal, ketal in lakton, se njegov mehanizem delovanja, ki po treh desetletjih raziskav še ni povsem pojasnjen, razlikuje od vseh do sedaj znanih antimalarikov (Tu, 2017). Artemisinin v parazitovo celico vstopi z veziklom, 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 artemisininina sproži dvovalentno 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 et al., 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 parazitne 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 3.)



SLIKA 3: MODEL REDUKTIVNEGA RAZPADA ARTEMISININA DO REDUKTIVNIH VRST (STARKL, 2012)

Artemisinin ima lahko tudi citotoksične učinke. Na podlagi nevtralizacije njegovega citotoksičnega učinka apreko dodatka monoklonskega protitelesa proti transferinu, lahko sklepamo, da je slednji ključno povezan s tem učinkom. Transferrin je protein, ki prenaša železo po krvi in ia ključno vlogo pri uravnavanju koncentracije prostega železa. To je še en namig za specifičnost celičnih učinkov, povezanih z železom. Ugotovili so, da tumorske celice izražajo bistveno več receptorja transferina na svoji površini kot normalne celice, kar kaže, da bi lahko železo in transferin vsaj deloma spodbudila citotoksičnost artemisinina pri delovanju na tumorske celice. Znano je, da rakaste celice vsebujejo več železa kot normalna tkiva, namreč hitro rastoči tumorji potrebujejo učinkovito preskrbo s hranilnimi snovmi, kar posledično vpliva na močno

razvejano krvožilje. Tako je vsaj delno pojasnjeno, zakaj zdravila tipa artemisinin v večji meri uničujejo rakaste celice kot normalne celice. Kompleksi transferin-železavztopijo v celico preko receptorja za transferin (tj. s procesom endocitoze). Izražanje kompleksa je visoko v tumorjih, vendar nizko v normalnih tkivih in omejeno na nekaj mest, hepatocitov, testisov, hipofize. Zato je vredno raziskati, ali lahko omenjeni kompleksi služijo kot biomarkerji za napovedovanje odzivnosti tumorjev na zdravila tipa artemisinin (Efferth, 2017).

2.1.2.1 IZOLACIJA ARTEMISININA

Leta 1975 so na ICMM-CACMS³ določili kemijsko strukturo artemisinina, 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 spojine.

Pri ekstrakciji artemisinina se soočamo z dvema velikima težavama. Vsebnost spojine v listih *Artemisiae annuae* L. je nizka, zaloga rastline, dostopna 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 ekstrakcij zvišuje njihova cena (Tu, 2017).

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 (Hao, 2002).

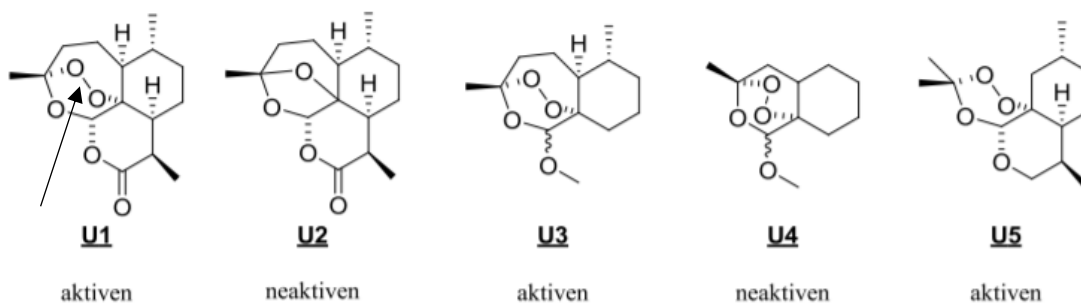
Superkritična ekstrakcija (SFE) je postopek ločevanja ene komponente od druge z uporabo superkritičnih tekočin kot ekstrakcijskega topila. Metoda je primerna za ekstrakcijo nepolarnih komponent ali pa za odstranitev neželenih snovi iz materiala. Kot superkritična tekočina se

³ Institute of Chinese Materia Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences.

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 artemisinina zelo dobro usmerjamo z izbiro prave temperaturne in tlaka. Primerjava MAE, superkritične in ekstrakcije po Soxhletu je pokazala, da absolutni etanol ali kloroform nista primerni topili (Hao, 2002).

2.1.2.2 DERIVATI ARTEMISININA

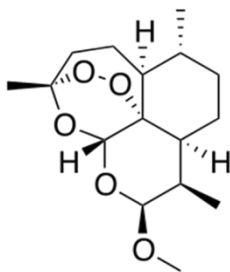
Za medicinske namene se uporabljajo trije derivati artemisinina: artemeter, artesunate in dihidroartemisinin. Za njihovo delovanje je odločilna endoperoksidna skupina, označena na sliki.



SLIKA 4: BIOLOŠKO AKTIVNI IN NEAKTIVNI ANALOGI ARTEMISININA (STARKL, 2012).

Prvo generacijo predstavljajo eterski, esterski in karboantni derivati dihidroartemisinina, katerih predstavnik sta artemeter in arteeter.

Artemeter

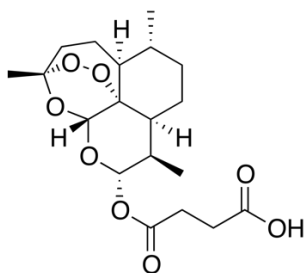


SLIKA 5: STRUKTURNA FORMULA ARTEMETRA

Artemeter je eter, pridobljen iz dihidroartemisinina. 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 zdravit zaužiti peroralno. 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).

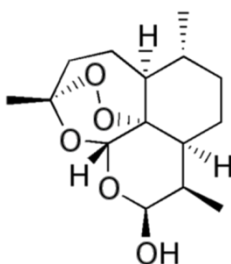
Artesunat



SLIKA 6: STRUKTURNA FORMULA ARTESUNATA

Artesunat je spojina, topna v vodi. 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 neželeni učinek zdravljenja pa je vročina, ki je ne smemo zamešati z vročino, ki je posledica malarije.

Dihidroartemisinin



SLIKA 7: STRUKTURNA 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 *piperkvinom*. Omenjena kombinacija zdravil je po učinkovitosti enakovredna, v tretji fazi testiranja v Afriki je pokazala celo boljše rezultate kot terapija z artemetrom (White, 2013).

2.1.2.3 UPORABA ARTEMISININA V MEDICINSKE NAMENE

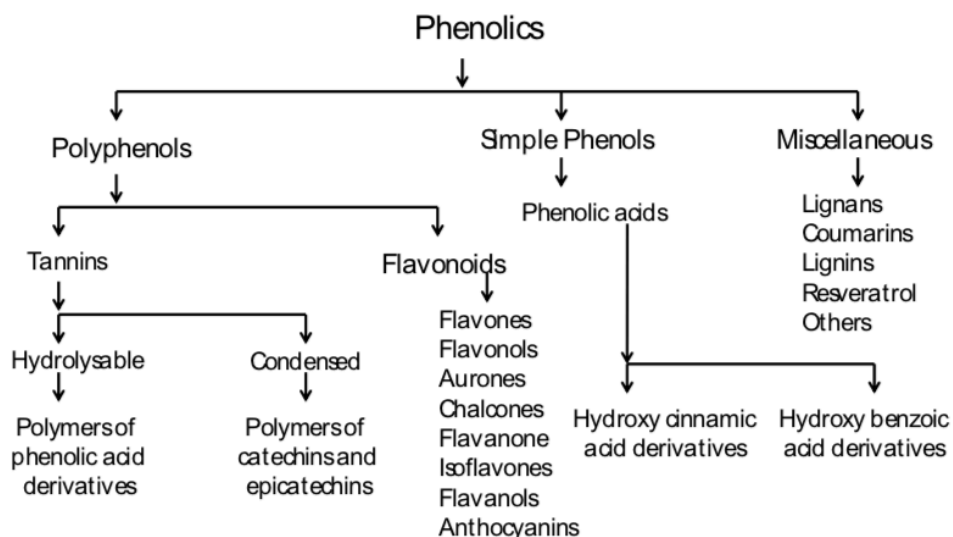
Danes je znano, da artemisinin učinkovito deluje proti vsem okužbam s paraziti rodu *Plasmodium*. Zdravilo je še posebej koristno pri zdravljenju okužb, ki vključujejo parazite, odporne proti klorokinu in kininu. Trenutno potekajo tudi zgodnje faze testiranja artemisininina za zdravljenje rakavih obolenj. 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 rastnega faktorja v nekaterih tkivnih kulturah (Ferreira, 2007). Artemisinin se lahko zaužije preoralno, intramuskularno ali kot svečka (supozitorij). Najvišjo koncentracijo v krvi doseže nekaj ur po zaužitju. Deluje zelo hitro, tako da število parazitov zniža že v prvih nekaj dneh po pričetku zdravljenja. Kot izjemno učinkovit se je izkazal derivat artemisininina, imenovan artezunat, 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 zdravi⁴.

⁴ Vir: <https://www.britannica.com/science/artemisinin>; pridobljeno 27. 8. 2017.

2.2 FENOLI

Fenoli predstavljajo največjo skupino rastlinskih sekundarnih metabolitov, ki se medsebojno razlikujejo po velikosti in kompleksnosti strukture. Naravni fenoli so lahko enostavne molekule, kot so fenolne kisline, ali pa visoko polimerizirane spojine, kot so tanini. Osnovni skelet predstavlja benzenski obroč na katerega je vezana vsaj ena hidroksilna skupina (-OH) (Kale, 2008; Robinson, 2003). Glede na kemijske lastnosti jih delimo na tri večje skupine (glej sliko 8):

- polifenoli (tanini in flavnoidi),
- preprosti fenoli (fenolne kisline)
- in v skupino razno.



SLIKA 8: RAZDELITEV FENOLOV GLEDE NA KEMIJSKE LASTNOSTI (NIJVELDT, 2001)

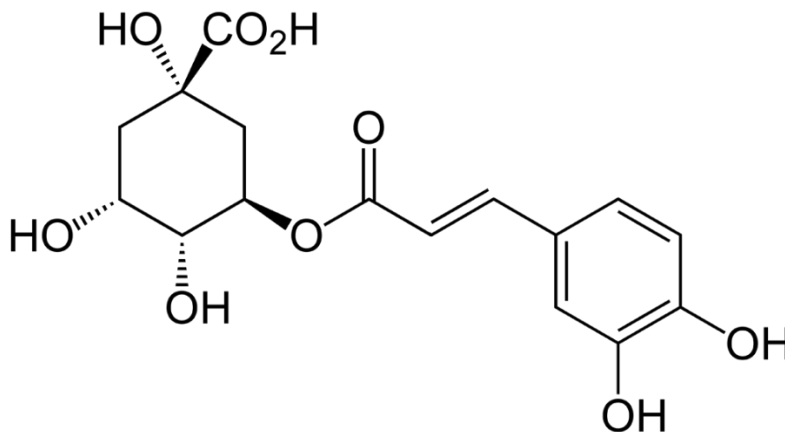
V nadaljevanju bomo na kratko predstavili fenolne kislin ter flavnoide, saj so ključni za nadaljnje razlage. Glede na rezultate tekočinske kromatografije, ki smo jo opravili v sklopu lanske raziskave (Koletnik, 2018), smo katehin in klorogensko kislino določili kot poglobiti komponenti ekstraktov *Artemisia annua* L.

2.2.1 FENOLNE KISLINE

Fenolne kisline so kemijsko definirane kot karboksilni derivati fenolov. Delijo se na dva širša razreda: hidroksilcinamične in hidroksilbenzoične kisline. V skupino fenolnih kislin pogosto klsificiramo tudi analoge aldehydov, kot na primer vanilin.

Klorogenska kislina

Klorogenska kislina je trivialno ime, ki se uporablja za opredelitev glavne fenolne spojine v kavi, estra kofeinske kisline in (-) - kininske kisline, lahko tudi ferulične ali kumarinske kisline. Strukturna formula klorogenske kisline je prikazana na sliki 9. Klorogenska kislina je vmesni metabolit pri sintezi lignina, v velikih koncentracijah se nahaja v kavi.



SLIKA 9: STRUKTURNA FORMULA KLOORGENSKE KISLINE (WIKIPEDIA, 2018)

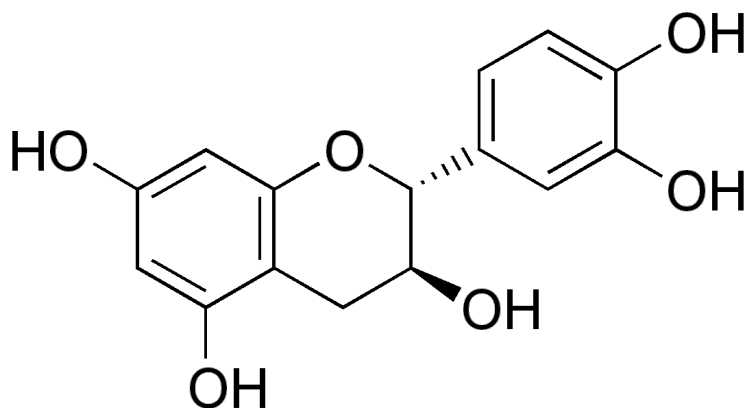
Klorogenska kislina in njeni derivati so pogosto preučevani zaradi svojih bioloških in kemijskih lastnosti. Dokazana je bila antioksidativna aktivnost kafeoilkinske kisline, dikafeoilkinska kislina je pokazala močno inhibitorno aktivnost proti encimom integraze (Trugo, 2003).

2.2.2 FLAVONOIDI

Flavonoidi je skupno ime za aromatične spojine s petnajstimi ogljikovimi atomi in tremi obroči (C6-C3-C6). Več kot 4.500 različnih flavonoidov je bilo izoliranih iz rastlin, po velikosti so malce večji od kvinonov in se nahajajo v vseh vaskularnih rastlinah.

Katehin

Katehin sestavljata dva benzenska obroča in dihidropiranski heterocikel, kjer je na tretjem ogljikovem atomu vezana hidroksilna skupina, skeletna formula je predstavljena na sliki 9. Molekula vsebuje dve kiralni središči, na ogljikovem atomu 2 in 3, kar pomeni, da ima štiri diastereoizomere. Dva, ki sta trans konfigurirana, se imenujeta katehin, druga dva, ki sta cis konfigurirana, pa epikatehin. Najpogostejša stereoizomera sta (+) – katehin in (-) - katehin ali ent-katehin, med seboj jih ločimo s polarimetrijo. Tako katehin kot epikatehin sta osnovni enoti proantocianidov, vrste taninov.



SLIKA 10: STRUKTURNA FORMULA KATEHINA (WIKIPEDIA, 2018)

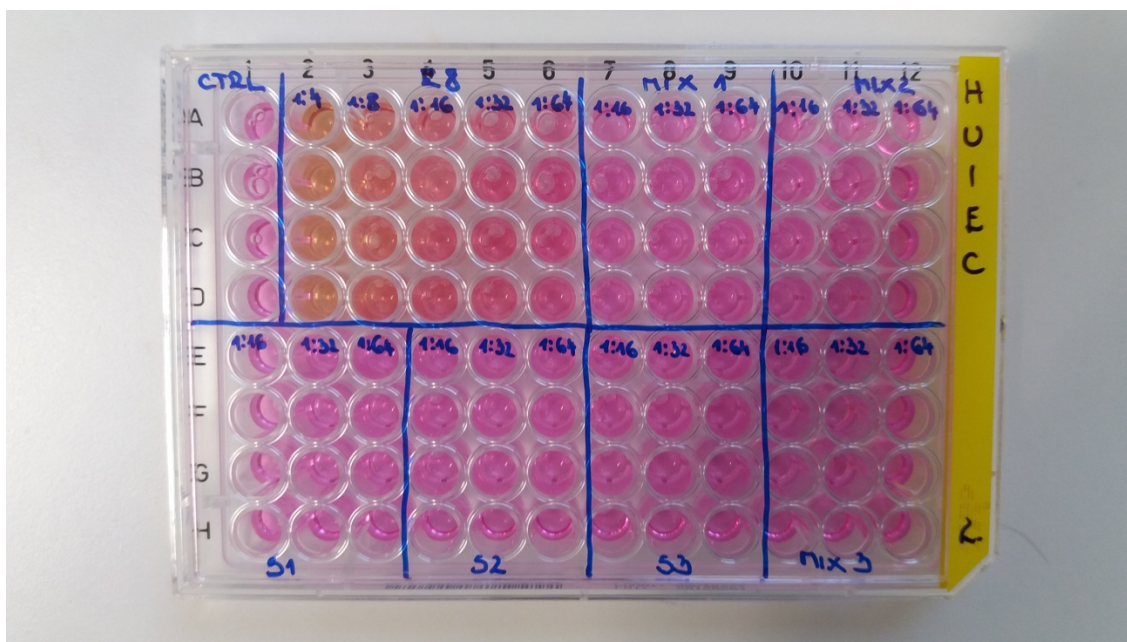
Prisoten je v rastlinah, sadju, zelenem čaju, vinu, kakavu in mnogih drugih izdelkih naravnega izvora. Njegovo antioksidacijsko delovanje je bilo dokazano z in vitro, kot tudi in vivo testi. Vpliva na molekularne mehanizme, ki sodelujejo pri angiogenezi, razgradnji zunajceličnega matriksa, pri mehanizmih, ki regulirajo celično smrt in odpornost na zdravila proti raku. Pozitivna korelacija je bila opažena med porabo zelenega čaja in kardiovaskularnim zdravjem, kar se pripisuje se katehinovim antioksidativnim, antitrombogenim in protivnetnim učinkom (Tao, Lambert, 2014).

2.3 IN VITRO TESTIRANJA

Zaradi učinkovitosti in vse pogostejše rabe *in vitro* testov v medicinske namene smo se v raziskavi odločili nanesti ekstrakte rastline *Artemisia annua* L. na epitelne črevesne celice, saj smo želeli preučiti njihovo biološko aktivnost.

Pri eksperimentiranju v grobem ločimo med *in vitro* ter *in vivo* modeli. Slovar slovenskega knjižnega jezika *in vitro* (< lat. *vitrium* 'steklo') definira kot "ki poteka zunaj živega organizma, navadno v epruveti ali drugi laboratorijski posodi" (<https://fran.si/iskanje?View=1&Query=in+vitro>; pridobljeno 15. 1. 2019), prikazan na sliki 11, *in vivo* (< lat. *vivus* 'živ') pa kot "ki poteka znotraj živega organizma" (<https://fran.si/iskanje?View=1&Query=in+vivo>; pridobljeno 15. 1. 2019).

Celične kulture, pridobljene iz različnih človeških ali živalskih tkiv, se trenutno uvrščajo med najboljše izbire pri opravljanju bioloških raziskav in ugotavljanju toksičnosti. *In vitro* testni sistemi, ki se uporabljajo za vrednotenje sprememb v bioloških procesih z uporabo celic, celičnih linij ali določenih celičnih komponent, imajo ključno vlogo pri vzpostavljanju *in vitro* metodologij za diagnosticiranje in zdravljenje določenih obolenj. *In vitro* toksikološki testi ne omogočajo samo globljega razumevanja celične aktivnosti, marveč tudi pomagajo izboljšati in povečati učinkovitost terapij, hkrati tudi zmanjšujejo testiranje z uporabo *in vivo* modelov, pri čemer se ravna po načelih treh R-jev (Shingatgeri, 2018).



Načela 3R (angleško: replacement, refinement and reduction) uveljavljajo zmanjšanje, izboljšanje ter nadomestne alternative eksperimentiranju z uporabo živali, z namenom premostiti globel med *in vivo* testi toksičnosti baziranimi na živalih, in novimi *in vitro* metodami, baziranimi na celičnih in tkivnih kulturah. Predstavitev načel 3 R (Srivastava et al, 2018):

- Prvi R, angl. reduction ali zmanjšanje, se nanaša na zniževanje števila živali, ki se uporabljajo za poskuse. Morebiten primanjkljaj podatkov, ki bi se izkazal kot posledica zmanjšanega števila živali, je potrebno ublažiti z izsledki *in vitro* raziskav.
- Drugi R, angl. refinement ali izboljšanje, se nanaša na zmanjševanje trpljenja in travm, ki jih doživljajo živali, izpostavljene poskusom. Priporoča se uporaba tistih živalskih vrst, ki se na filogenetski lestvici nahajajo nižje. S tehniko izboljševanja lahko tako dosežemo zmanjšanje ali (vsaj delno) zamenjavo živalskih vrst.
- Tretji R, angl. replacement ali nadomeščanje, se nanaša na uporabo raziskovalnih tehnik, ki ne vključujejo živali, ampak temeljijo na uveljavljenih celičnih linijah ter proliferaciji celičnih kultur in tkiv. S tem se izognemo poskusom na živalih za namene različnih študij.

In vitro testiranja se najpogosteje izvajajo med razvojem novih zdravil, ko raziskovalci poskušajo razumeti pogosto zapletene procese bolezni in/ali mehanizme delovanja zdravil na celični in molekularni ravni. Tako se npr. na področju biotehnologije celične kulture v veliki meri uporabljajo pri razvijanju specifičnih in manj tveganih cepiv in biološko podobnih snovi po vzorcu bioloških molekul, kot npr. inzulin. Prav tako zagotavljajo potrebne podlage za nekatera biološka testiranja, kot je npr. testiranje učinkovitosti in potentnosti cepiv ter odkrivanje nezaželenih spojin v končnih produktih. Dokazano je, da so *in vitro* testi, pri katerih se uporabljajo mikroorganizmi ali človeške oz. živalske celične linije, pripomogli k identificiranju in ugotavljanju genotoksičnosti kemikalij ter k predvidevanju akutnih lokalnih toksičnosti ksenobiotikov. V študijah *in vitro*, ki preučujejo toksične učinke, se uporabljajo različne jetrne, ledvične, pljučne, srčne in možganske celične vrste (Stacey, 2004).

Ob tem pa je potrebno opozoriti tudi na dejavnike tveganja ob delu s kulturami. Najpomembnejši ovirajoč dejavnik, je celovitost celične linje z nespremenjenimi primarnimi karakteristikami celic tkiva, od koder so bile izolirane (ohranjen fenotip). Te se namreč ohranijo samo, če ne pride do kontaminacije z mikroorganizmi ali drugimi celičnimi kulturami. Do kontaminacije najpogosteje prihaja med nesterilnimi postopki dela. Tvegano je tudi ravnanje s citotoksičnimi kemikalijami in hitroprodornimi topili, kot sta tekoči dušik in CO₂.

Z raziskavo bomo nadaljevali, saj želimo preučiti učinkovitost ekstraktov rastline *Artemisia annua* L. na rakastih kulturah. V ta namen bomo prav tako uporabili *in vitro* model, in sicer model raka črevesja, na katerem bomo testirali različne biološke učinke pripravljenih ekstraktov. Obstoječi *in vitro* modeli raka, so se že izkazali kot nepogrešljivo orodje za identifikacijo rakotvornih snovi, razvoj novih terapij raka, pregled učinkovitosti obstoječih učinkovin za ta namen ter zagotavljanje vpogleda v molekularne mehanizme rasti tumorjev in metastaziranja.

2.4 METODE

V sklopu poglavja bodo predstavljene analitične kemijske metode, uporabljene v empiričnem delu naloge, in priprava celične linije.

2.4.1 EKSTRAKCIJE

2.4.1.1 SUPERKRITIČNA EKSTRAKCIJA⁵

Ekstrakcija iz trdnih delcev s superkritičnimi tekočinami (fluidi) – SFE⁶ 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, brezkofeinsko 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).

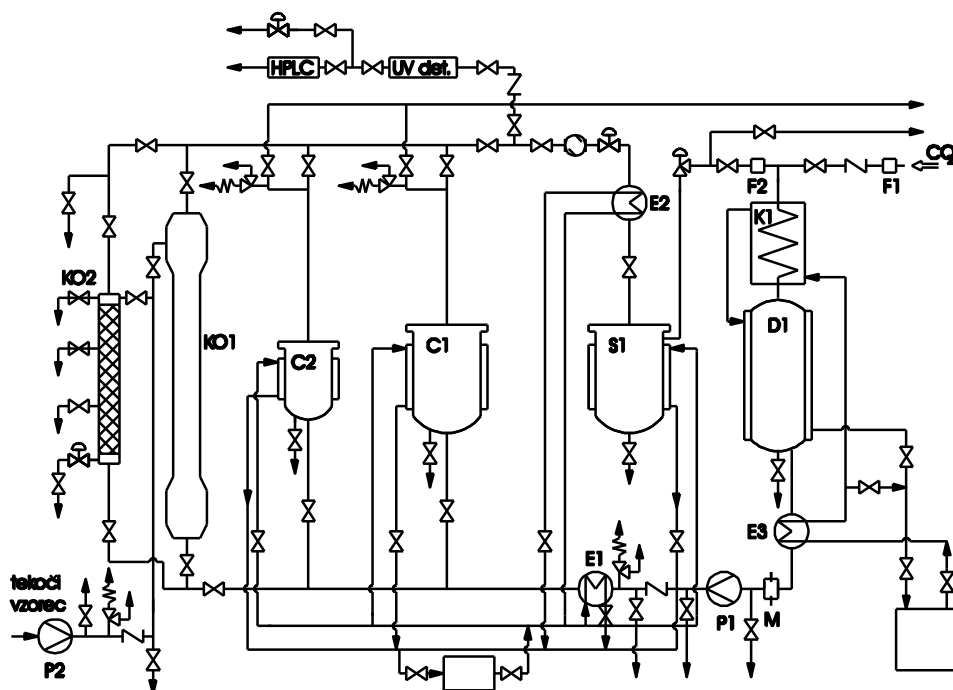
2.4.1.1.1 VISOKOTLAČNA EKSTRAKCIJA NA PILOTNI APARATURI UHDE

Na sliki 12 je prikazana procesna shema aparature namenjene superkritični ekstrakciji v t. i. pilotnem merilu. Fluid, ki teče skozi filter F1 in se ohladi ter kondenzira v kondenzatorju K1, steče v rezervoar. Na poti do visokotlačne membranske črpalke, s pomočjo katere vzpostavimo željen delovni tlak, se med tokom skozi toplotni menjalnik E3 dodatno ohladi do 0 °C. Po vzpostavitvi tlaka se fluid v toplotnem menjalniku greje na delavno temperaturo in teče nato v enega izmed ekstraktorjev C1 (4 L) ali C2 (1 L), ki je bil predhodno napolnjen s poljubno količino surovega materiala, ki ga želimo ekstrahirati. Topljenec se raztopi v topilu (CO₂). Separacija komponent poteka v separatorju S1. CO₂ upari. Topljenec se izloči, lahko ga vzamemo skozi ventil na dnu

⁵ Povzeto po Koletnik, 2018

⁶ angl. Supercritical fluid extraction (ekstrakcija s superkritičnimi fluidi)

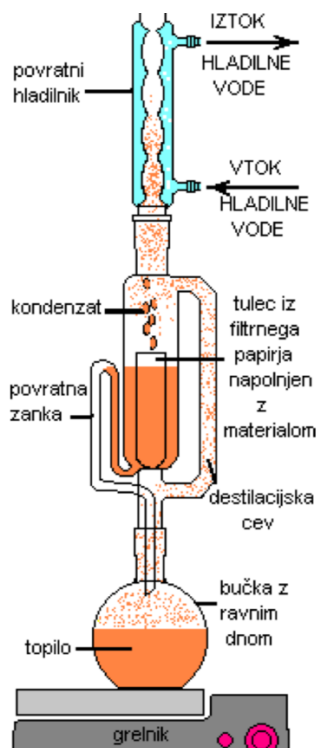
separatorja. Preostali CO₂ teče skozi filter v kondenzator in rezervoar, kjer se reciklira (Škerget et al., 1998).



SLIKA 12: SHEMA PILOTNE APARATURE ZA EKSTRAKCIJO - UHDE (ŠKERGET ET AL., 1998)

2.4.1.2 EKSTRAKCIJA PO SOXHLETU

Za ekstrakcijo iz trdnih zmesi pogosto uporabljamo ekstrakcijski aparat po Soxhletu, ki ga je leta 1879 izumil Franz von Soxhlet (1884-1926). Aparat je bil prvotno zasnovan za ekstrakcijo lipidov iz trdnega materiala (slika 12). Ekstrakcijsko topilo se v bučki segreva z grelno ploščo. Pare topila potujejo po destilacijski cevi do kondenzatorja, kjer se utekočinijo in zbirajo v zbirni posodi s papirnim tulcem, napolnjenim z mletim materialom. Kondenzat topila kaplja na material v tulcu, pri čemer nastaja raztopina spojin, ki jih ekstrahiramo. Ko raztopina napolni zbirno posodo do višine odtoka, po principu natege, steče topilo nazaj v bučko in postopek se ponovi. Ekstrahirane spojine se nabirajo v bučki, v tulcu pa ostanejo netopne sestavine prvotne zmesi.



SLIKA 13: SHEMA SOXHLET-OVEGA APARATA (PETROVIČ, 2013)

2.4.1.3 ULTRAZVOČNA EKSTRAKCIJA

Ultrazvočna ekstrakcija je metoda ekstrakcije, s katero lahko izboljšamo kvaliteto vzorca, tj. odstranimo nezaželene komponente, in povečamo izkoristek, namreč topilo ali mešanico topil lahko optimiziramo tako, da zagotovimo največji možni izkoristek. Hkrati lahko vzporedno poteka več ekstraktij in postopek ne zahteva posebne laboratorijske opreme. Kakorkoli, ker sta selektivnost in obogatenost vzorcev omejena, so ponavadi potrebni dodatni koraki za določanje vsebnosti vseh spojin v vzorcu (Ridgway et al, 2007).

2.4.2 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA / MASNA SPEKTROMetriJA (LC / MS)

Analitska metoda z uporabo tekočinske kromatografije (LC) – masne spektrometrije (MS) se najpogosteje uporablja pri ločevanju večjih in nehlapljivih molekul, npr. proteinov in kompleksnih peptidov. Metoda je priljubljena, ker omogoča separacijo kompleksnih zmesi, količinsko določanje analitov in identifikacijo organski snovi.

V tekočinski kromatografiji je bistvenega pomena izbira stacionarne in mobilne faze, tako se namreč učinkovito ločujejo komponente vzorca glede na njihovo težo in afiniteto za mobilno,

oziroma stacionarno, fazo kolone. Hkrati s tem povzročamo razdrobljenost vzorca in njegovo anionizacijo zaradi izgube H^+ ionov. Ko zapustijo LC se ionizirajo v masnem spektrometru z uporabo elektronskih ali kemijskih virov ionizacije. Ionizirane molekule se nato pospešeno premikajo do masne analize, kjer se ločijo glede na razmerja med maso in nabojem (m/z). V zadnjem koraku se po ionski zaznavi in analizi ustvari graf, kjer vsaka komponenta predstavlja enega izmed njegovih vrhov. Višina vrhov je sorazmerna količini komponente v začetnem vzorcu (ThermoFisher, 2018).

2.4.3 TESTI ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDACIJSKE UČINKOVITOSTI⁷

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:

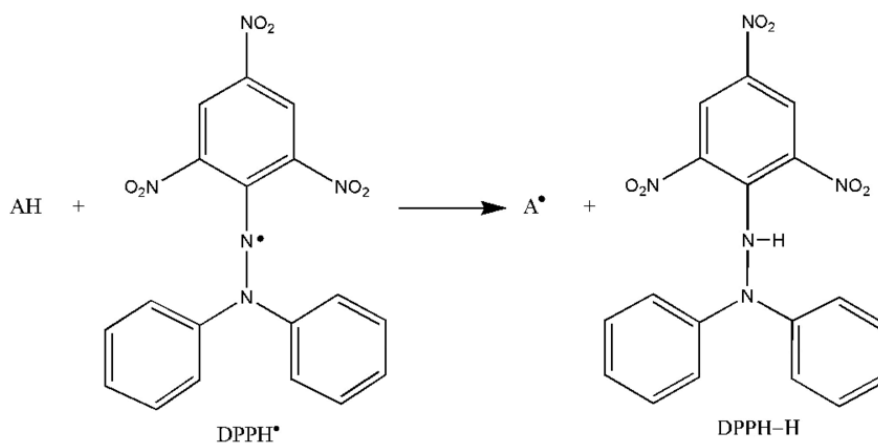
1. Testi, ki merijo zmožnost antioksidanta, da odda vodikov atom;
2. Testi, ki temeljijo na reakcijah prenosa elektrona in merijo stopnjo spremembe barve zaradi reduciranega oksidanta; to so:
 - Zmogljivost, izražena kot ekvivalent troloksne raztopine.
 - Parameter antioksidanta za zniževanje železovega iona.
 - Oksidacija bakra (II).
 - Vsebnost skupnih fenolov, določenih s Folin-Ciocalteujevim reagentom.
 - Določanje antioksidativnega delovanja z 2,2-difenil-1-dipikrilhidrazilom (DPPH).
3. Ostali *in vitro* testi za določanje antioksidativne zmožnosti.

Ker fenolne spojine verjetno niso edine spojine z antioksidacijsko sposobnostjo, bomo v naši raziskavi izvedli še DPPH-test.

⁷ Povzeto po Koletnik, 2018 (str. 27-28)

2.4.3.1 UPORABA DPPH (2,2-DIFENIL-1-PIKRILHIDRAZIL)⁸

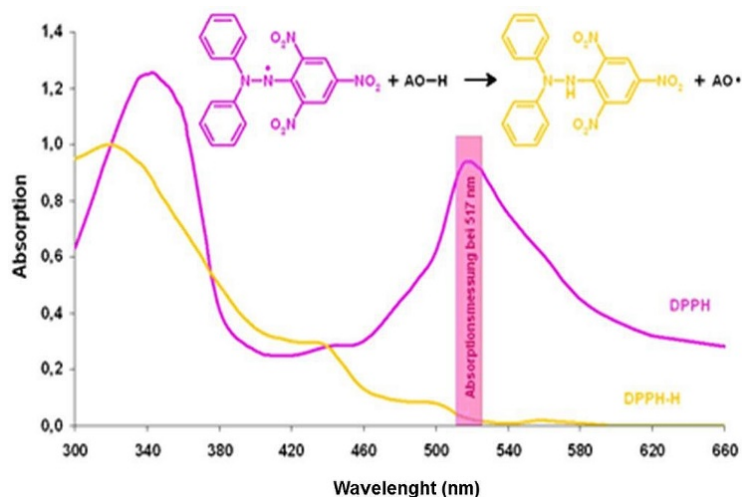
DPPH \cdot je eden izmed stabilnejših in komercialno dostopnejših organskih dušikovih radikalov. Barva metanolne raztopine DPPH \cdot je vijolična in ima absorpcijski maksimum pri 515 nm. Ko antioksidanti reagirajo z DPPH \cdot radikali (po mehanizmu prenosa elektrona, slika 14), nastane produkt difenildipikrilhidrazin – 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 et al., 2005)



SLIKA 14: STRUKTURA DPPH PRED IN PO REAKCIJI Z ANTIOKSIDANTOM (HUANG ET AL., 2005)

Hitrost in s tem tudi učinkovitost lahko spremljamo s spremembo absorbance pri valovni dolžini z največjo absorbcijo (λ_{\max}), ki je 517 nm. Ob prisotnosti reductentov (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).

⁸ Povzeto po Koletnik, 2018



SLIKA 15: SPREMEMBE V ABSORBCIJSKEM SPEKTRU (OD VIJOLIČNE DO RUMENE) V REAKCIJAH DPPH Z RADIKALI REDUCENTI

2.4.4 CELICE

2.4.4.1 HUIEC PRIPRAVA

HUIEC so hitro rastoče črevesne epitelne celice. Izhajajo iz osnovnega tkiva človeškega darovalca, nakar so bile pripravljene s selektivno tripsinizacijo in kloniranjem, pri čemer so odstranili morebitne druge tipe celic. V primarnih fazah so bili v suspenziji prisotni mnogi različni tipi celic, po večih ponovljenih tripsinizacijah in kloniranju je kultura razvila uniformno epitelno morfologijo. Celice so bile v postopku ustvarjanja nadaljnih pasaž rutinsko kultivirane v T25 bučkah in inkubirane pri 37 °C ter 5 % CO₂ (Gradišnik, 2015)



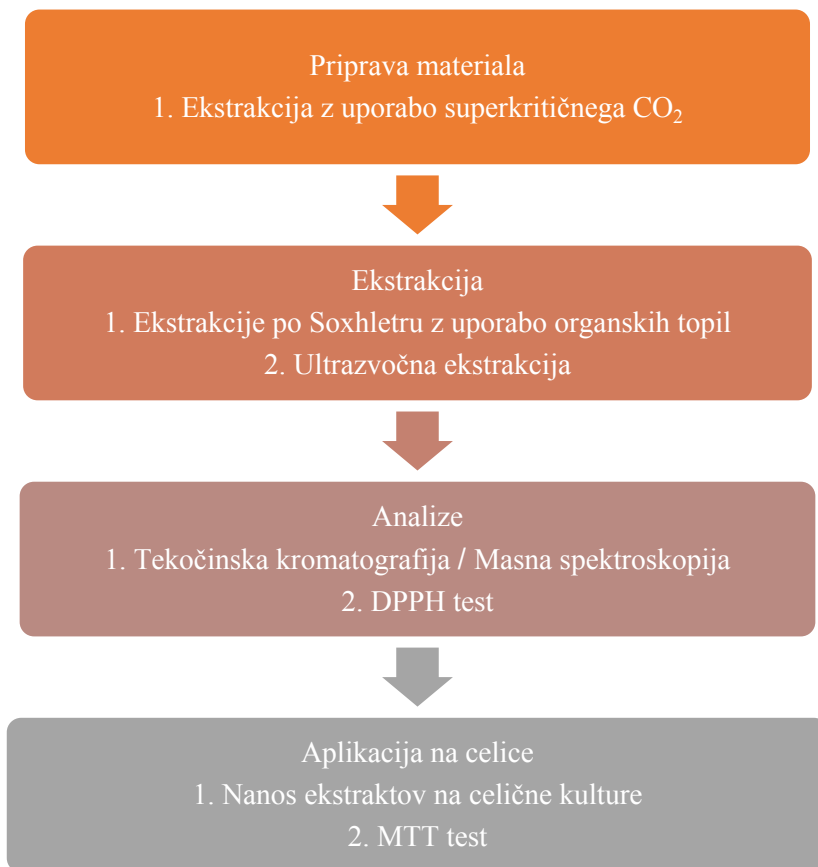
SLIKA 16: CELIČNA KULTURA HUIEC UPORABLJENA V EMPIRIČNEM DELU

2.4.4.2 MTT TEST

MTT test se uporablja za določanje viabilnosti celičnih kultur. Encimska redukcija 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoli bromida (MTT) do MTT-formazana je katalizirana s strain mitohondrijske sukcinat dehidrogenaze, zato je MTT test odvisen od mitohondrijske respiracije in neposredno služi za oceno energijske kapacitete celice. Je kolometrijska reakcija in kot končni rezultat se meri absorbcija svetlobe po dodatku 10% reagenta (Kelc, 2015).

3 EMPIRIČNI DEL

Celoten potek praktičnega dela je prikazan na organigramu 1.



ORGANIGRAM 1: POTEK LABORATORIJSKEGA DELA

3.1 IZVEDBA EKSTRAKCIJE S SUPERKRITIČNIM CO₂

V sklopu priprave rastlinskega materiala smo izvedli dve ekstrakciji s superkričnim CO₂, ki sta se razlikovali v tlaku, tempertauri in času trajanja. Pogoji so bili izbrani glede na rezultate lanske raziskovalne naloge, kjer so se izkazali za učinkovite. Surov material smo namestili v ekstraktor, skozi katerega je tekel superkrični fluid in sicer s pretokom 15 litrov na uro.

Prva ekstrakcija je potekala 2 uri pri tlaku 200 barov (± 0.1 bar) in temperaturi 50 °C (± 1 °C). Druga ekstrakcija je potekala 2 uri pri tlaku 300 barov (± 0.1 bar) in temperaturi 35 °C (± 1 °C). Pogoji separatorja se med seboj niso razlikovali, vzdrževal se je tlak 50 barov (± 0.1 bar) in

temperatura $20 (\pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$. Tako pridobljena ekstrakta smo oznčili z V_1 (material pridobljen s prvo ekstrakcijo) in V_2 (material pridobljen z drugo ekstrakcijo).

Po opravljenih ekstrakcijah smo material temu primerno shranili do nadaljne uporabe. V reagenčnih stekleničkah, s čimer smo preprečili izhlapevanje eteričnih olj, je bil postavljen v hladilnik pri $6 \text{ }^\circ\text{C} (\pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$.

3.2 IZVEDBA EKSTRAKCIJE PO SOXHLETU

Z materialom, obdelanim s superkritičnim CO_2 , smo nato izvedli ekstrakcije po Soxhletu z uporabo različnih organskih topil, ki so se med seboj razlikovala v polarosti:

- Metanol; dipolni moment $\approx 1,69 \text{ D}$ (National Center for Biotechnology Information, 2018).⁹
- Etanol; dipolni moment $\approx 1,66 \text{ D}$ (National Center for Biotechnology Information, 2018).
- Voda; dipolni moment $\approx 1,85$ (National Center for Biotechnology Information, 2018).

Za izvedbo prvih ekstrakcij smo uporabili 130 mL metanola, za izvedbo drugih dveh pa smo pripravili raztopino vode in etanola v razmerju 50 : 50 (volumen %), torej 65 mL vode ter 65 mL etanola. Ekstrakcije so vzporedno potekale 4 ure. Vse aparature smo prekrili z aluminijevo folijo ter tako minimizirali toplotne izgube. Ekstrakcijsko topilo smo v bučkah segrevali z grelnimi ploščami, $75 \text{ }^\circ\text{C} (\pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$ v primeru metanola ter $105 \text{ }^\circ\text{C} (\pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$ v primeru raztopine 50 % etanola. Kondenzat je kapljal na trdno zmes v tulcu, pri čemer je nastajala raztopina. Postopek se je ponovil, ko je raztopina napolnila nastavek do vrha in po principu natege stekla nazaj v bučko, kjer so se nabirale ekstrahirane spojine.

Ker se je ob ekstraktu v bučkah nabralo tudi topilo, smo po končanih ekstrakcijah slednje odstranili z uporabo rotavaporja Buechi R-114 pri temperaturi $40 \text{ }^\circ\text{C}$ in podtlaku v območju od 400 –100 mbar.

⁹ Vir: "Methanol". The PubChemProject. USA: National Center for Biotechnology Information, 2018; pridobljeno 28. 12. 2018.

Po odstranitvi topila smo ekstrakte postrgali s sten bučk, jih zatehtali v steklene posodice ter shranili v hladilniku pri 6 °C (\pm 1 °C) in s tem preprečili potencialno razgradnjo ekstrahiranih aktivnih komponent.

3.3 IZVEDBA EKSTRAKCIJE Z UPORABO ULTRAZVOČNE KOPELI

Tudi v primeru ekstrakcije z ultrazvočno kopelijo smo uporabili predhodno obdelan material s superkritičnim CO₂ ter 130 mL metanola, oziroma raztopine etanol – voda. Ekstrakcije so potekale 2 uri (štirikrat 30 minut) pri temperaturi 40 °C (\pm 0.1 °C). Na sliki 17 je prikazana uporabljena naprava za izvedbo ekstrakcije z uporabo ultrazvočne kopeli.

Po končanih ekstrahiranjih smo s pomočjo vakuuma vzorce prefiltrirali, da smo ločili raztopino topila z ekstrahiranimi snovmi od trdnega rastlinskega materiala. Sledila je odstranitev topila z uporabo rotavaporja, upoštevali so se enaki pogoji kot v primeru odstranitve topila pri ekstraktih ekstrahiranih po Soxhletu (glej poglavje 2.4.1.2).

Po odstranitvi topila smo ekstrakte postrgali s sten bučk, jih zatehtali v steklene posodice ter shranili v hladilniku pri 6 °C (\pm 1 °C) in s tem preprečili potencialno razgradnjo ekstrahiranih aktivnih komponent.



SLIKA 17: ULTRAZVOČNA KOPEL

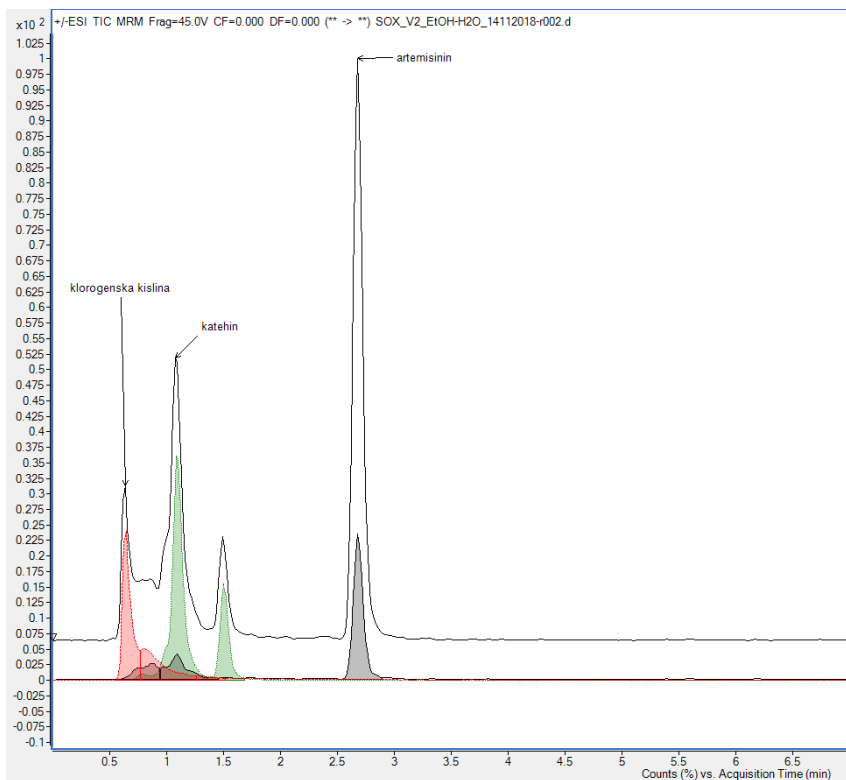
3.4 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA / MASNA SPEKTROMETRIJA

Za količinsko določanje analitov smo opravili analizov vzorcev z uporabo tekočinske kromatografije / masne spektrometrije (LC/MS). Ker smo v naslednjem koraku vzorce nanašali na celično kulturo, je bilo potrebno ob metanolnih raztopinah pripraviti še vodne raztopine (metanol na celice deluje toksično).

V 2 mL bučko z ravnim dnom smo zatehtati približno 30.00 mg (± 0.01 g) ekstrakta. Pripravljene vzorce so se zato razlikovali po koncentraciji, izračuni so bili temu prilagojeni. Ko smo zatehtali ekstrakte, smo bučke do oznake napolnili z vodo oz. metanolom in raztopino prefiltrirali v vialo.

Analize so potekale na tekočinskem kromatografu proizvajalca Agilent 1200 z masnim spektrometrom Agilent 6460 JetStream s trojnim kvadropolom. Aparat omogoča kvantitativno analizo znanih spojin. Separacija komponent je bila izvedena na kromatografski koloni Agilent Poroshell C18 (dimenzij 150 x 4,6 mm z delci 2,7 μ m) s pomočjo mobilne faze voda in acetonitril z dodano mravljično kislino v deležu 0,1 vol. %. Pretok mobilne faze je bil 0,4 mL/min in retenzijski časi komponent: za artemisinin 2,7 min, za klorogensko kislino 0,6 min in za katehin 1,1 min. Kvantifikacija komponent je bila izvedena z masno spektrometrijo na ionih za artemisinin

283,3 -> 265, za klorogensko kislino 353 -> 191 in za katehin 289 -> 245 s pomočjo umeritvene krivulje (grafi 13, 14 in 15 so predstavljeni v Prilogi), ki je bila predhodno določena za vsako posamezno komponento. Primer kromatograma ločitve komponent je prikazan na sliki 18.



SLIKA 18: KROMATOGRAM LOČITVE KOMONENT V EKSTRAKTU IZ PELINA

Z enako metodo smo določili vsebnost iskanih komponent v vodni in metanolni raztopini.

3.5 DOLOČITEV ANTIOKSIDACIJSKE UČINKOVITOSTI

V 100 mL merilno bučko smo zatehtali 0.00400 (± 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 Vernierjevimi 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 (λ_{\max}). Pri tej valovni dolžini smo določili antioksidativno učinkovitost ekstraktov s pomočjo spodnje enačbe 1 (Yen in Duh, 1994; Marković, Talić, 2013):

$$\% \text{ ANTIOKSIDACIJSKA UČINKOVITOST (INHIBICIJA)} = \frac{(A^{\circ} - A')}{A^{\circ}} \cdot 100 \quad (1)$$

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 kontrolo smo namesto ekstrakta uporabili 0.5000 mL metanola. Meritve smo opravljali v časovnih intervalih 0, 3, 5, 7 in 9 minut.

Opravili smo štiri sklope meritev, ki so se razlikovali po koncentraciji osmih vzorcev: 5,00 mg mL⁻¹, 2,50 mg mL⁻¹, 1,50 mg mL⁻¹ ter 1,00 mg mL⁻¹. Vzorci so bili raztopljeni v metanolu.

3.6 PRIPRAVA CELIC

Celice HUIEC enajste pasaže, gojene v inkubatorju pri 37 °C (± 0.1 °C) in atmosferskih pogojih s 5 % vsebnostjo CO₂, smo pripravili za nasaditev na mikroteterski ploščici s 96 vodnjaki (P96). V gojilno posodico T25 smo dodali 0.25 % raztopino tripsina, s čimer so se celice odlepile od podlage. V naslednjem koraku smo pripravili gojitveni medij, sestavljen iz Advanced DMEM (komercialno dostopni medij), ki vsebuje L-glutamin ter penicilin, ki smo mu dodali tripsin in serum, v tem primeru fetalni goveji serum (5 %).



SLIKA 19: CELICE HUVEC POD INVERTNIM SVETLOBNIM MIKROSKOPOM

Mikrotetrski ploščici s 96 vodnjaki smo razdelili na več delov: prvo kolono, ki je vsebovala zgolj medij in služila kot kontrola, drugo kolono, ki je služila kot kontrola medija z ekstrakti, vsebovala je namreč medij in ultra-čisto vodo,¹⁰ sledile so kolone 4 – 8 na prvi ploščici in 1 – 3 na drugi, ki so v prvem delu eksperimenta vsebovale medije z ekstrakti v različnih koncentracijah (1:2, 1:4, 1:8, razredčine se nanašajo na vsebnost v ekstraktih v Preglednicah 4 in 5). Vsak vodnjak je vseboval 100 μ L raztopine medija in suspenzije celic, 10.000 na vodnjak, zato je bilo slednje potrebno prešteti. V drugem delu eksperimenta smo postopek ponovili, pri tem pa nanesli ekstrakte v koncentracijah 1:16, 1:32 in 1:64 (razredčine se nanašajo na vsebnost v ekstraktih v Preglednicah 4 in 5).

Število celic v 1 mL tekočine smo določili z enačbo 2:

$$\frac{\text{število celic}}{\text{mL}} = \frac{\text{število celic}}{25} \cdot 10^6 \quad (2)$$

¹⁰ Voda z rezistenco 18.2 M Ω cm, pri temperaturi 25 °C.

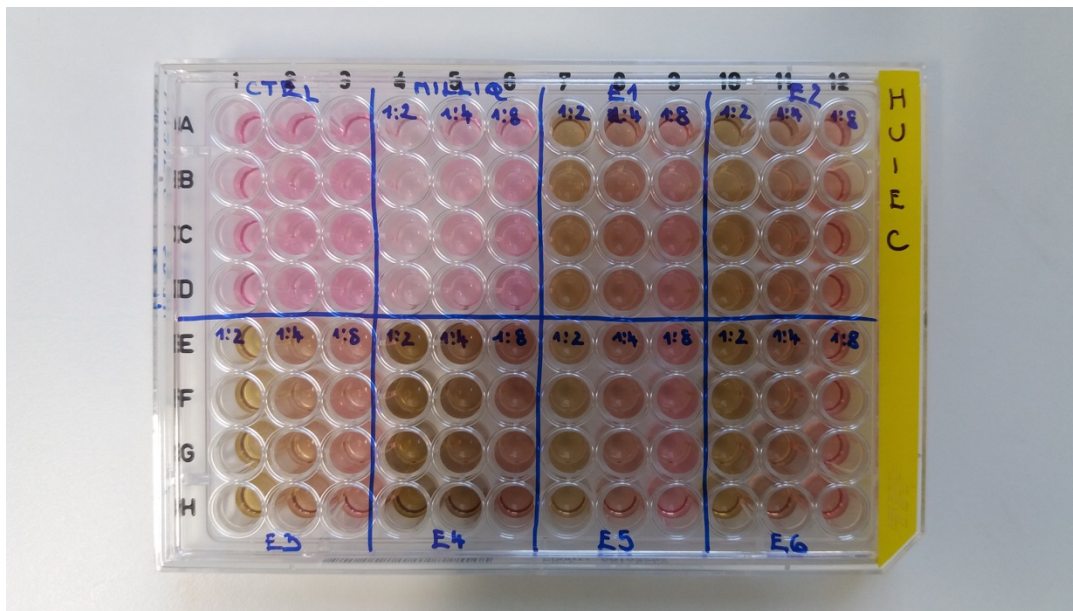
in sicer tako, da smo pod invertnim svetlobnim mikroskopom (Axiovert 40 CFL, Zeiss) s povečavo 50 x mikroskopirali 900 μ L 0.10 % tripanskega modrila, ki je obarvalo celice, in 100 μ L suspenzije celic na citometru znamke Malassez.

Glede na izračune je 7.1 mL suspenzije vsebovalo 2. 000. 000 celic, zato je bila končna raztopina, namenjena nanosu na dve mikrotetrski ploščici s 96 vodnjaki, pripravljena iz:

- 7.1 mL suspenzije celic,
- 1.1 mL FBS (5 % serum),
- 13.8 mL DMEM (medij).

3.6.1 MTT TEST

Po 24-ih urah inkubacije (primer mikrotetrske ploščice s 96 vodnjaki na sliki 20), ki je potekala pri 37 °C in 5 % CO₂, smo ugotavljali viabilnost celic s testom MTT. V vsak vodnjak smo dodali 10 μ L MTT- reagenta in ploščici inkubirali 3 ure na 37 °C, 5 % CO₂. Zatem smo odpipetirali medij iz vodnjakov, formirane vijolične kristalčke pa raztopili z dodatkom 100 μ L DMSO v vsak vodnjak. Sledila je meritev absorbance pri valovni dolžini 570 nm s spektrofotometrom Varioskan. Postopek je bil enak v prvem in drugem delu eksperimenta.



SLIKA 20: MIKROTETRSKA PLOŠČICA S 96 VODNJAKI PO INKUBACIJI

4 REZULTATI

Surov rastlinski material je bil obdealan s superkričnim CO₂ z namenom, da smo iz vzorcev izločili nepolarne oz. lipofilne snovi. Za izolacijo fenolnih ekstraktov iz obdelanega materiala smo uporabili različni metodi ekstrakcije. Pri prvi metodi, ekstrakcija po Soxhletu, smo primerjali razlike med učinkovitostjo dveh topil: metanola in 50 % etanola. Druga metoda ekstrakcije aktivnih spojin je potekala z uporabo ultrazvočne kopeli. Dobljene ekstrakte smo nato raztopili v metanolu in vodi ter opravili analize na vsebnost katehina, klorogenske kisline in artemisinina ter določili antioksidacijsko učinkovitost s stabilnim prostim radikalom DPPH. Ekstrakte, raztopljene v vodi, smo nato nanegli na črevesne epitelne celice in preverili obnašanje celic ob prisotnosti raztopin ter s tem določili varnost in primernost ekstraktov.

4.1 IZKORISTKI EKSTRAKCIJ

V nadaljevanju bomo uporabljali sledeči način označevanja vzorcev:

PREGLEDNICA 2: SISTEM OZNAČEVANJA VZORCEV EKSTRAKTOV

Oznaka vzorca	Pogoji obdelave	Tip ekstrakcije	Uporabljeno topilo
V ₁	200 barov (± 0.1 bar), 50 °C (± 1 °C)	Ekstrakcija po Soxhletu	50 % etanol
V ₂	300 barov (± 0.1 bar), 35 °C (± 1 °C)	Ekstrakcija po Soxhletu	50 % etanol
V ₃	200 barov (± 0.1 bar), 50 °C (± 1 °C)	Ekstrakcija po Soxhletu	metanol
V ₄	300 barov (± 0.1 bar), 35 °C (± 1 °C)	Ekstrakcija po Soxhletu	metanol
V ₅	200 barov (± 0.1 bar), 50 °C (± 1 °C)	Ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli	50 % etanol

V ₆	300 barov (± 0.1 bar), 35 °C (± 1 °C)	Ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli	50 % etanol
V ₇	200 barov (± 0.1 bar), 50 °C (± 1 °C)	Ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli	metanol
V ₈	300 barov (± 0.1 bar), 35 °C (± 1 °C)	Ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli	metanol

PREGLEDNICA 3: MASA VHODNEGA MATERIALA IN EKSTRAKTA, SOXHLET

Vzorec	Masa vhodnega materiala (g ± 0.01 g)	Masa ekstrakta (g ± 0.01 g)	Izkoristek (%)
V ₁	5,00	0,72	14,40
V ₂	5,00	0,54	10,80
V ₃	4,99	0,68	13,63
V ₄	5,00	0,56	11,20

PREGLEDNICA 4: MASA VHODNEGA MATERIALA IN EKSTRAKTA, ULTRAZVOČNA EKSTRAKCIJA

Vzorec	Masa vhodnega materiala (g ± 0.01 g)	Masa ekstrakta (g ± 0.01 g)	Izkoristek (%)
V ₅	5,00	0,42	8,40
V ₆	5,00	0,42	8,40
V ₇	5,00	0,40	8,02
V ₈	5,00	0,36	7,20

Izkoristki ekstrakcij po Soxhletu z uporabo organskih topil in izkosti ekstrakcij z uporabo ultrazvočne kopeli so bili izračunani po enačbi 3:

$$\% \text{ izkoristek} = \frac{\text{masa ekstrakta (g)}}{\text{masa obdelanega materiala (g)}} \times 100 \quad (3)$$

Iz preglednic 4 in 5 je razvidno, da pri vzorcih, ki so bili predhodno obdelani s superkritičnim CO₂ pri tlaku 200 barov in temperaturi 50 °C, v primerjavi z vzorci, obdelanimi pri tlaku 300 barov in 35 °C, dobimo višje izkoristke. Če primerjamo različna tipa ekstrakcij, je razvidno, da so bile

ekstrakcije po Soxhletu uspešnejše od ekstrakcij z ultrazvočno kopeljo, od tega je največji izkoristek viden pri ekstrakciji s 50 % etanolom. To sovпада s podatki iz literature, kjer Jin-yu Hao et al (2002) navajajo, da je izkoristek z uporabo etanola kot topila presegel izkoristke ekstraktov ekstrahiranih s heksanom in petroletrom in je znašal 12.3 %.

4.2 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA IN MASNA SPEKTROMETRIJA

Po opravljeni analizi z uporabo sklopljene tehnike tekočinske kromatografije in masne spektroskopije smo rezultate meritev zbrali v tabeli v prilogi 1. Ker je bila vsaka meritev vzorcov ponovljena trikrat, smo izračunali povprečne vsebnosti artemisininina, katehina in klorogenske kisline v posamičnih vzorcih, izračuni so predstavljeni v preglednicah 6 in 7. Pomembno je poudariti, da ko smo z DPPH metodo določili antioksidacijsko učinkovitost metanolnih vzorcev, smo za analitično tehniko LC / MS pripravili tako metanolne kot tudi vodne raztopine ekstraktov. V naslednjem koraku smo ekstrakte različnih koncentracij nanесли na celične kulture, za kar metanolne raztopine ne bi bile primerne, ker bi celice uničile. Predpostavili smo, da se lahko pri pripravi metanolnih in vodnih raztopin ekstraktov zaradi polarnosti topil raztopijo različne učinkovine oziroma različne količine učinkovin, zato smo ločeno analizirali oba tipa vzorcev.

PREGLEDNICA 5: VSEBNOSTI KOMPONENT V VODNIH RAZTOPINAH EKSTRAKTOV

Vzorec	Artemisinin (mg/g na mat.)	Katehin (mg/g na mat.)	Klorogenska kislina (mg/g na mat.)	Skupne vrednosti (mg/g na mat.)
V ₁	0.0502	7.065	0.1648	7.28
V ₂	0.0774	7.064	0.2836	7.425
V ₃	0.0745	6.553	0.3283	6.9558
V ₄	0.0365	3.492	0.2383	3.7668
V ₅	0.0259	0.0960	0.0599	0.1818
V ₆	0.0273	0.0836	0.0473	0.1582
V ₇	0.0288	5.309	0.1172	5.455
V ₈	0.0320	3.767	0.1147	3.9137

PREGLEDNICA 6: VSEBNOSTI KOMPONENT V METANOLNIH RAZTOPINAH EKSTRAKTOV

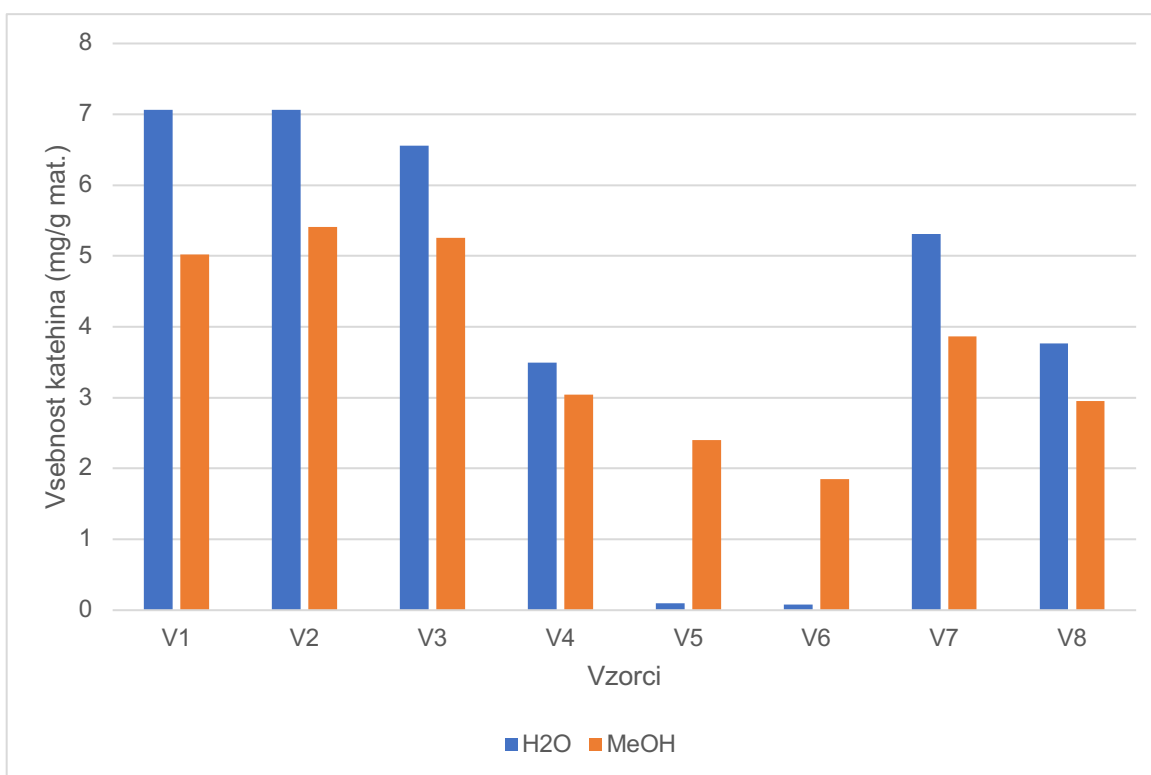
Vzorec	Artemisinin (mg/g na mat.)	Katehin (mg/g na mat.)	Klorogenska kislina (mg/g na mat.)	Skupne vrednosti (mg/g na mat.)
V ₁	0.0948	5.020	0.1665	5.2813
V ₂	0.1083	5.406	0.2990	5.8133
V ₃	0.1218	5.259	0.4272	5.808
V ₄	0.0919	3.040	0.2085	3.3404
V ₅	0.0282	2.402	0.0232	2.4534
V ₆	0.0462	1.847	0.0150	1.9082
V ₇	0.0535	3.868	0.1211	4.0426
V ₈	0.0590	2.949	0.1211	3.1291

Iz preglednic 6 in 7 je razvidno, da je ne glede na uporabljeno topilo v vzorcih najvišja vsebnost katehina. Sledi klorogenska kislina, v najmanjši meri pa smo določili tudi artemisinin.

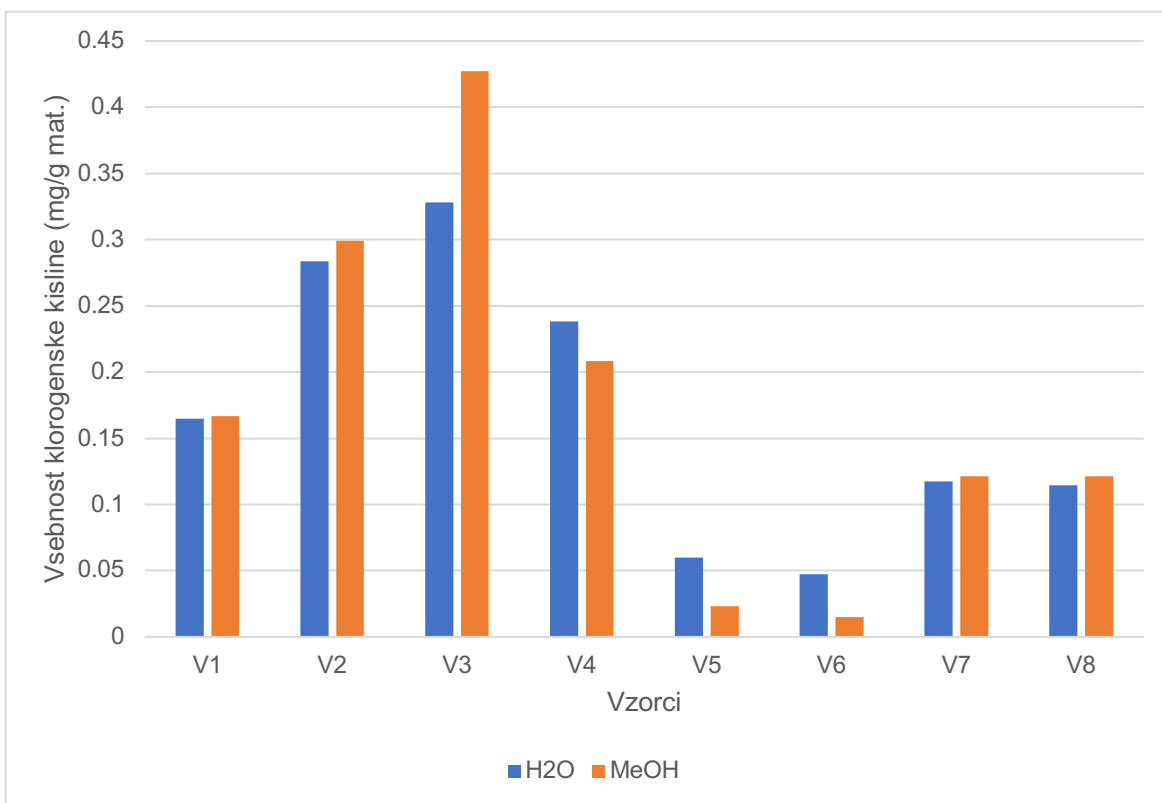
V grafih 1, 2 in 3 so prikazane količine posamezne spojine v vzorcu ekstraktov, pri katerih smo kot topilo uporabili metanol, in ekstraktov, pri katerih smo kot topilo uporabili vodo.



GRAF 1: PRIMERJAVA VSEBNOSTI ARTEMISININA V VODNIH IN METANOLNIH RAZTOPINAH



GRAF 2: PRIMERJAVA VSEBNOSTI KATEHINA V VODNIH IN METANOLNIH RAZTOPINAH



GRAF 3: PRIMERJAVA VSEBNOSTI KLOROGENSKE KISLINE V VODNIH IN METANOLNIH RAZTOPINAH

Po opravljeni analizi lahko zatrdimo, da vzorci vsebujejo največ katehina, sledi klorogenska kislina, najmanj pa je artemisinina. Iz grafov tako vodnih kot tudi metanolnih raztopin je razvidno, da je v povprečju najbogatejši vzorec V₂, torej tisti, čigar material je bil obdelan s superkričnim CO₂ pri 300 barih in 35 °C ter nato ekstrahiran s klasično ekstrakcijo po Soxhletu z uporabo 50 % etanola. Potrebno je poudariti, da pa V₂ ni izkazal najvišje vsebnosti aktivnih spojin v vseh primerih. V primerih vodnih raztopin je V₂ izkazal najvišji vsebnosti artemisinina in katehina. V primerih metanolne raztopine pa je izkazal najvišjo vsebnost katehina, pri čemer vzorčeva antioksidacijska učinkovitost pri koncentraciji 5 mg/mL po petih minutah doseže 94,28 %, kar je druga najvišja izmerjena vrednost.

4.3 ANTIOKSIDACIJSKA UČINKOVITOST

Oksidacija lahko vodi do nastanka prostih radikalov, ki veržino reagirajo in lahko poškodujejo celice. Antioksidanti so spojine, ki oksidacijo zavirajo, zato nas zanima antioksidacijska učinkovitost ekstraktov, tj. zmožnost preprečevanja nastanka prostih radikalov.

Kot navedeno pod metodami (razdelek 3.5), smo kot valovno dolžino z najvišjo absorbanco določili valovno dolžino pri $517,7 (\pm 0.006) \lambda$, povzeto po metodi Yen in Duh (1994) in Marković, Talić (2013).

V preglednicah od 11 do 14 (zbranih v prilogi) so zbrani podatki sprememb absorbanc DPPH po dodatku 50 μL ekstraktov pri različni koncentracijah (5; 2,5; 1,5; 1,00 mg/mL). Kot kontrolno raztopino smo uporabili reagent DPPH in metanol.

Odstotek inhibicije po času je bil izračunan po enačbi 1, navedeni v razdelku 3.5. Primer izračuna za V_1 po 5 minutah je predstavljen v spodnji enačbi:

$$AOU (\%) = \frac{(1,642 - 0,088)}{1,642} \cdot 100$$

FORMULA 1: PRIMER IZRAČUNA ANTIOKSIDACIJSKE UČINKOVITOSTI

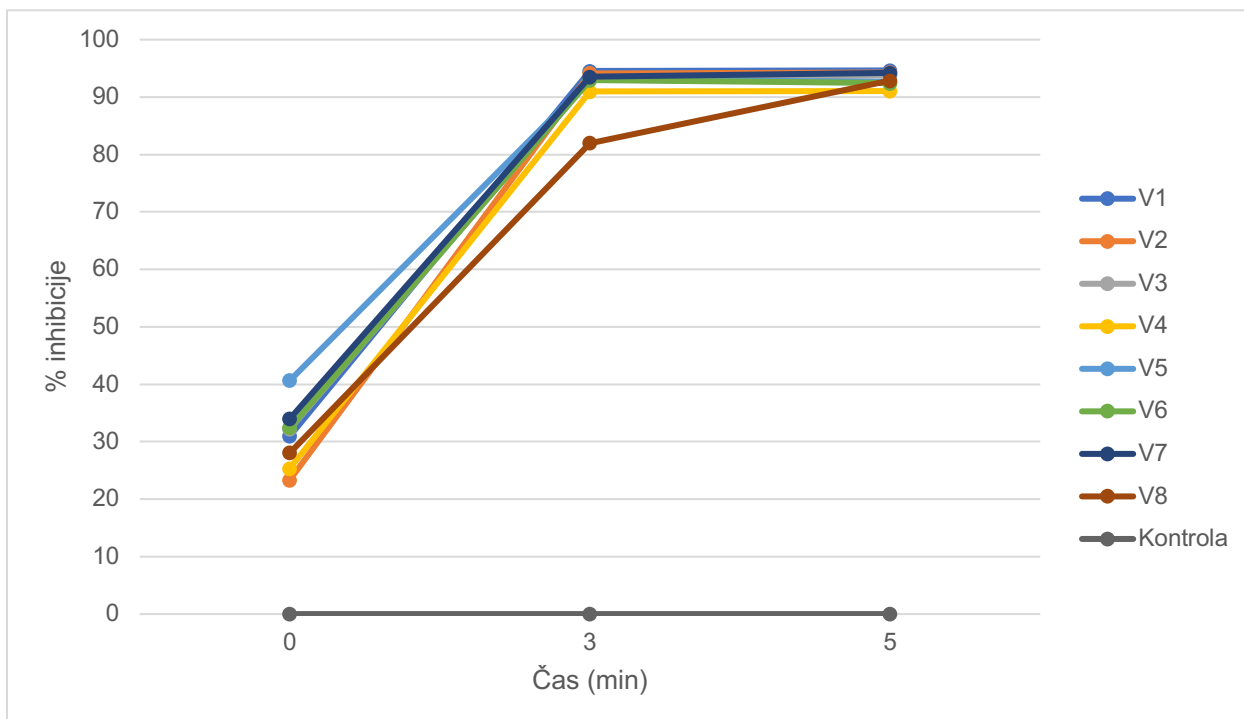
Rezultati vseh izračunov odstotkov inhibicije po času so zbrani v preglednicah od 15 do 18, ki se nahajajo v prilogi. V preglednici 8 (spodaj) pa so predstavljeni odstotki inhibicije posameznih vzorcev pri različnih koncentracijah po 5 minutah.

PREGLEDNICA 7: ODSOTOK INHIBICIJE VZORCEV PO 5 MINUTAH

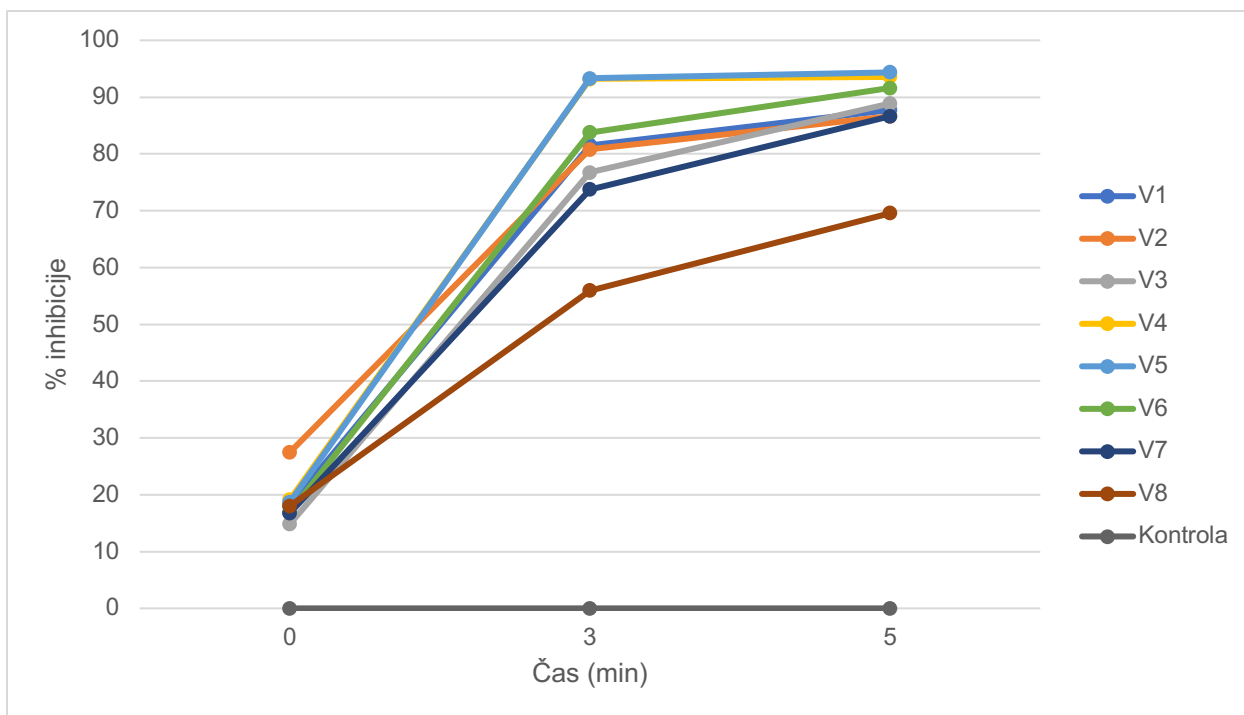
Vzorec	% inhibicije po 5 minutah pri različnih koncentracijah vzorca (mg/mL)			
	5,00	2,50	1,50	1,00
V_1	94,64	87,73	84,12	70,72
V_2	94,28	86,63	75,10	55,08
V_3	93,79	88,88	80,73	61,82
V_4	91,05	93,56	93,70	93,87
V_5	92,69	94,35	93,03	92,30
V_6	92,39	91,61	86,12	84,73

V ₇	94,21	86,63	73,64	73,18
V ₈	92,87	69,56	58,79	55,80
Kontrola	0	0	0	0

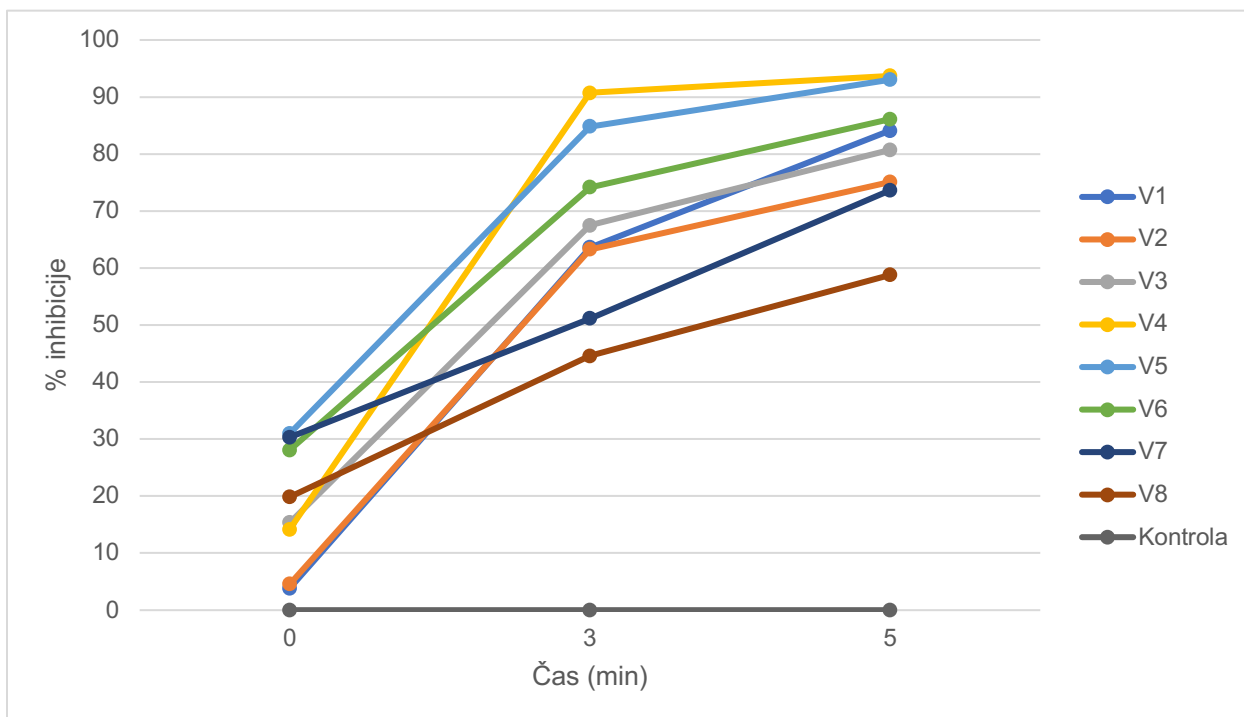
Grafi od 4 do 7 prikazujejo odvisnost odstotka inhibicije DPPH od časa, in sicer za vsako koncentracijo posebej.



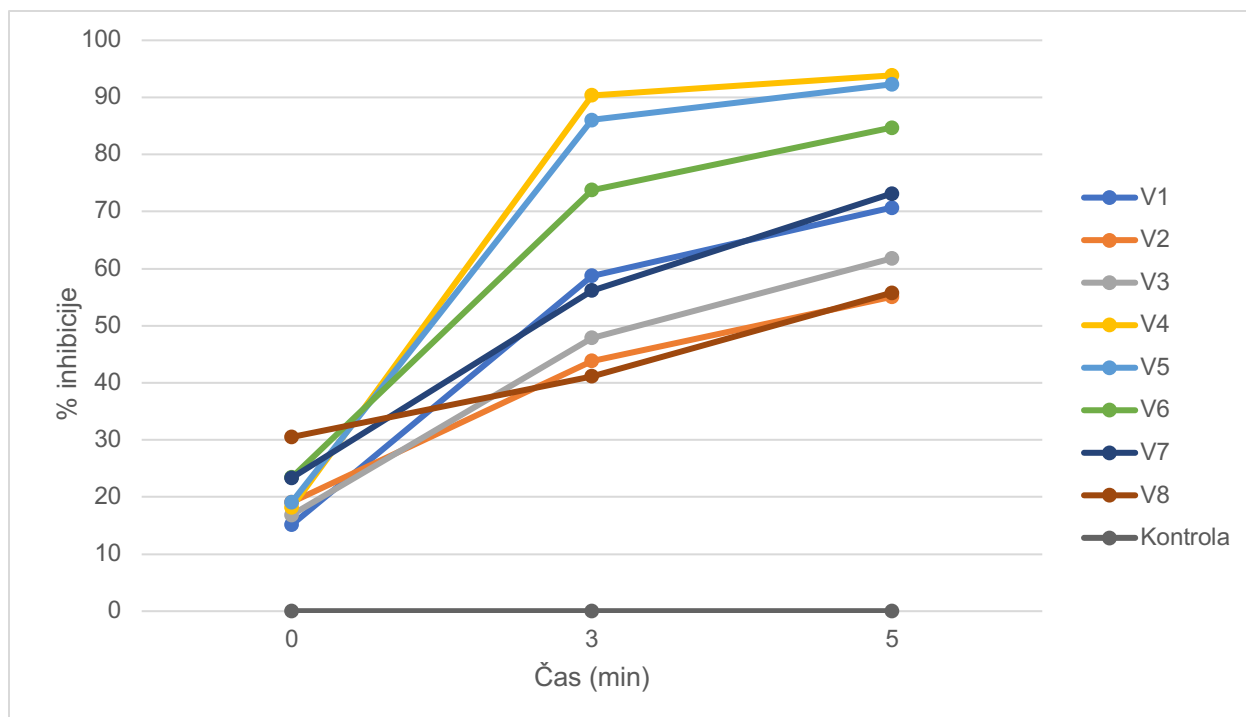
GRAF 4: ODVISNOST ODSOTKA INHIBICIJE OD ČASA PRI KONCENTRACIJI 5,00 MG/ML.



GRAF 5: ODVISNOST ODSOTKA INHIBICIJE OD ČASA PRI KONCENTRACIJI VZORCEV 2,50 MG/ML.



GRAF 6: ODVISNOST ODSOTKA INHIBICIJE OD ČASA PRI KONCENTRACIJI 1,50 MG/ML.



GRAF 7: ODVISNOST ODSOTKA INHIBICIJE OD ČASA PRI KONCENTRACIJI 1,00 MG/ML.

Iz grafov je razvidno, da smo največ snovi z najvišjo antioksidacijsko učinkovitostjo ekstrahirali v vzorcih V₄ in V₅. Rastlinski material ekstrakta V₄ je bil obdelan s superkritičnim CO₂ pri 300 barih in 35 °C ter nato ekstrahiran s klasično ekstrakcijo po Soxhletu z uporabo metanola; rastlinski material V₅ je bil obdelan s superkritičnim CO₂ pri 200 barih in 50 °C ter nato ekstrahiran z ultrazvočno ekstrakcijo z uporabo etanola. V vzorcu V₂ je največ katehina, 5,406 mg/g na materiala (0,1083 mg/g na mat¹¹. artemisinina ter 0,2990 mg/g na mat. klorogenske kisline), kar v kombinaciji z rezultati DPPH testa pomeni, da ima taka sestava največji potencial za antioksidativne pripravke. Posledično to nakazuje, da je tip ekstrakcije, s katero je bil pripravljen ekstrakt, za ta namen najbolj primeren

4.4 VIABILNOST CELIC HUIEC

Test MTT smo izvedli v dveh delih. V prvem smo na celično kulturo HUIEC nanegli ekstrakte v razredčinah 1:2, 1:4 in 1:8 (razredčine se nanašajo na vsebnost v ekstraktih v preglednicah 4 in 5). Ker so visoko koncentrirani ekstrakti izkazali neugoden učinek na celično rast (razvidno iz grafov

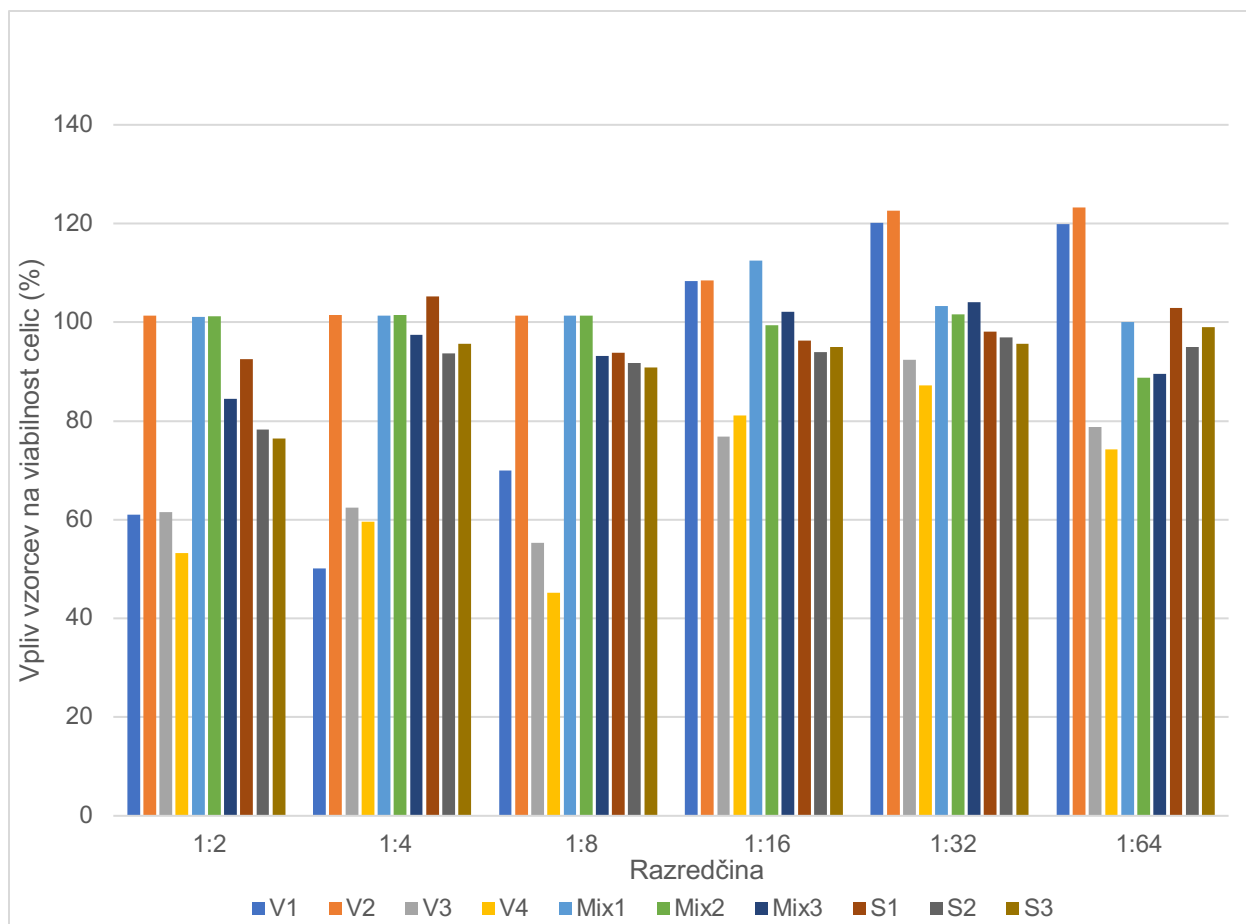
¹¹ Okrajšava za material.

8 in 9), smo v drugem delu testirali še ekstrakte nižjih koncentracij, in sicer 1:16, 1:32, 1:64. Vzporedno smo na celice nanесли tudi posamične standarde ciljnih spojin, tj. katehin, klorogensko kislino ter artemisinin, in njihove zmesi, pri čemer veljajo sledeče oznake:

- S₁: katehin
- S₂: klorogenska kislina
- S₃: artemisinin
- Mix 1: katehin, klorogenska kislina in artemisinin
- Mix 2: klorogenska kislina in artemisinin
- Mix 3: katehin in artemisinin

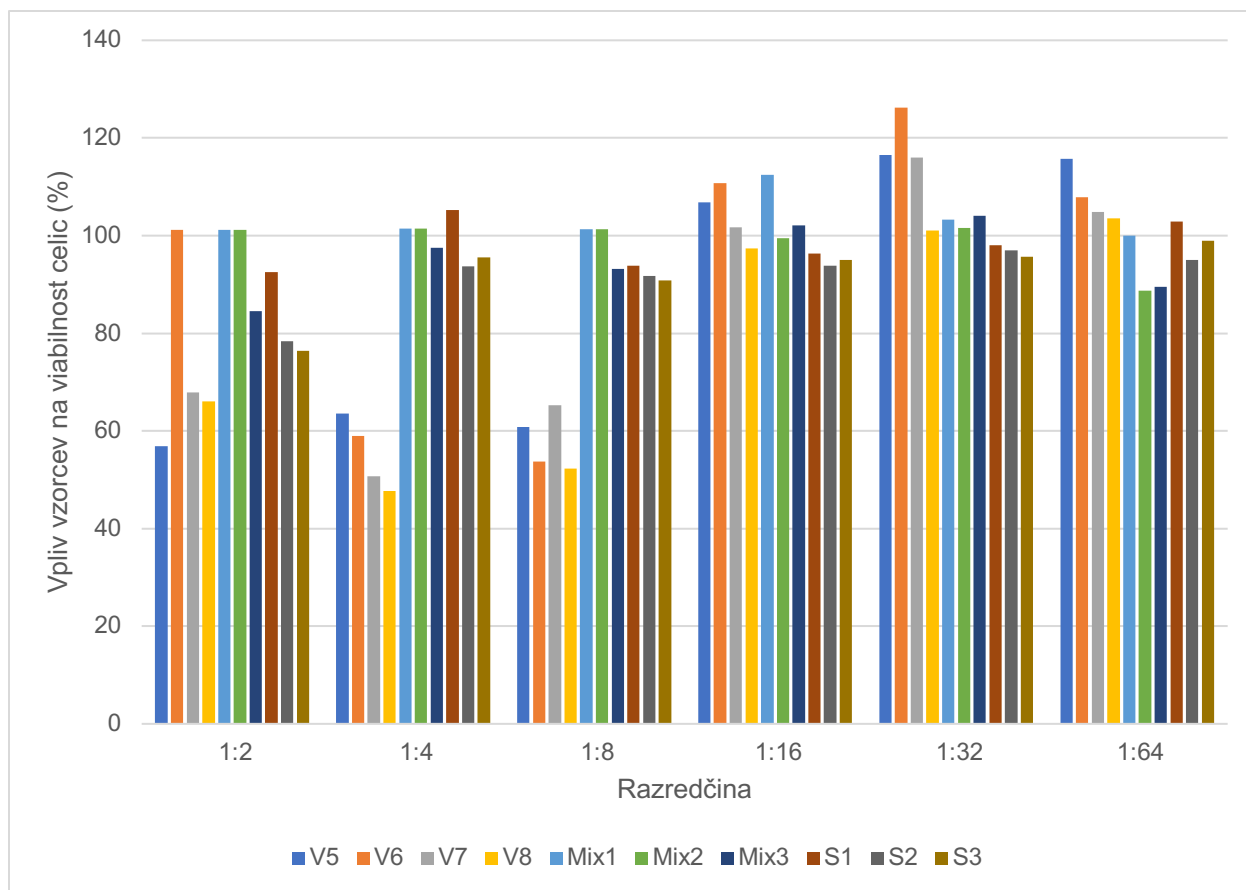
Rezultati meritev so predstavljeni v ločenih grafih glede na uporabljeno metodo ekstrakcije (ekstrakcija po Soxhletu ali ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli).

Ekstrakti po Soxhletu (glej graf 8 spodaj) so pri višjih koncentracijah izkazali inhibitorne učinke, le ekstrakt V₂ je presegel 100 % in v primeru višjih razredčitev tudi izkazal najpozitivnejši učinek na celično kulturo – medtem ko so vsi vzorci dosegli vrh pri razredčitvi 1:32, je V₂ v primeru 1:64 svoj učinek presegel za 0,69 %. Ekstrakt V₂ po analizi vsebuje največ katehina in v primerjavi s samim standardom pri optimalni razredčitvi, tj. 1:64, presega odstotek delovanja standarda za 20,37 %.



GRAF 8: PRIMERJAVA VPLIVA EKSTRAKTOV, PRIDOBLENIH Z EKSTRAKCIJO PO SOXHLETU, NA VIABILNOST CELIC HUIEC.

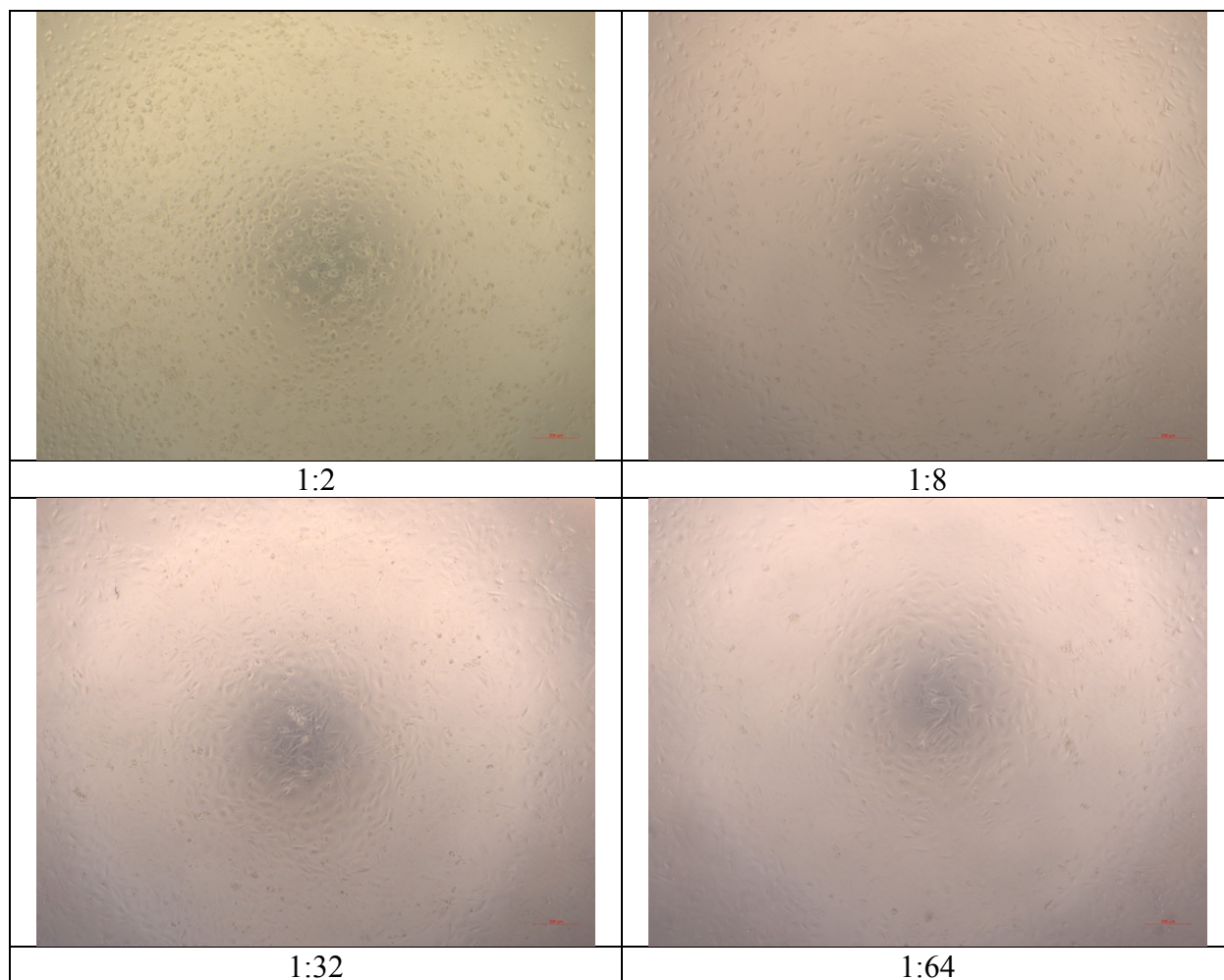
Tako kot ekstrakti, pridobljeni z ekstrakcijo po Soxhletu, tudi ekstrakti, pridobljeni z ultrazvočno ekstrakcijo, pri nižjih razredčinah izkazujejo citotoksični učinek. Vsi ekstrakti so izkazali najboljši učinek pri razredčitvi 1:32, pri čemer je V₆, predhodno obdelan pri tlaku 300 barov in 35 °C ter nato ekstrahiran z ultrazvočno ekstrakcijo z uporabo topila 50 % etanol, izkazal najpozitivnejši učinek in s 126,26 % presegel vrednosti standardov spojin ter zmesi standardov. Izpostavili bi tudi, da imamo v določenih primerih, npr. pri vzorcu S1, že pri razredčitvi 1:4, tj. višji koncentraciji, pozitivne rezultate viabilnosti napram kontrolni.



GRAF 9: PRIMERJAVA VPLIVA EKSTRAKTOV, EKSTRAHIRANIH Z EKSTRAKCIJO Z UPORABO ULTRAZVOČNE KOPELI, NA VIABILNOST CELIC HUIEC.

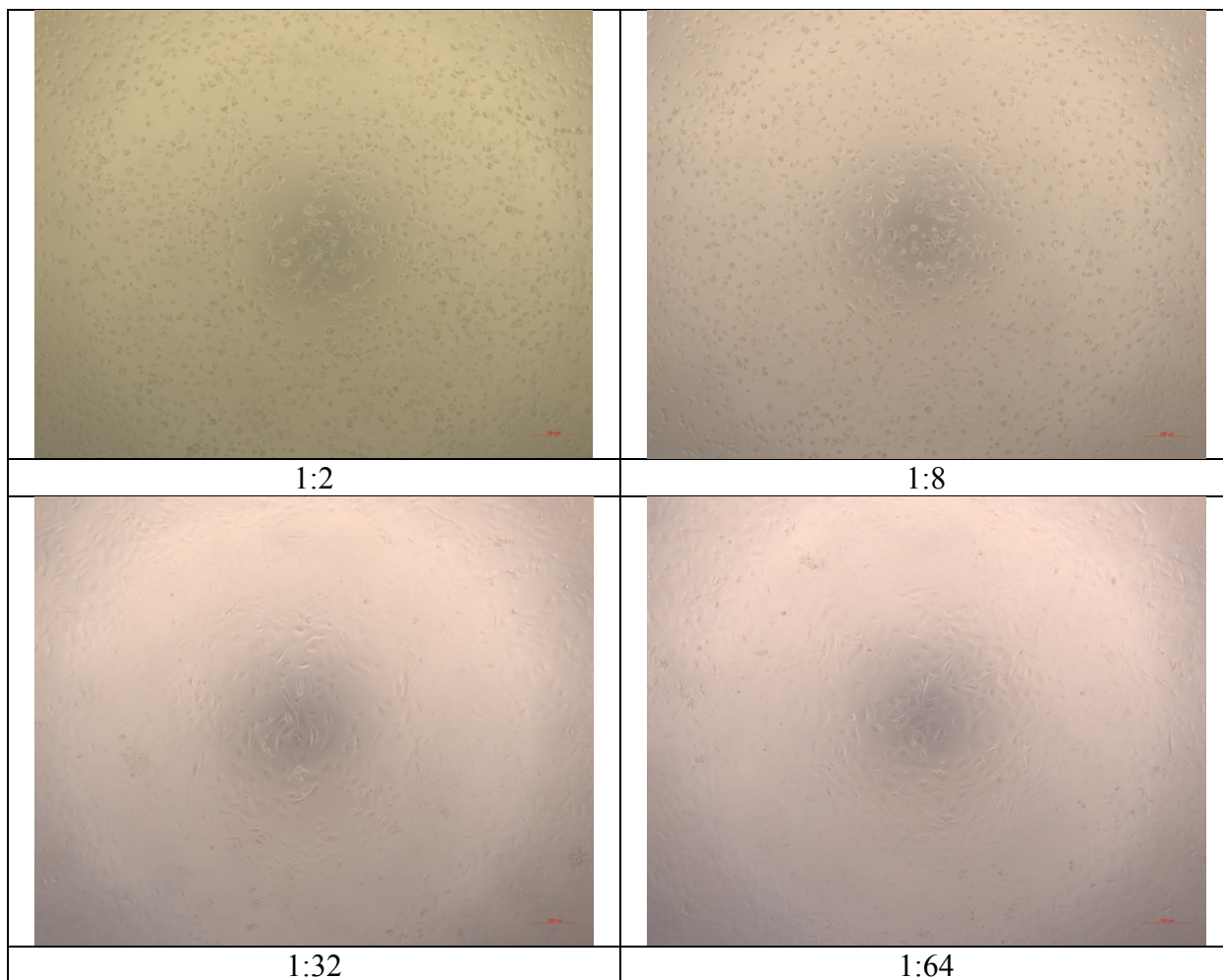
Rezultate MTT potrdimo s fotografijami celičnih kultur pri določenih razredčitvah za ekstrakte, ki so najpozitivneje učinkovali na viabilnost celic. V vseh primerih je prikazan učinek razredčitve 1:2, kjer so bili ekstrakti najbolj citotoksični, in nato 1:32, kjer je bil učinek ekstraktov pozitiven na celično rast. V primeru razredčitve 1:8 je pozitiven učinek pričel naraščati, pri 1:64 pa je ponovno upadel. Ker gre za epiteljske celice, tj. celice, ki tvorijo epitelje, na fotografijah opazujemo obliko, ki jo tvorijo na površini. Bolj kot so celice sprijete in podolgovate, zrnaste oblike, bolj jim okolje ugaja. Nasprotno, če so celice sferične oblike in se nahajajo v suspenziji, so dejavniki, ki vplivajo na njihovo rast, manj ugodni. To je razvidno iz razredčin 1:2 ter razredčin 1:32, predstavljenih na fotografijah od 21 do 24. Medtem ko so se celice pri višji razredčitvi (1:32) prijele na podlago ter prevzele podolgvato obliko, so sferične celice pri nižji razredčitvi suspenzirane v mediju. Iz tega lahko zaključimo, da je razredčitev 1:32 ugodnejša za celično rast epiteljskih celic kot razredčina 1:2.

Učinkovitost V_1 (glej sliko 21), predhodno obdelanega pri tlaku 200 barov in tempertauri 50 °C ter nato ekstrahiranega z ekstrakcijo po Soxhletu z uporabo topila 50 % etanol, je iz razredčine 1:2, kjer je vrednost meritve znašala 61,00 %, narasla za 59,20 %, tj. na 120,20 %, v primeru razredčitve 1:32.



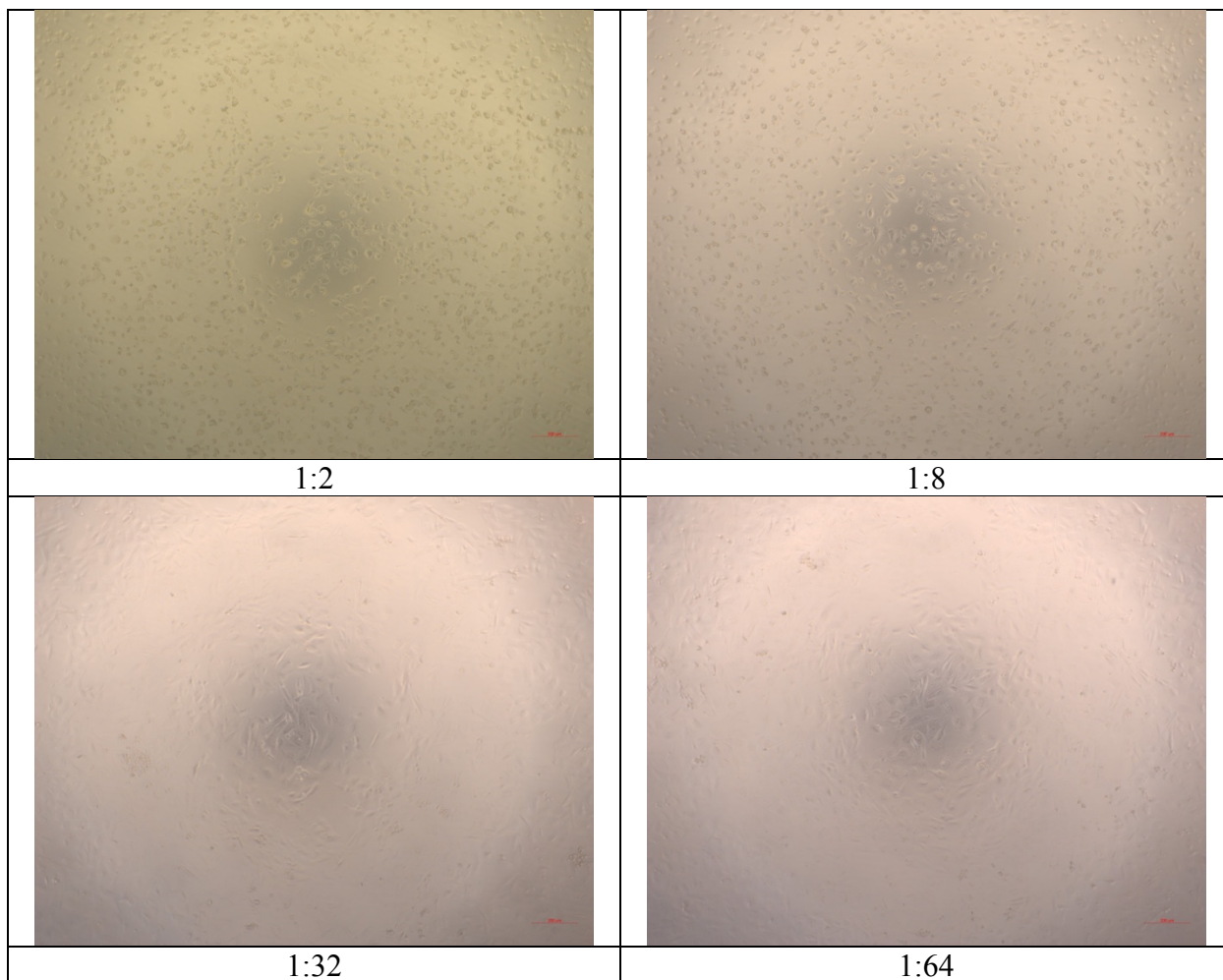
SLIKA 21: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN EKSTRAKTA V_1 NA VIABILNOST CELIC.

V primerjavi z ekstraktom V_1 so vrednosti ekstrakta V_2 (glej sliko 22), predhodno obdelanega s CO_2 pri tlaku 300 barov in temperaturi 35 °C ter nato ekstrahiranega z ekstrakcijo po Soxhletu z uporabo topila 50 % etanol, prav tako presegle 100 % oziroma rast celic glede na kontrolo. Najpozitivnejši učinek je vzorec V_2 izkazal pri najvišji razredčitvi, 1:64, in sicer 123,27 %, kar je podobno rezultatom razredčitve 1:32.



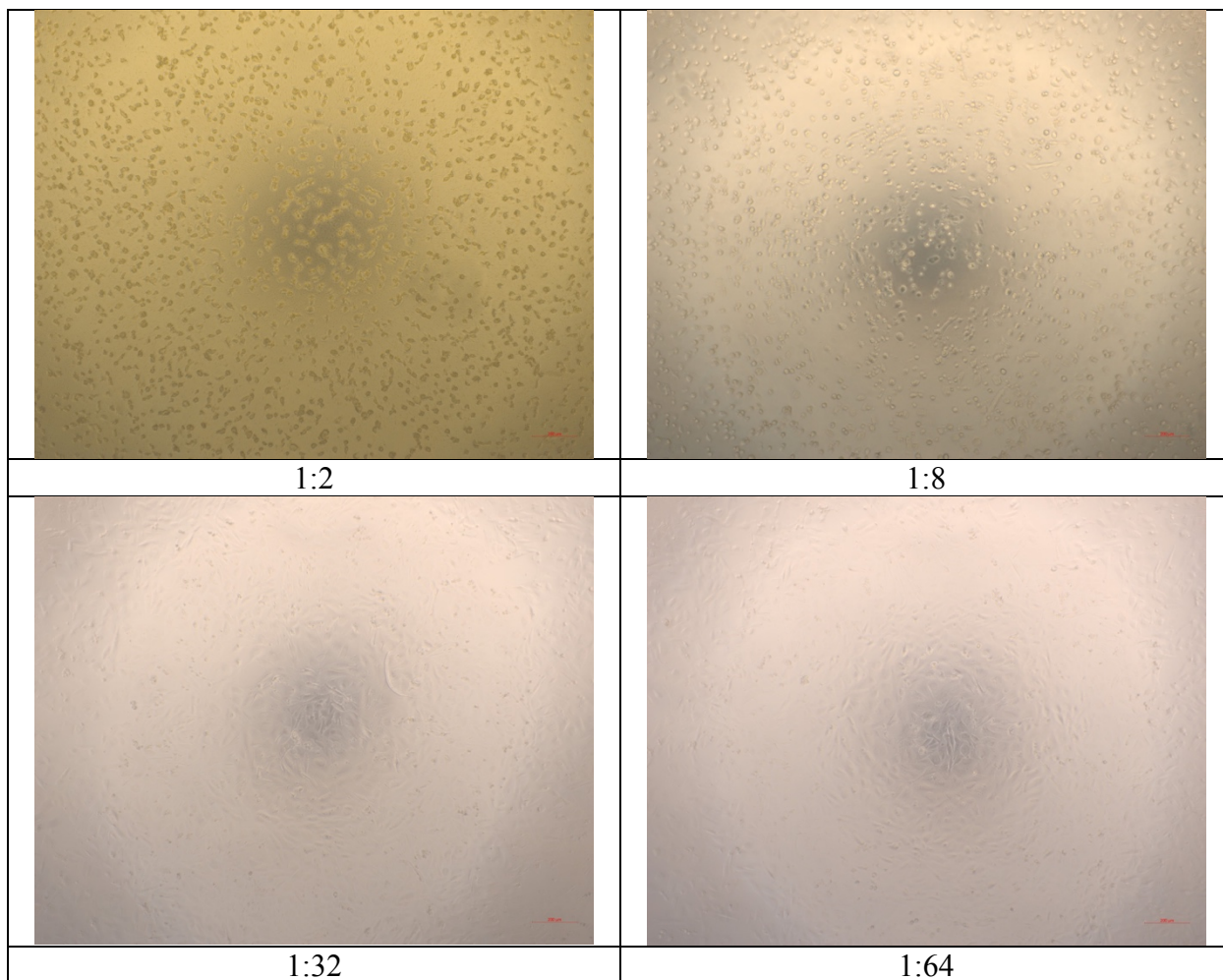
SLIKA 22: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN EKSTRAKTA V_2 NA VIABILNOST CELIC.

Surovi material V_5 je bil tako kot surovi material V_1 predhodno obdelan s CO_2 pri tlaku 200 barov in temperaturi $50\text{ }^\circ\text{C}$ in ekstrahiran z ultrazvočno kopeljo z uporabo 50 % etanola. Rezultati meritev viabilnosti so presegli 100 % pri razredčitvi 1:16 in dosegli vrh, 116,55 %, pri razredčitvi 1:32. Primerjava je prikazana na sliki 23 (spodaj).



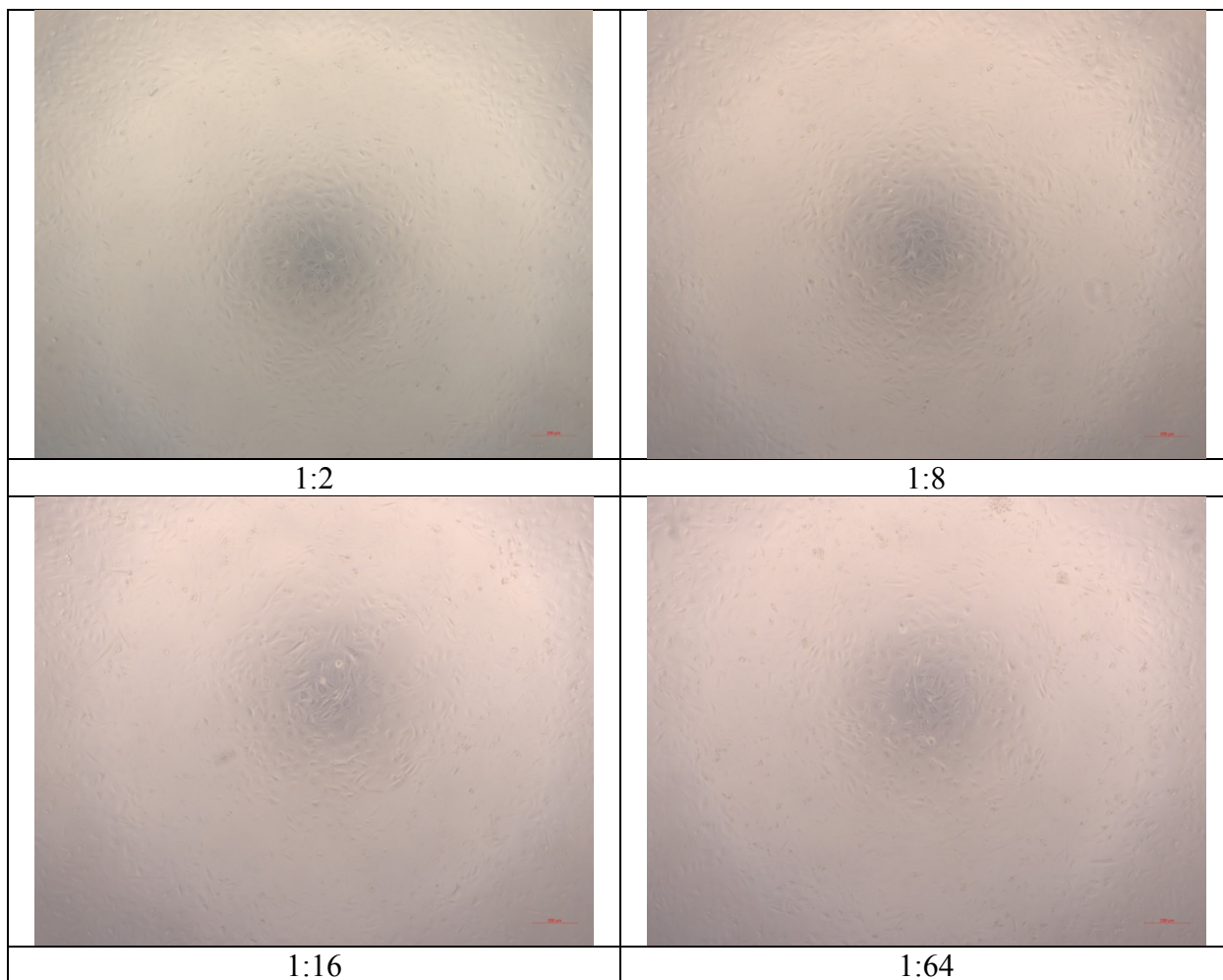
SLIKA 23: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN EKSTRAKTA V₅ NA VIABILNOST CELIC.

Ekstrakt V₆ (slika 24), predhodno obdelan s CO₂ pri tlaku 300 barov in temperaturi 35 °C ter nato ekstrahiran z ultrazvokom z uporabo topila 50 % etanol, je med vsemi testiranimi vzorci izkazal najpozitivnejši učinek na viabilnost celic HUIEC, in sicer je pri razredčini 1:32 dosegel 126,26 %.



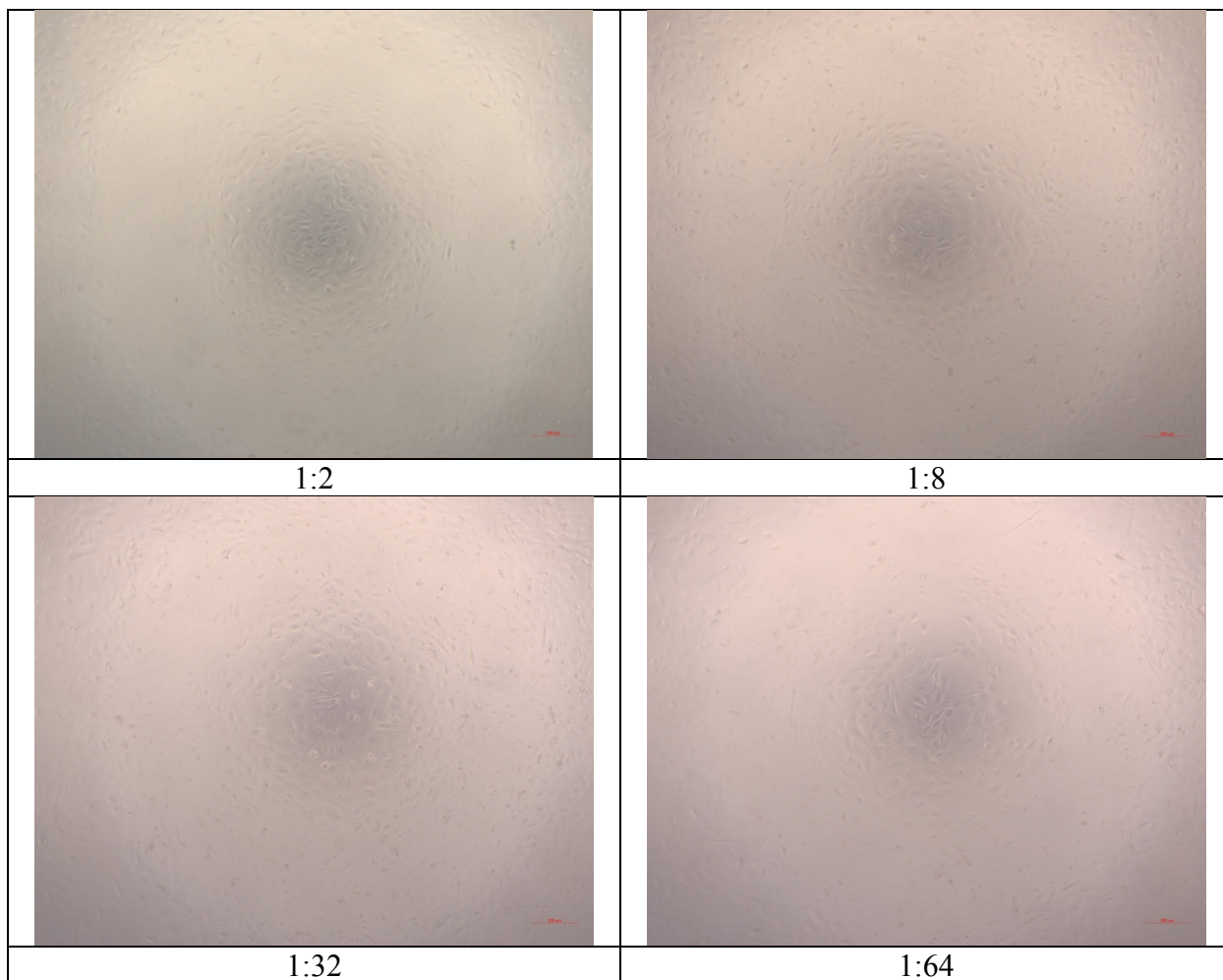
SLIKA 24: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN EKSTRAKTA V₆ NA VIABILNOST CELIC.

Kot omenjeno, smo na celične kulture nanegli tudi zmesi ciljnih spojin, tj. katehina, klorogenske kisline in artemisinina. Od treh kombinacij (glej str. 40) je bil najpozitivnejši učinek izmerjen pri Mix 1 (slika 25), tj. zmesi vseh treh komponent. Pri razredčitvi 1:16 je dosegel 112,49 %, kar je samo 11,48 % več kot v primeru razredčine 1:2. V sklopu kvalitativne analize lahko na sliki 24 opazimo, da že pri razredčitvi 1:2 ni izrazito negativnega učinka na samo morfologijo celic, kot je bilo to vidno na prejšnjih slikah, kjer so bile celice pri razredčitvi 1:2 še sferične oblike.



SLIKA 25: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN STANDARDOV MIX 1 NA VIABILNOST CELIC.

Mix 1, ki je vseboval katehin, klorogensko kislino ter artemisinin, je pri višjih razredčinah sicer slabše vplival na viabilnost celic kot Mix 3 (slika 26), a še zmeraj izkazal za 2,54 % višjo učinkovitost pri razredčitvi 1:32 kakor zmes z oznako Mix 1, ki je vsebovala klorogensko kislino in artemisinin.



SLIKA 26: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN STANDARDOV MIX 3 NA VIABILNOST CELIC.

Fotografije preostalih ekstraktov so v prilogi (slike 27 do 34).

5 RAZPRAVA

5.1 IZKORISTKI EKSTRAKCIJ

Rastlinski material je bil predhodno obdelan s superkritičnim CO₂ z namenom, da bi odstranili vsebovane maščobe. Stebla in liste rastline *Artemisia annua* L. smo obdelali pod različnimi pogoji (Martinez-Correa et al., 2016), in sicer pri tlaku 200 barov in temperaturi 50 °C ter pri tlaku 300 barov in temperaturi 35 °C.

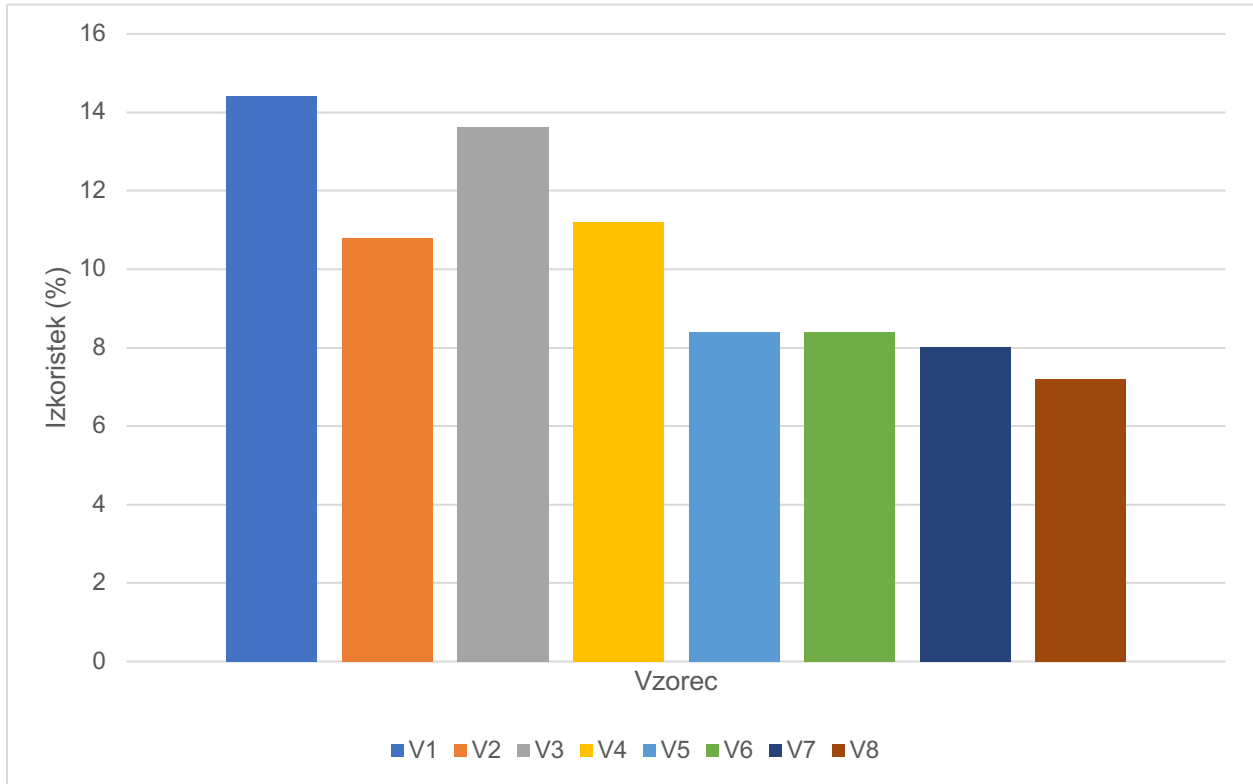
V naslednjem koraku smo obe liniji rastlinskega materiala ekstrahirali s klasično ekstrakcijo po Soxhletu, pri čemer smo uporabili dve topili z različno polarnostjo, metanol ter 50 % etanol. S tem smo pridobili štiri vzorce. Izkoristek vzorca V₁, obdelan s CO₂ pod tlakom 200 barov in 50 °C ter ekstrahiranega s topilom 50 % etanol, je znašal 14,40 %, izkoristek V₂, prav tako ekstrahiranega s topilom 50 % etanol, a obdelanega pod tlakom 300 barov in 35 °C je znašal 10,80 %, izkoristek V₃, obdelanega pod tlakom 200 barov in 50 °C ter ekstrahiranega z metanolom pa je znašal 13,63 %.

Tudi v primeru ekstrakcije z ultrazvočno kopeljo smo uporabili predhodno obdelan material s superkritičnim CO₂ ter 130 mL metanola oziroma 130 mL 50 % raztopine etanola. Ekstrakcije so potekale 2 uri (štirikrat 30 minut) pri temperaturi 50 °C (± 0.1 °C). Izkoristek V₅, obdelanega pod tlakom 200 barov in 50 °C ter ekstrahiranega s topilom 50 % etanol, je znašal 8,40 %, enako tudi izkoristek vzorca V₆, obdelanega s superkritičnim CO₂ pod tlakom 300 barov in 35 °C. Izkoristek metanolnega vzorca V₇, obdelanega pod tlakom 200 barov in 50 °C, je znašal 8,02 %, izkoristek metanolnega vzorca V₈, obdelanega pod tlakom 300 barov in 35 °C, pa je znašal 7,20 %.

Primerjava izkoristkov ekstrakcij kaže (glej graf 10), da je najoptimalnejša ekstrakcija ekstrakcija po Soxhletu z uporabo topila 50 % etanola, pri čemer je bil surov rastlinski material predhodno obdelan s superkritičnim CO₂ pod tlakom 200 barov in pri temperaturi 50 °C. Izkoristek je za 7,20 % višji od najnižje ekstrahirane vrednosti pri vzorcu V₈, kjer je bil surov rastlinski material predhodno obdelan s superkritičnim CO₂ pod tlakom 200 barov in 50 °C. Iz grafa je razvidno, da so ekstrakcije po Soxhletu zaslužne za višje izkoristke kot ekstrakcije, pri katerih je bila uporabljena ultrazvočna kopel. Pri tem je potrebno opozoriti sledeče:

1. V vseh primerih ekstrakcij so ekstrakti, katerih rastlinski material je bil obdelan s superkritičnim CO₂ pod tlakom 200 barov in 50 °C, izkazali višje izkoristke kakor ekstrakti, obdelani pod tlakom 300 barov in 35 °C. Izjema je ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli, kjer sta ekstrakta, ekstrahirana s 50 % etanolom, izkazala enak izkoristek.
2. Ekstrakcije, kjer smo kot topilo uporabili raztopino 50 % etanola, so v vseh primerih (z izjemo ekstrakcije po Soxhletu, kjer je bil material obdelan pod tlakom 300 barov in 35 °C) izkazali višje izkoristke.

Iz tega lahko sklepamo, da so ekstrahirane snovi boljše topne v topilu 50 % etanolu, torej je njihova polarnost bližja etanolu kot pa metanolu. Hkrati razločimo, da je bila superkritična ekstrakcija s CO₂ pri tlaku 200 barov in temperaturi 50 °C uspešnejša pri odstranjevanju lipofilnih snovi kot pa ekstrakcija, ki je potekala pod tlakom 300 barov in temperaturi 35 °C.



GRAF 10: PRIMERJAVA IZKORISTKOV EKSTRAKTOV.

5.2 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA Z MASNO SPEKTROSKOPIJO

Z analitično tehniko LC – MS smo analizirali metanolne in vodne raztopine ekstraktov. V naslednjem koraku smo ekstrakte različnih koncentracij namreč nanegli na celične kulture, za kar metanolne raztopine ne bi bile primerne, ker bi celice uničile. Predpostavili smo, da se lahko pri pripravi metanolnih in vodnih raztopin ekstraktov zaradi polarnosti topil raztopijo različne učinkovine oziroma različne količine učinkovin, zato smo ločeno analizirali oba tipa vzorcev.

Po opravljeni analizi lahko zatrdimo, da so vzorci najbogatejši s katehinom, sledi klorogenska kislina in nazadnje artemisinin. Iz grafov 1, 2 in 3, kjer so primerjane tako vodne kot tudi metanolne raztopine ekstraktov, je razvidno, da je v povprečju fenolno najbogatejši vzorec V₃,

torej tisti, čigar material je bil obdelan s superkritičnim CO₂ pri 200 barih in 50 °C ter nato ekstrahiran s klasično ekstrakcijo po Soxhletu z uporabo metanola. Potrebno je poudariti, da pa vzorec V₃ ni izkazal najvišje vsebnosti aktivnih spojin v vseh primerih. V primeru metanolne raztopine je izkazal najvišjo vsebnost katehina ekstrakt V₂, čigar material je bil obdelan s superkritičnim CO₂ pri 350 barih in 35 °C ter nato ekstrahiran z ultrazvočno ekstrakcijo s 50 % etanolom kot topilom. V primerih vodnih raztopin je V₂ izkazal najvišji vsebnosti artemisinina in katehina.

Pri primerjavi ekstraktov, pridobljenih z ekstrakcijo po Soxhletu, in ekstraktov, ekstrahiranih z ultrazvočno kopeljo, opazimo, da ekstrakti po Soxhletu vsebujejo višje količine katehina, klorogenske kisline in artemisinina kot vzorci, ekstrahirani z ultrazvočno kopeljo. Če sedaj primerjamo rezultate DPPH-testa metanolnih raztopin ekstraktov z rezultati LC – MS, bi pričakovali, da bodo ekstrakti, kjer so bile ekstrahirane najvišje količine izbranih fenolnih spojin ter artemisinina, izkazali najvišjo antioksidacijsko učinkovitost. Toda višjo antioksidacijsko učinkovitost so pri koncentracijah 2,50 mg/mL, 1,50 mg/mL in 1.00 mg/mL izkazali prav vzorci, ekstrahirani z ultrazvočno kopeljo (V₅, V₆), ter V₄, ekstrahiran po Soxhletu, ki je v primerjavi z ekstrakti V₁, V₂, V₃, prav tako ekstrahiranih po Soxhletu, vseboval najmanj testiranih spojin. Iz tega lahko sklepamo, da antioksidacijska učinkovitost v največji meri ne izhaja iz katehina, klorogenske kisline in artemisinina, kljub temu da smo v lanski raziskavi (Koletnik, 2018) s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) katehin in klorogensko kislino določili za poglavitni komponenti. Zaključimo lahko, da verjetno vseh komponent, ki prispevajo k antioksidativnemu učinku, še ne poznamo oz. jih nismo določili.

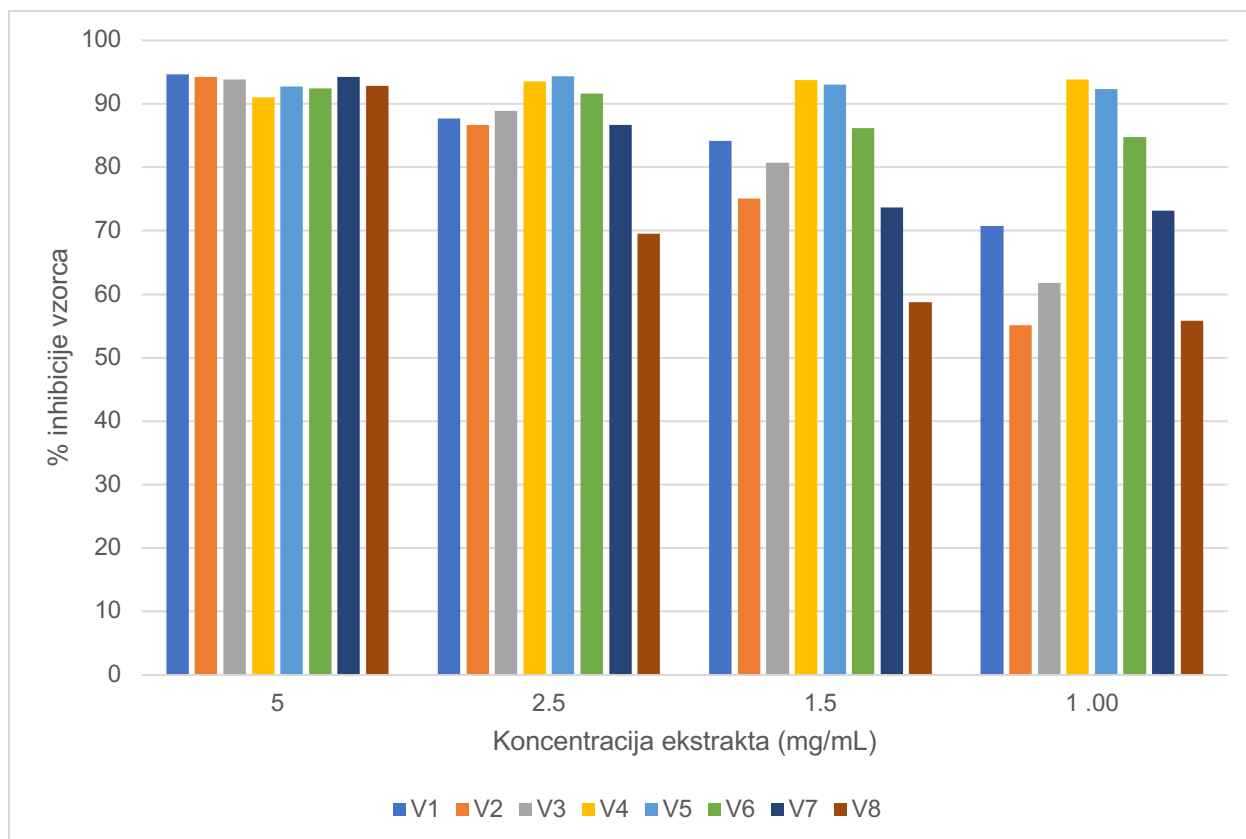
5.3 ANTIOKSIDACIJSKA UČINKOVITOST

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.

Na grafu 11 (spodaj), kjer je prikazana primerjava odstotka inhibicije vzorcev pri posamičnih koncentracijah, lahko opazimo, da rezultati, izmerjeni pri najvišji izbrani koncentraciji, tj. 5,00 mg/mL, odstopajo od trenda, vzpostavljenega pri preostalih koncentracijah, tj. 2,50 mg/mL, 1,50 mg/mL in 1.00 mg/mL. Najvišjo AOU pri koncentraciji 5 mg/mL po petih minutah sta izkazala

etanolna ekstrakta po Soxhletu, V₁ in V₂, in sicer 94,64 % ter 94,28 %. Pri nadaljnjih analizah smo opazili spremembo trenda, v povprečju smo največ snovi z najvišjo antioksidacijsko učinkovitostjo ekstrahirali v vzorcih V₄ in V₅. Rastlinski material ekstrakta V₄ je bil obdelan s superkritičnim CO₂ pri 300 barih in 35 °C ter nato ekstrahiran s klasično ekstrakcijo po Soxhletu z uporabo metanola, rastlinski material V₅ je bil obdelan s superkritičnim CO₂ pri 200 barih in 50 °C ter ekstrahiran z ultrazvočno ekstrakcijo z uporabo 50 % etanola. Presenetljivo je pri koncentraciji 5 mg/mL najslabšo antioksidacijsko učinkovitost izkazal ekstrakt V₄, pri 2,50 mg/mL ter 1,50 mg/mL je najslabše delovanje izkazal ekstrakt V₈, obdelan s superkritičnim CO₂ pri 300 barih in 35 °C ter nato ekstrahiran z uporabo ultrazvočne kopeli z uporabo metanola, pri koncentraciji 1.00 mg/mL pa je najslabše delovanje izkazal V₂.

Sanchez-Moreno et al. (1998) je glede na hitrost popolne oksidacije razvrstil antioksidante v tri skupine, hitre (<5 min), zmerne (5–30 min) in počasne (> 30 min). Glede na njegovo študijo je čas, ki je potreben za vzpostavitev stabilnega stanja reakcije, odvisen od koncentracije antioksidantov. Če pri analizi rezultatov upoštevamo navedeno predpostavko, bi torej pričakovali vzpostavitev padajočega trenda. Slednji je bil vzpostavljen v smislu, da je opazen padec v odstotku inhibicije, ampak kot omenjeno, pride do spremembe t. i. najučinkovitejših vzorcev.



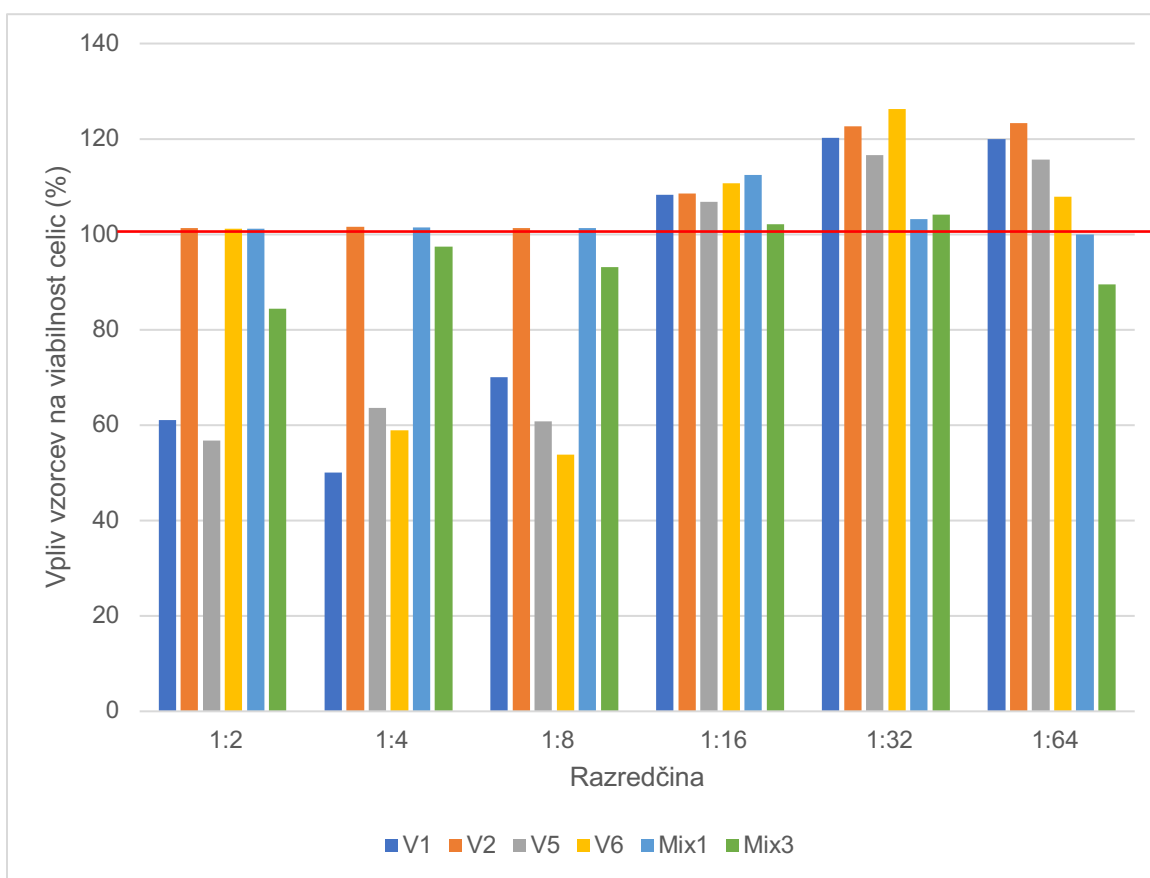
GRAF 11: PRIMERJAVA % INHIBICIJE VZORCEV MED KONCENTRACIJAMI

5.4 MTT TEST

V 1. delu poskusa smo ugotovili, da začetne koncentracije ekstraktov neželeno vplivajo na rast celic, zato smo s poskusom nadaljevali in v drugem delu testirali nižje koncentracije vzorcev. Najvišja dosežena vrednost, 126,22 %, za 26,22 % presega vrednost kontrole (ta je sestavljena iz Advanced DMEM, tj. komercialno dostopnega medija, ki vsebuje L-glutamin ter penicilin, in seruma, v tem primeru 5 % fetalnega govejega seruma) in nakazuje, da ekstrakti *Artemisie annue* L pozitivno vplivajo na viabilnost celične kulture epitelnih črevesnih celic. Vrednost je bila izmerjena pri nanosu ekstrakta V₆, predhodno obdelanega pri tlaku 300 barov in temperaturi 35 °C ter nato ekstrahiranega z ultrazvočno kopeljo z uporabo topila 50 % etanola, in sicer v primeru razredčine 1:32.

Iz grafa 12, kjer so predstavljeni ekstrakti, ki so najboljše učinkovali na celice, je razvidno, da v razredčinah 1:2, 1:4 ter 1:8 določeni vzorci (V₁, V₅ ter V₆) celično rast zavirajo. Njihova

učinkovitost ponovno naraste pri razredčitvi 1:16 in izkaže najboljše rezultate pri 1:32, nakar je razviden ponoven padec pri razredčitvi 1:64. Iz tega lahko sklepamo, da so ekstrakti pri razredčitvi 1:2 preveč skoncentrirani in zavirajo celično rast, medtem ko so ekstrakti razredčitve 1:64 pretirano razredčeni, torej izgubljajo učinek oz. se njihova sestava približa kontroli, tj. mediju samemu. V razdelku 5.2 smo zaključili, da antioksidacijska učinkovitost vzorcev v največji meri ne izhaja iz klorogenske kisline, katehina ter artemisininina, toda z nanosom raztopine omenjenih snovi, ki je v grafu označena z Mix 1, smo dokazali pozitiven učinek komponent na rast celic, ki je najvišji v primeru razredčine 1:16. Pri analizi LC – MS so vzorci izkazali najvišjo vsebnost katehina, iz česar bi lahko sklepali, da bo slednji v veliki meri spodbujal celično rast, toda vzorec Mix 3, ki je vseboval katehin in artemisinin, je slabše vplival na celično rast kot vzorec Mix 2, ki je vseboval klorogensko kislino in artemisinin. Ponovno lahko zaključimo, da ekstrakti vsebujejo tudi komponente, ki jih nismo določili.



GRAF 12: PRIMERJAVA NAJPOZITIVNEJŠIH UČINKOV EKSTRAKTOV NA VIABILNOST CELIC.

Zaključimo lahko, da imajo ekstrakti pri ekstrakciji z uporabo topila 50 % etanola bolj pozitiven učinek na viabilnost celic kot ekstrakti, pri katerih ekstrakciji je bil kot topilo uporabljen metanol. Razlog je verjetno razlika v ekstrahiranih spojinah. Zaradi različne polarnosti topil so se v ekstrakcijah ekstrahirale različne spojine, pri čemer opazimo, da so tiste, ekstrahirane s 50 % etanolom, izkazale pozitivnejši učinek na viabilnost celic HUIEC. Izključili smo vpliv citotoksičnosti metanola, saj je bilo topilo po ekstrakcijah v celoti odstranjeno z rotavaporjem.

Najpozitivnejši učinek je izkazal ekstrakt V₆, kar je podprto z rezultati DPPH-analize. V₆ je v vseh testiranih koncentracijah izkazal antioksidacijsko učinkovitost nad 85 %, najvišji odstotek antioksidacijske učinkovitosti pa je zabeležen v primeru koncentracije pri 2,50 mg/mL, in sicer 91,61 %, kar je tretja najvišja vrednost. To nadalje nakazuje, da antioksidacijska učinkovitost ekstraktov ne izhaja zgolj iz artemisinina, katehina ter klorogenske kisline, marveč tudi iz drugih, nedoločenih spojin. Vendar smo z nanosom zmesi fenolnih spojin in artemisinina, to so vzorci Mix 1, Mix 2 in Mix 3, dokazali pozitiven učinek na viabilnost celične kulture. Pri primerjavi vzorca V₆ in zmesi fenolnih spojin, ki je izkazala najpozitivnejši učinek, opazimo, da se, po pričakovanjih, rezultati razlikujejo odvisno od razredčine ekstrakta. Medtem ko v primeru nižje razredčine ekstraktov Mix 1 preseže učinek V₆ za 1,77 %, pri višji razredčini, tj. 1:32, V₆ preseže učinkovitost Mix 1 za 22,97 %, kar pomeni, da je pri nižji koncentraciji vzorcev vzpodbujeno delovanje aktivnih spojin, ki jih nismo kvantitativno določili.

Za natančnejše rezultate bi bilo pri nadaljnjih raziskavah smotrnejše izmeriti antioksidacijsko učinkovitost ekstraktov po njihovem neposrednem nanosu na celice.

S tem, ko smo dokazali, da artemisinin v kombinaciji s katehinom pozitivno vpliva na rast črevesnih celic HUIEC, se nam je zdelo smiselno nadaljevati z raziskavo še na rakastih črevesnih celicah. Tako preverjamo, ali ekstrakti *Artemisia annua* L. ugodno vplivajo tudi na te, tj. zavirajo njihovo rast. Rezultati te študije presegajo okvir te raziskovalne naloge, zato bodo predstavljeni v prihodnosti.

6 ZAKLJUČEK

Zaključek je trodelen. V prvem podpoglavju bomo opravili pregled hipotez in jih potrdili ali ovrgli v skladu z rezultati raziskave, v drugem delu bomo povzeli pogloblitve izsledke in odgovorili na raziskovalno vprašanje, v tretjem pa bomo predstavili možnost nadaljnjih raziskav.

6.1 POTRDITEV / ZAVRNITEV HIPOTEZ

1. hipoteza: Ultrazvočni ekstrakti, pridobljeni s topilom 50 % etanol, izkazujejo višji izkoristek kot ekstrakti ekstrahirani z metanolom. **Potrjena.**

Izkoristek etanolnih ekstraktov, katerih material je bil prehodno obdelan s superkritičnim CO₂ pri 300 barih in 35 °C, kot tudi izkoristek tistih, katerih material je bil predhodno obdelan s superkritičnim CO₂ pri 200 barih in 50 °C, so izkazali višji izkoristek kot ekstrakti, pri katerih ekstrakciji je bil kot topilo uporabljen metanol. Metanolni in 50 % etanolni ekstrakt superkritičnega materiala V₁¹² se razlikujeta za 0,38 %, ekstrakta superkritično obdelanega materiala V₂¹³ pa za 1 %.

2. hipoteza: Sočasno pri ekstrakciji po Soxhletu ekstrakti pridobljeni z metanolom izkazujejo višji izkoristek kot ekstrakti, pridobljeni s topilom 50 % etanol. **Delno potrjena.**

Hipoteza smo potrdili glede na rezultate ekstrakcije, pri kateri je bil rastlinski material obdelan s superkritičnim CO₂ pri 200 barih in 50 °C. Izkoristek 50 % etanolnega ekstrakta je presegel izkoristek metanolnega ekstrakta za 0,80 %, kar je v okvirih eksperimentalne napake. V primeru rastlinskega materiala, obdelanega s superkritičnim CO₂ pri 300 barih in 35 °C je izkoristek metanolnega ekstrakta presegel izkoristek 50 % etanolnega za 0,40 % in s tem izpodbil del zastavljene hipoteze.

3. hipoteza: Več snovi z visoko antioksidacijsko učinkovitostjo je ekstrahiranih z ultrazvočno ekstrakcijo, pri kateri je kot topilo uporabljen 50 % etanol. **Delno potrjena.**

Višjo antioksidacijsko učinkovitost sta pri koncentracijah 2,50 mg/mL, 1,50 mg/mL in 1,00 mg/mL izkazala vzorca, ekstrahirana z ultrazvočno kopeljo z uporabo 50 % etanola, medtem ko sta najvišjo AOU pri koncentraciji 5 mg/mL po petih minutah izkazala etanolna ekstrakta po Soxhletu, V₁ in V₂. Zato lahko hipotezo potrdimo le delno.

¹² Material je bil predhodno obdelan s superkritičnim CO₂ pri 200 barih in 50 °C.

¹³ Material je bil prehodno obdelan s superkritičnim CO₂ pri 300 barih in 35 °C.

4. hipoteza: Pri analizi s tekočinsko kromatografijo z masno spektrometrijo metanolne raztopine ekstraktov izkazujejo večjo vsebnost katehina, klorogenske kisline in artemisinina. **Delno potrjena.**

Hipotezo so podprli rezultati analize za klorogensko kislino in artemisinin, za katehin pa velja, da je njegova vsebnost višja v ekstraktih, kjer je bila kot topilo uporabljena voda (z izjemo ekstraktov V₅ in V₆, katerih vsebnost katehina na material (mg/g) je znašala 0,0960 ter 0,0836). Iz tega lahko sklepamo, da je katehin fenolna spojina, ki je bolj topna v vodi kot metanolu. V primeru, kjer je bil ekstrakt ekstrahiran z uporabo ultrazvočne ekstrakcije s 50 % etanolom, in nato raztopljen v vodi, se je pri analizi katehin slabše raztapljal.

5. hipoteza: Vzorci, ki izkazujejo najvišjo antioksidacijsko učinkovitost, izkazujejo tudi največjo vsebnost katehina, klorogenske kisline in artemisinina. **Ovržena.**

Višjo antioksidacijsko učinkovitost so pri koncentracijah 2,50 mg/mL, 1,50 mg/mL in 1,00 mg/mL izkazali vzorci, ekstrahirani z ultrazvočno kopeljo (V₅, V₆) ter V₄, ekstrahiran po Soxhletu, ki je v primerjavi z ekstrakti V₁, V₂, V₃, prav tako ekstrahiranimi po Soxhletu, vseboval najmanj testiranih spojin. Iz tega lahko sklepamo, da antioksidacijska učinkovitost v največji meri ne izhaja iz katehina, klorogenske kisline in artemisinina. Zato smo hipotezo ovrgli.

6. hipoteza: Ekstrakti z najvišjo vsebnostjo fenolov vzpodbujajo rast celične kulture HUIEC bolj kakor ekstrakti, katerih antioksidacijska učinkovitost je nižja. **Delno potrjena.**

Najpozitivnejši učinek na celično viabilnost so izkazali ultrazvočni ekstrakti in ekstrakti po Soxhletu, pri katerih je bil kot topilo uporabljen 50 % etanol, tj. ekstrakti V₁, V₂, V₅ in V₆. Višjo antioksidacijsko učinkovitost sta pri koncentracijah 2,50 mg/mL, 1,50 mg/mL in 1,00 mg/mL izkazala vzorca, ekstrahirana z ultrazvočno kopeljo z uporabo 50 % etanola, medtem ko sta najvišjo AOU pri koncentraciji 5 mg/mL po petih minutah izkazala etanolna ekstrakta po Soxhletu, V₁ in V₂. Zato hipotezo delno ovržemo.

6.2 ODGOVOR NA RAZISKOVALNO VPRAŠANJE

Temeljno raziskovalno vprašanje v nalogi je bilo, kateri fenolni ekstrakt *Artemisie annue* L., pridobljen z različnimi metodami ekstrakcije (z ekstrakcijo po Soxhletu z uporabo metanola ali 50 % etanola ali z ekstrakcijo z uporabo ultrazvočne kopeli), z določeno antioksidacijsko učinkovitostjo bo ob nanosu na humane celice izkazal največjo mero biološke učinkovitosti.

Etanolni ekstrakti, katerih material je bil predhodno obdelan s superkričnim CO₂ pri 300 barih in 35 °C, kot tudi etanolni ekstrakti, katerih material je bil predhodno obdelan s superkričnim CO₂ pri 200 barih in 50 °C, so izkazali višji izkoristek kot ekstrakti, pri katerih ekstrakciji je bil kot topilo uporabljen metanol. Pri tem je potrebno izpostaviti, da so izkoristki ekstrakcij po Soxhletu preseglji izkoristke ekstraktov, pridobljenih z uporabo ultrazvočne kopeli. Najvišji izkoristek je izkazal ekstrakt V₁, čigar material je bil predhodno obdelan s CO₂ pri tlaku 200 barov in temperaturi 50 °C (± 1 °C) ter nato ekstrahiran z ekstrakcijo po Soxhletu z uporabo 50 % etanola. V₁ in V₂ sta izkazala tudi najvišjo antioksidacijsko učinkovitost pri koncentraciji 5 mg/mL po petih minutah, medtem ko sta višjo antioksidacijsko učinkovitost pri koncentracijah 2,50 mg/mL, 1,50 mg/mL in 1,00 mg/mL izkazala vzorca, ekstrahirana z ultrazvočno kopeljo z uporabo 50 % etanola. Pri primerjavi rezultatov izmerjene antioksidacijske učinkovitosti in analize vzorcev s tehniko LC – MS opazimo, da so višjo antioksidacijsko učinkovitost pri koncentracijah 2,50 mg/mL, 1,50 mg/mL in 1,00 mg/mL izkazali vzorci, ekstrahirani z ultrazvočno kopeljo (V₅, V₆), ter V₄, ekstrahiran po Soxhletu, ki je v primerjavi z ekstrakti V₁, V₂, V₃, prav tako ekstrahiranimi po Soxhletu, vseboval najmanj testiranih spojin. Iz tega lahko sklepamo, da antioksidacijska učinkovitost v največji meri ne izhaja zgolj iz katehina, klorogenske kisline in artemisinina.

V zadnjem koraku smo analizirali učinek vodnih raztopin ekstraktov različnih razredčin na črevesne celice HUIEC. V razredčinah 1:2, 1:4 ter 1:8 določeni vzorci (V₁, V₅ ter V₆) celično rast zavirajo. Zato smo na celicah testirali tudi razredčine 1:16, 1:32 ter 1:64. Učinkovitost ekstraktov je tako ponovno narasla pri razredčitvi 1:16 in izkazala najboljše rezultate pri 1:32. Iz tega lahko sklepamo, da so ekstrakti pri razredčitvah 1:2 ter 1:4 preveč skoncentrirani in zavirajo celično rast. Najpozitivnejši učinek na celično viabilnost so izkazali ultrazvočni ekstrakti in ekstrakti po Soxhletu, pri katerih je bil kot topilo uporabljen 50 % etanol, tj. ekstrakti V₁, V₂, V₅ in V₆.

Glede na pridobljene rezultate lahko sklenemo, da so najprimernejši ekstrakti V₁ in V₂ ter V₆. Tako ekstrakt V₁ kot tudi V₂ je ekstrahiran z ekstrakcijo po Soxhletu z uporabo 50 % etanola. Čeprav je

izkoristek V_1 presega izkoristek ekstrakta V_2 za 3,6 %, je V_2 izkazal za 0,145 mg/g materiala višjo vsebnost katehina, klorogenske kisline in artemisinina v primeru vodnih ekstraktov ter za 0,53 mg/g materiala višjo vsebnost spojin v primeru metanolnih raztopin. Vzorec V_6 je bil predhodno obdelan s CO_2 pri tlaku 300 barov in temperaturi 35 °C in nato ekstrahiran z ultrazvočno ekstrakcijo z uporabo 50 % etanola. Izkoristek ekstrakta V_6 je z 8,40 % občutno nižji od izkoristkov ekstraktov V_1 in V_2 , tudi vsebnost katehina, klorogenske kisline ter artemisinina se je izkazala za izjemno nizko (v primeru vodnih raztopin pod 1,00 mg/g mat.). Medtem ko sta najvišjo antioksidacijsko učinkovitost ekstrakta V_1 in V_2 izkazala pri koncentraciji 5 mg/mL (94,64 % ter 94,28 %), je pri nižjih koncentracijah V_6 izkazal višji odstotek inhibicije ter ob nanosu na črevesne celice HUIEC pri razredčini 1:32 tudi najpozitivnejši učinek (126,26 %). Ekstrakt V_1 je dosegel svojo najvišjo vrednost v primeru razredčine 1:32 (120,20 %), V_2 pa v primeru razredčine 1:64 (123,27 %).

Zatorej, fenolni ekstrakti *Artemisie annue* L., V_1 , V_2 ter V_6 , z visokimi vrednostmi antioksidacijske učinkovitosti so ob nanosu na humane celice tankega črevesja HUIEC najbolj vzpodbujali celično rast.

6.3 NADALJNJE RAZISKAVE

Povod za nadaljevanje raziskovanja, osredotočenega na izvleček *Artemisie annue* L., je domnevno antikancerogeno delovanje njene aktivne komponente, artemisinina. Slednji se ekstrahira v kombinaciji s flavnoidi, ki lahko delujejo kot modulatorji oksidativnega stresa proti raku. Zato bi v naslednjem koraku raziskovanja optimalne razredčine 1:32 vodnih ekstraktov nanесли na rakaste človeške epitelne celice tankega črevesja in preučili učinkovitost delovanja.

7 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Naloga temelji na izvedbi *in vitro* testa, ki upošteva opisana načela 3R (angleško: replacement, refinement and reduction). Slednja uveljavljajo zmanjšanje, izboljšanje ter nadomestne alternative eksperimentiranju z uporabo živali, ki smo jih z izbranim postopkom želeli približati širši javnosti. V skladu s teorijo etike *in vivo* testi ne ravnajo moralno, ker se poslužujejo živih bitji, medtem ko se z uporabo *in vitro* testov temu izognemo. Zaradi izsledkov lanske raziskave smo se lahko

odločili za najučinkovitejše procese ekstrakcij in s tem dosegli najmanjšo možno porabo vhodnega materiala. Naloga je bila izdelana na okolju prijazen način z minimalnimi odpadki, ki smo jih v skladu s splošno sprejetimi smernicami odstranili in reciklirali, če se je le dalo. Pomembno je tudi omeniti doprinos naloge k razvoju morebitnih zdravil, namreč aktivna komponenta sladkega pelina, artemisinin, se ekstrahira v kombinaciji s flavnoidi, ki lahko delujejo kot modulatorji oksidativnega stresa proti raku.

8 VIRI IN LITERATURA

- Abba, M.L., Patil N., Leupold, J. H., Saeed, M. E. M., Efferth, T., Allgayer, H. (2018). Prevention of carcinogenesis and metastasis by Artemisinin-type drugs. *Cancer Letters*.
- Efferth, T. (2017). From ancient herb to modern drug: Artemisia annua and artemisinin for cancer therapy . *Seminars in Cancer Biology* 46, 65-83 .
- Gradišnik, L. T. (2015). HUIEC, Human intestinal epithelial cell line with differentiated properties: process of isolation and characterisation . *Wien Klinische Wochenschrift*.
- 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.
- Kale, A., Gawande, S., & Kotwal, S. (2008). Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level. *Phytoth. Res*, 567-577.
- Katt, M. E. (2016). In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 4, 12.
- Kelc, R., Trapečar, M., Gradišnik, L., Rupnik, M. S., Vogrin, M. (2015). Platelet-rich plasma, especially when combined with a TGF- β inhibitor promotes proliferation, viability and myogenic differentiation of myoblasts in vitro. *PloS one*, 10(2)
- Koletnik, J. (2018). Artemisia annua: procesi ekstrakcije, antioksidacijska učinkovitost in vsebnost skupnih fenolnih spojin. *Mladi za napredek Maribora*.
- Marković, M., Talić, S. (2013). Antioksidacijska aktivnost odabranih hercegovačkih vina. *Kem.Ind.* 62 (1-2), str. 7-10
- Nijveldt, R., van Nood, E., van Hoorn, D., Boelens, P., van Norren, K., van Leeuwen, P. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 418-425.
- Petrovič, T. (2013). Procesi v nekonvencionalnih superkritičnih fluidih. Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. [Dostopano 5 februar 2019]. Pridobljeno s: <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?lang=slv&id=40934>

- Ridgway, K. L. (2007). Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *American Journal of Chromatography*, 36-53.
- Robbinson, J. R. (2003). Phenolic Acids in Foods: An Overview off Analytical Methodology. *Agricultural and Food Chemistry Journal*, 2866-2887.
- Shingatgeri, V. (2018). Safety Concerns Using Cell-Based In Vitro Methods for Toxicity Assessment. London: Academic Press.
- Srivastava, S. (2018). Principles for in Vitro Toxicology. In K. S. Dhwan A., *In Vitro Toxicology* (p. Chapter 2). London: Academic Press.
- Stacey, G. (2004). Fundamental issues for cell line banks in biotechnology and regulatory affairs. *CRC press LLC*.
- Škerget, M., Fukne-Kokot, K., Hadolin, K. M., & Knez, Z. (January 01, 1998). Fazna ravnotežja kot osnova za načrtovanje visokotlačne mikronizacije. *Zbornik Referatov S Posvetovanja*, 577-582.
- Trugo, L. C. (2003). Analysis of Coffee Products. In F. P. Caballero B., *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. London: Academic Press.

Spletni viri

- <https://fran.si/iskanje?View=1&Query=in+vitro>; pridobljeno 15. 1. 2019
- <https://fran.si/iskanje?View=1&Query=in+vivo>; pridobljeno 15. 1. 2019
- <https://www.thermofisher.com/us/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/gas-chromatography-mass-spectrometry-gc-ms-information.html>; pridobljeno 28. 12. 2018

Viri forografij

- Slike 1 – 7: Koletnik, J. (2018). Artemisia annua: procesi ekstrakcije, antioksidacijska učinkovitost in vsebnost skupnih fenolnih spojin. *Mladi za napredek Maribora*.
- Slika 8: Nijveldt, R., van Nood, E., van Hoorn, D., Boelens, P., van Norren, K., van Leeuwen, P. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 418-425.
- Slika 9: https://en.wikipedia.org/wiki/Chlorogenic_acid#/media/File:Chlorogenic-acid-from-CAS-2D-skeletal.png; 27. 12. 2018

Slika 10: [https://en.wikipedia.org/wiki/Catechin#/media/File:\(%2B\)-Catechin.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Catechin#/media/File:(%2B)-Catechin.png); 27. 12. 2018

Slika 11: arhiv avtorice

Slika 12: Škerget, M., Fukne-Kokot, K., Hadolin, K. M., & Knez, Z. (January 01, 1998). Fazna ravnotežja kot osnova za načrtovanje visokotlačne mikronizacije. *Zbornik Referatov S Posvetovanja*, 577-582.

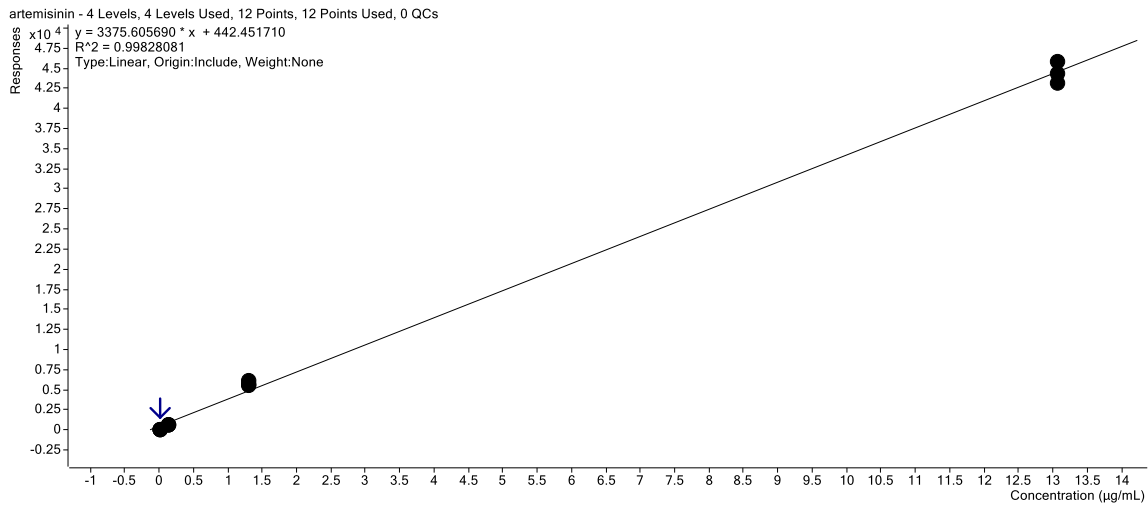
Slika 13: Petrovič, T. (2013). Procesi v nekonvencionalnih superkritičnih fluidih. Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. [Dostopano 5 februar 2019]. Pridobljeno s: <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?lang=slv&id=40934>

Slika 14: Huang, H. Y., et al. (2005). Analyses of phenolic compounds by microemulsion electrokinetic chromatography. *Electrophoresis* 26(16): 3134-40.

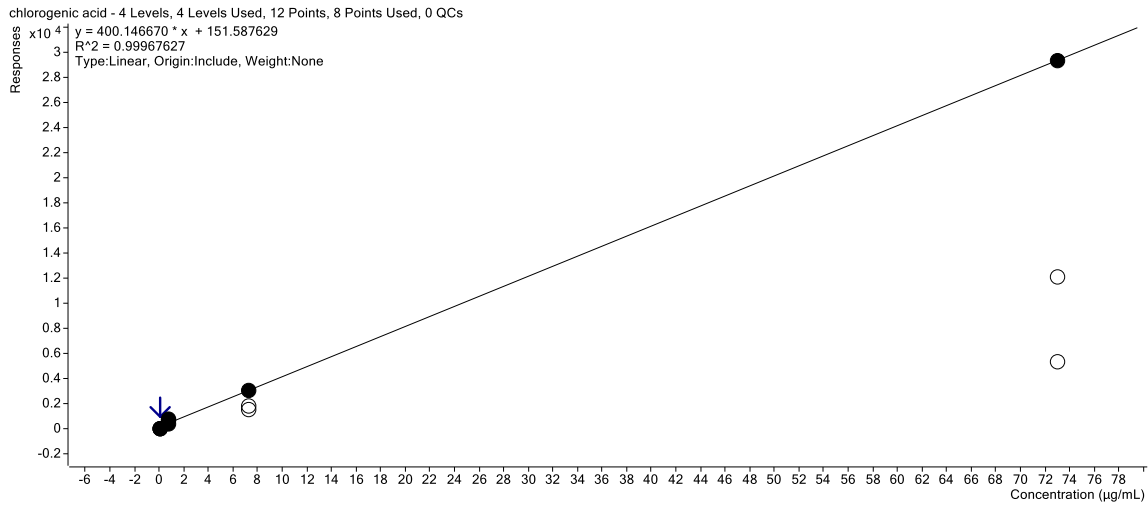
Slika 15: Koletnik, J. (2018). *Artemisia annua*: procesi ekstrakcije, antioksidacijska učinkovitost in vsebnost skupnih fenolnih spojin. *Mladi za napredek Maribora*.

Slike 16 – 34: arhiv avtorice

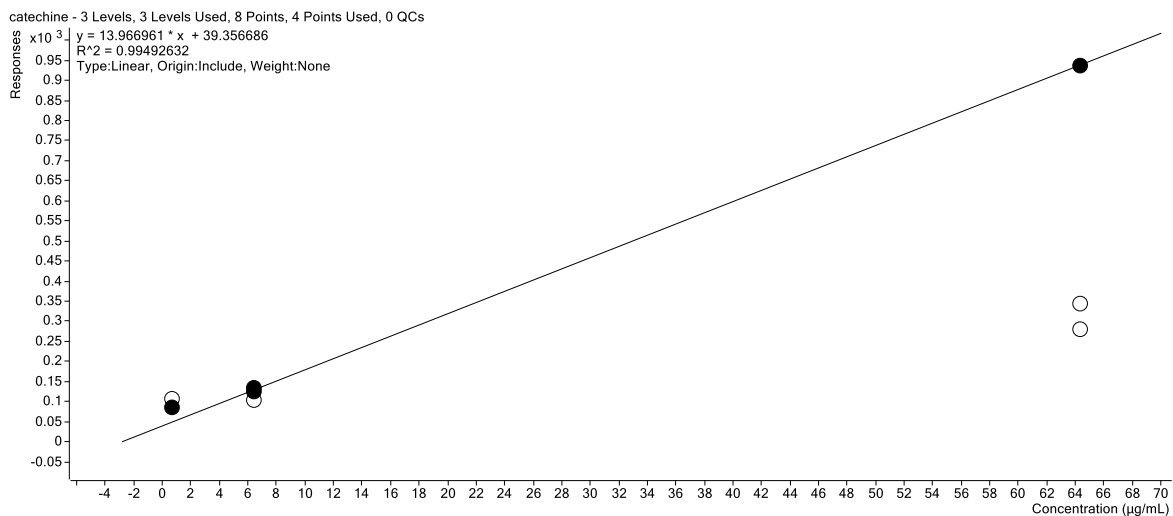
9 PRILOGA



GRAF 13: UMERITVENA KRIVULJA ZA ARTEMISININ



GRAF 14: UMERITVENA KRIVULJA ZA KLOROGENSKO KISLINO



GRAF 15: UMERITVENA KRIVULJA ZA KATEHIN

PREGLEDNICA 8: POVPREČNA VSEBNOST SPOJIN V VODNIH RAZTOPINAH EKSTRAKTOV

Vzorec	Artemisinin	Katehin	Klorogenska
	%	%	%
V ₁	0.0348	4.906	0.1145
V ₂	0.0717	6.540	0.2626
V ₃	0.0548	4.818	0.2414
V ₄	0.0326	3.118	0.2127
V ₅	0.0308	0.1143	0.0713
V ₆	0.0325	0.0995	0.0564
V ₇	0.0359	6.620	0.1462
V ₈	0.0444	5.232	0.1592

PREGLEDNICA 9: POVPREČNA VSEBNOST SPOJIN V METANOLNIH RAZTOPINAH EKSTRAKTOV

Vzorec	Artemisinin	Katehin	Klorogenska
	%	%	%
V ₁	0.0658	3.486	0.1156
V ₂	0.1003	5.005	0.2769
V ₃	0.0895	3.867	0.3141

V ₄	0.0821	2.715	0.1861
V ₅	0.0336	2.860	0.0277
V ₆	0.0550	2.199	0.0179
V ₇	0.0667	4.823	0.1510
V ₈	0.0819	4.096	0.1682

PREGLEDNICA 10: ABSORBANCA VZORCEV
PRI KONCENTRACIJI 5.00 MG

Čas (min) / Vzorec	0	3	5
V ₁	1,129	0,089	0,088
V ₂	1,254	0,096	0,094
V ₃	1,109	0,112	0,102
V ₄	1,221	0,148	0,147
V ₅	0,971	0,114	0,12
V ₆	1,106	0,115	0,125
V ₇	1,08	0,106	0,095
V ₈	1,177	0,294	0,117
Kontrola	1,636	1,634	1,642

PREGLEDNICA 11: ABSORBANCA VZORCEV
PRI KONCENTRACIJI 2,50 MG/ML

Čas (min) / Vzorec	0	3	5
V ₁	1,359	0,304	0,202
V ₂	1,204	0,316	0,22
V ₃	1,414	0,383	0,183
V ₄	1,343	0,112	0,106
V ₅	1,35	0,11	0,093
V ₆	1,379	0,267	0,138
V ₇	1,382	0,432	0,22
V ₈	1,361	0,726	0,501
Kontrola	1,66	1,648	1,646

PREGLEDNICA 12: ABSORBANCA VZORCEV
PRI KONCENTRACIJI 1,50 MG/ML

Čas (min) / Vzorec	0	3	5
V ₁	1,598	0,593	0,262
V ₂	1,586	0,599	0,411
V ₃	1,407	0,53	0,318
V ₄	1,426	0,151	0,104
V ₅	1,147	0,247	0,115
V ₆	1,195	0,421	0,229
V ₇	1,158	0,797	0,435
V ₈	1,332	0,904	0,68
Kontrola	1,662	1,631	1,65

PREGLEDNICA 13: ABSORBANCA VZORCEV
PRI KONCENTRACIJI 1,00 MG/ML

Čas (min) / Vzorec	0	3	5
V ₁	1,413	0,681	0,487
V ₂	1,347	0,927	0,747
V ₃	1,384	0,861	0,635
V ₄	1,362	0,159	0,102
V ₅	1,347	0,23	0,128
V ₆	1,275	0,433	0,254
V ₇	1,276	0,724	0,446
V ₈	1,157	0,972	0,735
Kontrola	1,665	1,651	1,663

PREGLEDNICA 14: ODSOTOK INHIBICIJE
VZORCEV PRI KONCENTRACIJI 5 MG/ML

Čas (min) / Vzorec	0	3	5
V ₁	30,99	94,55	94,64
V ₂	23,35	94,12	94,28
V ₃	32,21	93,15	93,79
V ₄	25,37	90,94	91,05
V ₅	40,65	93,02	92,69
V ₆	32,40	92,96	92,39
V ₇	33,99	93,51	94,21
V ₈	28,06	82,01	92,87
Kontrola	0	0	0

PREGLEDNICA 15: ODSOTOK INHIBICIJE
VZORCEV PRI KONCENTRACIJI 2,5 MG/ML

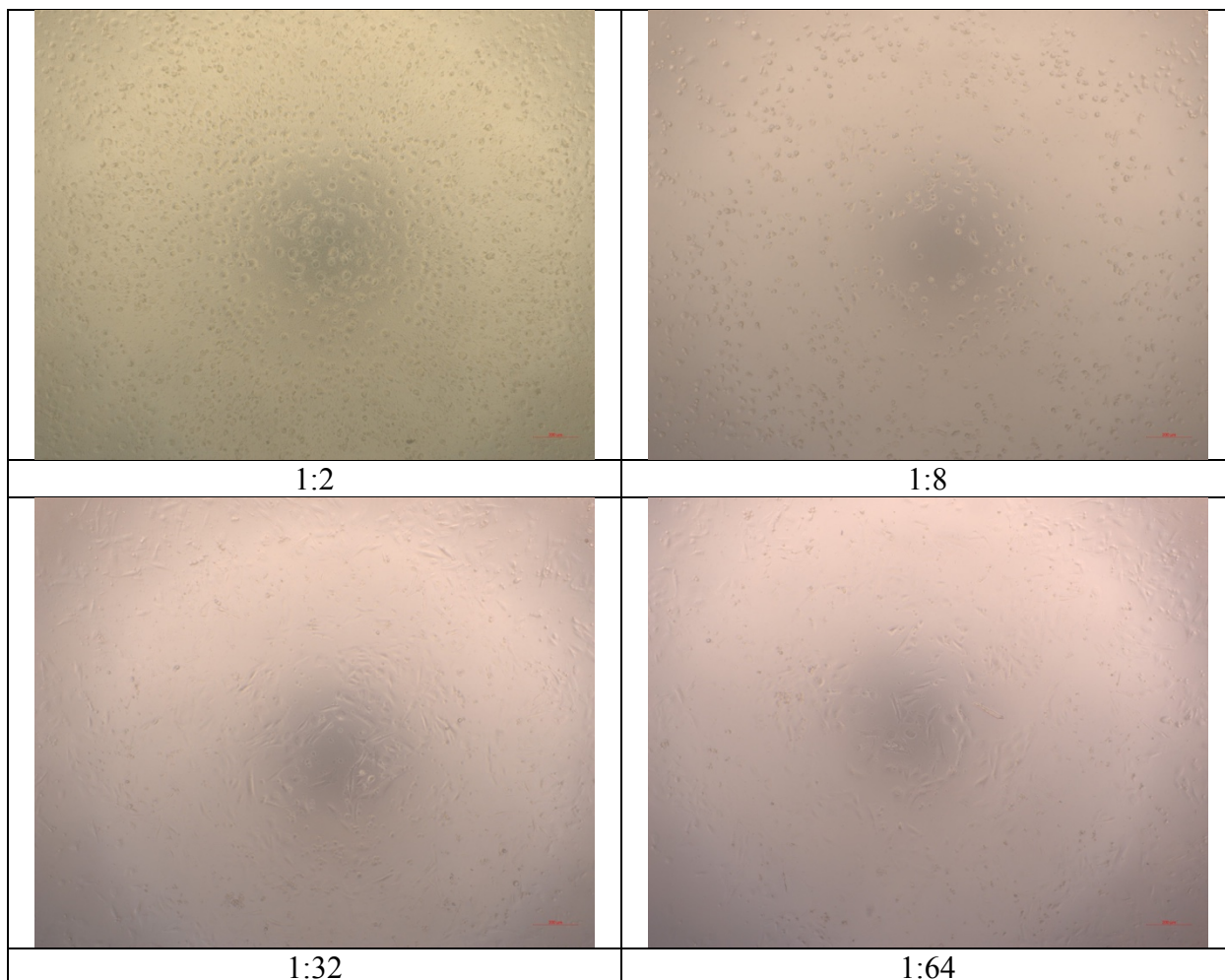
Čas (min) / Vzorec	0	3	5
V ₁	18,13	81,55	87,73
V ₂	27,47	80,83	86,63
V ₃	14,82	76,76	88,88
V ₄	19,10	93,20	93,56
V ₅	18,67	93,33	94,35
V ₆	16,93	83,80	91,61
V ₇	16,75	73,79	86,63
V ₈	18,01	55,95	69,56
Kontrola	0	0	0

PREGLEDNICA 16: ODSOTOK INHIBICIJE
VZORCEV PRI KONCENTRACIJI 1,50 MG/ML

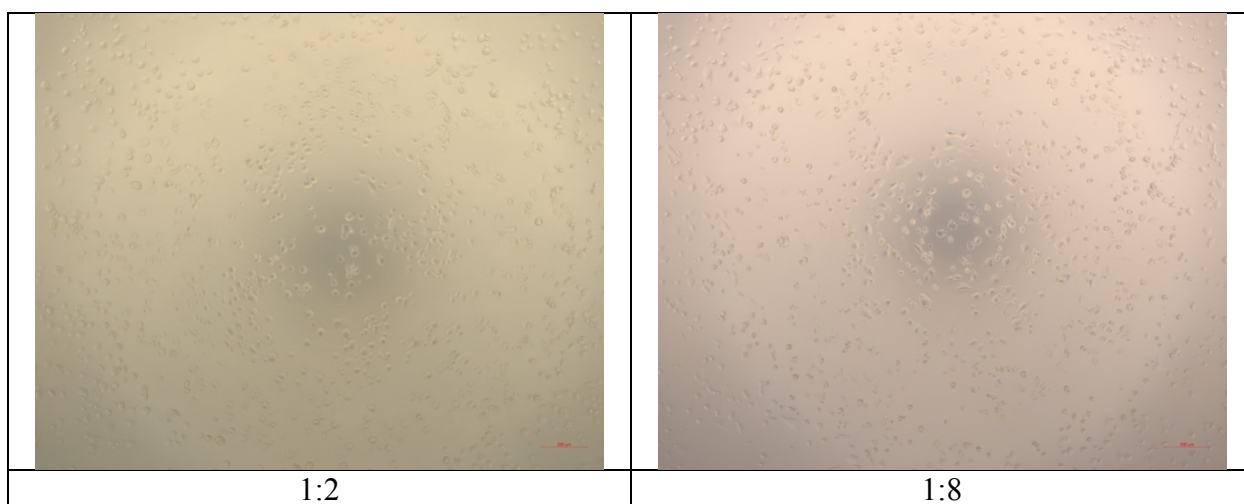
Čas (min) / Vzorec	0	3	5
V ₁	3,85	63,64	84,12
V ₂	4,57	63,27	75,10
V ₃	15,34	67,50	80,73
V ₄	14,20	90,74	93,70
V ₅	30,99	84,86	93,03
V ₆	28,10	74,19	86,12
V ₇	30,32	51,13	73,64
V ₈	19,86	44,57	58,79
Kontrola	0	0	0

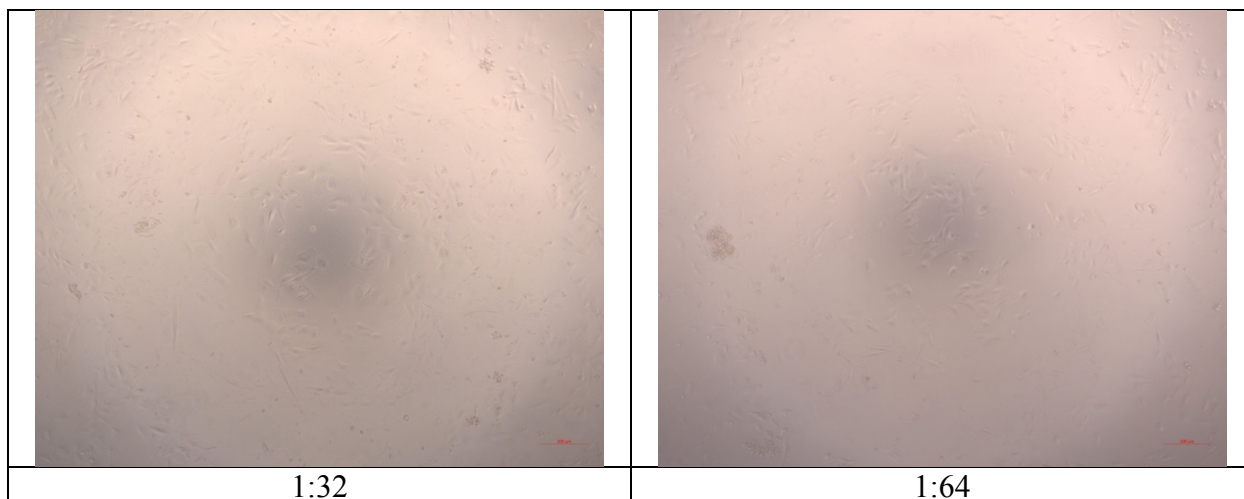
PREGLEDNICA 17: ODSOTOK INHIBICIJE
VZORCEV PRI KONCENTRACIJI 1,00 MG/ML

Čas (min) / Vzorec	0	3	5
V ₁	15,14	58,75	70,72
V ₂	19,10	43,85	55,08
V ₃	16,88	47,85	61,82
V ₄	18,20	90,37	93,87
V ₅	19,10	86,07	92,30
V ₆	23,42	73,77	84,73
V ₇	23,36	56,15	73,18
V ₈	30,51	41,13	55,80
Kontrola	0	0	0

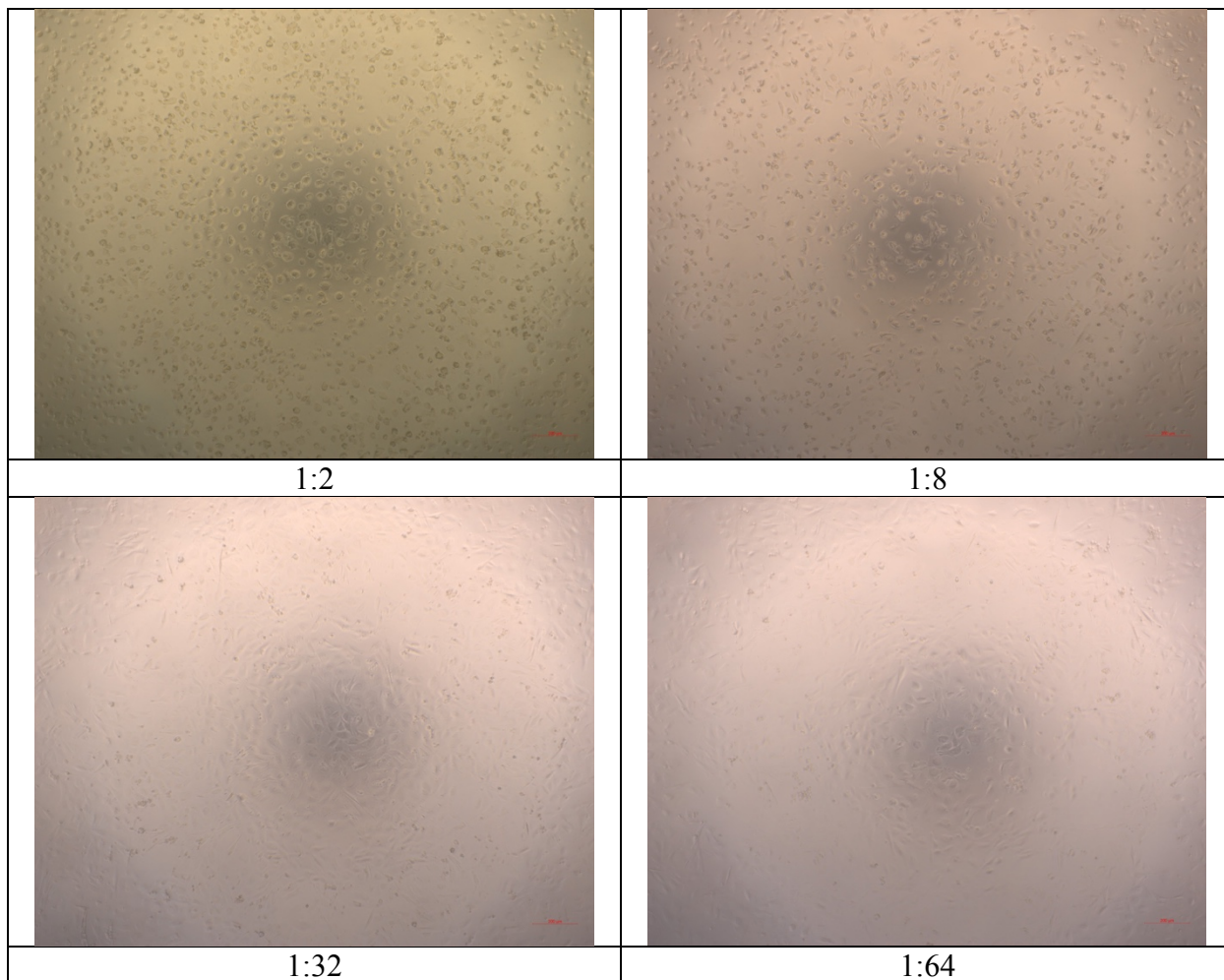


SLIKA 27: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN EKSTRAKTA V₃ NA RAST CELIC

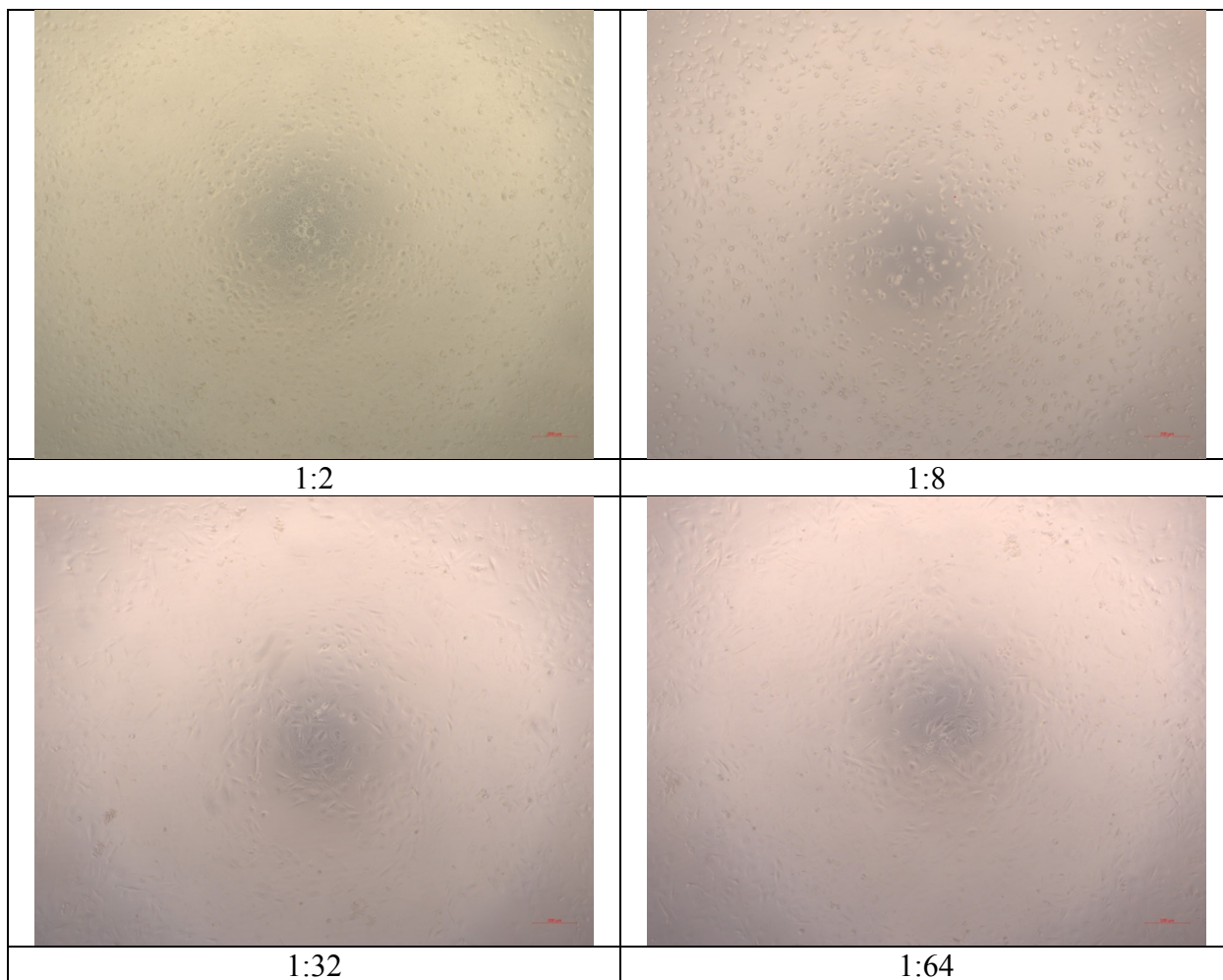




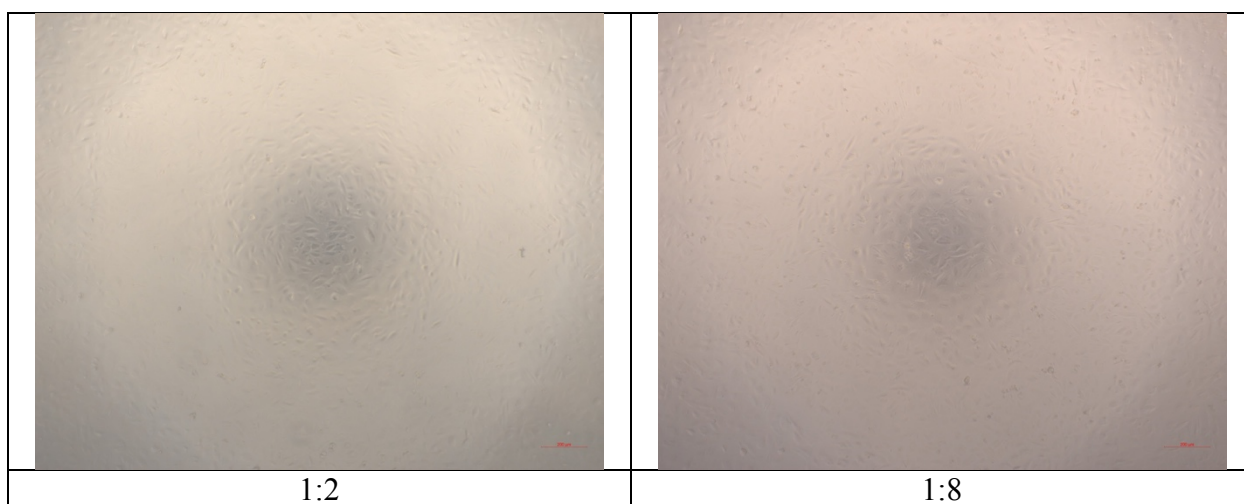
SLIKA 28: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN EKSTRAKTA V₄ NA RAST CELIC

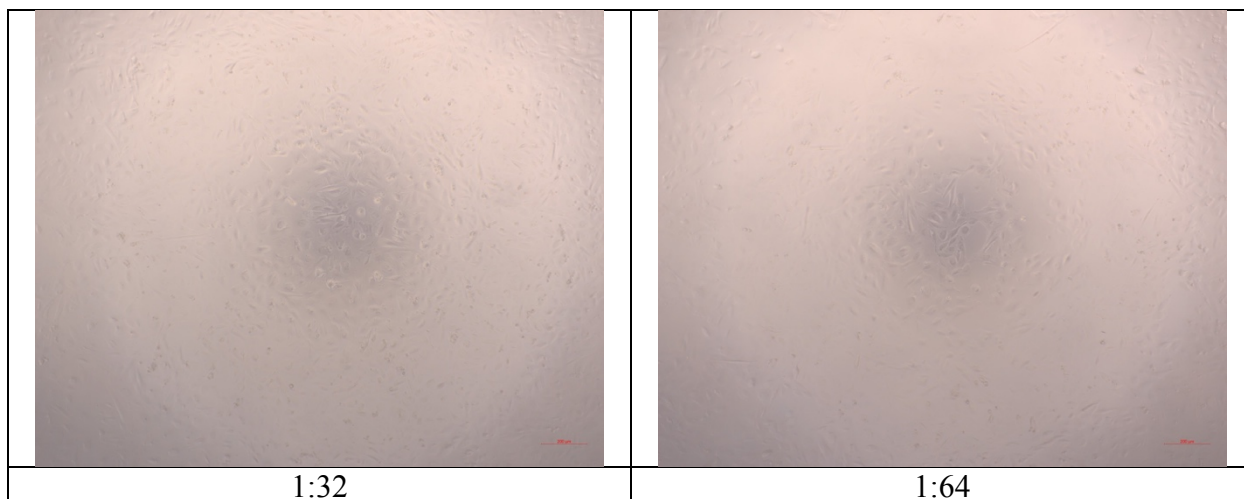


SLIKA 29: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN EKSTRAKTA V₇ NA RAST CELIC

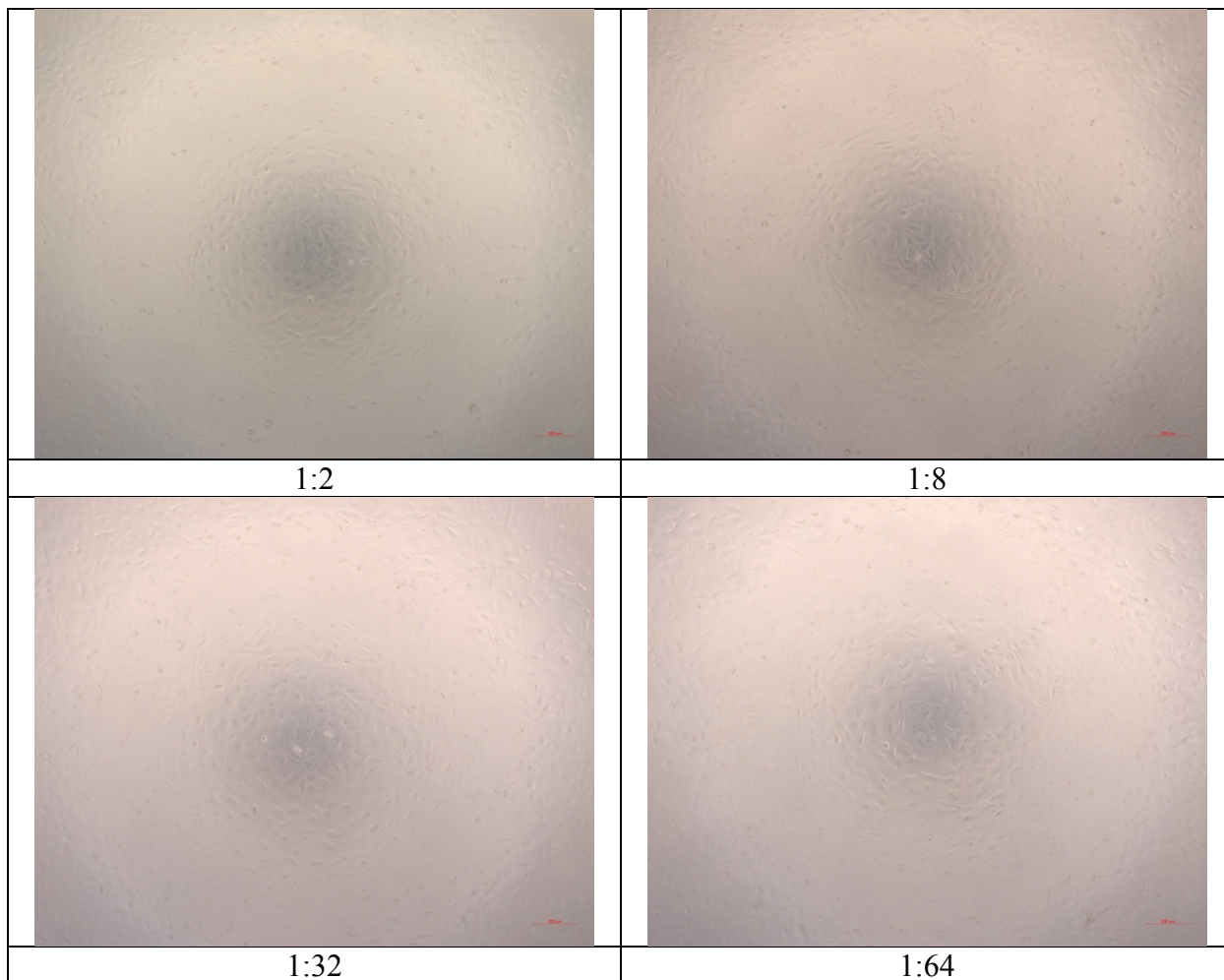


SLIKA 30: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN EKSTRAKTA V_8 NA RAST CELIC

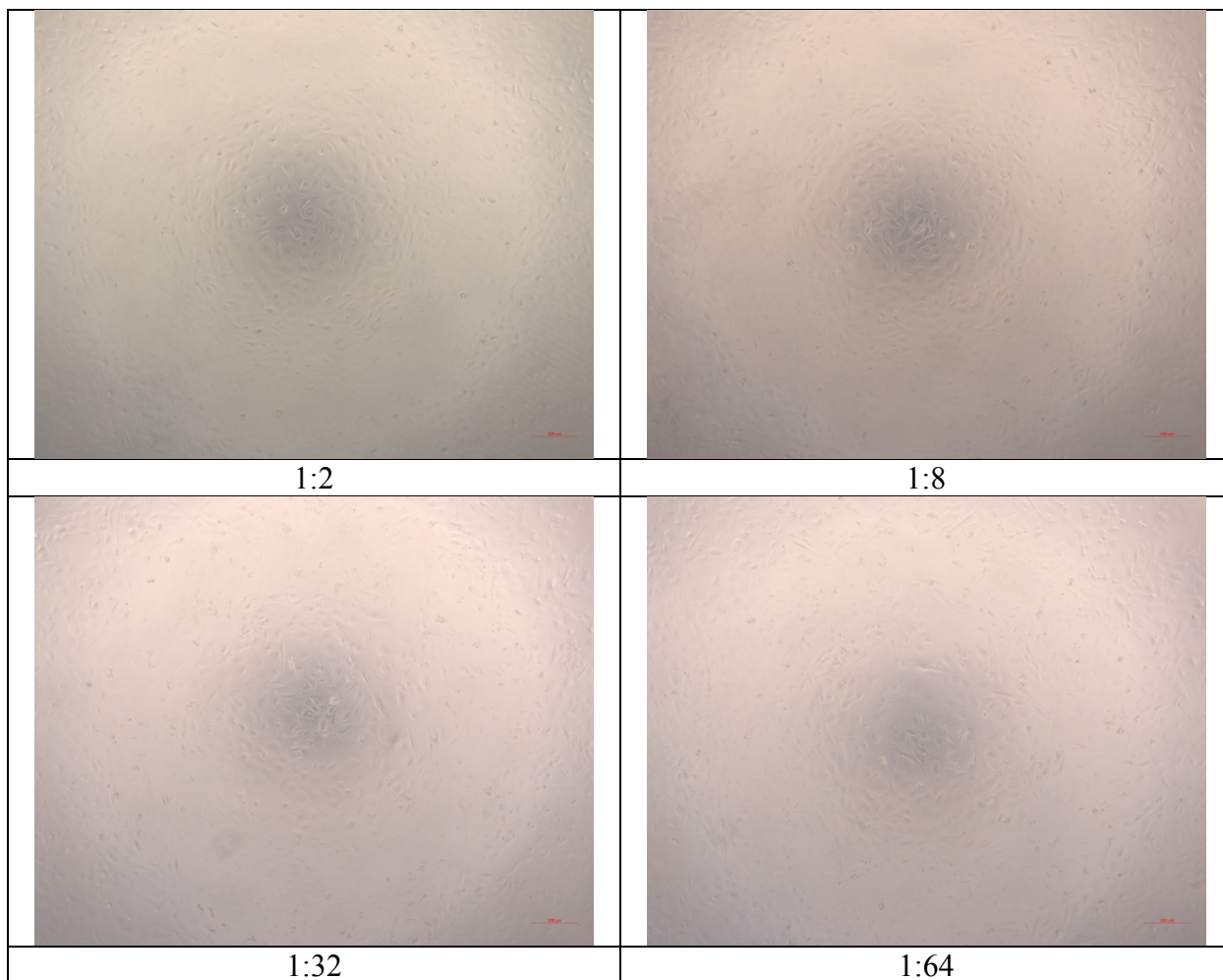




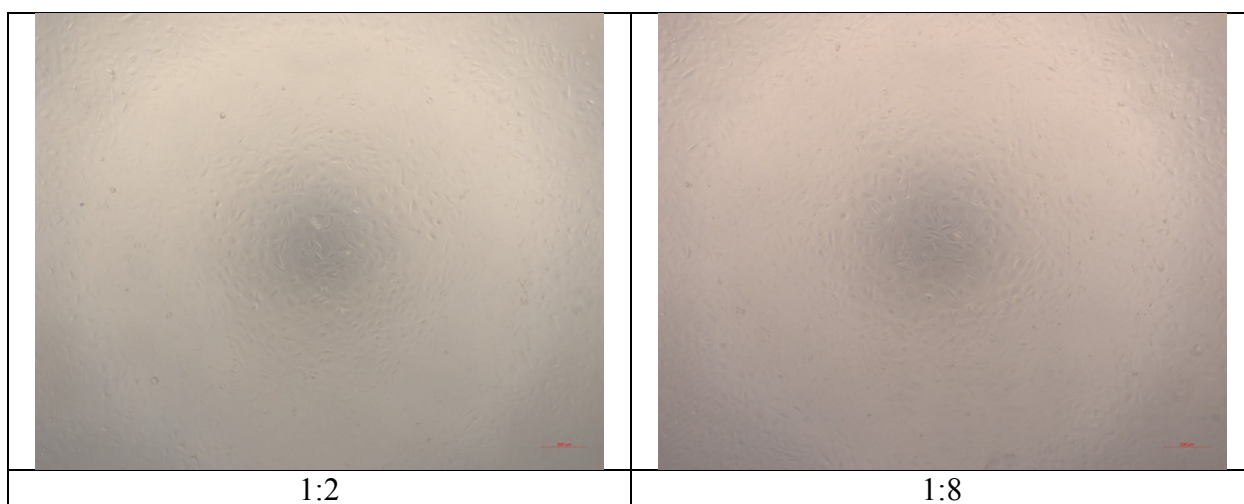
SLIKA 31: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN EKSTRAKTA MIX 3 NA RAST CELIC

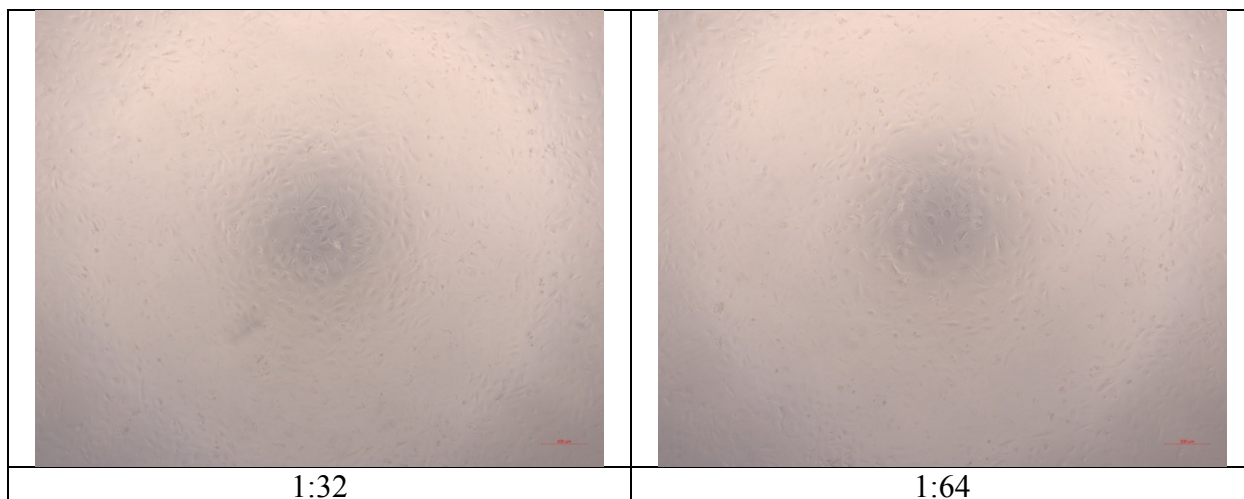


SLIKA 32: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN SPOJINE S1 NA RAST CELIC



SLIKA 33: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN SPOJINE S₂ NA RAST CELIC





SLIKA 34: PRIMERJAVA VPLIVA RAZLIČNIH RAZREDČIN SPOJINE S₃ NA RAST CELIC