



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Marta Mandić

**ZELENA EKSTRAKCIJA, KEMIJSKA
KARAKTERIZACIJA I BIOLOŠKI UČINCI
TERPENA I POLIFENOLA IZ
ODABRANIH VRSTA RODA *Artemisia* L.**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Marta Mandić

**ZELENA EKSTRAKCIJA, KEMIJSKA
KARAKTERIZACIJA I BIOLOŠKI UČINCI
TERPENA I POLIFENOLA IZ
ODABRANIH VRSTA RODA *Artemisia* L.**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević

Zagreb, 2026.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Marta Mandić

**GREEN EXTRACTION, CHEMICAL
CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL
EFFECTS OF TERPENES AND
POLYPHENOLS FROM SELECTED
Artemisia SPECIES**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Prof. Sanda Vladimir-Knežević, Ph. D.

Zagreb, 2026

Doktorski rad predan je na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti u području biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen na Zavodu za Farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u suradnji sa Zavodom za farmakognoziju Instituta za farmaceutske znanosti Sveučilišta u Grazu (Austrija).

Zahvaljujem ...

mentorici prof. dr. sc. Sandi Vladimir-Knežević na ukazanom povjerenju, znanstvenom usmjerenju te svim korisnim savjetima i pomoći tijekom izrade ove disertacije. Posebno zahvaljujem što ste mi srdačno otvorili vrata Zavoda i dopustili da se osjećam kao doma proteklih godina. Bila mi je izuzetna čast učiti od Vas;

prof. dr. sc. Franzu Bucaru na velikodušnoj pomoći, prenesenom znanju i srdačnom gostoprimstvu tijekom fitokemijskih ispitivanja na Institut für Pharmazeutische Wissenschaften-Pharmakognosie, Karl-Franzens Universität Graz (Austrija) u sklopu Ernst-Mach stipendije;

doc. dr. sc. Matiji Cvetniću sa Zavoda za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije na pomoći oko statističke obrade podataka vezanih za eterična ulja i sc-CO₂ ekstrakte;

svim bivšim i sadašnjim djelatnicima Zavoda za Farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na nesebičnoj pomoći, idejama i stručnim savjetima te prijateljskom odnosu. Boravak na Zavodu i naša druženja zauvijek će imati posebno mjesto u mom srcu;

dekanu prof. dr. sc. Ivici Briziću, prodekanima doc. dr. sc. Ivoni Ivančić i doc. dr. sc. Martinu Kondži, prijateljima i kolegama, djelatnicima Farmaceutskog fakulteta Sveučilišta u Mostaru na puno strpljenja i razumijevanja tijekom izrade ove disertacije, na svim savjetima i potpori;

Posebno zahvaljujem prof. dr. sc. Moniki Tomić i prof. dr. sc. Dubravki Šimić na znanstvenom usmjerenju, svesrdnoj podršci, toplim riječima i vjeri u mene od samog početka.

Na kraju, najveće hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su tijekom svih ovih godina bili moj oslonac, bez vaše podrške ne bih uspjela.

Mojim sestrama koje su bile vjetar u leđa kada je bilo teško, hvala vam!

Petri, Heleni, Barbari, Petru i Sofiji čija me ljubav motivirala, voli vas tetka.

Mama i tata, bez vaše bezuvjetne ljubavi i vjere u mene – ne bih danas bila gdje jesam! *VOLIM VAS!*

Sažetak

U okviru ovog doktorskog rada po prvi put je provedena usporedna zelena ekstrakcija, kemijska karakterizacija te ispitivanje bioloških učinaka terpena i polifenola iz odabranih vrsta roda *Artemisia* L. (*A. annua* L., *A. absinthium* L., *A. abrotanum* L., *A. vulgaris* L. i *A. maritima* L.) s područja Bosne i Hercegovine te Republike Hrvatske. Ekstrakcija biološki aktivnih sastavnica iz odabranih biljnih vrsta provedena je hidrodestilacijom, parnom destilacijom pri atmosferskom tlaku pare, supekritičnim ugljikovim dioksidom, prikladnim organskim otapalima te niskotemperaturnim eutektičkim otapalima. Kvalitativna i kvantitativna analiza terpena i polifenola provedena je primjenom spektrofotometrijskih metoda te različitih kromatografskih tehnika kao što su GC-MS, HPTLC, HPLC-DAD i LC-PDA-ESI-MS/MS. Ispitivane vrste *Artemisia* značajno su se razlikovale prema sadržaju i sastavu eteričnog ulja. Utvrđeno je da primjena različitih metoda destilacije značajno utječe na prinos i kromatografski profil eteričnog ulja. Optimiranjem postupka superkritične ekstrakcije isparljivih terpena iz vrste *A. annua* dobivene su optimalne vrijednosti tlaka i temperature za ciljanu sc-CO₂ ekstrakciju isparljivih terpena. Identificirano je 36 flavonoida i fenolnih kiselina, od kojih su neki po prvi put otkriveni u određenim vrstama. Prevladavale su fenolne kiseline, a udjelom su se isticali derivati kaveoilkina kiseline. Biološki učinci 70 %-tnih etanolnih ekstrakata ispitani su u prikladnim eksperimentalnim sustavima. Svim ispitivanim vrstama roda *Artemisia* utvrđena su snažna antioksidacijska svojstva temeljena na sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH i NO radikala, redukcije i keliranja iona željeza, a najveći doprinos se pripisuje fenolnim kiselinama. Ispitane vrste pokazale su umjerenu sposobnost inhibicije aktivnosti enzima α -amilaze, α -glukozidaze i acetilkolinesteraze, ukazujući na hipoglikemijska i neuroprotektivna svojstva. Rezultati provedenih fitokemijskih i bioloških ispitivanja odabranih vrsta roda *Artemisia* L., ukazali su na njihov biomedicinski potencijal i mogućnost primjene u prevenciji i liječenju kroničnih bolesti povezanih sa starenjem.

Ključne riječi: *Artemisia*, zelena ekstrakcija, terpeni, polifenoli, antioksidacijski učinak, α -glukozidaza, α -amilaza, acetilkolinesteraza

Extended summary

Background: Due to the growing demand from pharmaceutical, cosmetic, and food industries for natural substances, and the increasing focus on green technologies for the development of healthy and environmentally friendly products, sustainable green extraction of bioactive plant components is becoming more important. Among *Artemisia* species, many medicinal plants are used in both traditional medicine and modern phytotherapy, and today they also serve as sources of new phytotherapeutics. *Artemisia annua* L., known as Qinghao in China, has been used for centuries in traditional Chinese medicine (TCM) to treat a wide range of diseases and conditions, while *Artemisia absinthium* L. is the only *Artemisia* species with a monograph in the European Pharmacopoeia. Previous studies have shown that *Artemisia* species are rich in secondary metabolites, such as terpenes and polyphenols, and possess antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, antidiabetic, hypolipidemic, neuroprotective, hepatoprotective, nephroprotective, and antitumor effects.

Aims: In this doctoral thesis, for the first time, the green extraction, chemical composition, and biological effects of selected, insufficiently studied *Artemisia* species growing both wild and cultivated in Bosnia and Herzegovina and Croatia are comparatively investigated. The specific objectives guiding this research are: (a) to optimize green extraction methods of terpenes and polyphenols using supercritical carbon dioxide and deep eutectic solvents; (b) to perform qualitative and quantitative analysis of terpenes and polyphenols in plant extracts and essential oils using chromatographic techniques (GC-MS, HPTLC, HPLC-DAD, LC-PDA-ESI-MS/MS) and spectrophotometric methods; (c) to determine the biological activity of plant extracts under *in vitro* conditions, with emphasis on antioxidant, cytotoxic, neuroprotective, and hypoglycemic effects; (d) to identify the constituents responsible for the biological activity of selected plant species and clarify possible mechanisms of action; (e) establish the biomedical potential of selected *Artemisia* species in comparison with the officially recognised medicinal species *A. absinthium* and *A. annua*, which have monographs in the European and Chinese Pharmacopoeias.

Methods: Essential oils and volatile terpenes were isolated using green extraction methods, including hydrodistillation, steam distillation, and supercritical carbon dioxide (sc-CO₂) extraction. Additionally, 70 % ethanol and deep eutectic solvents were used to extract polyphenols from the flowering aerial parts of selected *Artemisia* species. Essential oils and sc-CO₂ extracts were characterised by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). High-

performance thin-layer chromatography (HPTLC) was used to detect various subclasses of polyphenols in methanolic *Artemisia* extracts with the HPTLC apparatus. The contents of total phenolic acids, flavonoids, and tannins in aerial plant parts were determined by different spectrophotometric methods according to the European Pharmacopoeia. Furthermore, phenolic acids in aerial plant parts were extracted by 70 % ethanol and deep eutectic solvents and determined in the same way. Liquid chromatography with electrospray ionization and mass spectrometry and diode array ultraviolet detection (LC-PDA-ESI-MS/MS and HPLC-DAD) was used for the identification and quantification of phenolic acids and flavonoids in the 70 % ethanolic extracts. The biological effects of plant extracts and phenolic constituents were determined using different bioassays. The antioxidant properties of selected *Artemisia* species were tested to determine their free radical scavenging ability, metal chelating activity and reducing power. Various colorimetric methods were used to determine the inhibitory effects of the tested *Artemisia* species on α -amylase, α -glucosidase and acetylcholinesterase enzymes in 96-well microtiter plates. The antiproliferative effect of selected *Artemisia* species on the human liver cancer cell line (HepG2) was determined by luminescent cell viability assay.

Results: The extraction yields of essential oils obtained by hydrodistillation from the aerial parts of selected *Artemisia* species ranged from 3 to 34 mL/kg, while yields from steam distillation were significantly lower (1-5 mL/kg). The highest yield was found in the essential oils of *A. annua* obtained by both methods, while the lowest yield was observed in both essential oils of *A. vulgaris*. According to the results of GC-MS analysis, 98 and 107 different compounds were identified in all essential oils obtained by hydrodistillation and steam distillation, accounting for 81,06-97,55 % and 89,03-96,42 % of the total oil content, respectively. The chromatographic profiles of the selected *Artemisia* species showed differences in composition. The hydrodistilled essential oils of the investigated *Artemisia* species were characterized by a high content of monoterpene components (66.18–91.62 %), while sesquiterpenes were present in lower amounts (3.74–23.15 %). Some essential oils contained phenylpropanoid compounds, fatty acids, and other constituents. Among the monoterpene components, oxygenated monoterpenes predominated (48.04–66.80 %), while monoterpene hydrocarbons ranged from 8.31 % (*A. absinthium*) to 24.82 % (*A. annua*). In the essential oils of *A. maritima* and *A. vulgaris*, the most abundant component was 1,8-cineole (24.04 % and 35.36 %, respectively), while the main components in the other oils differed significantly. Essential oils obtained by steam distillation of *A. absinthium*, *A. annua*, and *A. maritima* were characterized by a high proportion of monoterpene components (37.68–88.13 %), while sesquiterpenes were present in

lower amounts. In contrast, the essential oils of *A. abrotanum* and *A. vulgaris* contained significantly higher sesquiterpene fractions (49.37–76.50 %), along with small amounts of non-terpenoid compounds such as phenylpropanoids and fatty acids. As in hydrodistilled essential oils, those obtained by steam distillation were also dominated by oxygenated monoterpenes (31.72–68.65 %), while monoterpene hydrocarbons ranged from 4.92 % (*A. absinthium*) to 26.79 % (*A. annua*), except in *A. vulgaris*, where no oxygenated monoterpenes were detected. Significant differences were observed in the sesquiterpene fraction among the analyzed essential oils (6.64–76.50 %). In *A. abrotanum* and *A. absinthium*, oxygenated sesquiterpenes predominated (6.85–30.89 %), whereas in *A. annua*, *A. maritima*, and *A. vulgaris*, sesquiterpene hydrocarbons were more abundant (4.05–61.37%). The essential oils also differed in their main constituents. The essential oil of *A. vulgaris* obtained by steam distillation differed significantly in composition not only from the other investigated species but also from the oil obtained by hydrodistillation. The main component of the hydrodistilled essential oil was 1,8-cineole (35.36 %). In the essential oil obtained by steam distillation, the contents of α -, β -, and δ -selinene, germacrene D, and δ -cadinene increased significantly, while 1,8-cineole was not detected. A similar shift in major constituents was observed in the essential oil of *A. maritima*. In the hydrodistilled oil, 1,8-cineole, borneol, and 2,4-dimethylether-fluoroacetophenone predominated. In contrast, steam distillation resulted in the complete loss of borneol and a substantial decrease of 1,8-cineole, while significantly increasing the proportion of 2,4-dimethylether-fluoroacetophenone (20.20 %) and bornyl acetate. Artemisia ketone and camphor were the dominant components in the hydrodistilled essential oil of *A. annua*. Steam distillation resulted in a marked increase in artemisia ketone (42.04 %) and a decrease in camphor content. Simultaneously, a notable increase in α -pinene (17.78 %) was observed. The essential oil of *A. absinthium* obtained by steam distillation contained higher amounts of *trans*-thujone (29.46 %) and *trans*-sabinyl acetate (27.25 %), and lower amounts of *trans*-epoxyocimene, which had been identified as one of the main components in the hydrodistilled oil. For *A. abrotanum*, steam distillation significantly reduced the content of piperitone (18.09 %) and davanone B, while increasing the proportion of davana ether. The extraction of volatile terpenes from *A. annua* with supercritical CO₂ (sc-CO₂) was optimized using a full factorial design procedure. Extraction yields (m/m) varied from 0.62% (130 bar/40 °C) to 1.92% (100 bar/60 °C). Monoterpenes were the most abundant constituents of the sc-CO₂ extracts, among which artemisia ketone (16.93–48.49 %), camphor (3.29–18.44 %) and 1,8-cineole (4.77–11.89 %) dominated. Arteannuin B (3.98–10.03 %) and β -selinene (1.05–7.42 %) were the major sesquiterpenes. Differences were found between the terpene profiles of the sc-CO₂ extracts and

the essential oils obtained by conventional hydrodistillation and steam distillation. The yields of sc-CO₂ extracts of five selected *Artemisia* species obtained under optimal conditions, ranged from 0.13% (*A. absinthium*) to 1.92% (*A. annua*). The *A. annua* and *A. maritima* species exhibited higher extract yields at a pressure of 100 bar and a temperature of 60 °C, whereas the remaining three species showed higher yields at the higher applied pressure (181 bar), with other extraction conditions kept constant. *A. abrotanum* achieved one of the highest yields (1.89%) among the investigated species under conditions of 181 bar and 60 °C.

The presence of phenolic acids and flavonoids in the selected *Artemisia* species was confirmed by HPTLC using planar chromatography apparatus. The contents of total phenolic acids (3.72-6.45 %), flavonoids (0.19-0.57 %) and tannins (1.22-2.48 %) were determined in the flowering aerial parts of *Artemisia* species. Total phenolic acids were also determined spectrophotometrically in sonicated deep eutectic solvent extracts of the flowering aerial parts of selected *Artemisia* species. The deep eutectic solvent used in this study contained choline chloride as the HBA component and ethylene glycol or glycerol as HBD components in a molar ratio of 1:3. The extraction process was optimized by adding 30 % and 50 % of distilled water to stock DES solutions, and the results were compared with extracts obtained using 70 % ethanol. The total content of phenolic acids in extracts of selected *Artemisia* species ranged from 0.12 % to 0.52 % (ChCl:EG) and from 0.04 % to 0.43 % (ChCl:Gly), whereas 70 % ethanol extraction resulted in values ranging from 0.31 % to 0.51 %. Chromatographic profiles were established for the studied plant extracts by LC-PDA-ESI-MS/MS and HPLC-DAD analysis, and satisfactory separation of the polyphenolic compounds was obtained. The chromatographic profiles of the selected *Artemisia* species differed. All investigated species were characterized by the presence of hydroxycinnamic acid derivatives, particularly caffeoylquinic acids, with neochlorogenic, chlorogenic, cryptochlorogenic, 3,5-di-caffeoylquinic, and 4,5-di-caffeoylquinic acids detected in all species. In *A. annua* and *A. maritima*, derivatives of feruloyl-caffeoylquinic and caffeoyl-feruloylquinic acids were observed, while 5-feruloylquinic acid was identified in all analyzed samples except *A. absinthium*. The selected *Artemisia* species were also characterized by the presence of flavonoid glycosides and aglycones, particularly flavones. Species of the genus *Artemisia* are rich in highly methoxylated flavones. To the best of our knowledge, this study is the first to report the identification of hispidulin, jaceosidin and eupatilin in *A. maritima*. In *A. abrotanum*, *A. absinthium*, and *A. annua*, the presence of artemetin, a highly methoxylated flavone characteristic of *Artemisia* species, was also identified by LC-PDA-ESI-MS/MS. Analysis of

ethanol extracts from selected *Artemisia* species on a C18 column showed a peak at 30.10 minutes. The dominant molecular ion of this peak was $[M+H]^+$ at m/z 375, corresponding to a molecular mass of 374, which is consistent with either casticin or chrysosplenetin. Using a method optimized for the separation of these two peaks, both casticin and chrysosplenetin were identified in *A. absinthium* and *A. annua*, while *A. abrotanum* and *A. vulgaris* contained chrysosplenetin. Neither was identified in *A. maritima*. Moreover, neochlorogenic, chlorogenic, cryptochlorogenic, 1,5-di-caffeoylquinic, 3,4-di-caffeoylquinic, 3,5-di-caffeoylquinic, and 4,5-di-caffeoylquinic acids were quantified by HPLC-DAD. 3,5-Di-caffeoylquinic acid was the most abundant phenolic constituent in all extracts (2.24–8.06 mg/g), except in *A. annua*, where 1,5-di-caffeoylquinic acid was predominant (2.38 mg/g). Based on its content across species, the following descending order was observed: *A. vulgaris* > *A. absinthium* > *A. abrotanum* > *A. maritima* > *A. annua*.

The antioxidant effectiveness of ethanolic *Artemisia* extracts was determined using four different assays, compared with chlorogenic acid and reference antioxidants. All tested plant extracts exhibited DPPH free radical scavenging activity ($IC_{50} = 46.76\text{--}132.85 \mu\text{g/mL}$) and nitric oxide scavenging activity ($IC_{50} = 36.55\text{--}106.19 \mu\text{g/mL}$). The tested extracts also showed strong reducing properties ($IC_{50} = 21.41\text{--}51.58 \mu\text{g/mL}$) and ferrous ion chelating activity ($IC_{50} = 64.25\text{--}183.62 \mu\text{g/mL}$). As previously suggested by the scientific literature, this study confirmed that selected *Artemisia* species are effective antioxidants, with their activity primarily attributed to a high content of phenolic acids. This was supported by results obtained for chlorogenic acid, whose IC_{50} values for four antioxidant assays ranged from 8.14 $\mu\text{g/mL}$ to 29.06 $\mu\text{g/mL}$. *A. vulgaris*, which according to HPLC-DAD analysis contained the highest amount of phenolic acids, exhibited the strongest free radical scavenging and ferric ion reducing capacity. The enzyme inhibitory activity of the ethanolic extracts of *Artemisia* species, chlorogenic acid, and reference inhibitors was also evaluated using appropriate colorimetric assays. The hypoglycemic potential of 70% ethanolic extracts from selected *Artemisia* species was evaluated through inhibition of α -amylase and α -glucosidase, key therapeutic targets in the treatment of type 2 diabetes. The results showed that the ethanolic extracts, chlorogenic acid, rutin, and isoquercitrin were weak inhibitors of both enzymes. At the tested concentration of 1600 $\mu\text{g/mL}$, *A. abrotanum*, *A. absinthium*, *A. annua*, and *A. maritima* exhibited a relatively higher inhibitory effect on total α -glucosidase activity (26.13–36.23 %). In contrast, *A. vulgaris* demonstrated stronger inhibition of α -amylase (21.25 %) than α -glucosidase (18.54 %) at the same concentration. All investigated species demonstrated the ability to inhibit total

acetylcholinesterase activity. *A. abrotanum*, *A. annua*, and *A. vulgaris* achieved 50% enzyme inhibition at the highest tested concentrations, with IC₅₀ values of 1517.04 µg/mL, 1396.78 µg/mL, and 1638.01 µg/mL, respectively. *A. absinthium* and *A. maritima* did not achieve 50% inhibition of total enzyme activity within the tested concentration range, however, they exhibited moderate acetylcholinesterase inhibitory activity. At the highest tested concentration of 1600 µg/mL, they inhibited total enzyme activity by 44.06% and 39.43%, respectively.

Conclusions: The research presented in this doctoral thesis provides new insights into the phytochemical composition and biological effects of selected *Artemisia* species growing wild and cultivated in Bosnia and Herzegovina and Croatia. The results have shown that *Artemisia* species are a rich source of biologically active compounds, including terpenes and polyphenols, exhibiting antioxidant, hypoglycaemic, neuroprotective, and antiproliferative effects. These findings indicate a significant biomedical potential of the investigated species in the prevention and treatment of non-communicable, chronic, age-related diseases. Furthermore, the studied *Artemisia* species constitute a valuable source of lead compounds for the development of novel therapeutic agents.

Keywords: *Artemisia*, green extraction, terpenes, polyphenols, antioxidative effect, α-glucosidase, α-amylase, acetylcholinesterase, HepG2

Sadržaj

1. UVOD	2
1.1. BOTANIČKA OBILJEŽJA I TRADICIONALNA PRIMJENA ODABRANIH VRSTA RODA <i>Artemisia</i> L.	3
1.1.1. <i>Artemisia abrotanum</i> L.	4
1.1.2. <i>Artemisia absinthium</i> L.	5
1.1.3. <i>Artemisia annua</i> L.	6
1.1.4. <i>Artemisia maritima</i> L.	7
1.1.5. <i>Artemisia vulgaris</i> L.	9
1.2. PREGLED DOSADAŠNJIH FITOKEMIJSKIH ISTRAŽIVANJA ODABRANIH VRSTA RODA <i>Artemisia</i> L.	11
1.2.1. Eterična ulja	11
1.2.2. Seskviterpenski laktoni	19
1.2.3. Flavonoidi i fenolne kiseline	23
1.3. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA BIOLOŠKIH UČINAKA ODABRANIH VRSTA RODA <i>Artemisia</i> L.	32
1.3.1. Antioksidacijski učinak	32
1.3.2. Hipoglikemijski učinak	33
1.3.3. Neuroprotektivni učinak	35
1.3.4. Citotoksični učinak	36
2. OBRAZLOŽENJE TEME	35
3. EKSPERIMENTALNI DIO	40
3.1. BILJNI MATERIJAL	41
3.2. FITOKEMIJSKA ISPITIVANJA	42
3.2.1. Materijali	42
3.2.2. Izolacija i identifikacija isparljivih terpena	45
3.2.2.1. Izolacija eteričnog ulja postupcima hidroddestilacije i parne destilacije	45
3.2.2.2. Superkrična ekstrakcija isparljivih terpena ugljikovim dioksidom (sc-CO ₂)	45
3.2.2.3. Istraživanje sastava eteričnih ulja i sc-CO ₂ ekstrakata metodom plinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa (GC-MS)	46
3.2.3. Dokazivanje prisutnosti i spektrofotometrijsko određivanje polifenola	47
3.2.3.1. Dokazivanje prisutnosti favonoida i fenonih kiselina tankoslojnom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPTLC)	47
3.2.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih kiselina	48

3.2.3.3. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida	48
3.2.3.4. Spektrofotometrijsko određivanje trjeslovina	49
3.2.4. Ekstrakcija fenolnih kiselina niskotemperaturnim eutektičkim otapalima	50
3.2.4.1. Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala (DES-ova).....	50
3.2.4.2. Priprema ekstrakata u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima	51
3.2.5. Istraživanje polifenolnih sastavnica metodama tekućinske kromatografije (HPLC-DAD, LC-PDA-ESI-MS/MS)	52
3.2.5.1. Priprema uzoraka i standarda	52
3.2.5.2. Određivanje fenolnih kiselina i flavonoida metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti obrnutih faza (HPLC-DAD)	52
3.2.5.3. Analiza fenolnih kiselina i flavonoida u vezanom sustavu tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (LC-PDA-ESI-MS/MS)	53
3.3. ODREĐIVANJE BIOLOŠKIH UČINAKA	55
3.3.1. Materijali	55
3.3.2. Priprema uzoraka i standarda	57
3.3.3. Ispitivanje antioksidacijskog djelovanja	57
3.3.3.1. Određivanje sposobnosti hvatanja slobodnog DPPH radikala.....	57
3.3.3.2. Određivanje sposobnosti hvatanja radikala dušikovog(II) oksida	58
3.3.3.3. Određivanje sposobnosti redukcije iona željeza(III).....	58
3.3.3.4. Određivanje sposobnosti keliranja iona željeza(II).....	59
3.3.4. Ispitivanje djelovanja na aktivnost odabranih enzima.....	60
3.3.4.1. Određivanje sposobnosti inhibicije α -amilaze	60
3.3.4.2. Određivanje sposobnosti inhibicije α -glukozidaze	60
3.3.4.3. Određivanje sposobnosti inhibicije enzima acetilkolinesteraze.....	61
3.3.5. Ispitivanje antiproliferativnog djelovanja na stanice humanog hepatocelularnog karcinoma (HepG2).....	62
3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	63
4. REZULTATI I RASPRAVA	64
4.1. FITOKEMIJSKI SASTAV ODABRANIH VRSTA RODA <i>Artemisia</i> L.....	65
4.1.1. Sadržaj i kromatografski profil eteričnih ulja.....	65
4.1.1.1. Eterična ulja izolirana hidrodestilacijom.....	65
4.1.1.2. Optimizacija ekstrakcije isparljivih terpena superkričnim ugljikovim dioksidom (sc-CO ₂) iz cvatućih vršnih dijelova vrste <i>A. annua</i> L.....	80
4.1.1.3. Usporedni prinosi sc-CO ₂ ekstrakata pri optimiranim uvjetima superkrične ekstrakcije.....	90
4.1.2. Karakterizacija bioaktivnih sastavnica tankoslojnom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPTLC)	91

4.1.2.1. Fenolne kiseline.....	91
4.1.2.2. Flavonoidi.....	92
4.1.3. Ukupni udjeli polifenolnih sastavnica određen primjenom UV-Vis spektrofotometrije	96
4.1.4. Identifikacija fenolnih kiselina i flavonoida LC-PDA-ESI-MS/MS metodom....	97
4.1.5. Udjeli fenolnih kiselina određeni HPLC-DAD metodom	117
4.2. BIOLOŠKI UČINCI ODABRANIH VRSTA RODA <i>Artemisia L.</i>	125
4.2.1. Antioksidacijski učinak	125
4.2.1.1. Sposobnost hvatanja DPPH radikala.....	125
4.2.1.2. Sposobnost hvatanja NO radikala	127
4.2.1.3. Sposobnost redukcije iona željeza(III)	129
4.2.1.4. Sposobnost keliranja iona željeza(II)	131
4.2.2. Učinak na aktivnost odabranih enzima.....	135
4.2.2.1. Hipoglikemijski učinak	135
4.2.2.2. Neuroprotektivni učinak.....	143
5. ZAKLJUČCI	146
6. LITERATURA	152
7. PRILOZI.....	172
8. ŽIVOTOPIS.....	203
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	205

1 UVOD



Zbog rastuće potražnje farmaceutske, kozmetičke i prehrambene industrije za prirodnim tvarima te usmjerenosti prema zelenim tehnologijama za stvaranje zdravih i ekološki prihvatljivih proizvoda, sve veću važnost dobiva održiva zelena ekstrakcija bioaktivnih biljnih sastavnica. Zelena ekstrakcija predstavlja promjenu paradigme u području ekstrakcije bioaktivnih prirodnih tvari, s naglaskom na održivost i ekološku osviještenost (1).

Među pelinima mnogo je ljekovitih biljnih vrsta koje se koriste kako u tradicionalnim sustavima liječenja tako i u suvremenoj fitoterapiji, a danas služe i kao izvori lijekova. U Europskoj farmakopeji monografiju ima samo droga *Absinthii herba* (zelen gorkog pelina) koja se dobiva od vrste *Artemisia absinthium* L. (2). Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) kategorizira zelen gorkog pelina kao tradicionalni biljni lijek za privremeni gubitak apetita i blage dispeptične, odnosno gastrointestinalne poremećaje (3). Vrsta *Artemisia annua* L. (jednogodišnji pelin), biljka poznata kao Qinghao u Kini, stoljećima se primjenjuje za liječenje širokog spektra bolesti i stanja u tradicionalnoj kineskoj medicini (engl. *traditional Chinese medicine*, TCM), uključujući groznicu, akutne konvulzije, malariju, dijabetes, dijareju, hemoroide, tuberkulozu, zubobolju i rane (4). Godine 1992. službeno je uvrštena u kinesku farmakopeju kao Qinghao (青蒿) (5). Dosadašnja istraživanja pokazala su da jednogodišnji pelin obiluje sekundarnim metabolitima iz skupine terpena i polifenola (4). Najznačajniji bioaktivni spoj je seskviterpenski lakton artemizinin koji je otkriven je u Kini 70-ih godina prošlog stoljeća te je imao veliki utjecaj na razvoj antimalarika. Za to otkriće kineska znanstvenica Youyou Tu dobila je Nobelovu nagradu za fiziologiju ili medicinu 2015. godine. To je ujedno i prva Nobelova nagrada dodijeljena za područje farmakognozije. Izolacija artemizina te široka primjena kako u tradicionalnoj, tako i u konvencionalnoj medicini, potaknula je znanstvenike na proučavanje fitokemijskih i farmakoloških svojstava drugih vrsta roda *Artemisia*. Znanstvenim istraživanjima utvrđeni su njihovi antioksidacijski, antimikrobni, protuupalni, antidijabetički, hipolipidemijski, neuroprotektivni, hepatoprotektivni, nefroprotektivni te antitumorski učinci (6).

Dosadašnje znanstvene spoznaje ukazuju da pelini posjeduju veliki potencijal primjene u prevenciji i liječenju različitih bolesti te kao izvori ključnih spojeva za istraživanje i razvoj novih lijekova. Stoga su u okviru ovog doktorskog rada istražene odabrane vrste roda *Artemisia* s područja Bosne i Hercegovine te Republike Hrvatske.

1.1. BOTANIČKA OBILJEŽJA I TRADICIONALNA PRIMJENA ODABRANIH VRSTA RODA *Artemisia* L.

Rod *Artemisia* L. (pelin) jedan je od najvećih i najrasprostranjenijih rodova porodice cjevastocvjetnih glavočika (Asteraceae). Generički naziv „*Artemisia*“ potječe od „*Artemis*“, što znači Dijana, grčka božica prirode. To je heterogeni rod s više od 500 različitih vrsta koje najvećim dijelom rastu u umjerenim područjima Sjeverne Amerike, Europe i Azije (6, 7). Biljne vrste roda *Artemisia* su zeljaste biljke ili niski, često aromatični grmovi s naizmjeničnim listovima. Male cvatne glavice su skupljene u grozdaste, metličaste ili glavičaste cvatove, rijetko pojedinačne. Cvatne glavice su građene od cjevastih cvjetova, a obavijene su ovojem u nekoliko nizova. Plodovi su obrnuto jajaste roške, gotovo valjkaste ili spljoštene, glatke, fino uzdužno prugaste ili s dva rebra. Papusa nema ili je ponekad reduciran na mali, suhi (opnasti) prsten. Eterično ulje vrsta roda *Artemisia* smješteno je u žljezdanim dlakama tipičnim za porodicu glavočika (Asteraceae), koje se sastoje od osam sekretornih stanica raspoređenih u dva reda (8, 9).

Primjena vrsta roda *Artemisia* u svjetskoj tradicionalnoj medicini opsežno je dokumentirana, što ukazuje na njihov veliki etnofarmakološki značaj. Prema nacionalnom istraživanju kineskih ljekovitih biljaka, više od šezdeset vrsta *Artemisia* koristi se u različitim područjima medicine za liječenje određenih bolesti i ublažavanje tegoba kao što su upalne bolesti, poremećaji jetre i želuca te ginekološki problemi (8). U ruskoj narodnoj medicini, ekstrakti listova i korijena vrsta roda *Artemisia* primjenjivali su se u liječenju bolesti jetre, želuca i slezene. Mješavina svježeg biljnog soka i razrijeđenog etanola koristila se kod bubrežnih kamenaca, nesanice te kao protuupalno sredstvo. U Kazahstanu se tinktura pripravljena od nadzemnih dijelova vrsta roda *Artemisia* koristila u liječenju želučanog ulkusa, slijepog crijeva, hemoroida i epilepsije (10).

Prema podacima Flora Croatica database na području Republike Hrvatske i Bosne i Hercegovine samoniklo raste šesnaest vrsta pelina (11). Osim vrsta *A. absinthium* L. (gorki pelin) i *A. annua* L. (jednogodišnji pelin), kao značajniji predstavnici roda *Artemisia* ističu se *A. abrotanum* L. (divlji pelin), *A. vulgaris* L. (obični pelin) te manje poznate i slabije istražene vrste poput *A. alba Turra* (sivkasti pelin), *A. caerulescens* L. (modrikasti pelin) i *A. maritima* L. (primorski pelin). U skupinu invazivnih biljaka ubrajaju se jednogodišnji i Verlotov pelin (*A. verlotiorum* Lamotte) (12).

1.1.1. *Artemisia abrotanum* L.

Sinonimi: *Artemisia elatior* Klokov, *Artemisia herbacea* Willd., *Artemisia paniculata* Lam., *Artemisia procera* Willd., *Artemisia proceriformis* Krasch.

Tradicionalni hrvatski nazivi: divlji pelin, božja metica, božje drevce, brodan, brodnjak, ciper, drvce blažene djevice Marije, gorkasti pelin (11).

Divlji pelin je vrlo aromatičan grm, koji doseže visinu od približno 1 m. Listovi su naizmjenični, dugi 3-6 cm, jednostruko do trostruko perasto razdijeljeni, s nitastim režnjevima koji su žljezdasto-točkasti. Gornja strana listova je glatka i gola, dok je donja prekrivena sivkastim dlačicama. Peteljke su kratke i bez uški. Cvatne glavice na kratkim stapkama su viseće i kuglaste, 3-4 mm u promjeru, a nalaze se u pazušcima jednostavnih brakteja koje su 1-3 puta veća od same glavice (Slika 1). Svaka glavica sadrži 25-30 cvjetova sa žućkastim vjenčićem. Biljka cvate od kolovoza do listopada.

Vrsta *A. abrotanum* rasprostranjena je u Europi, središnjoj Aziji i Maloj Aziji. Najbolje raste na toplim i sunčanim te humusom bogatim i ne previše vlažnim mjestima (9, 13).



Slika 1. *Artemisia abrotanum* L. (preuzeto s <https://ukrbin.com/>)

Divlji pelin je odavno poznata ljekovita biljka. Spominje se u djelima Dioskorida i Plinija Starijeg te zauzima važno mjesto u tradicionalnoj medicini europskih zemalja. Prema zapisima iz 10. stoljeća, koristila se za širok spektar tegoba, uključujući otežano disanje, bolove u jetri, slezeni, mokraćnom mjehuru i maternici, kao antihelminetik, za zacjeljivanje rana te poticanje probave i diureze. Nadalje, služila je kao antipiretik i protiv unutarnjih parazita, u liječenju bolesti vlasišta i kose te kao protuupalno sredstvo kod očnih bolesti i čireva različitog podrijetla. Od biljke se pripremao uljni pripravak s analgetskim i diuretičkim djelovanjem, vino koje potiče apetit i djeluje protiv žutice te rakija za respiratorne tegobe (13).

1.1.2. *Artemisia absinthium* L.

Sinonimi: *Artemisia baldaccii* Degen.

Tradicionalni hrvatski nazivi: gorki pelin, pravi pelin, absint, akšenac, đul, gorčika, gorski pelin, osjenac (11).

Gorki pelin je višegodišnja, zeljasta i aromatična biljka koja naraste 60-120 cm. Stabljika je razgranata i u donjem dijelu odrvenjela. Na njoj su nasuprotno smješteni jednostruko ili dvostruko perasto razdijeljeni listovi koji su s obje strane obrasli dlačicama. Listovi su sjedeći ili se nalaze na vrlo kratkim peteljicama. Prizemni listovi su trostruko perasto razdijeljeni i nalaze se na dužim peteljicama. Mnoštvo žućkastih cvatnih glavica promjera 3-5 mm visi na kratkim stapkama oblikujući metličaste cvatove pri vrhu stabljike i ogranka (Slika 2). Cvate od srpnja do rujna.

Prirodna staništa vrste *A. absinthium* nalaze se u umjerenim područjima Europe i Azije te sjeverne Afrike, a prenesena je u Kanadu i sjeverna područja SAD-a gdje se također dobro prilagodila. Uglavnom se nalazi na osunčanim i toplim krševitim mjestima, suhim livadama, vinogradima, uz putove i na zapuštenim površinama (14).



Slika 2. *Artemisia absinthium* L. (preuzeto s <https://www.infoflora.ch/en/flora/artemisia-absinthium.html>)

U turskoj tradicionalnoj medicini gorki pelin primjenjivao se u liječenju sepse i febrilnih stanja, zatim kod crijevnih parazita te bolova u želucu. Biljka je poznata i po svom diuretičkom djelovanju. U tradicionalnoj kineskoj medicini gorki pelin se koristio u liječenje groznice i povišene tjelesne temperature, ali i kod dizenterije, malignih bolesti i neurodegenerativnih poremećaja (15).

1.1.3. *Artemisia annua* L.

Tradicionalni hrvatski nazivi: jednogodišnji pelin, slatki pelin, mirisni pelin (11, 16).

Jednogodišnji pelin je zeljasta biljka visine oko 1 m (u uzgoju naraste i do 2 m). Stabljika je gola, izbrazdana i razgranata, s nasuprotnim listovima cjelovitog ruba ili s nekoliko zubaca. Donji listovi su trostruko perasto razdijeljeni, dugi 3-5 cm i široki 2-4 cm, dok su gornji manji, jednostruko do dvostruko perasto razdijeljeni i sjedeći. Cvjetovi su žuti, sitni i cjevasti te su skupljeni u guste okruglaste i povinute cvatne glavice promjera oko 2 mm. Raspoređene su u rahle metličaste ili grozdaste cvatove s ovojem od niza brakteja (Slika 3). Cvate od srpnja do rujna.

Vrsta *A. annua* potječe iz umjerenih dijelova Azije (Kina, Vijetnam), ali se proširila diljem svijeta u umjereni, suprotropska i neka tropska područja. Uglavnom raste na sunčanim, toplim i umjerenom vlažnim zemljištima. Smatra se invazivnom biljnom vrstom te raste uz potoke, pruge, nasipe i na zapuštenim mjestima (16-18).



Slika 3. *Artemisia annua* L. (fotografirao Petar Mihić, Ljubinje, Bosna i Hercegovina)

Jednogodišnji pelin potječe iz Kine gdje se vrlo cijeni kao ljekovita biljka. U tradicionalnoj kineskoj medicini koristi se u liječenju groznice (uključujući malariju) i povišene tjelesne temperature (15). U starim zapisima se spominje kao sredstvo za liječenje febrilnih iscrpljujućih stanja, žutice, tuberkuloze, boli, dizenterije i hemoroida, a primjena se preporučuje i kod opekлина od sunca, ušiju i svraba. U tradicionalnoj iranskoj medicini ova biljka se koristila kao spazmolitik, karminativ ili sedativ za djecu (10).

1.1.4. *Artemisia maritima* L.

Sinonimi: *Artemisia boschniakiana* (Besser) DC., *Artemisia maritima* prol. *pseudogallica* Rouy, *Artemisia maritima* sensu Boissier, *Artemisia maritima sensu* Galuško, *Artemisia maritima sensu* Rechinger, *Artemisia maritima sensu* Stojanov, N. & Stefanov, B., *Artemisia maritima sensu* Webb, *Artemisia maritima* ssp. *maritima*, *Artemisia maritima* ssp. *salina* (Willd.) Nyman, *Artemisia maritima* subsp. *monogyna* (Waldst. & Kit.) Hegi, *Artemisia maritima* subsp. *salina sensu* Josifović, *Artemisia maritima* subsp. *salina sensu* Micevski, *Artemisia maritima* var. *boschniakiana* Besser, *Artemisia maritima* var. *salina sensu* Hayek, *Artemisia monogyna* Waldst. & Kit., *Artemisia praticola* Klokov, *Artemisia pseudogallica* (Rouy) A. W. Hill, *Artemisia salina* Willd., *Artemisia salina* Willd. ssp. *maritima*, *Seriphidium maritimum* L., *Seriphidium monogynum* Waldst. & Kit., *Seriphidium santonicum* L.

Tradicionalni hrvatski nazivi: primorski pelin, ledinasti pelin, pelin polemorski, primošćak (11).

Primorski pelin je višegodišnji vrlo razgranjen i aromatičan grm. Stabljike su visoke 50-60 cm i uglavnom u donjem dijelu odrvenjele. Biljka je najčešće prekrivena sivkastim do bijelim vunastim dlačicama. Donji listovi su 2,5-4 cm dugi, dvostruko do trostruko perasto razdijeljeni, s peteljka, često s malim uškama. Venu tijekom ili ubrzo nakon cvatnje. Gornji listovi su sjedeći, linearni, nerazdijeljeni ili s nekoliko režnjeva u donjem dijelu. Cvatne glavice su brojne, duguljaste do široko jajaste, duge 2-4 mm i široke 2 mm, gotovo sjedeće do kratko stapkaste, viseće ili uspravne. U pazušcima gornjih listova nalaze se klasasti cvatovi koje čini po 3-10 cvatnih glavica (Slika 4). Cvate od lipnja do rujna.

Vrsta *A. maritima* je primarno rasprostranjena u Europi duž obale Atlanskog oceana, od Baltičkih zemalja i Rusije do Irske i Francuske. Unesena je na područje Himalaja gdje se nalazi na visokim nadmorskim visinama. Njezina staništa u Hrvatskoj nalaze se u primorskim područjima. Obično raste na obalama, u sušnim dijelovima slanih močvara, na šljunkovitim nasipima, morskim liticama, zidovima i neobrađenim područjima uz more, ali i uz boćate nasipe isušanih estuarijskih močvara i na obalama plimnih rijeka (9, 19).



Slika 4. *Artemisia maritima* L. (<https://www.freenatureimages.eu/plants>)

Primorski pelin ima dugu povijest primjene u tradicionalnoj europskoj i azijskoj medicini kao snažan antihelmintik protiv crijevnih parazita. Osim toga, spominje se kao ljekovita biljka za želučane i probavne smetnje, poticanje apetita, bolove u trbuhu i dijareju, ali i za kašalj i zacjeljivanje rana. Nadalje, ova se biljka koristila i za ublažavanje žutice, zubobolje, grčeva i različitih upalnih stanja poput upale očiju. Sok njezinih svježih cvjetova primjenjivao se lokalno kod ugriza zmija i uboda škorpiona (20). Listovi primorskog pelina primjenjivali su se u Pakistanu za liječenje kožnih bolesti te intermitentne groznice, a bila je općenito cijenjena kao protuupalno, antimalarijsko i antiseptičko sredstvo (21).

1.1.5. *Artemisia vulgaris* L.

Sinonimi: *Artemisia coerctata* Forselles, *Artemisia vulgaris* ssp. *coerctata* (Forselles) Lemke et Rothm., *Artemisia vulgaris* ssp. *coerctata* Ameljez., *Artemisia vulgaris* ssp. *vulgaris*, *Artemisia vulgaris* subsp. *coerctata* null, *Artemisia vulgaris* var. *coerctata* (Forselles) Hegi.

Tradicionalni hrvatski nazivi: obični pelin, crni pelin, crnobil, ćoba, ćopa, komonika, martinščica, metlikovina, osjenac divlji, pelin černi (11).

Obični pelin višegodišnja biljka visine 50-180 cm, s nekoliko uspravnih, dugih, razgranjenih i bridastih stabljika koje su obrasle dlačicama. Na stabljici su nasuprotno smješteni listovi koji su duboko jednostruko ili dvostruko perasto razdijeljeni, a režnjevi su suličasti ili duguljasti. Listovi su sjedeći, dugi 5-10 cm, s gornje strane tamnozeleni, a na naličju gusto obrasli bijelim pustenastim dlakama. Na vrhovima stabljike i ogranka nalaze se grozdasti cvatovi raspoređeni u metlice, s 20-ak crvenkastih ili žućkastih cvatnih glavica (Slika 5). Cvate od srpnja do rujna.

Prirodni areal vrste *A. vulgaris* su umjerena područja Europe, Azije, Sjeverne Afrike i Aljaske. Prenesena je na Sjevernoamerički kontinent gdje se raširila i često se smatra invazivnim korovom. Uspijeva u umjerenim, kontinentalnim klimama, često se nalazi u tlima siromašnim hranjivim tvarima. Raste uz obale rijeka, ceste, ograde, šumske rubove i neobrađena zemljišta (14, 22).



Slika 5. *Artemisia vulgaris* L. (preuzeto s <https://www.infoflora.ch/>)

Obični pelin općenito je poznat u narodnoj medicini u liječenju epilepsije, depresije, razdražljivosti, stresa i nesаницe. Na Filipinima se, primjerice, primjenjivala i u liječenju hipertenzije. Osim toga, u Aziji se široko koristi kao dodatak za aromatiziranje jela od riže i čaja, dok je u zapadnoj kulturi poznata začinska biljka (8, 15).

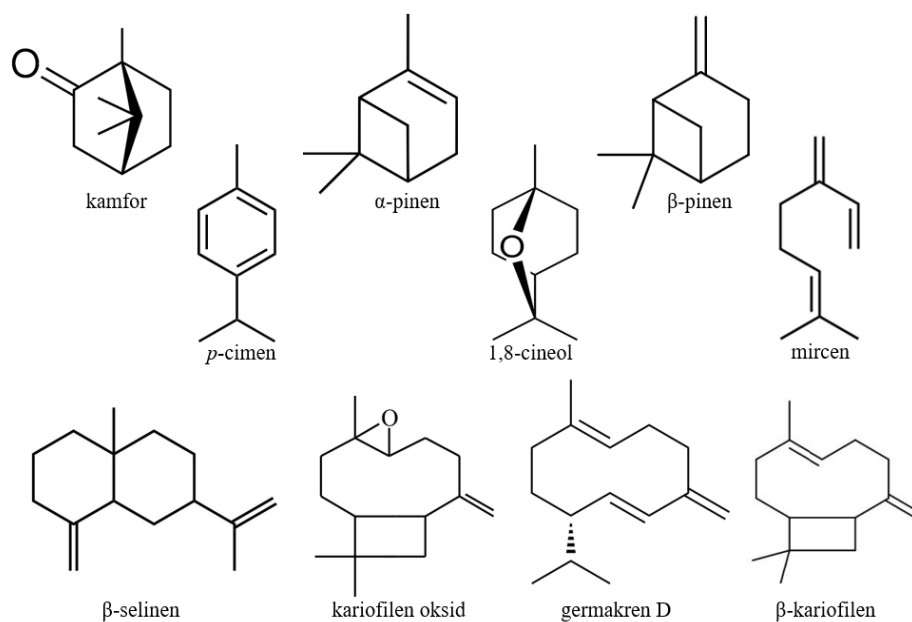
1.2. PREGLED DOSADAŠNJIH FITOKEMIJSKIH ISTRAŽIVANJA ODABRANIH VRSTA RODA *Artemisia* L.

1.2.1. Eterična ulja

Eterična ulja su vrlo kompleksni, hlapljivi i aromatični sekundarni biljni produkti. Dobivaju se destilacijom, tiještenjem ili ekstrakcijom iz različitih aromatičnih biljnih vrsta. Aromatične biljne vrste najzastupljenije su u porodicama: Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Lamiaceae, Laureaceae, Myrtaceae, Pinaceae, Piperaceae, Rutaceae te Zingiberaceae, gdje su eterična ulja pohranjena u morfološki definiranim spremnicima čija je anatomska građa svojstvena porodici ili rodu. Nastaju u svim organima biljaka te se kod nekih biljaka nalaze u cijeloj biljci, dok se u nekim biljnim vrstama nalaze samo u određenim biljnim organima. Svježe izolirana ulja su bistra do blijedožućkasta, a samo mali broj njih je obojen, lako su hlapljiva i lipofilna te se samim time dobro otapaju u nepolarnim organskim otapalima, a teško su topljiva u vodi. Karakterizira ih vrlo oštar i jak miris i okus. Eterična ulja bogata su velikim brojem sekundarnih metabolita koji pripadaju različitim skupinama organskih spojeva, kao što su ugljikovodici, fenoli, alkoholi, aldehidi, esteri, eteri, ketoni i laktoni, a među kojima su najzastupljeniji: monoterpeni (C_{10}) i seskviterpeni (C_{15}). Druga najzastupljenija skupina sekundarnih metabolita u eteričnim uljima su fenilpropanski derivati (23-25).

Metoda ekstrakcije jedan je od najvažnijih čimbenika u određivanju kvalitete eteričnih ulja, jer može utjecati na njihov kemijski profil, intrinzična svojstva i bioaktivnost. Uz do sada najčešće provedene metode destilacije, hidrodestilaciju i parnu destilaciju, ekstrakcija superkritičnim fluidom (engl. *supercritical fluid extraction*, SFE) pokazala se inovativnom metodom izolacije eteričnih ulja, koja omogućuje dobivanje čistih ekstrakata bez ostataka otapala, uz primjenu blagih uvjeta ekstrakcije koji smanjuju razgradnju termolabilnih spojeva. SFE omogućuje dobivanje vrlo čistih biljnih ekstrakata željenog sastava za medicinske, kozmetičke i prehrambene svrhe te je izrazito ekološki prihvatljiva, učinkovita i selektivna. Kao sredstvo za ekstrakciju koristi se homogeni fluid agregatnog stanja između plina i tekućine u uvjetima iznad kritičnog tlaka i temperature (26, 27).

Prema dosadašnjim znanstvenim istraživanjima utvrđeno je da geografski položaj i stanište u kojem biljka raste, vrijeme berbe, uvjeti sušenja i način ekstrakcije značajno utječu na sadržaj i sastav eteričnog ulja (4). Terpenske sastavnice prisutne u vrstama roda *Artemisia* obuhvaćaju širok raspon struktura, od mono- do triterpena (Tablica 1, Slika 6). Za većinu vrsta karakterističan je snažan miris koji potječe od monoterpena i seskviterpena. Značajna raznolikost u sastavu eteričnih ulja unutar roda *Artemisia* vidljiva je iz podataka objavljenih za najvažnije aromatične vrste. Sastav monoterpena varira od spojeva artemizijskog tipa (uključujući artemizija alkohol, artemizija keton, artemizija acetat, artemizija trien te yomogi alkohol/keton) do derivata sa santolinilnom i lavandulilnom osnovnom strukturom. Osim toga, učestala pojava brojnih iregularnih monoterpena smatra se njihovim karakterističnim obilježjem (8). Nadalje, recentna istraživanja pokazala su da eterična ulja vrsta roda *Artemisia* obiluju seskviterpenskima spojevima, među kojima se udjelom ističu germakren D, β -selinen, trans- β -kariofilen i kariofilen oksid, dok su 1,8-cineol, α/β -pinen, kamfor, *p*-cimen i mircen najzastupljeniji monoterpeni (28).



Slika 6. Primjeri često zastupljenih terpenkih sastavnica u eteričnim uljima vrsta roda *Artemisia*

Tablica 1. Pregled dosadašnjih istraživanja sastava eteričnih ulja odabranih vrsta roda *Artemisia* L.

Biljna vrsta	Porijeklo	Glavne sastavnice eteričnog ulja	Literatura
<i>A. abrotanum</i>	Austrija	dervat davanona (22,5 %), 4-metil-pent-2-enolid (15,7 %), <i>cis</i> -davanon (5,2 %), davana eter (3,2 %)	(29)
	Egipat	2-hidroksi-1,8-cineol (37,9-38,7 %), β -eudesmol (12,4-12,9 %), kamfor (11,8-12,1 %)	(30)
	Italija	1,8-cineol (34,7 %), bisabolol oksid (18,4 %), ascaridol (16 %), <i>p</i> -cimen (7,9 %)	(31)
	Krim	1,8-cineol (15,46-33,19 %), kamfor (20,33-44,63 %), kamfen (2,42-7,20 %), α -bisabolol (3,52-4,64 %)	(32)
	Kuba	<i>trans</i> -sabinil-acetat (33,4 %), α -terpineol (8,2 %)	(33)
	Litva	(+)-piperiton (20,38-38,48 %), γ -amorfen (0-17,85 %), isogermakren D (5,23-15,67 %), 1,4-cineol (4,12-13,14 %)	(34)
	Njemačka	1,8-cineol, α -tujen i α -pinen	(35)
	Srbija	silfiperfol-5-en-3-on A (21,84 %), 6-kamfenol (8,84%), cedrol (7,18 %)	(36)
	<i>A. absinthium</i>	Austrija	β -tujon (44 %), sabinil-acetat (23,7 %), α -tujon (13 %), mircen (6,4 %)
Etiopija		valencen (5,48%), bornil-acetat (5,15 %)	(37)
Francuska (4 uzorka)		[1] (Z)-6,7-epoksicimen (49,7 %), biciklo [2.2.1.]-hept-2-en-7-ol (18,9 %), <i>cis</i> -krisantenil-acetat (11,4 %)	(38)
		[2] (Z)-6,7-epoksicimen (25,6-47,3%), <i>cis</i> -krizantenil acetat (17,4-36,7 %), bicyclo[2.2.1.]-hept-2-en-7-ol (3,2-5,4 %)	
	[3] (Z)-6,7-epoksicimen (22,6-46,9 %), <i>cis</i> -krisantenil acetat (14,9-20,2 %), bicyclo[2.2.1.]-hept-2-en-7-ol (6,9-10,3 %)		
	[4] <i>cis</i> -krizantenil-acetat (33,6 %), (Z)-6,7-epoksicimen (24,2 %),		

Biljna vrsta	Porijeklo	Glavne sastavnice eteričnog ulja	Literatura
		bicyclo[2.2.1.]hept-2-en-7-ol (5,3 %)	
	Hrvatska (4 uzorka)	[1] (Z)-6,7-epoksicimen (25,7 %), β-tujon (20,9 %), sabinen (7,7 %) [2] (Z)-6,7-epoksicimen (30,8-38,2 %), β-tujon (24,5-27,8 %), (Z)-3-heksenil butirat (3,1-5 %) [3] (Z)-6,7-epoksicimen (24,1-29,6 %), β-tujon (14-26 %), (E)-6,7-epoksicimen (1,9-8,4 %) [4] β-tujon (27,8-48,6 %), sabinil-acetat (9,9-13,5 %), (Z)-6,7-epoksicimen (6,1-9 %)	(38)
	Italija (4 uzorka)	[1] miroksid (44,41 %), <i>trans</i> -tujon (2,5 %), 3-p-menten-7-al (1,58 %) [2] miroksid (41,28 %), <i>cis</i> -krisantenol (1,96 %), <i>trans</i> -tujon (1,89 %) [3] kamfor (19,07 %), β-mircen (3,07 %), linalol (3,04 %) [4] β-felandren (21,22 %), β-mircen (17,78 %), α-felandren (7,05 %), miroksid (7,24 %)	(39)
	Indija	borneol (16,7-18,7%), metil-hinokiat (11,9-12,9 %), izobornil-acetat (4-4,7 %), β-gurjunen (3,8-4,4 %)	(40)
	Kina	1,8-cineol (25,59 %), linalol (11,99 %), β-mircen (10,05 %), kamfor (5,22 %)	(41)
	Pakistan	5-(hidroksimetil)-2-furanokarboksialdehid (14,24%), 9,12-octadecanoic acid (Z,Z), metil ester (9,01%), estra-1,3,5(10)-trien-17β-ol (8,75%)	(42)
	Saudijska Arabija	<i>cis</i> -davanon (52,52 %), α-gurjenen (7,15 %), kamazulen (3,38 %), kamfen (3,27 %)	(43)
	Saudijska Arabija	[1] kamfor (26,4 %), <i>cis</i> -davanon (18 %), (e)-etil cinamat (5,4 %),	(44)

Biljna vrsta	Porijeklo	Glavne sastavnice eteričnog ulja	Literatura
	(2 uzorka)	(e)-nerolidol (4,6 %) [2] <i>cis</i> -davanon (60,2 %), kamazulen (10,8 %), kamfor (5,3 %), terpinen-4-ol (5,5 %)	
	Srbija (4 uzorka)	[1] β -tujon (19,8 %), <i>cis</i> - β -epoksiocimen (10,7 %), <i>trans</i> -sabinil acetat (8,8 %) [2] β -tujon (20,2 %), 1,8-cineol (16,3 %), <i>trans</i> -sabinil acetat (15,5 %), geranil 3-metilbutanoat (12,9 %) [3] β -tujon (63,4 %), sabinen (10,8 %), <i>p</i> -cimen (6,7 %) [4] α -fenhen (23,3 %), linalil-3-metilbutanoat (21,1 %), linalil-butanoat (14,4 %), linalil-propionat (8,2 %)	(45)
	Tunis	kamazulen (39,21 %), kamfor (21,12 %), bornil-acetat (13,84 %), krizantenilacetat (9,08 %)	(46)
<i>A. annua</i>	Bosna i Hercegovina (5 uzoraka)	[1] artemizija keton (46,4 %), β -mircen (17,1 %), kamfor (13,2 %) [2] artemizija keton (30,2 %), kamfor (24 %), 1,8-cineol (5,3 %) [3] artemizija keton (28,3 %), kamfor (16,9 %), 1,8-cineol (5,4 %) [4] kamfen (25,6 %), artemizija keton (24,5 %), 1,8-cineol (18,3 %) [5] kamfor (20 %), artemizija keton (16,5 %), kariofilen oksid (8,2 %)	(47)
	Bosna i Hercegovina	artemizija keton (30,7 %), kamfor (15,8 %), artemizija alkohol (6,5 %), 1,8-cineol (4,8 %)	(48)
	Brazil	kamfor (22,68 %), 1,8-cineol (20,42 %), <i>p</i> -cimen (12,21 %)	(49)
	Francuska	kamfor (44 %), germakren D (16 %), <i>trans</i> -pinokarveol (11 %), β -selinen (9 %)	(50)
	Indija	artemizija keton (58,4 %), kamfor (15,75 %), 1,8-cineol (10,19 %)	(51)
	Iran	1,8-cineol (18,68 %), kamfor (11,4 %), α -pinen (9,3 %), pinokarvon (7,5 %),	(52)

Biljna vrsta	Porijeklo	Glavne sastavnice eteričnog ulja	Literatura
		δ-3-karen (6,3 %)	
	Italija	artemizija keton (22,1 %), 1,8-cineol (18,8 %), kamfor (16,9 %)	(53)
	Italija	artemizija keton (24 %), kamfor (17,7 %), 1,8-cineol (16,1 %)	(54)
	Italija	artemizija keton (24,3 %), kamfor (18,1 %), 1,8-cineol (16 %), artemizija alkohol (7 %)	(55)
	Italija	kamfor (22,6 %), artemizija keton (17,3 %), 1,8-cineol (15,8 %)	(56)
	Italija	artemizija keton (22 %), 1,8-cineol (19 %), kamfor (17 %)	(57)
	Italija	[1] kamfor (25,2 %), 1,8-cineol (20,1 %), artemizija keton (12,5 %)	(58)
	(2 uzorka)	[2] α-pinen (22,8 %), 1,8-cineol (22,1 %), kamfen (12,9 %)	
	Kina	artemizija keton (70,6%), α-kariofilen (5,1 %), germakren D (3,8 %), β-selinen (3,5 %)	(59)
	Kina	kamfor, borneol, 1,8-cineol i piperiton	(60)
	Kina	borneol (15,90 %), <i>trans</i> -β-farnesen (12,92 %), germakren D (10,90 %), β- <i>cis</i> -kariofilen (5,98 %)	(61)
	Koreja	75 uzoraka: artemizija keton kemotip (20,51-83,82 %)	(62)
	(103 uzorka)	1 uzorak: kamfor kemotip (25,5 %)	
		5 uzoraka: β-kubeben kemotip (13,90-22,52 %)	
		4 uzorka: 1,8-cineol kemotip (15,07-43,01 %)	
		1 uzorak: α-pinen kemotip (21,16 %)	
	Mađarska	17 uzoraka: β-selinen kemotip (20,05-46,29 %)	(63)
		β-selinen (12,27 %), kariofilen oksid (8,64 %), <i>trans</i> -pinokarveol (7,55 %), kamfor (7,06 %)	

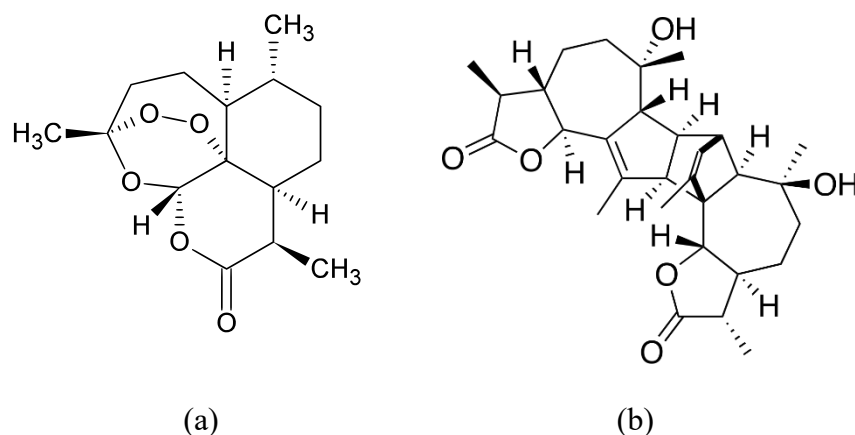
Biljna vrsta	Porijeklo	Glavne sastavnice eteričnog ulja	Literatura
	Maroko	artemizija keton (43,19 %), kariofilen (15,75 %), β -selinen (10,32 %), germakren D (9,56 %)	(64)
	Portugal (Madeira) (4 uzorka)	[1] kamfor (42,8 %), 1,8-cineol (11,6 %), β -kariofilen (7,77 %)	(65)
		[2] kamfor (45,5 %), β -kariofilen (20,21 %), borneol (8,96 %), germakren D (8,41 %)	
		[3] kamfor (42 %), 1,8-cineol (9,87 %), germakren D (8,61 %), α -humulen (6,70 %)	
		[4] kamfor (44,33 %), β -kariofilen (8,65%), 1,8-cineol (7,92 %), germakren D (7,77 %)	
	Rumunjska	kamfor (17,75 %), α -pinen (9,66 %), germakren d (7,55 %), 1,8-cineol (7,24 %), <i>trans</i> - β -kariofilen (7,02 %), artemizija keton (6,26 %)	(66)
<i>A. maritima</i>	Indija	1,8-cineol (41,14 %), bornil-acetat (18,10 %), mircen (9,54 %)	(67)
	Indija	kamfor (44,3-44,4 %), 1,8-cineol (27-27,3 %), kamfen (5,9 %)	(68)
	Indija (3 uzorka)	[1] 1,8-cineol (23,8 %), krisantenon (17,54 %)	(69)
		[2] krisantenon (38,1 %), 1,8-cineol (37,3 %)	
		[3] 1,8-cineol (44,22 %), borneol (10,94 %), kamfor (9,16 %)	
	Pakistan	1,8-cineol (41,14 %), α -(-)-kamfor (20,32 %)	(70)
<i>A. vulgaris</i>	Austrija	terpinen-4-ol (13,5-18,2 %), 1,8-cineol (0-18 %), borneol (5,4-13,2 %), spatulenol (7,1-12,1 %), l-terpineol (6,6-10 %)	(29)
	Brazil	kariofilen (37,45 %), germakren D (16,17 %), humalen (13,66 %), borneol (6,80 %)	(71)
	Francuska	[1] kariofilen oksid (8,7 %), β -kariofilen (8,2 %), β -tujon (7,1 %)	(72)

Biljna vrsta	Porijeklo	Glavne sastavnice eteričnog ulja	Literatura
	(4 uzorka)	[2] borneol (10,3 %), β -tujon (9,0 %), kamfor (8,3 %) [3] borneol (8,9 %), β -kariofilen (5,7 %), <i>cis</i> -krizantenol (5,6 %) [4] borneol (27%), 1,8-cineol (15,1%), artemizija keton (14,9%)	
	Hrvatska (4 uzorka)	[1] <i>trans</i> -krizantenil-acetat (16,3%), 2,2,4-trimetilcikloheksen-karboksilaldehid (10,6 %), 1,8-cineol (7,5 %) [2] <i>trans</i> -krizantenil-acetat (24,6 %), 2,2,4-trimetilcikloheksen-karboksilaldehid (16,6 %), β -tujon (13,7 %) [3] β -tujon (20,8 %), α -pinen (15,1 %), 1,8-cineol (11,7 %) [4]] <i>trans</i> -krizantenil-acetat (18,5 %), 1,8-cineol (15,2 %), α -felandren (12,9 %)	(72)
	Indija	kamfor (26,99 %), β -kariofilen oksid (15,87 %), borneol (10,79 %), 1,8-cineol (5,99 %)	(73)
	Indija	kamfor (28,94 %), 4-tert-butilanilin (19,79 %), 1,8-cineol (6,39 %), fenhol (6,03 %)	(74)
	Indija (2 uzorka)	[1] 1,8-cineol (29,91%), sabinen (8,44 %), endo-borneol (8,24 %) [2] 1,8-cineol (47,30 %), sabinen (8,86 %), endo-borneol (4,76 %)	(75)
	Indija	kamfor (16,8 %), α -tujon (11,3 %), germakren D (7,2 %), kamfen (6,5 %), 1,8-cineol (5,8 %)	(76)
	Kina	1,8-cineol (28,07 %), <i>cis</i> - β -terpineol (16,44 %), (-)- α -tujen (8,89 %)	(77)
	Litva	artemizija keton (0,2-41 %), sabinen (0,1-40 %), 1,8-cineol (0,5-32,7 %), davanon (11,4-27,9 %), kamfor (0,6-21,7 %)	(78)
	Nepal	β -tujon (19,99 %), kamfor (11,89 %), sabinen (11,29 %), germakren D (8,42 %)	(79)
	Srbija	1,8-cineol (0,3-28,9 %), sabinen (0-13,7 %), β -tujon (0-13,5 %), neril-2-metilbutanoat (0-13,2 %)	(45)

1.2.2. Seskviterpenski laktoni

Seskviterpenski laktoni sekundarni su metaboliti koji nastaju iz mevalonske kiseline (MVA), kondenzacijom triju izoprenoidnih (C_5) jedinica u složenu strukturu od petnaest ugljikovih atoma (seskviterpenoidi). Ključna strukturalna značajka ovih spojeva je prisutnost laktonskog prstena, najčešće γ -laktona, koji je često konjugiran s dvostrukom vezom. Osnovna strukturalna jedinica seskviterpenskih laktona nastaje ciklizacijom ciklodekadienskog tipa kationa preko germakrenolida, kada posredovano djelovanjem enzima, iz germakrenolida nastaju drugi tipovi seskviterpenskih laktona: pseudogvajanolid, gvajanolid, eudesmanolid, eremofilanolid i elemanolid, koji imaju vrlo različite kemijske strukture. Seskviterpenski laktoni imaju važnu ulogu u komunikaciji biljaka i u interakcijama s kukcima, mikroorganizmima i životinjama, djelujući kao atraktanti, repelenti i antifedanti (sredstva protiv hranjenja). Jedna biljna vrsta obično proizvodi jednu vrstu seskviterpenskih laktona, koji se uglavnom nalaze u listovima i cvjetovima. Najčešće se nalaze u biljnim vrstama porodice *Asteraceae* te pripadajućim drogama daju gorak okus, zbog toga ih ubrajamo u „gorke tvari“ (80, 81).

Najčešće zastupljeni i prepoznati kao karakteristični sekundarni metaboliti za vrste roda *Artemisia* su seskviterpenski laktoni. Najpoznatiji spoj iz ove skupine je endoperoksidni seskviterpenski lakton izoliran iz vrste *A. annua*, artemizinin, suvremeni antimalarik koji se koristi u kombiniranim terapijama te pokazuje i antikancerogeno djelovanje. Osim toga, arteannuin B, artemizin i artemizininska kiselina prisutni su u vrsti *A. annua*, dok je u vrste *A. vulgaris* zabilježena prisutnost vulgarina, jomogina i psilostahina C. Pored toga, glavni sekundarni metabolit vrste *A. absinthium* je gvajanolidni dimer absintin i njegovi derivati (artabsin, anabsin, absintinolid i anabsintin) (Slika 7) (81, 82).



Slika 7. Najčešći zastupljeni seskviterpenski laktoni u nadzemnim dijelovima vrsta roda *Artemisia*: (a) artemizinin, (b) absinthin

Tablica 2. Pregled dosadašnjih istraživanja seskviterpenskih laktona i drugih srodnih spojeva u odabranih vrsta roda *Artemisia* L.

Biljna vrsta	Ekstrakt	Glavne seskviterpenske sastavnice	Literatura
<i>A. abrotanum</i>	70 %-tni etanolni	Seskviterpenski laktoni: β -santonin (8,08 %), artemizinin (0,07 %)	(83)
<i>A. absinthium</i>	diklormetan	Seskviterpenski laktoni: hidroksipelenolid, partenolid	(84)
	diklormetan-metanol diklormetan-aceton	Seskviterpenski laktoni: anabsin, absintin, anabsintin, 3'-hidroksianabsintin, ketopelenolid B	(85)
	80 %-tni metanolni	Seskviterpenski laktoni: artabsinolid, artabsinolid D, anabsin, diosbulbin E	(86)
	[1] metanolni [2] kloroformni	Seskviterpenski laktoni: artabsinolid A, absintin, artenolid, izoabsintin	(87)
<i>A. annua</i>	50-100 %-tni etanolni	Seskviterpenski laktoni: arteannuin B, artemizinin Ostali seskviterpeni: dihidroartemizinska kiselina, artemizinska kiselina	(88)
	dietil-eter	Seskviterpenski laktoni: artemizinin, arteannuin B, 11-hidroksi-arteannuin B, deoksiartemizinin Ostali seskviterpeni: dihidroksiartemizinska kiselina	(89)
	[1] Toluenski [2] n-heksanski [3] kloroformni	Seskviterpenski laktoni: artemizinin	(90)

Biljna vrsta	Ekstrakt	Glavne seskviterpenske sestavnice	Literatura
	MoMundo GmbH (Bad Emstal, Germany)	Seskviterpanski laktoni: arteannuin B Ostali seskviterpeni: arteannuinska kiselina	(91)
	[1] metanolni [2] kloroformni	Seskviterpanski laktoni: artemizinin, deoksiartemizinin, pseudosanzonin, artemizin C, arteannuin B, dihidroarteannuin B, dihidrosantamarin	(87)
	vodeni	Seskviterpanski laktoni: artemizinin (47,5 mg/L), arteannuin B (1,3 mg/L) Ostali seskviterpeni: dihidroartemizinska kiselina (70 mg/L)	(92)
<i>A. vulgaris</i>	[1] metanolni [2] kloroformni	Seskviterpanski laktoni: santonin	(87)
	95 %-tni etanolni	Seskviterpanski laktoni: artemvulakton H, I, J, K, L, P, Q, R, S	(93)
	metanolni	Seskviterpanski laktoni: vulgarolid A, B	(94)

1.2.3. Flavonoidi i fenolne kiseline

Polifenoli predstavljaju raznoliku skupinu sekundarnih biljnih metabolita široko rasprostranjenih u prirodi te značajno prisutnih u ljudskoj prehrani. Strukturno su izgrađeni od fenolnih jedinica te se uglavnom nalaze esterificirani s malim organskim kiselinama, konjugirani sa šećernim jedinicama ili u polimernom obliku. U prirodi su rijetko prisutni u slobodnom obliku. U biljnim vrstama identificirano je više od 8000 polifenolnih spojeva koji se mogu klasificirati u različite skupine, ovisno o broju fenolnih prstenova koje sadrže te prema strukturnim elementima koji te prstenove međusobno povezuju. Dijelimo ih na četiri glavne skupine: flavonoide, fenolne kiseline, stilbene i lignane (95, 96).

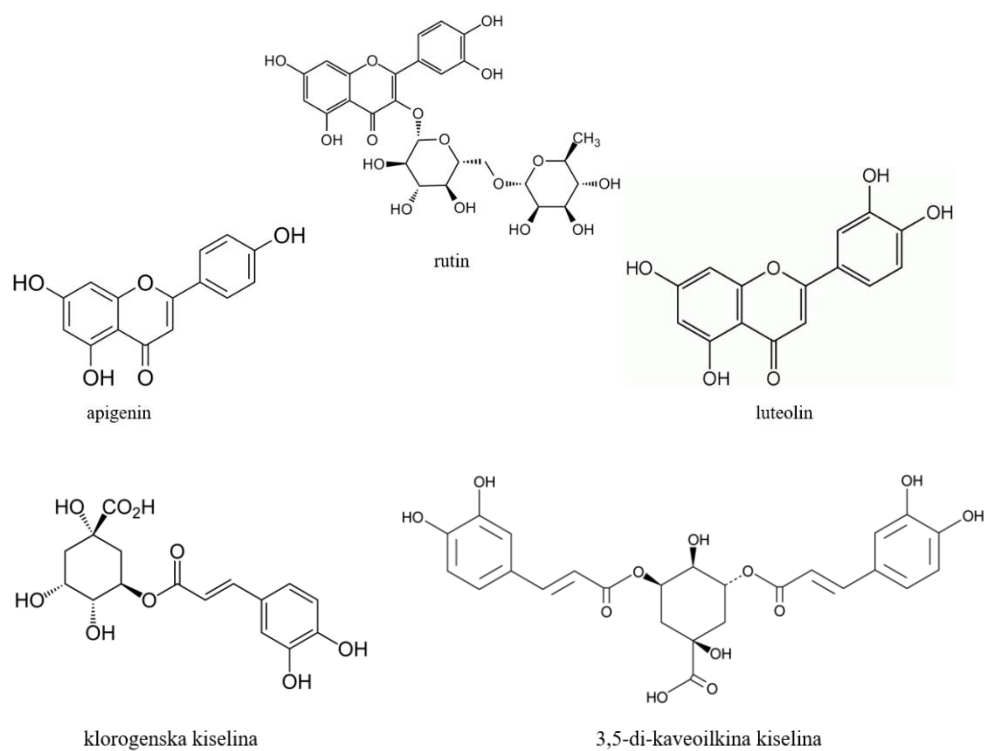
S više od 6000 identificiranih struktura **flavonoidi** predstavljaju najveću skupinu biljnih polifenola. Žuta boja (lat. *flavus* = žut) prvih izoliranih flavonoida dala je naziv cijeloj skupini, iako danas u nju ubrajamo i crvenomodre antocijane. Svim flavonoidima zajednička je osnovna struktura, koju čine dva benzenska prstena (*A* i *B*) koja su povezana propanskim lancem koji kod većine flavonoida formira zatvoreni piranski prsten zajedno s atomom kisika (*C*). Mješovitog su biogenog podrijetla te nastaju kombinacijom acilpolimalonatnog puta i puta šikiminske kiseline. Benzenski prsten *B* nastaje preko šikiminske kiseline, dok je prsten *A* acetatnog porijekla, formiran zatvaranjem poliketilnog lanca. Međusobno se flavonoidi razlikuju prema stupnju oksidacije, rasporedu hidroksilnih (-OH) i metoksilnih (-OCH₃) skupina te prema vezanim šećernim jedinicama te ih možemo podijeliti u 6 skupina: flavone, flavonole, flavanone, flavanole, antocijanidine i izoflavonoide. U prirodi su flavonoidi uglavnom glikozidno vezani i dolaze kao O- ili C-glikozidi, rijetko se pojavljuju u slobodnom obliku. Šećernu komponentu najčešće čine najčešće čine monosaharidi (arabinoza, glukoza, galaktoza i ramnoza) ili disaharidi (neohesperidoza i rutinoza). Flavonoidi su važni za rast biljaka i njihovu obranu od patogena i nametnika (97-100).

Fenolne kiseline sekundarni su biljni metaboliti koji također nastaju biosintezom preko šikiminske kiseline. Prema strukturi ih dijelimo na derivate benzojeve i cimetine kiseline, te razlikujemo dvije glavne podskupine fenolnih kiselina: hidroksibenzojeve (C₆-C₁) i hidroksicimetine kiseline (C₆-C₃). Početni spoj u biosintezi hidroksibenzojevih i hidroksicimernih kiselina je fenilalanin (aromska aminokiselina) koji nastaje iz korizmata kao konačnog produkta biosinteze šikiminske kiseline. Nadalje, deaminacijom iz fenilalanina nastaje cimetna kiselina, dok se ostale kiseline dobivaju naknadnim reakcijama hidroksilacije i metilacije u kojima se vežu supstituenti za benzenski prsten. Hidroksicimetine kiseline se u prirodi rijetko pojavljuju u slobodnom obliku, većinom su esterificirane (esteri alifatskih

alkohola i esteri kina kiseline). Mogu biti u obliku amida ili vezane sa šećerima u obliku glikozida. Najrasprostranjenije hidroksicimetne kiseline su 4-kumarna, kavena, ferulična i sinapna kiselina. Hidroksibenzojeve kiseline sintetiziraju se β -oksidacijom iz 4-kumarne kiseline, dok jednostavni hidroksibenzoati (pr. galna kiselina) mogu nastati izravno iz ranih međuprodukata metaboličkog puta šikiminske kiseline enzimskim reakcijama. U biljnim drogama najčešće se pojavljuju u slobodnom obliku, kao i vezane u esterima i glikozidima. Među često zastupljene derivate hidroksibenzojeve kiseline ubrajaju se galna, *p*-hidroksibenzojeva, protokatehinska, salicilna i vanilinska kiselina (95, 98, 101).

Za ekstrakciju polifenolnih sastavnica iz biljnih droga često se koriste etanol i metanol, međutim, njegove negativne strane su visoka hlapljivost i zapaljivost. Osim toga, primjenjuju se i druga organska otapala poput etil-acetata, acetona i kloroforma, međutim njihova primjena u procesima ekstrakcije nosi niz negativnih strana, uglavnom vezanih uz sigurnost, negativan utjecaj na okoliš i kvalitetu dobivenog ekstrakta. U novije vrijeme sve veću pozornost privlače niskotemperaturna eutektična otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES) koja udovoljavaju gotovo svim zahtjevima zelene kemije te se smatraju otapalima 21. stoljeća. Uključivanjem donora i akceptora vodikove veze stvaraju se jake vodikove veze, a zbog delokalizacije naboja u takvim smjesama, dolazi do sniženja tališta u odnosu na individualne komponente, odnosno do svojstva eutektičnosti (102, 103).

Vrste roda *Artemisia* razlikuju se međusobno po kemijskom sastavu, iako su u njihovom sastavu prisutne neke zajedničke skupine spojeva, zabilježena je značajna varijabilnost kemijskog sastava među različitim vrstama pelina. Do sada je identificirano više od 160 različitih flavonoidnih spojeva prisutnih u vrstama roda *Artemisia*, pri čemu otprilike jedna trećina pripada derivatima flavona luteolina i apigenina (8). Također, dosadašnjim istraživanjima dokazano je da su nadzemni dijelovi bogati flavonoidnim glikozidima poput kvercitrina, izokvercitrina, rutina, aglikonima poput izoramnetina, kaemferola, kvercetina te kumarinima (skopoletin, askuletin, izofraksidin). Nadalje, većina dosadašnjih istraživanja pokazala je da su metoksilirani flavonoli artemetin i kasticin prisutni u ekstraktima nadzemnih dijelova biljnih vrsta *A. abrotanum*, *A. absinthium* i *A. annua*. Fenolne kiseline zastupljene u vrstama roda *Artemisia* uključuju: feruličnu, kavenu, klorogensku, kriptoklorogensku, neoklorogensku, 3,5- i 4,5-di-kafeoilkininsku, protokatehničnu i ružmarinsku kiselinu (6, 82, 104). Pregled dosadašnjih istraživanja polifenolnih sastavnica iz cvatućih vršnih dijelova odabranih vrsta roda *Artemisia* prikazan je u Tablici 3, među kojima se udjelom ističu flavonoidi i fenolne kiseline (Slika 8).



Slika 8. Primjeri najčešće zastupljenih flavonoida i fenolnih kiselina u nadzemnim dijelovima vrsta roda *Artemisia* L.

Tablica 3. Pregled dosadašnjih istraživanja flavonoida i fenolnih kiselina u odabranim vrstama roda *Artemisia* L.

Biljna vrsta	Ekstrakt	Glavne sastavnice	Literatura
<i>A. abrotanum</i>	70 %-tni etanolni	Fenolne kiseline: <i>p</i> -kumarna (2-3,36 µg/mL), ferulična (10,31-27,7 µg/mL), sinapna (34,56-79,95 µg/mL) Flavonoidi: hiperozid (0-1,95 µg/mL), rutin (62,9 µg/mL), kvercitrin (2,42 µg/mL), kvercitol (33,31 µg/mL), patuletin (19,04 µg/mL), luteolin (1,29 µg/mL), apigenin (1,16 µg/mL), kaemferol (4,19 µg/mL)	(105)
	50 %-tni etanolni	Fenolne kiseline: galna kiselina (2,83 µg/mL), kavena kiselina (1,43 µg/mL), klorogenska kiselina (103,47 µg/mL) Flavonoidi: rutin (10,57 µg/mL), luteolin (4,35 µg/mL), kvercetin (5,36 µg/mL), kvercetin 3-β-D-glukozid (1,07 µg/mL), kaemferol (1,33 µg/mL), apigenin (3,84 µg/mL)	(106)
	70 %-tni etanolni	Fenolne kiseline: 3,5-dihidroksibenzojeva (57,07 µg/g), neoklorogenska kiselina (295,38 µg/g), klorogenska kiselina (3834,38 µg/g), kriptoklorogenska kiselina (208,88 µg/g), izoferulična (89,90 µg/g), kaveoil-tartarna (108,70 µg/g), 3-feruloilcina (196,41 µg/g), 4-feruloilcina (234,74 µg/g), 3,4-dikaveoilcina (1320,08 µg/g), 3,5-dikaveoilcina (2303,19 µg/g), derivat kina kiseline (443,79 µg/g), 4,5-dikaveoilcina kiselina (443,79 µg/g), 3-feruloil-4-kaveoilcina (592,24 µg/g), 4-feruloil-5-kaveoilcina (325,77 µg/g), 3,4-diferuloilcina (164,61 µg/g), 3,5-diferuloilcina (191,50 µg/g), 5-kaveoil-4-feruloilcina (237,03 µg/g), 3,4,5-trikaveoilcina (126,08 µg/g) Flavonoidi: apigenin-arabinozil-glukozid (46,26 µg/g), rutin (903,68 µg/g), apigenin-glukozil-arabinozil (193,67 µg/g), izoramnetin-rutinozil (240,37 µg/g), 3,5-dihidroksi-6,7,4'-trimetoksiflavon (45,16 µg/g), 3,5-dihidroksi-6,7,3',4'-tetrametoksiflavon (36,92 µg/g)	(107)
	70 %-tni etanolni	Fenolne kiseline: gentizinska (0,10 %), 3-O-feruloil-kina (4,52 %), izoklorogenska (3,22 %), ružmarinska (4,39 %)	(83)

Biljna vrsta	Ekstrakt	Glavne sastavnice	Literatura
		<p>Flavonoidi: vicenin-2 (2,04 %), rutin (5,04 %), izokvercitrin (3,35 %), kvercetin-3-O-heksozid (4,83 %), luteolin-7-O-glukozid (2,78 %), izoramnetin-3-rutinozid (4,22 %), kvercetrin (6,53 %), luteolin (7,60 %), izoramnetin (4,59 %), eupatolitin (3,83 %), krizosplenol D (8,31 %), cirisilineol (6,16 %), kasticin (8,32 %)</p>	
<i>A absinthium</i>	metanolni	<p>Fenolne kiseline: glukonska, kina, maleinska, L(-)-maleinska, citrična, izocitrična, 3,4,5-trihidroksibenzojeva, 3-<i>trans</i>-kaveoilglukuronska, 4-<i>trans</i>-kaveoilglukuronska, 3-<i>cis</i>-kaveoilglukuronska, protokatehinska kiselina 3-glukozid, 4-<i>cis</i>-kaveoilglukuronska, glukozid vanilinske kiseline, protokatehinska kiselina 4-glukozid, 5-<i>trans</i>-kaveoilglukuronska, 2-<i>trans</i>-kaveoilglukuronska, glukosiringčna, 3-<i>cis</i>-kaveoilkina, 3-izopropilmalinska, salicilna, 5-<i>trans</i>-kaveoilkina, 4-<i>trans</i>-kaveoil-metil-glukuronska, 5-<i>cis</i>-kaveoilkina, ružmarinska, 2-hidroksioktadekanoinjska, 4-<i>trans</i>-kaveoilkina, 1-<i>cis</i>-kaveoilkina, 2-<i>trans</i>-kaveoil-metil-glukuronska, 4-<i>cis</i>-kaveoil-metil-glukuronska, kavena, 2-<i>cis</i>-kaveoil-metil-glukuronska, asperulosidična, 1-<i>trans</i>-kaveoilkina, 5-<i>cis</i>-kaveoil-metil-glukuronska, 7-epi-12-hidroksijasmonska, glukozid tuberonske kiseline, 3-<i>p</i>-kumaroilkina, 5-<i>trans</i>-kaveoil-metil-glukuronska, 3-feruloilkina, 5-<i>p</i>-kumaroilkina, 5-feruloilkina, 4-feruloilkina, 4-<i>p</i>-kumaroilkina, 3,4-di-kaveoilkina, 3,5-di-kaveoilkina, 1,3-di-kaveoilkina, 4,5-di-kaveoilkina, 3,4,5-tri-kaveoilkina</p> <p>Flavonoidi: spinacetin 3-O-glukozil-(1->6)-glukozid, kaemferol-3-sambubiozid-7-glukozid, kaemferol-7-kafeoilramnozid-glukozid, kvercetin-7-glukozid, kaemferol-7-ksilozilglukozid, kaemferol-7-sambubozid, rutin, kaemferol-3-ramnozid-7-glukozid, mearnsetin-3-rutinozid, izokvercitrin, mearnsetin-3-glukozid, kaemferol-7-rutinozid, apigenin-7-apioglukozid, apigenin-7-neohesperidozid, izoramnetin-7-rutinozid, spinacetin-7-rutinozid, izoramnetin-3-glukozid, spinacetin-</p>	(108)

Biljna vrsta	Ekstrakt	Glavne sestavnice	Literatura
		7-robinobiozid, spinacetin-3-glukozid, kaemferol-3-glukozid, izoramnetin-7-(2"-acetilglukozid), apigenin, kaemferol, krizoeriol, eupatilin, kasticin, kaemferid, artemetin	
	diklormetan	Flavonoidi: artemetin, santin, apigenin	(84)
	[1] etil-acetatni [2] vodeni	[1] Fenolne kiseline: <i>p</i> -hidroksibenzojeva (0,21%), kavena (21,49 %), <i>p</i> -kumarna (0,77 %) Flavonoidi: kvercetin (1,29 %), naringenin (5,85 %) [2] Fenolne kiseline: <i>p</i> -hidroksibenzojeva (5,44 %) Flavonoidi: naringenin (58,76 %)	(109)
	diklormetan- metanol diklormetan- aceton	Flavonoidi: epiangambin, artemisetin	(85)
	70 %-tni etanolni	Fenolne kiseline: galna (0,092 mg/g), klorogenska (0,077 mg/g), kavena (0,181 mg/g), kumarna (0,112 mg/g), ferulična (0,100 mg/g) Flavonoidi: rutin (0,089 mg/g), luteolin (0,677 mg/g), kvercetin (2,707 mg/g), miricetin (0,201 mg/g), apigenin (0,359 mg/g)	(110)
	metanolni	Fenolne kiseline: klorogenska, kina, cimetna, malinska Flavonoidi: rhoifolin	(111)
	80 %-tni metanolni	Fenolne kiseline: di-etil ester L-(-)malinske kiseline (0,22 g/kg), klorogenska (3,42 g/kg), 3-O-feruloilkina (0,08 g/kg), 1,5-di-kaveoilkina (2,12 g/kg), 4,5-di-kaveoilkina (0,61 g/kg) Flavonoidi: tanacetin, spinacetin 3-rutinozid (0,24 g/kg), izoramnetin 7-glukozid (0,10 g/kg), hedikorizid B	(112)
	[1] etanolni [2] acetonski	Fenolne kiseline: galna, klorogenska	(86)

Biljna vrsta	Ekstrakt	Glavne sastavnice	Literatura
	[1] metanolni [2] kloroformni	Fenolne kiseline: klorogenska, neoklorogenska, kriptoklorogenska, di-kaveoilkina, kumaroilkina, kumaroil-kaveoilkina, feruloil-kaveoilkina, feruloilkina, feruloil-kaveoilkina I, feruloil-kaveoilkina II Flavonoidi: eupatolitin-O-deoksiheksozid-O-heksozid	(87)
	50 %-tni etanolni	Fenolne kiseline: klorogenska (259,4-297,9 µg/mL), kavena (2,6-3,2 µg/mL), ružmarinska (21,0-22,6 µg/mL), elaginska (4,7-5,1 µg/mL) Flavonoidi: kvercetil (0,6-0,7 µg/mL), luteolin (4,7-5,5 µg/mL), apigenin (0,7-1,1 µg/mL), rutin (12,6-15,6 µg/mL), izokvercitrin (1,5-1,9 µg/mL)	(113)
<i>A. annua</i>	50-100 %-tni etanolni	Flavonoidi: rutin, izoramnetin, kasticin, cinarozid, krizosplenol D	(88)
	dietil-eter	Flavonoidi: krizosplenol D, krizosplenetin, kasticin, artemetin	(89)
	[1] Toluenski [2] n-heksanski [3] kloroformni	Flavonoidi: krizosplenol D, eupatin, cirsilineol, kasticin, krizosplenetin	(90)
	70 %-tni etanolni	Fenolne kiseline: 3,5-dihidroksibenzojeva (26,43-20,24 µg/g), 3-kaveoilkina (55,45-57,90 µg/g), 5-kaveoilkina (1064,44-2232,88 µg/g), 4-kaveoilkina (46,31-55,72 µg/g), glukozid kavene kiseline (82,71-96,58 µg/g), izo-ferulična (110,12-246,52 µg/g), kaveoil-tartarna (85,84-116,55 µg/g), 3-feruloilkina (546,98-1201,73 µg/g), 4-feruloilkina (70,06-98,49 µg/g), 5-feruloilkina (109,01-155,29 µg/g), 3,4-di-kaveoilkina (1302,00-1652,25 µg/g), 3,5-di-kaveoilkina (805,10-1006,37 µg/g), derivat kina kiseline (149,02-485,51 µg/g), 4,5-di-kaveoilkina (369,09-425,25 µg/g), 3-feruloil-4-kaveoilkina (107,04-122,08 µg/g), 4-feruloil-5-kaveoilkina (794,42-1461,61 µg/g), 3,4-diferuloilkina (252,47-284,51 µg/g), 3,5-diferuloilkina (126,01-170,22 µg/g), 5-kaveoil-4-feruloilkina (233,76-292,95 µg/g)	(114)

Biljna vrsta	Ekstrakt	Glavne sestavnice	Literatura
		Flavonoidi: apigenin-arabinozil-glukozid (118,22-168,29 µg/g), apigenin-glukozil-arabinozid (113,69-297,29 µg/g), izoramnetin-rutinozid (429,73-790,47 µg/g), 3,5-dihidroksi-6,7,4'-trimetoksiflavon (71,59-117,02 µg/g), 3,5-dihidroksi-6,7,3',4'-tetrametoksiflavon (82,77-108,81 µg/g)	
	vodeni	Flavonoidi: krizosplenol D, patuletin-3-O-β-D-glukopiranozid, kvercetin-7-O-β-D-glukozid, rutin, apigenin 6,8-di-C-β-D-glukopiranozid, izoschaftozid, annfenon	(115)
	MoMundo GmbH (Bad Emstal, Germany)	Flavonoidi: krizosplenol D, kasticin	(91)
	[1] metanolni [2] kloroformni	Fenolne kiseline: klorogenska, dikaveoilkina, kumaroilkina, kumaroil-kaveoilkina, feruloil-kaveoilkina, feruloilkina, feruloil-kaveoilkina I, feruloil-kaveoilkina II Flavonoidi: eupatolitin, mearnsetin-di-O-heksozid, kvercetin-O-heksozid, apigenin-C-heksozid-C-pentozid	(87)
	metanolni	Fenolne kiseline: 3,5-dihidroksibenzojeva kiselina-O-glukozid, 3,5-dihidroksibenzojeva kiselina-O-glukozid-ksilozid, klorogenska, 3-kaveoilkina, 5-feruloilkina, 3,4-di-kaveoilkina, 3,5-di-kaveoilkina, derivat kina kiseline, 4,5-di-kaveoilkina, 3-feruloil-4-kaveoilkina, 4-feruloil-5-kaveoilkina, 1-feruloil-5-kaveoilkina, 1-kaveoil-5-feruloilkina, 3-feruloil-5-kaveoilkina, 3-kaveoil-5-feruloilkina, 4-kaveoil-5-feruloilkina, 3-kaveoil-4-feruloilkina, 3,4-di-feruloilkina, 3,5-diferuloilkina, di-kaveoil-feruloilkina Flavonoidi: mearnsetin-di-glukozid, vicenin-2, izoschaftozid, schaftozid, apigenin-6-C-pentozid-8-C-glukozid, apigenin-6-C-glukozid-8-C-pentozid, apigenin-6-C-ramnozid-8-C-glukozid, viteksin, apigenin-6-C-glukozid-8-C-ramnozid, kvercetin-ramnozid-glukozid, kvercetin-glukozid, mearnsetin-	(116)

Biljna vrsta	Ekstrakt	Glavne sestavnice	Literatura
		glukozid, izoramnetin-glukozid, 3,5-dihidroksi-6,7,4'-trimetoksiflavon, 3-hidroksi-6,7,4'-trimetoksiflavon, 3,5-dihidroksi-6,7,3',4'-tetrametoksiflavon	
	vodeni	Fenolne kiseline: kavena (0,8 mg/L), 3,5-di-kaveoilkina (57 mg/L), 3-kaveoilkina (72 mg/L), 4-kaveoilkina (20,4 mg/L), 4,5-di-kaveoilkina (31,6 mg/L), 5-kaveoilkina (9,0 mg/L), ružmarinska (1,1 mg/L) Flavonoidi: izoviteksin (105 mg/L)	(92)
<i>A. vulgaris</i>	[1] metanolni [2] kloroformni	Fenolne kiseline: klorogenska, kriptoklorogenska, neoklorogenska, dikaveoilkina I, kumaroilkina, kumaroil-kaveoilkina, feruloil-kaveoilkina, feruloilka, kumarna kiselina-O-glukozid, kavena kiselina-O-pentozid Flavonoidi: eupalitin, eupatilin, rhamnazin, luteolin-O-deoksiheksozid-O-heksozid, ramnetin-O-heksozid	(87)
	50 %-tni etanolni	Fenolne kiseline: klorogenska (301,1-350,6 µg/mL), kavena (2,4-3,2 µg/mL), ružmarinska (3,1-3,3 µg/mL) Flavonoidi: kvercitol (0,1-0,8 µg/mL), luteolin (12,4-14,5 µg/mL), apigenin (2,5-2,6 µg/mL), rutin (18,4-19,6 µg/mL), izokvercitrin (3,7 µg/mL)	(113)

1.3. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA BIOLOŠKIH UČINAKA ODABRANIH VRSTA RODA *Artemisia* L.

1.3.1. Antioksidacijski učinak

Istraživanja bioloških učinaka vrsta roda *Artemisia* uglavnom obuhvaćaju ispitivanja antioksidacijskog potencijala putem nekoliko različitih mehanizama djelovanja, uključujući hvatanje slobodnih DPPH i NO radikala, sposobnosti redukcije iona željeza(III), ukupnog antioksidacijskog kapaciteta i inhibicije lipidne peroksidacije te je utvrđeno da odabrane vrste roda *Artemisia* posjeduju izražena antioksidacijska svojstva. Iako nema opsežnih podataka za vrstu *A. abrotanum*, postojeći rezultati upućuju na dobar antioksidacijski potencijal etanolnog ekstrakta divljeg pelina s IC_{50} vrijednostima 69,27 $\mu\text{gTE/mL}$, 56,66 $\mu\text{gQE/mL}$ i 59,43 $\mu\text{gTE/mL}$ za hvatanje slobodnih DPPH, NO i H_2O_2 radikala te 67,13 $\mu\text{gTE/mL}$ za sposobnost redukcije iona željeza (108). Rezultati Baiceanu i sur. (106) potvrđuju da 70 %-tni etanolni ekstrakt zeleni divljeg pelina ima dobru sposobnost hvatanja DPPH radikala s IC_{50} vrijednošću 284,5 $\mu\text{g/mL}$. Istraživanje Hbika i sur. iz 2022 godine ukazuje na dobra antioksidacijska svojstva vodenog i etil-acetatnog ekstrakta nadzemnih dijelova vrste *A. absinthium* koji hvataju DPPH radikale ($IC_{50} = 0,35\text{-}0,17 \text{ mg/mL}$) te reduciraju ione željeza ($IC_{50} = 3,36\text{-}0,92 \text{ mg/mL}$) (109). Iz istraživanja Ticolea i sur. (114) vidljivo je da antioksidacijska aktivnost vrsta *A. annua* i *A. absinthium* ovisi o dijelu biljke iz koje je pripremljen ekstrakt. Etanolni ekstrakti listova pokazali bolje antioksidacijsko djelovanje nego oni dobiveni iz cvjetova. Vrijednosti IC_{50} za vrstu *A. absinthium* bili su 87,54-189,64 $\mu\text{gTE/g}$ (DPPH), 66,45-145,12 $\mu\text{gQE/g}$ (NO), 85,18-87,42 $\mu\text{gTE/g}$ (H_2O_2) te 62,45-46,45 $\mu\text{gTE/g}$ (redukcijska snaga), a za vrstu *A. annua* 73,08-77,28 $\mu\text{gTE/g}$ (DPPH), 68,23-64,93 $\mu\text{gQE/g}$ (NO), 70,59-84,51 $\mu\text{gTE/g}$ (H_2O_2) te 30,74-21,43 $\mu\text{gTE/g}$ (redukcijska snaga). Jamei i Anvari (2018) ustanovili su također da etanolni ekstrakt lista vrste *A. absinthium* ima bolju sposobnost hvatanja slobodnih radikala u odnosu na etanolni ekstrakt cvijeta, s postotkom inhibicije 87,36-92,56 % (DPPH) i 42,80-43,85 % (NO) (117). Skowrya i sur. (2014) ispitali su antioksidacijsku aktivnost 50 %-tnog etanolnog ekstrakta vrste *A. annua* trima različitim metodama određivanja: metoda s 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonskom kiselinom (engl. 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulphonic acid assay, ABTS), apsorpcijski kapacitet kisikovih radikala (engl. Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC) i sposobnosti redukcije iona željeza (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP). Primjena ABTS testa dobivena je vrijednost 314,99 $\mu\text{M TE/g}$, ORAC testa 736,26 $\mu\text{M TE/g}$ te FRAP testa 212,18 $\mu\text{M TE/g}$ (118). Za vrstu *A. annua* dostupni su brojni podaci koji ukazuju

na značajnu varijabilnost antioksidacijske sposobnosti ovisno o korištenom otapalu. Etanolni ekstrakt pokazuje izrazito snažno djelovanje ($IC_{50} = 5,17 \mu\text{g/mL}$ za DPPH i $79,94 \mu\text{g/mL}$ za NO) (119), dok prema Iqbalu i sur. metanolni ekstrakt ima najbolju, a heksanski ekstrakt najmanju sposobnost hvatanja DPPH radikala (120). Dosadašnja znanstvena istraživanja antioksidacijskog kapaciteta vrste *A. vulgaris* potvrđuju značajnu sposobnost hvatanja slobodnih radikala, pri čemu IC_{50} vrijednosti variraju ovisno o dijelu biljke i vrsti ekstrakta (121, 122). Oyedemi i sur. (2015) pokazali su da 70 %-tni etanolni ekstrakt običnog pelina hvata slobodne DPPH radikala ($IC_{50} = 0,98 \mu\text{g/mL}$) te da inhibira lipidnu peroksidaciju ($IC_{50} = 36 \mu\text{g/mL}$), ksantin oksidaze ($IC_{50} = 112,51 \mu\text{g/mL}$) i glikacije proteina ($IC_{50} = 968,40 \mu\text{g/mL}$) (123).

1.3.2. Hipoglikemijski učinak

U zapadnoj i afričkoj tradicionalnoj medicini zabilježeno je više od 400 vrsta roda *Artemisia* kojima se pripisuju antidijabetička svojstva. Osim toga, različite vrste roda *Artemisia*, posebice *A. annua*, *A. herba-alba*, *A. afra* i *A. dracunculus*, imaju dugu povijest primjene u liječenju dijabetesa i snižavanju povišene razine šećera u krvi (hiperglikemije) u narodnoj medicini Mediterana, Afrike i Bliskog istoka (124, 125). Znanstvena istraživanja potvrdila su ove tradicionalne tvrdnje, pokazujući da i vodeni i alkoholni ekstrakti vrsta roda *Artemisia* mogu značajno sniziti razinu glukoze u krvi. Prema preglednom radu Settembre-Malaterre i sur. iz 2020 godine, vodeni ekstrakti vrste *A. annua* pokazuju značajno hipoglikemijsko i antihipoinzulinemijsko djelovanje u animalnim modelima. Naime, zabilježeno je značajno smanjenje razine glukoze u krvi u pokusnih životinja koje su primale $28,5 \text{ mg/kg}$ vodenog ekstrakta dva puta dnevno. Pretpostavljeni mehanizmi djelovanja su stimulacija lučenja inzulina iz β -stanica, inhibicija α -stanica otočića gušterače ili pojačavanje djelovanja inzulina (17). Ghanbari i sur. (2022) ispitivali su učinke vodenih i alkoholnih ekstrakata vrste *A. annua* na inzulinsku rezistenciju u dijabetičnih miševa izazvanu visokomasnom prehranom i streptozocinom. Rezultati su pokazali da su oba ekstrakta u koncentracijama 100, 200 i 400 mg/kg, kao i metformin (250 mg/kg), značajno smanjili serumske razine slobodnih masnih kiselina, TNF- α , IL-6 te omjer LDL/HDL i indeks inzulinske rezistencije (HOMA-IR) u ispitivanoj skupini u usporedbi s dijabetičnim miševima kontrolne skupine. Posebice se istaknula doza 400 mg/kg vodenog ekstrakta koja je bila učinkovitija od metformina u smanjenju TNF- α i IL-6 (126). Nadalje, u ispitan je etanolni ekstrakt vrste *A. absinthium* na štakorima kojima je dijabetes značajno narušio vrijednosti glukoze natašte u serumu, lipidni

profil, ureu, kreatinin i albumin. Primjenom vrste *A. absinthium* navedeni parametri približili su se normalnim vrijednostima (127).

Ispitivanja antidijabetičkog i hipoglikemijskog učinka vrsta roda *Artemisia* uključivala su i procjenu njihove sposobnosti da inhibiraju enzime α -glukozidazu i α -amilazu. Prema radu Neagu i sur., 50 %-tni etanolni ekstrakt vrste *A. abrotanum* inhibira aktivnost navedenih enzima postižući IC_{50} vrijednosti 1450,32-1881,21 mg/mL, bolje djelujući na α -glukozidazu (106). Suprotno tome, ispitivanje Hbika i sur. iz 2022 godine pokazao je da etil-acetatni i vodeni ekstrakt vrste *A. absinthium* bolje djeluje na enzim α -amilazu s IC_{50} vrijednostima 0,68 i 0,76 mg/mL za oba ekstrakta u odnosu na enzim α -glukozidazu (IC_{50} = 0,155 i 0,170 mg/mL), pri čemu je vodeni ekstrakt bio aktivniji od etil-acetatnog na oba enzima (109). U usporednom istraživanju antidijabetičkog potencijala vrsta *A. absinthium* i *A. vulgaris* 50 %-tni etanolni ekstrakt vrste *A. absinthium* (IC_{50} = 45,16 μ g/mL) pokazao je bolju inhibiciju α -glukozidaze u odnosu na vrstu *A. vulgaris* (IC_{50} = 96,04 μ g/mL), dok su oba ekstrakta snažnije djelovala na α -amilazu (IC_{50} = 22,2 i 17,0 μ g/mL) (113). Nadalje, u usporedbi s nadzemnim dijelovima vrste *A. absinthium*, 70 %-tni metanolni ekstrakt korijena pokazao je bolju inhibiciju enzima, s IC_{50} vrijednostima 224,12 μ g/mL za α -amilazu i 243,35 μ g/mL za α -glukozidazu (128).

Iz dostupne znanstvene literature vrsta roda *Artemisia* vidljivo je da pelini posjeduju veliki potencijal u istraživanju prirodnih ljekovitih tvari s hipoglikemijskim i antidijabetičkim svojstvima.

1.3.3. Neuroprotektivni učinak

Sukladno dosadašnjim znanstvenim ispitivanjima vrste roda *Artemisia* pokazuju značajna neuroprotektivna svojstva. Istraživanja upućuju na potencijalne koristi primjene pelina kod neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti te epilepsije, kroz smanjenje oksidacijskog oštećenja i poticanje preživljavanja neuronskih stanica. Neke vrste roda *Artemisia* koristile su se u narodnoj medicini za liječenje epileptičnih napadaja, a antikonvulzivna učinkovitost ovih biljaka potvrđena je u animalnim modelima akutne i kronične epilepsije. Istraživanja su pokazala da eterična ulja, sirovi ekstrakti i različite frakcije vrsta roda *Artemisia* mogu spriječiti napadaje (129, 130). Prema Zhou i sur. (2023) vodeni ekstrakt vrste *A. annua* potaknuo je preživljavanje i proliferaciju neuronskih progenitorskih stanica (NPS) te povećao ekspresiju sinaptičkih proteina. Osim toga, devetomjesečne ženke miševa s Alzheimerovom bolešću tretirane ekstraktom pokazale su značajno poboljšanje kognitivnih sposobnosti te smanjeno nakupljanje beta-amiloida (A β) i oslobađanje upalnih medijatora te smanjenu apoptozu i hiperfosforilaciju tau proteina u usporedbi s miševima iz kontrolne skupine (131).

Artemeter je polusintetski derivat artemizina koji se dobiva iz vrste *A. annua*. Quan i sur. ispitali su njegovo djelovanje na štakorima s Parkinsonovom bolešću. Ustanovljeno je da se djelovanje artemetera može povezati sa signalnim putovima apoptoze te da artemeter ima dobru spontanu vezujuću aktivnost s ključnim metama fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI3K), protein kinaza B (Akt), kinaza glikogen sintaze 3 β (GSK-3 β) i B-stanični limfom-2 protein (Bcl-2). Osim toga, artemeter je ublažio motoričku disfunkciju i kognitivne poremećaje u miševa s Parkinsonovom bolešću te povećao ekspresiju dopaminergičkih neurona u moždanim strukturama *substantia nigra* i *striatum* (132). Bora i Sharma (2010) proveli su ispitivanje potencijalnog protektivnog učinka metanolnog ekstrakta nadzemnih dijelova vrste *A. absinthium* na cerebralni oksidacijski stres i oštećenje te poremećaje ponašanja izazvane ishemijom i reperfuzijskom ozljedom mozga u štakora. Ustanovljena su neuroprotektivna svojstva te ukazano na potencijal primjene kao dodatne terapije u liječenju moždanog udara budući da su oralno primijenjeni metanolni ekstrakti gorkog pelina (100 mg/kg i 200 mg/kg) značajno smanjili oksidacijski stres i oštećenje mozga kod prethodno izazvanog moždanog udara (133).

Veliki dio ispitivanja neuroprotektivnog učinka vrsta roda *Artemisia* usmjeren je na utvrđivanje sposobnosti inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE), kao važnih terapijskih meta. Prema Ali Khan i sur. (2022), eterično ulje vrste *A.*

absinthium ima dobru sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE s IC_{50} vrijednostima 32 $\mu\text{g/mL}$ i 36 $\mu\text{g/mL}$ (134). Drugo je istraživanje pokazalo da etanolni ekstrakt vrste *A. annua* ostvario IC_{50} vrijednost od 87,43 $\mu\text{g/mL}$ (135). Prema istraživanju Trifan i sur. (2022), za metanolne i kloroformne ekstrakte nadzemnih dijelova i korijena vrsta *A. absinthium*, *A. annua* i *A. vulgaris* utvrđeno je da postoji razlika u djelovanju ovisno o primijenjenom otapalu i dijelu biljke koji se ispituje. Kloroformski ekstrakti nadzemnih dijelova vrsta *A. annua* i *A. vulgaris* bolje su djelovali u usporedbi s ekstraktima korijena, ali i bolje od metanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova biljke. Nasuprot tome, metanolni ekstrakt korijena vrste *A. absinthium* pokazao je najbolju sposobnost inhibicije AchE (87).

Provedena ispitivanja potvrđuju opravdanost primjene vrsta roda *Artemisia* u tradicionalnoj medicini te ukazuje na njihov potencijal za daljnja istraživanja neuroprotektivnog djelovanja.

1.3.4. Citotoksični učinak

Prethodna znanstvena istraživanja potvrđuju dobar citotoksični učinak eteričnih ulja i različitih ekstrakata vrsta roda *Artemisia* na odabrane tumorske stanične linije. Prethodno provedena ispitivanja pokazala su značajan antikancerogeni potencijal vrste *A. annua*, s citotoksičnim učinkom na različite tumorske stanice, uključujući humane tumore probavnog sustava, hepatocelularni karcinom (HepG2) i stanice karcinoma želuca. Prema Gavarić i sur. (2025) 70 %-tni etanolni ekstrakt vrste *A. annua* posjeduje inhibicijski učinak ovisan o koncentraciji na Rin5F stanice pankreasnog inzulinoma. U HepG2 stanicama humanog hepatocelularnog karcinoma, ekstrakt je izazvao umjereno, ali dosljedno smanjenje vijabilnosti stanica u cijelom rasponu testiranih koncentracija (0-300 $\mu\text{g/mL}$). Nasuprot tome, u H4IIE stanicama hepatoma štakora, određene koncentracije 70 %-tnog etanolnog ekstrakta pokazale su povećanje vijabilnosti stanica, što upućuje na mogući hormetički ili stanično specifični adaptivni odgovor (119). U istraživanju Isani i sur. na stanicama pasjeg osteosarkoma (D-17), učinak artemizininina i vodeno-alkoholnog ekstrakta vrste *A. annua* procijenjen je pomoću MTT testa vijabilnosti stanica. I artemizinin i vodeno-alkoholni ekstrakt uzrokovali su smanjenje vijabilnosti stanica pri svim koncentracijama te su pokazali citotoksični učinak ovisan o dozi, sa IC_{50} vrijednostima 548 μM za standard artemizinin i 65 μM za vodeno-alkoholni ekstrakt (136). Osim toga, metanolni ekstrakt vrste *A. annua* pokazao je i dobar antikancerogeni učinak protiv kolorektalnog karcinoma te je je pokazao snažnu citotoksičnu aktivnost *in vitro* na stanice humanog kolorektalnog karcinoma HCT116 ($IC_{50} = 20 \mu\text{g/mL}$) i RKO ($IC_{50} = 15 \mu\text{g/mL}$) (137). Prema istraživanju Tsamesidis i sur. (2024) 50 %-tni etanolni ekstrakt vrste *A. absinthium*

djeluje citotoksično na staničnu liniju humanog skvamoznocelularnog karcinoma jezika (HSC-3), dok ne pokazuje štetan učinak na zdrave humane stanice periodontalnog ligamenta. Nakon 24-satne inkubacije s HSC-3 stanicama, ekstrakt (10 μ M) je smanjio vijabilnost stanica raka za 99 % te povećao ekspresiju kaspaza 3 i 9 približno šest puta (138). Nadalje, 70 %-tni metanolni ekstrakt *A. absinthium* pokazao je izražen antikancerogeni učinak na stanicama karcinoma dojke (MCF-7) i humanog hepatocelularnog karcinoma (HepG2) s IC_{50} vrijednostima od 150,12 μ g/mL odnosno 137,11 μ g/mL. Ekstrakt je uzrokovao i povećanu ekspresiju proapoptotskih gena (caspase-3, 8, 9, Bax) te smanjenu ekspresiju antiapoptotskih markera (Bcl-2 i Bcl-Xl) (119). Etanolni ekstrakt (70 %-tni) vrste *A. vulgaris* pokazao je selektivnu citotoksičnost na humanim stanicama raka gušterače (PANC-1) u uvjetima nutritivne deprivacije, s preferencijalnom citotoksičnošću $PC_{50} = 12,5$ μ g/mL (139). Metanolni ekstrakt *A. vulgaris* pokazao je citotoksični učinak ovisan o dozi na stanice humanog karcinoma kolona (HCT-15) s IC_{50} vrijednošću od 50 μ g/mL (140). Eterično ulje vrste *A. vulgaris* u niskim koncentracijama inhibiralo je rast stanica akutne mijeloične leukemije (HL-60). Analize protočnom citometrijom, fragmentacije DNA i aktivacije kaspaza pokazale su da je citotoksični učinak ulja posredovan apoptozom ovisnom o kaspazama. Osim toga, eterično ulje uzrokovalo je poremećaj mitohondrijskog transmembranskog potencijala ($\Delta\Psi_m$), povećano oslobađanje citokroma c u citosol te promjene u ekspresiji proteina koji reguliraju apoptozu iz Bcl-2 obitelji, čimbenika aktivacije apoptotičke proteaze (Apaf-1) i X-vezanog inhibitora proteina apoptoze (XIAP). Eterično ulje je snažnije induciralo apoptozu u stanicama raka nego u normalnim stanicama, što ukazuje na njegovo snažno antikancerogeno djelovanje (141).

2 OBRAZLOŽENJE TEME



U skorije vrijeme, sve je veći interes industrije, akademske zajednice i biomedicinskih znanosti za istraživanjem ljekovitih i aromatičnih biljnih vrsta kao potencijalnih fitoterapeutika ili kao dobrih kandidata za daljnja istraživanja te razvoj novih lijekova. Vrste roda *Artemisia* L. predstavljaju vrijedan izvor strukturno različitih terpena i polifenola s izraženim antioksidacijskim i citotoksičnim potencijalom te sposobnosti inhibicije različitih enzima kao važnih terapijskih meta.

Opći cilj istraživanja bio je po prvi puta provesti usporednu zelenu ekstrakciju, kemijsku karakterizaciju i određivanje bioloških učinaka terpena i polifenola iz nedovoljno istraženih vrsta roda *Artemisia* koje uzgojeno i samoniklo rastu na području Bosne i Hercegovine (*A. absinthium* L., *A. annua* L., *A. abrotanum* L. i *A. vulgaris* L.) te Republike Hrvatske (*A. maritima* L.). Sva ispitivanja provedena su u usporedbi sa vrstom *Artemisia absinthium* L., kao jedinom službeno priznatom ljekovitom biljnom vrstom roda *Artemisia* sa monografijom u Europskoj farmakopeji te vrstom *Artemisia annua* L. sa monografijom u Kineskoj farmakopeji.

Postavljeni specifični ciljevi, prema kojima je provedeno ovo istraživanje, su:

- a) Optimirati metode zelene ekstrakcije terpena i polifenola superkritičnim ugljikovim dioksidom i niskotemperaturnim eutektičkim otapalima;
- b) Primjenom kromatografskih tehnika (GC-MS, HPTLC, HPLC-DAD, LC-PDA-ESI-MS/MS) te spektrofotometrijskih metoda provesti kvalitativnu i kvantitativnu analizu terpena i polifenola u biljnim ekstraktima i eteričnim uljima;
- c) u *in vitro* uvjetima odrediti biološku aktivnost biljnih ekstrakata s naglaskom na antioksidacijsko, citotoksično, neuroprotektivno i hipoglikemijsko djelovanje;
- d) Identificirati sastavnice odgovorne za biološku aktivnost odabranih biljnih vrsta te razjasniti moguće mehanizme djelovanja;
- e) Ustanoviti biomedicinski potencijal odabranih vrsta roda *Artemisia* u usporedbi sa službeno priznatim ljekovitim vrstama *A. absinthium* i *A. annua* s monografijama u Europskoj i Kineskoj farmakopeji.

3 EKSPERIMENTALNI DIO



3.1. BILJNI MATERIJAL

Nadzemni dijelovi samoniklih i uzgojenih odabranih vrsta roda *Artemisia* L. (Asteraceae) sakupljani su na različitim lokacijama u fazi punog cvjetanja tijekom kolovoza i rujna na području Bosne i Hercegovine te Republike Hrvatske (Tablica 4, Slika 9). Vrste *A. abrotanum*, *A. absinthium*, *A. annua* i *A. vulgaris* prikupljene u okolini Mostara i u Ljubinju, dok je vrsta *A. maritima* prikupljena na otoku Krku budući da u ovom dijelu Europe raste jedino u primorskim dijelovima Hrvatske. Prikupljeni biljni materijal osušen je na zraku, uz zaštitu od svjetlosti. Identifikacija biljnog materijala provedena je na Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu gdje su autentični uzorci i pohranjeni.

Tablica 4. Istraživani biljni materijal, vrijeme i lokacija sakupljanja

Biljna vrsta roda <i>Artemisia</i> L.		Vrijeme sakupljanja	Lokacija sakupljanja
<i>A. abrotanum</i>	samonikla	rujan, 2022./2023.	Mostarsko blato, Hercegovačko-neretvanska županija, BiH
<i>A. absinthium</i>	samonikla	rujan, 2022./2023.	Međine (Troskot), Hercegovačko-neretvanska županija, BiH
<i>A. annua</i>	uzgojena	rujan, 2022./2023.	Ljubinje, Istočna Hercegovina, BiH
<i>A. maritima</i>	samonikla	kolovoz, 2025.	Otok Krk, Primorsko-goranska županija, RH
<i>A. vulgaris</i>	samonikla	rujan, 2023.	Ljubinje, Istočna Hercegovina, BiH



Slika 9. Lokacije sakupljanja uzgojenih i samoniklih vrsta roda *Artemisia* L.

3.2. FITOKEMIJSKA ISPITIVANJA

3.2.1. Materijali

Instrumenti i pribor

- ❖ Analitička vaga (Mettler-Toledo, Greifensee, Švicarska-Columbus, Ohio, SAD)
- ❖ Aparatura za destilaciju pomoću vodene pare prema Clevengeru
- ❖ Aparatura za parnu destilaciju (Šurlan-laboratorijsko staklo, Medulin, Hrvatska)
- ❖ Centrifuga Biofuge Pico (Heraeus, Hanau, Njemačka)
- ❖ CO₂ inkubator (Memmert Büchenbach, Njemačka)
- ❖ CO₂ Invensys nanodac separator (Eurotherm, UK)
- ❖ CO₂ rashladni recirkulirajući uređaj PCNO 26.01-NED (National Lab GmbH, Njemačka)
- ❖ Grijača košara LabHEAT (SAF Wärmetechnik GmbH, Njemačka)
- ❖ Kolona za plinsku kromatografiju HP-5ms 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent Technologies, Palo Alto, Kalifornija, SAD)
- ❖ Kolona za tekućinsku kromatografiju Luna Phenyl-Hexyl 100Å (250 x 2,0 mm; 5 µm) (Phenomenex, Torrance, SAD)
- ❖ Kolona za tekućinsku kromatografiju Kinetex PFP 100Å (100 x 2.1 mm; 1.7µm) (Phenomenex, Torrance, SAD)
- ❖ Laboratorijska tresilica (GFL, Hannover, Njemačka)
- ❖ Laboratorijski mlin Cyclotec (Foss, Eden Prairie, Minnesota, SAD)
- ❖ Magnetska mješalica (DLab Scientific Co., Beijing, Kina)
- ❖ Maseni spektrometar Agilent 5977A (Agilent Technologies, Palo Alto, Kalifornija, SAD)
- ❖ Maseni spektrometar LTQ XL (Termo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka)
- ❖ Plinski kromatograf Agilent 7890B (Agilent Technologies, Palo Alto, Kalifornija, SAD)
- ❖ Ploče za tankoslojnu kromatografiju visoke djelotvornosti HPTLC Kieselgel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ Pumpa za CO₂ ekstrakciju (SFE Process, Tomblaine, Francuska)
- ❖ Rotacijski vakuum uparivač Büchi (Büchi Labortechnik AG, Postfach, Švicarska)
- ❖ Tekućinski kromatograf Dionex Ultimate 3000 RS (Termo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka)
- ❖ Tekućinski kromatograf Dionex Ultimate 3000 RS s DAD detektorom (Termo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka)

- ❖ Ultrazvučna kupelj Sonorex Digital 10 P (Bandelin, Berlin, Njemačka)
- ❖ Uređaj za automatsko nanošenje uzoraka Camag Automatic TLC Sampler 4 (Camag, Muttenz, Švicarska)
- ❖ Uređaj za prskanje pločice Camag Derivatizer (Camag, Muttenz, Švicarska)
- ❖ Uređaj za razvijanje pločice Camag ADC 2 Automatic Developing Chamber (Camag, Muttenz, Švicarska)
- ❖ Uređaj za grijanje pločice TLC Plate Heater II (Camag, Muttenz, Švicarska)
- ❖ Uređaj za snimanje i pohranjivanje kromatograma Camag TLC Visualiser 2 (Camag, Muttenz, Švicarska)
- ❖ UV-Vis spektrofotometar Helios γ (Spectronic Unicam, Cambridge, Velika Britanija)
- ❖ Vodena kupelj (Inko, Zagreb, Hrvatska)

Reagensi, standardi i ostale kemikalije

- ❖ Artemetin (Apollo Scientific, Manchester, UK)
- ❖ Aceton (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ Acetonitril HPLC čistoće (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ Aluminijev klorid heksahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ 2-aminoetilester difenilboratne kiseline (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ❖ Anisaldehyd (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- ❖ Butanol p.a. (Lach-ner, Neratovice, Češka Republika)
- ❖ Diizopropileter $\geq 98\%$ (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ❖ Diklormetan (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ Dimetil-sulfoksid p.a. (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ Dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ Etanol 96% p.a. (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ Etil-acetat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ Etil-formijat $\geq 97\%$ (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ❖ Etilen-glikol p.a. (VWR Chemicals, Radnor, Pennsylvania, SAD)
- ❖ Folin-Ciocalteu fenolni reagens (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ Glicerol redestilirani (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ Heksametilentetramin (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ n-Heksan GC čistoće (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ Izoklorogenska kiselina A (Apollo Scientific, Manchester, UK)
- ❖ Izoklorogenska kiselina B (Apollo Scientific, Manchester, UK)

- ❖ Izokvercitrin (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ❖ Kloridna kiselina 37% (Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika)
- ❖ Klorogenska kiselina $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- ❖ Kvercetin 98% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- ❖ Kvercitrin $\geq 90\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- ❖ Kolin klorid 98+% (Termo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts)
- ❖ Kožni prašak (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- ❖ Metanol p.a. (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ Metanol HPLC čistoće (Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika)
- ❖ Mravlja kiselina 98-100% (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ Mravlja kiselina LC-MS čistoće (Honeywell Fluka, Charlotte, SAD)
- ❖ Natrijev hidroksid (Carlo Erba, Rodano, Italija)
- ❖ Natrijev karbonat dekahidrat (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ Natrijev molibdat (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- ❖ Natrijev nitrit (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- ❖ Natrijev sulfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ Octena kiselina $\geq 99,5\%$ (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ Pirogalol 99% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- ❖ Polietilenglikol 4000 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- ❖ Rutin trihidrat (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ❖ Željezov(III) klorid heksahidrat (Merck, Darmstadt, Njemačka)

3.2.2. Izolacija i identifikacija isparljivih terpena

3.2.2.1. Izolacija eteričnog ulja postupcima hidrodestilacije i parne destilacije

Sadržaj eteričnog ulja u cvatućim vršnim dijelovima ispitivanih vrsta roda *Artemisia* određen je postupkom hidrodestilacije prema Europskoj farmakopeji (2) te postupkom parne destilacije u ručno izrađenoj aparaturi za parnu destilaciju. U tikvicu okruglog dna napunjenu s 500 mL (hidrodestilacija) i 600 mL (parna destilacija) destilirane vode stavljeno je 20,00 g biljnog materijala koji je grubo usitnjen neposredno prije analize. Brzina destilacije prilagođena je na 2-3 mL/min, a volumen izoliranog eteričnog ulja (mL) očitao je deset minuta nakon zaustavljanja trosatnog postupka destilacije. Prinos eteričnog ulja izražen je kao volumen eteričnog ulja (mL) na 1 kg biljnog materijala. Zaostala voda u izdvojenom eteričnom ulju uklonjena je dodatkom bezvodnog natrijevog sulfata, te su uzorci eteričnih ulja čuvani u tamnim bočicama u hladnjaku na temperaturi 5 °C.

3.2.2.2. Superkrična ekstrakcija isparljivih terpena ugljikovim dioksidom (sc-CO₂)

Ekstrakcija isparljivih terpenskih sastavnica, iz cvatućih vršnih dijelova odabranih vrsta roda *Artemisia*, provedena je u sustavu za ekstrakciju superkričnim ugljikovim dioksidom (sc-CO₂) prema metodi koju su opisali Jokić i sur. (142), uz manje modifikacije. U svrhu optimizacije postupka ekstrakcije provedeno je 15 ekstrakcija pri različitim vrijednostima tlaka i temperature. U ekstraktor je stavljeno po 10,00 g grubo usitnjenih cvatućih vršnih dijelova vrste *A. annua*. Ekstrakcija je trajala trideset minuta, uz konstantni protok superkričnog CO₂ (50 g/min), dok su vrijednosti temperature i tlaka varirale od 40 do 60 °C, odnosno od 100 do 220 bara.

Superkrična ekstrakcija preostalih biljnih vrsta provedena je prema ustanovljenim optimalnim uvjetima za dobivanje većih ekstrakcijskih prinosa. Po 10,00 g biljnog materijala ekstrahirano je tijekom trideset minuta, uz konstantni protok superkričnog CO₂ (50 g/min). Ekstrakcija je provedena uz vrijednosti tlaka 100 i 181 bara te pri temperaturi od 60 °C.

Dobiveni ekstrakti sakupljeni su u prethodno izvagane staklene bočice s preciznošću od $\pm 0,0001$ g i pohranjeni u hladnjaku na 5 °C. Prinos ekstrakcije izražen je kao maseni postotak (% m/m).

3.2.2.3. Istraživanje sastava eteričnih ulja i sc-CO₂ ekstrakata metodom plinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa (GC-MS)

Kvalitativna i kvantitativna analiza eteričnih ulja i sc-CO₂ ekstrakata provedena je u veznom sustavu: plinski kromatograf Agilent 7890B i maseni spektrometar Agilent 5977A. Primijenjena je metoda koju su opisali Tschiggerl i Bučar (143). Analizirani uzorci pripremljeni su otapanjem u heksanu u omjeru 1:100 te je injektirano po 1 μL uzorka u split modu (1:100) pri temperaturi 240 °C. Helij je korišten kao plin nositelj pri konstantnoj brzini protoka 1,2 mL/min. Sastavnice eteričnih ulja i sc-CO₂ ekstrakata odijeljene su na nepolarnoj kapilarnoj koloni Agilent Technologies HP-5 MS (30 m x 0,25 mm, debljina filma 0,25 μm), uz sljedeći temperaturni program: početna temperatura kolone iznosila je 45 °C (2 min), povećanje temperature od 45 °C do 250 °C brzinom 4 °C/min te održavanje temperature na 250 °C (2 min). Odijeljene sastavnice analizirane su na masenom spektrometru (EI 70 eV, m/z 40–400). Obrada dobivenih rezultata provedena je pomoću Agilent GC/MS ChemStation softvera. Sastavnice eteričnih ulja i sc-CO₂ ekstrakata identificirane su usporedbom njihovih masenih spektara s masenim spektrima pohranjenim u bazama NIST 2020 te Wiley 12, u vlastitoj bazi i prema literaturnim podacima (144). U svrhu izračuna retencijskih indeksa odijeljenih sastavnica pod istim je uvjetima analizirana i smjesa n-alkana (C8-C24).

Identifikacija je također provedena na temelju retencijskog indeksa (RI) koji je izračunat za svaku odijeljenu sastavnicu prema sljedećem izrazu:

$$RI = 100 \times C + 100 \frac{(t_R)_X - (t_R)_C}{(t_R)_{C+1} - (t_R)_C}$$

gdje C predstavlja broj C atoma n-alkana, t_R retencijsko vrijeme za pojedinu komponentu, a X predstavlja sastavnicu za koju se računa retencijski indeks.

3.2.3. Dokazivanje prisutnosti i spektrofotometrijsko određivanje polifenola

3.2.3.1. Dokazivanje prisutnosti flavonoida i fenolnih kiselina tankoslojnom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPTLC)

Priprema uzoraka i standarda

Na zraku osušeni cvatući vršni dijelovi ispitivanih vrsta roda *Artemisia* samljeveni su u prašak. Po 1 g praškastog uzorka ekstrahirano je s 10 mL metanola na vodenoj kupelji pri temperaturi od 60 °C tijekom 10 minuta, uz povratno hladilo. Ekstrakti su potom filtrirani, a dobiveni filtrati korišteni su kao ispitivane otopine za kromatografska ispitivanja prisutnosti fenolnih kiselina i flavonoida.

Otopine standardnih fenolnih kiselina (klorogenska, 3,5- i 4,5-di-kaveoilkina kiselina) i flavonoida (artemetin, izokvercitrin, kvercitrin, rutin, kvercetin) pripremljene su otapanjem u metanolu u koncentraciji 0,05 %.

HPTLC analiza u sustavu za planarnu kromatografiju

U sustavu za planarnu kromatografiju Camag provedena je analiza fenolnih kiselina i flavonoida u cvatućim vršnim dijelovima ispitivanih biljnih vrsta tankoslojnom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *high performance thin layer chromatography*, HPTLC). Na tanki sloj silikagela 60 F₂₅₄, linijski (10 mm) nanoseni su uzorci (20 µL) i otopine standarda (10 µL) pomoću uređaja za automatsko nanošenje. Kao mobilna faza za odjeljivanje fenolnih kiselina korištena je smjesa otapala diizopropiletera, acetona, mravlje kiseline i vode u volumnim omjerima 50:30:10:10, dok je za odjeljivanje flavonoidnih glikozida i aglikona korištena smjesa otapala etila-cetat, mravlja kiselina, ledena octena kiselina i voda u omjerima 100:11:11:27 te etila-cetat, mravlja kiselina i voda (80:10:10, V/V/V). Za prskanje razvijenog kromatograma korišten je NS/PEG reagens (engl. *natural substance-polyethylene glycol reagent*): 1 %-tna metanolna otopina 2-aminoetil-difenilborata i 5 %-tna etanolna otopina polietilenglikola 4000. Zatim su odijeljene sastavnice detektirane promatranjem ploče pod UV svjetlom na 245 nm i 366 nm (145-147).

3.2.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih kiselina

Spektrofotometrijsko određivanje fenolnih kiselina u cvatućim vršnim dijelovima ispitivanih vrsta roda *Artemisia* provedeno je prema propisu Europske farmakopeje (2). Ispitivanje je provedeno tako što je 0,300 g praškasto usitnjenog biljnog materijala ekstrahirano s 95 mL 50 %-tnog etanola zagrijavanjem na kipućoj vodenoj kupelji, tijekom 30 minuta, uz povratno hladilo. Potom je ekstrakt ohlađen pod mlazom hladne vode te profiltriran. Filtrat je prenesen u odmjernu tikvicu od 100,0 mL i razrijeđen 50 %-tnim etanolom do oznake. Zatim je 1 mL te otopine prenesen u odmjernu tikvicu od 10,0 mL u koju je potom dodano: 2 mL 0,5 M kloridne kiseline, 2 mL otopine pripravljene otapanjem 10 g natrijevog nitrita i 10 g natrijeva molibdata u 100 mL destilirane vode (nitrit-molibdat reagens), te 2 mL 8,5 %-tne otopine natrijevog hidroksida. Sadržaj tikvice nadopunjen je destiliranom vodom do oznake te je odmah izmjerena apsorbancija na 525 nm. Kompenzacijska otopina pripravljena je prenošenjem 1 mL ekstrakta u odmjernu tikvicu od 10 mL, u koju je zatim dodano: 2 mL 0,5 M kloridne kiseline i 2 mL 8,5 %-tne otopine natrijevog hidroksida te je do oznake nadopunjen destiliranom vodom. Maseni udio fenolnih kiselina izražen kao klorogenska kiselina, izračunat je prema izrazu:

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

gdje je A apsorbancija ispitivane otopine na 525 nm, a m masa pulveriziranog biljnog materijala u gramima.

3.2.3.3. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida

Određivanje udjela flavonoida u cvatućim vršnim dijelovima ispitivanih vrsta roda *Artemisia* provedeno je spektrofotometrijskom metodom prema Europskoj farmakopeji (2). Ispitivanje je provedeno tako što je prvotno 0,600 g pulveriziranih cvatućih, vršnih dijelova pomiješano sa 1 mL heksametilentetramina koncentracije 5 g/L, 20 mL acetona te 2,0 mL kloridne kiseline koncentracije 250 g/L u tikvici okruglog dna od 100,0 mL, a dobivena je smjesa zatim ekstrahirana trideset minuta na vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Po završetku ekstrakcije, sadržaj tikvice je ohlađen i filtriran preko malo pamuka, a ostatci droge u tikvici i na pamuku su sjedinjeni te ponovno ekstrahirani dva puta s 20 mL acetona, zagrijavanjem tijekom 10 minuta. Potom su sjedinjeni acetonski ekstrakti filtrirani u odmjernu tikvicu volumena 100,0 mL, uz ispiranje filter-papira, te razrijeđeni acetonom do oznake. Po 20,0 mL razrijeđenog acetonskog ekstrakta preneseno je u lijevak za odjeljivanje te pomiješano s 20,0 mL destilirane vode. Sadržaj je u lijevku najprije izmućkavan s 15 mL etil-acetata te zatim tri

puta s po 10 mL etil-acetata. Sjedinjene etil-acetatne frakcije isprane su dva puta s po 50 mL destilirane vode, a zatim preko 10,0 g bezvodnog natrijevog sulfata filtrirane u odmjernu tikvicu od 50,0 mL te dopunjene etil-acetatom do oznake. Za izradu ispitivane otopine 10,0 mL etil-acetatnog ekstrakta pomiješano je u odmjernoj tikvici od 25,0 mL s 1,0 mL otopine aluminijskog klorida te razrijeđeno 5 %-tnom metanolnom otopinom octene kiseline do oznake. Apsorbancija ispitivane otopine izmjerena je nakon trideset minuta na valnoj duljini od 425 nm. Poredbena otopina je priređena razrijeđivanjem 10,0 mL etil-acetatnog ekstrakta s 5 %-tnom metanolnom otopinom octene kiseline do oznake, u odmjernoj tikvici od 25,0 mL. Maseni udio ukupnih flavonoida, izražen kao izokvercitrin, izračunat je prema sljedećoj jednadžbi:

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

gdje A predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine na valnoj duljini od 425 nm, a m masu biljne droge u gramima.

3.2.3.4. Spektrofotometrijsko određivanje trjeslovina

Udjeli ukupnih trjeslovina u cvatućim vršnim dijelovima ispitivanih vrsta roda *Artemisia* određen je prema spektrofotometrijskoj metodi koju propisuje Europska farmakopeja (2). Praškasto usitnjeni biljni materijal (1,000 g) pomiješan je sa 150 mL destilirane vode u tikvici okruglog dna te je provedena ekstrakcija tijekom 30 minuta, zagrijavanjem na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Dobiveni ekstrakt ohlađen je pod mlazom hladne vode, kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu, razrijeđen destiliranom vodom do 250,0 mL te profiltriran. Prvih 50 mL filtrata je bačeno, 5 mL filtrata preneseno je u odmjernu tikvicu i razrijeđeno do 25,0 mL destiliranom vodom. Potom je 2 mL te otopine preneseno u odmjernu tikvicu od 25,0 mL i pomiješano s 1 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 10 mL destilirane vode te nadopunjen do oznake otopinom natrijevog karbonata (290 g/L). Nakon 30 minuta inkubacije, izmjerena je apsorbancija na 760 nm (A_1), uz vodu kao poredbenu otopinu.

Za određivanje polifenola neadsorbiranih na kožni prašak (netrjeslovinskih polifenola), u tikvici je 10 mL filtrata pomiješano sa 0,100 g kožnog praška te je sadržaj tikvice snažno mućkan 60 minuta na tresilici. Zatim je profiltriran, a 5 mL dobivenog filtrata razrijeđeno je destiliranom vodom u odmjernoj tikvici do 25,0 mL. Potom je 2 mL te otopine preneseno u odmjernu tikvicu od 25,0 mL i pomiješano sa 1 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 10 mL destilirane vode te nadopunjen otopinom natrijevog karbonata (290 g/L) do oznake. Nakon 30 minuta inkubacije, izmjerena je apsorbancija na 760 nm (A_2), uz vodu kao poredbenu otopinu.

Standardna otopina pirogalola pripravljena je otapanjem 50 mg pirogalola u destiliranoj vodi u odmjernoj tikvici od 100 mL. Potom je 2 mL te otopine preneseno u odmjernu tikvicu od 25 mL i pomiješano sa 1 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 10 mL destilirane vode te nadopunjen otopinom natrijevog karbonata (290 g/L) do oznake. Nakon 30 minuta inkubacije, izmjerena je apsorbancija na 760 nm (A_3), uz vodu kao poredbenu otopinu. Postotni udio trjeslovina, izražen kao pirogalol, izračunat je prema izrazu:

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

U navedenom izrazu, A_1 i A_2 predstavljaju apsorbanciju ispitivane otopine polifenola prije i poslije obrade kožnim praškom, A_3 apsorbanciju otopine pirogalola, dok je m_1 masa ispitivanog uzorka u gramima, a m_2 masa pirogalola u gramima.

3.2.4. Ekstrakcija fenolnih kiselina niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

3.2.4.1. Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala (DES-ova)

U svrhu optimiranja zelene ekstrakcije polifenolnih sastavnica iz cvatućih vršnih dijelova odabranih vrsta roda *Artemisia* niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (engl. *deep eutectic solvents*, DES), priređeni su DES-ovi na bazi kolin-klorida (ChCl; akceptor vodikove veze (HBA)) te etilen-glikola (EG) i glicerola (Gly) kao donora vodikove veze (HBD). Prethodno pripremi DES-ova, njihove organske sastavnice pohranjene su u inkubator na temperaturu od 60 °C tijekom 12 sati. Potom su navedene sastavnice odvagane prema izračunu za zadani molarni omjer HBA:HBD = 1:3 i miješane na magnetskoj miješalici na temperaturi 80 °C do postizanja transparentne homogene smjese. Pripremljeni DES-ovi ohlađeni su te tijekom noći pohranjeni u hladnjak na temperaturu od 4-5 °C, radi provjere stabilnosti. Kako bi se ispitala njihova ekstrakcijska učinkovitost DES-ovi su razrijeđeni destiliranom vodom u željenim volumnim omjerima od 30 % i 50 % (148). U Tablici 5 prikazani su različiti sustavi DES-ova koji su primijenjeni u svrhu ekstrakcije fenolnih kiselina iz odabranih vrsta roda *Artemisia*.

Tablica 5. Različiti sustavi niskotemperaturnih eutektičkih otapala (DES-ova) korištenih u svrhu ekstrakcije fenolnih kiselina

Sastavnice	Molarni omjer	Volumni udio destilirane vode (%)
ChCl:EG	1:3	0
ChCl:EG	1:3	30
ChCl:EG	1:3	50
ChCl:Gly	1:3	0
ChCl:Gly	1:3	30
ChCl:Gly	1:3	50

ChCl - kolin-klorid, EG – etilen-glikol, Gly - glicerol

3.2.4.2. Priprema ekstrakata u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Praškasto usitnjeni cvatući vršni dijelovi odabranih vrsta roda *Artemisia* (4,000 g) pomiješani su sa 40,0 mL pripremljenih DES-ova prema uvjetima opisanim u Tablici 5. Dobivena smjesa potom je miješana na magnetskoj miješalici tijekom 15 minuta pri 25 °C i 350 rpm, zatim je prenesena u kivete te petnaest minuta centrifugirana brzinom od 3000 okretaja u minuti. Dobiveni supernatanti s ekstrahiranim polifenolnim sastavnicama preneseni su u bočice i pohranjeni u hladnjak na temperaturu od 4 °C. Udjeli fenolnih kiselina u navedenim ekstraktima određeni su spektrofotometrijskom metodom prema Europskoj farmakopeji koja je opisana u poglavlju 3.2.3.2. Analize su provedene u usporedbi sa 70 %-tnim etanolnim ekstraktima, koji su također priređeni na gore navedeni način (2, 148).

3.2.5. Istraživanje polifenolnih sastavnica metodama tekućinske kromatografije (HPLC-DAD, LC-PDA-ESI-MS/MS)

3.2.5.1. Priprema uzoraka i standarda

Po 10 g praškasto usitnjenih vršnih dijelova odabranih vrsta roda *Artemisia* preliveno je sa 100 mL 70 %-tnog etanola i ekstrahirano na ultrazvučnoj kupelji pri temperaturi 25 °C tijekom 30 minuta, zatim profiltrirano kroz Büchnerov lijevak primjenom Whatman br. 1 filter-papira. Biljni materijal koji je zaostao na filter-papiru ponovno je ekstrahiran i filtriran na gore navedeni način. Dobiveni filtrati upareni su do suha pomoću rotacijskog vakuum-uparivača te čuvani u hladnjaku na 5 °C. Iskorištenja dobivenih ekstrakata bila su: *A. abrotanum* (35,98%), *A. absinthium* (30,24%), *A. annua* (31,43%), *A. maritima* (22,82%) i *A. vulgaris* (21,83%). Za potrebe analize suhi ekstrakti su otopljeni u 10 % i 70 % acetonitrilu u koncentraciji 5 mg/mL. Nastali talog odvojen je centrifugiranjem (10 min, 13000 rpm), a supernatant je korišten za daljnju analizu. Otopine referentnih supstanci otopljene su u metanolu u koncentraciji 0,5 mg/mL.

3.2.5.2. Određivanje fenolnih kiselina i flavonoida metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti obrnutih faza (HPLC-DAD)

Kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih kiselina i flavonoida u cvatućim vršnim dijelovima odabranih vrsta roda *Artemisia* provedena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti obrnutih faza (engl. *reversed phase high-performance liquid chromatography*, RP-HPLC) primjenom instrumenta Dionex UltiMate 3000 RS opremljenim automatskim injektorom, binarnom pumpom, komorom za termostatanje kolone te DAD detektorom (engl. *diode array detector*, DAD) prema metodi Ramić i sur., uz manje modifikacije (149). Odjeljivanje je provedeno na koloni Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl dimenzija 250 x 2,0 mm, i promjerom zrna punila 5 µm, pri temperaturi kolone od 35 °C. Mobilnu fazu je činila smjesa otapala koja se sastojala od 0,1 % mravlje kiseline u deioniziranoj vodi (otapalo A) i acetonitrila (otapalo B), uz primjenu gradijenta elucije prikazanog u Tablici 6. Protok mobilne faze iznosio je 0,350 mL/min, a volumen injektiranja uzorka 5 µL. UV/VIS spektri snimani su u području valnih duljina od 190 do 500 nm, a detekcija istih provedena je na valnim duljinama od 320 nm i 350 nm. Udjeli pojedinih polifenolnih sastavnica u ispitivanim uzorcima određeni su prema baždarnom pravcu ovisnosti površine ispod kromatografskoga pika i mase odgovarajućeg vanjskog standarda. Identifikacija i kvantifikacija odijeljenih sastavnica provedena je korištenjem Chromeleon Chromatography Data System programskog paketa. Svi ispitivani standardi pokazali su linearan odziv u ispitivanom području koncentracija ($R^2 = 0,9997$).

Fenolne kiseline i flavonoidi prisutni u biljnim ekstraktima identificirani su usporedbom retencijskih vremena i UV/VIS spektara s podacima dobivenim za standarde te primjenom literaturnih podataka.

Tablica 6. Gradijent otapala za odjeljivanje fenolnih kiselina i flavonoida metodom HPLC-DAD u ispitivanim vrstama roda *Artemisia* L.

Vrijeme (min)	Otapalo A (udio %)	Otapalo B (udio %)
0	90	10
25,00	60	40
40,00	0	100
42,00	0	100
42,50	90	10
48,00	90	10

3.2.5.3. Analiza fenolnih kiselina i flavonoida u vezanom sustavu tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (LC-PDA-ESI-MS/MS)

Analiza pripremljenih biljnih ekstrakata otopljenih u 10 % i 70 % acetonitrila provedena je na tekućinskom kromatografu Dionex UltiMate 3000 RS primjenom kolone Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl dimenzija 250 x 2,0 mm, i promjerom zrna punila 5 µm, pri temperaturi kolone od 25 °C. Za odjeljivanje fenolnih kiselina i flavonoida u uzorcima korištena je smjesa otapala A (0,1 % mravlja kiselina u deioniziranoj vodi) i otapala B (acetonitril) pri protoku od 0,350 mL/min uz elucijske uvjete ranije opisane u Tablici 6, dok je volumen injektiranja iznosio 5 µL.

Odjeljivanje i identifikacija visokometoksiliranih flavonoida krizosplenetina i kasticina u odabranim vrstama *Artemisia* provedeno je prema metodi koju su opisali Kunert i sur. (150), primjenom kolone Kinetex 1.7µm PFP 100Å (100 x 2.1 mm), pri temperaturi kolone 35 °C. Za odjeljivanje visokometoksiliranih flavonoida u uzorcima korištena je smjesa otapala A (0,1 % mravlja kiselina u deioniziranoj vodi) i otapala B (acetonitril) pri protoku od 0,250 mL/min uz elucijske uvjete opisane u Tablici 7, dok je volumen injektiranja iznosio 5 µL.

Tablica 7. Gradijent otapala za identifikaciju i odjeljivanje krizosplenetina i kasticina metodom LC-PDA-ESI-MS/MS u ispitivanim vrstama roda *Artemisia* L.

Vrijeme (min)	Otapalo A (udio %)	Otapalo B (udio %)
0	80	20
4,00	80	20
4,00	60	40
8,00	60	40
12,00	0	100
14,00	0	100
14,50	80	20

Odijeljene polifenolne sastavnice identificirane su primjenom masenog detektora Thermo Scientific LTQ XL nakon provedene ionizacije elektroraspršivanjem (engl. *electrospray ionization*, ESI). Uzorci su analizirani u negativnom i pozitivnom ionizacijskom modu, uz m/z opseg od 50 do 2000, dok su uvjeti ionskog izvora bili: temperatura izvora 300 °C, temperatura kapilare 350 °C, protok plina nositelja 40 arbitrarnih jedinica, protok pomoćnog plina 10 arbitrarnih jedinica, napon izvora 5 kV (ESI poz.) i 3,5 kV (ESI neg.) te napon na kapilari 35 V (ESI poz.) i -33 V (ESI neg.), normalizirana energija sudara 35,0. Ispitivanje uzastopne fragmentacije provedeno je korištenjem najintenzivnijeg prekursorskog iona. Za kontrolu instrumenta i obradu podataka korišten je Thermo Xcalibur programski paket verzija 3.1.

3.3. ODREĐIVANJE BIOLOŠKIH UČINAKA

3.3.1. Materijali

Instrumenti i pribor

- ❖ Analitička vaga (Mettler-Toledo, Greifensee, Švicarska-Columbus, Ohio, SAD)
- ❖ Automatske jednokanalne i multikanalne pipete različitih volumena (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- ❖ Čitač mikrotitarskih pločica (ChroMate Awareness Technology, Palm City, Florida, SAD)
- ❖ Mikrotitarske pločice 96 jažica ravnog dna (Dynex technologies, Ashford, Velika Britanija)
- ❖ Ručna repetitivna pipeta (Handystep®, Wertheim, Njemačka)
- ❖ Termostat (Inko, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ Ultrazvučna kupelj Sonorex Digital 10 P (Bandelin, Berlin, Njemačka)
- ❖ UV-Vis spektrofotometar Helios γ (Spectronic Unicam, Cambridge, Velika Britanija)

Standardi, kemikalije i ostali reagensi

- ❖ Artemetin (Apollo Scientific, Manchester, UK)
- ❖ Acetiltiokolin-jodid >98% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- ❖ Akarboza >98% (TCI, Tokio, Japan)
- ❖ CellTiter-Glo® (Promega, Madison, Wisconsin, SAD)
- ❖ 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- ❖ Dimetil-sulfoksid p.a. (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ Dinatrijeva sol etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina (DTNB) >98% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- ❖ Eagleov minimalni esencijalni medij (engl. *eagle's minimum essential medium*, EMEM) (American Type Culture Collection, SAD)
- ❖ Etanol 96% p.a. (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ Fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*, FBS) (Biowest, Nuaille, Francuska)
- ❖ Fosfatom puferirana otopina soli (0,01M, pH=7,4) (PBS, eng. *phosphate buffered saline*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- ❖ Galantamin hidrobromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- ❖ Izoklorogenska kiselina A (Apollo Scientific, Manchester, UK)

- ❖ Jod p.a. (Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika)
- ❖ Kalijev jodid p.a. $\geq 99\%$ (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ❖ Kloridna kiselina 37% (Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika)
- ❖ Klorogenska kiselina $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- ❖ Klorpromazin hidroklorid (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ Krumpirov škrob (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ❖ N-(1-naftil)etilendiamin dihidroklorid (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ❖ N-sukcinil-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilid $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- ❖ Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ Natrijev heksacijanoferat(III) (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ Natrijev nitroprusid (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ Natrijeva sol 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazin-4',4''-disulfonske kiseline (ferozin) (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ❖ 4-nitrofenil- α -D-glukopiranozid $>99\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- ❖ Staurosporin (MedChemExpress, New Jersey, SAD)
- ❖ Sulfanilamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- ❖ Tiobarbiturna kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- ❖ Trikloroctena kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- ❖ Trizma® baza, min. 99,9% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- ❖ Troloks 98% (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ❖ Željezov(II) klorid tetrahidrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- ❖ Željezov(III) klorid (Riedel-de-Haën, Seelze, Njemačka)

Enzimi

- ❖ Acetilkinesteraza iz električne jegulje (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- ❖ α -amilaza iz svinjske gušterače, tip VI-B, ≥ 5 U/mg proteina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- ❖ α -glukozidaza iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, tip I, >10 U/mg proteina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)

Stanice

- ❖ Stanice humanog hepatocelularnog karcinoma Hep G2 (American Type Culture Collection, SAD)

3.3.2. Priprema uzoraka i standarda

U svrhu istraživanja bioloških učinaka odabranih vrsta roda *Artemisia* 10 g praškasto usitnjenog biljnog materijala preliveno je sa 100 mL 70 %-tnog etanola i ekstrahirano na ultrazvučnoj kupelji pri temperaturi od 25 °C tijekom 30 minuta, zatim profiltrirano kroz Büchnerov lijevak primjenom Whatman br. 1 filter-papira. Nakon filtriranja, biljnom materijalu je dodano novih 100 mL istog otapala te je ekstrakcija ponovljena prema gore navedenim uvjetima. Dobiveni filtrati sjedinjeni su i upareni su do suha pomoću rotacijskog vakuum-uparivača te čuvani u hladnjaku na 5 °C. Iskorištenja dobivenih ekstrakata bila su: *A. abrotanum* L. (35,98 %), *A. absinthium* L. (30,24 %), *A. annua* L. (31,43 %), *A. maritima* L. (22,82 %) i *A. vulgaris* L. (21,83 %).

Neposredno prije ispitivanja pripremljene su osnovne otopine ispitivanih vrsta *Artemisia*, kao i otopine standarda artemetina, klorogenske kiseline i 3,5-di-kaveoilkina kiseline, trostrukim serijskim razrjeđivanjem u odgovarajućim koncentracijskim nizovima.

3.3.3. Ispitivanje antioksidacijskog djelovanja

3.3.3.1. Određivanje sposobnosti hvatanja slobodnog DPPH radikala

Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala etanolnih ekstrakata ispitivanih vrsta roda *Artemisia* određena je spektrofotometrijski prema metodi koju su opisali Vladimir-Knežević i sur. (151). Ispitivani suhi ekstrakti, klorogenska kiselina i referentni antioksidans troloks, otopljeni su u 70 %-tnom etanolu, te su serijskim razrjeđivanjem uzoraka, volumena 130 µL, u jažicama mikrotitarskih pločica pripremljeni nizovi testiranih koncentracija u rasponu 6,25-800 µg/mL. Nakon toga, u svaku jažicu sa uzorkom dodano je po 70 µL 0,36 mM otopine DPPH radikala, dok je u kontrolne jažice umjesto uzorka dodano po 130 µL odgovarajućeg otapala i 70 µL 0,36 mM otopine DPPH radikala. Nakon tridesetominutne inkubacije u mraku pri sobnoj temperaturi, ispitivanim otopinama izmjerena je apsorbancija na valnoj duljini od 492 nm. Određivanje je provedeno u triplicatu, a sposobnost inhibicije slobodnog DPPH radikala izračunata je prema sljedećoj jednadžbi:

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

gdje A_0 predstavlja apsorbanciju kontrolne otopine koja je umjesto ispitivanog uzorka sadržavala jednaku količinu odgovarajućeg otapala, a A_1 apsorbancija ispitivane otopine.

3.3.3.2. Određivanje sposobnosti hvatanja radikala dušikovog(II) oksida

Sposobnost hvatanja slobodnih NO radikala etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Artemisia* određena je spektrofotometrijski prema metodi koju su opisali Kropek i sur. (152). U jažicama mikrotitarskih pločica pripremljen je niz serijskih razrjeđenja uzoraka, klorogenske kiseline i referentnog antioksidansa troloksa u 70 %-tnom etanolu (80 μ L) u rasponu koncentracija 12,5–400 μ g/mL. U kontrolne jažice umjesto uzorka dodano je po 80 μ L odgovarajućeg otapala. Potom je u svaku jažicu dodano po 80 μ L 2 mM otopine Na-nitroprusida u PBS-u (0,01 mM, pH 7,4). Inkubacija u trajanju od 120 minuta provedena je pri sobnoj temperaturi, pod svjetlom. Potom je u reakcijske smjese dodano 40 μ L 1 % sulfanilamida u 5 % fosfornoj kiselini. Nakon 5 minuta, u jažice je dodano po 40 μ L 0,1 %-tne otopine naftiletildiamin hidroklorida (NED). Potom je odmah izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 545 nm. Određivanje je provedeno u triplikatu, a sposobnost inhibicije slobodnog NO radikala izračunata je prema sljedećoj jednadžbi:

$$\% \text{ NO antiradikalne aktivnosti} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

gdje A_0 predstavlja apsorbanciju kontrolne otopine koja je umjesto ispitivanog uzorka sadržavala jednaku količinu odgovarajućeg otapala, a A_1 apsorbancija ispitivane otopine.

3.3.3.3. Određivanje sposobnosti redukcije iona željeza(III)

Sposobnost etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Artemisia* da reduciraju ione željeza(III) određena je spektrofotometrijskom metodom prema metodi koju su opisali Mervić i sur.(153). U jažicama mikrotitarskih pločica pripremljeni su nizovi serijskih razrjeđenja tako da konačne koncentracije uzorka, klorogenske kiseline i referentnog antioksidansa troloksa u reakcijskoj smjesi budu u rasponu koncentracija 3,125-400 μ g/mL, odnosno 0,78-100 μ g/mL za klorogensku kiselinu i troloks (20 μ L odgovarajućeg otapala + 20 μ L ispitivanog uzorka). Potom je u svaku jažicu dodano po 50 μ L fosfatnog pufera koncentracije 0,2 M (pH = 6,6) te 50 μ L 1 %-tne otopine kalijevog heksacijanoferata(III), reakcijska smjesa je inkubirana dvadeset minuta u termostatu na 50 °C. Po isteku inkubacije u reakcijske smjese dodano je po 50 μ L 10 %-tne otopine trikloroetene kiseline te je smjesa ponovno inkubirana u trajanju od 10 minuta. Potom je 125 μ L bistrog supernatanta preneseno u odgovarajuću jažicu novog reda te pomiješano sa 125 μ L destilirane vode te 25 μ L 0,1 %-tne otopine željezovog(III) klorida. Apsorbancija dobivene zelenoplave otopine odmah je izmjerena u čitaču za mikrotitarske pločice na valnoj duljini od 700 nm, uz destiliranu vodu kao slijepu probu. Koncentracije

ispitivanih otopina koje su uzrokovale apsorbanciju od 0,5 koja odgovara 50 %-tnoj redukcijskoj sposobnosti (IC_{50}) dobivene su linearnom interpolacijom iz odnosa izmjerenih vrijednosti apsorbancija i pripadajućih koncentracija uzoraka.

3.3.3.4. Određivanje sposobnosti keliranja iona željeza(II)

Sposobnost etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Artemisia* i njihove sastavnice klorogenske kiseline, da keliraju ione željeza(II) određena je spektrofotometrijskom metodom prema metodi koju su opisali Vladimir-Knežević i sur. (146). U tu svrhu suhi ekstrakti i klorogenska kiselina otopljeni su u 70 %-tnom i 96 %-tnom etanolu te su serijskim razrjeđivanjem pripremljeni nizovi testiranih koncentracija u rasponu 12,5-400 $\mu\text{g/mL}$, odnosno od 3,125 do 100 $\mu\text{g/mL}$ za usporedno ispitani referentni kelator EDTA. U svaku epruvetu s 400 μl uzorka dodano je po 50 μL 2 mM otopine željezovog(II) klorida heksahidrata, smjesa je inkubirana pet minuta na sobnoj temperaturi. Potom je reakcija potaknuta dodatkom 200 μL 5 mM otopine ferozina. Ukupni volumen od 4 mL podešen je dodatkom 96 %-tnog etanola, zatim je sadržaj epruveta snažno pomiješan te je uslijedila desetominutna inkubacija u istim uvjetima. Apсорbancija ispitivanih otopina ružičaste boje izmjerena je na valnoj duljini od 562 nm, uz etanol kao slijepu probu. Sposobnost keliranja metalnih iona, odnosno inhibicije formiranja ferozin- Fe^{2+} kompleksa, izračunata je prema sljedećoj jednadžbi:

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

gdje A_0 predstavlja apsorbanciju kontrolne otopine bez uzorka dok A_1 predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine umanjenu za vrijednost apsorbancije samog uzorka.

3.3.4. Ispitivanje djelovanja na aktivnost odabranih enzima

3.3.4.1. Određivanje sposobnosti inhibicije α -amilaze

Sposobnost inhibicije enzima α -amilaze odabranih vrsta roda *Artemisia* određena je spektrofotometrijskom metodom prema metodi koju su opisali Sudha i sur.(154), uz manje modifikacije. Ispitivane otopine ekstrakata i klorogenske kiseline otopljenih u 10 %-tnom dimetil-sulfoksidu priređene su serijskim razrjeđivanjem u jažicama mikrotitarskih pločica u rasponu koncentracija 50-1600 $\mu\text{g/mL}$, dok je otopina referentnog antidijabetika akarboze priređena u rasponu koncentracija od 3,125 do 100 $\mu\text{g/mL}$. Prvotno je 25 μL uzorka pomiješano s ekvivalentnim volumenom otopine α -amilaze (2,5 U/mL) priređene u 10 mM PBS-u (pH = 7,4), smjesa je potom inkubirana na temperaturi od 37 °C tijekom deset minuta. Nakon isteka desetominutne inkubacije smjesi je dodano 25 μL 0,5 %-tne otopine škroba te je smjesa ponovno inkubirana u trajanju od petnaest minuta pri istim uvjetima. U sljedećem koraku dodano je 25 μL 0,1 M kloridne kiseline kako bi se zaustavila reakcija te ekvivalentan volumen 0,5 %-tne otopine joda u kalijevom jodidu (1:2). Kontrolna otopina, umjesto enzima sadržavala je ekvivalentan volumen 10 mM PBS-a, dok je akarboza korištena kao pozitivna kontrola. Apsorbancija je izmjerena odmah na valnoj duljini od 630 nm, te je izračunat postotak inhibicije α -amilaze prema sljedećoj jednadžbi:

$$\% \text{ inhibicije } \alpha - \text{amilaze} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

gdje A_0 predstavlja apsorbanciju kontrolne otopine bez enzima dok A_1 predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine umanjenu za vrijednost apsorbancije samog uzorka.

3.3.4.2. Određivanje sposobnosti inhibicije α -glukozidaze

Sposobnost inhibicije enzima α -glukozidaze za etanolne ekstrakte odabranih vrsta roda *Artemisia* određena je spektrofotometrijskom metodom prema metodi koju su opisali Mervić i sur. (153), uz manje modifikacije. U jažicama mikrotitarskih pločica pripremljeni su nizovi serijskih razrjeđenja ispitivanih etanolnih ekstrakata, klorogenske kiseline, rutina te referentnog antidijabetika akarboze otopljenih u 10 %-tnom dimetil-sulfoksidu tako da konačne koncentracije u reakcijskoj smjesi budu u rasponu koncentracija od 100 do 3200 $\mu\text{g/mL}$, odnosno 50-800 $\mu\text{g/mL}$ za referentne supstance. Prvotno je 100 μL ispitivanog uzorka pomiješano s 50 μL otopine α -glukozidaze koncentracije 1 U/mL priređene u 0,1 M fosfatnom puferu (pH = 6,8), smjesa je inkubirana deset minuta na temperaturi od 37 °C. U sljedećem

koraku dodano je 50 μL otopine supstrata 4-nitrofenil- α -glukopiranozida koncentracije 1,25 mM te je uslijedila petominutna inkubacija na sobnoj temperaturi. Kontrolna otopina umjesto uzorka sadržavala je ekvivalentan volumen otapala, dok je akarboza korištena kao pozitivna kontrola. Apsorbancija je izmjerena na valnoj duljini od 405 nm. Postotak inhibicije aktivnosti α -glukozidaze izračunat je prema sljedećoj jednadžbi:

$$\% \text{ inhibicije } \alpha - \text{glukozidaze} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

gdje A_0 predstavlja apsorbanciju kontrolne otopine bez uzorka dok A_1 predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine umanjenu za vrijednost apsorbancije samog uzorka.

3.3.4.3. Određivanje sposobnosti inhibicije enzima acetilkolinesteraze

Sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze odabranih vrsta roda *Artemisia* određena je spektrofotometrijskom metodom prema metodi koju su opisali Uddin i sur. (155), uz modifikacije. Ekstrakti vrsta roda *Artemisia*, klorogenska kiselina te referentni inhibitor galantamin otopljeni su u 10 %-tnom dimetil-sulfoksidu. Njihove ispitivane otopine priređene su serijskim razrjeđivanjem u rasponu koncentracija 25-1600 $\mu\text{g/mL}$, odnosno 0,156-5 $\mu\text{g/mL}$ za galantamin. Prvotno je 20 μL uzorka pomiješano s ekvivalentnim volumenom otopine acetilkolinesteraze (0,25 U/mL) priređene u Tris-HCl puferu koncentracije 50 mM (pH = 8,0). Potom je u jažice mikrotitarskih pločica dodano 120 μL pufera te je uslijedila inkubacija na sobnoj temperaturi u trajanju od petnaest minuta. Reakcija je pokrenuta dodatkom 40 μL supstrata 2,5 mM 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeve kiseline (DTNB) i 2,5 mM acetiltiokolin-jodida. Kontrolna otopina, umjesto uzorka, sadržavala je ekvivalentan volumen otapala, dok je galantamin korišten kao pozitivna kontrola. Apsorbancija je izmjerena na valnoj duljini od 405 nm nakon petnaestominutne inkubacije na sobnoj temperaturi, te je izračunat postotak inhibicije acetilkolinesteraze prema sljedećoj jednadžbi:

$$\% \text{ inhibicije acetilkolinesteraze} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

gdje A_0 predstavlja apsorbanciju kontrolne otopine koja je umjesto uzorka sadržavala ekvivalentnu količinu 10 %-tnog dimetil-sulfoksida dok A_1 predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine umanjenu za vrijednost apsorbancije samog uzorka.

3.3.5. Ispitivanje antiproliferativnog djelovanja na stanice humanog hepatocelularnog karcinoma (HepG2)

Za određivanje antiproliferativnog djelovanja ispitivanih vrsta *Artemisia*, klorogenske, 3,5-di-kaveoilkina kiseline i artemetina na stanice humanog hepatocelularnog karcinoma (HepG2) korišten je luminiscencijska metoda, uz primjenu CellTiter-Glo reagensa. Tumorske stanične linije su nakon odmrzavanja tijekom noći uzgojene u EMEM (engl. *Eagle's minimum essential medium*) mediju, uz 10% FBS (engl. *fetal bovine serum*) na 37 °C u struji zraka relativne vlažnosti 95% i 5% CO₂. Sljedeći dan, medij je izvučen aspiracijom te zamijenjen sa 100 µL svježeg medija. Ispitivani etanolni ekstrakti i njihove bioaktivne sastavnice otopljene su u 10 %-tnom DMSO-u. Ispitivane otopine priređene su serijskim razrjeđivanjem u rasponu koncentracija 3,125-400 µg/mL, odnosno 0,31-40 µM te 0,18-400 µM za referentne supstancije staurosporin i klorpromazin hidroklorid, te je dodano po 400 nL svake otopine u jažice mikrotitarske pločice. Potom je uslijedila 24-satna inkubacija. Vijabilnost stanica određena je dodavanjem 50 µL reagensa CellTiter-Glo po jažici: Nakon desetominutne inkubacije na sobnoj temperaturi izmjerena je luminiscencija na uređaju EnVision 2105.

3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Za statističku obradu dobivenih rezultata korišteni su računalni programi Microsoft Excel (Microsoft, Seattle, SAD) i GraphPad Prism 11.0.0 (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornija, SAD) te programski paketi Design Expert 8 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, Minnesota, SAD) i XLSTAT (Addinsoft, New York, NY, USA). Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Koncentracije ispitivanih uzoraka koje ostvaruju 50 %-tni učinak (IC_{50}) izračunate su na temelju ekstrapolacije pomoću linearne regresije, dok su razlike između dobivenih rezultata određene jednosmjernom analizom varijance (engl. *analysis of variance*, ANOVA) i Tukey post-hoc testom. Multivarijatna analiza dobivenih rezultata provedena je primjenom hijerarhijskog klasteriranja i metode glavnih komponenti (engl. *principal component analysis*, PCA). Razina značajnosti $p < 0,05$ smatrala se statistički značajnom razlikom za sve provedene statističke analize.

4 REZULTATI I RASPRAVA



4.1. FITOKEMIJSKI SASTAV ODABRANIH VRSTA RODA *Artemisia* L.

4.1.1. Sadržaj i kromatografski profil eteričnih ulja

4.1.1.1. Eterična ulja izolirana hidrodestilacijom

Sadržaj eteričnih ulja dobivenih iz cvatućih vršnih dijelova vrsta *A. abrotanum*, *A. absinthium*, *A. annua*, *A. maritima* i *A. vulgaris* određen je metodom hidrodestilacije prema propisu Europske farmakopeje za drogu Absinthii herba (2). Nakon trosatne destilacije, očitani je volumen izoliranog eteričnog ulja te je isti izražen u mL po kg biljne droge, a dobivene vrijednosti prikazane su u Tablici 8. Rezultati su ukazali na značajne razlike u sadržajima eteričnih ulja među istraživanim vrstama, a koji je bio u rasponu od 3 mL/kg do 34 mL/kg. Vrsta *A. annua* bila je najbogatija eteričnim uljem, dok je najmanje eteričnog ulja sadržavala vrsta *A. vulgaris*.

Tablica 8. Sadržaj eteričnog ulja u cvatućim vršnim dijelovima odabranih vrsta roda *Artemisia* L.

Biljna vrsta	Sadržaj eteričnog ulja (mL/kg)
<i>A. abrotanum</i>	12,50
<i>A. absinthium</i>	10,67
<i>A. annua</i>	34,00
<i>A. maritima</i>	16,67
<i>A. vulgaris</i>	3,00

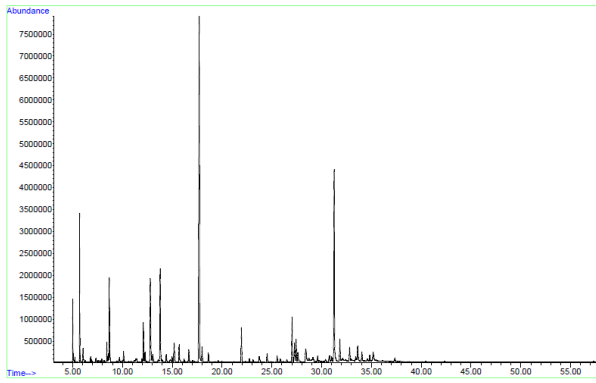
Kvalitativna i kvantitativna analiza eteričnih ulja provedena je u vezanom sustavu plinskog kromatografa spregnutog sa spektrometrom masa (GC-MS), uz ranije opisane uvjete u poglavlju 3.2.2.3. Karakteristični plinski kromatogrami eteričnih ulja dobivenih postupkom hidrodestilacije iz cvatućih vršnih dijelova odabranih vrsta roda *Artemisia* prikazani su na Slici 10. Identificirano je ukupno 98 sastavnica koje su činile od 81,06 % do 97,55 % pripadajućeg eteričnog ulja. Sastavnice su identificirane usporedbom njihovih masenih spektara s masenim spektrima u dostupnim bazama (NIST 2020, Wiley 12 i vlastita baza), literaturi (Adams, 2007) te temeljem linearnog retencijskog indeksa (RI) koji je izračunat za svaku odijeljenu sastavnicu. Rezultati GC-MS analize eteričnih ulja prikazani su u Tablicama 9 i 10. Eterična ulja ispitivanih vrsta roda *Artemisia* isticala su se sadržajem monoterpenskih sastavnica (66,18-91,62 %), dok su seskviterpeni bili prisutni u manjoj količini (3,74-23,15 %). Pojedina ulja sadržavala su također i fenilpropanske spojeve, masne kiseline i druge sastavnice.

Među monoterpenskim sastavnicama prevladavali su oksidirani monoterpeni (48,04-66,80 %), dok je monoterpenskih ugljikovodika bilo u rasponu od 8,31 % (*A. absinthium*) do 24,82 % (*A. annua*). U eteričnim uljima vrsta *A. maritima* i *A. vulgaris* najzastupljenija sastavnica bio je 1,8-cineol (24,04 % i 35,36 %), dok su se glavne sastavnice u ostalim uljima značajno razlikovale. Najzastupljenije sastavnice eteričnog ulja vrste *A. abrotanum* bili su piperiton (27,48 %) i davanon B (13,92 %). *Trans*-sabinil-acetat (19,46 %), *trans*-tujon (16,62 %) i *trans*-epoksiocimen (16,15 %) prevladavali su u vrsti *A. absinthium*, dok su artemizija keton (29,20 %) i kamfor (17,67 %) identificirani kao glavne sastavnice eteričnog ulja vrste *A. annua*. U eteričnom ulju vrste *A. maritima* bilo je najviše 1,8-cineola (24,04 %), fluoroacetofenon 2,4-dimetiletera (14,86 %) i borneola (13,61 %).

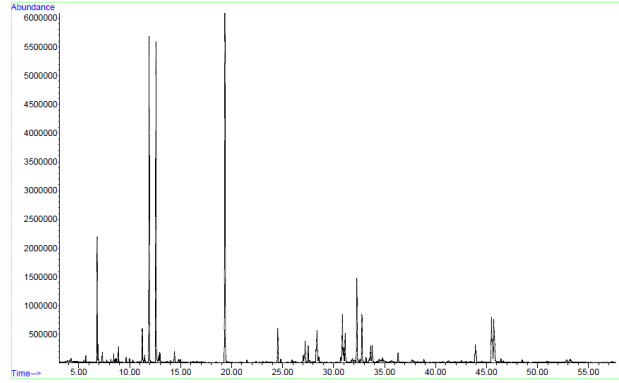
U odnosu na ostale ispitane vrste, eterično ulje vrste *A. vulgaris* najbogatije je seskviterpenima (23,15 %), među kojima su se udjelom isticali germakren D (5,98 %), kariofilen oksid (4,1 %) i α -selinen (3,39 %). Seskviterpenska frakcija je također bila značajno zastupljena u eteričnom ulju vrste *A. abrotanum* (22,14 %), u kojoj je bilo najviše davanona B (13,92 %). Vrsta *A. absinthium* sadržavala je 14,08 % seskviterpena, dok su eterična ulja izolirana iz vrsta *A. annua* i *A. maritima* sadržavale svega 5,54 % odnosno 3,74 % seskviterpenskih sastavnica.

Tablica 9. Udjeli (%) sastavnica u eteričnim uljima izoliranih hidrodestilacijom iz odabranih vrsta roda *Artemisia* L.

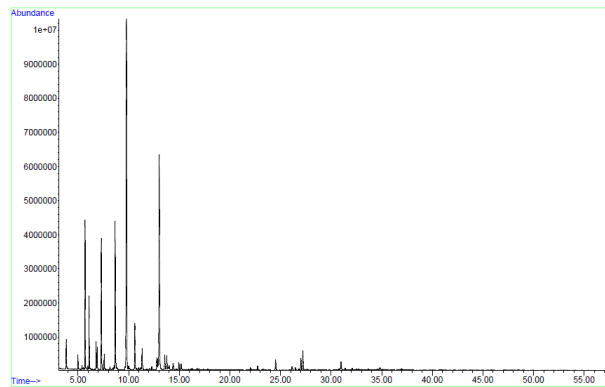
Sastavnice	<i>A. abrotanum</i>	<i>A. absinthium</i>	<i>A. annua</i>	<i>A. maritima</i>	<i>A. vulgaris</i>
Monoterpeni	66,71	66,18	91,62	72,37	67,61
ugljikovodici	10,53	8,31	24,82	9,79	19,57
oksidirani	56,18	58,57	66,80	62,58	48,04
Seskviterpeni	22,14	14,08	5,54	3,74	23,15
ugljikovodici	5,47	8,95	4,64	0,79	16,56
oksidirani	16,67	5,13	0,90	2,95	6,59
Fenilpropani	-	0,80	0,22	15,38	-
Ostalo	0,19	-	0,17	0,16	0,95
UKUPNO	89,04	81,06	97,55	91,65	91,71



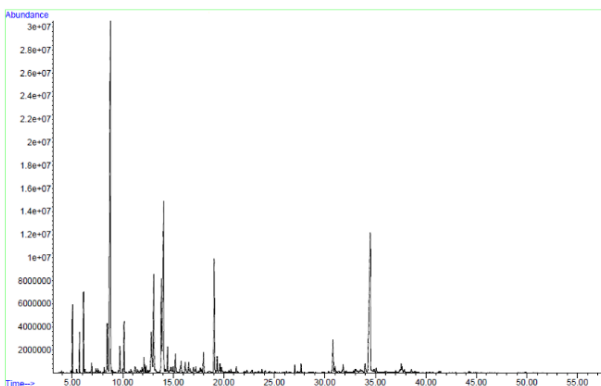
(a)



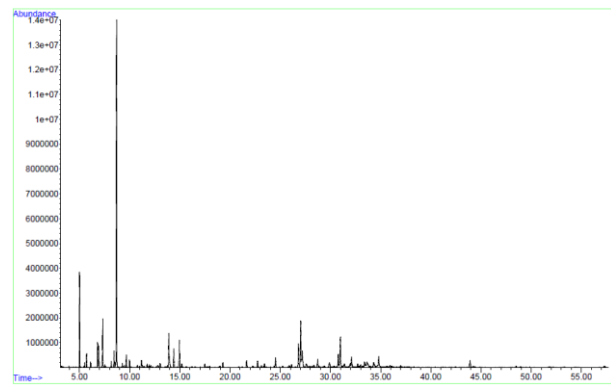
(b)



(c)



(d)



(e)

Slika 10. Plinski kromatogrami eteričnih ulja izoliranih hidrodestilacijom iz cvatućih vršnih dijelova odabranih vrsta roda *Artemisia*: *A. abrotanum* (a), *A. absinthium* (b), *A. annua* (c), *A. maritima* (d) i *A. vulgaris* (e)

Tablica 10. Usporedni sastav eteričnih ulja odabranih vrsta roda *Artemisia* L. izoliranih hidrodestilacijom

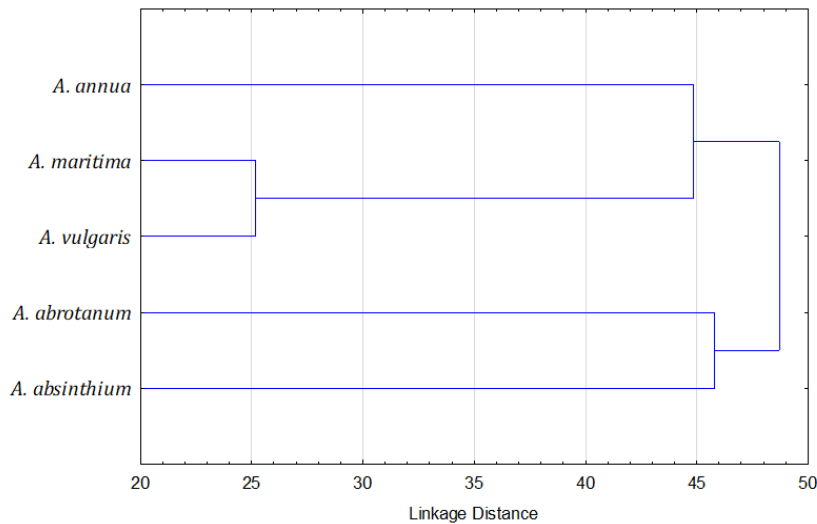
Sastavnica	RI	Udio (%)				
		<i>A. abrotanum</i>	<i>A. absinthium</i>	<i>A. annua</i>	<i>A. maritima</i>	<i>A. vulgaris</i>
Santolina trien	908	2,07	-	-	1,75	6,09
Tetrahidrofuran	915	0,19	-	-	-	-
Triciklen	922	-	-	0,17	0,10	-
α -Tujen	926	-	-	-	-	0,32
α -Pinen	933	5,94	0,21	7,64	1,15	0,96
2-Metilpropil-butanoat	943	-	-	0,17	-	-
α -Fenhen	945	0,43	-	-	-	-
Kamfen	947	-	-	3,86	2,47	0,4
Tuja-2,4(10)-dien	953	-	-	-	0,1	-
Sabinen	973	0,20	4,59	1,51	-	1,94
β -Pinen	976	-	0,73	1,29	0,52	2,03
Mircen	991	-	0,37	7,73	-	3,88
2,3-Dehidro-1,8-cineol	992	-	-	-	0,16	-
Yomogi alkohol	1001	-	-	0,93	-	-
α -Terpinen	1016	-	0,14	0,17	0,23	0,50
<i>p</i> -Cimen	1024	1,08	0,37	-	-	1,50
β -Felandren	1028	0,46	0,17	-	-	-
Limonen	1029	-	-	0,26	-	0,41
1,8-Cineol	1030	4,66	0,18	9,88	24,04	35,36
<i>cis</i> - β -Ocimen	1047	-	0,66	-	-	0,37
γ -Terpinen	1057	0,35	0,25	0,22	-	1,17
Artemizija keton	1061	-	-	29,20	-	-
<i>cis</i> -Sabinen hidrat	1067	-	0,17	0,19	0,15	0,68
Artemizija alkohol	1083	-	-	3,22	-	-
Terpinolen	1088	-	-	-	0,19	-
<i>trans</i> -Sabinen hidrat	1099	-	-	0,19	0,24	-
Linalol	1101	-	1,78	-	-	-
1,3,8- <i>p</i> -Mentatrien	1103	-	-	1,59	-	-
Nonanal	1105	-	-	-	0,12	0,95
<i>cis</i> -Tujon	1106	-	0,37	-	-	-
Okten-3-il-acetat	1113	-	-	-	-	0,29
<i>trans</i> -Tujon	1117	-	16,62	-	0,27	-
Dehidro-sabina keton	1121	2,44	-	-	-	-
<i>cis-p</i> -Ment-2-en-1-ol	1122	-	-	-	0,65	-
α -Kamfolenal	1126	0,73	-	0,24	0,30	-
<i>trans</i> -Epoksiocimen	1133	-	16,15	-	-	-
<i>trans</i> -Pinokarveol	1138	6,78	0,37	0,92	2,94	-

2-Metil-6-metilen-1,7-oktadien-3-on	1140	-	-	0,72	-	-
Kamfor	1143	0,65	-	17,67	4,92	0,53
Ocimenol	1157	-	-	1,17	-	-
Pinokarvon	1162	6,29	-	1,20	4,88	-
Borneol	1164	-	-	-	13,61	4,89
Mentol	1172	-	-	-	0,14	-
Terpinen-4-ol	1177	0,47	0,66	0,54	1,14	1,99
α -Terpineol	1190	0,37	-	0,56	0,26	2,98
Mirtenol	1196	1,61	-	0,55	0,95	0,47
Verbenon	1210	-	-	-	0,55	-
<i>trans</i> -Karveol	1219	-	-	-	0,55	-
Bornil-formijat	1227	-	-	-	0,50	-
<i>cis</i> -Karveol	1231	-	-	-	0,21	-
Kumin aldehid	1238	-	-	-	0,36	-
Karvon	1243	-	-	-	0,29	-
Piperiton	1254	27,48	-	-	0,30	-
Nordavanon	1255	0,90	-	-	-	-
<i>cis</i> -Krizantenil-acetat	1261	1,01	-	-	0,89	-
<i>cis</i> -Verbenil-acetat	1276	0,60	-	-	-	-
Bornil-acetat	1286	-	-	-	5,68	0,33
Lavandulil-acetat	1292	-	-	-	-	0,52
<i>trans</i> -Sabinil-acetat	1293	-	19,46	-	0,77	-
Karvakrol	1303	-	-	-	0,16	-
Mirtenil-acetat	1325	-	-	-	0,15	-
<i>trans</i> -Karvil-acetat	1338	-	-	-	0,26	-
α -Longipinen	1348	-	-	-	-	0,80
<i>cis</i> -Krizantenil-propionat	1354	2,19	-	-	-	-
Eugenol	1357	-	-	0,22	-	-
α -Kopaen	1374	-	-	0,37	-	0,75
β -Elemen	1390	-	-	-	-	0,53
<i>trans</i> -Jasmon	1398	-	-	-	0,16	-
<i>trans</i> - β -Kariofilen	1417	0,63	1,97	0,92	-	1,24
Lavandulil-izobutirat	1424	-	0,17	-	-	-
<i>trans</i> - β -Farnezen	1456	-	-	0,31	-	-
Artemizija trien	1465	-	-	0,20	-	-
α -Selinen	1473	-	-	-	-	3,39
Germakren D	1478	3,04	-	1,10	0,37	5,98
γ -Muurolen	1479	-	0,40	-	-	-
α -Neokalitropsen	1481	-	-	-	-	0,59
β -Selinen	1483	-	1,58	1,74	-	2,42
Krizantenil-2-metil-butanoat	1485	1,39	-	-	-	-
Ciklofenhen	1491	-	0,82	-	-	-
Biciklogermakren	1494	0,79	-	-	0,42	-

Lavandulil-2-metil-butanoat	1510	-	0,74	-	-	-
Davana eter	1513	1,47	-	-	-	-
δ-Kadinen	1521	-	-	-	-	0,86
Fragranil-2-metil-butirat	1572	-	0,35	-	-	-
Spatulenol	1575	-	3,09	-	1,75	1,87
Kariofilen oksid	1580	-	0,91	0,90	0,37	4,10
Neril-3-metil-butanoat	1584	-	1,71	-	-	-
Kopaborneol	1601	-	-	-	0,47	-
Davanon B	1602	13,92	-	-	-	-
Humulen epoksid II	1606	-	-	-	-	0,62
3,6-Dihidrokamazulen	1614	-	5,00	-	-	-
Eudesma-2,4,11-trien	1628	1,01	-	-	-	-
Kariofiladienol I	1633	-	0,33	-	0,08	-
2,3,4-Trimetil-5-fenil-ciklopentadien	1647	-	0,21	-	-	-
α-Eudesmol	1650	1,28	-	-	-	-
Fluoroacetofenon 2,4-dimetileter	1674	-	-	-	14,86	-
β-Kostol	1763	-	-	-	0,28	-
Geranil- <i>p</i> -cimen	1952	-	0,59	-	-	-

RI-retencijski indeks na HP-5 MS koloni

S ciljem određivanja kemotaksonomskih odnosa između ispitivanih vrsta roda *Artemisia* prema sastavu eteričnih ulja, rezultati GC-MS analize hidrodestiliranih ulja podvrgnuti su hijerarhijskoj klsterskoj analizi. Za klstersku analizu korištena je matrica sličnosti izračunana primjenom Bray-Curtisovog indeksa, uz metodu povezivanja po prosjeku grupa (engl. *unweighted pair group method with arithmetic mean*, UPGMA). Na temelju dobivenog dendrograma prikazanog na Slici 11 vidljivo je da se prema sastavu eteričnog ulja mogu uočiti jasni obrasci sličnosti među ispitanim vrstama roda *Artemisia*. Najizraženija sličnost prisutna je između vrsta *A. vulgaris* i *A. maritima*, koje se grupiraju na najnižoj razini udaljenosti (~ 25). To upućuje na visok stupanj podudarnosti sastava. Vrsta *A. annua* se toj skupini pridružuje na većoj udaljenosti (~ 45), što ukazuje na umjerenu sličnost, ali i na određene specifičnosti u njezinom fotokemijskom profilu. S druge strane, vrste *A. absinthium* i *A. abrotanum* tvore zaseban klster (~ 46), zbog međusobne sličnosti, ali se i jasno diferenciraju u odnosu na prethodnu skupinu. Na najvišoj razini hijerarhije (~ 49) dolazi do spajanja dviju glavnih skupina. Prvoj skupini pripadaju *A. vulgaris*, *A. maritima* i *A. annua*, dok vrste *A. abrotanum* i *A. absinthium* čine drugu skupinu koja pokazuje izraženu odvojenost od prve skupine.

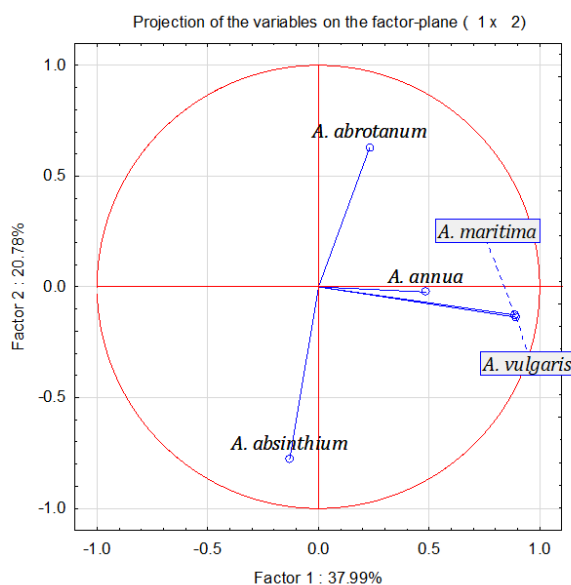


Slika 11. Dendrogram klaster analize udjela sastavnica eteričnih ulja odabranih vrsta roda *Artemisia* L.

Ukupno gledano, navedeni rezultati pokazuju da je sastav eteričnih ulja dobar diskriminacijski kriterij za razlikovanje vrsta unutar roda *Artemisia*, pri čemu se izdvajaju skupine vrsta sa sličnim kemijskim profilima koje mogu odražavati srodnost, ekološke prilagodbe ili biokemijske putove sinteze sekundarnih metabolita. Stoga su eterična ulja istraživanih vrsta roda *Artemisia* dodatno podvrgnuta i analizi glavnih komponenti (engl. *principal component analysis*, PCA) korištenjem Bray-Curtis matrice sličnosti. Dobiveni rezultati analize prikazani su na Slici 12. PCA dijagram daje uvid u međusobne odnose fitokemijskih profila eteričnih ulja analiziranih vrsta roda *Artemisia*. Projekcija varijabli na faktorsku ravninu grafički pokazuje odnose između izvornih varijabli i glavnih komponenti odnosno faktora. Prve dvije glavne komponente objašnjavaju približno 58,77 % ukupne varijabilnosti (F1: 37,99 %; F2: 20,78 %), što je dovoljno za pouzdanu interpretaciju osnovnih obrazaca.

Na PCA dijagramu vidljivo je da se vrste *A. vulgaris* i *A. maritima* nalaze u neposrednoj blizini na pozitivnoj strani prve komponente, čime pokazuju da imaju vrlo sličan sastav eteričnog ulja, s 1,8-cineolom kao glavnom sastavnicom, te potvrđuju rezultate dobivene klaster analizom. Vrsta *A. annua* je također na pozitivnoj strani F1, ali bliže centru, što ukazuje na umjerenu sličnost s prethodne dvije vrste, ali i na određene razlike. Naime, njezino eterično ulje bogato je artemizija ketonom i kamforom. Vrsta *A. abrotanum* se izdvaja prema pozitivnom F2, predstavljajući zasebniji kromatografski profil sa specifičnim sastavnicama koje ga razlikuju od ostalih vrsta, a to su piperiton i davanon B. Vrsta *A. absinthium* je jasno odvojena prema

negativnom F2, što ukazuje na značajno različit sastav eteričnog ulja. Ova se vrsta najviše razlikuje od ostalih analiziranih biljnih vrsta s eteričnim uljem u kojem prevladavaju *trans*-tujon, *trans*-epoksicimen i *trans*-sabinil-acetat. Naše istraživanje je pokazalo da su rezultati klusterske i PCA analize međusobno konzistentni te ukazuju na postojanje dviju glavnih skupina ispitivanih vrsta roda *Artemisia*, s definiranim razlikama u kemijskom sastavu eteričnih ulja. PCA analiza jasno je izdvojila jednu skupinu koju čine vrste *A. vulgaris*, *A. maritima* i *A. annua*, dok se specifičnim fitokemijskim profilima izdvajaju vrste *A. abrotanum* i *A. absinthium*.



Slika 12. Rezultati PCA analize sastava eteričnih ulja odabranih vrsta roda *Artemisia* L.

Profil eteričnih ulja ispitivanih vrsta roda *Artemisia* dobivenih hidrodestilacijom u skladu je s rezultatima prethodnih istraživanja zbog visokog udjela oksidiranih oblika monoterpena. (28, 29, 34, 47, 57, 67). Prema našem saznanju, u okviru ovog rada, po prvi puta je provedena usporedna analiza kromatografskih profila eteričnih ulja odabranih vrsta roda *Artemisia*. Rezultati ukazuju na značajne međusobne razlike te su u skladu s prethodnim znanstvenim istraživanjima za pojedine vrste. Eterično ulje vrste *A. abrotanum* pokazalo se najbližijim eteričnom ulju iz Litve koje u kojem je također prevladavao piperiton (20,38-38,48 %) te austrijskom eteričnom ulju koje je bilo bogato derivatom davanona (22,5 %), *cis*-davanonom (5,2 %) i davana eterom (3,2 %) (29, 34). No, naše eterično ulje značajno se razlikovalo od talijanskog i srpskog eteričnog ulja iz nadzemnih dijelova *A. abrotanum* (31, 36). Profil testiranog eteričnog ulja vrste *A. absinthium*, s visokim udjelima *trans*-sabinil-acetata (19,46 %), *trans*-tujona (16,62 %) i (E)-epoksi-ocimena (16,15 %) bio je vrlo sličan eteričnim uljima

gorkog pelina s područja Europe (29, 38, 45). Profil ispitanog eteričnog ulja vrste *A. annua* bio je najbliži talijanskim eteričnim uljima iz cvatućih vršnih i nadzemnih dijelova, u kojima je bilo najviše artemizija ketona (12,5–24,3 %), kamfora (16,9–25,2 %) i 1,8-cineola (15,8–22,1 %) (53-58). U nekim drugim eteričnim uljima iz nadzemnih dijelova, poput onih iz Srbije (156, 157), Bosne i Hercegovine (48), Maroka (64) i Kine (59), artemizija keton bio je glavna sastavnica, uz α -pinen, kamfor ili β -kariofilen. Nasuprot tome, iranski (52), brazilski (dobiveno iz listova) (49) i rumunjski (66) uzorci eteričnog ulja nisu sadržavali artemizija keton kao glavnu sastavnicu, nego 1,8-cineol i kamfor. Pregledom dostupne literature utvrđeno je nekoliko kemotipova ovisno o udjelima kamfora, 1,8-cineola, artemizija ketona i germakrena D (158). Uvidom u znanstvenu literaturu, utvrđeno je da su do sada provedena ispitivanja kromatografskog profila eteričnog ulja vrste *A. maritima* jedino iz Indije i Pakistana. Naši rezultati su u skladu s navedenim istraživanjima budući da su ta eterična ulja sadržavala također visoke udjele 1,8-cineola (23,8-44,22 %). Naši rezultati za vrstu *A. vulgaris* odgovarali su objavljenim rezultatima za srpske i kineske uzorke eteričnog ulja iz nadzemnih dijelova budući da su kao glavnu sastavnicu sadržavali 1,8-cineol (0,3-28,9 %), α -tujen i sabinen (45, 77). Suprotno tome, eterično ulje vrste *A. vulgaris* s područja Francuske i Hrvatske, osim 1,8-cineola, sadržavalo je i visoke udjele borneola (8,9-27 %), kariofilen oksida (8,7 %), *trans*-krizantenil-acetata (16,3-24,6 %) i β -tujona (20,8 %) (72), dok su indijski uzorci bili bogati kamforom (73-75).

4.1.1.2. Eterična ulja izolirana parnom destilacijom pri atmosferskom tlaku

Dosadašnja istraživanja ukazuju da eterična ulja vrsta roda *Artemisia* uveliko doprinose njihovim biološkim učincima, međutim, treba uzeti u obzir da kemijski sastav eteričnih ulja može znatno varirati. Geografski položaj i stanište na kojem biljka raste, vrijeme berbe, uvjeti sušenja te metoda ekstrakcije imaju velik utjecaj na fitokemijski profil biljke, a samim time i na njezinu biološku aktivnost (6, 159). Stoga je po prvi put u sklopu ovog istraživanja za sve odabrane vrste roda *Artemisia*, u usporedbi s hidrodestilacijom, provedena izolacija eteričnog ulja parnom destilacijom pri atmosferskom tlaku. Primijenjena je metoda opisana u poglavlju 3.2.2.1. Nakon trosatne destilacije, u aparaturi za parnu destilaciju pri atmosferskom tlaku pare očitan je volumen izoliranog eteričnog ulja te je isti izražen u mL/kg, a dobivene vrijednosti prikazane su u Tablici 11. Rezultati su ukazali na razlike u sadržajima eteričnih ulja među ispitivanim vrstama roda *Artemisia*, a koji je bio u širokom rasponu od 1 do 5 mL/kg. Vrsta *A. annua* bila je najbogatija eteričnim uljem, dok je najmanje ulja sadržavala vrsta *A. vulgaris*. U

usporedbi s metodom hidrodestilacije, sadržaji eteričnih ulja dobiveni parnom destilacijom pri atmosferskom tlaku bili su višestruko manji.

Tablica 11. Sadržaj eteričnog ulja izoliranog parnom destilacijom iz odabranih vrsta roda *Artemisia* L.

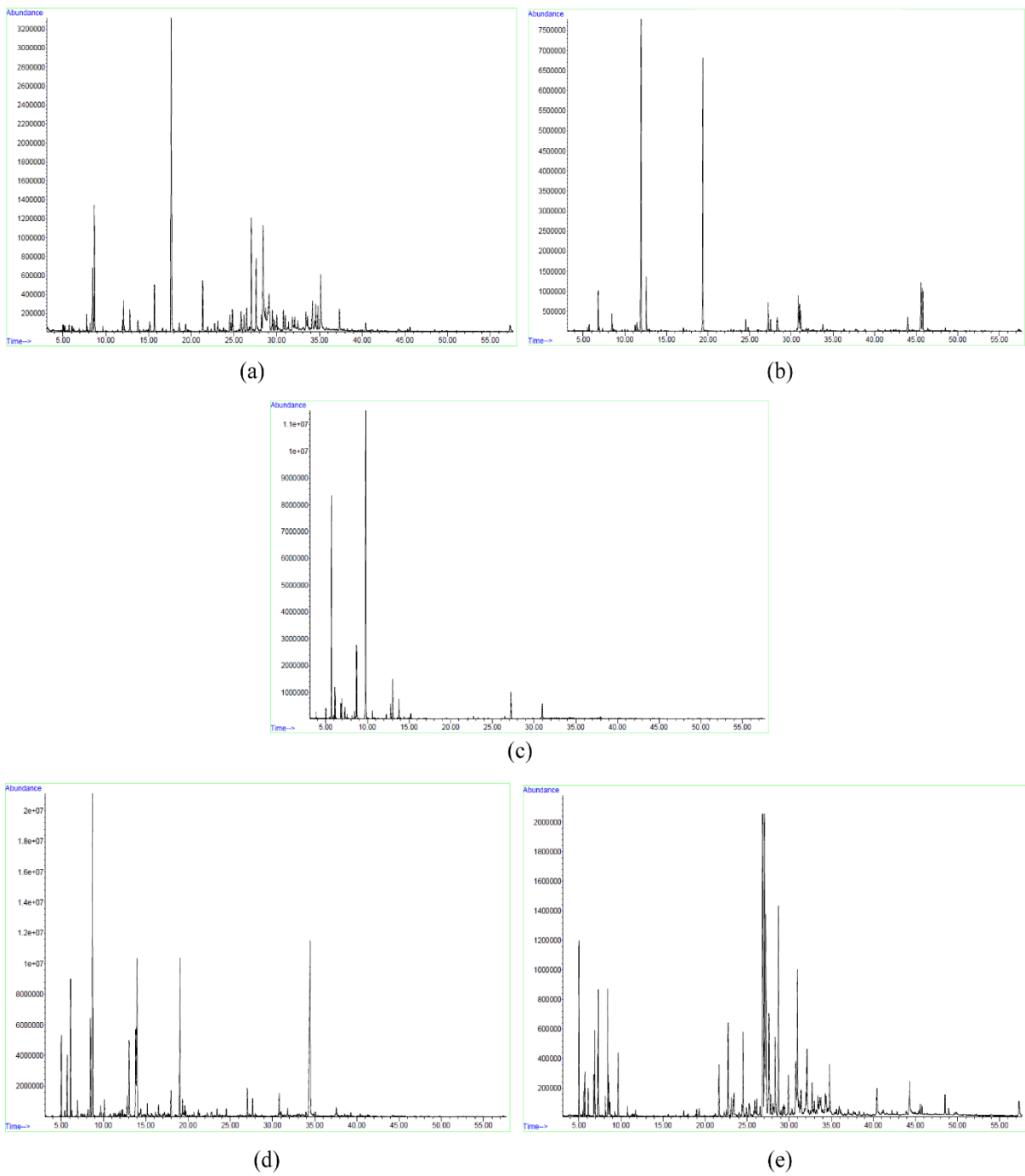
Biljna vrsta	Sadržaj eteričnog ulja (mL/kg)
<i>A. abrotanum</i>	1,33
<i>A. absinthium</i>	2,60
<i>A. annua</i>	5,00
<i>A. maritima</i>	3,75
<i>A. vulgaris</i>	1,00

Kvalitativna i kvantitativna analiza eteričnih ulja izoliranih parnom destilacijom provedena je u vezanom sustavu plinskog kromatografa spregnutog sa spektrometrom masa (GC-MS). Karakteristični plinski kromatogrami eteričnih ulja prikazani su na Slici 13. Identificirano je ukupno 107 sastavnica koje su činile od 89,03 % do 96,42 % pripadajućeg eteričnog ulja. Sastavnice su identificirane usporedbom njihovih masenih spektara s masenim spektrima u dostupnim bazama (NIST 2020, Wiley 12 i vlastita baza), literaturi (Adams, 2007), te temeljem linearnog retencijskog indeksa (RI) koji je izračunat za svaku odijeljenu sastavnicu, a rezultati su prikazani u Tablicama 12 i 13. Eterična ulja vrsta *A. absinthium*, *A. annua* i *A. maritima* isticala su se udjelima monoterpenskih sastavnica (37,68-88,13%), dok su seskviterpeni bili prisutni u manjoj količini. Suprotno tome, eterična ulja vrsta *A. abrotanum* i *A. vulgaris* karakterizirale su značajno veće seskviterpenske frakcije (49,37-76,50 %) te mali udjeli neterpenskih sastavnica poput fenilpropana i masnih kiselina. Kao u hidrodestiliranim eteričnim uljima, i u onima izoliranim parnom destilacijom sadržajem su se isticali oksidirani monoterpeni (31,72-68,65 %), dok su udjeli monoterpenskih ugljikovodika bili između 4,92 % (*A. absinthium*) i 26,79 % (*A. annua*), uz iznimku vrste *A. vulgaris* u kojoj nisu detektirani oksidirani oblici monoterpena. Među analiziranim eteričnim uljima zabilježene su značajne razlike u udjelima seskviterpenske frakcije (6,64-76,50 %). U vrstama *A. abrotanum* i *A. absinthium* prevladavali su oksidirani seskviterpeni (6,85-30,89 %), dok su u vrstama *A. annua*, *A. maritima* i *A. vulgaris* prevladavali ugljikovodici (4,05-61,37 %).

Eterična ulja su se međusobno razlikovala i prema glavnim sastavnicama. Najzastupljenija sastavnica eteričnog ulja *A. abrotanum* bio je oksidirani monoterpen piperiton (18,9 %), a u vrste *A. absinthium trans*-tujon (29,46 %). Artemizija keton (42,04 %) prevladavao je u eteričnom ulju vrste *A. annua*, dok je eterično ulje vrste *A. maritima* sadržavalo najviše fenilpropana floroacetofenon 2,4-dimetiletera (20,20 %). Seskviterpenski ugljikovodik α -selinen (15,30 %) bio je glavna sastavnica eteričnog ulja vrste *A. vulgaris*. Ostale zastupljenije sastavnice bile su redom: *trans*-sabinil-acetat (27,25 %, *A. absinthium*), α -pinen (17,78 %, *A. annua*), 1,8-cineol (16,85 %, *A. maritima*), davana eter (13,04 %, *A. abrotanum*) te germakren D (12,16 %, *A. vulgaris*).

Tablica 12. Udjeli (%) sastavnica u eteričnim uljima izoliranim parnom destilacijom iz odabranih vrsta roda *Artemisia* L.

Sastavnice	<i>A. abrotanum</i>	<i>A. absinthium</i>	<i>A. annua</i>	<i>A. maritima</i>	<i>A. vulgaris</i>
Monoterpeni	30,68	73,57	88,13	69,23	16,83
ugljikovodici	5,96	4,92	26,79	15,17	16,83
oksidirani	31,72	68,65	61,34	54,11	0,00
Seskviterpeni	49,37	13,45	6,64	6,73	76,50
ugljikovodici	18,48	6,60	4,38	4,05	61,37
oksidirani	30,89	6,85	2,26	2,56	15,13
Fenilpropani	2,53	1,64	-	20,20	-
Ostalo	0,60	0,37	0,27	0,26	2,43
UKUPNO	90,18	89,03	95,04	96,42	94,06



Slika 13. Karakteristični plinski kromatogrami eteričnih ulja izoliranih parnom destilacijom iz cvatućih vršnih dijelova vrsta: *A. abrotanum* (a), *A. absinthium* (b), *A. annua* (c), *A. maritima* (d) i *A. vulgaris* (e)

Tablica 13. Usporedni pregled sastava eteričnih ulja izoliranih parnom destilacijom iz odabranih vrsta roda *Artemisia* L.

Sastavnica	RI	Udio (%)				
		<i>A. abrotanum</i>	<i>A. absinthium</i>	<i>A. annua</i>	<i>A. maritima</i>	<i>A. vulgaris</i>
Santolina trien	908	-	-	-	2,21	3,08
Triciklen	922	-	-	0,11	0,17	-
α -Tujen	926	-	0,20	0,20	-	0,47
α -Pinen	933	-	0,41	17,78	1,84	0,87
2-Metilpropil-butanoat	943	-	-	0,27	-	-
α -Fenhen	945	-	-	-	-	-
Kamfen	947	-	-	2,55	4,50	0,59
Tuja-2,4(10)-dien	953	-	-	-	0,20	-
Sabinen	973	-	2,57	1,25	-	0,91
β -Pinen	976	-	0,31	1,84	0,52	1,95
Mircen	991	-	0,18	1,11	-	2,86
2,3-Dehidro-1,8-cineol	992	-	-	-	0,16	-
Mesitilen	995	-	-	-	0,09	-
Yomogi alkohol	1001	-	-	0,39	-	-
α -Felandren	1005	0,67	-	-	0,09	-
α -Terpinen	1016	-	-	0,31	0,35	0,49
<i>p</i> -Cimen	1024	2,70	1,25	0,72	4,26	3,14
β -Felandren	1028	1,47	-	-	-	-
Limonen	1029	-	-	0,23	-	0,78
1,8-Cineol	1030	-	-	7,47	16,85	-
γ -Terpinen	1057	-	-	0,42	0,60	1,70
Artemizija keton	1061	-	-	42,04	-	-
<i>cis</i> -Sabinen hidrat	1067	-	-	-	0,13	-
Artemizija alkohol	1083	-	-	0,81	-	-
Terpinolen	1088	-	-	-	0,19	-
Linalol	1101	-	0,66	-	0,24	-
Nonanal	1105	-	-	-	0,12	-
<i>cis</i> -Tujon	1106	-	0,73	-	-	-
<i>trans</i> -Tujon	1117	0,48	29,46	-	0,25	-
<i>cis-p</i> -Ment-2-en-1-ol	1122	1,39	-	-	0,27	-
α -Kamfolenal	1126	0,73	-	0,47	0,36	-
<i>trans</i> -Epoksiocimen	1133	-	4,87	-	-	-
<i>trans</i> -Pinokarveol	1138	1,12	-	1,79	1,34	-
Kamfor	1143	-	-	4,89	3,75	-
Pinokarvon	1162	0,76	-	2,46	5,60	-
Borneol	1164	-	-	-	9,94	-
Mentol	1172	-	-	-	0,16	-
Terpinen-4-ol	1177	-	-	0,29	0,46	-

α -Terpineol	1190	-	-	-	0,10	-
Mirtenol	1196	-	-	0,73	0,71	-
<i>trans</i> -Piperitol	1208	2,65	-	-	0,07	-
<i>trans</i> -Karveol	1219	-	-	-	0,30	-
Bornil-formijat	1227	-	-	-	0,59	-
<i>cis</i> -Karveol	1231	-	-	-	0,16	-
Kumin aldehid	1238	-	0,40	-	0,18	-
Karvon	1243	-	-	-	0,21	-
Piperiton	1254	18,09	-	-	0,16	-
<i>cis</i> -Kkrizantenil-acetat	1261	-	-	-	1,22	-
<i>cis</i> -Verbenil-acetat	1276	-	-	-	0,08	-
Bornil-acetat	1286	-	-	-	8,67	-
<i>trans</i> -Sabinil-acetat	1293	-	27,25	-	0,85	-
Karvakrol	1303	-	-	-	0,22	-
Mirtenil-acetat	1325	-	-	-	0,21	-
<i>trans</i> -Karvil-acetat	1338	-	-	-	0,35	-
Piperitenon	1341	2,75	-	-	0,15	-
α -Longipinen	1348	-	-	-	-	1,82
<i>cis</i> -Krizantenil-propionat	1354	2,19	-	-	-	-
Eugenol	1357	-	-	-	-	-
α -Kopaen	1374	-	-	0,33	0,39	3,09
β -Burbonen	1383	0,58	-	-	-	0,70
β -Kubeben	1388	-	-	-	-	0,52
β -Elemen	1390	-	-	-	0,43	0,74
<i>trans</i> -Jasmon	1398	-	-	-	0,13	-
<i>trans</i> - β -Kariofilen	1417	1,24	1,19	0,92	0,41	3,01
Lavandulil-izobutirat	1424	0,91	0,33	-	-	-
<i>trans</i> - β -Farnezen	1456	1,06	-	0,31	-	-
Artemizija trien	1465	1,54	-	0,35	-	-
α -Selinen	1473	-	-	-	-	15,30
Germakren D	1478	6,60	-	-	1,46	12,16
γ -Muurolen	1479	-	-	-	-	-
β -Selinen	1483	-	3,55	3,70	0,19	8,26
Ciklofenhen	1491	-	1,20	-	-	-
δ -Selinen	1492	-	-	-	-	4,66
Biciklogermakren	1494	4,81	-	-	0,99	-
α -Muurolen	1498	-	-	-	-	0,58
(E,E)-Germakra-3,9,11-trien	1502	-	-	-	0,11	-
Lavandulil-2-metil-butanoat	1510	-	1,25	-	-	-
γ -Kadinen	1511	-	-	-	-	3,27
Lavandulil izovalerat	1512	-	1,19	-	-	-
Davana eter	1513	13,04	-	-	-	-
δ -Kadinen	1521	1,74	-	-	0,07	7,27
Davana eter 2	1527	1,86	-	-	-	-

Italicen eter	1532	3,34	-	-	-	-
Lacinata furanon E	1548	0,60	-	-	-	-
Izospatulanol	1552	-	-	-	-	1,77
Fragranil-2-metil-butirat	1572	1,25	0,24	-	-	-
Spatulanol	1575	-	3,96	-	1,30	3,04
Kariofilen oksid	1580	1,10	2,89	2,26	0,31	5,59
Neril-3-metil-butanoat	1584	-	2,05	-	-	-
Salvial-4(14)-en-1-on	1591	-	-	-	-	0,96
Kopaborneol	1601	-	-	-	0,50	-
Davanon B	1602	5,31	-	-	-	-
Humulen epoksid II	1606	-	-	-	-	0,75
3,6-Dihidrokamazulen	1614	-	0,25	-	-	-
1-Epi-kubenol	1626	-	-	-	-	1,06
Eudesma-2,4,11-trien	1628	-	-	-	-	-
Kariofiladienol I	1633	-	-	-	0,11	-
epi- α -Muurool	1640	-	-	-	0,11	-
2,3,4-Trimetil-5-fenil-ciklopentadien	1647	-	-	-	0,11	-
α -Eudesmol	1650	1,28	0,66	-	-	-
Germakra-4(15),5,10(14)-trien-1 α -ol	1665	2,53	-	-	-	-
Fluoroacetofenon 2,4-dimetileter	1674	1,59	-	-	20,20	-
α -Bisabolol	1683	1,54	-	-	-	1,96
β -Kostol	1763	-	-	-	0,12	-
6,10,14-Trimetil-2-pentadekanon	1810	-	-	-	0,14	-
n-Heksadekanoična kiselina	1844	-	-	-	-	1,71
Geranil- <i>p</i> -cimen	1952	-	1,64	-	-	-
Heneikozan	1963	-	0,37	-	-	0,73

RI-retencijski indeks na HP-5 MS koloni

U odnosu na hidrodestilirana ulja, najveće promjene dogodile su se pri parnoj destilaciji eteričnog ulja vrsta *A. abrotanum* i *A. vulgaris* kada su se 2-4 puta smanjili udjeli monoterpenske frakcije u korist prinosa seskviterpena (2-4 puta). U vrsti *A. annua* zabilježen je isti trend, ali su promjene bile manje značajne. U eteričnim uljima vrsta *A. absinthium* i *A. maritima* dobivenih parnom destilacijom došlo je do blagog povećanja monoterpena, uz istovremeno smanjenje seskviterpena (Tablica 12).

Eterično ulje vrste *A. vulgaris* dobiveno parnom destilacijom sastavom se značajno razlikovalo od ostalih ispitivanih vrsta, ali i od samog eteričnog ulja izoliranog hidrodestilacijom. Glavna sastavnica hidrodestiliranog eteričnog ulja bio je 1,8-cineol (35,36 %). U eteričnom ulju izoliranom parnom destilacijom značajno se povećao udio α -, β - i δ -selinena, germakrena D i δ -kadinena, dok 1,8-cineol nije detektiran. Jednako tako došlo je i do

promjene glavnih sastavnica u eteričnom ulju vrste *A. maritima*. U hidrodestiliranom eteričnom ulju prevladavali su 1,8-cineol, borneol i floroacetofenon 2,4-dimetileter, dok je u parnoj destilaciji došlo do potpunog gubitka borneola i velikog smanjenja 1,8-cineola, dok se značajno povećao udio floroacetofenon 2,4-dimetiletera (20,20 %) i bornil-acetata. Artemizija keton i kamfor su prevladavali u hidrodestiliranom eteričnom ulju vrste *A. annua*. Parnom destilacijom se značajno povećao udio artemizija ketona (42,04 %), a smanjio udio kamfora. Istovremeno se jako povećao udio α -pinena (17,78 %). Parnom destilacijom dobiveno eterično ulje vrste *A. absinthium* imalo je više *trans*-tujona (29,46 %) i *trans*-sabinil-acetata (27,25 %) manje *trans*-epoksiocimena koji su identificirani kao glavne sastavnice hidrodestiliranog eteričnog uja. U postupku parne destilacije, u eteričnom ulju vrste *A. abrotanum* značajno se smanjio udio piperitona (18,09 %) i davanona B, dok se udio davana etera povećao. Rezultati ovog usporednog istraživanja pokazali su da primjena različitih metoda destilacije značajno utječe na prinos i kromatografski profil eteričnog ulja vrsta roda *Artemisia*.

4.1.1.3. Optimizacija ekstrakcije isparljivih terpena superkritičnim ugljikovim dioksidom (sc-CO₂) iz cvatućih vršnih dijelova vrste *A. annua* L.

Ekstrakcija superkritičnim fluidima (engl. *supercritical fluid extraction*, SFE) jedna je od naprednih i perspektivnih tehnika koja pobuđuje veliki interes, kako znanstvene zajednice tako i industrije, budući da je izrazito ekološki prihvatljiva, učinkovita i selektivna. Ova metoda ima prednosti zbog svojih „zelenih“ svojstava i blažih temperaturnih uvjeta, a istodobno omogućuje selektivnost i učinkovitost zahvaljujući svojstvima superkritičnog fluida. SFE koristi poboljšanu difuzivnost i nisku viskoznost superkritičnog fluida, što omogućuje učinkovitu ekstrakciju analita iz složenih matriksa, u tu svrhu najčešće se koristi superkritični ugljikov dioksid (sc-CO₂) obzirom da je nezapaljiv, niskotoksičan, jeftin i lako se uklanja iz ekstrakta. Sustav recikliranja CO₂ u SFE procesu povezan je s nižim troškovima i manjim utjecajem na okoliš, u skladu s načelima zelene kemije (160, 161).

Optimizacija ekstrakcije isparljivih terpena iz cvatućih vršnih dijelova vrste *A. annua*, superkritičnim ugljikovim dioksidom (sc-CO₂), provedena je primjenom potpunog faktorskog dizajna (engl. *Full Factorial Design*) s dva čimbenika: tlaka (100-220 bar) i temperature (40-60 °C). Tijekom ekstrakcije kontinuirani protok superkritičnog CO₂ iznosio je 50 g/min, dok je zadano vrijeme ekstrakcije bilo 30 minuta. Redoslijed ekstrakcija pri zadanim uvjetima tlaka i temperature uz konstantan protok određen je uz pomoć softverskog programa Design Expert 8. Prinos sc-CO₂ ekstrakata u ovisnosti o tlaku i temperaturi prikazan je u Tablici 14. Vrijednosti

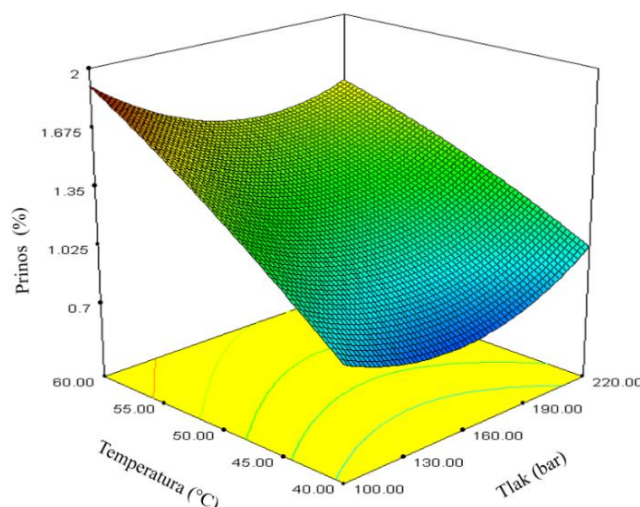
su bile, u granicama od 0,62 % (uzorak 8) do 1,92 % (uzorak 3). Najviši prinos ekstrakta od 1,92 % dobiven je pri najnižem tlaku od 100 bara te najvišoj temperaturi (60 °C).

Tablica 14. Prinos sc-CO₂ ekstrakata iz cvatućih vršnih dijelova vrste *A. annua* u ovisnosti o tlaku i temperaturi

Uzorak	Tlak (bar)	Temperatura (°C)	Prinos (%)
1	220	60	1,43
2	130	50	0,90
3	100	60	1,92
4	160	60	1,61
5	220	40	1,05
6	190	50	1,46
7	190	60	1,88
8	130	40	0,62
9	220	50	1,27
10	160	40	0,89
11	100	50	1,59
12	160	50	1,10
13	130	60	1,55
14	190	40	0,66
15	100	40	1,02

Utjecaj tlaka i temperature na prinos ekstrakcije statistički je ispitan testom analize varijance (ANOVA), uz razinu pouzdanosti 95% ($p \leq 0,05$). Prema rezultatima testa ANOVA regresijski model za prinos ekstrakcije bio je značajan ($p=0,0125$) sa zadovoljavajućim koeficijentom determinacije (R^2). Temperatura se pokazala kao statistički najznačajniji parametar ($p=0,0007$), što upućuje na njezin snažan utjecaj na prinos sc-CO₂ ekstrakata vrste *A. annua*. Nasuprot tome, statistička analiza nije pokazala značajan utjecaj primijenjenog tlaka na prinos ekstrakcije. Regresijski model je korišten za izradu odzivne površine koja prikazuje prinos ekstrakcije u ovisnosti o temperaturi i tlaku (Slika 14), na kojoj je vidljivo da pri konstantnom tlaku povećanje temperature s 40 na 60 °C dovodi do linearnog porasta prinosa ekstrakcije. Odzivna površina pokazuje najniži prinos pri nižim temperaturama, dok se s porastom temperature prinos povećava. Nasuprot tome, pri konstantnoj temperaturi porast tlaka ne pokazuje isti pozitivan trend. Površina ukazuje da je prinos najveći pri ekstremnim

vrijednostima tlaka, dok srednje vrijednosti tlaka rezultiraju najnižim prinosom sc-CO₂ ekstrakata.

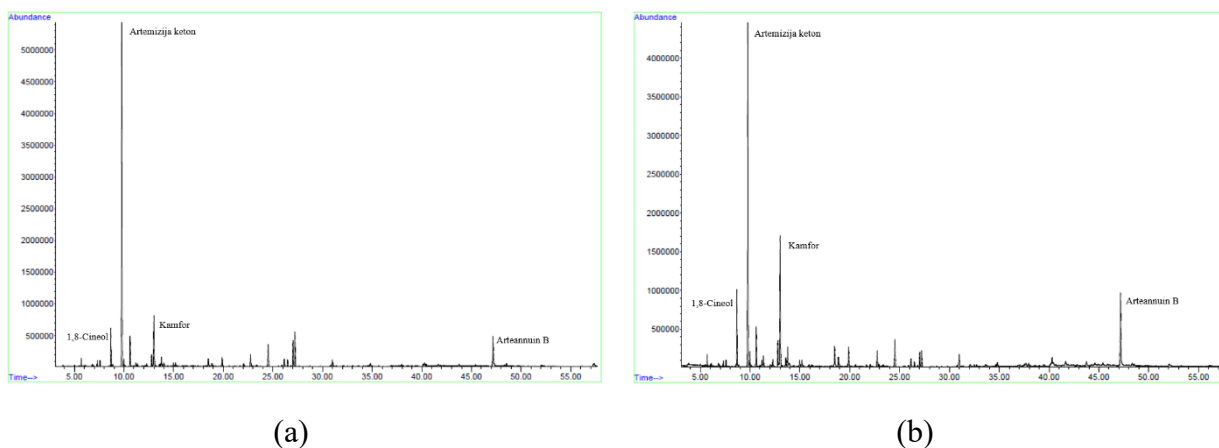


Slika 14. Trodimenzionalni prikaz prinosa sc-CO₂ ekstrakata iz cvatućih vršnih dijelova vrste *A. annua* u ovisnosti o tlaku i temperaturi

Pregledom dostupne literature, dosadašnja istraživanja ekstrakcije *A. annua* superkritičnim fluidima uglavnom su bila usmjerena na pronalaženje najučinkovitijih uvjeta za ekstrakciju artemizina i njegovih derivata, u usporedbi ili kombinaciji s ekstrakcijom organskim otapalima (162-165). No, dostupna literatura o optimizaciji uvjeta supekritične ekstrakcije eteričnog ulja iz vrste *A. annua* vrlo je rijetka, štoviše korišteni uvjeti ekstrakcije znatno se razlikuju. Prema istraživanju Li i sur učinkovita ekstrakcija eteričnog ulja iz vrste *A. annua* provodi se tijekom dva sata pri tlaku od 250 bar, temperaturi od 50 °C i protoku CO₂ od 25 g/min. Najveći pozitivan učinak na ekstrakciju pripisan je vremenu ekstrakcije i tlaku. Autori su također istaknuli da je kombinacija ekstrakcije superkritičnim fluidom i molekulske destilacije dobar način dobivanja visokokvalitetnih eteričnih ulja (166). Utjecaj tlaka (100, 200 i 300 bar) i temperature (40 i 60 °C) na prinos sc-CO₂ ekstrakata istraživali su i Vidović i suradnici. Tijekom trosatne ekstrakcije postigli su najveći prinos pri 300 bar i 40 °C. Autori su povećanje prinosa povezali s porastom tlaka pri konstantnoj temperaturi (167). Suprotno tome, rezultati ovoga istraživanja pokazali su da na prinos ekstrakcije snažnije utječe temperatura nego tlak. Pri razmatranju ove razlike treba imati na umu da je vrijeme ekstrakcije bilo znatno kraće nego u prethodna dva istraživanja, a primijenjeni tlak iznosio je najviše 220 bar. Razlozi za niži ili viši prinos ekstrakcije mogu se povezati i s dvama osnovnim svojstvima CO₂ u superkritičnom stanju, a to su niska viskoznost i visoka difuzivnost. S porastom tlaka povećava se i gustoća, što može pridonijeti boljoj sposobnosti otapanja i time većem prinosu ekstrakcije. Povećanje temperature pri konstantnom tlaku dovodi do smanjenja gustoće CO₂, ali i do porasta

tlaka para pojedinih komponenti (160, 167, 168). Stoga utjecaj temperature na prinos ekstrakcije ovisi o odnosu između gustoće superkritičnog fluida i tlaka para komponenti, odnosno o tome koji parametar ima prevladavajući utjecaj na proces ekstrakcije. U ovom istraživanju smatra se da je prevladavao utjecaj tlaka para komponenti, što može objasniti znatno veći utjecaj temperature na prinos ekstrakcije u odnosu na tlak.

Kromatografski profil petnaest sc-CO₂ ekstrakata analiziran je plinskom kromatografijom spregnutom s masenom spektrometrijom (GC-MS). Identificirane su 32 sastavnice, koje su činile od 84,43 % do 97,19 % ukupnog ulja (Tablica 15). Najzastupljeniji terpeni identificirani u dobivenim sc-CO₂ ekstraktima bili su monoterpeni (59,43–80,16 %), među kojima su prevladavali oksidirani oblici (50,26–75,98 %), poput artemizija ketona (16,93–48,49 %), zatim kamfora (3,29–18,44%), 1,8-cineola (4,77–11,89%), *trans*-pinokarveola (1,39–5,08%) i artemizija alkohola (2,25–4,10 %) (Slika 15). Nasuprot tome, seskviterpenske sastavnice bile su manje zastupljene (15,99–29,73 %). Za razliku od monoterpena, među seskviterpenima je bilo više ugljikovodika (9,95–18,59%) nego oksidiranih oblika (1,64–12,35%). Najzastupljeniji seskviterpeni bili su arteannuin B (3,98–10,03 %), β-selinen (1,05–7,42 %) i *trans*-β-kariofilen (2,53–5,41 %). Iako je u prethodnim istraživanjima primarni cilj sc-CO₂ ekstrakcije vrste *A. annua* bio izolacija artemizina, pritom su ekstrahirani i drugi lako isparljivi spojevi, što omogućuje okvirnu usporedbu s našim rezultatima. Rezultati ovog istraživanja u skladu su s ranijim rezultatima o visokom udjelu kamfora i 1,8-cineola (163, 164), a mogu se najbolje usporediti s rezultatima Banožić i sur., koji su također istaknuli arteannuin B, kamfor i artemizija keton kao najzastupljenije spojeve u sc-CO₂ ekstraktu (169).



Slika 15. Plinski kromatogrami sc-CO₂ ekstrakata s visokim udjelom artemizija ketona (a) i arteannuina B (b), dobiveni pri 100 bar i 40 °C (uzorak 15) te 220 bar i 60 °C (uzorak 1)

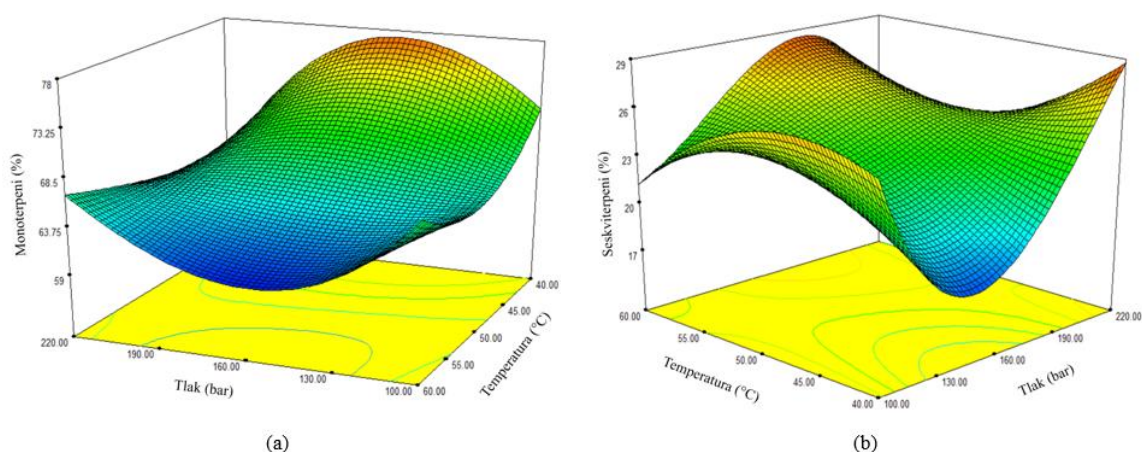
Tablica 15. Kemijski sastav sc-CO₂ ekstrakata dobivenih iz cvatućih vršnih dijelova vrste *A. annua* L.

Sastavnica	RI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Santolina trien	908	-	-	-	-	-	-	-	-	0,22	-	-	-	-	-	-
α -Pinen	933	0,77	2,75	2,34	2,60	1,31	2,11	3,30	2,48	2,99	1,08	3,99	2,44	1,05	0,95	0,76
Kamfen	947	-	0,39	0,52	0,40	0,26	-	-	-	0,51	0,39	-	-	-	-	-
Sabinen	973	-	0,39	0,33	0,39	0,27	-	0,57	0,53	0,50	0,35	0,70	0,53	0,34	-	-
β -Pinen	976	-	0,43	0,37	0,39	0,24	-	0,44	-	0,43	-	0,54	0,35	-	-	-
Mircen	991	0,45	1,35	1,32	0,87	0,71	0,81	0,60	0,93	0,80	0,80	0,82	1,46	0,89	0,83	0,68
Yomogi alkohol	1001	0,50	0,27	-	-	0,42	-	-	-	0,34	0,56	-	0,43	0,49	0,52	0,68
1,8-Cineol	1031	6,64	8,05	8,00	8,24	6,79	10,35	11,29	11,24	7,06	7,44	11,89	7,62	8,59	6,94	4,77
Artemizija keton	1060	31,55	19,28	19,57	16,93	27,06	38,04	19,90	30,13	27,43	48,49	25,31	31,75	29,81	37,56	46,76
<i>cis</i> -Sabinen hidrat	1066	1,24	1,84	1,80	1,91	1,31	1,41	2,30	2,04	1,01	0,68	2,35	1,49	1,43	0,90	0,94
Artemizija alkohol	1083	3,64	2,70	2,43	2,25	3,08	4,03	2,81	3,60	2,50	3,44	3,24	2,72	2,97	2,94	4,10
<i>trans</i> -Sabinen hidrat	1099	0,65	0,76	0,55	0,83	0,67	-	1,01	0,91	0,58	0,38	1,03	0,69	0,81	0,56	0,44
1,3,8- <i>p</i> -Mentatriene	1103	1,11	2,18	2,41	2,17	1,66	0,93	0,93	1,25	0,89	-	0,93	1,00	1,10	0,75	-
α -Kamfolenal	1126	0,78	1,22	1,31	1,37	0,82	0,78	1,24	0,90	0,78	0,37	1,15	0,75	0,71	-	-
<i>trans</i> -Pinokarveol	1138	2,66	2,96	2,80	3,52	3,01	2,59	5,08	3,68	2,74	1,39	4,81	2,90	2,54	1,42	1,74
Kamfor	1143	13,94	14,17	18,44	13,15	11,88	16,05	3,29	12,88	9,39	12,22	4,17	7,17	6,77	14,36	7,83
Ocimenol	1157	1,09	1,99	2,32	2,01	1,37	1,02	1,13	1,20	0,97	-	1,08	1,02	1,28	0,81	-
Pinokarvon	1162	1,86	1,86	1,79	2,23	1,93	2,03	3,31	2,45	1,85	1,28	3,10	1,97	1,95	1,15	1,53
Borneol	1165	-	0,13	-	-	-	-	0,23	-	0,12	-	-	-	0,75	-	-
α -Terpineol	1190	0,60	0,77	0,55	0,68	0,51	-	0,88	0,98	0,59	0,36	0,98	0,83	0,85	-	0,54
Mirtenol	1196	0,70	0,77	0,66	0,88	0,70	-	1,09	0,86	0,71	0,41	1,06	0,80	0,72	-	-
Eugenol	1357	-	-	-	-	-	-	-	-	0,48	-	-	-	-	-	-
α -Kopaen	1374	1,76	1,62	1,23	1,50	2,32	1,76	1,82	1,78	1,24	1,33	1,82	1,98	1,64	1,70	1,90

Sastavnica	RI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>trans</i> - β -Kariofilen	1417	3,15	2,87	2,68	3,23	5,41	3,95	4,04	3,37	2,59	2,53	3,86	3,75	3,33	4,19	3,78
<i>trans</i> - β -Farnezen	1457	0,96	0,98	0,77	0,89	1,53	1,23	0,88	0,86	0,91	0,52	0,75	1,32	1,03	1,29	1,31
Artemizija trien	1465	0,50	0,68	0,48	0,78	0,56	-	0,68	0,60	0,75	0,53	0,58	0,98	-	0,78	1,06
Germakren D	1478	1,71	1,71	1,66	1,85	3,79	3,48	2,54	2,75	1,74	1,98	2,56	3,42	3,38	5,33	4,34
β -Selinen	1483	1,87	5,26	5,16	6,41	4,98	1,05	7,42	3,80	4,91	3,60	7,14	6,72	6,23	4,26	5,88
Kariofilen oksid	1580	1,82	2,00	1,36	1,83	2,10	1,55	2,88	-	2,22	1,14	2,43	2,08	1,53	1,65	1,40
Eudesma-4(15),7-dien-1- β -ol	1683	-	0,58	-	0,57	0,55	-	-	-	-	-	-	0,92	1,02	-	-
Arteanuinska kiselina	1840	0,80	0,55	1,55	0,62	0,58	-	0,61	1,72	0,55	-	0,74	0,20	0,52	-	-
Arteannuin B	2054	10,03	6,10	5,82	7,55	6,23	4,23	8,86	3,98	9,52	4,38	6,70	7,05	7,54	8,32	5,86
Monoterpeni		68,18	62,08	67,51	60,80	63,98	80,16	59,43	76,06	62,41	79,66	67,13	65,90	63,06	69,68	70,75
ugljikovodici		4,23	7,91	9,64	9,56	6,44	5,26	9,17	8,13	7,92	3,68	10,34	7,95	5,63	3,99	2,82
oksidirani		63,95	54,17	57,87	51,24	57,54	74,90	50,26	67,93	54,49	75,98	56,79	57,95	57,43	65,69	67,93
Seskviterpeni		22,59	22,34	20,69	25,24	28,05	17,24	29,73	18,85	24,43	15,99	26,57	28,41	26,22	27,51	25,52
ugljikovodici		9,95	13,11	11,96	14,66	18,59	11,46	17,38	13,16	12,14	10,47	16,70	18,16	15,61	17,54	18,26
oksidirani		12,64	9,23	8,73	10,58	9,46	5,78	12,35	5,71	12,29	5,52	9,87	10,25	10,61	9,97	7,26
Fenilpropanski derivati		-	-	-	-	-	-	-	-	0,48	-	-	-	-	-	-
UKUPNO		90,77	84,43	88,20	86,04	92,03	97,39	89,16	94,91	87,32	95,64	93,70	94,30	89,27	97,19	96,27

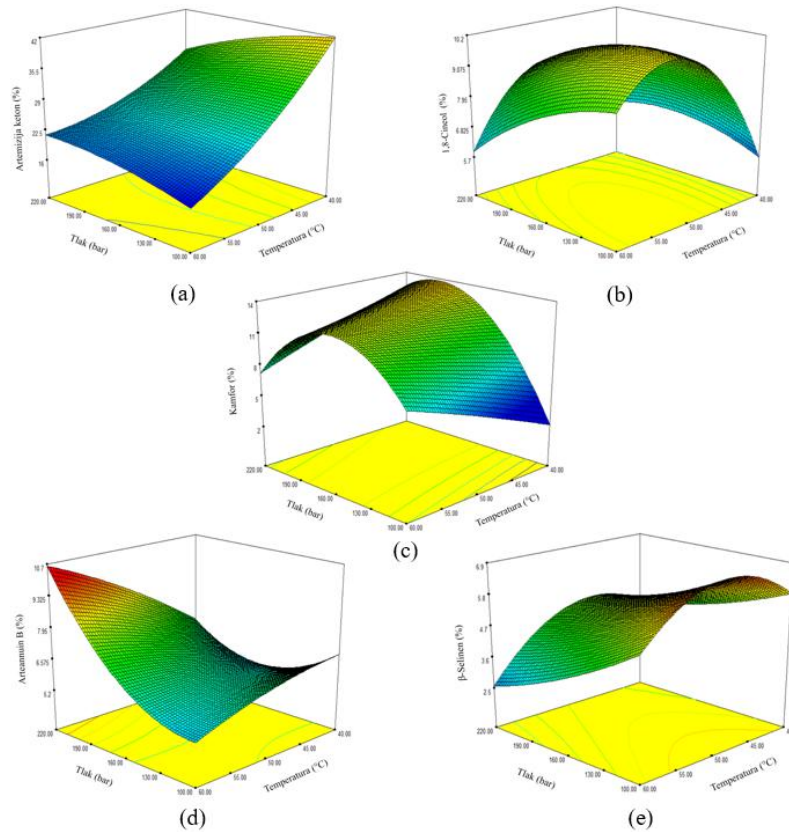
RI-retencijski indeks na HP-5 MS koloni; **1-15**: redosljed uzoraka sc-CO₂ ekstrakata prema uvjetima navedenim u Tablici 14.

Regresijski model za ekstrakciju monoterpena i seskviterpena superkritičnom ekstrakcijom pokazao se statistički značajnim, s p -vrijednostima od 0,0473, odnosno 0,0433. Vrijednosti koeficijenta determinacije (R^2) dosezale su do 0,85. Temperatura je bila statistički značajna za obje skupine spojeva ($p = 0,0019$ i $0,0029$), kao i odnosi između temperature i tlaka. Slika 16 prikazuje utjecaj temperature i tlaka na sadržaj monoterpena (a) i seskviterpena (b) u dobivenim sc-CO₂ ekstraktima. Vidljivo je da se većina monoterpena ekstrahira pri temperaturi od 40 °C i tlaku 160 bara ili pri temperaturi 50 °C i tlaku 190 bar. Povećanje temperature ili tlaka iznad tih vrijednosti nema pozitivan učinak na prinos ekstrakcije. Dok su za ekstrakciju seskviterpena u sc-CO₂ ekstraktima, odgovarajući tlakovi također 160 i 190 bar, ali uz više temperature od 50 i 60 °C. Slična količina seskviterpena može se dobiti i pri nižoj temperaturi od 40 °C, no tada je potrebno primijeniti viši tlak od 220 bar.



Slika 16. Trodimenzionalni prikaz sadržaja monoterpena (a) i seskviterpena (b) u sc-CO₂ ekstraktima dobivenim iz cvatućih vršnih dijelova vrste *A annua* u ovisnosti o tlaku i temperaturi

Biolška aktivnost te potencijal primjene biljnih ekstrakata značajno ovisi o kemijskom sastavu i sadržaju biološki aktivnih sastavnica, čiji se udio može optimirati primjenom odgovarajućih uvjeta ekstrakcije. Najzastupljeniji terpeni u sc-CO₂ ekstraktima korišteni su za daljnju statističku analizu primjenom ANOVA testa. Slika 17 prikazuje odzivne površine za odabrane monoterpene i seskviterpene u ovisnosti o temperaturi i tlaku.



Slika 17. Trodimenzionalni prikaz sadržaja najzastupljenijih komponenti u sc-CO₂ ekstraktima u ovisnosti o tlaku i temperaturi: (a) artemizija keton; (b) 1,8-cineol; (c) kamfor; (d) arteannuin B; (e) β-selinen

Za ekstrakciju artemizija ketona kao glavne sastavnice svih sc-CO₂ ekstrakata, temperatura se pokazala najvažnijim parametrom ($p = 0,0018$), dok utjecaj tlaka nije bio značajan. Odzivna površina jasno pokazuje da niža temperatura pogoduje ekstrakciji artemizija ketona te da povećanje temperature daje ekstrakte s manjim udjelom ove sastavnice (Slika 17(a)). Ekstrakti bogati artemizija ketonom dobiveni su pri temperaturi 40 °C i tlakovima od 160 i 100 bara. Niske temperature vjerojatno omogućuju učinkovitiju ekstrakciju artemizija ketona održavanjem visoke gustoće fluida, minimiziranjem toplinske degradacije i sprječavanjem gubitaka uslijed isparavanja. Suprotno rezultatima za artemizija keton, temperatura nije imala značajan utjecaj na prinos kamfora, dok su najvažniji parametri bili tlak ($p = 0,0155$) te odnos između tlaka i temperature ($p = 0,0198$). Ustanovljeno je da je najučinkovitija ekstrakcija kamfora pri temperaturi 50 °C i tlakovima od 190 i 160 bara (Slika 17(c)). Slično tome, najbolja ekstrakcija 1,8-cineola također se postiže pri temperaturi 50 °C, ali pri nižim tlakovima od 100 i 130 bara (Slika 17(b)). Temperatura je bila jedini značajan

parametar ($p = 0,0080$) za ekstrakciju 1,8-cineola. Prethodna istraživanja pokazala su da eterična ulja bogata artemizija ketonom (12,5–43,2 %) imaju snažnu antibakterijsku i antifungalnu aktivnost protiv vrsta *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Malassezia sympodialis* i *Fusarium oxysporum* (57, 64, 170). Eterično ulje vrste *A. annua* pokazalo je i antioksidacijska svojstva, posebice kada je veći prinos seskviterpena, uz artemizija keton ili kamfor kao glavne sastavnice ekstrakta (50, 64). Radulović i sur. izvijestili su da artemizija keton ima jača antioksidacijska svojstva u usporedbi s kamforom, 1,8-cineolom i α -pinenom (156). Nadalje, artemizija keton je pokazao i najsnažnije antimikrobno djelovanje na gljivice te Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterijske sojeve, pri čemu je *Staphylococcus aureus* bio najosjetljiviji na njegovo djelovanje.

U seskviterpenskoj frakciji sc-CO₂ ekstrakta prevladavali su seskviterpenski lakton arteannuin B te ugljikovodik β -selinen. Ekstrakti s najvećim udjelom arteannuina B dobiveni su pri najvišim primijenjenim tlakovima i temperaturama. Slika 17(d) pokazuje da njegov prinos linearno raste s povećanjem tlaka od 160 do 220 bar, a vrijednosti se povećavaju i s rastom temperature pri istim tlakovima. Na ekstrakciju arteannuina B najviše utječe tlak ($p = 0,0133$), kao i odnos između tlaka i temperature ($p = 0,0264$). Tlak i temperatura pokazali su statistički značajan učinak i na ekstrakciju β -selinena, čija je ekstrakcija bila najučinkovitija pri temperaturi 50 °C i niskim tlakovima od 100 do 160 bar, nakon čega je sadržaj β -selinena opadao. Sličan trend opažen je i pri nižim i pri višim temperaturama (Slika 17(e)). Superkritični ekstrakti bogati seskviterpenima, posebno arteannuinom B i β -selinenom, osim svoje antimikrobne i antioksidativne aktivnosti, ukazuju i na druge aspekte biološke aktivnosti te potencijalne terapijske primjene ekstrakata *A. annua*. Recentna istraživanja arteannuina B pokazala su njegovu antitumorsku aktivnost i nisku toksičnost *in vitro* i *in vivo* (171). Utvrđeno je da arteannuin B pojačava učinkovitost cisplatina u nediferenciranom karcinomu pluća regulirajući connexin 43 i signalni put mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) (172). Također se pokazao kao inhibitor glavne proteaze SARS-CoV-2 (nestrukturani protein 5) i kaspaze-8, cisteinskih proteaza koje su obećavajuće molekularne mete za antivirusna i antikancerogena sredstva (173). Osim toga, dokazan je i značajan antivirusni učinak arteannuina B *in vitro*, što podupire dokazanu aktivnost *A. annua* protiv SARS-CoV-2 i drugih koronavirusa (174). Nadalje, sukladno novijim istraživanjima, ovaj seskviterpenski lakton snažan je protuupalni agens. Dokazano je da ublažava upalni odgovor suzbijajući nekontroliranu aktivaciju NF- κ B signalnog puta (175). Također, recentna istraživanja ukazuju na potencijalna protuupalna svojstva β -selinena. Eterično ulje *Callicarpa macrophylla*, bogato

β -selinenom (37,51–57,01 %), pokazalo je protuupalni, analgetski i antipiretički učinak u modelu švicarskih albino miševa u usporedbi sa referentnim lijekovima (176). Sukladno navedenom, rezultati ovoga ispitivanja sugeriraju potencijal superkritičnih ekstrakata za buduća istraživanja antimikrobnog, protuupalnog, antikancerogenog i antivirusnog djelovanja.

Istraženi su i optimalni uvjeti za ekstrakciju monoterpena, odnosno sekviterpena te željenih aktivnih sastavnica superkritičnom ekstrakcijom, a dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 16. Prema dobivenim rezultatima, temperatura od 60 °C i tlak od 100 bar pokazali su se optimalnima za ekstrakciju monoterpena. Ukoliko je cilj ekstrakcije samo visok udio artemizija ketona, temperatura se mora smanjiti na 45 °C pri istom tlaku. Međutim, za dobivanje ekstrakata bogatih sva tri najzastupljenija monoterpena (artemizija keton, kamfor i 1,8-cineol), temperatura i tlak trebaju se povećati na 50 °C i 160 bar. Seskviterpeni se također najbolje ekstrahiraju pri 60 °C, ali pri višem tlaku (181 bar) nego monoterpeni. Za ekstrakte bogate arteannuinom B i β -selinenom potrebno je primijeniti još viši tlak od 220 bar. Ako se želi visok udio arteannuina B, temperatura mora ostati 60 °C, dok je nešto niža temperatura od 53 °C pogodnija ako je, uz arteannuin B, također važan visok udio β -selinena.

Tablica 16. Optimalne vrijednosti tlaka i temperature za ciljanu sc-CO₂ ekstrakciju isparljivih terpena iz cvatućih vršnih dijelova vrste *Artemisia annua* L.

Cilj	Tlak (bar)	Temperatura (°C)	Poželjnost
Visok prinos i udio monoterpena	100	60	0,660
Visok prinos i udio artemizija ketona	100	45	0,473
Visok prinos i udio artemizija ketona, kamfora i 1,8-cineola	160	50	0,509
Visok prinos i udio seskviterpena	181	60	0,809
Visok prinos i udio arteannuina B	220	60	0,899
Visok prinos i udio arteannuina B i β -selinena	220	53	0,650

4.1.1.4. Usporedni prinosi sc-CO₂ ekstrakata pri optimiranim uvjetima superkritične ekstrakcije

Udio superkritičnih ekstrakata dobivenih iz cvatućih vršnih dijelova (10,00 g) vrsta *A. abrotanum*, *A. absinthium*, *A. annua*, *A. maritima* i *A. vulgaris* određen je prema prethodno izračunatim optimalnim vrijednostima tlaka i temperature za ciljanu sc-CO₂ ekstrakciju isparljivih terpena iz cvatućih vršnih dijelova vrsta *Artemisia*, opisanim u Tablici 16. Tijekom ekstrakcije kontinuirani protok superkritičnog CO₂ iznosio je 50 g/min, a zadano vrijeme ekstrakcije bilo je 30 minuta, dok su vrijednosti tlaka i temperature bile 100 bar i 60 °C, odnosno 180 bar i 60 °C.

Sc-CO₂ ekstrakti dobiveni pri nižem tlaku bili su bijeli do blijedožuti, dok su pri ekstrakciji na višim vrijednostima tlaka dobiveni ekstrakti intenzivnije boje, osim za vrstu *A. maritima* koji je bio bijel pri obje ekstrakcije, ali je pri višem primijenjenom tlaku ekstrakt bio značajno gušći.

Prinos sc-CO₂ ekstrakata u ovisnosti o tlaku i temperaturi pri optimalnim uvjetima prikazan je u Tablici 17. Vrijednosti su bile, u granicama od 0,13 % (*A. absinthium*) do 1,92 % (*A. annua*). Vrste *A. annua* i *A. maritima* pokazale su veći prinos ekstrakata pri tlaku i temperaturi od 100 bara te 60 °C, dok su preostale tri vrste imale veći prinos ekstrakta pri primijenjenom višem tlaku (181 bar) dok su ostali uvjeti ekstrakcije bili isti. Vrsta *A. abrotanum* imala je najveći prinos od 1,89 % u odnosu na ostale ispitivane vrste pri uvjetima tlaka i temperature 181 bar i 60 °C. Gorki pelin imao je najmanji prinos ekstrakata u obje ekstrakcije.

Tablica 17. Prinosi sc-CO₂ ekstrakata u cvatućim vršnim dijelovima odabranih vrsta roda *Artemisia* L.

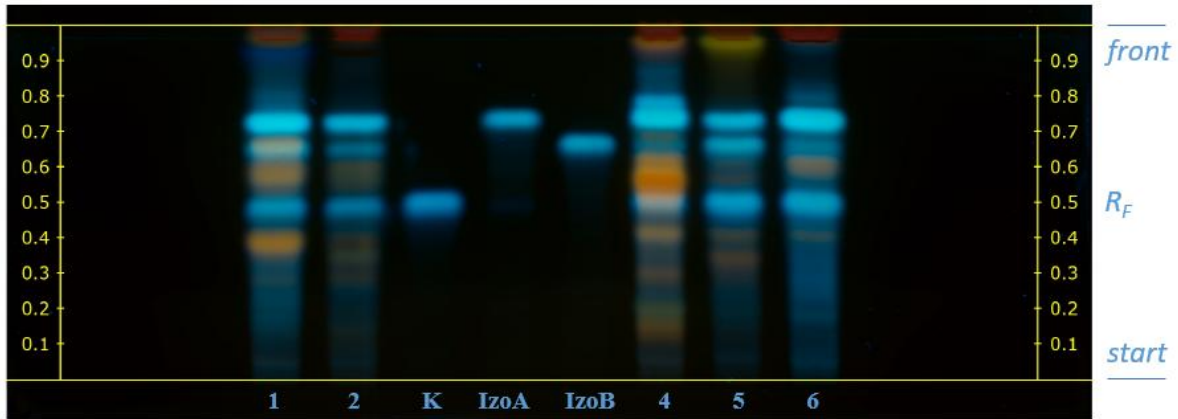
Biljna vrsta	Prinos (%)	
	100 bar/ 60 °C	181 bar/ 60 °C
<i>A. abrotanum</i>	1,31	1,89
<i>A. absinthium</i>	0,13	0,55
<i>A. annua</i>	1,92	0,80
<i>A. maritima</i>	1,41	0,68
<i>A. vulgaris</i>	0,18	0,57

4.1.2. Karakterizacija bioaktivnih sastavnica tankoslojnom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPTLC)

Kvalitativna analiza odabranih vrsta roda *Artemisia* provedena je metodom tankoslojne kromatografije visoke djelotvornosti (HPTLC) prema Europskoj farmakopeji (2). Ispitana je prisutnost fenolnih kiselina i flavonoida, primjenom silikagela kao adsorbensa te prikladnih pokretnih faza koje čini smjesa otapala različitih polarnosti. Detekcija odijeljenih sastavnica provedena je prskanjem kromatograma odgovarajućim reagensima. Odijeljene bioaktivne sastavnice karakterizirane su prema položaju odijeljenih zona, odnosno faktoru zaostajanja (R_f) te boji i intenzitetu obojenja odijeljenih zona u usporedbi s odgovarajućim referentnim spojevima (3,5-di-kaveoilkina kiselina, 4,5-di-kaveoilkina kiselina, artemetin, izokvercitrin, klorogenska kiselina, kvercetin, kvercitrin, rutin).

4.1.2.1. Fenolne kiseline

Prisutnost fenolnih kiselina u istraživanim odabranim vrstama roda *Artemisia* ispitana je odjeljivanjem priređenih metanolnih ekstrakata pomoću pokretne faze koja je sadržavala diizopropileter, aceton, mravlju kiselinu i vodu u volumnim omjerima 50:30:10:10. Odijeljene sastavnice ddetektirane su pod UV svjetlom na valnoj duljini od 366 nm nakon prskanja NS/PEG reagensom. Na razvijenom kromatogramu uočen je veliki broj zona svijetloplave i žutonarančaste fluorescencije (Slika 18). Zone koje pripadaju fenolnim kiselinama fluorescirale su svijetloplavom bojom, dok su žutonarančaste zone ukazivale na prisutnost flavonoida. U svim ispitivanim ekstraktima vidljive su svijetloplave zone jakog intenziteta koje odgovaraju poredbenim kiselinama, klorogenskoj ($R_F = 0,49$), 3,5-di-kaveoilkina ($R_F = 0,73$) te 4,5-di-kaveoilkina kiselini ($R_F = 0,65$). Osim toga, uočeno je još nekoliko svijetlo plavih zona slabijeg intenziteta, što ukazuje na prisutnost drugih fenolnih kiselina u ispitivanim vrstama roda *Artemisia*.



Slika 18. Kromatogram fenolnih kiselina u odabranim vrstama roda *Artemisia* L.

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ TLC ploča

Pokretna faza: diizopropileter – aceton – mravlja kiselina – voda 50:30:10:10 (V/V/V/V)

Detekcija: NS/PEG, UV – 366 nm

Metanolni ekstrakti: **1** - *A. abrotanum*, **2** - *A. absinthium*, **3** - *A. annua*, **4** - *A. maritima*, **5** - *A. vulgaris*

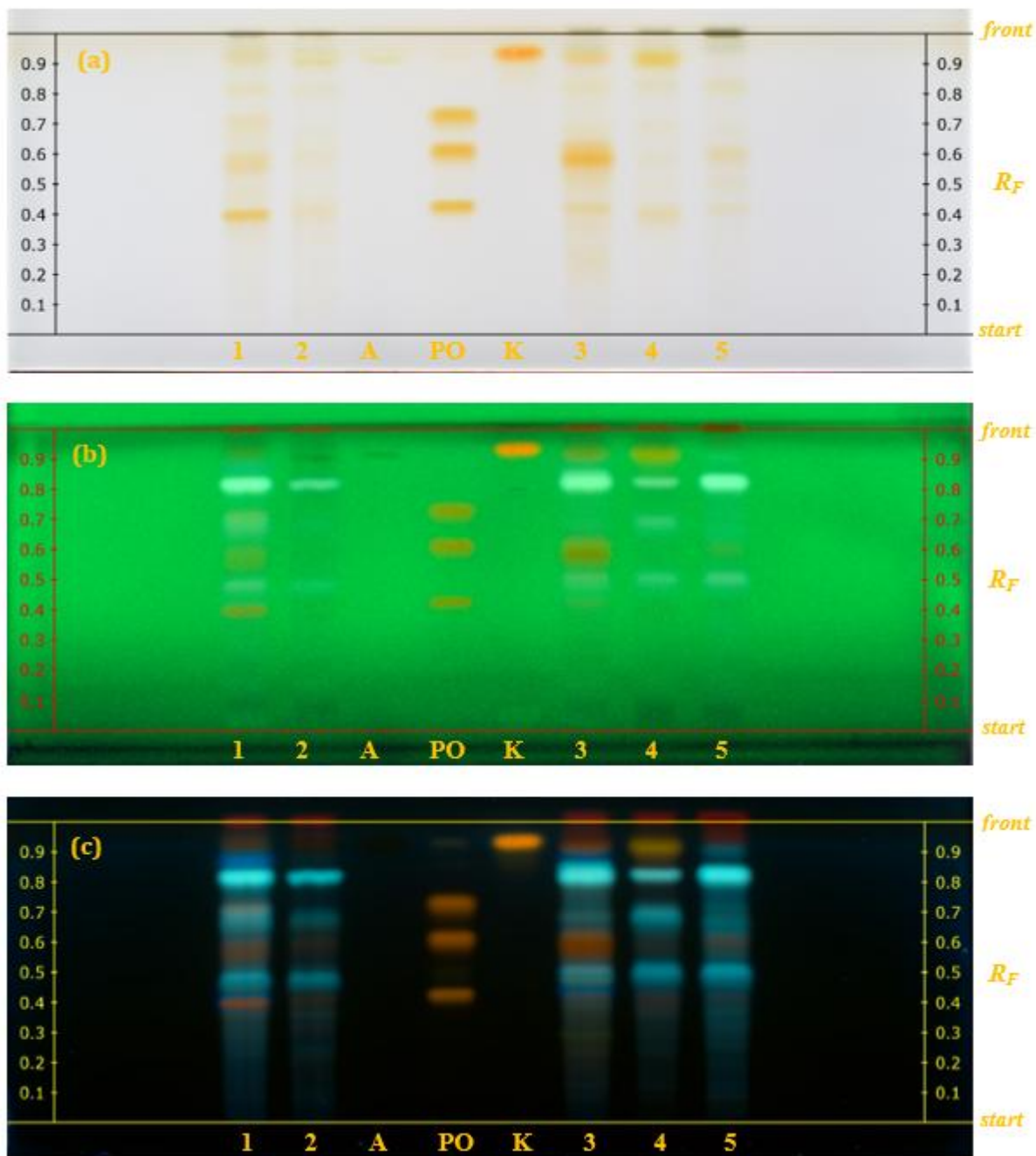
Poredbene supstancije: **K** – klorogenska kiselina ($R_F=0,49$), **IzoA** - 3,5-di-kaveoilkina kiselina ($R_F=0,73$), **IzoB** - 4,5-di-kaveoilkina kiselina ($R_F=0,67$)

4.1.2.2. Flavonoidi

Prisutnost flavonoidnih glikozida i aglikona ispitana je primjenom pokretnih faza koje su se sastojale od etil-acetata, mravlje kiseline, ledene octene kiseline i vode (100:11:11:27, V/V/V/V) te etil-acetata, mravlje kiseline i vode (80:10:10, V/V/V). Kromatogrami su promatrani na vidljivom svjetlu te pod UV svjetlom na valnim duljinama 254 nm (gašenje zona fluorescencije) i 366 nm nakon prskanja NS/PEG reagensom. Faktori zaostajanja (R_F) su se razlikovali u dva primijenjena sustava. Na dobivenim kromatogramima vidljivo je više fluorescirajućih žutonarančastih zona flavonoidnih glikozida i aglikona, te svijetloplavih zona koje odgovaraju fenolnim kiselinama (Slike 19 i 20). U ekstraktima vrsta *A. abrotanum* i *A. annua* uočene su žutonarančaste zone jakog intenziteta fluorescencije, dok se u ostalim ispitanim vrstama prikazuju žutonarančaste zone slabijeg intenziteta. U ekstraktu vrste *A. abrotanum* uočena je žutonarančasta zona jakog intenziteta fluorescencije čija se R_F -vrijednost poklapa s faktorom zaostajanja rutina (0,43 i 0,26). I u drugim ispitivanim vrstama roda *Artemisia* također su uočene žutonarančaste zone čija se R_F -vrijednost slaže s faktorom zaostajanja rutina, no one su vrlo slabog intenziteta fluorescencije. Nadalje, u vrstama *A. abrotanum*, *A. absinthium*, *A. annua* i *A. vulgaris* prisutna je žutonarančasta zona slabijeg

intenziteta čija se R_F -vrijednost poklapa s R_F -vrijednošću izokvercitrina (0,63 i 0,49), koja je bila bolje vidljiva na danjem svjetlu.

U oba primijenjena sustava, žuta zona artemetina uočavala se na vidljivom svjetlu te na 245 nm kao tamna zona gašenja fluorescencije, dok nije bila vidljiva pri 366 nm nakon prskanja NS/PEG reagensom. Također, ista zona detektirana je i u vrsti *A. absinthium* čija se R_F -vrijednost poklapa s faktorom zaostajanja artemetina u oba sustava (0,92 i 0,85). Iako su u ekstraktu vrste *A. maritima* uočene žutonarančaste zone slabijeg intenziteta, ni jedna nije odgovarala primijenjenim poredbenim supstancijama. Svi su ispitivani uzorci sadržavali intenzivne svijetloplave zone fenolnih kiselina, među kojima se ističu zone jakog intenziteta fluorescencije, a koje prema prethodno spomenutim rezultatima (poglavlje 4.1.2.1.) odgovaraju faktorima zaostajanja klorogenske ($R_F = 0,49$), 3,5-di-kaveoilkina ($R_F = 0,73$) te 4,5-di-kaveoilkina kiseline ($R_F = 0,65$).



Slika 19. Kromatogrami flavonoida u odabranim vrstama roda *Artemisia* L.

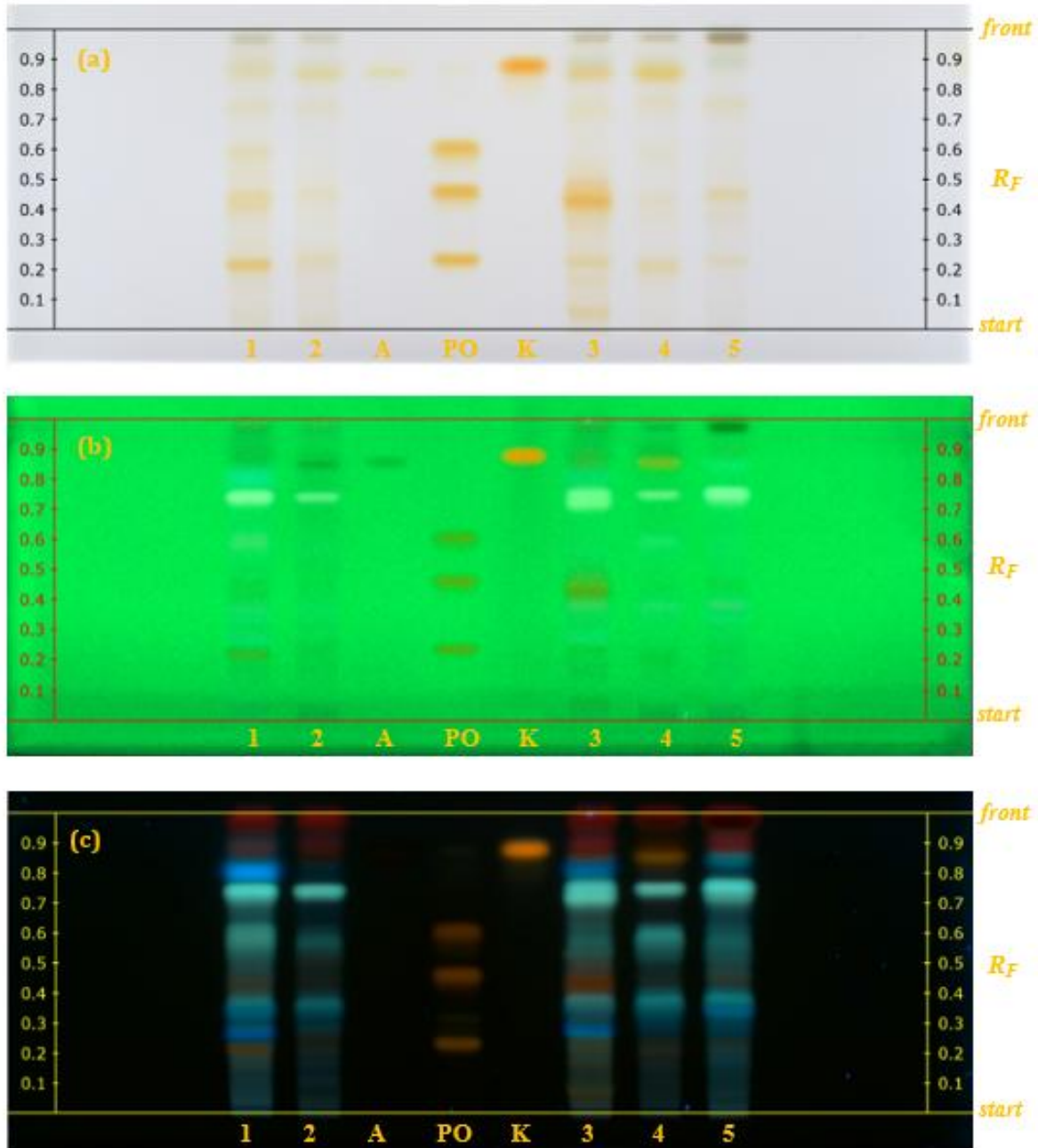
Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ TLC ploča

Pokretna faza: etil-acetat-mravljja kiselina-ledena octena kiselina-voda (100:11:11:27, V/V/V/V)

Detekcija: (a) vidljivo svjetlo; (b) UV – 254 nm; (c) NS/PEG, UV – 366 nm

Metanolni ekstrakti: 1- *A. abrotanum*, 2 - *A. absinthium*, 3 - *A. annua*, 4 - *A. maritima*, 5 - *A. vulgaris*

Poredbene supstancije: A – Artemetin ($R_F=0,92$); PO- R - Rutin ($R_F = 0,43$), I - Izokvercitrin ($R_F=0,63$), K – Kvercitrin ($R_F=0,76$); K – Kvercetin ($R_F=0,96$)



Slika 20. Kromatogram flavonoida u odabranim vrstama roda *Artemisia* L.

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ TLC ploča

Pokretna faza: etil-acetat-mravljja kiselina-voda (80:10:10, V/V/V)

Detekcija: (a) vidljivo svjetlo; (b) UV – 254 nm; (c) NS/PEG, UV – 366 nm

Metanolni ekstrakti: 1- *A. abrotanum*, 2 - *A. absinthium*, 3 - *A. annua*,
4 - *A. maritima*, 5 - *A. vulgaris*

Poredbene supstancije: A – Artemetin ($R_F=0,85$); PO- R - Rutin ($R_F = 0,26$),
I - Izokvercitrin ($R_F=0,49$), K – Kvercitrin ($R_F=0,62$); K – Kvercetin ($R_F=0,89$)

4.1.3. Ukupni udjeli polifenolnih sastavnica određen primjenom UV-Vis spektrofotometrije

Određivanje ukupnih udjela pojedinih polifenolnih sastavnica, odnosno fenolnih kiselina, flavonoida i trjeslovina u cvatućim vršnim dijelovima odabranih vrsta roda *Artemisia* provedeno je spektrofotometrijskim metodama prema Europskoj farmakopeji (2), koje se temelje na stvaranju obojenih stabilnih kompleksa između pojedinih polifenolnih skupina sa određenim reagensima. Žuto obojenje (zaluživanjem prelazi u narančasto) daju fenolne kiseline u reakciji s nitrit-molibdatnim reagensom, dok flavonoidni aglikoni s aluminijskim kloridom stvaraju svijetložuto obojene komplekse. Određivanje trjeslovina temelji se na stvaranju plavo obojenih kompleksnih spojeva u reakciji s fosfomolibdenovolfraimovim reagensom (Folin-Ciocalteu reagens) te njihovoj adsorpciji na kožni prašak.

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenolnih kiselina, flavonoida i trjeslovina u cvatućim vršnim dijelovima odabranih vrsta roda *Artemisia* prikazani su u Tablici 18. Udio derivata hidroksicimetne kiseline, odnosno fenolnih kiselina, u odabranim vrstama roda *Artemisia* bio je u rasponu 3,72-6,45 %. Sadržajem fenolnih kiselina isticale su se vrste *A. vulgaris* (6,45 %) i *A. maritima* (4,62 %), dok ih je najmanje bilo u vrsti *A. absinthium* (3,72 %). Dobiveni rezultati pokazali su da je udio ukupnih flavonoida u ispitivanim biljnim vrstama u rasponu 0,19-0,57 %. Najviše ih je određeno u vrsti *A. annua* (0,57 %) i *A. abrotanum* (0,37 %), a najmanje u vrsti *A. maritima* (0,19 %). Nadalje, utvrđeni udjeli trjeslovina bili su u granicama od 1,22 % do 2,48 %. Vrste *A. maritima* (2,48 %) i *A. absinthium* (2,16 %) bile su najbogatije trjeslovinama, dok je njihov najmanji udio određen u vrsti *A. annua* (1,22 %).

Tablica 18. Udjeli ukupnih fenolnih kiselina, flavonoida i trjeslovina u cvatućim vršnim dijelovima odabranih vrsta roda *Artemisia* L.

Biljna vrsta	Udio (%) ± SD		
	Fenolne kiseline	Flavonoidi	Trjeslovine
<i>A. abrotanum</i>	4,39 ± 0,14 ^b	0,37 ± 0,002 ^b	1,79 ± 0,03 ^c
<i>A. absinthium</i>	3,72 ± 0,04 ^c	0,27 ± 0,003 ^c	2,16 ± 0,08 ^b
<i>A. annua</i>	4,55 ± 0,11 ^b	0,57 ± 0,006 ^a	1,22 ± 0,03 ^d
<i>A. maritima</i>	4,62 ± 0,19 ^b	0,19 ± 0,001 ^e	2,48 ± 0,03 ^a
<i>A. vulgaris</i>	6,45 ± 0,13 ^a	0,24 ± 0,002 ^d	1,68 ± 0,00 ^c

Srednje vrijednosti unutar stupca označene različitim slovima međusobno se značajno statistički razlikuju ($p < 0,05$).

Prethodna istraživanja vrsta roda *Artemisia* uključivala su i spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola, fenolnih kiselina i flavonoida, kako bi se ustanovila korelacija između njihovog fitokemijskog sastava i biološke aktivnosti ekstrakata (87, 114, 120, 118, 177). Budući da su u prethodnim istraživanjima primjenjivane različite spektrofotometrijske metode te način izračuna i prikazivanja rezultata, udjele polifenola dobivenih u ovom radu nije bilo moguće usporediti s rezultatima iz prethodnih istraživanja, dok za vrstu *A. maritima* nije pronađena dosadašnja literatura.

4.1.4. Identifikacija fenolnih kiselina i flavonoida LC-PDA-ESI-MS/MS metodom

Identifikacija fenolnih kiselina i flavonoida u 70 %-tnim etanolnim ekstraktima vrsta roda *Artemisia* provedena je u vezanom sustavu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije, uz elektroraspršivanje kao ionizacijsku metodu te detektorom s nizom fotodioda (LC-PDA-ESI-MS/MS). Ustanovljeno je da su vrste roda *Artemisia* bogate derivatima hidroksicimetne kiseline, te da su u ispitivanim ekstraktima najzastupljeniji derivati kaveoilkina kiseline, kao i O-glikozidi iz skupine flavona, posebice derivati kvercetina i mearnsetina. Osim toga, utvrđena je prisutnost flavonskih C-glikozida, derivata apigenina, poput vicenina-2, izoschaftozida, schaftozida, apigenin-6-C-pentozid-8-C-glukozida i apigenin-6-C-glukozid-8-C-pentozida. Nadalje, utvrđena je prisutnost visokometoksiliranih flavonskih aglikona poput artemetina, eupatilina, hipsulidina, jaceidina, jaceosidina, kasticina/krizosplenetina, penduletina, tricina te 3,5-dihidroksi-6,7,4'-trimetoksiflavona (Tablica 19).

U ekstraktima odabranih vrsta roda *Artemisia* identificirano je dvanaest derivata hidroksicimetne kiseline. U svim ispitivanim vrstama utvrđena je prisutnost **klorogenske** (3-kaveoilkina kiselina, $UV_{max} = 219, 241, 325$ nm), **kriptoklorogenske** (4-kaveoilkina kiselina, $UV_{max} = 202, 227, 292, 334$ nm) i **neoklorogenske kiseline** (5-kaveoilkina kiselina, $UV_{max} = 221, 256, 294, 319$ nm) čiji je glavni molekularni ion $[M-H]^-$ pri m/z 353. Kod 3-kaveoilkina kiseline i 4-O-kaveoilkina kiseline djelomično dolazi do stvaranja dimera s dvostrukom molekularnom masom u MS^1 te nastaje signalni pik pri m/z 707. Drugom fragmentacijom je nastao MS^2 spektar sa signalom pri m/z 191 $[M-H-162]^-$. Kod jednostavnih supstitucija u položaju 3- ili 5-O-kaveoilkina kiseline, prijelazom iz MS^1 u MS^2 dolazi do odcjepljenja kavene kiseline uz gubitak od 162 ($353 \rightarrow 191$), gdje jedan hidroksilni ostatak kavene kiseline pritom ostaje vezan za kina kiselinu. Nadalje, za 3-kaveoilkina i 5-kaveoilkina kiseline uočen je i produktni ion pri m/z 179 $[kavena\ kiselina-H]^-$, koji je bio izraženiji kod 3-kaveoilkina kiseline. Kod 4-kaveoilkina kiseline, prijelazom iz MS^1 do MS^2 , dolazi do gubitka od 180 Da

(353→173). Taj gubitak od 180 Da pokazuje samo 4-kaveoilkina kiselina. Daljnjom fragmentacijom u MS³ nastaje fragment pri signalu m/z 127 [M-H-64]⁻ kod klorogenske i neoklorogenske kiseline koji ukazuje na daljnji raspad kinske strukture, dok se kod kriptoklorogenske kiseline u spektru MS³ detektira fragment pri m/z 93 [M-H-80]⁻. Rezultati LC-PDA-ESI-MS/MS identifikacije 3-, 4- i 5-kaveoilkina kiselina u skladu su sa dosadašnjom literaturom (114, 178).

U svim ispitivanim vrstama roda *Artemisia* utvrđena je prisutnost **3,5-di-kaveoilkina kiseline** (UV_{max} = 242, 326 nm) i **4,5-di-kaveoilkina kiseline** (UV_{max} = 244, 324 nm), s glavnim molekulskim ionima [M-H]⁻ pri m/z 515 te pri m/z 1031 koji ukazuju na dvostruku molekulsku masu dimera. Drugom fragmentacijom je nastao MS² spektar sa signalom pri m/z 353 [M-H-162]⁻, što odgovara odcjepljenju jedne kavene kiseline. Daljnjom fragmentacijom odcjepljuje se druga kavena kiselina (162 Da) te nastaje MS³ spektar s fragmentnim ionom pri m/z 191 za 3,5-di-kaveoilkina kiselinu. Nasuprot tome, kod supstitucije u položaju 4,5-, glavni fragmentni ion u MS³ spektru detektiran je pri m/z 173 [M-H-180]⁻, što je posljedica odcjepljena kavene kiseline u položaju 5. Dok je daljnja fragmentacija također dala različite MS⁴ spektre, gdje je za 3,5-di-kaveoilkina kiselinu signalni pik pri m/z 127 pokazivao najveći intenzitet, a za 4,5-di-kaveoilkina kiselinu pri m/z 93 (Slike 21 i 22).

U vrstama *A. abrotanum*, *A. absinthium*, *A. maritima* i *A. vulgaris* identificirana je **3,4-di-kaveoilkina kiselina** (UV_{max} = 222, 242, 324 nm) čiji je glavni molekulski ion [M-H]⁻ pri m/z 515 te također molekulski ion sa signalnim pikom m/z 1031 koji ukazuje na dvostruku molekulsku masu dimera. Drugom fragmentacijom je nastao MS² spektar sa signalom pri m/z 353 [M-H-162]⁻, dok je trećom fragmentacijom nastao MS³ spektar gdje je signalni pik pri m/z 173 [M-H-180]⁻ pokazivao najveći intenzitet, što je posljedica odcjepljenja kavene kiseline u položaju 3-, odnosno 5- za 3,5-di-kaveoilkina kiselinu te je u skladu s literaturnim podacima (116, 179-181). Nadalje, četvrtom fragmentacijom nastaje MS⁴ spektar s najvišim intenzitetom fragmenta pri m/z 93.

U vrsti *A. annua* utvrđena je prisutnost i **1,5-di-kaveoilkina kiseline** (UV_{max} = 221, 243, 328 nm), čiji je glavni molekulski ion [M-H]⁻ pri m/z 515. Fragmentacijski put bio je sličan 3,5-di-kaveoilkina kiselini, a razlikovali su se u intenzitetu pikova produktnih iona fragmentacije. Kod supstitucija kina kiseline u položajima 1,5- i 3,5-, fragmentni ion s najvišim intenzitetom u MS³ spektru bio je pri m/z 191, koji nastaje dvostrukim gubitkom 162 Da (515→353→191), dok fragment pri m/z 127 u MS⁴ spektru pokazuje najveći intenzitet, što je u skladu sa znanstvenom literaturom (181).

U vrstama *A. abrotanum*, *A. absinthium*, *A. maritima* i *A. vulgaris* utvrđena je prisutnost **3,4,5-tri-kaveoilkina kiseline** ($UV_{\max} = 246, 305, 323 \text{ nm}$) čiji je glavni molekularni ion $[M-H]^-$ pri m/z 677. Fragmentni ioni s najvišim intenzitetom u MS^2 spektru su pri m/z 515 te pri m/z 353 u MS^3 spektru, a koji nastaju dvostrukim gubitkom 162 Da ($677 \rightarrow 515 \rightarrow 353$), što odgovara molekularnoj masi kaveoilkina kiseline (354). Rezultati analize masenih spektara te UV-Vis spektara u skladu su sa rezultatima za vrstu *A. annua* (114, 116) te je kiselina identificirana kao 3,4,5-tri-kaveoilkina kiselina.

5-Feruloilkina kiselina ($UV_{\max} = 235, 325 \text{ nm}$), koja je dala glavni molekularni ion $[M-H]^-$ pri m/z 367, identificirana je u vrstama *A. annua*, *A. maritima* i *A. vulgaris*. Drugom fragmentacijom nastao je MS^2 spektar sa signalom pri m/z 191, koji ukazuje na odcjepljenje ferulične kiseline (176 Da), pri čemu ostaje kina kiselina. Daljnjom fragmentacijom nastaje MS^3 spektar koji daje signalni pik sa najvišim intenzitetom pri m/z 127. Fragmentacija ove kiseline u skladu je s rezultatima Zhao i sur. (182) te je identificirana kao 5-feruloilkina kiselina.

U vrsti *A. annua* utvrđena je prisutnost **3-kaveoil-5-feruloilkina kiseline** ($UV_{\max} = 242, 326 \text{ nm}$), čiji je glavni molekularni ion $[M-H]^-$ pri m/z 529. Drugom fragmentacijom nastao je MS^2 spektar sa signalom pri m/z 367, koji ukazuje na gubitak kavene kiseline (162 Da), dok ostaje fragment feruloilkina kiseline koji odgovara molekularnoj masi kiseline (368). Trećom fragmentacijom nastao je MS^3 spektar sa signalom pri m/z 191, koji ukazuje na odcjepljenje ferulične kiseline (176 Da), pri čemu ostaje kina kiselina. Daljnjom fragmentacijom nastaje MS^4 spektar koji daje signalni pik sa najvišim intenzitetom pri m/z 127, što se slaže s ranije obrazloženim rezultatima fragmentacije 5-feruloilkina kiseline te je u skladu s literaturnim podacima za vrstu *A. annua* (116, 179).

U vrsti *A. maritima* po prvi puta je, prema našem saznanju, identificirana **3-feruloil-4-kaveoilkina kiselina** ($UV_{\max} = 245, 302, 326 \text{ nm}$), čiji je glavni molekularni ion $[M-H]^-$ pri m/z 529. Drugom fragmentacijom je nastao MS^2 spektar sa signalom pri m/z 353, koji ukazuje na gubitak ferulične kiseline (176 Da), dok ostaje fragment kaveoilkina kiseline koji odgovara molekularnoj masi kiseline (353). Trećom je fragmentacijom nastao MS^3 spektar gdje je signalni pik pri m/z 173 $[M-H-180]^-$ pokazivao najveći intenzitet. Također, četvrtom fragmentacijom nastaje MS^4 spektar sa najvišim intenzitetom fragmenta pri m/z 93, što je u skladu sa prethodno obrazloženim podacima za 4-kaveoilkina kiselinu (113, 179).

3,5-Di-feruloilkina kiselina ($UV_{\max} = 246, 323 \text{ nm}$) čiji je glavni molekularni ion $[M-H]^-$ pri m/z 543, identificirana je u vrsti *A. annua*. Daljnjom fragmentacijom je nastao MS^2 spektar s najvećim signalom pri m/z 369 $[M-H-176]^-$ te MS^3 spektar sa najvećim signalom pri m/z 191

[M-H-176]⁻, što ukazuje na gubitak dvije ferulične kiseline. Rezultati analize masenih spektara te UV-Vis spektara u skladu su s rezultatima za vrstu *A. annua* (114, 116) te je kiselina identificirana kao 3,5-di-feruloilkina kiselina.

Izokvercitrin (kvercetin-3-O-glukozid, $UV_{\max} = 254, 331 \text{ nm}$) identificiran je u svim ispitivanim vrstama roda *Artemisia*. Na spektru je bilo moguće uočiti glavni molekularni ion [M-H]⁻ pri m/z 463 koji odgovara molekularnoj masi izokvercitrina (464). Drugom fragmentacijom dobiven je signal m/z 301 koji je u skladu s molekularnom masom kvercetina (302), nakon gubitka molekule glukoze (162 Da) (108).

U vrsti *A. abrotanum* identificiran je **hiperozid** (kvercetin-3-O-galaktozid, $UV_{\max} = 256, 345 \text{ nm}$) koji je dao glavni molekularni ion [M-H]⁻ pri m/z 463 koji odgovara molekularnoj masi hiperozida (464). Drugom fragmentacijom nastao je MS² spektar sa signalom pri m/z 301, koji ukazuje na gubitak galaktoze (162 Da), pri čemu nastaje aglikon kvercetin. Obzirom da su izokvercitrin i hiperozid strukturno slični te su im fragmentacije iona do MS⁴ spektra jednake, moguće ih je razlikovati na osnovu retencijskih vremena te UV-Vis spektara.

Rutin (kvercetin-3-O-rutinozid, $UV_{\max} = 204, 256, 326 \text{ nm}$) također je identificiran u svim ispitivanim vrstama. Detektiran je glavni molekularni ion [M-H]⁻ pri m/z 609 koji odgovara molekularnoj masi rutina (610). Drugom fragmentacijom dobiven je signal pri m/z 301 koji je u skladu s molekularnom masom kvercetina (302), a koji nastaje uzastopnim gubitkom dvije heksoze [M-H-ramnozilglukozid]⁻. Fragmentacijski obrazac rutina u skladu je sa dosadašnjom literaturom (88).

Astragalin (kemferol-3-O-glukozid, $UV_{\max} = 265, 286, 326 \text{ nm}$) identificiran je u vrsti *A. annua*. Detektiran je glavni molekularni ion [M-H]⁻ pri m/z 447 koji odgovara molekularnoj masi astragalina (448) te je u skladu sa prethodnom znanstvenom literaturom za vrstu *A. annua* (184). Drugom fragmentacijom nastaje MS² spektar sa signalom pri m/z 285 [M-H-glukozid]⁻, koji odgovara molekularnoj masi kemferola (286). Njegova je prisutnost do sada utvrđena i u vrsti *A. absinthium* prema istraživanju He i sur. (184).

Kemferol-3-O-ramnozilglukozid ($UV_{\max} = 231, 342 \text{ nm}$) identificiran je u vrstama *A. abrotanum* i *A. vulgaris*. Detektiran je glavni molekularni ion [M-H]⁻ pri m/z 593. Drugom fragmentacijom nastaje MS² spektar sa signalom pri m/z 285, koji odgovara molekularnoj masi kemferola, a nastaje sekvencijalnim gubitkom ramnoze (146 Da) i glukoze (162 Da). Jednaka fragmentacija kemferol-3-O-ramnozilglukozida opisana je u radu Lee i sur. (185).

U ekstraktima vrstama *A. annua* i *A. maritima* utvrđena je prisutnost metoksiliranog flavonola **mearnsetin-O-heksozida** (metoksilirani miricetin-O-heksozid, $UV_{\max} = 210, 257,$

351 nm) koji je dao glavni molekularni ion $[M-H]^-$ pri m/z 493. Druga fragmentacija dala je MS^2 spektar sa signalom pri m/z 331 [aglikon- H] $^-$ koji ukazuje na gubitak heksoze (162 Da), dok daljnom fragmentacijom nastaje MS^3 spektar koji daje signal pri m/z 316 [aglikon- $H-15$] $^-$. Nadalje, u vrsti *A. annua* utvrđena je i prisutnost **mearnsetin-di-O-heksozida** (metoksilirani miricetin-di-O-heksozid, $UV_{max} = 232, 256, 324, 341$ nm) čiji je glavni molekularni ion $[M-H]^-$ detektiran pri m/z 655. Drugom fragmentacijom dobiven je signal pri m/z 493, dok je daljnjom fragmentacijom nastao MS^3 spektar sa signalom pri m/z 331 [aglikon- H] $^-$, što ukazuje na uzastopni gubitak po 162 Da (dvije heksoze) (Slika 23). Fragmentacije mearnsetin-O-heksozida i mearnsetin-di-O-heksozida u skladu su sa dosadašnjom literaturom (116).

U vrsti *A. annua* identificirani su **izoschaftozid** (apigenin-6-C-arabinozid-8-C-glukozid, $UV_{max} = 230, 273, 325$ nm), **schaftozid** (apigenin-6-C-glukozid-8-C-arabinozid, $UV_{max} = 227, 272, 330$ nm), **apigenin-6-C-pentozid-8-C-glukozid** ($UV_{max} = 226, 272, 329$ nm) te **apigenin-6-C-glukozid-8-C-pentozid** ($UV_{max} = n.d.$), čiji su glavni molekularni ioni $[M-H]^-$ detektirani pri m/z 563. Druga fragmentacija dala je MS^2 spektar sa glavnim produktnim signalom pri m/z 473 za izoschaftozid i apigenin-6-C-pentozid-8-C-glukozid te pri m/z 443 za schaftozid i apigenin-6-C-glukozid-8-C-pentozid, svi spojevi su, dali produktne ione $[M-H-60]^-$, $[M-H-90]^-$, $[M-H-120]^-$ i $[M-H-210]^-$, što je tipično za C-di-glikozidne flavone koji za razliku od O-glikozida ne gube cijele šećere nego se oni fragmentiraju putem mehanizma cijepanja unutar prstena (engl. *cross-ring cleavage*). Glavni fragmentacijski ioni razlikuju se u ovisnosti o položaju šećera. Produktni ioni $[M-H-60]^-$, $[M-H-90]^-$, $[M-H-120]^-$ bili su intenzivniji kod 6-C-pentozida, dok je $[M-H-60]^-$ ion karakterističan za derivat pentoze bio slabiji jer je šećer bio na poziciji 8, što je u skladu sa prethodnom literaturom (87, 114, 116, 186).

Vicenin-2 (apigenin-6,8-di-C-glukozid, $UV_{max} = 239, 295, 322$ nm) čiji je glavni molekularni ioni $[M-H]^-$ detektiran pri m/z 593, identificiran je u vrsti *A. absinthium*. Drugom fragmentacijom nastaje MS^2 spektar sa glavnim signalom pri m/z 473 te pri m/z 575 $[M-H-90]^-$, 503 $[M-H-90]^-$, 473 $[M-H-120]^-$ i 383 $[M-H-210]^-$, dok je ion $[M-H-60]^-$ karakterističan za derivat pentoze izostao. Prema našem znanju, apigenin-6,8-di-C-glukozid po prvi puta je identificiran u vrsti *A. absinthium*, prethodna znanstvena literatura potvrđuje njegovu identifikaciju u vrstama *A. annua* i *A. capillaris* (116, 187).

Eupatolitin-O-deoksiheksozid-O-heksozid ($UV_{max} = 254, 349$ nm) identificiran je u ekstraktu vrste *A. absinthium*. Detektiran je glavni molekularni ion $[M-H]^-$ pri m/z 653. Drugom fragmentacijom nastaje MS^2 spektar sa glavnim signalom pri m/z 345, koji odgovara molekularnoj masi eupatolitina (346), a nastaje cijepanjem unutar prstena fragmentacijom

šećernih komponenti na što upućuju produktni ioni $[M-H-156]^-$, $[M-H-170]^-$, $[M-H-199]^-$, $[M-H-221]^-$, $[M-H-236]^-$, $[M-H-266]^-$, što je u skladu sa znanstvenom literaturom (87).

U vrstama *A. abrotanum*, *A. absinthium* i *A. annua* utvrđeno je prisustvo **artemetina** (5-hidroksi-3,3',4',6,7-pentametoksiflavon, $UV_{max} = 212, 256, 272, 347$ nm). Glavni molekularni ioni $[M+H]^+$ detektiran pri m/z 389 koji odgovara molekularnoj masi artemetina (388) i u skladu je s prethodnom literaturom (88, 183). Drugom fragmentacijom nastaje MS^2 spektar s glavnim signalom pri m/z 356 $[M+H-33]^+$, te pri 374 $[M+H-15]^+$ i 325 $[M+H-64]^+$, što ukazuje na gubitak metoksilne skupine i metanola, što je karakteristično za visokometoksilirane flavonoide.

3,5-Dihidroksi-6,7,4'-trimetoksiflavon ($UV_{max} = 255, 273, 320$ nm) identificiran je u vrsti *A. annua*. Glavni molekularni ion $[M+H]^+$ detektiran je pri m/z 361. Drugom fragmentacijom dobiven je signal pri m/z 346 $[M+H-15]^+$, a daljnjim fragmentacijama nastaju spektri produktnih iona MS^3 i MS^4 pri m/z 331 $[M+H-15]^+$ te m/z 316 $[M+H-15]^+$. Uzastopni gubitak -CO skupina $[M+H-28]^+$ ukazuje na flavonsku jezgru te potvrđuje da je identificirani spoj trimetoksiflavon. Pregledom dostupne literature za prethodno identificirane sastavnice u *A. annua* spoj je identificiran kao 3,5-dihidroksi-6,7,4'-trimetoksiflavon (116).

U vrstama *A. abrotanum* i *A. vulgaris* utvrđena je prisutnost **penduletina** (5,4'-dihidroksi-3,6,7-trimetoksiflavon, $UV_{max} = 270, 356$ nm) čiji je glavni molekularni ioni $[M+H]^+$ detektiran pri m/z 345 koji odgovara molekularnoj masi penduletina (344), u skladu s prethodnom literaturom za vrstu *A. abrotanum* (150). Drugom fragmentacijom nastaju produktni ioni pri m/z 330 $[M+H-15]^+$, 312 $[M+H-33]^+$ i 281 $[M+H-64]^+$. To ukazuje na eliminaciju metoksilne grupe i metanola, što je karakteristično za visokometoksilirane flavonoide.

U skladu s istraživanjem Kunert i sur. (150), u vrsti *A. abrotanum* utvrđena je prisutnost **jaceidina** (5,7,4'-trihidroksi-3,6,3'-trimetoksiflavon, $UV_{max} = 258, 357$ nm). Detektiran je glavni molekularni ion $[M+H]^+$ pri m/z 345 koji odgovara molekularnoj masi jaceidina (360). Drugom fragmentacijom nastaje MS^2 spektar s glavnim signalom pri m/z 346 $[M+H-15]^+$, što ukazuje na eliminaciju metoksilne skupine. Nadalje, ispitivanjem ekstrakta *A. abrotanum* u pozitivnom načinu rada na istom retencijskom vremenu utvrđena je prisutnost tricina (5,7,4'-trihidroksi-3',5'-dimetoksiflavon, $UV_{max} = n.d.$). Njegov glavni molekularni ion $[M+H]^+$ detektiran je pri m/z 331 te odgovara molekularnoj masi tricina (330). Njegov UV-Vis spektar preklapao sa UV-Vis spektrom jaceidina. Fragmentacija tricina u skladu je s literaturnim podacima (188).

Jaceosidin (4',5,7-trihidroksi-3',6-dimetoksiflavon, $UV_{\max} = 248, 273, 343 \text{ nm}$) identificiran je u vrsti *A. maritima*. Njegov glavni molekularni ion $[M+H]^+$ detektiran je pri m/z 331 te odgovara molekularnoj masi jacosidina (330). Pri analizi rezultata u pozitivnom načinu rada za jaceosidin detektiran je samo glavni molekularni ion te UV-Vis spektar. Suprotno tome, analizom masenog spektra u negativnom načinu rada, gdje je glavni molekularni ion $[M-H]^-$ detektiran pri m/z 329, ustanovljene su druga i treća fragmentacija. Drugom fragmentacijom nastaje produktni ion pri m/z 314 $[M-H-15]^-$ koji ukazuje na eliminaciju metoksilne grupe. Trećom fragmentacijom nastaje MS^3 spektar koji prikazuje uzastopne gubitke $-CO$ $[M-H-28]^-$, tipične za razgradnju flavonske strukture. Signalni pik pri m/z 285 $[M-H-CO+H]^-$ imao je najviši intenzitet, dok je signalni pik pri m/z 151 (A-prsten) nastao Retro-Diels-Alder fragmentacijom, što ukazuje na flavonsku strukturu. Prema preglednom radu Siwan i sur. u vrsti *A. vulgaris* prethodno je identificiran jaceosidin (189).

U vrsti *A. maritima* identificiran je **ramnetin** (3,3',4',5-tetrahidroksi-7-metoksiflavon, $UV_{\max} = 239, 273, 345$). U negativnom načinu rada, glavni molekularni ion $[M-H]^-$ detektiran je pri m/z 315 koji odgovara molekularnoj masi ramnetina (316), dok u pozitivnom načinu rada nije detektiran. Drugom fragmentacijom nastao je produktni ion pri m/z 330 $[M-H-15]^-$ koji ukazuje na eliminaciju metoksilne skupine. Trećom fragmentacijom nastaje MS^3 spektar s više produktnih iona koji ukazuju na razgradnju flavonske strukture. Signal pri m/z 216 imao je najviši intenzitet, dok je za identifikaciju ramnetina bio važan signalni pik pri m/z 137 koji je karakterističan za kateholni B-prsten. Pregledom dosadašnje literature za vrste roda *Artemisia* utvrđena je prisutnost ramnetina u vrsti *A. campestris* (190), dok je prema našem znanju, po prvi puta identificiran u vrsti *A. maritima*.

U vrsti *A. maritima* utvrđena je prisutnost **hispidulina** (4',5,7-trihidroksi-6-metoksiflavon, $UV_{\max} = 245, 274, 338, 399 \text{ nm}$) i **eupatilina** (5,7-dihidroksi-3',4',6-trimetoksiflavon, $UV_{\max} = 249, 276, 338 \text{ nm}$). Njihovi glavni molekularni ioni $[M+H]^+$ detektirani su pri m/z 301 i m/z 345 koji odgovaraju molekularnoj masi hispidulina (300), odnosno eupatilina (344). Pri analizi u pozitivnom načinu rada, detektiran je samo glavni molekularni ion hispidulina te UV-Vis spektar, dok je analizom masenog spektra u negativnom načinu rada ustanovljen glavni molekularni ion $[M-H]^-$ pri m/z 299 te druga i treća fragmentacija. Drugom fragmentacijom detektiran je signalni pik pri m/z 284 $[M-H-15]^-$ koji ukazuje na eliminaciju jedne metoksilne grupe, dok trećom fragmentacijom nastaje MS^3 spektar sa više produktnih iona koji ukazuju na razgradnju flavonske strukture s uzastopnim gubicima $[M-H-28]^-$ ($-CO$). Pri tom je fragmentni ion najvišeg intenziteta detektiran pri m/z 283 $[M-H-H]^-$.

Pregledom znanstvene literature utvrđena je prisutnost hispidulina u vrsti *A. campestris* i *A. argyi* (190, 191), dok je prema našem saznanju, po prvi puta identificiran u vrsti *A. maritima*. Drugom fragmentacijom eupatilina nastao je produktni ion pri m/z 330 [M-H-15]⁻ koji ukazuje na eliminaciju jedne metoksilne grupe. Treća fragmentacija dala je MS³ spektar s više produktnih iona koji ukazuju na razgradnju flavonske strukture, gdje je najviši intenzitet imao signal pri m/z 169 [M-H-161]⁻, što je tipično za hidroksilirani B-prsten u položaju 4. Nadalje, uočen je produktni ion pri m/z 315 [M-H-15]⁻ koji ukazuje na eliminaciju još jedne metoksilne skupine. Prema našem saznanju, eupatilin je po prvi put identificiran u vrsti *A. maritima*. Eupatilin je prethodno dokazan u vrsti *A. annua*, a hispulidin u vrstama *A. absinthium* i *A. vulgaris* (192).

U vrstama *A. abrotanum*, *A. absinthium* i *A. annua* utvrđena je prisutnost **kasticina** i/ili **krizosplenetina** ($UV_{\max} = 256, 349, 376$ nm). Glavni molekularni ion [M+H]⁺ detektiran pri m/z 375 odgovarao molekularnoj masi kasticina (374), odnosno krizosplenetina (374). Drugom i trećom fragmentacijom odcjepljuju se dvije metoksilne grupe te nastaju signalni pikovi pri m/z 360, odnosno m/z 345 na MS³ spektru. Prema prethodnoj literaturi u vrstama roda *Artemisia* identificirani su kasticin i krizosplenetin (193-195), dok su rezultati Bilia i sur. (90) te Kunert i sur. (150) pokazali da u RP-18 koloni nije moguće razdvojiti ta dva izomera.

Tablica 19. Fenolne kiseline i flavonoidi identificirani u ekstraktima odabranih vrsta roda *Artemisia* metodom LC-PDA-ESI-MS/MS

Pik	Rt (min)	λ (nm)	[M-H] ^{-/+} (m/z)	MS ⁿ	Sastavnica
1	5,07	221, 256, 294, 319	353	MS ² [353]: 135, 179, 191 MS ³ [191]: 71, 85, 93, 111, 127 , 145, 155, 171, 173	neoklorogenska kiselina (5-kaveoilkina kiselina)
2	6,35	232, 256, 324, 341	655	MS ² [655]: 493 MS ³ [493]: 181, 209, 287, 315, 331 , 373, 433, 478	mearnsetin-di-O-heksozid
3	6,89	218, 234, 326	353, 707	MS ² [353]: 135, 179, 191 MS ³ [191]: 71, 85, 93, 111, 127 , 145, 155, 171, 173, 191	klorogenska kiselina (3-kaveoilkina kiselina)
4	7,18	236, 292, 322	353, 707	MS ² [353]: 135, 173 , 191 MS ³ [173]: 71, 83, 93 , 111, 137, 155, 173	kriptoklorogenska kiselina (4-kaveoilkina kiselina)
5	8,11	-	387	MS ² [387]: 119, 163, 179, 207 , 225, 287, 309, 369, 370 MS ³ [207]: 81, 109, 145, 163 , 189	heksozid tuberonske kiseline
6	8,32	239, 295, 322	593	MS ² [593]: 221, 325, 353, 383, 455, 473 , 503, 575 MS ³ [473]: 191, 221, 325, 353 , 383, 395, 455	vicenin-2 (apigenin-6,8-di-C-glukozid)
7	9,22	230, 273, 325	563	MS ² [563]: 353, 443, 473 , 503, 545 MS ³ [473]: 192, 275, 325, 353 , 383, 455 MS ⁴ [325]: 163, 191, 233, 297, 325 , 335	izoschaftozid (apigenin-6-C-arabinozid-8-C-glukozid)
8	9,60	227, 272, 330	563	MS ² [563]: 353, 443 , 473, 503, 545	schaftozid (apigenin-6-C- glukozid-8-C-arabinozid)
9	9,87	226, 272, 329	563	MS ² [563]: 191, 311, 353, 473 , 503, 545 MS ³ [473]: 161, 221, 311, 353 , 383, 413, 455 MS ⁴ [353]: 163, 191, 233, 297, 325 , 335	apigenin-6-C-pentozid-8-C-glukozid

Pik	Rt (min)	λ (nm)	[M-H] ^{-/+} (m/z)	MS ⁿ	Sastavnica
10	10,22	-	563	MS ² [563]: 191, 335, 353, 443 , 473, 545 MS ³ [443]: 353 , 383 MS ⁴ [353]: 297, 325	apigenin-6-C-glukozid-8-C-pentozid
11	10,22	235, 325	367	MS ² [367]: 191 MS ³ [191]: 71, 85, 93, 111, 127 , 155, 171, 173	5-feruloil kina kiselina
12	11,67	255, 351	609	MS ² [609]: 301 MS ³ [301]: 107, 151, 179 , 193, 229, 257, 273, 283 MS ⁴ [179]: 151	rutin (kvercetin-3-O-rutinozid)
13	12,56	256, 345	463	MS ² [463]: 301 MS ³ [301]: 107, 151, 179 , 193, 229, 273, 283 MS ⁴ [179]: 151	hiperozid (kvercetin-3-O-galaktozid)
14	12,75	251, 268, 295, 328	463	MS ² [463]: 301 MS ³ [301]: 107, 151, 179 , 193, 229, 257, 273, 283 MS ⁴ [179]: 151	izokvercitrin (kvercetin-3-O-glukozid)
15	12,63	210, 257, 351	493	MS ² [193]: 331, MS ³ [331]: 316 MS ⁴ [316]: 94, 110, 138, 166, 179, 194, 227, 243, 271, 287 , 298, 320	mearnsetin-O-heksozid
16	13,29	231, 342	593	MS ² [593]: 285 MS ³ [285]: 107, 135, 163, 213, 229, 257 , 267, 285 MS ⁴ [257]: 151	kemferol-3-O-ramnozilglukozid
17	13,49	254, 349	653	MS ² [653]: 287, 302, 315, 330, 345 , 346, 372, 387, 417, 432, 454, 483, 497 MS ³ [345]: 137, 181, 273, 302, 330 , 331	eupatolitin-O-deoksiheksozid-O-heksozid
18	14,44	265, 286, 326	447	MS ² [447]: 151, 179, 255, 284 , 327 MS ³ [284]: 93, 106, 135, 163, 197, 227, 255 , 257, 285	astragalin (kemferol-3-O-glukozid)
19	14,66	222, 242, 324	515	MS ² [515]: 173, 255, 335, 353 MS ³ [353]: 135, 173 , 179, 191 MS ⁴ [173]: 59, 71, 83, 93 , 111, 115, 155	3,4-di-kaveoilkina kiselina
20	15,32	221, 243, 328	515	MS ² [515]: 191, 335, 353 , 379, 471 MS ³ [353]: 136, 179, 191 , 263, 309, 335	1,5-di-kaveoilkina kiselina

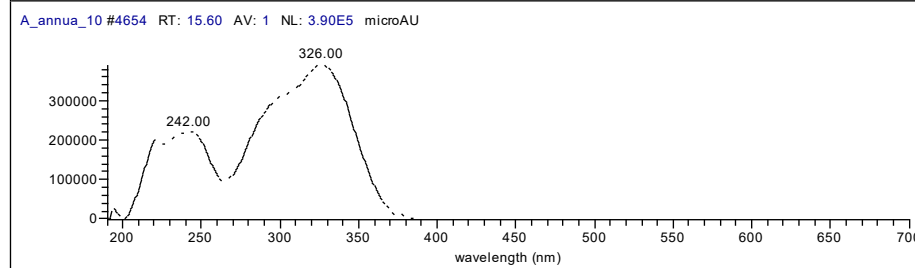
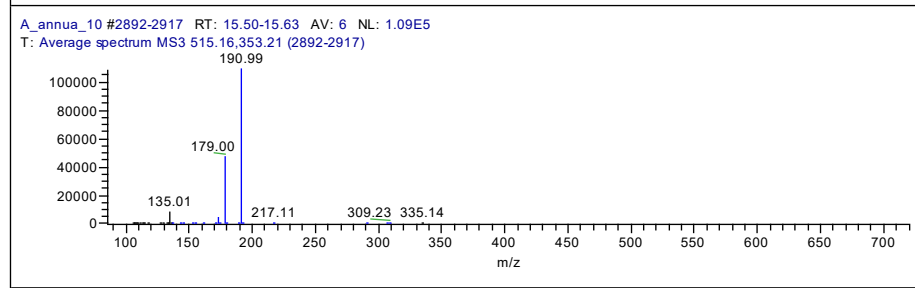
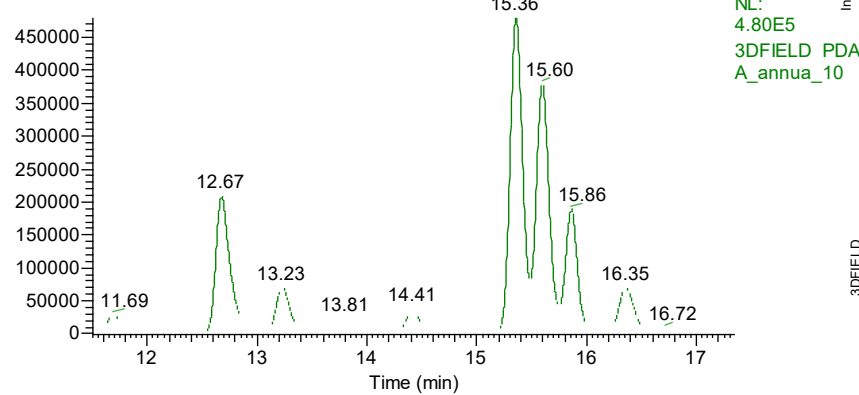
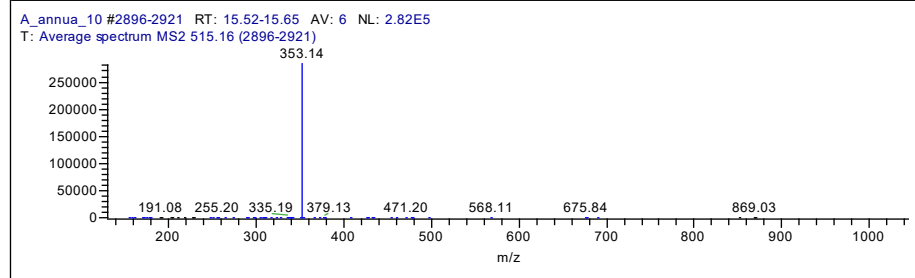
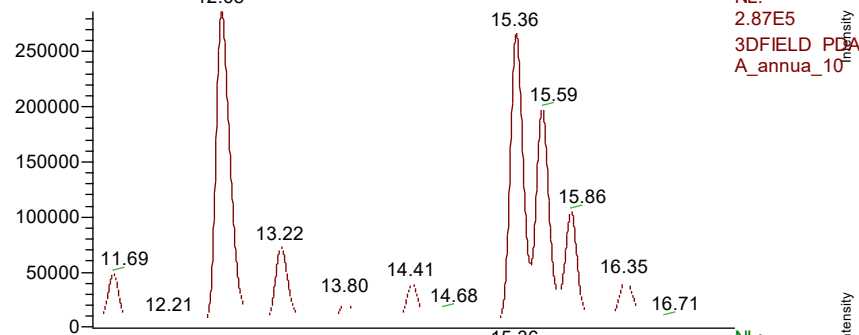
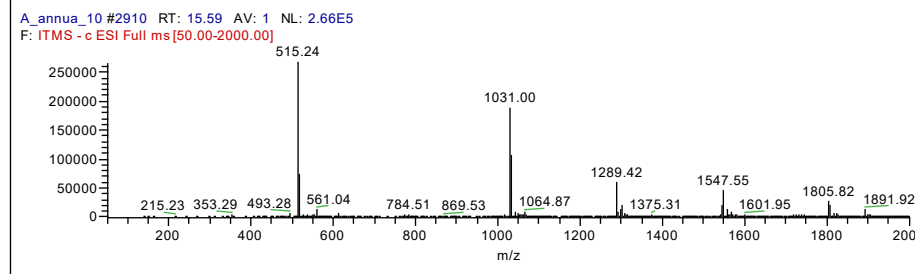
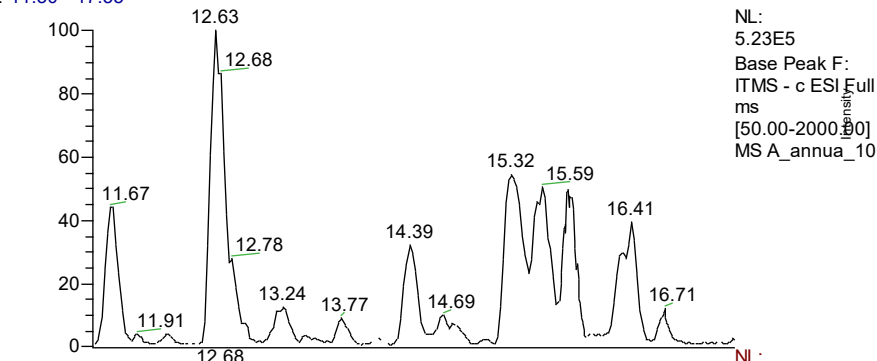
Pik	Rt (min)	λ (nm)	[M-H] ^{-/+} (m/z)	MS ⁿ	Sastavnica
				MS ⁴ [191]: 85, 93, 110, 127 , 155, 176, 173, 191	
21	15,59	242, 326	515	MS ² [515]: 353, MS ³ [353]: 135, 179, 191 MS ⁴ [191]: 71, 85, 93, 111, 127 , 155, 171, 173	3,5-di-kaveoilkina kiselina
22	16,35	244, 324	515	MS ² [515]: 203, 299, 353 , 434, 471 MS ³ [353]: 135, 173 , 179, 191 MS ⁴ [173]: 59, 71, 83, 93 , 111, 137, 155, 173	4,5-di-kaveoilkina kiselina
23	18,49	242, 326	529	MS ² [529]: 367 , 353, 335,191 MS ³ [367]: 191 , 173, 134 MS ⁴ [191]: 173, 171, 155, 127 , 111, 93, 85, 71	3-kaveoil-5-feruloilkina kiselina
24	19,20	245,302, 326	529	MS ² [529]:203, 255, 335, 353 , 367, 379 MS ³ [353]: 135, 173 , 179, 191, 217, 299, 335 MS ⁴ [173]: 59, 71, 83, 93 , 109, 111, 127, 137, 155, 173	3-feruloil-4-kaveoilkina kiselina
25	20,49	239, 273, 345	315	MS ² [315]: 300 MS ³ [300]: 111, 137, 174, 214, 216 , 228, 256, 272, 299, 300	ramnetin (3,5,3',4'-tetrahidroksi-7-metoksiflavon)
26	21,31	246,323	543	MS ² [543]: 349, 367 MS ³ [367]:134, 173, 191 , 193, 203, 203, 291	3,5-di-feruloilkina kiselina
27	21,56	246, 305, 323	677	MS ² [677]: 515 MS ³ [515]: 173, 203, 299, 335, 353 , 379, 469, 497	3,4,5-tri-O-kaveoilkina kiselina
28	23,93	245, 274, 338, 399	299	MS ² [299]: 284 MS ³ [284]: 94, 109, 137, 150, 184, 200, 212, 227, 256, 283	hispidulin (5,7,4'-Trihidroksi-6-metoksiflavon)
29	24,44	248, 273, 343	329	MS ² [329]: 314 MS ³ [314]: 151, 227, 243, 271, 285	jaceosidin (5,7,4'-trihidoksi-6,3'-dimetoksiflavon)

Pik	Rt (min)	λ (nm)	[M-H] ^{-/+} (m/z)	MS ⁿ	Sastavnica
30	26,30	255,273,320	361	MS ² [361]:344, MS ³ [344]: 329, MS ⁴ [329]: 301, 314 MS ⁵ [314]: 179, 202, 230, 286 , 297	3,5-dihidroksi-6,7,4'-trimetoksiflavon
31	26,41	-	329	MS ² [329]: 314 , 299, 229, MS ³ [314]: 299 , 271, 243, MS ⁴ [299]: 271 , 243, 199, 151, 101	tricin (5,7,4'-trihidroksi-3',5'-dimetoksiflavon)
32	26,41	258, 357	359	MS ² [359]:344	jaceidin (5,7,4'-trihidroksi-3,6,3'-trimetoksiflavon)
33	28,55	249, 276, 338	345	MS ² [345]:330 MS ³ [330]: 121, 165, 169 , 187, 231, 269, 287, 315, 330, 332	eupatilin (5,7-dihidroksi-3',4',6-trimetoksiflavon)
34	30,10	258, 359	375	MS ² [375]: 311, 360 MS ³ [360]: 137, 197, 217, 285, 313, 342 , 345, 359	kasticin/krizosplenetin
35	31,74	270, 356	345	MS ² [345]: 330 , 312, 281	penduletin (5,4'-dihidroksi-3,6,7'-trimetoksiflavon)
36	32,35	212, 256, 272, 347	389	MS ² [389]:325, 356 , 374 MS ³ [356]: 285, 299, 310, 328 , 341, 355	artemetin (5-hidroksi-3,6,7,3',4'-pentametoksiflavon)

C:\Users\...IA_annua_10

11/07/25 14:22:14

RT: 11.50 - 17.35

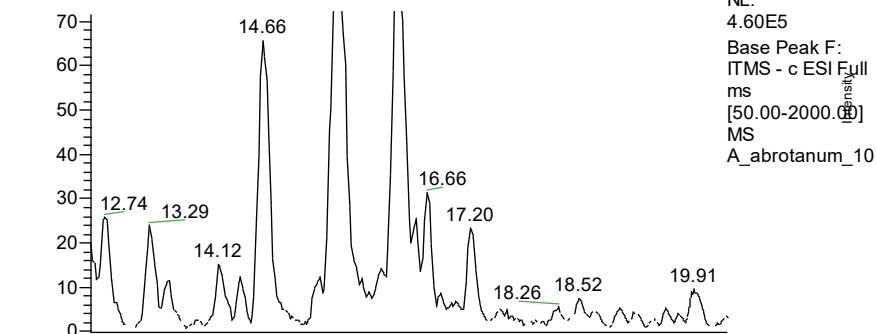
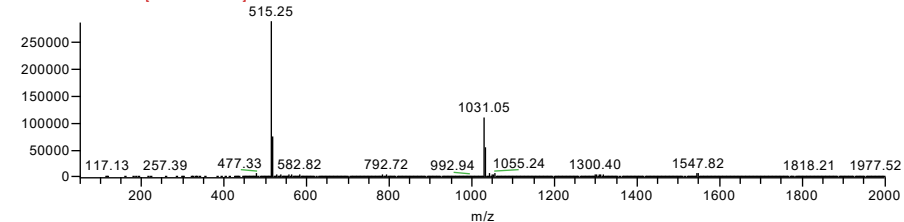
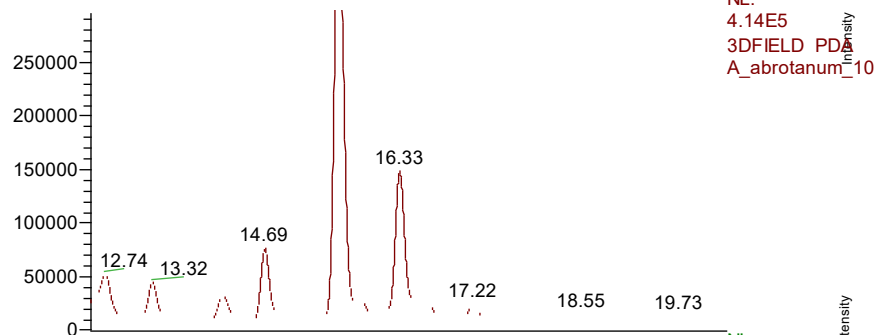
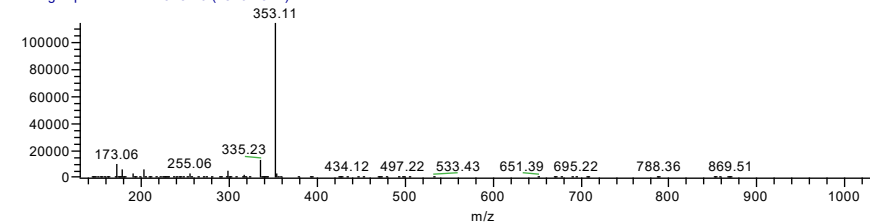
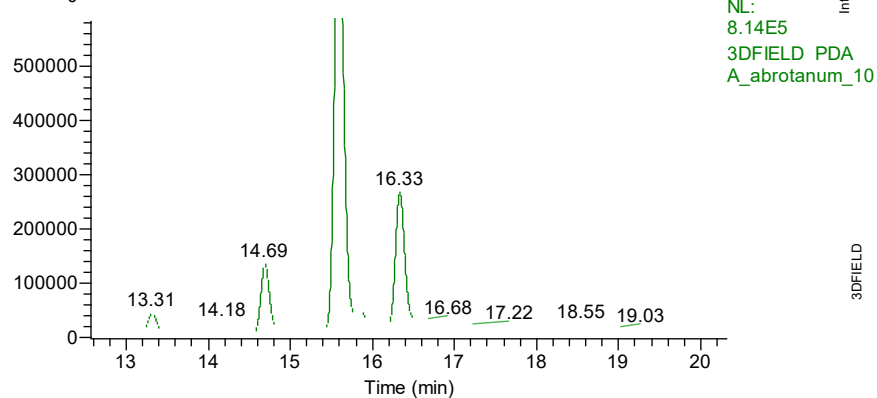
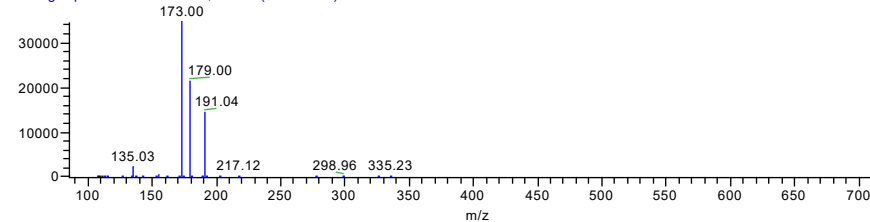


Slika 21. MS spektri i UV-Vis spektrar 3,5-di-kaveoilkina kiseline identificirane u vrsti *A. annua* metodom LC-PDA-ESI-MS/MS

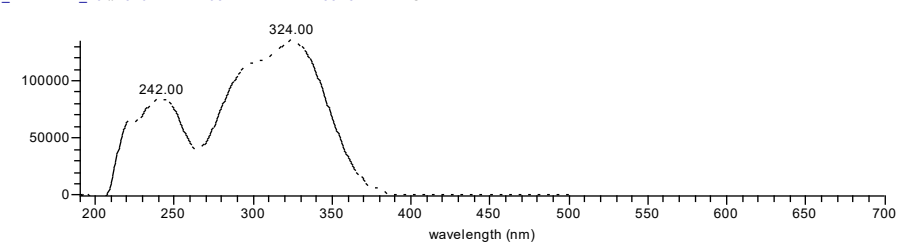
C:\Users\...A_abrotanum_10

11/07/25 15:11:32

RT: 12.56 - 20.32

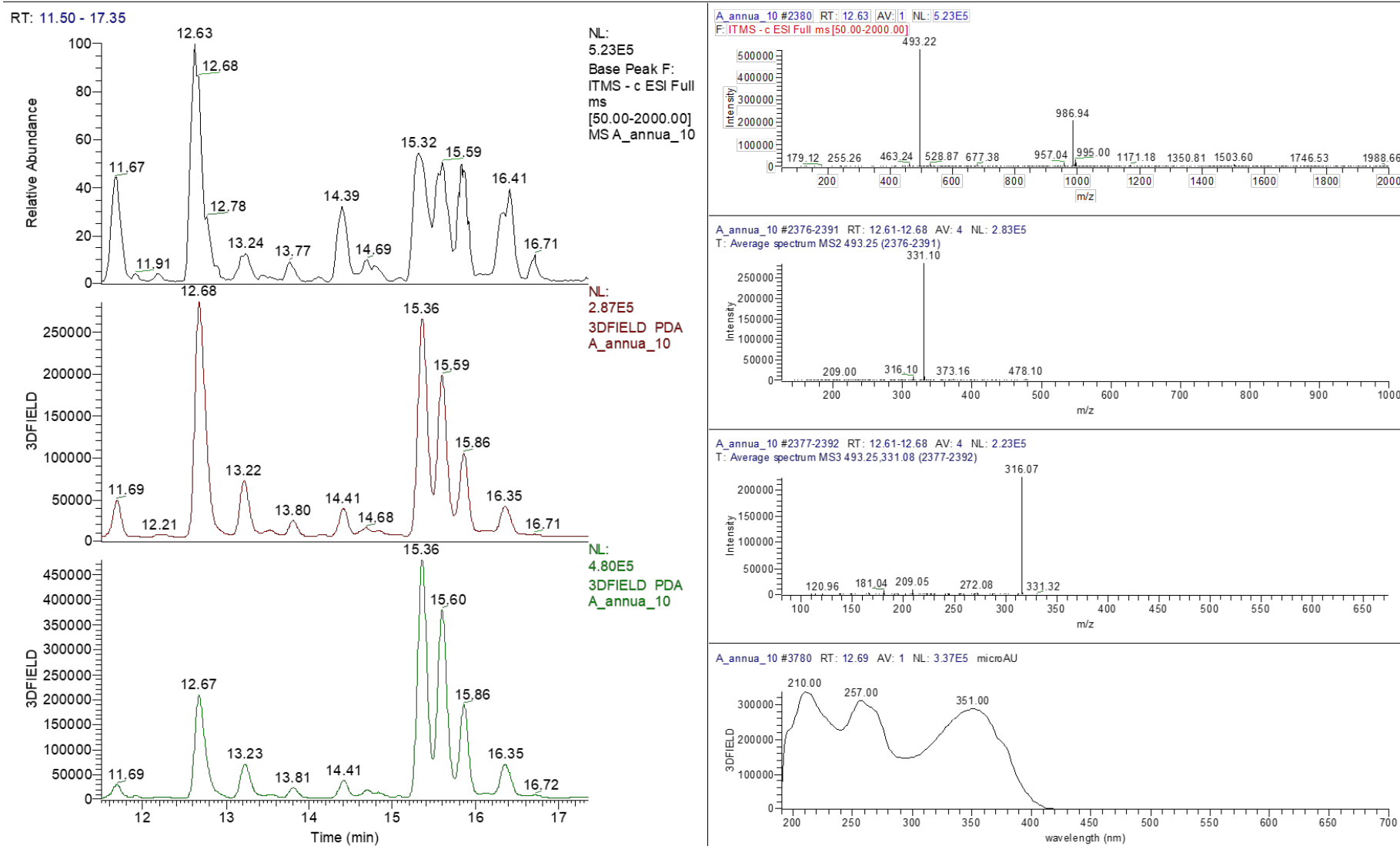

 A_abrotanum_10 #2840 RT: 14.69 AV: 1 NL: 2.85E5
 F: ITMS - c ESI Full ms[50.00-2000.00]

 A_abrotanum_10 #2826-2841 RT: 14.62-14.69 AV: 4 NL: 1.15E5
 T: Average spectrum MS2 515.26 (2826-2841)

 A_abrotanum_10 #2827-2842 RT: 14.62-14.69 AV: 4 NL: 3.46E4
 T: Average spectrum MS3 515.26,353.18 (2827-2842)


A_abrotanum_10 #4376 RT: 14.68 AV: 1 NL: 1.35E5 microAU


 Slika 22. MS spektri i UV-Vis spektar 4,5-di-kaveoilkina kiseline identificirane u vrsti *A. abrotanum* metodom LC-PDA-ESI-MS/MS

C:\Users\...A_annua_10

11/07/25 14:22:14

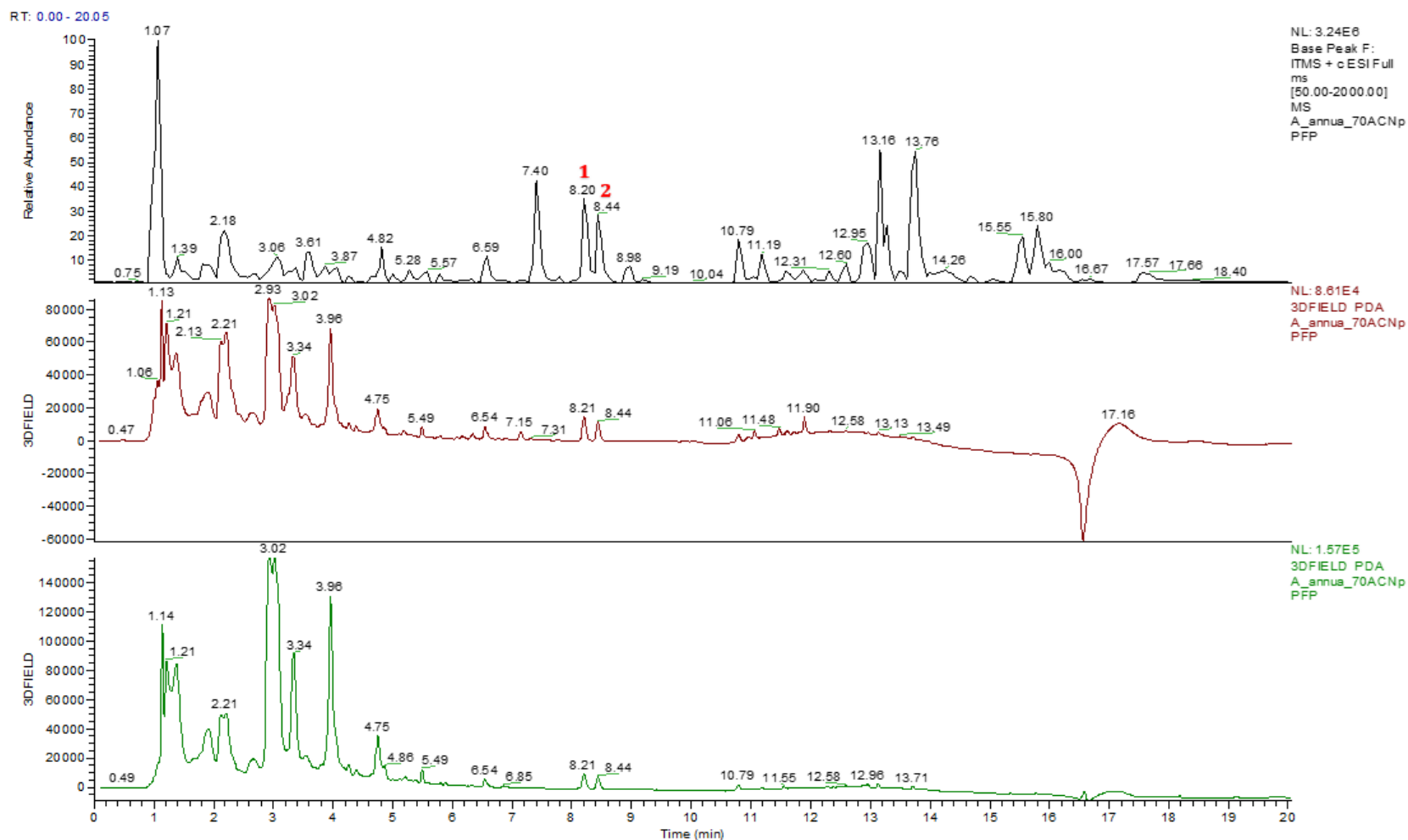
Slika 23. MS spektri i UV-Vis spektrar mearnsetin-O-heksozida identificiranog u vrsti *A. annua* metodom LC-PDA-ESI-MS/MS

Razdvajanje kasticina i krizosplenetina

Ispitivanjem etanolnih ekstrakata odabranih vrsta *Artemisia* na Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl C-18 koloni detektiran je pik na 30,10 minuti čiji je glavni molekularski ion $[M+H]^+$ pri m/z 375 te je odgovarao molekularskoj masi kasticina (374), odnosno krizosplenetina (374). Isti pik detektiran je u vrstama *A. abrotanum*, *A. absinthium* i *A. annua*.

Kasticin i krizosplenetin su visokometoksilirani izomerni flavoni prisutni u vrstama *Artemisia*. Kasticin je značajno bolje istražen te mu se pripisuju izražena protuupalna i antitumorska svojstva (196), dok je biomedicinski potencijal krizosplenetina manje istražen, moguće dijelom i zbog ranijih pogrešnih identifikacija. Primjena suvremenih LC-PDA-ESI-MS/MS i NMR metoda omogućila je njihovo jasno razdvajanje i identifikaciju, naglašavajući važnost precizne kemijske karakterizacije pri procjeni njihove biološke aktivnosti. Prema rezultatima Bilia i sur. (90) u RP-18 koloni nije moguće razdvojiti ova dva strukturna izomera. Stoga je za njihovo odjeljivanje primijenjena kolona Kinetex 1.7 μ m PFP 100Å s pentafluorofenilpropilnom nepokretnom fazom koja je selektivna za izomerne aromatske spojeve. Metoda prema Kunert i sur. (150) opisana je u poglavlju 3.2.5.3.

LC-PDA-ESI-MS/MS analizom u pozitivnom načinu i uspješno su odijeljena ova dva strukturna izomera. U vrstama *A. absinthium* i *A. annua* utvrđena je prisutnost oba spoja. Vrijeme zadržavanja (t_R) kasticina u koloni iznosilo je 8,20 minuta, a za krizosplenetin 8,44 minuta (Slika 24). Njihova identifikacija provedena je usporedbom dobivenih retencijskih vremena i masenih spektara s rezultatima koje su objavili Kunert i sur. (150). U vrstama *A. absinthium* i *A. annua* utvrđena je prisutnost oba spoja. Vrste *A. abrotanum* i *A. vulgaris* sadržavale su jedino kasticin, dok u vrsti *A. maritima* nije identificiran niti jedan od izomera. Iako analizom ekstrakta vrste *A. vulgaris* u C-18 koloni nije detektiran pik na 30,10 minuti koji bi ukazivao na prisutnost kasticina i/ili krizosplenetina, primjenom ove metode uočen je mali pik na 8,44 minuta koji je potvrdio prisutnost krizosplenetina.



Slika 24. Prikaz razdvajanja kasticina i krizosplenetina identificiranih u vrsti *A. annua* metodom LC-PDA-ESI-MS/MS

1- kasticin; 2- krizosplenetin

Iz Tablice 20 vidljivo je da se kromatografski profili odabranih vrsta roda *Artemisia* razlikuju. Ispitivane biljne vrste obilježava prisutnost derivata hidroksicimetne kiseline, posebice kaveoilkina kiselina. Neoklorogenska, klorogenska, kriptoklorogenska, 3,5-di-kaveoilkina i 4,5-di-kaveoilkina kiselina identificirane su u svim vrstama. Feruloil-kaveoilkina te kaveoil-feruloilkina kiselina dokazane su u vrsta *A. annua* i *A. maritima* dok je 5-feruloilkina kiselina bila prisutna u ispitivanim vrstama, izuzev vrste *A. absinthium*.

Ispitivani ekstrakti obilježeni su i prisutnošću flavonoidnih glikozida i aglikona, posebice iz skupine flavona. Vrsta *A. annua* sadržavala je sva četiri identificirana derivata apigenina. Prema našem saznanju, u ovom je istraživanju po prvi put u vrsti *A. absinthium* identificiran vicenin-2. Prema dobivenim rezultatima, vrste roda *Artemisia* sadrže i različite visokometoksilirane flavone. U vrsti *A. maritima* prvi put su identificirani hispidulin, eupatilin i jaceosidin. Izuzev vrste *A. maritima*, ispitivane vrste su sadržavale krizosplenetin, dok je kasticin identificiran u vrstama *A. absinthium* i *A. annua*. U vrstama *A. abrotanum*, *A. absinthium* i *A. annua* utvrđena je prisutnost artemetina, visokometoksiliranog flavona karakterističnog za vrste roda *Artemisia*.

Tablica 20. Usporedni prikaz fenolnih kiselina i flavonoida identificiranih u odabranim vrstama roda *Artemisia* L.

Sastavnica	<i>A.</i> <i>abrotanum</i>	<i>A.</i> <i>absinthium</i>	<i>A.</i> <i>annua</i>	<i>A.</i> <i>maritima</i>	<i>A.</i> <i>vulgaris</i>
Neoklorogenska kiselina (3-kaveoilkina kiselina)	+	+	+	+	+
Mearnsetin-di-O-heksozid	-	-	+	-	-
Klorogenska kiselina (5-kaveoilkina kiselina)	+	+	+	+	+
Kriptoklorogenska kiselina (4-kaveoilkina kiselina)	+	+	+	+	+
Vicenin-2 (apigenin-6,8-di-C-glukozid)	-	+	-	-	-
Izoschaftozid (apigenin-6-C-arabinozid-8-C- glukozid)	-	-	+	-	-
Schaftozid (apigenin-6-C- glukozid-8-C- arabinozid)	-	-	+	-	-
Apigenin-6-C-pentozid-8-C- glukozid	-	-	+	-	-
Apigenin-6-C-glukozid-8-C- pentozid	-	-	+	-	-
5-Feruloilkina kiselina	+	-	+	+	+
Rutin (kvercetin-3-O-rutinozid)	+	-	+	+	+
Hiperozid (kvercetin-3-O-galaktozid)	+	-	-	-	-
Izokvercitrin (kvercetin-3-O-glukozid)	+	+	+	+	+
Mearnsetin-O-heksozid	-	-	+	+	-
Kemferol-3-O-ramnozilglukozid	+	-	-	-	+
Eupatolitin-O-deoksiheksozid- O-heksozid	-	+	-	-	-
Astragalin (kemferol-3-O-glukozid)	-	-	+	-	-
3,4-Di-kaveoilkina kiselina	+	+	-	+	+
1,5-Di-kaveoilkina kiselina	-	-	+	-	-
3,5-Di-kaveoilkina kiselina	+	+	+	+	+
4,5-Di-kaveoilkina kiselina	+	+	+	+	+
3-Kaveoil-5-feruloilkina kiselina	-	-	+	-	-
3-Feruloil-4-kaveoilkina kiselina	-	-	-	+	-
Ramnetin (3,5,3',4'-tetrahidroksi-7- metoksiflavon)	-	-	-	+	-
3,5-Di-feruloilkina kiselina	-	-	+	-	-

Sastavnica	<i>A. abrotanum</i>	<i>A. absinthium</i>	<i>A. annua</i>	<i>A. maritima</i>	<i>A. vulgaris</i>
3,4,5-Tri-kaveoilkina kiselina	+	+	-	+	+
Hispidulin (5,7,4'-trihidroksi-6- metoksiflavon)	-	-	-	+	-
Jaceosidin (5,7,4'-trihidroksi-6,3'- dimetoksiflavon)	-	-	-	+	-
3,5-dihidroksi-6,7,4 - trimetoksiflavon	-	-	+	-	-
Tricin (5,7,4'-trihidroksi-3',5'- dimetoksiflavon)	+	-	-	-	-
Jaceidin (5,7,4'-trihidroksi-3,6,3'- trimetoksiflavon)	+	-	-	-	-
Eupatilin (5,7-dihidroksi-3',4',6- trimetoksiflavon)	-	-	-	+	-
Kasticin (5,3'-dihidroksi-3,6,7,4'- tetrametoksiflavon)	-	+	+	-	-
Krizosplenetin (5,4'-dihidroksi-3,6,7,3'- tetrametoksiflavon)	+	+	+	-	+
Penduletin (5,4'-dihidroksi-3,6,7- trimetoksiflavon)	+	-	-	-	+
Artemetin (5-hidroksi-3,6,7,3',4'- pentametoksiflavon)	+	+	+	-	-

4.1.5. Udjeli fenolnih kiselina određeni HPLC-DAD metodom

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina vrsta roda *Artemisia* provedena je HPLC-DAD metodom. U tu svrhu ispitivani su 70%-tni etanolni ekstrakti otopljeni u 10 %-tnom acetonitrilu prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.6.2. Pikovi odijeljenih fenolnih kiselina detektirani su DAD detektorom (190-500 nm), a detekcija istih provedena je na valnoj duljini 320 nm. Dobiveni kromatogrami ispitivanih ekstrakata prikazani su na Slikama 25 i 26. Udjeli pojedinih sastavnica u ispitivanim uzorcima određeni su metodom vanjskog standarda (klorogenska kiselina) prema baždarnom pravcu ovisnosti mase i površine ispod kromatografskog pika. Referentna klorogenska kiselina pokazala je linearan odziv u ispitivanom području koncentracija ($R^2 = 0,9997$). Udjeli fenolnih kiselina izračunati su prema baždarnom pravcu klorogenske kiseline ($y = 6,615 x - 1,5479$) te su vrijednosti pomnožene faktorom 1,46. Dobiveni rezultati izraženi su u miligramima po gramu suhog ekstrakta. Udjeli pojedinih sastavnica u nadzemnim dijelovima ispitivanih biljnih vrsta prikazani su u Tablici 21.

3,5-Di-kaveoilkina kiselina bila je najzastupljenija fenolna kiselina većini ispitanih ekstrakata (2,241-8,059 mg/g). S obzirom na njezin udio u pojedinoj vrsti vrijedio je sljedeći niz: *A. vulgaris* > *A. absinthium* > *A. abrotanum* > *A. maritima* > *A. annua*. Dobiveni rezultati u skladu su sa dosadašnjom literaturom koja također ukazuje na visoku prisutnost fenolnih kiselina u odabranim vrstama roda *Artemisia* (92, 107, 109, 110, 112-114). Za razliku od ostalih vrsta, u vrsti *A. annua* najzastupljenija sastavnica bila 1,5-di-kaveoilkina kiselina (2,375 mg/g).

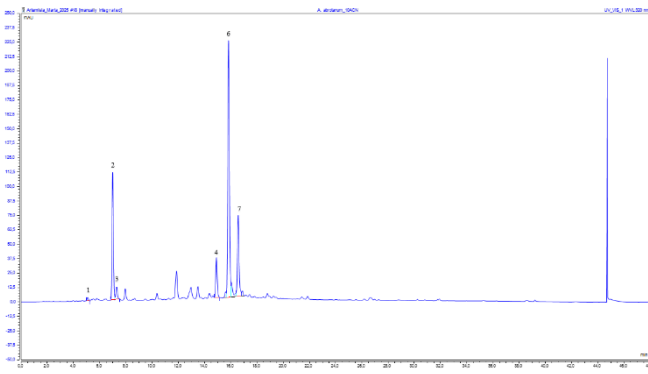
Tablica 21. Udjeli fenolnih kiselina u etanolnim ekstraktima vrsta roda *Artemisia* određeni HPLC-DAD metodom

Sastavnica	Udio (mg/g) ± SD				
	<i>A. abrotanum</i>	<i>A. absinthium</i>	<i>A. annua</i>	<i>A. maritima</i>	<i>A. vulgaris</i>
Neoklorogenska kiselina (3-kaveoilkina kiselina)	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,29 ± 0,01
Klorogenska kiselina (5-kaveoilkina kiselina)	1,21 ± 0,03	0,84 ± 0,02	1,24 ± 0,03	1,34 ± 0,02	1,72 ± 0,02
Kriptoklorogenska kiselina (4-kaveoilkina kiselina)	0,25 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,23 ± 0,01
3,4-Di-kaveoilkina kiselina	0,74 ± 0,01	0,47 ± 0,02	-	0,46 ± 0,01	0,63 ± 0,01
1,5-Di-kaveoilkina kiselina	-	-	2,38 ± 0,02	-	-
3,5-Di-kaveoilkina kiselina	4,00 ± 0,05	5,11 ± 0,04	1,93 ± 0,01	2,24 ± 0,03	8,06 ± 0,05
4,5-Di-kaveoilkina kiselina	1,42 ± 0,02	1,14 ± 0,02	0,49 ± 0,01	1,72 ± 0,02	1,72 ± 0,02

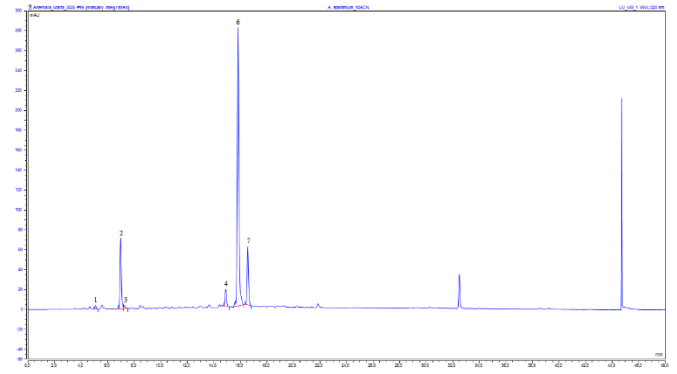
Dosadašnja kvalitativna i kvantitativna ispitivanja ekstrakata nadzemnih dijelova odabranih vrsta roda *Artemisia* uglavnom su bila usmjerena na identifikaciju i kvantifikaciju seskviterpenskih laktona, dok je značajno manji broj dostupnih podataka o polifenolnim sastavnicama, a za vrstu *A. maritima* nije pronađen nijedan relevantan znanstveni rad.

Prethodnim istraživanjem određeno je da 50 %-tni etanolni ekstrakt vrste *A. abrotanum* sadrži 103,47 µg/mL klorogenske kiseline i 1,43 µg/mL kavene kiseline (106). Sukladno rezultatima našeg istraživanja, Ticolea i sur. (2024) potvrdili su prisutnost neoklorogenske (295,38 µg/g), klorogenske (3834,38 µg/g), kriptoklorogenske (208,88 µg/g), 3,4-di-kaveoilkina (1320,08 µg/g), 3,5-di-kaveoilkina (2303,19 µg/g) i 4,5-di-kaveoilkina kiseline (443,79 µg/g) u vrsti *A. abrotanum*, gdje je također 3,5-di-kaveoilkina kiselina bila najzastupljenija (108). U 80 %-tnom metanolnom ekstraktu nadzemnih dijelova *A. absinthium* također je određen udio klorogenske (3,42 g/kg), 4,5-di-kaveoilkina kiseline (0,61 g/kg), 1,5-di-kaveoilkina kiselinee (2,12 g/kg) (112). Prethodno je određeno da 70 %-tni etanolni ekstrakt nadzemnih dijelova sadrži 0,077 mg/g klorogenske kiseline, što je 10 puta manje nego u našem ekstraktu (110). Prema rezultatima Ticolea i sur. (2025), u 70 %-tnim etanolnim ekstraktima listova i cvjetova vrste *A. annua* sadržaj odabranih fenolnih kiselina iznosio je: neoklorogenska (55,45-57,90 µg/g), klorogenska (1064,44-2232,88 µg/g), kriptoklorogenska (46,31-55,72 µg/g), 3,4-di-kaveoilkina (1302,00-4652,25 µg/g), 3,5-di-kaveoilkina (805,10-1006,37 µg/g) i 4,5-di-kaveoilkina (369,09-425,25 µg/g). Navedeni rezultati približno su korelirali s

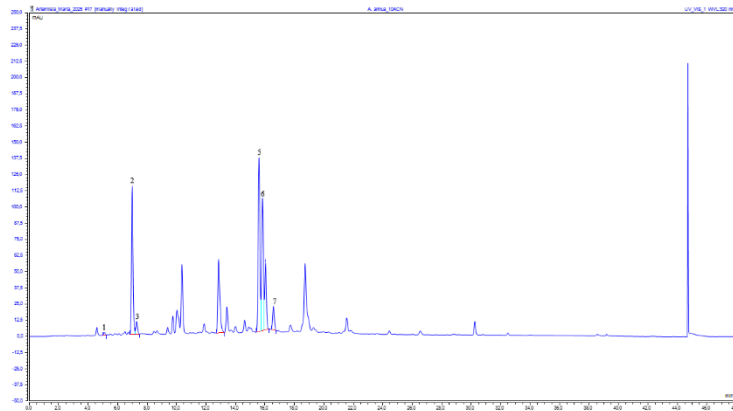
rezultatima našega istraživanja, no važna razlika je u identifikaciji najzastupljenije fenolne kiseline koja je prema našem istraživanju u cvatućim vršnim dijelovima jednogodišnjeg pelina bila 1,5-di-kaveoilkina kiselina, dok je prema Ticolea i sur. to bila 3,4-di-kaveoilkina kiselina (114). Nadalje, u vodenom ekstraktu vrste *A. annua* određeni su sljedeći udjeli fenolnih kiselina: 3-kaveoilkina (72 mg/L), 5-kaveoilkina (9,0 mg/L), 4-kaveoilkina (20,4 mg/L), 3,5-di-kaveoilkina (57 mg/L) i 4,5-di-kaveoilkina kiselina (20,4 mg/L) (92). Prethodno je također određeno da 50 %-tni etanolni ekstrakti vrste *A. vulgaris* i *A. absinthium* sadrži 301,1-350,6 µg/mL, odnosno 259,4-297,9 µg/mL klorogenske kiseline (113).



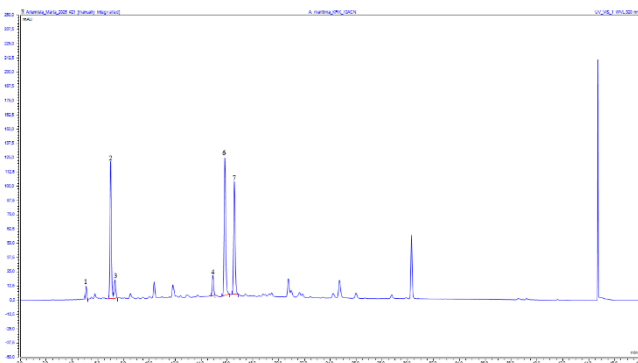
(a)



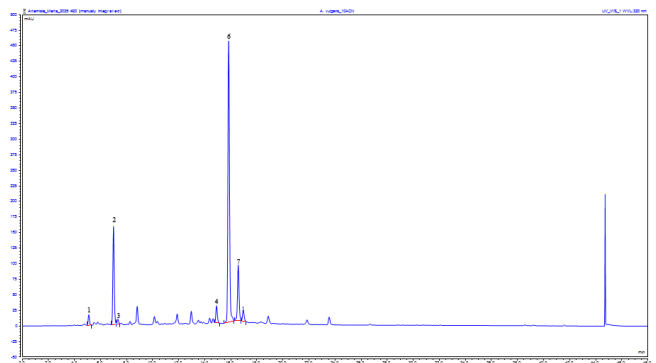
(b)



(c)



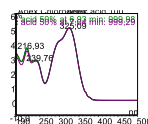
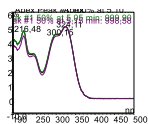
(d)



(e)

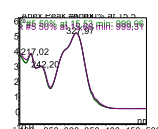
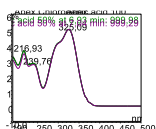
Slika 25. HPLC kromatogrami (UV = 320 nm) odabranih vrsta roda *Artemisia*: *A. abrotanum* (a), *A. absinthium* (b), *A. annua* (c), *A. maritima* (d) i *A. vulgaris* (e)

1- Neoklorogenska kiselina; 2- Klorogenska kiselina; 3- Kriptoklorogenska kiselina; 4-3,4-di-kaveoilkina kiselina; 5- 1,5-di-kaveoilkina kiselina; 6- 3,5-di-kaveoilkina kiselina; 7- 4,5-di-kaveoilkina kiselina.



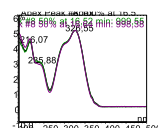
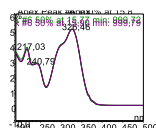
(a)

(b)



(c)

(d)



(e)

(f)

Slika 26. UV-VIS spektri fenolnih kiselina u ispitivanim vrstama roda *Artemisia* L.:

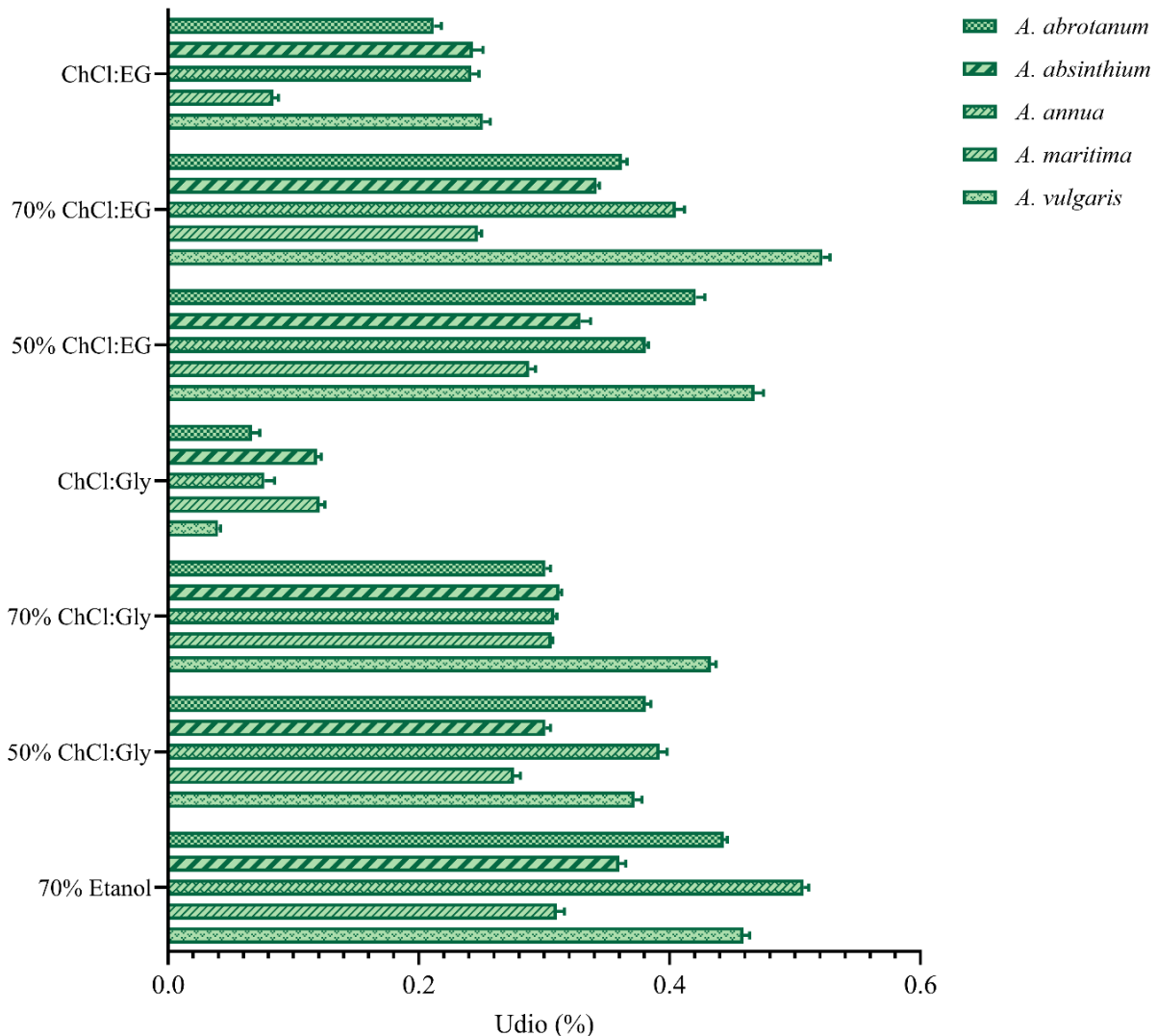
(a) neoklorogenska kiselina, (b) klorogenska kiselina, (c) kriptoklorogenska kiselina, (d) 1,5-di-kaveoilkina kiselina, (e) 3,5-di-kaveoilkina kiselina, (f) 4,5-di-kaveoilkina kiselina

4.1.6. Spektrofotometrijski određeni udjeli fenolnih kiselina u ekstraktima niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Kvalitativnom i kvantitativnom analizom 70%-tnih etanolnih ekstrakata vrsta roda *Artemisia* utvrđeno je da su fenolne kiseline najzastupljenije polifenolne sastavnice u ispitivanim ekstraktima. Za ekstrakciju polifenolnih sastavnica iz nadzemnih dijelova biljaka najčešće se primjenjuje etanol (EtOH), međutim, hlapljivost i zapaljivost su njegova negativna obilježja. Stoga, u novije vrijeme sve veću pozornost privlače niskotemperaturna eutektična otapala (DES-ovi) koja udovoljavaju gotovo svim zahtjevima zelene kemije te se smatraju otapalima 21. stoljeća.

Niskotemperaturna eutektička otapala odabrana za ekstrakciju fenolnih kiselina iz ispitivanih vrsta roda *Artemisia* pripravljena su miješanjem kolin klorida (ChCl) s etilen-glikolom (EG), odnosno glicerolom (Gly) u molarnom omjeru $\text{ChCl:EG/ChCl:Gly} = 1:3$. U svrhu optimizacije ekstrakcije fenolnih kiselina iz praškasto usitnjenih cvatućih vršnih dijelova odabranih pelina korišteno je šest različitih DES-ova na bazi kolin-klorida, u usporedbi sa 70 %-tnim etanolom kao konvencionalnim otapalom za ekstrakciju polifenola. Zbog visoke viskoznosti DES-ova dodano je 30 % i 50 % destilirane vode (*V/V*) kako bi se smanjila viskoznost i potencijalno povećala učinkovitost ekstrakcije. Prethodnim istraživanjima utvrđeno je da prisutnost vode u DES-ovima mijenja njihovu polarnost i topljivost biljnih polifenola (197, 198). Kako bi se usporedila učinkovitost ekstrakcije ispitivanih otapala, u ekstraktima su određene ukupne fenolne kiseline prema Europskoj farmakopeji (2), a rezultati su prikazani na Slici 27.

Ukupni udjeli fenolnih kiselina u ekstraktima odabranih vrsta *Artemisia* iznosili su 0,12–0,52 % (ChCl:EG) i 0,04–0,43 % (ChCl:Gly), dok je ekstrakcijom 70 %-tnim etanolom dobiveno 0,31–0,51 % fenolnih kiselina. Najviši udio fenolnih kiselina dobiven je ekstrakcijom vrste *A. vulgaris* 70 %-tnim ChCl:EG, a najmanji udio ekstrakcijom 100 %-tnim ChCl:Gly iste vrste. Ekstrakcija vrsta *A. abrotanum* i *A. annua* 70 %-tnim ChCl:EG također je rezultirala visokim udjelom fenolnih kiselina (0,42 % i 0,41 %). Navedeni DES se pokazao najbolji i za vrstu *A. maritima* (0,34 %). Najviše fenolnih kiselina iz vrste *A. absinthium* postignuto je ekstrakcijom 50 %-tnim ChCl:EG, a iz vrste *A. maritima* ekstrakcijom 70 %-tnim ChCl:Gly (0,30 %). Bolji prinos fenolnih kiselina postignut je primjenom DES-ova jedino za vrstu *A. vulgaris*, dok su za ostale vrste DES-ovi bili usporedivi s 70 %-tnim etanolom.



Slika 27. Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u odabranim vrstama roda *Artemisia* ovisno o vrsti ekstrakcijskog otapala

Najučinkovitija ekstrakcija fenolnih kiselina postignuta je 70 %-tnim EtOH i vodom razrijeđenim ChCl:EG ($p < 0,05$). Nerazrijeđena smjesa ChCl i Gly pokazala se kao najslabije otapalo za ekstrakciju fenolnih kiselina jer je dosegnuta 8-39 % učinkovitost 70 %-tnog EtOH, ali je dodatak vode povoljno djelovao na ekstrakciju. Općenito je dodavanje 30 % i 50 % vode DES-ovima poboljšavalo njihov ekstrakcijski kapacitet, što se može objasniti smanjenjem viskoznosti DES-ova i slabljenjem vodikovih veza između komponenti. Prethodnim istraživanjem ustanovljeno je da dodatak vode do 50 % ne narušava strukturu DES-ova (199). Ukupno gledano, kod svih ispitivanih biljnih vrsta, vodom razrijeđeni DES-ovi na bazi kolin-

klorida i etilen-glikola postigli su približnu ili bolju ekstrakciju fenolnih kiselina u usporedbi s EtOH, a vodom razrijeđeni DES-ovi na bazi kolin-klorida i glicerola 60-95 % njegove učinkovitosti. Iako je prisutnost vode poboljšala učinkovitost ekstrakcije kod oba tipa ispitivanih DES-ova, otapala na bazi kolin-klorida s etilen-glikolom (EG) bila su učinkovitija od onih koja sadrže glicerol (Gly). Stoga je vidljivo da prisutnost poliola u DES-ovima predstavlja prednost pri ekstrakciji fenolnih kiselina iz odabranih vrsta roda *Artemisia*, te je u skladu s istraživanjem Barbieri i sur. (2020), koji su pokazali veću učinkovitost ekstrakcije 90 %-tnim ChCl:otapalo koje sadrži 1,2-propandiol u usporedbi s 90 %-tnim ChCl:Gly (1:2) (197).

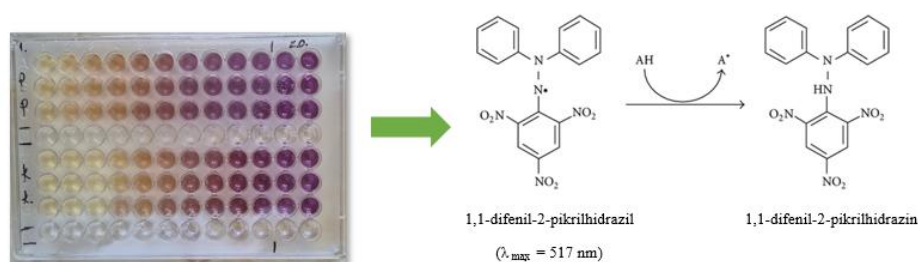
Dobiveni rezultati ukazuju da je razrjeđivanje DES-ova rezultiralo sustavima u kojima postoje interakcije između alkoholnih komponenti (EG ili Gly) i vode, koje se ne razlikuju značajno od interakcija u 70 %-tnom etanolu. Stoga su suptilne razlike u interakcijama alkohol/voda vjerojatno određivale ekstrakcijsku učinkovitost niskotemperaturnih eutektičkih otapala (148). Iako razlike u ukupnom sadržaju fenolnih kiselina u ekstraktima vrsta roda *Artemisia* nisu bile izražene, za većinu ekstrakata one su bile statistički značajne ($p < 0,05$). Rezultati ovoga istraživanja ukazuju na mogućnost zamjene konvencionalnih organskih otapala, poput etanola, novim i ekološki prihvatljivim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (ChCl:Gly i ChCl:EG) u ekstrakciji bioaktivnih polifenolnih sastavnica iz vrsta roda *Artemisia*.

4.2. BIOLOŠKI UČINCI ODABRANIH VRSTA RODA *Artemisia* L.

4.2.1. Antioksidacijski učinak

4.2.1.1. Sposobnost hvatanja DPPH radikala

DPPH^{*} (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) predstavlja komercijalno dostupan stabilni slobodni radikal koji, zbog prisutnosti nesparenog elektrona, pokazuje izraženu apsorpciju u vidljivom dijelu spektra, pri čemu se maksimum apsorpcije nalazi na 517 nm, što otopini daje karakterističnu ljubičastu boju. U reakciji s antioksidansima dolazi do prijenosa atoma vodika ili elektrona na DPPH radikal, pri čemu nastaje stabilna dijamagnetična molekula 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin, svijetložute boje. Kao posljedica redukcije DPPH radikala dolazi do obezbojenja otopine, a stupanj promjene boje proporcionalan je antioksidativnoj aktivnosti ispitivane tvari (Slika 28).



Slika 28. Mehanizam hvatanja slobodnog radikala DPPH u mikrotitarskoj pločici

Sposobnost hvatanja slobodnog DPPH radikala za etanolne ekstrakte odabranih vrsta roda *Artemisia*, u usporedbi s klorogenskom kiselinom i referentnim antioksidansom troloksom, ispitana je u rasponu koncentracija 800-6,25 $\mu\text{g/mL}$. Svi ispitani ekstrakti i klorogenska kiselina pokazali su sposobnost hvatanja slobodnog DPPH radikala te su izračunate vrijednosti inhibicije, ovisne o koncentraciji, a dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 22. Za svaki ekstrakt određena je koncentracija pri kojoj je postignut 50 %-tni učinak, a njihove IC_{50} vrijednosti kretale su se između 46,76 i 132,83 $\mu\text{g/mL}$ te je u skladu s dobivenim rezultatima prema jakosti djelovanja vrijedio sljedeći niz: *A. vulgaris* (46,76 $\mu\text{g/mL}$) > *A. maritima* (72,66 $\mu\text{g/mL}$) > *A. abrotanum* (110,19 $\mu\text{g/mL}$) > *A. annua* (112,99 $\mu\text{g/mL}$) > *A. absinthium* (132,85 $\mu\text{g/mL}$). Sposobnost hvatanja DPPH radikala klorogenske kiseline te referentnog antioksidansa trolokso ispitana je u rasponu koncentracija 0,78-100 $\mu\text{g/mL}$, dok je pri 8,14 $\mu\text{g/mL}$ postignut 50 %-tni dok je IC_{50} trolokso ostvarena pri 3,49 $\mu\text{g/mL}$, te su djelovali bolje od testiranih biljnih ekstrakata.

Tablica 22. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala određena za 70 %-tne etanolne ekstrakte odabranih vrsta roda *Artemisia*, klorogensku kiselinu i referentni antioksidans (troloks)

Uzorak	Sposobnost hvatanja DPPH (%) ± SD							
	Koncentracijski niz (µg/mL)							
	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25
<i>A. abrotanum</i>	91,65 ± 0,12 ^c	85,77 ± 0,94 ^{a,b}	63,69 ± 0,82 ^c	50,87 ± 2,81 ^{b,c}	38,79 ± 1,40 ^c	24,81 ± 0,82 ^c	18,36 ± 0,35 ^b	11,41 ± 1,05 ^{a,b}
<i>A. absinthium</i>	93,51 ± 0,07 ^{a,b}	87,43 ± 0,44 ^a	61,95 ± 0,39 ^c	43,29 ± 0,18 ^d	36,39 ± 0,45 ^{c,d}	25,75 ± 1,15 ^{b,c}	14,50 ± 2,51 ^b	12,12 ± 1,53 ^{a,b}
<i>A. annua</i>	92,87 ± 0,14 ^b	87,42 ± 1,21 ^a	70,70 ± 0,26 ^b	47,93 ± 0,91 ^{c,d}	34,00 ± 0,95 ^d	22,38 ± 0,10 ^c	15,49 ± 0,83 ^b	10,23 ± 0,46 ^{a,b}
<i>A. maritima</i>	94,64 ± 0,22 ^a	83,13 ± 0,48 ^b	68,57 ± 1,53 ^b	57,77 ± 4,37 ^{a,b}	43,22 ± 1,97 ^b	29,93 ± 3,22 ^b	17,24 ± 2,18 ^b	7,92 ± 3,68 ^b
<i>A. vulgaris</i>	93,97 ± 0,95 ^{a,b}	85,02 ± 2,16 ^{a,b}	75,04 ± 0,92 ^a	64,13 ± 2,49 ^a	54,79 ± 1,25 ^a	39,08 ± 1,74 ^a	25,22 ± 2,71 ^a	14,54 ± 3,06 ^a
Uzorak	Koncentracijski niz (µg/mL)							
	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78
Klorogenska kiselina	100,0 ± 0,12	95,37 ± 0,03	89,45 ± 0,06	58,64 ± 1,44	39,09 ± 1,12	32,90 ± 1,82	26,39 ± 2,51	14,63 ± 1,84
Troloks	99,60 ± 0,13	96,24 ± 0,29	95,26 ± 0,41	93,78 ± 0,44	68,65 ± 1,81	57,57 ± 0,52	29,79 ± 2,40	12,28 ± 0,95

Srednje vrijednosti unutar stupca označene različitim slovom se međusobno statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

4.2.1.2. Sposobnost hvatanja NO radikala

NO• (dušikov(II) oksid) važna je signalna molekula koja sudjeluje u regulaciji brojnih fizioloških procesa, endogeno se sintetizira u endotelnim stanicama krvnih žila, kao i u živčanom i imunološkom sustavu, pri čemu ima značajnu ulogu u održavanju fizioloških funkcija. Njegova prisutnost doprinosi očuvanju zdravlja kardiovaskularnog i živčanog sustava te općem stanju organizma. No, istraživanja su također dokazala da njegovo pojačano stvaranje može doprinijeti razvoju upalnih stanja i neurodegenerativnih bolesti. NO• lako ulazi u reakciju sa superoksidnim anionom, pri čemu nastaju reaktivni dušikovi spojevi, što dodatno pridonosi razvoju oksidacijskog stresa. Za razliku od sintetskog DPPH radikala, NO• predstavlja biološki značajan slobodni radikal (200, 201). Stoga je u ovom radu ispitana sposobnost inhibicije slobodnog NO radikala. U eksperimentalnim uvjetima, natrijev nitroprusid koristi se kao izvor NO radikala, koji pri fiziološkom pH (7,4) spontano oslobađa NO radikal koji zatim reagira s kisikom pod utjecajem svjetlosti, pri čemu oksidacijom nastaju nitritni ioni. Njihova koncentracija u reakcijskoj smjesi određuje se spektrofotometrijski primjenom Griessove reakcije, pri čemu nastaje ljubičasto obojen kompleks. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 545 nm u čitaču mikrotitarskih pločica te je proporcionalan koncentraciji nitrita u uzorku.

Sposobnost hvatanja NO slobodnog radikala ispitivanih vrsta *Artemisia*, klorogenske kiseline te referentnog antioksidansa (troloks) ispitana je u rasponu koncentracija 400-12,5 µg/mL. Svi ispitivani ekstrakti i čisti spojevi pokazali su sposobnost inhibicije stvaranja nitritnih iona ovisno o primijenjenoj koncentraciji, a dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 23. Zabilježena je njihova sposobnost inhibicije u rasponima 67,29-82,68 %, 66,69-83,33 %, 53,99-75,58 % i 35,14-62,12 % pri koncentracijama 400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL i 50 µg/mL, gdje je vrsta *A. annua* pokazala najslabije djelovanje, dok je pri koncentracijama 400 i 200 µg/mL vrsta *A. maritima* imala najveći intenzitet djelovanja dok je u nižim koncentracijama (100 i 50 µg/mL) zamijenila vrsta *A. vulgaris*. Za svaki ekstrakt određena je koncentracija pri kojoj je postignut 50 %-tni učinak, a njihove IC₅₀ vrijednosti kretale su se između 36,55 – 106,19 µg/mL te je u skladu s dobivenim rezultatima prema jakosti djelovanja vrijedio sljedeći niz: *A. vulgaris* (36,55 µg/mL) > *A. absinthium* (48,70 µg/mL) > *A. maritima* (52,30 µg/mL) > *A. abrotanum* (92,32 µg/mL) > *A. annua* (106,19 µg/mL). Antiradikalna sposobnost klorogenske kiseline, kao i kod DPPH radikala, pokazala se većom od troloksa (IC₅₀ = 38,06 µg/mL) i testiranih biljnih ekstrakata, te je pri 29,97 µg/mL postignut 50 %-tni učinak.

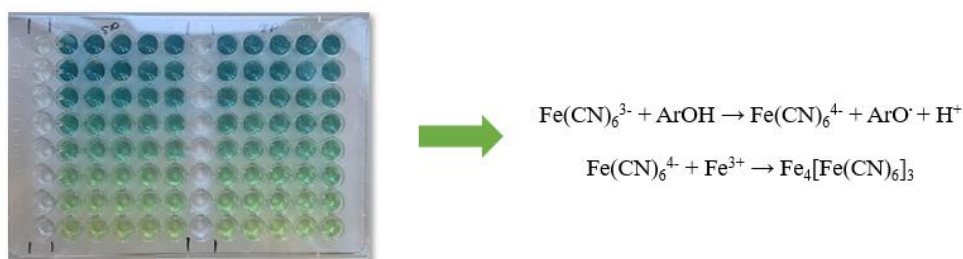
Tablica 23. Sposobnost hvatanja slobodnih NO radikala određena za 70 %-tne etanolne ekstrakte odabranih vrsta roda *Artemisia*, klorogensku kiselinu i referentni antioksidans (troloks)

Uzorak	Sposobnost hvatanja NO (%) ± SD					
	Koncentracijski niz (µg/mL)					
	400	200	100	50	25	12,5
<i>A. abrotanum</i>	73,41 ± 2,50 ^c	71,50 ± 1,56 ^{d,e}	55,99 ± 0,68 ^e	38,10 ± 1,10 ^f	20,45 ± 3,09 ^e	4,59 ± 0,20 ^d
<i>A. absinthium</i>	76,40 ± 0,32 ^c	76,17 ± 1,85 ^{c,d}	68,77 ± 1,59 ^d	44,32 ± 1,93 ^e	28,50 ± 1,89 ^d	11,69 ± 3,71 ^c
<i>A. annua</i>	67,25 ± 2,09 ^d	66,69 ± 0,03 ^e	53,99 ± 1,08 ^e	35,14 ± 0,02 ^f	12,52 ± 2,08 ^f	2,41 ± 0,04 ^d
<i>A. maritima</i>	82,68 ± 2,36 ^b	83,33 ± 0,08 ^b	70,97 ± 0,17 ^{c,d}	50,76 ± 2,21 ^d	36,45 ± 0,17 ^c	6,45 ± 2,86 ^{c,d}
<i>A. vulgaris</i>	82,12 ± 0,45 ^b	76,50 ± 2,12 ^c	75,58 ± 0,82 ^b	62,12 ± 0,80 ^b	41,84 ± 1,40 ^b	20,65 ± 0,18 ^b
Klorogenska kiselina	85,80 ± 1,36 ^b	78,35 ± 3,13 ^c	74,02 ± 1,28 ^{b,c}	57,66 ± 1,54 ^c	47,67 ± 2,35 ^a	32,50 ± 1,94 ^a
Troloks	97,83 ± 1,22 ^a	96,81 ± 1,02 ^a	95,68 ± 1,81 ^a	74,02 ± 1,91 ^a	18,06 ± 1,11 ^c	10,99 ± 0,02 ^c

Srednje vrijednosti unutar stupca označene različitim slovom se međusobno statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

4.2.1.3. Sposobnost redukcije iona željeza(III)

Redukcijska snaga usko je povezana s antioksidacijskim svojstvima, budući da spojevi izražene redukcijske sposobnosti mogu reagirati s prekursorima peroksida te na taj način spriječiti formiranje reaktivnih spojeva. U svrhu određivanja sposobnosti redukcije iona željeza(III), koristi se metoda u kojoj reducensi u reakcijskoj smjesi s kalijevim heksacijanoferatom reduciraju Fe^{3+} u Fe^{2+} . Nastali Fe^{2+} potom, uz dodatak soli trovalentnog željeza, tvori plavi kompleks poznat kao Berlinsko modriilo. Intenzitet obojenja ovog kompleksa može se pratiti spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 700 nm u čitaču mikrotitarskih pločica. Tijekom reakcije, početna žuta boja ispitivanih otopina prelazi u nijanse zelene i plave, ovisno o njihovoj redukcijskoj sposobnosti, dok veće vrijednosti apsorbancije ukazuju na snažniju moć apsorbancije (146, 202) (Slika 29).



Slika 29. Reakcija redukcije iona željeza(III) u mikrotitarskoj pločici

Redukcijska snaga ispitivanih biljnih ekstrakata, klorogenske kiseline i referentnog antioksidansa troloksa ispitana je u rasponu koncentracija 400-3,125 $\mu\text{g/mL}$. U Tablici 24. prikazani su dobiveni rezultati, koji ukazuju na snažnu sposobnost redukcije iona željeza(III) biljnih ekstrakata s IC_{50} vrijednostima od 21,41-51,58 $\mu\text{g/mL}$. Uočena je izražena linearna ovisnost aktivnosti svih testiranih ekstrakata o primijenjenoj koncentraciji ($R^2 = 0,9861-1$). Vrste *A. vulgaris* ($\text{IC}_{50} = 21,41 \mu\text{g/mL}$), *A. maritima* ($\text{IC}_{50} = 25,82 \mu\text{g/mL}$) i *A. annua* ($\text{IC}_{50} = 28,47 \mu\text{g/mL}$) pokazala su bolja redukcijska svojstva od ostalih vrsta pelina ($\text{IC}_{50} = 38,96 - 51,58 \mu\text{g/mL}$). Rezultati ovoga istraživanja istaknula su snažna redukcijska svojstva klorogenske s IC_{50} vrijednošću 8,88 $\mu\text{g/mL}$, koja je djelovala približno jednako kao i referentni antioksidans troloks ($\text{IC}_{50} = 8,75 \mu\text{g/mL}$).

Tablica 24. Redukcijska sposobnost etanolnih ekstrakata odabranih vrsta *Artemisia*, klorogenske kiseline i referentnog antioksidansa troloksa

Uzorak	Apsorbancija na 700 nm ± SD							
	Koncentracijski niz (µg/mL)							
	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125
<i>A. abrotanum</i>	1,891 ± 0,006 ^c	1,323 ± 0,017 ^d	0,846 ± 0,008 ^{b,c}	0,501 ± 0,021 ^d	0,289 ± 0,011 ^c	0,197 ± 0,020 ^c	0,101 ± 0,010 ^b	0,068 ± 0,019 ^c
<i>A. absinthium</i>	1,554 ± 0,008 ^d	1,433 ± 0,009 ^c	0,889 ± 0,009 ^b	0,594 ± 0,009 ^c	0,394 ± 0,007 ^d	0,226 ± 0,024 ^c	0,215 ± 0,026 ^a	0,153 ± 0,004 ^a
<i>A. annua</i>	1,869 ± 0,021 ^c	1,697 ± 0,011 ^b	0,818 ± 0,007 ^c	0,778 ± 0,013 ^b	0,418 ± 0,006 ^c	0,327 ± 0,023 ^b	0,208 ± 0,014 ^a	0,113 ± 0,007 ^b
<i>A. maritima</i>	2,099 ± 0,008 ^a	1,712 ± 0,010 ^b	0,834 ± 0,026 ^c	0,787 ± 0,012 ^b	0,443 ± 0,012 ^b	0,356 ± 0,016 ^{a,b}	0,203 ± 0,005 ^a	0,114 ± 0,007 ^b
<i>A. vulgaris</i>	1,974 ± 0,021 ^b	1,798 ± 0,014 ^a	0,961 ± 0,029 ^a	0,932 ± 0,052 ^a	0,538 ± 0,003 ^a	0,399 ± 0,027 ^a	0,235 ± 0,029 ^a	0,141 ± 0,004 ^a
Uzorak	Koncentracijski niz (µg/mL)							
	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78
	Klorogenska kiselina	2,577 ± 0,002	1,723 ± 0,013	0,933 ± 0,004	0,685 ± 0,032	0,362 ± 0,045	0,216 ± 0,008	0,152 ± 0,028
Troloks	2,417 ± 0,088	1,911 ± 0,006	1,068 ± 0,019	0,669 ± 0,011	0,388 ± 0,008	0,248 ± 0,008	0,102 ± 0,002	0,077 ± 0,007

Srednje vrijednosti unutar stupca označene različitim slovom se međusobno statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

4.2.1.4. Sposobnost keliranja iona željeza(II)

Ioni prijelaznih metala, poput željezovih(II) iona, pokazuju izravno prooksidativno djelovanje jer kataliziraju stvaranje visoko reaktivnih kisikovih spojeva. Osim toga, željezo ima osobito važnu ulogu u procesima lipidne peroksidacije zbog svoje visoke reaktivnosti. Ioni Fe^{2+} reagira s vodikovim peroksidom pri čemu nastaje hidroksilni radikal, jedan od najreaktivnijih slobodnih radikala, što je također poznato kao Fentonova reakcija ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$). Osim toga, Fe^{2+} može reagirati i s lipidnim hidroperoksidima, pri čemu nastaju reaktivni lipidni radikali koji dodatno sudjeluju u oksidacijskim oštećenjima lipida. Povećana prisutnost Fe^{2+} iona i posljedično pojačan oksidacijski stres mogu doprinijeti razvoju brojnih bolesti, jer dolazi do oštećenja lipida, proteina i DNA. Takva oštećenja narušavaju normalnu funkciju stanica i tkiva. Oksidacija lipida doprinosi razvoju ateroskleroze, dok je kronični oksidacijski stres povezan s dugotrajnim upalnim procesima u organizmu (203, 204). Nadalje, znanstvena istraživanja su dokazala da se prijelazni ioni metala, poput željezovih(II) i bakrovih(I) iona, nakupljaju u β -amiloidnim plakovima u mozgu te mogu uzrokovati nastanak ili pridonijeti napredovanju Alzheimerove bolesti, kao i drugih neurodegenerativnih bolesti poput Creutz-Jakubove bolesti i Parkinsonove bolesti (205, 206).

Za određivanje sposobnosti keliranja željeza koristi se metoda s ferozinom, koji kvantitativno stvara kompleks s Fe^{2+} ionima, pri čemu nastaje ružičasto obojeni kompleks. U prisutnosti kelirajućih tvari dolazi do inhibicije nastanka ovog kompleksa, što se očituje smanjenjem intenziteta obojenja. Promjena se prati spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 562 nm te je smanjenje apsorbancije proporcionalno kelirajućoj aktivnosti ispitivane tvari. Kelirajuća aktivnost biljnih ekstrakata u koncentracijskom nizu 400-12,5 $\mu\text{g/mL}$ te klorogenske kiseline i referentnog kelatora etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA) 100-3,125 $\mu\text{g/mL}$ (Tablica 25). Većina ispitanih vrsta roda *Artemisia* pokazala je kelirajuću sposobnost u svim ispitanim koncentracijama, izuzev vrste *A. absinthium*. Vrsta *A. maritima* ostvarila je 50 %-tnu sposobnost keliranja pri 64,25 $\mu\text{g/mL}$, dok su ostale vrste bile manje djelotvorne. S obzirom na dobivene IC_{50} vrijednosti, odnosno prema jakosti djelovanja vrijedio je sljedeći niz: *A. maritima* (64,25 $\mu\text{g/mL}$) > *A. abrotanum* (132,89 $\mu\text{g/mL}$) > *A. annua* (137,98 $\mu\text{g/mL}$) > *A. absinthium* (144,55 $\mu\text{g/mL}$) > *A. vulgaris* (183,62 $\mu\text{g/mL}$). Kelirajuća sposobnost ispitivanih ekstrakata bila je značajno slabija u usporedbi s djelovanjem klorogenske kiseline ($\text{IC}_{50} = 27,30 \mu\text{g/mL}$) te EDTA ($\text{IC}_{50} = 18,36 \mu\text{g/mL}$).

Tablica 25. Kelirajuća sposobnost etanolnih ekstrakata odabranih vrsta *Artemisia*, klorogenske kiseline i referentnog kelatora EDTA

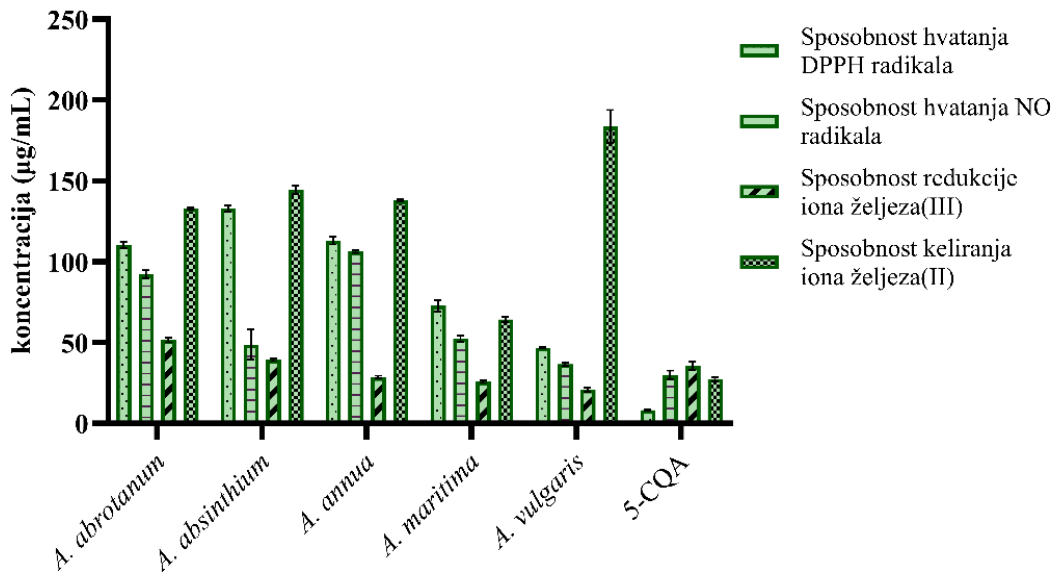
Uzorak	Sposobnost keliranja iona željeza(II) (%) ± SD					
	Koncentracijski niz (µg/mL)					
	400	200	100	50	25	12,5
<i>A. abrotanum</i>	94,25 ± 0,87 ^a	75,03 ± 1,04 ^b	41,49 ± 1,39 ^b	14,20 ± 1,21 ^c	5,88 ± 0,87 ^b	2,33 ± 1,73 ^b
<i>A. absinthium</i>	90,36 ± 0,18 ^b	71,21 ± 0,71 ^c	29,79 ± 1,24 ^d	19,15 ± 1,06 ^b	1,75 ± 0,88 ^c	n.a.
<i>A. annua</i>	93,07 ± 1,89 ^{a,b}	75,33 ± 0,52 ^b	33,17 ± 0,69 ^c	16,04 ± 0,86 ^c	7,41 ± 1,37 ^b	3,04 ± 1,03 ^b
<i>A. maritima</i>	82,36 ± 0,86 ^c	81,99 ± 1,03 ^a	75,79 ± 1,20 ^a	44,77 ± 0,69 ^a	15,69 ± 2,24 ^a	8,39 ± 0,86 ^a
<i>A. vulgaris</i>	81,72 ± 0,13 ^c	56,78 ± 0,40 ^d	29,62 ± 0,66 ^d	14,71 ± 1,59 ^c	8,06 ± 0,66 ^b	2,91 ± 0,80 ^b
Uzorak	Koncentracijski niz (µg/mL)					
	100	50	25	12,5	6,25	3,125
	Klorogenska kiselina	81,96 ± 0,35	72,06 ± 0,18	50,13 ± 0,71	32,58 ± 2,13	29,32 ± 1,42
EDTA	95,57 ± 0,70	73,60 ± 0,56	60,69 ± 0,42	44,43 ± 1,67	23,55 ± 2,79	17,44 ± 0,56

Srednje vrijednosti unutar stupca označene različitim slovom se međusobno statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$); **n.a.** – nije akvitan

Reaktivni kisikovi spojevi (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) i slobodni radikali visoko su reaktivne molekule s nesparenim elektronom, koje nastaju u ljudskom organizmu kao rezultat normalnog metabolizma kisika. Zbog prekomjernog stvaranja ROS-a dolazi do oksidacijskog stresa te posljedično nastanka i napredovanja različitih kroničnih bolesti i stanja, poput kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti, ateroskleroze, dijabetesa te upalnih i malignih bolesti. Uz endogene antioksidanse u organizmu, u smanjenju oksidacijskog stresa i nastalih posljedica mogu pomoći i egzogeni antioksidansi iz prirodnih izvora (120). Pregledom dostupne literature ustanovljeno je da odabrane vrste roda *Artemisia* posjeduju antioksidacijska svojstva. Prema ispitivanju Ticolea i sur. (114) za vrste *A. annua* i *A. absinthium* utvrđeno je da se njihova sposobnost hvatanja slobodnih DPPH i NO radikala te redukcije iona željeza(III) razlikuje ovisno o vrsti biljnog materijala koji je ekstrahiran. Etanolni ekstrakti listova pokazali su bolje antioksidacijsko djelovanje od etanolnih ekstrakata cvjetova. Dobivene IC₅₀ vrijednosti etanolnih ekstrakata cvjetova i listova vrste *A. absinthium*, izraženi u mikrogramima troloksa po gramu suhe biljne droge, varirali su između 87,54-189,64 µgTE/g (DPPH), 66,45-145,12 µgTE/g (NO) te 62,45-46,45 µgTE/g (redukcijska snaga). Za vrstu *A. annua* IC₅₀ vrijednosti bile su 73,08-77,28 µgTE/g (DPPH), 68,23-64,93 µgTE/g (NO) te 30,74-21,43 µgTE/g (redukcijska snaga). Za vrstu *A. annua* dostupni su brojni podaci o sposobnosti hvatanja slobodnih radikala, pri čemu IC₅₀ vrijednosti značajno ovise o korištenom otapalu. Etanolni ekstrakt pokazao je vrlo snažna antioksidacijska svojstva s IC₅₀ vrijednostima 5,17 µg/mL (DPPH) i 79,94 µg/mL (NO) (119). Prema istraživanju Iqbal i sur. (2012), utvrđeno da najbolju sposobnost hvatanja DPPH radikala ima metanolni ekstrakt, dok je heksanski ekstrakt pokazao najslabije djelovanje (120). Jamei i Anvari (2018) utvrdili su razliku u djelovanju etanolnog ekstrakta cvijeta i lista vrste *A. absinthium* na hvatanje slobodnih DPPH i NO radikala, postotak inhibicije je varirao između 87,36 i 92,56 % (DPPH) i 42,80-43,85 % (NO), gdje je ekstrakt lista pokazao bolji učinak (118). Prema rezultatima Hbika i sur. (109) vodeni i etil-acetatni ekstrakti nadzemnih dijelova vrste *A. absinthium* pokazali su dobru sposobnost hvatanja DPPH radikala (IC₅₀=0,352-0,167 mg/mL) te sposobnost redukcije iona željeza(III) (IC₅₀=3,361-0,923 mg/mL). Za vrstu *A. abrotanum* pregledom dosadašnje literature pronađen je samo jedan dostupan rad koji ukazuje na dobar antioksidacijski potencijal etanolnog ekstrakta s IC₅₀ vrijednostima 69,27 µgTE/mL (DPPH), 56,66 µgTE/mL (NO) te 67,13 µgTE/mL (redukcijska snaga) (107). Prema istraživanju Oyedemi i sur. (123) za vrstu *A. vulgaris* dokazana je sposobnost hvatanja DPPH radikala (IC₅₀ = 0.976 µg/mL) ekstrakta cijele biljke, dok je prema istraživanju Melguizo-Melguizo i sur. (2020) metanolni ekstrakt listova vrste *A. vulgaris* pokazao 50 %-tni učinak u koncentraciji 16,00 µg/mL (121). Pored toga, vodeni ekstrakt

nadzemnih dijelova vrste *A. vulgaris* prema Temraz i sur. (2008) pokazao je dobru sposobnost hvatanja slobodnih DPPH i NO radikala s IC_{50} vrijednostima 11,4 $\mu\text{g/mL}$ i 125 $\mu\text{g/mL}$ (122). Za vrstu *A. maritima* dostupni su samo podaci za sposobnost hvatanja DPPH radikala tri različite vrste ekstrakata (metanolni, kloroformski i etil-acetatni) te su IC_{50} vrijednosti bile 73,1-80,7 ekvivalenata askorbinske kiseline (%) (21). Dosadašnja ispitivanja antioksidacijske sposobnosti odabranih vrsta roda *Artemisia* najviše se odnose na hvatanje slobodnih radikala, sposobnost redukcije iona željeza(III) i lipidne peroksidacije, dok za test sposobnosti keliranja iona željeza(II) nema dostupne znanstvene literature. Pregledom literature utvrđeno je da rezultati ispitivanja značajno variraju ovisno o eksperimentalnim uvjetima (otapalo, koncentracija, način ekstrakcije) te da postoji razlika u izražavanju dobivenih rezultata, što otežava izravnu usporedbu rezultata ovoga istraživanja sa dosadašnjom literaturom.

Ovim ispitivanjem utvrđeno je da su vrste roda *Artemisia* dobri antioksidansi, čiji antioksidacijski kapacitet prvenstveno potječe od visokog udjela fenolnih kiselina, što su potvrdili dobiveni rezultati za klorogensku kiselinu čije su IC_{50} vrijednosti za četiri provedena antioksidacijska testa bila u granicama od 8,14 $\mu\text{g/mL}$ do 29,06 $\mu\text{g/mL}$. Vrsta *A. vulgaris* koja je prema rezultatima HPLC analize udjelom sadržavala najviše fenolnih kiselina pokazala je i najveću sposobnost hvatanja slobodnih radikala te redukcije iona željeza(III) s IC_{50} vrijednostima od 21,41 $\mu\text{g/mL}$ do 36,5 $\mu\text{g/mL}$. Vrsta *A. maritima* pokazala najbolju sposobnost keliranja iona željeza(II) ($IC_{50} = 64,25 \mu\text{g/mL}$), dok je vrsta *A. vulgaris* najslabije djelovala ($IC_{50} = 183,62 \mu\text{g/mL}$) od svih ispitivanih vrsta. U odnosu na rezultate prethodnih istraživanja, ispitani 70 %-tni etanolni ekstrakti pokazali su slabiju sposobnost hvatanja DPPH radikala. U svrhu ispitivanja antioksidacijskog potencijala provedena su četiri testa: sposobnost hvatanja DPPH i NO radikala, sposobnost redukcije iona željeza(III) i sposobnost keliranja iona željeza(II). Sve su ispitivane vrste pokazale snažnu redukcijsku snagu u odnosu na ostale testove, dok je klorogenska kiselina pokazala najbolju sposobnost hvatanja DPPH radikala (Slika 30). Vrste roda *Artemisia* predstavljaju značajan prirodni antioksidans, pri čemu njihova biološka aktivnost proizlazi prvenstveno iz prisutnosti fenolnih kiselina, koje imaju važnu ulogu u neutralizaciji slobodnih radikala i zaštiti organizma od oksidativnog stresa.



Slika 30. Usporedni prikaz IC_{50} vrijednosti ispitivanih biljnih vrsta i klorogenske kiseline (5-CQA) za provedena ispitivanja antioksidacijskog učinka

4.2.2. Učinak na aktivnost odabranih enzima

4.2.2.1. Hipoglikemijski učinak

Dijabetes mellitus (šećerna bolest) kronična je metabolička bolest koju karakterizira povišena razina glukoze u krvi. Dijabetes je povezan s nizom zdravstvenih posljedica. Akutni zdravstveni problemi uključuju dijabetičku ketoacidozu, sindrom sličan malignoj hipertermiji s rabdomiolizom te hiperosmolarnu hiperglikemiju, dok dugoročne posljedice mogu uključivati hipertenziju, poremećaje lipida, retinopatiju, oštećenje bubrega, nealkoholnu masnu bolest jetre, neurološke te kardiovaskularne bolesti. Dijabetes tip 2 najčešći je oblik šećerne bolesti, te se smatra metaboličkim poremećajem povezanim s abnormalnostima u metabolizmu ugljikohidrata, lipida i proteina, kao i smanjenim lučenjem inzulina, obično praćenim inzulinskom rezistencijom te je povezan sa nastankom i razvojem različitih bolesti i stanja. U tom kontekstu, inhibicija enzima koji sudjeluju u razgradnji ugljikohidrata smatra se terapijskom strategijom za kontrolu i liječenje dijabetesa tipa 2 (207, 208).

Sposobnost inhibicije enzima α -amilaze

Alfa-amilaza, koja se uglavnom nalazi u slini i gušterači, sudjeluje u početku kemijskog procesa razgradnje ugljikohidrata hidrolizom glikozidnih veza u škrobu i srodnim polisaharidima, pretvarajući ih u oligosaharide i jednostavne, apsorbirajuće šećere. Dok se α -amilaza iz sline proizvodi u žlijezdama slinovnicama i započinje probavu ugljikohidrata u ustima, velika količina pankreasne amilaze izlučuje se iz gušterače u dvanaesnik kako bi nastavila probavu unesene hrane. Ljudska pankreasna α -amilaza protein je mase 57 kDa koji se sastoji od 512 aminokiselina u jednom polipeptidnom lancu s jasno definiranim aktivnim mjestom (209). Pankreasna α -amilaza najvažniji je probavni enzim. To je metaloenzim ovisan o kalciju koji djeluje kao katalizator i omogućuje hidrolizu α -1,4-glikozidnih veza u molekulama polisaharida, poput amiloze, amilopektina, glikogena i drugih maltodekstrina te je odgovoran za glavninu probavu škroba u ljudi (208).

Kolorimetrijsko određivanje inhibicije enzima α -amilaze temelji se na sposobnosti Lugolove otopine (otopina joda u kalijevom jodidu) da oboji škrob. Nakon što se ekstrakt inkubira s enzimom i supstratom, u reakcijsku smjesu dodaje se klorovodična kiselina da prekine daljnju razgradnju škroba. Stupanj hidrolize potom se procjenjuje prema promjeni boje nakon dodatka Lugolove otopine: nerazgrađeni škrob daje ljubičastosivu boju, djelomično razgrađeni škrob poprima narančastosmeđu nijansu, dok žuta boja upućuje na potpunu razgradnju škroba (154).

Sposobnost inhibicije enzima α -amilaze za etanolne ekstrakte odabranih vrsta roda *Artemisia*, klorogensku kiselinu i akarbozu ispitana je u rasponu koncentracija 1600-50 $\mu\text{g/mL}$, odnosno 100-3,125 $\mu\text{g/mL}$ za akarbozu. Prema dostupnoj znanstvenoj literaturi, ovo ispitivanje provedeno je po prvi puta za vrstu *A. maritima*. Većina ispitivanih etanolnih ekstrakata pri najvišoj koncentraciji inhibirala je između 20,04 i 22,18 % ukupne aktivnosti enzima (Tablica 26). Uz vrste roda *Artemisia* ispitano je i djelovanje klorogenske kiseline te je određena vrlo visoka IC_{50} vrijednost pri koncentraciji 1410,98 $\mu\text{g/mL}$, što je 70 puta više u odnosu na IC_{50} vrijednost akarboze (19,37 $\mu\text{g/mL}$). Prema dobivenim rezultatima, ispitane vrste roda *Artemisia* i klorogenska kiselina su slabi inhibitori α -amilaze.

Neagu i sur. (2023) ispitivali su inhibicijsko djelovanje 50 %-tnog etanolnog ekstrakta vrste *A. abrotanum* na α -amilazu te utvrdili da postiže vrijednost IC_{50} pri koncentraciji 2110,12 mg/mL, dok je u istom ispitivanju IC_{50} vrijednost klorogenske kiseline 192,31 mg/mL. To je jedino provedeno ispitivanje za vrstu *A. abrotanum* u dostupnoj literaturi (106). Za vrstu *A. absinthium* provedeno je ispitivanje etil-acetatnog i vodenog ekstrakta na inhibiciju enzima te je utvrđeno bolje djelovanje etil-acetatnog ekstrakta ($IC_{50} = 0,68$ mg/mL) u odnosu na vodeni ($IC_{50} = 0,76$ mg/mL) (109). Osim toga, Neagu i sur. (2023) proveli su usporedno ispitivanje sposobnosti inhibicije α -amilaze 50 %-tnih etanolnih ekstrakata vrsta *A. absinthium* i *A. vulgaris*, gdje je nešto bolje djelovanje pokazala vrsta *A. vulgaris* ($IC_{50}=17,0$ μ g/mL) u odnosu na *A. absinthium* ($IC_{50}=22,2$ μ g/mL), dok je u istom ispitivanju određena IC_{50} vrijednost klorogenske kiseline iznosila 1,9 μ g/mL (113).

Tablica 26. Sposobnost inhibicije α -amilaze 70 %-tnih etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Artemisia*, klorogenske kiseline, izokvercitrina, rutina i akarboze

Uzorak	Sposobnost inhibicije aktivnosti α -amilaze (%)					
	Koncentracijski niz ($\mu\text{g/mL}$)					
	1600	800	400	200	100	50
<i>A. abrotanum</i>	20,04 \pm 0,96 ^c	16,12 \pm 1,90 ^a	10,51 \pm 1,15 ^{a,b}	6,74 \pm 0,74 ^a	3,30 \pm 0,25 ^b	2,91 \pm 0,36 ^{a,c}
<i>A. absinthium</i>	11,90 \pm 0,17 ^c	11,77 \pm 0,43 ^b	8,79 \pm 0,86 ^b	5,57 \pm 0,74 ^{a,b}	2,86 \pm 0,46 ^{b,c}	2,55 \pm 0,56 ^{b,c}
<i>A. annua</i>	22,18 \pm 0,54 ^c	17,55 \pm 0,84 ^a	11,07 \pm 0,13 ^{a,b}	5,96 \pm 0,19 ^{a,b}	4,41 \pm 0,19 ^a	2,16 \pm 0,50 ^{b,c}
<i>A. maritima</i>	21,14 \pm 0,83 ^c	18,29 \pm 0,63 ^a	11,81 \pm 1,04 ^a	7,05 \pm 0,81 ^a	4,42 \pm 0,49 ^a	3,84 \pm 0,08 ^a
<i>A. vulgaris</i>	21,25 \pm 0,29 ^c	18,25 \pm 1,05 ^a	11,94 \pm 1,38 ^a	6,32 \pm 0,23 ^{a,b}	2,24 \pm 0,28 ^{c,d}	1,90 \pm 0,41 ^c
Klorogenska kiselina	64,72 \pm 0,92 ^a	3,29 \pm 0,36 ^c	2,82 \pm 0,31 ^c	2,22 \pm 1,11 ^c	1,92 \pm 0,29 ^{c,d}	n.a.
Uzorak	Koncentracijski niz ($\mu\text{g/mL}$)					
	100	50	25	12,5	6,25	3,125
Akarboza	74,33 \pm 3,54	70,01 \pm 0,18	62,54 \pm 1,61	36,86 \pm 0,44	15,60 \pm 1,57	8,15 \pm 3,88

Srednje vrijednosti unutar stupca označene različitim slovom se međusobno statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$); **n.a.** – nije aktivno.

Sposobnost inhibicije enzima α -glukozidaze

Alfa-glukozidaza je enzim smješten u četkastom obrubu epitelnih stanica tankog crijeva koji katalizira završni korak probave ugljikohidrata, razgrađujući disaharide i oligosaharide u glukozu. Taj enzim je važna meta u liječenju šećerne bolesti tipa 2, njezina inhibicija usporava apsorpciju šećera, čime se snižava postprandijalna razina glukoze (210). α -Glukozidaza tipična je egzo-hidrolaza koja reagira s α -glikozidnom vezom na nereducirajućem kraju supstrata te oslobađa α -glukozu. Pri visokim koncentracijama supstrata enzim također katalizira transglukozilaciju, sintetizirajući oligosaharide (211). Akarboza se ubraja u antidijabetike koji djeluju kao inhibitori α -glikozidaze. Osim sintetskih lijekova, dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je kako mnoge ljekovite biljne vrste posjeduju hipoglikemijski potencijal te se mogu primjenjivati u prevenciji i liječenju dijabetesa. Osim toga, razvoj široko korištenog sintetskog antidijabetika metformina povezan je s tradicionalnom primjenom ljekovitih biljnih vrsta (212-214). Enzim α -glukozidaza katalizira pretvorbu supstrata 4-nitrofenil- α -D-glukopiranozida (pNPG) u α -D-glukopiranozid i *p*-nitrofenol. Nastali *p*-nitrofenol u alkalnom mediju postaje žut i snažno apsorbira svjetlost na valnoj duljini od 405 nm te se određivanje sposobnosti ispitivanih biljnih ekstrakata i referentnih supstanci da inhibiraju α -glikozidazu temelji se na mjerenju obojenja žutog *p*-nitrofenola (215).

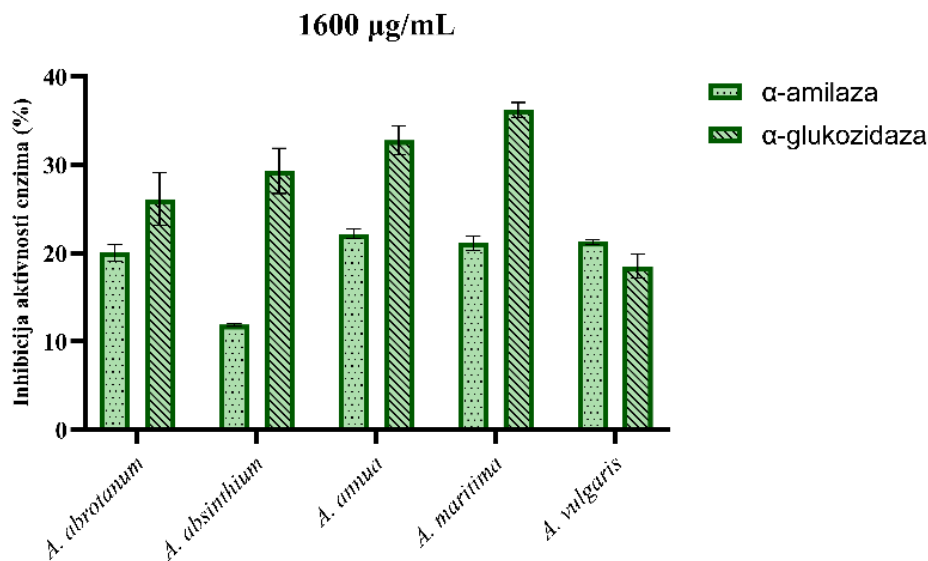
U Tablici 27 prikazani su dobiveni rezultati za ispitivane vrste *Artemisia*, klorogensku kiselinu i referentni antidijabetik akarbozu, koji su testirani u rasponu koncentracija od 1600 do 100 $\mu\text{g/mL}$, odnosno 400-50 $\mu\text{g/mL}$ za referentne supstancije. Iako su svi etanolni ekstrakti pokazali inhibicijsko djelovanje na spomenuti enzim, nijedna od vrsta nije dosegla IC_{50} vrijednost u ispitivanim koncentracijama. Ispitani etanolni ekstrakt pri koncentraciji 1600 $\mu\text{g/mL}$ inhibirali su 18,54-36,23 % ukupne aktivnosti enzima. Usporedno je ispitano djelovanje klorogenske kiseline na α -glukozidazu, koja nije pokazala aktivnost u ispitanim koncentracijama. Dobiveni rezultati ukazali su na slabu sposobnost etanolnih ekstrakata vrsta roda *Artemisia* da inhibiraju aktivnost enzima α -glukozidaze te da klorogenska kiselina ne doprinosi tom učinku.

Tablica 27. Sposobnost inhibicije α -glukozidaze 70 %-tnih etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Artemisia*, klorogenske kiseline, rutina i referentnog antidijabetika akarboze

Uzorak	Sposobnost inhibicije aktivnosti α -glukozidaze (%)				
	Koncentracijski niz ($\mu\text{g/mL}$)				
	1600	800	400	200	100
<i>A. abrotanum</i>	26,13 \pm 3,02 ^c	25,08 \pm 2,79 ^c	22,25 \pm 5,49 ^{a,b}	16,71 \pm 6,38 ^b	6,26 \pm 0,91 ^b
<i>A. absinthium</i>	29,32 \pm 2,55 ^{b,c}	22,74 \pm 0,99 ^c	17,45 \pm 0,18 ^b	12,60 \pm 0,54 ^b	11,32 \pm 0,22 ^a
<i>A. annua</i>	32,77 \pm 1,63 ^{a,b}	29,46 \pm 1,61 ^b	21,64 \pm 1,8 ^b	12,39 \pm 1,28 ^b	6,35 \pm 0,61 ^b
<i>A. maritima</i>	36,23 \pm 0,85 ^a	35,22 \pm 0,60 ^a	29,29 \pm 1,73 ^a	21,18 \pm 1,50 ^a	11,92 \pm 0,60 ^a
<i>A. vulgaris</i>	18,54 \pm 1,39 ^d	18,33 \pm 1,15 ^d	16,04 \pm 1,82 ^b	11,64 \pm 2,61 ^b	7,11 \pm 0,35 ^b
Uzorak	Koncentracijski niz ($\mu\text{g/mL}$)				
	400	200	100	50	25
	Klorogenska kiselina	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Akarboza	66,37 \pm 1,19	54,00 \pm 0,97	38,37 \pm 2,34	24,53 \pm 2,37	18,51 \pm 1,44

Srednje vrijednosti unutar stupca označene različitim slovom se međusobno statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$); **n.a.** – nije akvitan.

Provedenim ispitivanjem hipoglikemijskog potencijala 70 %-tnih etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Artemisia* putem inhibicije enzima α -amilaze i α -glukozidaze kao ključnih terapijskih meta u liječenju dijabetesa tip 2, utvrđeno je da su etanolni ekstrakti i klorogenska kiselina slabi inhibitori navedenih enzima. Vrste *A. abrotanum*, *A. absinthium*, *A. annua* i *A. maritima*. Pri ispitivanoj koncentraciji 1600 $\mu\text{g/mL}$ pokazale su bolju sposobnost inhibicije ukupne aktivnosti enzima α -glukozidaze (26,13-36,23 %), dok je vrsta *A. vulgaris* pokazala bolju sposobnost inhibicije α -amilaze (21,25 %) nego α -glukozidaze (18,54 %) (Slika 31).



Slika 31. Usporedni prikaz hipoglikemijskog učinka 70 %-tnih etanolnih ekstrakata ispitivanih biljnih vrsta u koncentraciji 1600 $\mu\text{g/mL}$

Neagu i sur.(106) ispitali su i sposobnost 50 %-tnog etanolnog ekstrakta vrste *A. abrotanum* da inhibira enzima α -glukozidazu. IC_{50} vrijednost iznosila je 1450,32 mg/mL , što je bio bolji učinak nego na α -amilazu. U istom ispitivanju određeno je da klorogenska kiselina postiže 50 %-tni učinak pri koncentraciji 51,21 mg/mL . Uz navedeno, i rezultati za referentni lijek akarbozu značajno se razlikuju od rezultata ovoga istraživanja. Naime, prema rezultatima našeg istraživanja akarboza je 10 puta bolje djelovala na enzim α -amilazu ($\text{IC}_{50} = 19,37 \mu\text{g/mL}$) u odnosu na α -glukozidazu ($\text{IC}_{50} = 218,41 \mu\text{g/mL}$), dok je prema rezultatima Neagu i sur., akarboza pokazala značajno slabije djelovanje te je djelovala bolje na α -glukozidazu ($\text{IC}_{50} = 372,35 \text{ mg/mL}$) nego na α -amilazu ($\text{IC}_{50} = 1110,25 \text{ mg/mL}$).

Za razliku od navedenog, naš rezultat potvrđuje istraživanje koje su proveli Hbika i sur. (109), gdje je akarboza također bolje inhibirala α -amilazu ($\text{IC}_{50} = 0,58 \text{ mg/mL}$) nego α -glukozidazu ($\text{IC}_{50} = 0,148 \text{ mg/mL}$). Nadalje, ispitali su i djelovanje etil-acetatnog ($\text{IC}_{50} = 0,155$

mg/mL) i vodenog ekstrakta ($IC_{50} = 0,170$ mg/mL) vrste *A. absinthium* na α -glukozidazu, što je bio bolji učinak u usporedbi s učinkom na α -amilazu. Jedno je istraživanje dalo zanimljive rezultate. Naime, pokazalo se da 70 %-tni metanolni ekstrakt korijena vrste *A. absinthium* značajno bolje djeluje na oba enzima u odnosu na dostupne rezultate za ekstrakte iz nadzemnih dijelova biljke, s IC_{50} vrijednostima 224,12-243,35 μ g/mL (128). U usporednom ispitivanju koje su proveli Neagu i sur. (113), 50 %-tni etanolni ekstrakt vrste *A. absinthium* ($IC_{50}=45,16$ μ g/mL) bolje je djelovao od ekstrakta *A. vulgaris* ($IC_{50} = 96,04$ μ g/mL) na enzim α -glukozidazu, dok su oba ekstrakta bolje inhibirala enzim α -amilazu. Istim ispitivanjem utvrđeno je da klorogenska kiselina snažno djeluje na oba enzima ($IC_{50} = 0,59$ μ g/mL za α -glukozidazu), dok u našem istraživanju klorogenska kiselina nije pokazala sposobnost inhibicije α -glukozidaze. Prema istraživanju Acquaviva i sur. (216) s više različitih ekstrakata vrste *A. annua* (heksanski, diklormetanski, etil-acetatni, etanolni, 70 %-tni etanolni i vodeni), najbolju sposobnost inhibicije enzima α -glukozidaze pokazao je heksanski ekstrakt. Za vrstu *A. maritima*, prema našem saznanju, ovo je prvo provedeno ispitivanje sposobnosti inhibicije enzima α -glukozidaze.

4.2.2.2. Neuroprotektivni učinak

Alzheimerova bolest (AD) progresivni je neurodegenerativni poremećaj koji prvenstveno zahvaća stariju populaciju te se smatra odgovornim za većinu slučajeva demencije kod osoba starijih od 65 godina. Ireverzibilna je neurodegenerativna bolest koja postupno i progresivno uništava kognitivne funkcije mozga. Karakteriziraju je progresivan gubitak pamćenja i kognitivnih sposobnosti, poremećaji govora te funkcionalne i bihevioralne promjene, što značajno narušava kvalitetu života oboljelih. Unatoč sve boljem razumijevanju patofiziologije AD-a, do danas nije razvijen učinkovit lijek, a dostupne terapije ne uspijevaju zaustaviti niti spriječiti napredovanje bolesti (133, 217, 218).

Sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze

Acetilkolinesteraza (AChE) ima ključnu ulogu u regulaciji prijenosa živčanih impulsa u kolinergičnim sinapsama središnjeg i perifernog živčanog sustava te je važna za održavanje homeostaze organizma. Spada u skupinu hidrolaza, a zajedno s butirilkolinesterazom (BChE) predstavlja značajan čimbenik u liječenju teških neurodegenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova, Parkinsonova i Huntingtonova bolest. U mozgu osoba oboljelih od AD-a dolazi do nakupljanja dvaju abnormalnih proteinskih struktura – plakova i neurofibrilarnih snopova – koji oštećuju moždane stanice. Posljedica toga je smanjena koncentracija acetilkolina i aktivnost AChE, dok se aktivnost BChE povećava, stoga se acetilkolinesteraza smatra terapijski važnom metom u liječenju neurodegenerativnih bolesti (219). Nadalje, biljke se smatraju vrijednim izvorom inhibitora acetilkolinesteraze. Galantamin je lijek koji djeluje kao inhibitor AChE i primjenjuje se u terapiji Alzheimerove bolesti. Izvorno je izoliran iz više biljnih vrsta roda *Galanthus* (135, 220). Vrste roda *Artemisia* pokazuju značajan neuroprotektivni potencijal koji se temelji na antioksidacijskom, protuupalnom i antiapoptotskom djelovanju te inhibiciji acetilkolinesteraze, što ih čini potencijalnim kandidatima za terapiju neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove bolesti (130, 131, 135). Stoga je sposobnost inhibicije AChE ispitana za etanolne ekstrakte vrsta roda *Artemisia*, klorogenske kiseline te referentnog inhibitora galantamina.

Sposobnost inhibicije AChE određena je Ellmanovom kolorimetrijskom metodom u mikrotitarskim pločicama, pri kojoj reakcija acetiltiokolina s 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojevom kiselinom rezultira nastankom aniona 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline. Ovaj žuto obojeni produkt apsorbira svjetlost pri valnoj duljini od 405 nm (155). Aktivnost navedenih etanolnih ekstrakata ovisila je o njihovoj koncentraciji, a ispitana je u koncentracijskom nizu od 1600 do

100 µg/mL. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 28. Sve ispitivane vrste pokazale su sposobnost inhibicije aktivnosti enzima acetilkolinesteraze. Vrste *A. abrotanum*, *A. annua* i *A. vulgaris* postigle su 50 %-tnu inhibiciju enzima pri najvišim ispitivanim koncentracijama s IC_{50} vrijednostima 1517,04 µg/mL, 1396,78 µg/mL i 1638,01 µg/mL koje se nisu značajno razlikovale.

Vrste *A. absinthium* i *A. maritima* u ispitivanom koncentracijskom rasponu nisu postignule 50 %-tnu inhibiciju ukupne aktivnosti enzima, ali su pokazale umjerenu sposobnost inhibicije AChE te su pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji 1600 µg/mL inhibirale 44,06 % i 39,43 % ukupne aktivnosti enzima. Od svih ispitivanih vrsta *A. maritima* pokazala je najslabije inhibicijsko djelovanje na enzim acetilkolinesterazu. Klorogenska kiselina pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji u reakcijskoj smjesi dovela je do zamućenja, dok je pri 800 µg/mL ostvarila samo 13,99 % inhibicije ukupne aktivnosti enzima. Referentni inhibitor galantamin ostvario je IC_{50} vrijednost pri koncentraciji 0,425 µg/mL.

Dosadašnja znanstvena istraživanja neuroprotektivnog učinka odabranih vrsta roda *Artemisia* najviše su usredotočena na ispitivanje učinka eteričnih ulja na enzim acetilkolinesterazu, dok je za biljne ekstrakte vrlo malo dostupne literature. Prema istraživanju Trifan i sur. (87) za metanolne i kloroformne ekstrakte iz nadzemnih dijelova i korijena vrsta *A. absinthium*, *A. annua* i *A. vulgaris* ustanovljeno je da postoji razlika u djelovanju ovisno o primijenjenom otapalu i dijelu biljke. Kloroformni ekstrakt nadzemnih dijelova vrsta *A. annua* i *A. vulgaris* pokazao je bolje djelovanje u odnosu na ekstrakte korijena te metanolni ekstrakt nadzemnih dijelova biljke, dok je za vrstu *A. absinthium* metanolni ekstrakt korijena pokazao najbolju sposobnost inhibicije enzima AchE. Prema istraživanju Chougou i sur. (135) ekstrakt vrste *A. annua* ostvario je IC_{50} vrijednost pri 87,43 µg/mL, što je 15 puta jače djelovanje od rezultata dobivenih ovim istraživanjem. Prema našem saznanju, ovo je prvo istraživanje sposobnosti inhibicije enzima AChE za etanolne ekstrakte vrsta *A. abrotanum* i *A. maritima*.

Tablica 28. Sposobnost inhibicije acetilkolinesteraze 70 %-tnih etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Artemisia*, klorogenske kiseline i referentnog inhibitora galantamina

Uzorak	Sposobnost inhibicije aktivnosti acetilkolinesteraze (%)					
	Koncentracijski niz ($\mu\text{g/mL}$)					
	1600	800	400	200	100	50
<i>A. abrotanum</i>	52,45 \pm 1,18 ^{a,b}	28,40 \pm 1,82 ^{a,b}	15,97 \pm 1,83 ^{a,b}	8,08 \pm 0,34 ^b	8,05 \pm 3,77 ^a	n.a.
<i>A. absinthium</i>	44,06 \pm 1,10 ^c	23,59 \pm 3,66 ^b	17,07 \pm 1,25 ^a	11,46 \pm 1,36 ^a	5,06 \pm 1,62 ^{a,b}	0,85 \pm 0,45
<i>A. annua</i>	56,40 \pm 2,89 ^a	31,59 \pm 1,93 ^a	19,36 \pm 2,08 ^a	7,53 \pm 1,94 ^b	2,59 \pm 1,42 ^b	0,58 \pm 0,25
<i>A. maritima</i>	39,43 \pm 2,28 ^c	31,49 \pm 0,15 ^a	8,72 \pm 1,02 ^{c,d}	5,91 \pm 0,64 ^b	2,23 \pm 0,43 ^b	0,39 \pm 0,28
<i>A. vulgaris</i>	50,80 \pm 0,20 ^b	10,96 \pm 3,54 ^c	7,03 \pm 0,43 ^d	6,94 \pm 1,09 ^b	2,34 \pm 0,14 ^b	0,84 \pm 0,13
Klorogenska kiselina	n.d.	13,99 \pm 1,82 ^c	12,29 \pm 0,69 ^{b,c}	7,64 \pm 0,18 ^b	5,77 \pm 0,70 ^{a,b}	n.a.
Uzorak	Koncentracijski niz ($\mu\text{g/mL}$)					
	5	2,5	1,25	0,625	0,313	0,157
Galantamin	88,57 \pm 0,26	83,34 \pm 2,49	73,70 \pm 0,09	63,34 \pm 1,68	41,21 \pm 1,99	35,45 \pm 0,04

Srednje vrijednosti unutar stupca označene različitim slovom se međusobno statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$); **n.a.** – nije akvitan; **n.d.** - nije detektiran.

5 ZAKLJUČCI



U okviru ovog istraživanja po prvi put provedena je usporedna zelena ekstrakcija, kemijska karakterizacija i određivanje bioloških učinaka terpena i polifenola iz nedovoljno istraženih vrsta roda *Artemisia* koje uzgojeno i samoniklo rastu na području Bosne i Hercegovine (*A. abrotanum*, *A. absinthium*, *A. annua* i *A. vulgaris*) te Republike Hrvatske (*A. maritima*). Temeljem dobivenih rezultata izvedeni su zaključci navedeni u nastavku.

FITOKEMIJSKI SASTAV

Sadržaj eteričnih ulja vrsta roda *Artemisia* određen je postupcima hidrodestilacije i parne destilacije pri atmosferskom tlaku. Najveći prinos eteričnog ulja zabilježen je za vrstu *A. annua* (5,00-34,00 mL/kg), dok je najmanje eteričnog ulja sadržavala vrsta *A. vulgaris* (1,00-3,00 mL/kg). Kvalitativna i kvantitativna analiza izoliranih eteričnih ulja provedena je plinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa. Identificirano je ukupno 98 i 107 sastavnica koje su činile 81,06-97,55 % te 89,03-96,42 % eteričnih ulja izoliranih hidrodestilacijom, odnosno parnom destilacijom. Kromatografski profili odabranih vrsta roda *Artemisia* pokazali su razlike u njihovom kemijskom sastavu. Eterična ulja dobivena hidrodestilacijom oobilježavali su visoki udjeli monoterpena (66,18–91,62 %), a seskviterpeni su bili manje zastupljeni (3,74–23,15 %). Među monoterpenskim sastavnicama prevladavali su oksidirani monoterpeni (48,04-66,80 %), dok je monoterpenskih ugljikovodika bilo u rasponu od 8,31 % (*A. absinthium*) do 24,82 % (*A. annua*). U eteričnim uljima vrsta *A. maritima* i *A. vulgaris* najzastupljenija sastavnica bio je 1,8-cineol (24,04 % i 35,36 %), dok su se glavne sastavnice u ostalim uljima značajno razlikovale. Najzastupljenije sastavnice eteričnog ulja vrste *A. abrotanum* bili su piperiton (27,48 %) i davanon B (13,92 %). *Trans*-sabinil-acetat (19,46 %), *trans*-tujon (16,62 %) i *trans*-epoksiocimen (16,15 %) prevladavali su u vrsti *A. absinthium*, dok su artemizija keton (29,20 %) i kamfor (17,67 %) identificirani kao glavne sastavnice eteričnog ulja vrste *A. annua*. U eteričnom ulju vrste *A. maritima* bilo je najviše 1,8-cineola (24,04 %), fluoroacetofenon 2,4-dimetiletera (14,86 %) i borneola (13,61 %). Rezultati klusterske i PCA analize međusobno su konzistentni te ukazuju na postojanje dviju glavnih skupina ispitivanih vrsta roda *Artemisia*, s definiranim razlikama u kemijskom sastavu eteričnih ulja. PCA analiza jasno je izdvojila jednu skupinu koju čine vrste *A. vulgaris*, *A. maritima* i *A. annua*, dok se specifičnim fitokemijskim profilima izdvajaju vrste *A. abrotanum* i *A. absinthium*. U odnosu na hidrodestilirana ulja, najveće promjene dogodile su se pri parnoj destilaciji eteričnog ulja vrsta *A. abrotanum* i *A. vulgaris* kada su se 2-4 puta smanjili udjeli monoterpenske frakcije u korist prinosa seskviterpena. U vrsti *A. annua* zabilježen je isti trend,

ali su promjene bile manje značajne. U eteričnim uljima vrsta *A. absinthium* i *A. maritima* dobivenih parnom destilacijom došlo je do blagog povećanja monoterpena, uz istovremeno smanjenje seskviterpena. Eterično ulje vrste *A. vulgaris* dobiveno parnom destilacijom sastavom se značajno razlikovalo od ostalih ispitivanih vrsta, ali i od samog eteričnog ulja izoliranog hidrodestilacijom s prevladavajućim 1,8-cineolom. Parnom destilacijom se značajno povećao udio α -, β - i δ -selinena, germakrena D i δ -kadinena, dok 1,8-cineol nije detektiran. Jednako tako, došlo je i do promjene glavnih sastavnica u eteričnom ulju vrste *A. maritima*. U hidrodestiliranom eteričnom ulju prevladavali su 1,8-cineol, borneol i floroacetofenon 2,4-dimetileter, dok je parna destilacija rezultirala potpunim gubitkom borneola i velikim smanjenjem 1,8-cineola, te značajnim povećanjem floroacetofenon 2,4-dimetiletera i bornil-acetata. Parnom destilacijom se značajno povećao udio artemizija ketona (42,04 %), a smanjio udio kamfora koji su prevladavali u hidrodestiliranom eteričnom ulju vrste *A. annua*. Ujedno se jako povećao udio α -pinena. Parnom destilacijom dobiveno eterično ulje vrste *A. absinthium* imalo je više *trans*-tujona i *trans*-sabinil-acetata, a manje *trans*-epoksiocimena koji su identificirani kao glavne sastavnice hidrodestiliranog eteričnog ulja. U postupku parne destilacije, u eteričnom ulju vrste *A. abrotanum* značajno se smanjio udio piperitona (18,09 %) i davanona B, dok se udio davana etera povećao.

Optimizacija ekstrakcije superkritičnim CO₂ provedena je za vrstu *A. annua* promjenom temperature od 40 do 60 °C i tlaka u rasponu od 100 do 220 bara. Prinos sc-CO₂ ekstrakata u ovisnosti o tlaku i temperaturi varirao je od 0,62 % do 1,92 % . Najviši prinos ekstrakta od 1,92 % dobiven je pri najnižem tlaku od 100 bara te najvišoj temperaturi (60 °C). Temperatura se pokazala kao statistički najznačajniji parametar za prinos sc-CO₂ ekstrakata. Identificirane su 32 sastavnice, koje su činile od 84,43 % do 97,19 % ukupnog ulja. Najzastupljeniji terpeni identificirani u dobivenim sc-CO₂ ekstraktima bili su monoterpeni (59,43–80,16%), među kojima su prevladavali oksidirani oblici (50,26–75,98 %), poput artemizija ketona (16,93–48,49 %), zatim kamfora (3,29–18,44%), 1,8-cineola (4,77–11,89%), *trans*-pinokarveola (1,39–5,08%) i artemizija alkohola (2,25–4,10 %) (Slika 15). Nasuprot tome, seskviterpenske sastavnice bile su manje zastupljene (15,99–29,73 %). Za razliku od monoterpena, među seskviterpenima je bilo više ugljikovodika (9,95–18,59%) nego oksidiranih oblika (1,64–12,35%). Najzastupljeniji seskviterpeni bili su arteannuin B (3,98–10,03 %), β -selinen (1,05–7,42 %) i *trans*- β -kariofilen (2,53–5,41 %). Temperatura je bila statistički značajna za ekstrakciju monoterpena i seskviterpena, kao i odnosi između temperature i tlaka. Većina monoterpena ekstrahirala se pri temperaturi od 40 °C i tlaku 160 bara ili pri temperaturi 50 °C

i tlaku 190 bar, dok su za ekstrakciju seskviterpena u sc-CO₂ ekstraktima, odgovarajući tlakovi također 160 i 190 bar, ali uz više temperature od 50 i 60 °C. Udio sc-CO₂ ekstrakata dobivenih iz cvatućih vršnih dijelova vrsta *A. abrotanum*, *A. absinthium*, *A. annua*, *A. maritima* i *A. vulgaris* određen je prema prethodno izračunatim optimalnim vrijednostima tlaka i temperature za ciljanu sc-CO₂ ekstrakciju. Vrijednosti su bile, u granicama od 0,13 % (*A. absinthium*) do 1,92 % (*A. annua*). Vrste *A. annua* i *A. maritima* pokazale su veći prinos ekstrakata pri tlaku i temperaturi od 100 bara te 60 °C, dok su preostale tri vrste imale veći prinos ekstrakta pri primijenjenom višem tlaku (181 bar) dok su ostali uvjeti ekstrakcije bili isti. Vrsta *A. abrotanum* imala je najveći prinos od 1,89% u odnosu na ostale ispitivane vrste pri uvjetima tlaka i temperature 181 bar i 60 °C. Gorki pelin imao je najmanji prinos ekstrakata u obje ekstrakcije.

Tankoslojnom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPTLC) u automatiziranom sustavu za planarnu kromatografiju dokazana je prisutnost fenolnih kiselina (klorogenske, 3,5-di-kaveoilkina i 4,5-di-kaveoilkina kiseline) te flavonodnih aglikona i glikozida u metanolnim ekstraktima ispitivanih vrsta roda *Artemisia*. Spektrofotometrijski je određeno je da cvatući vršni dijelovi ispitanih biljnih vrsta sadrže 3,72-6,45 % fenolnih kiselina, 0,19-0,57 % flavonoida, 1,22-2,48 % trjeslovina.

Identifikacija i kvantifikacija fenolnih kiselina i flavonoida u 70 %-tnim etanolnim ekstraktima vrsta roda *Artemisia* provedena je koristeći vezani sustav tekućinske kromatografije i spektrometrije masa, uz elektroraspršivanje kao ionizacijsku metodu (LC-PDA-ESI-MS/MS) te tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti s DAD detektorom (HPLC-DAD). Ustanovljeni su kromatografski profili odabranih vrsta roda *Artemisia* te je postignuto zadovoljavajuće odjeljivanje polifenolnih sastavnica. Identificirano je ukupno 36 fenolnih kiselina i flavonoida. Ustanovljeno je da su ispitane vrste bogate derivatima hidroksicimetine kiseline, posebice kaveoilkina kiseline. U svim vrstama ustanovljena je prisutnost neoklorogenske, klorogenske i kriptoklorogenske kiseline te 1,5-di-kaveoilkina, 3,5-di-kaveoilkina i 4,5-di-kaveoilkina kiseline. Derivati feruloil-kaveoilkina i kaveoil-feruloilkina kiseline identificirani su u vrstama *A. annua* i *A. maritima*, a u svim ispitivanim uzorcima osim u vrsti *A. absinthium* identificirana je 5-feruloilkina kiselina. Flavonoidi u obliku aglikona i glikozida, posebice iz skupine flavona, identificirani su u ispitanim ekstraktima. Vrsta *A. annua* sadržavala je čak četiri derivata apigenina, a po prvi put je u vrsti *A. absinthium* identificiran vicenin-2. Istraživanje je pokazalo da su vrste roda *Artemisia* bogate visokometoksiliranim flavonima. Hispidulin, jaceosidin i eupatilin su po prvi put identificirani u vrsti *A. maritima*. Artemetin, visokometoksilirani flavon karakterističan za vrste roda *Artemisia* identificiran je u

vrstama *A. abrotanum*, *A. absinthium* i *A. annua*. Uspješno su odijeljeni i identificirani izomerni visokometoksilirani flavoni kasticin i krizosplenetin. Njihova prisutnost dokazana je u vrstama *A. absinthium* i *A. annua*, dok je u vrstama *A. abrotanum* i *A. vulgaris* identificiran samo krizosplenetin. Istraživanje je pokazalo da su fenolne kiseline najzastupljenije polifenolne sastavnice ispitanih etanolnih ekstrakata. Utvrđeno je da su ispitane vrste sasržavale najviše 3,5-di-kaveoilkina kiseline (2,24-8,06 mg/g), izuzev vrste *A. annua* u kojoj je 1,5-di-kaveoilkina kiselina (2,38 mg/g) bila najzastupljenija. S obzirom na njezin udio u pojedinom ekstraktu vrijedio je sljedeći niz: *A. vulgaris* > *A. absinthium* > *A. abrotanum* > *A. maritima* > *A. annua*. „Zelenom“ ekstrakcijom niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (DES-ovima) provedena je ekstrakcija fenolnih kiselina, u usporedbi sa 70 %-tnim etanolom. DES-ovi su pripremljeni miješanjem kolin klorida (ChCl) i etilen-glikola (EG), odnosno glicerola (Gly) u molarnom omjeru ChCl:EG/ChCl:Gly = 1:3. U svrhu optimizacije ekstrakcije, zbog visoke viskoznosti DES-ova dodano je 30 % i 50 % destilirane vode (V/V) kako bi se smanjila viskoznost i potencijalno povećala učinkovitost ekstrakcije.

Udjeli fenolnih kiselina u dobivenim ekstraktima bili su 0,12-0,52 % (ChCl:EG) i 0,04–0,43 % (ChCl:Gly), dok je ekstrakcijom etanolom dobiveno 0,31-0,51 % fenolnih kiselina. Vodom razrijeđeni DES-ovi na bazi kolin-klorida i etilen-glikola postigli su približnu ili bolju ekstrakciju fenolnih kiselina, dok su vodom razrijeđeni DES-ovi na bazi kolin-klorida i glicerola postigli 60-95 %-tni učinak etanola.

BIOLOŠKI UČINCI

Antioksidacijsko djelovanje 70 %-tnih etanolnih ekstrakata ispitivanih vrsta *Artemisia* određena je pomoću četiri različite spektrofotometrijske metode u usporedbi s klorogenskom kiselinom i referentnim antioksidansima. Svi ispitivani biljni ekstrakti pokazali su sposobnost hvatanja slobodnih radikala DPPH ($IC_{50} = 46,76\text{--}132,85 \mu\text{g/mL}$) i NO ($IC_{50} = 36,55\text{--}106,19 \mu\text{g/mL}$). Ispitivani ekstrakti također su pokazali snažna redukcijska svojstva ($IC_{50} = 21,41\text{--}51,58 \mu\text{g/mL}$) te sposobnost keliranja iona željeza(II) ($IC_{50} = 64,25\text{--}183,62 \mu\text{g/mL}$). Ovim ispitivanjem utvrđeno je da su vrste roda *Artemisia* dobri antioksidansi. Njihova antioksidacijska aktivnost prvenstveno potječe od visokog udjela fenolnih kiselina, što su potvrdili dobiveni rezultati za klorogensku kiselinu, s IC_{50} vrijednostima od 8,14 $\mu\text{g/mL}$ do 29,06 $\mu\text{g/mL}$. Vrsta *A. vulgaris* koja je prema rezultatima HPLC analize udjelom sadržavala najviše fenolnih kiselina pokazala je i najveću sposobnost hvatanja slobodnih radikala ($IC_{50} = 36,55 \mu\text{g/mL}$) i redukcije iona željeza(III) ($IC_{50} = 21,41 \mu\text{g/mL}$). Vrsta *A. maritima* bila je najbolji kelator iona željeza(II) ($IC_{50} = 64,25 \mu\text{g/mL}$).

Hipoglikemijski učinak etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Artemisia* ispitan je putem inhibicije enzima α -amilaze i α -glukozidaze kao ključnih terapijskih meta u liječenju dijabetesa tip 2. Utvrđeno da su etanolni ekstrakti i klorogenska kiselina slabi inhibitori navedenih enzima. Vrste *A. abrotanum*, *A. absinthium*, *A. annua* i *A. maritima* pri ispitivanoj koncentraciji 1600 $\mu\text{g/mL}$ pokazale su bolju sposobnost inhibicije ukupne aktivnosti enzima α -glukozidaze (26,13-36,23 %), dok je vrsta *A. vulgaris* pokazala pri istoj koncentraciji pokazala bolju sposobnost inhibicije α -amilaze (21,25 %) nego α -glukozidaze (18,54 %).

Neuroprotektivni učinak etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Artemisia* ispitan je putem inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE) koja se smatra terapijski važnom metom u liječenju neurodegenerativnih bolesti. Sve ispitivane vrste pokazale su sposobnost inhibicije ukupne aktivnosti enzima acetilkolinesteraze, dok su vrste *A. abrotanum*, *A. annua* i *A. vulgaris* postignule 50 %-tnu inhibiciju enzima pri najvišim ispitivanim koncentracijama s IC_{50} vrijednostima 1396,78-1638,01 $\mu\text{g/mL}$. Vrste *A. absinthium* i *A. maritima* u ispitivanom koncentracijskom rasponu nisu postignule 50 %-tnu inhibiciju ukupne aktivnosti enzima, ali su pokazale umjerenu sposobnost inhibicije AChE te su pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji 1600 $\mu\text{g/mL}$ inhibirale 44,06 % i 39,43 % ukupne aktivnosti enzima.

Istraživanja provedena u okviru ovog rada pružaju nove znanstvene spoznaje o fitokemijskom sastavu i biološkim učincima nedovoljno istraženih vrsta roda *Artemisia*. Dobiveni rezultati ukazuju na njihov potencijal u prevenciji i liječenju kroničnih bolesti povezanih sa starenjem ili kao izvorišta polaznih molekula za istraživanje i razvoj novih lijekova. Optimiranje ekološki prihvatljivih metoda ekstrakcije terpena i polifenola superkritičnim ugljikovim dioksidom i niskotemperaturnim eutektičkim otapalima daje doprinos razvoju zelenih tehnoloških postupaka dobivanja biljnih ekstrakata u medicinske svrhe.

6 LITERATURA



1. Usman M, Nakagawa M, Cheng S. Emerging Trends in Green extraction techniques for bioactive natural products. *Processes* 2023;11(12):3444.
2. European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care. European Pharmacopoeia 11th Edition Online. Preuzeto s: <https://pheur.edqm.eu/home>. (pristupljeno: 20. ožujka 2025.)
3. European Medicines Agency/Committee on Herbal Medicinal Products. EMA/HMPC/751490/2016 - Final European Union herbal monograph on *Artemisia absinthium* L., herba. Preuzeto s: <https://www.ema.europa.eu> (pristupljeno: 3. lipnja 2025.)
4. Feng X, Cao S, Qiu F, Zhang B. Traditional application and modern pharmacological research of *Artemisia annua* L. *Pharmacol Ther* 2020;216:107650.
5. Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Volume I., Beijing: China Medical Science Press, 2015:52.
6. Bora KS, Sharma A. The genus *Artemisia*: a comprehensive review. *Pharm Biol* 2011; 49(1):101-9.
7. Bisht D, Kumar D, Kumar D, Dua K, Chellappan DK. Phytochemistry and pharmacological activity of the genus *Artemisia*. *Arch Pharm Res* 2021;44(5):439-474.
8. Wright CW. *Artemisia*. London: CRC Press, 2001. str. 6-39, 79-86, 139-145, 149-156.
9. Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. *Flora Europaea*, Vol 4., Cambridge: Cambridge University Press, 1972, str. 178-185.
10. Nurlybekova A, Kudaibergen A, Kazymbetova A, Amangeldi M, Baiseitova A, Ospanov M, et al. Traditional use, phytochemical profiles and pharmacological properties of *Artemisia* genus from Central Asia. *Molecules* 2022;27(16):5128.
11. Flora Croatica Database. Preuzeto s: <https://hirc.botanic.hr/fcd/> (pristupljeno: 3. lipnja 2025.)
12. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Preuzeto s: <https://www.eppo.int> (pristupljeno: 3. lipnja 2025.)
13. Ekiert H, Knut E, Świątkowska J, Klin P, Rzepiela A, Tomczyk M, et al. *Artemisia abrotanum* L. (Southern Wormwood)-History, current knowledge on the chemistry, biological activity, traditional use and possible new pharmaceutical and cosmetological applications. *Molecules* 2021;26(9):2503.
14. Karin B. Flora Dalmatinske zagore – najčešće biljke. Zagreb: Školska knjiga, 2023. str. 342-343.

15. Koul B, Taak P, Kumar A, Khatri T, Sanyal I. The *Artemisia* genus: a review on traditional uses, phytochemical constituents, pharmacological properties and germplasm conservation. *J Glycomics Lipidomics* 2017;7:142.
16. Nikolić T, Mitić B, Boršić I. Flora Hrvatske – invazivne biljke. Zagreb: Alfa d.d., 2014. str. 74-77.
17. Septembre-Malaterre A, Lalarizo Rakoto M, Marodon C, Bedoui Y, Nakab J, Simon E, et al. *Artemisia annua*, a traditional plant brought to light. *Int J Mol Sci* 2020;21:4986.
18. Plants of the World Online (POWO). Royal Botanic Gardens, Kew. Preuzeto s: <https://powo.science.kew.org/> (pristupljeno: 10. travnja 2026.)
19. Grokipedia. *Artemisia maritima*. Preuzeto s: https://grokipedia.com/page/artemisia_maritima (pristupljeno: 11. travnja 2026.)
20. Kumar D, Bhat ZA, Kumar V, Zargar MI. A short review on *Artemisia maritima* Linn. *Int J Res Phytochem Pharmacol* 2011;1(4):201-206.
21. Zaman S, Barkatulllah, Zahoor M, Shah SWA, Ullah Z, Ullah R et al. Pharmacognostic evaluation of *Artemisia maritima* L. a highly medicinal specie of genus *Artemisia*. *Saudi J Biol Sci* 2022;29(10):103419.
22. World Flora Online (WFO). Preuzeto s: <https://www.worldfloraonline.org/> (pristupljeno: 11. travnja 2026.)
23. Maurya A, Prasad J, Das S, Dwivedy AK. Essential oils and their application in food safety. *Front Sustain Food Syst* 2021;5:653420.
24. Hegazy MM, Mekky RH, Ibrahim AE, Abouelela ME, Kedra TA, Al-Harrasi A. Essential oils: the science of extraction and its implications for composition and biological activity—A review. *Food Anal Methods* 2025;18:1483-1513.
25. Burčul F, Blažević I, Radan M, Politeo O. Terpenes, phenylpropanoids, sulfur and other essential oil constituents as inhibitors of cholinesterases. *Curr Med Chem* 2020;27(26):4297-4343.
26. Dias ALB, de Aguiar AC, Rostagno MA. Extraction of natural products using supercritical fluids and pressurized liquids assisted by ultrasound: Current status and trends. *Ultrason Sonochem* 2021;74:105584.
27. Cannavacciuolo C, Pagliari S, Celano R, Campone L, Rastrelli L. Critical analysis of green extraction techniques used for botanicals: trends, priorities, and optimization strategies—a review. *TrAC Trends Anal Chem* 2024;173:117627.

28. Pandey AK, Singh P. The genus *Artemisia*: a 2012-2017 literature review on chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of essential oils. *Medicines (Basel)* 2017;4(3):68.
29. Obistioiu D, Cristina RT, Schmerold I, Chizzola R, et al. Chemical characterization by GC-MS and in vitro activity against *Candida albicans* of volatile fractions prepared from *Artemisia dracunculus*, *Artemisia abrotanum*, *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. *Chemistry Central Journal* 2014;8:6.
30. Khalid KA, El-Gohary AE. Productivity of wormwood (*Artemisia abrotanum*) enhanced by trace elements. *Bull Natl Res Cent* 2020;44:120.
31. Mucciarelli M, Caramiello R, Maffei M, Chialva F. Essential oils from some *Artemisia* species growing spontaneously in North-West Italy. *Flavour Fragr J* 1995;10(1):25-32.
32. Khodakov GV, Kotikov IV, Pankovetskii VN. Component composition of essential oil from *Artemisia abrotanum* and *A. dracunculus*. *Chem Nat Compd* 2009;45(6):905-908.
33. Pino JA, Marbot R, Martí MP. Leaf oil of *Artemisia abrotanum* L grown in Cuba. *J Essent Oil Res* 2011;23(1):119-120.
34. Saunoriūtė S, Ragažinskienė O, Ivanauskas L, Marksa M. Essential oil composition of *Artemisia abrotanum* L during different vegetation stages in Lithuania. *Chemija* 2020;31(1):52-56.
35. Vostrowsky O, Michaelis K, Ihm H, Knobloch K. Das ätherische Öl von *Artemisia abrotanum* L. *Z Lebensm Unters Forsch* 1984;179:125-128.
36. Radulović NS, Blagojević PD, Zlatković BK, Palić RM. A GC/MS profile of the volatile constituents of the aerial parts of *Artemisia abrotanum* L. (Asteraceae) from Serbia. *S Afr J Chem* 2009;62:30-32.
37. Kebie N, Sisay MA. Essential oil and smoke components of *Artemisia absinthium* and *Hagenia abyssinica*. *Int J Food Sci* 2024;2024:9949040.
38. Juteau F, Jerković I, Masotti V, Miloš M, Mastelić J, Bessière J-M, et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France. *Planta Med* 2003;69(2):158-161.
39. Malaspina P, Polito F, Mainetti A, Khedhri S, De Feo V, Cornara L. Exploring chemical variability in the essential oil of *Artemisia absinthium* L. in relation to different phenological stages and geographical location. *Chem Biodivers* 2025;22:e00743.
40. Joshi RK. Volatile composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* growing in Western Ghats region of North West Karnataka, India. *Pharm Biol* 2013;51(7):888-892.

41. Jiang C, Zhou S, Liu L, Toshmatov Z, Huang L, Shi K, et al. Evaluation of the phytotoxic effect of the essential oil from *Artemisia absinthium*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2021;226: 112856.
42. Khan FA, Khan NM, Ahmad S, Nasruddin, Aziz R, Ullah I, et al. Phytochemical profiling, antioxidant, antimicrobial and cholinesterase inhibitory effects of essential oils isolated from the leaves of *Artemisia scoparia* and *Artemisia absinthium*. *Pharmaceuticals* 2022;15(10):1221.
43. Mohammed HA. Phytochemical analysis, antioxidant potential, and cytotoxicity evaluation of traditionally used *Artemisia absinthium* L. (wormwood) growing in the central region of Saudi Arabia. *Plants* 2022;11(8):1028.
44. Aati HY, Attia HA, Alanazi AS, AL Tamran LK, Wanner JK. Phytochemical characterization utilizing HS-SPME/GC-MS: Exploration of the antioxidant and enzyme inhibition properties of essential oil from Saudi *Artemisia absinthium* L. *Pharmaceuticals* 2024;17(11):1460.
45. Blagojević P, Radulović N, Palić R, Stojanović G. Chemical composition of the essential oils of Serbian wild-growing *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. *J Agric Food Chem* 2006;54(13):4780–4789.
46. Mathlouthi A, Saadaoui N, Ben-Attia M. Essential oils from *Artemisia* species inhibit biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* EPEC 2348/69. *Biofouling* 2021;37(2):174-183.
47. Vidic D, Čopra-Janićijević A, Miloš M, Maksimović M. Effects of different methods of isolation on volatile composition of *Artemisia annua* L. *Int J Anal Chem* 2018;2018:9604183.
48. Čavar S, Maksimović M, Vidic D, Parić A. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. *Ind Crops Prod* 2012;37(1):479–485.
49. Perazzo FF, Carvalho JCT, Carvalho JE, Rehder VLG. Central properties of the essential oil and the crude ethanol extract from aerial parts of *Artemisia annua* L. *Pharmacol Res* 2003;48(5):497–502.
50. Juteau F, Masotti V, Bessière JM, Dherbomez M, Viano J. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. *Fitoterapia* 2002;73(6):532–535.
51. Ahmad A, Misra LN. Terpenoids from *Artemisia annua* and constituents of its essential oil. *Phytochemistry* 1994;37(1):183–186.

52. Oftadeh M, Jalali Sendi JJ, Ebadollahi A. Toxicity and deleterious effects of *Artemisia annua* essential oil extracts on mulberry pyralid (*Glyphodes pyloalis*). *Pestic Biochem Physiol* 2020;170:104702.
53. Bedini S, Flamini G, Cosci F, Ascrizzi R, Echeverria MC, Guidi L, et al. *Artemisia* spp. essential oils against the disease-carrying blowfly *Calliphora vomitoria*. *Parasites Vectors* 2017;10:80.
54. Donato R, Santomauro F, Bilia AR, Flamini G, Sacco C. Antibacterial activity of Tuscan *Artemisia annua* essential oil and its major components against some foodborne pathogens. *LWT - Food Sci Technol* 2015;64(2):1251-1254.
55. Grifoni L, Sacco C, Donato R, Tziakas S, Tomou E M, Skaltsa H, et al. Environmentally friendly microemulsions of essential oils of *Artemisia annua* and *Salvia fruticosa* to protect crops against *Fusarium verticillioides*. *Nanomaterials* 2024;14(21):1715.
56. Risaliti L, Pini G, Ascrizzi R, Donato R, Sacco C, Bergonzi MC, et al. *Artemisia annua* essential oil extraction, characterization, and incorporation in nanoliposomes, smart drug delivery systems against *Candida species*. *J Drug Deliv Sci Technol* 2020;59:101849.
57. Santomauro F, Donato R, Sacco C, Pini G, Flamini G, Bilia AR. Vapour and liquid phase *Artemisia annua* essential oil activities against several clinical strains of *Candida*. *Planta Med* 2016;82(11/12):1016–1020.
58. Santomauro F, Donato R, Pini G, Sacco C, Ascrizzi R, Bilia AR. Liquid and vapor phase activity of *Artemisia annua* essential oil against pathogenic *Malassezia* spp. *Planta Med* 2018;84(3):160–167.
59. Liu H, Guo SS, Lu L, Li D, Liang J, Huang ZH, et al. Essential oil from *Artemisia annua* aerial parts: composition and repellent activity against two storage pests. *Nat Prod Res* 2019;35(5):822–825.
60. Sun W, Yang G, Zhang F, Feng C, Liang M, Jia P, et al. Effects of *Artemisia annua* L. essential oil on osteoclast differentiation and function induced by RANKL. *Evid Based Complement Alternat Med* 2022;2022:1322957.
61. Ma C, Wang H, Lu X, Li H, Liu B, Xu G. Analysis of *Artemisia annua* L. volatile oil by comprehensive two dimensional gas chromatography time of flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2007;1150(1-2):50-53.
62. Hong M, Kim M, Jang H, Bo S, Deepa P, Sowndhararajan K, et al. Multivariate analysis of essential oil composition of *Artemisia annua* L. collected from different locations in Korea. *Molecules* 2023;28(3):1131.

63. Das S, Vörös Horváth B, Bencsik T, Micalizzi G, Mondello L, Horváth G, et al. Antimicrobial activity of different *Artemisia* essential oil formulations. *Molecules* 2020;25(10):2390.
64. Chebbac K, Benziane Ouaritini Z, El Moussaoui A, Chalkha M, Lafraxo S, Bin Jordan YA, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of chemically analyzed essential oil of *Artemisia annua* L. (Asteraceae) native to Mediterranean area. *Life* (Basel) 2023;13(3):807.
65. Gouveia SC, Castilho PC. *Artemisia annua* L.: Essential oil and acetone extract composition and antioxidant capacity. *Ind Crops Prod* 2013;45:170-181.
66. Marinas IC, Oprea E, Chifiriuc MC, Badea IA, Buleandra M, Lazar V. Chemical composition and antipathogenic activity of *Artemisia annua* essential oil from Romania. *Chem Biodivers* 2015;12(10):1554-1564.
67. Chauhan N, Kashyap U, Dolma SK, Eswara Reddy SG. Chemical composition, insecticidal, persistence and detoxification enzyme inhibition activities of essential oil of *Artemisia maritima* against the pulse beetle. *Molecules* 2022;27(5):1547.
68. Stappen I, Wanner J, Tabanca N, Wedge DE, Ali A, Khan IA, et al. Chemical composition and biological effects of *Artemisia maritima* and *Artemisia nilagirica* essential oils from wild plants of western Himalaya. *Planta Med* 2014;80(13):1079–1087.
69. Jaitak V, Singh B, Kaul VK. Variability of volatile constituents in *Artemisia maritima* in western Himalaya. *Nat Prod Res* 2008;22(7):565–568.
70. Shah AJ, Gilani AH, Abbas K, Rasheed M, Ahmed A, Ahmad VU. Studies on the chemical composition and possible mechanisms underlying the antispasmodic and bronchodilatory activities of the essential oil of *Artemisia maritima* L. *Arch Pharm Res* 2011;34(8):1227-1238.
71. Malik S, de Mesquita LSS, Silva CR, de Mesquita JWC, de Sá Rocha E, Bose J, et al. Chemical profile and biological activities of essential oil from *Artemisia vulgaris* L. cultivated in Brazil. *Pharmaceuticals* 2019;12(2):49.
72. Jerkovic I, Mastelic J, Milos M, Juteau F, Masotti V, Viano J. Chemical variability of *Artemisia vulgaris* L. essential oils originated from the Mediterranean area of France and Croatia. *Flavour Fragr J* 2003;18(5):436-440.
73. Balasubramani S, Sabapathi G, Moola AK, Solomon RV, Venuvanalingam P, Bollipo Diana RK. Evaluation of the leaf essential oil from *Artemisia vulgaris* and its larvicidal and repellent activity against dengue fever vector *Aedes aegypti* — an experimental and molecular docking investigation. *ACS Omega* 2018;3(11):15657-15665.

74. Kunnathattil M, Visakh NU, Pathrose B, Punathil T, Ravindran AE, Narayanankutty A, et al. Evaluation of chemical composition, acaricidal, and repellent activities of *Artemisia vulgaris* L. (Asteraceae) essential oil against gall mite *Aceria pongamiae* Keifer (Acarina: Eriophyidae). *Molecules* 2025;30(16):3326.
75. Singh NB, Devi ML, Biona T, Sharma N, Das S, Chakravorty J, et al. Phytochemical composition and antimicrobial activity of essential oil from the leaves of *Artemisia vulgaris* L. *Molecules* 2023;28(5):2279.
76. Govindaraj S, Kumari BR, Cioni PL, Flamini G. Mass propagation and essential oil analysis of *Artemisia vulgaris*. *J Biosci Bioeng* 2008;105(3):176-183.
77. Jiang Z, Guo X, Zhang K, Sekaran G, Cao B, Zhao Q, et al. The essential oils and eucalyptol from *Artemisia vulgaris* L. prevent acetaminophen-induced liver injury by activating Nrf2–Keap1 and enhancing APAP clearance through non-toxic metabolic pathway. *Front Pharmacol* 2019;10:782.
78. Judzentiene A, Budiene J. Chemical polymorphism of essential oils of *Artemisia vulgaris* growing wild in Lithuania. *Chem Biodivers* 2018;15(2):e1700257.
79. Pandey BP, Thapa R, Upreti A. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oil and methanol extract of *Artemisia vulgaris* and *Gaultheria fragrantissima* collected from Nepal. *Asian Pac J Trop Med* 2017;10(11):1049–1057.
80. Moujir L, Callies O, Sousa PMC, Sharopov F, Seca AML. Applications of sesquiterpene lactones: A review of some potential success cases. *Applied Sciences* 2020;10(9):3001.
81. Ivanescu B, Miron A, Corciova A. Sesquiterpene lactones from *Artemisia* genus: Biological activities and methods of analysis. *J Anal Methods Chem* 2015;2015:247685.
82. Ekiert H, Klimek-Szczykutowicz M, Rzepiela A, Klin P, Szopa A. *Artemisia* species with high biological values as a potential source of medicinal and cosmetic raw materials. *Molecules* 2022;27(19):6427.
83. Nikitin E, Fitsev I, Egorova A, Logvinenko L, Terenzhev D, Bekmuratova F, et al. Five different *Artemisia* L. species ethanol extracts' phytochemical composition and their antimicrobial and nematocide activity. *Int J Mol Sci* 2023;24(18):14372.
84. de Almeida LM, de Carvalho LS, Gazolla MC, Pinto PLS, da Silva MPN, de Moraes J, et al. Flavonoids and sesquiterpene lactones from *Artemisia absinthium* and *Tanacetum parthenium* against *Schistosoma mansoni* Worms. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016;2016:9521349.
85. Aberham A, Cicek SS, Schneider P, Stuppner H. Analysis of sesquiterpene lactones, lignans, and flavonoids in wormwood (*Artemisia absinthium* L.) using high-performance

- liquid chromatography (HPLC)-mass spectrometry, reversed phase HPLC, and HPLC-solid phase extraction-nuclear magnetic resonance. *J Agric Food Chem* 2010;58(19):10817-10823.
86. Teterovska R, Sile I, Paulausks A, Kovalcuka L, Koka R, Mauriņa B, et al. The antioxidant activity of wild-growing plants containing phenolic compounds in Latvia. *Plants* 2023;12(24):4108.
87. Trifan A, Zengin G, Sinan KI, Sieniawska E, Sawicki R, Maciejewska-Turska M, et al. Unveiling the phytochemical profile and biological potential of five *Artemisia* species. *Antioxidants* 2022;11(5):1017.
88. Fu C, Yu P, Wang M, Qiu F. Phytochemical analysis and geographic assessment of flavonoids, coumarins and sesquiterpenes in *Artemisia annua* L. based on HPLC-DAD quantification and LC-ESI-QTOF-MS/MS confirmation. *Food Chem* 2020;312:126070.
89. Kontogianni VG, Primikyri A, Sakka M, Gerothanassis IP. Simultaneous determination of artemisinin and its analogs and flavonoids in *Artemisia annua* crude extracts with the use of NMR spectroscopy. *Magn Reson Chem* 2020;58(3):232-244.
90. Bilia AR, Melillo de Maltgalhaes P, Bergonzi MC, Vincieri FF. Simultaneous analysis of artemisinin and flavonoids of several extracts of *Artemisia annua* L. obtained from a commercial sample and a selected cultivar. *Phytomedicine* 2006;13(7):487-493.
91. Lang SJ, Schmiech M, Hafner S, Paetz C, Werner K, El Gaafary M, Schmidt CQ, Syrovets T, Simmet T. Chrysosplenol d, a flavonol from *Artemisia annua*, induces ERK1/2-mediated apoptosis in triple negative human breast cancer cells. *Int J Mol Sci* 2020;21(11):4090.
92. Suberu JO, Gorka AP, Jacobs L, et al. Anti-plasmodial polyvalent interactions in *Artemisia annua* L. aqueous extract--possible synergistic and resistance mechanisms. *PLoS One* 2013;8(11):e80790.
93. Chen XY, Liu T, Hu YZ, Qiao TT, Wu XJ, Sun PH, et al. Sesquiterpene lactones from *Artemisia vulgaris* L. as potential NO inhibitors in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. *Front Chem* 2022;10:948714.
94. Hanh TTH, Hang LTT, Huong PTT, et al. Two new guaiane sesquiterpene lactones from the aerial parts of *Artemisia vulgaris*. *J Asian Nat Prod Res* 2018;20(8):752-756.
95. Ciupei D, Colișar A, Leopold L, Stănilă A, Diaconeasa ZM. Polyphenols: From Classification to Therapeutic Potential and Bioavailability. *Foods* 2024;13(24):4131.
96. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2009;2(5):270-278.

97. Stachelska MA, Karpiński P, Kruszewski B. A comprehensive review of biological properties of flavonoids and their role in the prevention of metabolic, cancer and neurodegenerative diseases. *Applied Sciences* 2025;15(19):10840.
98. Sun W, Shahrajabian MH. Therapeutic potential of phenolic compounds in medicinal plants – natural health products for human health. *Molecules* 2023;28:1845.
99. Dias MC, Pinto DCGA, Silva AMS. Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules* 2021;26:5377.
100. Liu W, Feng Y, Yu S, Fan Z, Li X, Li J, et al. The flavonoid biosynthesis network in plants. *Int J Mol Sci* 2021;22(23):12824.
101. Kumar N, Goel N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol Rep (Amst)* 2019;24:e00370.
102. El Achkar T, El Achkar T, Greige-Gerges H, Fourmentin S. Basics and properties of deep eutectic solvents: a review. *Environ Chem Lett* 2021;19(4):3397-3408.
103. Coscarella M, Nardi M, Alipieva K, Bonacci S, Popova M, Procopio A, et al. Alternative assisted extraction methods of phenolic compounds using NaDESs. *Antioxidants* 2024;13(1):62.
104. Sharifi-Rad J, Herrera-Bravo J, Semwal P, Painuli S, Badoni H, Ezzat SM, et al. *Artemisia* spp.: An update on its chemical composition, pharmacological and toxicological profiles. *Oxid Med Cell Longev* 2022;2022:5628601.
105. Baiceanu E, Vlase L, Baiceanu A, Nanes M, Rusu D, Crisan G. New polyphenols identified in *Artemisiae abrotani* herba extract. *Molecules* 2015;20(6):11063-11075.
106. Neagu E, Paun G, Albu C, Eremia SA-MV, Radu GL. *Artemisia abrotanum* and *Symphytum officinale* polyphenolic compounds-rich extracts with potential application in diabetes management. *Metabolites* 2023;13(3):354.
107. Țicolea M, Pop RM, Pârvu M, Usatiuc L-O, Uifălean A, Ranga F, et al. Phytochemical composition antioxidant and anti-inflammatory activity of *Artemisia dracunculus* and *Artemisia abrotanum*. *Antioxidants* 2024;13(8):1016.
108. Liu Z, Li X, Jin Y, Nan T, Zhao Y, Huang L, et al. New Evidence for *Artemisia absinthium* as an alternative to classical antibiotics: Chemical analysis of phenolic compounds, screening for antimicrobial activity. *Int J Mol Sci* 2023;24(15):12044.
109. Hbika A, Daoudi NE, Bouyanzer A, Bouhrim M, Mohti H, Loukili EH, et al. *Artemisia absinthium* L. aqueous and ethyl acetate extracts: Antioxidant effect and potential activity *In Vitro* and *In Vivo* against pancreatic α -amylase and intestinal α -glucosidase. *Pharmaceutics* 2022;14(3):481

110. Craciunescu O, Constantin D, Gaspar A, Toma L, Utoiu E, Moldovan L. Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of *Arnica montana* L. and *Artemisia absinthium* L. ethanolic extracts. *Chem Cent J* 2012;6(1):97.
111. Koyuncu I. Evaluation of anticancer, antioxidant activity and phenolic compounds of *Artemisia absinthium* L. Extract. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2018;64(3):25-34.
112. Mravčáková D, Komáromyová M, Babják M, Urda Dolinská M, Königová A, Petrič D, et al. Anthelmintic activity of Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) and Mallow (*Malva sylvestris* L.) against *Haemonchus contortus* in sheep. *Animals* 2020;10(2):219.
113. Neagu E, Paun G, Albu C, Apreutesei OT, Radu GL. *In Vitro* Assessment of the antidiabetic and anti-inflammatory potential of *Artemisia absinthium*, *Artemisia vulgaris* and *Trigonella foenum-graecum* extracts processed using membrane technologies. *Molecules* 2023;28(20):7156.
114. Țicolea M, Pop RM, Pârvu M, Usatiuc L-O, Uifălean A, Pop DD, et al. Flowers and leaves of *Artemisia absinthium* and *Artemisia annua* phytochemical characterization, anti-inflammatory, antioxidant, and anti-proliferative activities evaluation. *Plants* 2025;14(7):1029.
115. Xiao LH, Li HB, Huang YX, Qin DP, Zhang CF, Wang ZZ, et al. Research on chemical constituents from *Artemisia annua* I. 2021;46(5):1160-1167.
116. Han J, Ye M, Qiao X, Xu M, Wang BR, Guo DA. Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug *Artemisia annua* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2008;47(3):516-525.
117. Anvari D, Jamei R. Evaluation of antioxidant capacity and phenolic content in ethanolic extracts of leaves and flowers of some Asteraceae species. *Recent Pat Food Nutr Agric* 2018;9(1):42-49.
118. Skowryra M, Gallego MG, Segovia F, Almajano MP. Antioxidant Properties of *Artemisia annua* extracts in model food emulsions. *Antioxidants* 2014;3(1):116-128.
119. Gavarić N, Aćimović M, Kladar N, Hitl M, Drljača Lero J, Milić N, et al. Unlocking the bioactivity of Sweet wormwood (*Artemisia annua* L., Asteraceae) ethanolic extract: Phenolics, antioxidants, and cytotoxic Effects. *Pharmaceutics* 2025;17(7):890.
120. Iqbal S, Younas U, Chan KW, Zia-Ul-Haq M, Ismail M. Chemical composition of *Artemisia annua* L. leaves and antioxidant potential of extracts as a function of extraction solvents. *Molecules* 2012;17(5):6020-6032.

121. Melguizo-Melguizo D, Diaz-de-Cerio E, Quirantes-Piné R, Švarc-Gajić J, Segura-Carretero A. The potential of *Artemisia vulgaris* leaves as a source of antioxidant phenolic compounds. *J Funct Foods* 2020;5:192–200.
122. Temraz A, El-Tantawy WH. Characterization of antioxidant activity of extract from *Artemisia vulgaris*. *Pak J Pharm Sci* 2008;21(4):321-326.
123. Oyedemi S, Coopoosamy R. Preliminary studies on the antibacterial and antioxidative potentials of hydroalcoholic extract from the whole parts of *Artemisia vulgaris* L. *Int J Pharmacol* 2015;2:1–9.
124. Dabe NE, Kefale AT. Antidiabetic effects of *Artemisia* species: A systematic review. *Anc Sci Life* 2017;36(4):175-181.
125. Sharafati-Chaleshtori R, Nickdasti A, Mortezapour E, Pourhanifeh MH, Ghazanfari M, Movahedpour A, et al. *Artemisia* species as a new candidate for diabetes therapy: A comprehensive review. *Curr Mol Med* 2021;21(10):832-849.
126. Ghanbari M, Lamuki MS, Habibi E, Sadeghimahalli F. *Artemisia annua* L. extracts improved insulin resistance via changing adiponectin, leptin and eesistin production in HFD/STZ diabetic mice. *J Pharmacopuncture* 2022;25(2):130-137.
127. Bagheri F, Amri J, Salehi M, Karami H, Alimoradian A, Latifi SA. Effect of *Artemisia absinthium* ethanolic extract on oxidative stress markers and the TLR4, S100A4, Bax and Bcl-2 genes expression in the kidney of STZ-induced diabetic rats. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2020;41(4):10.1515/hmbci-2020-0028.
128. Alsaleh AN, Aziz IM, Aljowaie RM, Alshalan RM, Alkubaisi NA, Aboul-Soud MAM. *In Vitro* evaluation, chemical profiling, and *In silico* ADMET prediction of the pharmacological activities of *Artemisia absinthium* root extract. *Pharmaceuticals (Basel)* 2024;17(12):1646.
129. Li Q, Rubin L, Silva M, Li S, Yang C, Lazarovici P, et al. Current progress on neuroprotection induced by *Artemisia*, *Ginseng*, *Astragalus*, and *Ginkgo* traditional chinese medicines for the therapy of Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev* 2022;2022:3777021.
130. Sailike B, Omarova Z, Jenis J, Adilbayev A, Akbay B, Askarova S, et al. Neuroprotective and anti-epileptic potentials of genus *Artemisia* L. *Front Pharmacol* 2022;13:1021501.
131. Zhou W, Lei B, Yang C, Silva M, Xing X, Yu H, et al. *Artemisia annua* extract improves the cognitive deficits and reverses the pathological changes of Alzheimer's disease via regulating YAP signaling. *Int J Mol Sci* 2023;24(6):5259.

132. Quan S, Li J, Ding S, Zhuo X, Yang Y, Li Q. Artemether exerts neuroprotective effect in Parkinson's disease through the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway. *Eur J Pharmacol* 2025;996:177566.
133. Bora KS, Sharma A. Neuroprotective effect of *Artemisia absinthium* L. on focal ischemia and reperfusion-induced cerebral injury. *J Ethnopharmacol* 2010;129(3):403-409.
134. Khan FA, Khan NM, Ahmad S, Nasruddin, Aziz R, Ullah I, et al. Phytochemical profiling, antioxidant, antimicrobial and cholinesterase inhibitory effects of essential oils isolated from the leaves of *Artemisia scoparia* and *Artemisia absinthium*. *Pharmaceuticals (Basel)* 2022;15(10):1221.
135. Chougouo RD, Nguekeu YM, Dzoyem JP, Awouafack MD, Kouamouo J, Tane P, et al. Anti-inflammatory and acetylcholinesterase activity of extract, fractions and five compounds isolated from the leaves and twigs of *Artemisia annua* growing in Cameroon. *Springerplus* 2016;5(1):1525.
136. Isani G, Bertocchi M, Andreani G, Farruggia G, Cappadone C, Salaroli R, et al. Cytotoxic Effects of *Artemisia annua* L. and pure artemisinin on the D-17 canine osteosarcoma cell line. *Oxid Med Cell Longev* 2019;2019:1615758.
137. Alrumaihi F. Exploring the Chemopreventive Potential of *Artemisia annua* methanolic extract in colorectal cancer induced by azoxymethane in mice. *Pharmaceuticals* 2025;18(1):34.
138. Tsamesidis I, Papadimitriou-Tsantarliotou A, Christodoulou A, Amanatidou D, Avgeros C, Stalika E, et al. Investigating the cytotoxic effects of *Artemisia absinthium* extract on oral carcinoma cell line. *Biomedicines* 2024;12(12):2674.
139. Omar AM, Dibwe DF, Tawila AM, Sun S, Kim MJ, Awale S. Chemical constituents from *Artemisia vulgaris* and their antiausterity activities against the PANC-1 human pancreatic cancer cell line. *Nat Prod Res* 2021;35(22):4279-4285.
140. Lian G, Li F, Yin Y, Chen L. Herbal extract of *Artemisia vulgaris* (mugwort) induces antitumor effects in HCT-15 human colon cancer cells via autophagy induction, cell migration suppression and loss of mitochondrial membrane potential. *J BUON* 2018;23(1):73-78.
141. Saleh AM, Aljada A, Rizvi SA, Nasr A, Alaskar AS, Williams JD. *In vitro* cytotoxicity of *Artemisia vulgaris* L. essential oil is mediated by a mitochondria-dependent apoptosis in HL-60 leukemic cell line. *BMC Complement Altern Med* 2014;14:226.
142. Jokić S, Jerković I, Pavić V, Aladić K, Molnar M, Jakovljević Kovač M, et al. Terpenes and cannabinoids in supercritical CO₂ extracts of industrial hemp inflorescences:

- Optimization of extraction, antiradical and antibacterial activity. *Pharmaceuticals (Basel)* 2022;15(9):1117.
143. Tschiggerl C, Bucar F. Investigation of the volatile fraction of rosemary infusion extracts. *Sci Pharm* 2010;78(3):483-92.
144. Adams R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4. izd., Carol Stream: Allured Publishing Corp, 2007.
145. Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis – a thin-layer chromatography atlas, 2nd ed. Berlin: Heidelberg, 2009:197.
146. Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Štefan MB, Alegro A, Koszegi T, Petrik J. Antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected *Micromeria* species from Croatia. *Molecules* 2011;16(2):1454-70.
147. Blažeković B, Stanić G, Vladimir-Knežević S. Morfološko-anatomska i fitokemijska obilježja biljnih vrsta *Thymus vulgaris* L. i *Thymus pulegioides* L. *Farm Glas* 2006;62(3):121-30.f
148. Vladimir-Knežević S, Perković M, Zagajski Kučan K, Mervić M, Rogošić M. Green extraction of flavonoids and phenolic acids from elderberry (*Sambucus nigra* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) using deep eutectic solvents. *Chem Pap* 2022;76:341-49.
149. Ramić D, Bucar F, Kunej U, Dogša I, Klančnik A, Smole Možina S. Antibiofilm Potential of *Lavandula* Preparations against *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 2021;87(19):e0109921.
150. Kunert O, Alperth F, Pabi E, Bucar F. Highly oxidized flavones in *Artemisia* species – structure revisions and improved UHPLC-MSⁿ analysis. *Heliyon* 2023;9(11):e22309.
151. Vladimir-Knežević S, Bival Štefan M, Blažeković B, Jelić D, Petković T, Mandić M, et al. Src Tyrosine kinase inhibitory and antioxidant activity of black chokeberry and bilberry fruit extracts rich in chlorogenic acid. *Int J Mol Sci* 2023;24(21):15512.
152. Kroppek M, Bival Štefan M, Rajkovača K, Petković T, Cvetnić M, Bolanča T, et al. Comparative phenolic profiles of monovarietal wines from different Croatian regions. *Appl Sci* 2023;13(5):3031.
153. Mervić M, Bival Štefan M, Kindl M, Blažeković B, Marijan M, Vladimir-Knežević S. Comparative antioxidant, anti-acetylcholinesterase and anti- α -glucosidase activities of Mediterranean *Salvia* species. *Plants (Basel)* 2022;11(5):625.
154. Sudha P, Zinjarde SS, Bhargava SY, Kumar AR. Potent α -amylase inhibitory activity of Indian Ayurvedic medicinal plants. *BMC Complement Altern Med* 2011; 11:5.

155. Uddin MJ, Russo D, Haque MA, Çiçek SS, Sönnichsen FD, Milella L, et al. Bioactive abietane-type diterpenoid glycosides from leaves of *Clerodendrum infortunatum* (Lamiaceae). *Molecules* 2021; 26(14): 4121.
156. Radulović NS, Randelović PJ, Stojanović NM, Blagojević PD, Stojanović-Radić ZZ, Ilić IR, et al. Toxic essential oils. Part II: Chemical, toxicological, pharmacological and microbiological profiles of *Artemisia annua* L. volatiles. *Food Chem Toxicol* 2013;58:37-49.
157. Aćimović M, Stanković Jeremić J, Todosijević M, Kiprovski B, Vidović S, Vladić J, Pet al. Comparative study of the essential oil and hydrosol composition of sweet wormwood (*Artemisia annua* L.) from Serbia. *Chem Biodivers* 2022;19:e202100954.
158. Bilia AR, Santomauro F, Sacco C, Bergonzi MC, Donato R. Essential oil of *Artemisia annua* L.: An extraordinary component with numerous antimicrobial properties. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014;2014:159819.
159. Abad MJ, Bedoya LM, Apaza L, Bermejo P. The *Artemisia* L. genus: a review of bioactive essential oils. *Molecules* 2012; 17(3): 2542-2566.
160. Yousefi M, Rahimi-Nasrabadi M, Pourmortazavi SM, Wysokowski M, Jesionowski T, Ehrlich H, et al. Supercritical fluid extraction of essential oils. *TrAC Trends Anal Chem* 2019;118:182-193.
161. Cheriyan BV, Karunakar KK, Anandakumar R, Murugathirumal A, Senthil Kumar A. Eco-friendly extraction technologies: A comprehensive review of modern green analytical methods. *Sustain Chem Clim Action* 2025;6:100054.
162. Kohler M, Haerdi W, Christen P, Veuthey JL. Extraction of artemisinin and artemisinic acid from *Artemisia annua* L. using supercritical carbon dioxide. *J Chromatogr A* 1997;785:353-360.
163. Baldino L, Reverchon E, Della Porta G. An optimized process for SC-CO₂ extraction of antimalarial compounds from *Artemisia annua* L. *J Supercrit Fluids* 2017;128:89-93.
164. Martinez-Correa HA, Bitencourt RG, Kayano ACAV, Magalhães PM, Costa FTM, Cabral FA. Integrated extraction process to obtain bioactive extracts of *Artemisia annua* L. leaves using supercritical CO₂, ethanol and water. *Ind Crops Prod* 2017;95:535-542.
165. Ciftci ON, Cahyadi J, Guigard SE, Saldaña MDA. Optimization of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L. with supercritical carbon dioxide + ethanol using response surface methodology. *Electrophoresis* 2018;39:1926-1933.

166. Li Y, Xia L, Vazquez JFT, Song S. Optimization of supercritical CO₂ extraction of essential oil from *Artemisia annua* L. by means of response surface methodology. *J Essent Oil Bear Plants* 2017;20:314-327.
167. Vidović S, Simić S, Gavarić A, Aćimović M, Vladić J. Extraction of sweet wormwood (*Artemisia annua* L.) by supercritical carbon dioxide. *Lek Sirovine* 2020;40:22-26.
168. Confortin TC, Todero I, Canabarro N, Luft L, Ugalde GA, Neto JRC, et al. Supercritical CO₂ extraction of compounds from different aerial parts of *Senecio brasiliensis*: Mathematical modeling and effects of parameters on extract quality. *J Supercrit Fluids* 2019;153:104589.
169. Banožić M, Wronska AW, Jakovljević Kovač M, Aladić K, Jerković I, Jokić S. Comparative evaluation of different extraction techniques for separation of artemisinin from sweet wormwood (*Artemisia annua* L.). *Horticulturae* 2023;9:629.
170. Habibi Z, Ghanian S, Ghasemi S, Yousefi M. Chemical composition and antibacterial activity of the volatile oil from seeds of *Artemisia annua* L. from Iran. *Nat Prod Res* 2013;27:198-200.
171. Wang Y, Huang W, Wang N, Ouyang D, Xiao L, Zhang S, et al. Development of arteannuin B sustained-release microspheres for anti-tumor therapy by integrated experimental and molecular modeling approaches. *Pharmaceutics* 2021;13:1236.
172. Huang W, Wang Y, He T, Zhu J, Li J, Zhang S, et al. Arteannuin B enhances the effectiveness of cisplatin in non-small cell lung cancer by regulating connexin 43 and MAPK pathway. *Am J Chin Med* 2022;50:1963-1992.
173. Varela K, Arman HD, Berger MS, Sponsel VM, Lin CA, Yoshimoto FK. Inhibition of cysteine proteases via thiol-Michael addition explains the anti-SARS-CoV-2 and bioactive properties of arteannuin B. *J Nat Prod* 2023;86:1654-1666.
174. Baggieri M, Gioacchini S, Borgonovo G, Catinella G, Marchi A, Picone P, et al. Antiviral, virucidal and antioxidant properties of *Artemisia annua* against SARS-CoV-2. *Biomed Pharmacother* 2023;168:115682.
175. Chen H, Hu Q, Wen T, Luo L, Liu L, Wang L, et al. Arteannuin B, a sesquiterpene lactone from *Artemisia annua*, attenuates inflammatory response by inhibiting the ubiquitin-conjugating enzyme UBE2D3-mediated NF-κB activation. *Phytomedicine* 2024;124:155263.
176. Chandra M, Prakash O, Kumar R, Bachheti RK, Bhushan B, Kumar M, et al. β-Selinene-rich essential oils from the parts of *Callicarpa macrophylla* and their antioxidant and pharmacological activities. *Medicines* 2017;4:52.

177. Saunoriūtė S, Ragažinskienė O, Ivanauskas L, Marksa M, Laužikė K, Raudonė L. Phenolic diversity and antioxidant activity of *Artemisia abrotanum* L. and *Artemisia absinthium* L. during vegetation stages. *Separations* 2023;10(10):545.
178. Jaiswal R, Patras MA, Eravuchira PJ, Kuhnert N. Profile and characterization of the chlorogenic acids in green Robusta coffee beans by LC-MSⁿ: identification of seven new classes of compounds. *J Agric Food Chem* 2010;58(15):8722–8737.
179. Ramabulana AT, Steenkamp P, Madala N, Dubery IA. Profiling of chlorogenic acids from *Bidens pilosa* and differentiation of closely related positional isomers with the aid of UHPLC-QTOF-MS/MS-based in-source collision-induced dissociation. *Metabolites* 2020;10(5):178.
180. Mateos R, Baeza G, Sarriá B, Bravo L. Improved LC-MSⁿ characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity. *Food Chem* 2018;241:232-241.
181. Clifford MN, Knight S, Kuhnert N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ. *J Agric Food Chem* 2005;53(10):3821-3832.
182. Zhao W, Zhang W, Chen Y, Yang F, Cao Q, Chen W, et al. Identification and purification of novel chlorogenic acids in *Artemisia annua* L. *J. Exp Biol Agric Sci.* 2015;3(5):415-422.
183. Shi H, Wang Z, Xu F, Li J, Li J, Wang M. A Discovery-Based Metabolomic Approach Using UPLC-Q-TOF-MS/MS Reveals Potential Antimalarial Compounds Present in *Artemisia annua* L. *Int J Mol Sci* 2022;23(23):14903.
184. He M, Yasin K, Yu S, Li J, Xia L. Total flavonoids in *Artemisia absinthium* L. and evaluation of its anticancer activity. *Int J Mol Sci* 2023;24(22):16348.
185. Lee SY, Mediani A, Ismail IS, Maulidiani, Abas. Antioxidants and α -glucosidase inhibitors from *Neptunia oleracea* fractions using ¹H NMR-based metabolomics approach and UHPLC-MS/MS analysis. *BMC Complement Altern Med* 2019;19:7.
186. Ferreres F, Silva BM, Andrade PB, Seabra RM, Ferriera MA. Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). *Phytochem Anal* 2003;14(6):352–359.
187. Islam MN, Ishita IJ, Jung HA, Choi JS. Vicenin 2 isolated from *Artemisia capillaris* exhibited potent anti-glycation properties. *Food Chem Toxicol* 2014;69:55-62.
188. Li M, Pu Y, Yoo CG, Ragauskas AJ. The occurrence of triclin and its derivatives in plants. *Green Chem* 2016;18(6):1439–1454.

189. Siwan D, Nandave D, Nandave M. *Artemisia vulgaris* Linn: an updated review on its multiple biological activities. *Future J Pharm Sci* 2022;8:47.
190. Megdiche-Ksoury W, Trabelsi N, Mkadmini K, Bourgou S, Noumi A, Mejdj S, et al. *Artemisia campestris* phenolic compounds have antioxidant and antimicrobial activity. *Ind Crop Prod* 2015;77:292-299.
191. Yang X, Zhang H, Mushtaq W, Zhao J, Lei M, Peng S, et al. Hispidulin mediates long-term cadmium tolerance and accumulation capacity in *Artemisia argyi*. *Ind Crop Prod* 2026;241:122819.
192. Ivanescu B, Vlase L, Lungu C, Corciova A. HPLC analysis of phenolic compounds from *Artemisia* species. *Eur Chem Bull* 2016;5(4):119-123.
193. Fu C, Zhang K, Wang M, Qiu F. Casticin and chrysosplenol D from *Artemisia annua* L. induce apoptosis by inhibiting topoisomerase II α in human non-small-cell lung cancer cells. *Phytomedicine* 2022;100:154095.
194. Wei S, Ji H, Yang B, Ma L, Bei Z, Li X, et al. Impact of chrysosplenetin on the pharmacokinetics and anti-malarial efficacy of artemisinin against *Plasmodium berghei* as well as in vitro CYP450 enzymatic activities in rat liver microsome. *Malar J* 2015;14:432.
195. Ferreira JFS, Luthria DL, Sasaki T, Heyerick A. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. *Molecules* 2010;15(5):3135-3170.
196. Negri S, Pietrolucci F, Andreatta S, Njoku RC, Silva CA, Ramos N, et al. Bioprospecting of *Artemisia* genus: from artemisinin to other potentially bioactive compounds. *Sci Rep* 2024;14(1):4791.
197. Barbieri JB, Goltz C, Batistão F, Toci CAT, Igarashi-Mafra L, Mafra MR. Deep eutectic solvents applied in the extraction and stabilization of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) phenolic compounds. *Ind Crops Prod* 2020;144:112049.
198. Dai Y, van Spronsen J, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal Chim Acta* 2013;766:61-68.
199. Dai Y, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chem.* 2015;187:14-19.
200. Lei J, Vodovotz Y, Tzeng E, Billiar TR. Nitric oxide, a protective molecule in the cardiovascular system. *Nitric Oxide* 2013;35:175-185.

201. Kindl M, Blažeković B, Vladimir-Knežević S, Bucar F. Antioxidant and anticholinesterase potential of six *Thymus* species. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015;2015:403950.
202. Sun L, Zhang J, Lu X, Zhang L, Zhang Y. Evaluation of the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food Chem Toxicol* 2011;49(10):2689-2696.
203. Yoon HJ, Lee MS, Kang JH. Reaction of ferritin with hydrogen peroxide induces lipid peroxidation. *BMP Rep* 2010;43(3):219-224.
204. Abe C, Miyazawa T, Miyazawa T. Current use of Fenton reaction in drugs and food. *Molecules* 2022;27(17):5451.
205. Doroszkiewicz J, Farhan JA, Mroczko J, Winkel I, Perkowski M, Mroczko B. Common and trace metals in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Int J Mol Sci* 2023;24(21):15721.
206. Abe C, Miyazawa T, Miyazawa T. Current use of Fenton reaction in drugs and food. *Molecules* 2022;27(17):5451.
207. Alberti KGM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15:539–553.
208. Kashtoh H, Baek K-H. New insights into the latest advancement in α -amylase inhibitors of plant origin with anti-diabetic effects. *Plants* 2023;12(16):2944.
209. Ogunyemi OM, Gyebi GA, Saheed A, Paul J, Nwaneri-Chidozie V, Olorundare O, et al. Inhibition mechanism of alpha-amylase, a diabetes target, by a steroidal pregnane and pregnane glycosides derived from *Gongronema latifolium* Benth. *Front Mol Biosci* 2022;9:866719.
210. Samson SL, Garber AJ. Prevention of type 2 diabetes mellitus: Potential of pharmacological agents. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2016;30(3):357-371.
211. Okuyama M, Saburi W, Mori H, Kimura A. α -Glucosidases and α -1,4-glucan lyases: structures, functions, and physiological actions. *Cell Mol Life Sci* 2016;73(14):2727-2751.
212. Derosa G, Maffioli P. α -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice. *Arch Med Sci* 2012;8(5):899-906.
213. Martin AE, Montgomery PA. Acarbose: an alpha-glucosidase inhibitor. *Am J Health Syst Pharm* 1996;53(19):2277-2337.

214. Yedjou CG, Grigsby J, Mbemi A, et al. The management of diabetes mellitus using medicinal plants and vitamins. *Int J Mol Sci* 2023;24(10):9085.
215. Eertmans F, Bogaert V, Van Poecke T, Puype B. An improved neutral α -glucosidase assay for assessment of epididymal function-validation and comparison to the WHO method. *Diagnostics (Basel)* 2014;4(1):1-11.
216. Acquaviva A, Nilofar, Bouyahya A, Zengin G, Di Simone SC, Recinella L, et al. Chemical characterization of different extracts from *Artemisia annua* and their Antioxidant, enzyme inhibitory and anti-inflammatory properties. *Chem Biodivers* 2023;20(8):e202300547.
217. Xiaopeng Z, Jing Y, Xia L, Xingsheng W, Juan D, Yan L, et al. Global Burden of Alzheimer's disease and other dementias in adults aged 65 years and older, 1991-2021: population-based study. *Front Public Health* 2025;13:1585711.
218. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 2001;81(2):741-766.
219. Marucci G, Buccioni M, Dal Ben D, Lambertucci C, Volpini R, Amenta F. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 2021;190:108352.
220. Williams P, Sorribas A, Howes MJ. Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. *Nat Prod Rep* 2011;28(1):48-77.

7 PRILOZI






PRILOG 1

Mandić M, Ivančić I, Cvetnić M, Ferrante C, Orlando G, Vladimir-Knežević S. Green extraction of volatile terpenes from *Artemisia annua* L. *Molecules* 2025;30(7):1638.

Article

Green Extraction of Volatile Terpenes from *Artemisia annua* L.

Marta Mandić¹, Ivona Ivančić¹, Matija Cvetnić² , Claudio Ferrante³ , Giustino Orlando³
and Sanda Vladimir-Knežević^{4,*} 

¹ Faculty of Pharmacy, University of Mostar, Matice Hrvatske BB, 88000 Mostar, Bosnia and Herzegovina; marta.mandic@farf.sum.ba (M.M.); ivona.ivancic@farf.sum.ba (I.I.)

² Faculty of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb, Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Croatia; mcvetnic@fkit.unizg.hr

³ Department of Pharmacy, D'Annunzio University of Chieti-Pescara, Via dei Vestini, 31, 66013 Chieti, Italy; claudio.ferrante@unich.it (C.F.); giustino.orlando@unich.it (G.O.)

⁴ Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

* Correspondence: sanda.vladimir@pharma.unizg.hr

Abstract: In the present study, the extraction of volatile terpenes from *A. annua* with supercritical CO₂ (sc-CO₂) was optimized by a full factorial design procedure and compared with conventional distillation. The influence of pressure (100–220 bar) and temperature (40–60 °C) on sc-CO₂ extraction was investigated to obtain extracts rich in the desired components while maintaining a high yield. Extraction yields (m/m) varied from 0.62% (130 bar/40 °C) to 1.92% (100 bar/60 °C). Monoterpenes were the most abundant constituents of the sc-CO₂ extracts, among which artemisia ketone (16.93–48.49%), camphor (3.29–18.44%) and 1,8-cineole (4.77–11.89%) dominated. Arteannuin B (3.98–10.03%) and β-selinene (1.05–7.42%) were the major sesquiterpenes. Differences were found between the terpene profiles of the sc-CO₂ extracts and the essential oils obtained by conventional hydrodistillation and steam distillation, as well as between the distilled essential oils. Our results demonstrate the optimal conditions for the rapid and effective supercritical extraction of certain monoterpenes and sesquiterpenes from *A. annua*, which have promising antimicrobial, antioxidant, antiviral, anti-inflammatory and antitumor properties.

Keywords: *Artemisia annua*; sweet wormwood; essential oil; terpenes; green extraction; hydrodistillation; steam distillation; supercritical CO₂ extraction; artemisia ketone; arteannuin B



check for updates

Academic Editor: Dimitris P. Makris

Received: 19 February 2025

Revised: 31 March 2025

Accepted: 31 March 2025

Published: 7 April 2025

Citation: Mandić, M.; Ivančić, I.; Cvetnić, M.; Ferrante, C.; Orlando, G.; Vladimir-Knežević, S. Green Extraction of Volatile Terpenes from *Artemisia annua* L. *Molecules* **2025**, *30*, 1638. <https://doi.org/10.3390/molecules30071638>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Artemisia L. is one of the largest and most widespread genera in the Asteraceae family. It comprises more than 500 taxa that are widely distributed in the temperate regions of the northern hemisphere, with only a few representatives in the southern hemisphere. *Artemisia* species mainly colonize dry and semi-arid habitats, from sea level to high altitudes, but they are able to thrive and survive in almost all habitat types. Central Asia is the center of their origin and their main center of diversification, while the Mediterranean region and Northwest America are two secondary speciation areas [1,2]. They are herbaceous annual, biennial and perennial plants or compact shrubs known for their characteristic bitter taste and pungent odor due to the presence of sesquiterpene lactones and other terpenoids [3,4]. *Artemisia* species have a rich history in traditional medicine around the world and provide remedies for a variety of ailments [5]. In addition to their promising traditional use, modern scientific research continues to investigate the efficacy and safety of *Artemisia* species in various therapeutic contexts. These medicinal plants gained much research attention in

2015, when the Nobel Prize in Physiology and Medicine was awarded for the discovery of artemisinin, a sesquiterpene lactone isolated from the Chinese herb *A. annua* L. (sweet wormwood), which is widely used as an antimalarial agent. The discovery of artemisinin has dramatically changed the landscape in the fight against malaria and has led to a paradigm shift in the development of antimalarial drugs [6,7].

A. annua has been used in traditional Asian medicine, especially in Chinese and Hindu medicine, for more than 2000 years to treat fever in various diseases [8]. *A. annua* has significant health benefits, particularly in the fight against malaria, but it also shows promise in other therapeutic areas, including the treatment of viral and bacterial diseases and even cancer. Namely, extensive scientific research has shown that *A. annua* has numerous other biological activities, such as action against other diseases caused by protozoa; antibacterial, antifungal and antiviral activities; and immunosuppressive, anti-inflammatory, anticancer, analgesic, nephroprotective, antioxidant and anti-obesity effects [9–12]. Due to its high biological value, the plant is increasingly used as an ingredient in cosmetic products for the protection and care of skin, hair and nails [8,13].

The most important bioactive components of *A. annua* are mainly specific sesquiterpene lactones, essential oil, flavonoids, phenolic acids and coumarins. The geographical location and habitat in which the plant grows, the time of harvest, the drying conditions and the extraction method have a major influence on the phytochemical profile of the plant and thus on its biological properties [10]. Previous studies have shown that the essential oil, which consists mainly of monoterpenes and sesquiterpenes, contributes significantly to the biological effects and health benefits of *A. annua*, but the content and composition of the essential oil are subject to considerable variability [8]. Due to its geographical origin, the essential oil of *A. annua* showed large differences in the contents of the main components artemisia ketone (3,3,6-trimethyl-1,5-heptadien-4-one), 1,8-cineole, camphor and germacrene D [14,15]. Furthermore, an intraspecific chemical diversity within the species was observed based on the essential oil profile [16]. The essential oil composition is certainly influenced by the extraction methods used. Hydrodistillation and solvent extraction are the traditional methods used to obtain the essential oil of *A. annua*. The extraction method is one of the most important elements in determining the quality of essential oils, as their chemical signature, intrinsic properties and bioactivity can be affected. For example, high temperatures and the presence of water during hydrodistillation can lead to degradation and chemical alteration of the essential oils, while the essential oils obtained by extraction with organic solvents usually contain toxic solvent residues [17,18]. Supercritical fluid extraction (SFE) has proven to be an innovative method for isolating essential oils, as it allows extracts to be obtained without solvent contamination and uses mild processing conditions that avoid the degradation of heat-sensitive compounds.

This extraction method is advantageous due to its “green” properties and milder temperature conditions, but it also enables selectivity and efficiency due to the properties of a supercritical fluid. The SFE utilizes the improved diffusivity and low viscosity of the supercritical fluid, which facilitates the efficient extraction of analytes from complex matrices. Supercritical carbon dioxide (sc-CO₂) is most commonly used as it is non-flammable, low toxic, inexpensive and easy to remove from the extract. A CO₂ recycling system in SFE is associated with lower costs and lower environmental impact, which is in line with the principles of green chemistry [19,20]. The extraction yield and the composition of the extracts proved to be useful criteria for comparing SFE with conventional extraction methods. For example, the essential oil was isolated from *Eucalyptus loxophleba* leaves by the parallel application of SFE, Soxhlet extraction and hydrodistillation. The highest yield was achieved by Soxhlet extraction with ethanol, and the lowest was achieved by hydrodistillation. In Soxhlet extraction, the type of solvent had a greater influence on

the yield than the extraction time, while in hydrodistillation, the yield increased with the extraction time. The addition of ethanol as a co-solvent improved the efficiency of the SFE. The hydrodistilled essential oil contained only volatile components, while the other two samples contained both volatile and higher molecular weight compounds. Accordingly, the content of 1,8-cineole was highest in the distilled essential oil and lowest in the Soxhlet extract [21]. A comparison of the essential oils extracted from different *Salvia* species using sc-CO₂ and simultaneous distillation/extraction showed that the yield of the supercritical extracts was significantly lower [22]. The yield and chemical profile of *Thymus munbyanus* essential oils obtained by SFE and hydrodistillation were also compared. The yield of the supercritical extract was higher than that of the hydrodistilled essential oil but with a significantly lower number of volatile terpenes and more terpenes with a higher molecular mass [23]. Supercritical CO₂ permeates solid matrices and selectively dissolves the target compounds without the need for large amounts of organic solvents. However, co-solvents can be added as CO₂ does not have the necessary polarity to extract polar substances. The SFE process is optimized by adjusting the properties of the supercritical fluid. It has been found that pressure, temperature, co-solvent concentration, sample size, flow rate and extraction time influence the efficiency of SFE [20].

In line with all the above, our study primarily aimed to optimize the environmentally friendly, mild and rapid process of supercritical CO₂ extraction of volatile terpenes from leaves and flowering tops of *A. annua* using a full factorial design approach. We focused our research on obtaining extracts that are rich in the desired components and, at the same time, have a high yield. A second objective was to compare the terpene profile of the sc-CO₂ extracts with the essential oils obtained by hydrodistillation and steam distillation.

2. Results and Discussion

2.1. Content and Composition of Essential Oil of *Artemisia annua* Obtained by Hydrodistillation and Steam Distillation

The essential oil was isolated from the flowering tops and leaves of *A. annua* by hydrodistillation and steam distillation for three hours. Hydrodistillation yielded 3.24% (V/m) of the essential oil, while steam distillation yielded 0.50% (V/m). It is difficult to compare the yields obtained with previous studies, as many factors, such as the parts of the plant collected, the time of harvest, the drying method, the geographical region or the method and duration of the distillation process, play an important role. Previous studies have shown that the essential oil yield of *A. annua* obtained by hydrodistillation during the flowering period from August to November can vary between 0.37% and 2.25% [24–32]. It was also found that hydrodistillation of the flowering tops and leaves gave a higher yield of essential oil (0.99%) than the whole aerial parts (0.66%) of *A. annua* [29]. Steam distillation is much less commonly used in essential oil research than hydrodistillation, which is also true for *A. annua*. It has been reported that the yield of essential oil of *A. annua* from various regions of Korea obtained by steam distillation ranged from 0.04% to 1.09% [16].

According to the results of GC-MS analysis, 34 and 26 different compounds were identified in the essential oils from leaves and flowering tops obtained by hydrodistillation and steam distillation, which accounted for 97.55% and 95.04% of the total oil content, respectively (Table 1). Both essential oil samples were characterized by a very high content of monoterpenes (91.62% and 88.13%, respectively), while sesquiterpenes were only weakly represented. The monoterpenes were predominantly present in oxidized form, while hydrocarbons were the most abundant of the sesquiterpenes. Despite the significant differences in content observed, artemisia ketone was the major constituent of both the essential oil obtained by hydrodistillation (29.20%) and the essential oil obtained by steam distillation (42.04%) (Figure 1). The hydrodistilled essential oil contained significant

amounts of camphor (17.67%), 1–8 cineole (9.88%), myrcene (7.73%) and α -pinene (7.64%), while the steam-distilled oil contained more α -pinene (17.78%) and less of the other components mentioned (1.11–7.47%). Among the sesquiterpenes, β -selinene (1.74–3.70%) and caryophyllene oxide (0.90–2.26%) were the most abundant.

Table 1. Composition of the essential oil of *Artemisia annua* L. obtained by hydrodistillation and steam distillation.

Compound	RI	Yield (%)	
		Hydrodistillation	Steam Distillation
Tricyclene	922	0.17	0.11
α -Thujene	926	-	0.20
α -Pinene	933	7.64	17.78
2-Methylpropyl butanoate	943	0.17	0.27
Camphene	947	3.86	2.55
Sabinene	973	1.51	1.25
β -Pinene	976	1.29	1.84
Myrcene	991	7.73	1.11
Yomogi alcohol	1001	0.93	0.39
α -Terpinene	1016	0.17	0.31
<i>p</i> -Cymene	1024	-	0.72
Limonene	1028	0.26	0.23
1,8-Cineole	1030	9.88	7.47
γ -Terpinene	1057	0.22	0.42
Artemisia ketone	1061	29.20	42.04
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1067	0.19	-
Artemisia alcohol	1083	3.22	0.81
<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1099	0.19	-
1,3,8- <i>p</i> -Mentatriene	1103	1.59	-
α -Campholenal	1126	0.24	0.47
<i>trans</i> -Pinocarveol	1138	0.92	1.79
2-Methyl-6-methylene-1,7-octadien-3-one	1140	0.72	-
Camphor	1143	17.67	4.89
Ocimenol	1157	1.17	-
Pinocarvone	1162	1.20	2.46
Terpinen-4-ol	1177	0.54	0.29
α -Terpineol	1190	0.56	-
Myrtenol	1196	0.55	0.73
Eugenol	1357	0.22	-
α -Copaene	1374	0.37	0.33
<i>trans</i> - β -Caryophyllene	1417	0.92	-
<i>trans</i> - β -Farnesene	1456	0.31	-
Artemisia triene	1465	0.20	0.35
Germacrene D	1478	1.10	-
β -Selinene	1483	1.74	3.70
Caryophyllene oxide	1580	0.90	2.26
Monoterpenes		91.62	88.13
Hydrocarbons		24.82	26.79
Oxidized forms		66.80	61.34
Sesquiterpenes		5.54	6.64
Hydrocarbons		4.64	4.38
Oxidized forms		0.90	2.26
Others		0.39	0.27
TOTAL		97.55	95.04

RI—retention index on HP-5 MS column.

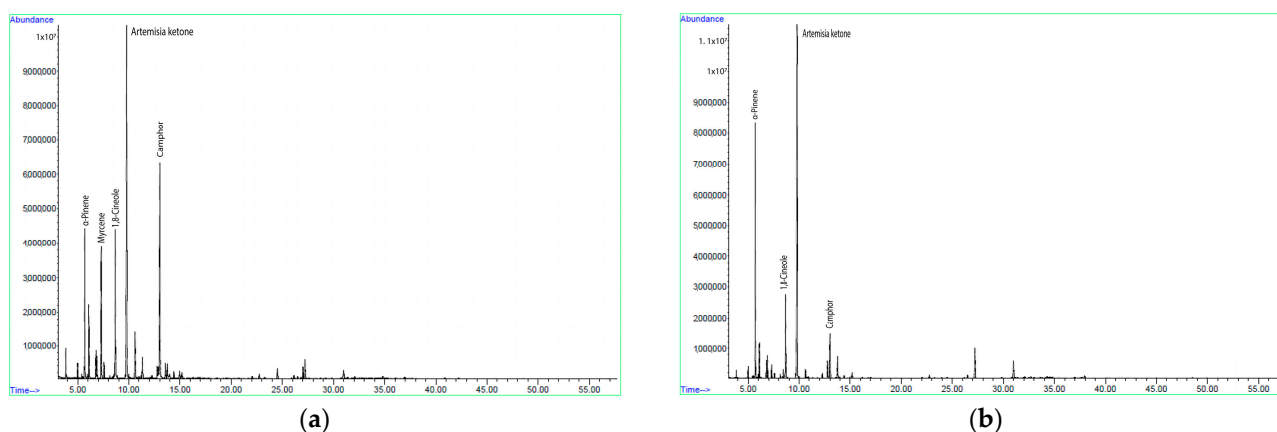


Figure 1. Gas chromatograms of the essential oil obtained by hydrodistillation (a) and steam distillation (b) from dried leaves and flowering tops of *Artemisia annua* L.

The hydrodistilled essential oil profile is consistent with the results of previous studies due to the high content of oxidized forms of monoterpenes, with the unusual artemisia ketone and the most common 1,8-cineole and camphor being the main representatives. The essential oil profile obtained was most similar to the Italian samples of the flowering tops and aerial parts, which were characterized by high levels of artemisia ketone (17.3–24.3%), camphor (17.0–22.6%) and 1,8-cineole (16.0–19.0%) [24,26,29,33]. In some other essential oils isolated mainly from aerial parts, such as those from Serbia [25,34], Bosnia and Herzegovina [35], Morocco [27] and China [36], artemisia ketone was the main component, followed by α -pinene, camphor or β -caryophyllene. In contrast, the Iranian [37], Brazilian (leaves) [38] and Romanian [28] essential oil samples did not contain artemisia ketone as the major component but 1,8-cineole and camphor. Thus, previous studies have shown that the essential oil composition of *A. annua* varies greatly depending on the geographical origin. A review of the literature data revealed several chemotypes depending on the proportions of the following components: camphor, 1,8-cineole, artemisia ketone and germacrene D [15]. A hierarchical cluster analysis of the essential oils of *A. annua* from Tajikistan revealed the existence of three chemotypes: camphor/1,8-cineole, camphor and artemisia ketone [14], while a study of Serbian samples revealed five different chemotypes in terms of the content of artemisia ketone, α -pinene, 1,8-cineole, germacrene D and β -caryophyllene [25]. A multivariate analysis of 103 samples of steam-distilled oils isolated from *A. annua* growing in different Korean regions divided them into three main groups: artemisia ketone, 1,8-cineole and β -selinene [16]. The essential oil obtained by steam distillation in our study corresponds well to the artemisia ketone cluster as it contains more than 41% artemisia ketone. Regarding the influence of the extraction method on the essential oil composition, our results also showed that direct steam distillation at atmospheric pressure favors the extraction of artemisia ketone and α -pinene, while hydrodistillation gives a lower percentage of artemisia ketone and is more suitable for camphor extraction.

In agreement with previous studies, our results also indicate the complexity of the chemical composition of *A. annua* essential oil, which certainly determines its biological activity, such as antimicrobial and antioxidant effects. Previous studies showed that essential oils rich in artemisia ketone (12.5–43.2%) had strong antibacterial and antifungal activity against *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Malassezia sympodialis* and *Fusarium oxysporum* [27,33,39]. Essential oils with a high camphor content (7.1–43.5%) also had strong antimicrobial activity against various bacteria and fungi, such as *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichophyton rubrum* and *Epidermophyton floccosum* [40–42]. The essential oil of *A. annua* has been found to have antioxidant properties, especially when the sesquiterpene fraction is partic-

ularly abundant alongside artemisia ketone or camphor as the main constituents [27,42]. Radulović et al. [25] reported that artemisia ketone has stronger antioxidant properties compared to camphor, 1,8-cineole and α -pinene. It also showed the highest antimicrobial activity against tested Gram-positive and Gram-negative bacterial strains and fungal strains, with *Staphylococcus aureus* being the most sensitive. The author also suggested that the use of *A. annua* essential oil does not pose a health risk, as the essential oil showed no negative effects on kidney and liver function and morphology in rats.

2.2. Content and Composition of sc-CO₂ Extracts of *Artemisia annua* Depending on the Applied Pressure and Temperature—Full Factorial Design Approach

The optimization of sc-CO₂ extraction of volatile terpenes from the flowering tops and leaves of *A. annua* was performed by a full factorial design with two factors: pressure at five levels and temperature at three levels. The pressure range was between 100 and 220 bar, while the temperature varied between 40 and 60 °C. The extraction time of half an hour and the CO₂ flow rate of 50 g/min remained constant during the extraction process. In view of the results obtained, the response surface method was used with the Design Expert 8 software. Table 2 shows the yield of the sc-CO₂ extracts as a function of the applied pressure and temperature. The extraction yield varied from 0.62% (sequence 8) to 1.92% (sequence 3). The yield of 1.92% was obtained at the lowest pressure of 100 bar and the highest temperature of 60 °C.

Table 2. The yield of sc-CO₂ extracts of *Artemisia annua* L. as a function of pressure and temperature.

Sequence	Pressure (bar)	Temperature (°C)	Yield (%)
1	220	60	1.43
2	130	50	0.90
3	100	60	1.92
4	160	60	1.61
5	220	40	1.05
6	190	50	1.46
7	190	60	1.88
8	130	40	0.62
9	220	50	1.27
10	160	40	0.89
11	100	50	1.59
12	160	50	1.10
13	130	60	1.55
14	190	40	0.66
15	100	40	1.02

The influence of the pressure and temperature was investigated through a variance analysis (ANOVA) with 95% confidence ($p \leq 0.05$). According to the ANOVA results presented in Supplementary Materials (Table S1), the regression model for the extraction yield was significant ($p = 0.0125$) with a satisfactory coefficient of determination (R^2). The temperature was the most statistically significant parameter for the observed response ($p = 0.0007$), indicating its strong influence on the yield of sc-CO₂ extracts of *A. annua*. In contrast, statistical analysis showed no significant effect of applied pressure on the extraction yield. The model was used to create a response surface that shows the extraction yield as a function of temperature and pressure (Figure 2). It can be seen that at constant pressure, an increase in temperature from 40 to 60 °C leads to a linear increase in extraction yield. The response surface shows the lowest yield at low temperatures, and with increasing temperature, the yield increases visibly. In contrast, there is no such positive trend when

the pressure increases at a constant temperature. The surface shows that the yield is highest at extreme pressure, while the medium pressures promote the lowest yield.

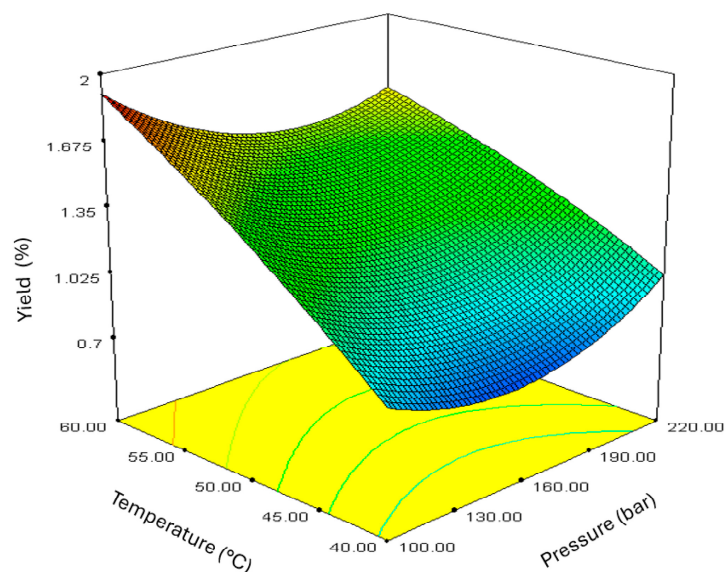


Figure 2. Three-dimensional plot of the sc-CO₂ extraction yield of *Artemisia annua* L. as a function of pressure and temperature.

Previous research on the extraction of *A. annua* with supercritical fluids was mainly aimed at finding the most efficient conditions for the extraction of artemisinin and its derivatives in comparison or combination with solvent extraction [43–46]. However, reports on the optimization of extraction conditions for essential oil from *A. annua* are very rare. Moreover, the extraction conditions used vary considerably, which further complicates the comparison of the results. Li et al. reported that efficient extraction of essential oil from *A. annua* can be performed for two hours at a pressure of 250 bar, a temperature of 50 °C and a CO₂ flow rate of 25 g/min. The highest positive effect on extraction was attributed to extraction time and pressure. The authors also pointed out that the combination of supercritical fluid extraction and molecular distillation is a good means of obtaining high-quality essential oils [17]. The influence of pressure (100, 200 and 300 bar) and temperature (40 and 60 °C) on the yield of sc-CO₂ extracts was also investigated by Vidović et al. During a three-hour extraction, they achieved the highest yield at 300 bar and 40 °C. The authors linked the increase in yield to an increase in pressure at a constant temperature [47]. In contrast, our results showed a stronger influence of temperature on the extraction yield compared to the influence of pressure. When considering this difference, it should be borne in mind that our extraction time was much shorter than in the two previous studies, and the applied pressure was a maximum of 220 bar. The reasons for a lower or higher extraction yield may also be related to the two basic properties of CO₂ in the supercritical state, namely its low viscosity and its high diffusivity. With increasing pressure, the density also increases, which can contribute to a better solvation capacity and, thus, to a better extraction yield. An increase in temperature at constant pressure leads to a decrease in CO₂ density but also to an increase in the vapor pressure of the components [19,48,49]. Therefore, the influence of temperature on the extraction yield depends on the relation between the density of the supercritical fluid and the vapor pressure of the components, i.e., which parameter has the predominant influence on the extraction. In our case, the vapor pressure of the components was obviously dominant, which can explain the much greater influence of temperature on the extraction yield compared to pressure.

The chemical composition of fifteen sc-CO₂ extracts was analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). Thirty-two compounds were identified, accounting for 84.43–97.19% of the total crude oil (Table 3). The major volatile terpenes identified in the sc-CO₂ extracts obtained were monoterpenes (59.43–80.16%), among which oxidized forms predominated (50.26–75.98%), such as artemisia ketone (16.93–48.49%), followed by camphor (3.29–18.44%), 1,8-cineole (4.77–11.89%), *trans*-pinocarveol (1.39–5.08%) and artemisia alcohol (2.25–4.10%) (Figure 3). The sesquiterpene fraction was less abundant (15.99–29.73%). In contrast to the monoterpenes, there were more hydrocarbons (9.95–18.59%) than oxidized forms (1.64–12.35%) among the sesquiterpenes. The most abundant sesquiterpenes were arteannuin B (3.98–10.03%), β -selinene (1.05–7.42%) and *trans*- β -caryophyllene (2.53–5.41%). Although the primary aim of sc-CO₂ extraction of *A. annua* in previous studies was to separate artemisinin, some volatile compounds were also extracted so that we could use them for a rough comparison with the sc-CO₂ extracts obtained in this work. Our results are in line with previous findings on the high content of camphor and 1,8-cineole [44,45], but our results are most comparable to those of Banožić et al. [50], where the most abundant compounds in the sc-CO₂ extract were also arteannuin B, camphor and artemisia ketone. Other components consistent with our results were 1,8-cineole, *trans*-pinocarveol, artemisia alcohol, β -selinene and *trans*- β -caryophyllene, although artemisinin and artemisinic acid were not present in our extracts, probably due to the different extraction conditions.

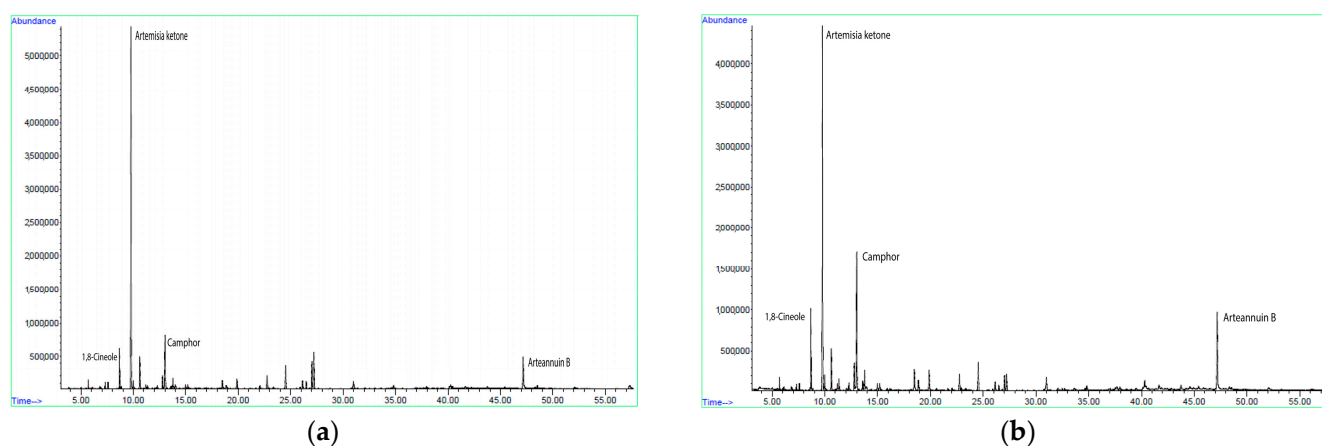


Figure 3. Gas chromatograms of the sc-CO₂ extracts of *Artemisia annua* L. with the high content of artemisia ketone (a) and arteannuin B (b), obtained at 100 bar and 40 °C (sequence 15) and 220 bar and 60 °C (sequence 1), respectively.

In our study, the supercritical extracts contained fewer monoterpenes in number and total yield than the essential oil samples obtained by distillation, but the number and total yield of sesquiterpenes were significantly higher. In addition to an increased content of *trans*- β -caryophyllene, germacrene D and β -selinene, the extracts contained arteannuin B and arteannuic acid, which were not present in the hydrodistilled and steam-distilled essential oils of *A. annua*. The sc-CO₂ extracts rich in sesquiterpenes, especially arteannuin B and β -selinene, in addition to their antimicrobial and antioxidant activity, indicate other aspects of the biological activity and potential therapeutic applications of *A. annua* extracts. Recent studies on arteannuin B have demonstrated its antitumor activity and low toxicity in vitro and in vivo [51]. Arteannuin B has been found to enhance the efficacy of cisplatin in non-small cell lung cancer by regulating connexin 43 and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway [52]. It proved to be an inhibitor of the SARS-CoV-2 main protease (nonstructural protein 5) and caspase-8, the cysteine protease enzymes that are promising molecular targets for antiviral and anticancer agents [53]. Considerable antiviral effect of

arteannuin B has been demonstrated in vitro, supporting the activity of *A. annua* against SARS-CoV-2 and other coronaviruses [12]. In a more recent study, this sesquiterpene lactone from *A. annua* was identified as a potent anti-inflammatory agent. It was found to attenuate the inflammatory response by suppressing the uncontrolled activation of the NF- κ B signaling pathway [54]. In addition, previous research has also indicated the potential anti-inflammatory properties of β -selinene. *Callicarpa macrophylla* essential oil, which is rich in β -selinene (37.51–57.01%), showed anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects in the Swiss albino mice model compared to the standard drugs [55]. *Beta*-selinene was identified as an anti-inflammatory biomarker from essential oils of the Myrtaceae family by untargeted metabolomics [56]. The proportion of sesquiterpenes in the sc-CO₂ extracts obtained in this study was significantly higher compared to the essential oils isolated by conventional distillation methods. Indeed, the presence of sesquiterpenes in sc-CO₂ extracts extends the spectrum of biological effects of *A. annua* beyond the antimicrobial and antioxidant activity commonly associated with the monoterpenes in distilled essential oils. Our results suggest the potential of supercritical extracts for future research into anti-inflammatory, anticancer and antiviral effects.

The regression model for the extraction of monoterpenes and sesquiterpenes proved to be significant, with a p -value of 0.0473 and 0.0433, respectively. The R^2 values were up to 0.85. Temperature was statistically significant for both groups of compounds ($p = 0.0019$ and 0.0029), as were the relationships between temperature and pressure (Tables S2 and S3). Figure 4 shows the effects of temperature and pressure on the content of monoterpenes (a) and sesquiterpenes (b) in the obtained sc-CO₂ extracts of *A. annua*. It can be seen that most of the monoterpenes are extracted at 40 °C and 160 bar or 50 °C and 190 bar. Moreover, increasing the temperature or pressure above these values has no positive effect on the extraction yield. For the extraction of sesquiterpenes, a less abundant fraction in sc-CO₂ extracts, pressures of 160 and 190 bar are also suitable but with higher temperatures of 50 and 60 °C. A similar amount of sesquiterpenes can be obtained at a lower temperature of 40 °C, but then a higher pressure of 220 bar must be used.

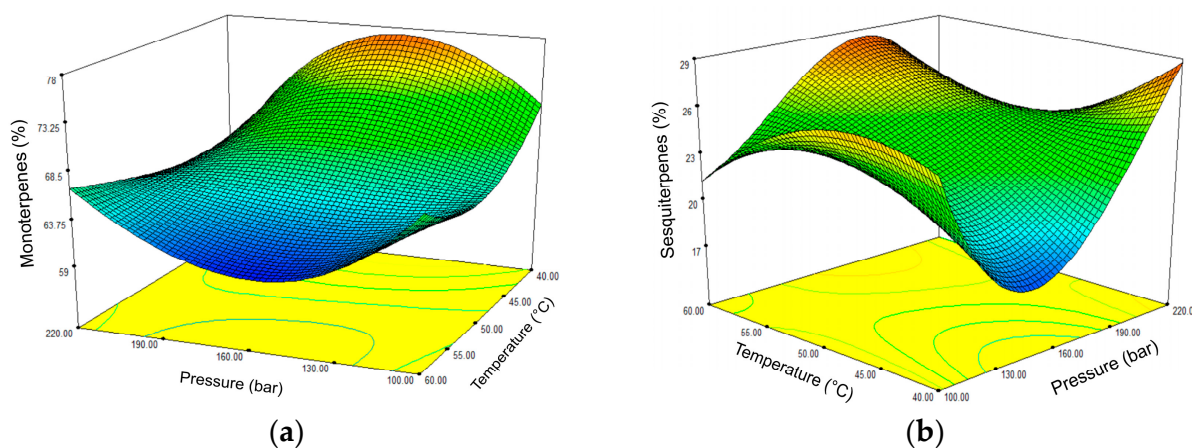


Figure 4. Three-dimensional plot of the content of monoterpenes (a) and sesquiterpenes (b) in sc-CO₂ extracts of *Artemisia annua* L. as a function of pressure and temperature.

Table 3. Chemical composition of sc-CO₂ extracts of *Artemisia annua* L.

Compound	RI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Santolina triene	908	-	-	-	-	-	-	-	-	0.22	-	-	-	-	-	-
α-Pinene	933	0.77	2.75	2.34	2.60	1.31	2.11	3.30	2.48	2.99	1.08	3.99	2.44	1.05	0.95	0.76
Camphene	947	-	0.39	0.52	0.40	0.26	-	-	-	0.51	0.39	-	-	-	-	-
Sabinene	973	-	0.39	0.33	0.39	0.27	-	0.57	0.53	0.50	0.35	0.70	0.53	0.34	-	-
β-Pinene	976	-	0.43	0.37	0.39	0.24	-	0.44	-	0.43	-	0.54	0.35	-	-	-
Myrcene	991	0.45	1.35	1.32	0.87	0.71	0.81	0.60	0.93	0.80	0.80	0.82	1.46	0.89	0.83	0.68
Yomogi alcohol	1001	0.50	0.27	-	-	0.42	-	-	-	0.34	0.56	-	0.43	0.49	0.52	0.68
1,8-Cineole	1031	6.64	8.05	8.00	8.24	6.79	10.35	11.29	11.24	7.06	7.44	11.89	7.62	8.59	6.94	4.77
Artemisia ketone	1061	31.55	19.28	19.57	16.93	27.06	38.04	19.90	30.13	27.43	48.49	25.31	31.75	29.81	37.56	46.76
cis-Sabinene hydrate	1066	1.24	1.84	1.80	1.91	1.31	1.41	2.30	2.04	1.01	0.68	2.35	1.49	1.43	0.90	0.94
Artemisia alcohol	1083	3.64	2.70	2.43	2.25	3.08	4.03	2.81	3.60	2.50	3.44	3.24	2.72	2.97	2.94	4.10
trans-Sabinene hydrate	1099	0.65	0.76	0.55	0.83	0.67	-	1.01	0.91	0.58	0.38	1.03	0.69	0.81	0.56	0.44
1,3,8-p-Mentatriene	1103	1.11	2.18	2.41	2.17	1.66	0.93	0.93	1.25	0.89	-	0.93	1.00	1.10	0.75	-
α-Campholenal	1126	0.78	1.22	1.31	1.37	0.82	0.78	1.24	0.90	0.78	0.37	1.15	0.75	0.71	-	-
trans-Pinocarveol	1138	2.66	2.96	2.80	3.52	3.01	2.59	5.08	3.68	2.74	1.39	4.81	2.90	2.54	1.42	1.74
Camphor	1143	13.94	14.17	18.44	13.15	11.88	16.05	3.29	12.88	9.39	12.22	4.17	7.17	6.77	14.36	7.83
Ocimenol	1157	1.09	1.99	2.32	2.01	1.37	1.02	1.13	1.20	0.97	-	1.08	1.02	1.28	0.81	-
Pinocarvone	1162	1.86	1.86	1.79	2.23	1.93	2.03	3.31	2.45	1.85	1.28	3.10	1.97	1.95	1.15	1.53
Borneole	1165	-	0.13	-	-	-	-	0.23	-	0.12	-	-	-	0.75	-	-
α-Terpineol	1190	0.60	0.77	0.55	0.68	0.51	-	0.88	0.98	0.59	0.36	0.98	0.83	0.85	-	0.54
Myrtenol	1196	0.70	0.77	0.66	0.88	0.70	-	1.09	0.86	0.71	0.41	1.06	0.80	0.72	-	-
Eugenol	1357	-	-	-	-	-	-	-	-	0.48	-	-	-	-	-	-
α-Copaene	1374	1.76	1.62	1.23	1.50	2.32	1.76	1.82	1.78	1.24	1.33	1.82	1.98	1.64	1.70	1.90
trans-β-Caryophyllene	1417	3.15	2.87	2.68	3.23	5.41	3.95	4.04	3.37	2.59	2.53	3.86	3.75	3.33	4.19	3.78
trans-β-Farnesene	1457	0.96	0.98	0.77	0.89	1.53	1.23	0.88	0.86	0.91	0.52	0.75	1.32	1.03	1.29	1.31
Artemisia triene	1465	0.50	0.68	0.48	0.78	0.56	-	0.68	0.60	0.75	0.53	0.58	0.98	-	0.78	1.06
Germacrene D	1478	1.71	1.71	1.66	1.85	3.79	3.48	2.54	2.75	1.74	1.98	2.56	3.42	3.38	5.33	4.34
β-Selinene	1483	1.87	5.26	5.16	6.41	4.98	1.05	7.42	3.80	4.91	3.60	7.14	6.72	6.23	4.26	5.88
Caryophyllene oxide	1580	1.82	2.00	1.36	1.83	2.10	1.55	2.88	-	2.22	1.14	2.43	2.08	1.53	1.65	1.40
Eudesma-4(15),7-dien-1-β-ol	1683	-	0.58	-	0.57	0.55	-	-	-	-	-	-	0.92	1.02	-	-
Arteannuic acid	1840	0.80	0.55	1.55	0.62	0.58	-	0.61	1.72	0.55	-	0.74	0.20	0.52	-	-
Arteannuin B	2054	10.03	6.10	5.82	7.55	6.23	4.23	8.86	3.98	9.52	4.38	6.70	7.05	7.54	8.32	5.86

Table 3. Cont.

Compound	RI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Monoterpenes		68.18	62.08	67.51	60.80	63.98	80.16	59.43	76.06	62.41	79.66	67.13	65.90	63.06	69.68	70.75
Hydrocarbons		4.23	7.91	9.64	9.56	6.44	5.26	9.17	8.13	7.92	3.68	10.34	7.95	5.63	3.99	2.82
Oxidized forms		63.95	54.17	57.87	51.24	57.54	74.90	50.26	67.93	54.49	75.98	56.79	57.95	57.43	65.69	67.93
Sesquiterpenes		22.59	22.34	20.69	25.24	28.05	17.24	29.73	18.85	24.43	15.99	26.57	28.41	26.22	27.51	25.52
Hydrocarbons		9.95	13.11	11.96	14.66	18.59	11.46	17.38	13.16	12.14	10.47	16.70	18.16	15.61	17.54	18.26
Oxidized forms		1.64	9.23	8.73	10.58	9.46	5.78	12.35	5.71	12.29	5.52	9.87	10.25	10.61	9.97	7.26
Phenylpropanes		-	-	-	-	-	-	-	-	0.48	-	-	-	-	-	-
TOTAL		90.77	84.43	88.20	86.04	92.03	97.39	89.16	94.91	87.32	95.64	93.70	94.30	89.27	97.19	96.27

RI—retention index on HP-5 MS column; 1–15: number of sequences corresponding to the sc-CO₂ extracts listed in Table 2.

The biological activity of a plant extract is determined by the content and composition of the active ingredients, which can be modulated by varying the extraction parameters. The most abundant terpenes were used for further statistical analysis, and the results of the proposed ANOVA models were summarized (Tables S4–S8). Based on the results obtained, regression models with significant variables ($p = 0.0104$ – 0.0480) were constructed for all target terpenes. Figure 5 shows the response surface plots for selected monoterpenes and sesquiterpenes as a function of temperature and pressure.

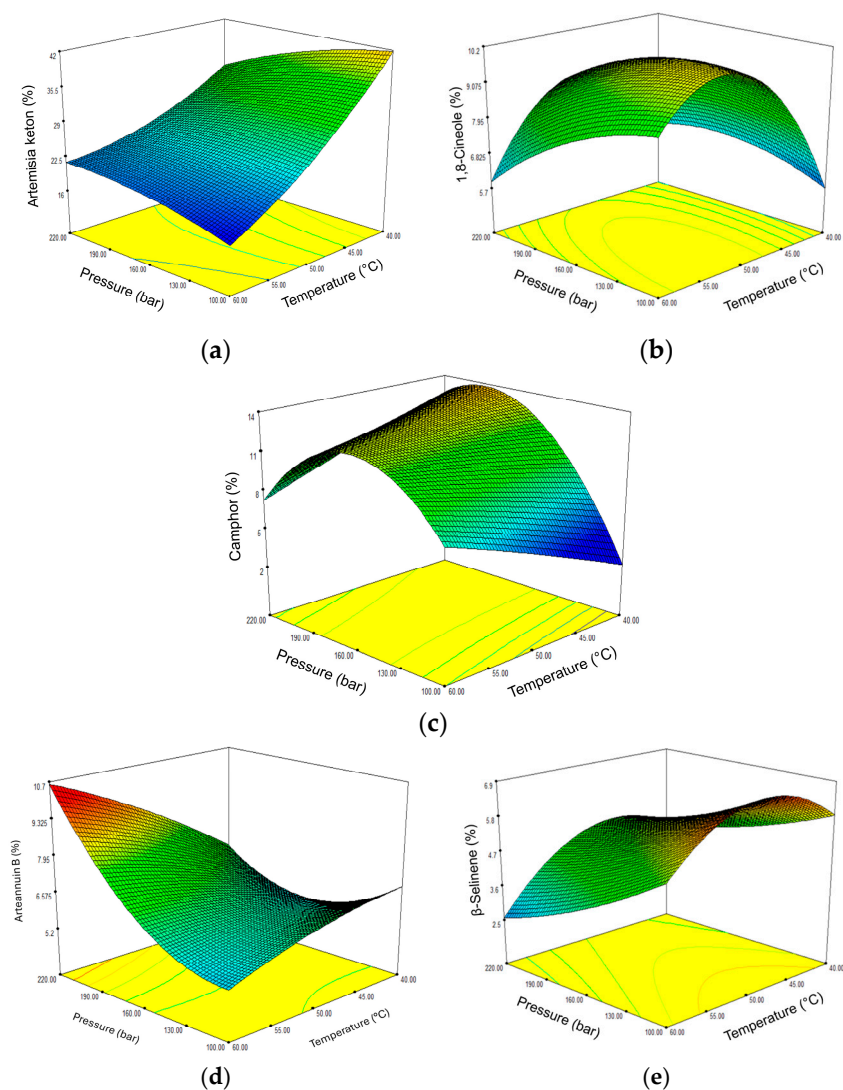


Figure 5. Three-dimensional plot of the content of the most abundant components in sc-CO₂ extracts of *Artemisia annua* L. as a function of pressure and temperature. (a) Artemisia ketone; (b) 1,8-cineole; (c) camphor; (d) arteannuin B; (e) β -selinene.

In the case of artemisia ketone, the main component of all extracts, temperature proved to be the most important parameter ($p = 0.0018$), while the influence of pressure was not significant (Table S4). The response surface clearly shows that a low temperature favors a better extraction and that an increase in temperature leads to extracts with lower amounts of artemisia ketones (Figure 5a). The extracts richest in artemisia ketone were obtained at 40 °C and a pressure of 160 and 100 bar. Low temperatures most likely promote efficient extraction of artemisia ketone by maintaining high fluid density, minimizing thermal degradation and preventing volatilization losses. In contrast to the results for artemisia ketone, temperature was found to have no significant effect on camphor yield, but the most

important parameters were pressure ($p = 0.0155$) and the relationship between pressure and temperature ($p = 0.0198$) (Table S6). The most efficient extraction of camphor occurs at 50 °C and pressures of 190 and 160 bar (Figure 5c). Accordingly, the best extraction of 1,8-cineole was also obtained at 50 °C, but at lower pressures of 100 and 130 bar (Figure 5b). Temperature was the only significant parameter ($p = 0.0080$) for 1,8-cineole extraction (Table S5).

In the sesquiterpene fraction of the sc-CO₂ extract of *A. annua*, the sesquiterpene lactone arteannuin B and the sesquiterpene hydrocarbon β -selinene were predominant. The sc-CO₂ extracts with the highest proportions of arteannuin B were obtained at the highest applied pressure and temperature. Figure 5d shows that its percentage increases linearly with increasing pressure from 160 to 220 bar and that the values increase with increasing temperature at the same pressures. The extraction of arteannuin B is most affected by pressure ($p = 0.0133$) and the relationship between pressure and temperature ($p = 0.0264$) (Table S7). Pressure and temperature were found to have a statistically strong effect on the extraction of β -selinene (Table S8). Extraction was most efficient at 50 °C and a low pressure of 100 to 160 bar, whereupon the content of β -selinene decreased. A similar trend was observed at both lower and higher temperatures (Figure 5e).

The response surface plots of the most abundant monoterpenes and sesquiterpenes in sc-CO₂ extracts shown in Figure 4 indicate that they differ from each other, suggesting different effects of temperature and pressure on their extraction. Thus, pressure was found to be critical for the extraction of camphor, arteannuin B and β -selinene, while temperature was a significant variable for the yield of artemisia ketone, 1,8-cineole and β -selinene. The relationship between pressure and temperature was an additional significant variable for camphor and arteannuin B. The complex composition of such extracts and the synergistic-antagonistic effect of the ingredients certainly have a considerable influence on their biological activity. Our optimization therefore aimed to obtain the highest possible overall yields of the extracts with the highest possible contents of selected main constituents, which significantly determine the biological properties of the sc-CO₂ extract under consideration. Table 4 provides the optimal extraction conditions for the selected targets, with the expected desirability function in the range of 0.473–0.899.

Table 4. Optimal pressure and temperature values for targeted sc-CO₂ extraction of volatile terpenes from *Artemisia annua* L.

	Target	Pressure (bar)	Temperature (°C)	Desirability
1.	High extraction yield and high monoterpenes	100	60	0.660
2.	High extraction yield and high artemisia ketone	100	45	0.473
3.	High extraction yield and high artemisia ketone, camphor and 1,8-cineole	160	50	0.509
4.	High extraction yield and high sesquiterpenes	181	60	0.809
5.	High extraction yield and high arteannuin B	220	60	0.899
6.	High extraction yield and high arteannuin B and β -selinene	220	53	0.650

A temperature of 60 °C and a pressure of 100 bar proved to be optimal for the extraction of monoterpenes. If only the high content of artemisia ketone is required, the temperature must be lowered to 45 °C at the same pressure. However, to obtain extracts rich in

all three most abundant monoterpenes (artemisia ketone, camphor and 1,8-cineole), the temperature and pressure must be increased slightly to 50 °C and 160 bar, respectively. The sesquiterpenes are also best extracted at 60 °C, but at a higher pressure (181 bar) than for the monoterpenes. For extracts rich in arteannuin B and β -selinene, an even higher pressure of 220 bar must be used. If a high proportion of arteannuin B is desired, a temperature of 60 °C must be maintained, while a slightly lower temperature of 53 °C is more suitable if, in addition to arteannuin B, a high proportion of β -selinene is also important. To ensure the quality, consistency and bioactive potency of the optimized sc-CO₂ extracts of *A. annua*, it is important to select appropriate chemical markers among the main bioactive ingredients and to develop analytical methods for their fingerprint profiling and quality control.

3. Materials and Methods

3.1. Plant Material

The aerial parts of cultivated *Artemisia annua* L. were collected during the flowering period in September 2022 and 2023 in Bosnia and Herzegovina, in Ljubinje (42°57'04.4" N 18°05'14.2" E in Eastern Herzegovina). The plant was authenticated by the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Biochemistry (University of Zagreb, Croatia), where the voucher specimen was also deposited. The collected plant material was air-dried in the shade at room temperature. The leaves and flowering tops were separated for examination.

3.2. Isolation of Essential Oil by Hydrodistillation and Steam Distillation

The essential oil of *A. annua* was isolated by hydrodistillation according to the European Pharmacopeia [57], while steam distillation was performed using a steam distillation apparatus (Šurlan–production of laboratory glassware, Medulin, Croatia). The dried plant material (20.0 g) was distilled for three hours in both distillation procedures. The yield (% V/m) was calculated as the volume of essential oil (mL) per 100 g of plant material. After extraction, the collected essential oils were dried under anhydrous sodium sulfate and stored in a refrigerator at 4 °C.

3.3. Supercritical Carbon Dioxide (sc-CO₂) Extraction

The extraction of the volatile terpene components from *A. annua* was carried out using an sc-CO₂ extraction system (SFE Process, Tomblaine, France). A total of 10.0 g of ground plant material was placed in an extraction vessel with a volume of 100 mL. High-purity CO₂ was used as solvent at a constant flow rate of 50 g/min. The extraction was carried out for 30 min at different temperatures (40–60 °C) and pressures (100–220 bar). The extracts obtained were collected in previously weighed glass tubes using a balance with an accuracy of ± 0.0001 g and stored in a refrigerator at 4 °C. The extraction yield was expressed as mass percent (% m/m).

A full factorial design was used to determine the optimal pressure and temperature to obtain the highest extraction yield and target ingredients. The commercial software Design-Expert® (Ver. 8, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) was used to analyze the results. The quality of the fitted model was assessed using analysis of variance (ANOVA). The test for statistical differences was based on the total error with a confidence level of 95.0%.

3.4. GC-MS Analysis

The supercritical CO₂ extracts and essential oils were analyzed using an Agilent 7890A gas chromatograph coupled to an Agilent 5975C electron ionization mass detector (Santa Clara, CA, USA). An aliquot of the sample (1 μ L) dissolved in hexane (1:100) was injected

into a split/splitless inlet at 240 °C, with a split ratio of 1:100. Helium was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1.2 mL/min. The components were separated on a non-polar Agilent Technologies HP-5 MS capillary column (30 m × 0.25 mm, film thickness 0.25 µm). The following temperature program was used: isothermal at 45 °C for 2 min, increasing from 45 °C to 250 °C at a rate of 4 °C/min and holding isothermal at 250 °C for 2 min. Mass spectra were recorded at 70 eV and scanned in the range 40–400 m/z. Data were acquired and processed using Agilent GC/MS ChemStation software (B.07.04). The components were identified by comparing their mass spectra with the mass spectra stored in the NIST 2020 or reported in the literature. Identification was also performed by comparing their retention indices (RI) with the values reported in the literature [58]. The linear retention indices were determined in relation to the retention times (t_R) of a homologous series of n-alkanes (C8–C24) analyzed under the same operating conditions. The relative amounts of the components, expressed as percentages, were calculated by a normalization procedure based on the peak area in the total ion chromatogram.

4. Conclusions

A fast and effective supercritical extraction of volatile terpenes from leaves and flowering tops of *A. annua* was optimized and compared with conventional hydrodistillation and steam distillation. Previous relevant research has mainly focused on artemisinin-rich extracts. To our knowledge, this is the first work to present the results of optimizing the sc-CO₂ extraction of the other targeted monoterpenes and sesquiterpenes along with the extraction yield. The supercritical extracts contained a high proportion of monoterpenes (59.43–80.16%), with artemisia ketone, camphor and 1,8-cineole being the most abundant. The sesquiterpene fraction was dominated by arteannuin B and β-selinene. Compared to the conventional distillation methods used in this study, the sc-CO₂ extracts contained significantly more sesquiterpenes, while the monoterpene fraction was reduced. The extraction yield (0.62–1.92%) was significantly affected by temperature, while different effects of pressure and temperature on the main constituents were observed. Our results demonstrate the optimal conditions for obtaining extracts with high contents of selected ingredients while maintaining high extraction yields. In contrast to conventional extraction techniques, this selective extraction of volatile terpenes could be useful to predict the biological effects of sc-CO₂ extracts from *A. annua* and guide future research. In light of previous results, the high content of artemisia ketone and camphor in the optimized extracts would support the antimicrobial and antioxidant effects, while the high content of arteannuin B and β-selinene would contribute to the antiviral, anti-inflammatory and antitumor effects. The results obtained may contribute to the improving methods of extraction of bioactive plant ingredients for the pharmaceutical, food and cosmetic industries and support the development of high-quality natural products with minimal impact on the environment.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules30071638/s1>, Table S1: Statistical analysis of response surface quadratic models for extraction yield; Table S2: Statistical analysis of response surface quadratic models for total monoterpenes; Table S3: Statistical analysis of response surface quadratic models for total sesquiterpenes; Table S4: Statistical analysis of response surface quadratic models for artemisia ketone; Table S5: Statistical analysis of response surface quadratic models for 1,8-cineole; Table S6: Statistical analysis of response surface quadratic models for camphor; Table S7: Statistical analysis of response surface quadratic models for arteannuin B; Table S8: Statistical analysis of response surface quadratic models for β-selinene.

Author Contributions: Conceptualization, S.V.-K.; methodology, M.M. and S.V.-K.; validation, M.M. and I.I.; formal analysis, M.M. and M.C.; investigation, M.M. and I.I.; writing—original draft preparation, M.M. and S.V.-K.; writing—review and editing S.V.-K., C.F. and G.O.; visualization, M.M.

and M.C.; supervision, S.V.-K., C.F. and G.O.; funding acquisition S.V.-K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article and Supplementary Materials.

Acknowledgments: This work was supported by the project FarmInova (KK.01.1.1.02.0021) funded by the European Regional Development Fund.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Sanz, M.; Vilatersana, R.; Hidalgo, O.; Garcia-Jacas, N.; Susanna, A.; Schneeweiss, G.M.; Vallès, J. Molecular phylogeny and evolution of floral characters of *Artemisia* and allies (Anthemideae, Asteraceae): Evidence from nrDNA ETS and ITS sequences. *Taxon* **2008**, *57*, 66–78.
2. Anibogwu, R.; Jesus, K.D.; Pradhan, S.; Pashikanti, S.; Mateen, S.; Sharma, K. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from *Artemisia* and their biological significance: A review. *Molecules* **2021**, *26*, 6995. [[CrossRef](#)]
3. Bisht, D.; Kumar, D.; Kumar, D.; Dua, K.; Kumar Chellappan, D. Phytochemistry and pharmacological activity of the genus *Artemisia*. *Arch. Pharm. Res.* **2021**, *44*, 439–474. [[CrossRef](#)]
4. Nigam, M.; Atanassova, M.; Mishra, A.P.; Pezzani, R.; Prasad Devkota, H.P.; Plygun, S.; Salehi, B.; Setzer, W.N.; Sharifi-Rad, J. Bioactive compounds and health benefits of *Artemisia* species. *Nat. Prod. Commun.* **2019**, *14*, 1–17. [[CrossRef](#)]
5. Hussain, M.; Thakurn, R.K.; Khazir, J.; Ahmed, S.; Khan, M.I.; Rahi, P.; Peer, L.A.; Shanmugam, P.V.; Kaur, S.; Raina, S.N.; et al. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of the genus *Artemisia* L. (Asteraceae): A high-value medicinal plant. *Curr. Top. Med. Chem.* **2024**, *24*, 301–342.
6. Su, X.-Z.; Miller, L.H. The discovery of artemisinin and Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Sci. China Life Sci.* **2015**, *58*, 1175–1179.
7. Ma, N.; Zhang, Z.; Liao, F.; Jiang, T.; Tu, Y. The birth of artemisinin. *Pharmacol. Ther.* **2020**, *216*, 107658. [[CrossRef](#)]
8. Ekiert, H.; Świątkowska, J.; Klin, P.; Rzepiela, A.; Szopa, A. *Artemisia annua*—Importance in traditional medicine and current state of knowledge on the chemistry, biological activity and possible applications. *Planta Med.* **2021**, *87*, 584–599. [[CrossRef](#)]
9. Efferth, T. From ancient herb to modern drug: *Artemisia annua* and artemisinin for cancer therapy. *Semin. Cancer Biol.* **2017**, *46*, 65–83. [[CrossRef](#)]
10. Feng, X.; Cao, S.; Qui, F.; Zang, B. Traditional application and modern pharmacological research of *Artemisia annua* L. *Pharmacol. Ther.* **2020**, *216*, 107650.
11. Septembre-Malaterre, A.; Lalarizo Rakoto, M.; Marodon, C.; Bedoui, Y.; Nakab, J.; Simon, E.; Hoarau, L.; Savriama, S.; Strasberg, D.; Guiraud, P.; et al. *Artemisia annua*, a traditional plant brought to light. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4986. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Baggieri, M.; Gioacchini, S.; Borgonovo, G.; Catinella, G.; Marchi, A.; Picone, P.; Vasto, S.; Fioravanti, R.; Bucci, P.; Kojouri, M.; et al. Antiviral, virucidal and antioxidant properties of *Artemisia annua* against SARS-CoV-2. *Biomed. Pharmacother.* **2023**, *168*, 115682. [[CrossRef](#)]
13. Ekiert, H.; Klimek-Szczykutowicz, M.; Rzepiela, A.; Klin, P.; Szopa, A. *Artemisia* species with high biological values as a potential source of medicinal and cosmetic raw materials. *Molecules* **2022**, *27*, 6427. [[CrossRef](#)]
14. Sharopov, F.S.; Salimov, A.; Numonov, S.; Safomuddin, A.; Bakri, M.; Salimov, T.; Setzer, W.N.; Habasi, M. Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of the essential oils from *Artemisia annua* L. growing wild in Tajikistan. *Nat. Prod. Commun.* **2020**, *15*, 1–7.
15. Bilia, A.R.; Santomauro, F.; Sacco, C.; Bergonzi, M.C.; Donato, R. Essential oil of *Artemisia annua* L.: An extraordinary component with numerous antimicrobial properties. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2014**, *2014*, 159819.
16. Hong, M.; Kim, M.; Jang, H.; Bo, S.; Deepa, P.; Sowndhararajan, K.; Kim, S. Multivariate analysis of essential oil composition of *Artemisia annua* L. collected from different locations in Korea. *Molecules* **2023**, *28*, 1131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Li, Y.; Xia, L.; Vazquez, J.F.T.; Song, S. Optimization of supercritical CO₂ extraction of essential oil from *Artemisia annua* L. by means of response surface methodology. *J. Essent. Oil Bear. Plants* **2017**, *20*, 314–327. [[CrossRef](#)]
18. Rao, A.B.; Sardeshpande, V.R. A hydrodistillation-based essential oils extraction: A quest for the most effective and cleaner technology. *Sustain. Chem. Pharm.* **2023**, *36*, 101270. [TrAC](#).
19. Yousefi, M.; Rahimi-Nasrabadi, M.; Pourmortazavi, S.M.; Wysokowski, M.; Jesionowski, T.; Ehrlich, H.; Mirsadeghi, S. Supercritical fluid extraction of essential oils. *TrAC Anal. Chem.* **2019**, *118*, 182–193. [[CrossRef](#)]

20. Cheriyan, B.V.; Karunakar, K.K.; Anandakumar, R.; Murugathirumal, A.; Kumar, A.S. Eco-friendly extraction technologies: A comprehensive review of modern green analytical methods. *Sustain. Chem. Clim. Action*. **2025**, *6*, 100054.
21. Zhao, S.; Zhang, D. Supercritical CO₂ extraction of *Eucalyptus* leaves oil and comparison with Soxhlet extraction and hydro-distillation methods. *Sep. Purif. Technol.* **2014**, *133*, 443–451.
22. Šulniūtė, V.; Baranauskienė, R.; Ragažinskienė, O.; Rimantas Venskutonis, P. Comparison of composition of volatile compounds in ten *Salvia* species isolated by different methods. *Flavor. Fragr. J.* **2017**, *32*, 254–264.
23. Bendif, H.; Adouni, K.; Miara, M.D.; Baranauskienė, R.; Kraujalis, P.; Venskutonis, P.R.; Nabavi, S.M.; Maggi, F. Essential oils (EOs), pressurized liquid extracts (PLE) and carbon dioxide supercritical fluid extracts (SFE-CO₂) from Algerian *Thymus munbyanus* as valuable sources of antioxidants to be used on an industrial level. *Food Chem.* **2018**, *260*, 289–292. [[CrossRef](#)]
24. Donato, R.; Santomauro, F.; Bilia, A.R.; Flamini, G.; Sacco, C. Antibacterial activity of Tuscan *Artemisia annua* essential oil and its major components against some foodborne pathogens. *LWT-Food Sci. Technol.* **2015**, *64*, 1251–1254. [[CrossRef](#)]
25. Radulović, N.S.; Randjelović, P.J.; Stojanović, N.M.; Blagojević, P.D.; Stojanović-Radić, Z.Z.; Ilić, I.R.; Djordjević, V.B. Toxic essential oils. Part II: Chemical, toxicological, pharmacological and microbiological profiles of *Artemisia annua* L. volatiles. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *58*, 37–49.
26. Grifoni, L.; Sacco, C.; Donato, R.; Tziakas, S.; Tomou, E.-M.; Skaltsa, H.; Vanti, G.; Bergonzi, M.C.; Bilia, A.R. Environmentally friendly microemulsions of essential oils of *Artemisia annua* and *Salvia fruticosa* to protect crops against *Fusarium verticillioides*. *Nanomaterials* **2024**, *14*, 1715. [[CrossRef](#)]
27. Chebbac, K.; Benziane Ouaritini, Z.; El Moussaoui, A.; Chalkha, M.; Lafraxo, S.; Bin Jordan, Y.A.; Nafidi, H.-A.; Bourhia, M.; Guemmouh, R. Antimicrobial and antioxidant properties of chemically analyzed essential oil of *Artemisia annua* L. (Asteraceae) native to Mediterranean area. *Life* **2023**, *13*, 807. [[CrossRef](#)]
28. Marinas, I.C.; Oprea, E.; Chifiriuc, M.C.; Badea, I.A.; Buleandra, M.; Lazar, V. Chemical composition and antipathogenic activity of *Artemisia annua* essential oil from Romania. *Chem. Biodivers.* **2015**, *12*, 1554–1564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Risaliti, L.; Pini, G.; Ascrizzi, R.; Donato, R.; Sacco, C.; Bergonzi, M.C.; Salvatici, M.C.; Bilia, A.R. *Artemisia annua* essential oil extraction, characterization, and incorporation in nanoliposomes, smart drug delivery systems against *Candida* species. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, *59*, 101849.
30. Vidic, D.; Čopra-Janićjević, A.; Miloš, M.; Maksimović, M. Effects of different methods of isolation on volatile composition of *Artemisia annua* L. *Int. J. Anal. Chem.* **2018**, *2018*, 9604183.
31. Bedinim, S.; Flamini, G.; Cosci, F.; Ascrizzi, R.; Echeverria, M.C.; Guidi, L.; Landi, M.; Lucchi, A.; Conti, B. *Artemisia* spp. essential oils against the disease-carrying blowfly *Calliphora vomitoria*. *Parasites Vectors* **2017**, *10*, 80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Zhigzhitzhapova, S.V.; Dylenova, E.P.; Gulyaev, S.M.; Randalova, T.E.; Taraskin, V.V.; Tykheev, Z.A.; Radnaeva, L.D. Composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia annua* L. *Nat. Prod. Res.* **2020**, *34*, 2668–2671. [[CrossRef](#)]
33. Santomauro, F.; Donato, R.; Sacco, C.; Pini, G.; Flamini, G.; Bilia, A.F. Vapour and liquid-phase *Artemisia annua* essential oil activities against several clinical strains of *Candida*. *Planta Med.* **2016**, *82*, 1016–1020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Aćimović, M.; Stanković Jeremić, J.; Todosijević, M.; Kiproviski, B.; Vidović, S.; Vladić, J.; Pezo, L. Comparative study of the essential oil and hydrosol composition of sweet wormwood (*Artemisia annua* L.) from Serbia. *Chem. Biodivers.* **2022**, *19*, e202100954. [[CrossRef](#)]
35. Čavar, S.; Vidic, D.; Parić, A. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. *Ind. Crop Prod.* **2012**, *37*, 479–485. [[CrossRef](#)]
36. Liu, H.; Guo, S.-S.; Lu, L.; Li, D.; Liang, J.; Huang, Z.-H.; Zhou, Y.-M.; Zhang, W.-J.; Du, S. Essential oil from *Artemisia annua* aerial parts: Composition and repellent activity against two storage pests. *Nat. Prod. Res.* **2021**, *35*, 822–825. [[CrossRef](#)]
37. Oftadeh, M.; Sendi, J.J.; Ebadollahi, M. Toxicity and deleterious effects of *Artemisia annua* essential oil extracts on mulberry pyralid (*Glyphodes pyloalis*). *Pestic. Biochem. Physiol.* **2020**, *170*, 104702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Perazzo, F.F.; Carvalho, J.C.T.; Rehder, V.L.G. Central properties of the essential oil and the crude ethanol extract from aerial parts of *Artemisia annua* L. *Pharmacol. Res.* **2003**, *48*, 497–502. [[CrossRef](#)]
39. Habibi, Z.; Ghanian, S.; Ghasemi, S.; Yousefi, M. Chemical composition and antibacterial activity of the volatile oil from seeds of *Artemisia annua* L. from Iran. *Nat. Prod. Res.* **2013**, *27*, 198–200. [[CrossRef](#)]
40. Ma, L.; Wei, L.; Chen, X.; Wang, W.; Lu, J.; Li, Y.; Yao, L. Chemical composition, antioxidative and antimicrobial activities of essential oil of wild *Artemisia annua* from Ningxia, China. *Nat. Prod. Res.* **2024**, *38*, 4340–4346. [[CrossRef](#)]
41. Das, S.; Vörös-Horváth, B.; Bencsik, T.; Micalizzi, G.; Mondello, L.; Horváth, G.; Kőszegi, T.; Széchenyi, A. Antimicrobial activity of different *Artemisia* essential oil formulations. *Molecules* **2020**, *25*, 2390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Juteau, F.; Masotti, V.; Bessière, J.M.; Dherbomez, M.; Viano, J. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. *Fitoterapia* **2002**, *73*, 532–535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kohler, M.; Haerdi, W.; Christen, P.; Veuthey, J.L. Extraction of artemisinin and artemisinic acid from *Artemisia annua* L. using supercritical carbon dioxide. *J. Chromatogr. A* **1997**, *785*, 353–360. [[PubMed](#)]

44. Baldino, L.; Reverchon, E.; Della Porta, G. An optimized process for SC-CO₂ extraction of antimalarial compounds from *Artemisia annua* L. *J. Supercrit. Fluids* **2017**, *128*, 89–93.
45. Martinez-Correa, H.A.; Bitencourt, R.G.; Kayano, A.C.A.V.; Magalhães, P.M.; Costa, F.T.M.; Cabral, F.A. Integrated extraction process to obtain bioactive extracts of *Artemisia annua* L. leaves using supercritical CO₂, ethanol and water. *Ind. Crops Prod.* **2017**, *95*, 535–542.
46. Ciftci, O.N.; Cahyadi, J.; Guigard, S.E.; Saldaña, M.D.A. Optimization of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L. with supercritical carbon dioxide + ethanol using response surface methodology. *Electrophoresis* **2018**, *39*, 1926–1933.
47. Vidović, S.; Simić, S.; Gavarić, A.; Aćimović, M.; Vladoić, J. Extraction of sweet wormwood (*Artemisia annua* L.) by supercritical carbon dioxide. *Lek. Sirovine* **2020**, *40*, 22–26. [[CrossRef](#)]
48. Confortin, T.C.; Todero, I.; Canabarro, N.; Luft, L.; Ugalde, G.A.; Neto, J.R.C.; Mazutti, M.A.; Zabot, G.L.; Tres, M.V. Supercritical CO₂ extraction of compounds from different aerial parts of *Senecio brasiliensis*: Mathematical modeling and effects of parameters on extract quality. *J. Supercrit. Fluids* **2019**, *153*, 104589.
49. Vladoić, J.; Jerković, I.; Svilović, S.; Pavić, V.; Pastor, K.; Paiva, A.; Jokić, S.; Rebocho, S.; Duarte, A.R. Evaluation of the volatiles' chemical profile and antibacterial activity of *Lavandula stoechas* L. extracts obtained by supercritical carbon dioxide. *Sustain. Chem. Pharm.* **2023**, *33*, 101126. [[CrossRef](#)]
50. Banožić, M.; Wronska, A.W.; Jakovljević Kovač, M.; Aladić, K.; Jerković, I.; Jokić, S. Comparative evaluation of different extraction techniques for separation of artemisinin from sweet wormwood (*Artemisia annua* L.). *Horticulturae* **2023**, *9*, 629. [[CrossRef](#)]
51. Wang, Y.; Huang, W.; Wang, N.; Ouyang, D.; Xiao, L.; Zhang, S.; Ou, X.; He, T.; Yu, R.; Song, L. Development of arteannuin B sustained-release microspheres for anti-tumor therapy by integrated experimental and molecular modeling approaches. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Huang, W.; Wang, Y.; He, T.; Zhu, J.; Li, J.; Zhang, S.; Zhu, Y.; Xu, Y.; Xu, L.; Wang, H.; et al. Arteannuin B enhances the effectiveness of cisplatin in non-small cell lung cancer by regulating connexin 43 and MAPK pathway. *Am. J. Chin. Med.* **2022**, *50*, 1963–1992. [[PubMed](#)]
53. Varela, K.; Arman, H.D.; Berger, M.S.; Sponsel, V.M.; Lin, C.A.; Yoshimoto, F.K. Inhibition of cysteine proteases via thiol-Michael addition explains the anti-SARS-CoV-2 and bioactive properties of arteannuin B. *J. Nat. Prod.* **2023**, *86*, 1654–1666. [[CrossRef](#)]
54. Chen, H.; Hu, Q.; Wen, T.; Luo, L.; Liu, L.; Wang, L.; Shen, X. Arteannuin B, a sesquiterpene lactone from *Artemisia annua*, attenuates inflammatory response by inhibiting the ubiquitin-conjugating enzyme UBE2D3-mediated NF- κ B activation. *Phytomedicine* **2024**, *124*, 155263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Chandra, M.; Prakash, O.; Kumar, R.; Bachheti, R.K.; Bhushan, B.; Kumar, M.; Pant, A.K. β -Selinene-rich essential oils from the parts of *Callicarpa macrophylla* and their antioxidant and pharmacological activities. *Medicines* **2017**, *4*, 52. [[CrossRef](#)]
56. Maiolini, T.C.S.; Nicácio, K.J.; Rosa, W.; Miranda, D.O.; Santos, M.F.C.; Bueno, P.C.P.; Lago, J.H.G.; Sartorelli, P.; Dias, D.F.; de Chagas Paula, D.A.; et al. Potential anti-inflammatory biomarkers from Myrtaceae essential oils revealed by untargeted metabolomics. *Nat. Prod. Res.* **2025**, *39*, 985–999. [[CrossRef](#)]
57. European Pharmacopoeia Online (11.6). Available online: <https://pheur.edqm.eu/home> (accessed on 19 February 2025).
58. Adams, R. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed.; Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, USA, 2007.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

PRILOG 2

Kondža M, **Mandić M**, Ivančić I, Vladimir-Knežević S, Brzić I. *Artemisia annua* L. extracts irreversibly inhibit the activity of CYP2B6 and CYP3A4 enzymes. *Biomedicines* 2023;11(1):232.

Article

Artemisia annua L. Extracts Irreversibly Inhibit the Activity of CYP2B6 and CYP3A4 Enzymes

Martin Kondža ^{1,*} , Marta Mandić ¹, Ivona Ivančić ¹, Sanda Vladimir-Knežević ² and Ivica Brizić ^{1,3}¹ Faculty of Pharmacy, University of Mostar, Matice Hrvatske bb, 88000 Mostar, Bosnia and Herzegovina² Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Trg Marka Marulića 20, 10000 Zagreb, Croatia³ University Clinical Hospital Mostar, Kralja Tvrtka bb, 88000 Mostar, Bosnia and Herzegovina

* Correspondence: martin.kondza@farf.sum.ba; Tel.: +387-36-312-791

Abstract: *Artemisia annua* L. has long been known for its medicinal properties and isolation of ingredients whose derivatives are used for therapeutic purposes. The CYP2B6 and CYP3A4 enzymes belong to a large family of cytochrome P450 enzymes. These enzymes are involved in the metabolism of drugs and other xenobiotics. It is known that various compounds can induce or inhibit the activity of these enzymes. The aim of this study was to investigate the nature of the inhibitory effect of *Artemisia annua* extract on CYP2B6 and CYP3A4 enzymes, as well as the type of inhibition, the presence of reversible or pseudo-irreversible inhibition, and the possible heme destruction. The methanolic extract of *Artemisia annua* showed an inhibitory effect on CYP2B6 (by almost 90%) and CYP3A4 enzymes (by almost 70%). A significant decrease in heme concentration by 46.8% and 38.2% was observed in different assays. These results clearly indicate that the studied plant extracts significantly inhibited the activity of CYP2B6 and CYP3A4 enzymes. Moreover, they showed irreversible inhibition, which is even more important for possible interactions with drugs and dietary supplements.

Keywords: *Artemisia annua* L.; CYP2B6; CYP3A4; methanolic extracts; inhibition; heme

Citation: Kondža, M.; Mandić, M.; Ivančić, I.; Vladimir-Knežević, S.; Brizić, I. *Artemisia annua* L. Extracts Irreversibly Inhibit the Activity of CYP2B6 and CYP3A4 Enzymes. *Biomedicines* **2023**, *11*, 232. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11010232>

Academic Editor: Grishanova Alevtina

Received: 7 December 2022

Revised: 12 January 2023

Accepted: 13 January 2023

Published: 16 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Although 50 years have passed since the discovery of artemisinin [1], the pharmacologically and biologically active compounds of the *Artemisia annua* L. (sweet wormwood) continue to engage and fascinate scientists around the world. *Artemisia annua* (Figure 1) belongs to the annual herbaceous herb class, and grows in Asia and India as well as some parts of Europe, America, Africa, and Australia [2,3].



Figure 1. *Artemisia annua* L. [4].

Sweet wormwood is a plant that people use on many occasions, from nutrition to health purposes. In parts of Asia, this plant is used as a spice, tea, or pressed juice [5]. It has been used as a medicine in traditional Chinese medicine for centuries. In addition, the official Chinese pharmacopoeia describes an infusion of the dried parts of the plant as a remedy for malaria and fever [6]. In addition to its antimalarial activity, there are numerous studies showing the antimicrobial, anticholesterol, antiviral, anti-inflammatory, anti-plasmodial, antitumor, antiobesity, and anticonvulsant effects of this plant [6–12]. The reason why sweet wormwood has such a wide range of effects on different types of diseases is that it contains numerous biologically active groups of compounds in its composition (Table 1).

In 2015, the Chinese pharmaceutical scientist Tu Youyou was awarded the Nobel Prize in Physiology or Medicine for the discovery and isolation of artemisinin, which is believed to be responsible for the antimalarial activity of this plant. According to its chemical structure, artemisinin belongs to the sesquiterpenes, a class of terpenes with three isoprene units. In addition to artemisinin, sweet wormwood contains a handful of other constituents that exhibit a range of biological and pharmacological effects [13].

Table 1. Main compounds found in *Artemisia annua* L.

Monoterpenes	Sesquiterpenes	Phenolic Compounds	Coumarins
1,8-cineole	artemisinin	quinic acid	scopolin
α -and- β -pinene	arteannuin B	caffeic acid	scopoletin
camphene	artemisinic acid	luteolin	
borneol		quercetin	
camphor		rutin	
carvone		apigenin	
limonene		isorhamnetin	
α -terpinene		kaempferol	
myrtenol		mearnsetin	
		artemetin	
		eupatorine	

Adjusted according to [13].

Cytochrome P450 (CYP) enzymes are a large family of enzymes found in all biological kingdoms, including humans. In humans, the CYP enzymes are located in the mitochondria or endoplasmic reticulum. This large group of enzymes are monooxygenases; they require an external oxygen donor to function properly. According to their structure, CYP enzymes are hemoproteins; they have heme as a prosthetic group [14]. CYP enzymes are involved in the metabolism of xenobiotics, including drugs that humans ingest daily. When metabolized by the same CYP enzymes, numerous substances can act as inducers or inhibitors of enzymatic activity [15].

The CYP2B6 enzyme is expressed in the liver and to some extent in the lungs [16]. It is an enzyme involved in approximately 5% of reduction and oxidation reactions within the CYP group [17]. The marker reaction used to measure the activity of this enzyme is the *N*-demethylation of *S*-mephenytoin. Efavirenz, which converts CYP2B6 to hydroxylated metabolites, is also used for this purpose [18]. Other substrates of this enzyme include artemisinin, bupropion, cyclophosphamide, ifosfamide, and methadone. The following compounds have been shown to inhibit of this enzyme: 17 α -ethinylestradiol, duloxetine, thiotepa, ticlodipine, clopidogrel, methadone, sibutramine, and ritonavir [18,19]. Besides drugs, numerous compounds of natural origin also inhibit the activity of this enzyme very successfully [18,20].

CYP3A4 is the most important drug-metabolizing enzyme in the CYP group, as it metabolizes about 33% of drugs. It is an enzyme responsible for 20% of all reduction and oxidation reactions within the CYP group [17]. Since it has a large active site, CYP3A4 is involved in the metabolism of numerous xenobiotics. The reaction marker used to measure the activity of this enzyme is the hydroxylation of testosterone to 6 β -hydroxytestosterone [18]. Some

of the substrates for this enzyme are clarithromycin, erythromycin, cisapride, astemizole, verapamil, atorvastatin, lovastatin, simvastatin, and sildenafil. Ritonavir, diltiazem, cimetidine, amiodarone, verapamil, and many other drugs act as inhibitors of this enzyme [18]. It has also been found that numerous substances of natural origin, such as flavonoids, can also significantly inhibit the activity of the CYP3A4 enzyme [20,21] and lead to clinically significant and potentially dangerous interactions [22].

The aim of this study was to investigate the inhibitory effect of *Artemisia annua* L. extract (AAE) on the activity of CYP2B6 and CYP3A4 enzymes, as well as to examine heme binding and pseudo-irreversible and reversible inhibition.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

The aerial parts of the *Artemisia annua* L. plant were purchased on the market (Suban, Croatia). Cytochromes P450 2B6 and 3A4 (recombinant) were co-expressed with nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate (NADPH) reductase and obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), as well as cytochrome b5 in baculosomes. The contents of CYP2B6 and CYP3A4 were confirmed to be 1 μ M, as was declared by the manufacturer, based on the cytochrome P450 carbon monoxide assay [23]. β -nicotinamide-dinucleotide phosphate disodium salt (NADP⁺), glucose-6-phosphate (G6P), and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) were used to prepare the generation system. Formic acid (85%, p.a.) was purchased from Semikem (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina), potassium phosphate (p.a.) and dichloromethane (p.a.) from Kemika (Zagreb, Croatia), methanol from Merck KGaA (Darmstadt, Germany), ultrapure water from Sigma-Aldrich, and acetonitrile from KEFO (East Sarajevo, Bosnia and Herzegovina). In order to prepare a potassium phosphate buffer of pH 7.4, a potassium dihydrogen phosphate obtained from Kemika d.d. was used. Sodium hydroxide (Semikem d.o.o.) was used to adjust the pH. For the marker reactions for CYP2B6 and CYP3A4, *S*-mephenytoin, *S*-nirvanol, testosterone, and 6 β -hydroxytestosterone from Sigma Aldrich were used. Clopidogrel and troleandomycin, used as positive controls for enzyme activities, were obtained from the Agency for Medicines and Medical Devices of Bosnia and Herzegovina (Banja Luka, Bosnia and Herzegovina). Pyridine (p.a.) (Semikem d.o.o.), bovine hemin (Sigma-Aldrich), and dimethylsulfoxide (DMSO) (Semikem d.o.o.) were used in the hemochromopyridine assay. Potassium hexacyanoferrate (PCF) (Siegfried AG, Zofingen, Switzerland) and diltiazem (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) were used in the study of reversible and pseudo-reversible inhibition. Plant extracts were shaken on an orbital shaker with mat platform (Sigma-Aldrich). Superoxide dismutase (SOD) (Sigma-Aldrich), catalase (CAT) (Sigma-Aldrich), and hydrogen peroxide (36%, p.a.) (Semikem) were used to test out the binding specificity of the enzyme. A water bath (Thermo Fisher Scientific) was used for enzyme incubations. Samples were centrifuged using the FC5306 mini centrifuge (OHAUS, Parsippany, NJ, USA). Assay of residual enzyme activity was performed using high-performance liquid chromatography coupled with UV-Vis detection (HPLC UV-Vis, Agilent 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). To record the sample spectra, a spectrophotometer UV-1280 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) was used. In order to retrieve the enzyme activity, Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes (Thermo Fisher Scientific) were used.

2.2. Plant Extraction

The extract of *Artemisia annua* (AAE) was obtained according to the method described by Mashati et al. [24]. The aerial parts of the plant were macerated with methanol. Then, the plant parts were left in the methanol overnight at room temperature in an orbital shaker. The macerate was then filtered, and the filtrate was evaporated to dryness. Next, 100 mg of the extract was dissolved in 1 mL of DMSO, and then the desired concentrations of the extract were prepared by dissolving in methanol.

2.3. Determination of Residual Activity

In order to determine the nature of the inhibitory effect of AAE on CYP2B6 and CYP3A4, three types of inhibition assays were performed: direct, time-dependent, and metabolic inhibition assays of the enzyme. In the direct inhibition assay, no preincubation of AAE with the enzyme was performed. The generating system was added directly to the incubation mixture with the substrate and incubated for 15 min. In the time-dependent inhibition assay, AAE was first pre-incubated with the enzyme in a water bath for 30 min, and then the reaction was started by adding the generating system and substrate. The samples were then incubated for an additional 15 min. In the metabolism-dependent inhibition assay, AAE, enzymes, and the generating system were first pre-incubated for 30 min, and the reaction started by adding the substrate. The samples were incubated for an additional 15 min. Enzyme incubations were performed in triplicate, with mechanical stirring in a water bath at 37 °C. Aliquots of AAE with a final concentration of 10 µg/mL dissolved in methanol were transferred to glass tubes and evaporated to dryness, except for the control samples without the inhibitor (AAE). After evaporation of the solvent, an incubation mixture with a volume of 100 µL was prepared, consisting of 5 pmol CYP2B6 or CYP3A4 enzyme, 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), and ultrapure water. An NADPH-generating system composed of 0.1 M G6P:10 mg/mL NADP⁺:1000 IU/mL G6PDH = 50:25:1 (*v/v/v*) was prepared immediately before use. This generating system contains glucose-6-phosphate dehydrogenase, which regenerates NADP⁺ to NADPH, keeping the concentration of cytochrome P450 co-enzyme (NADPH) constant during incubation. The reaction was started by adding the generating system (15% of the volume in the last incubation, *v/v*). In order to determine the enzyme residual activity, *S*-mephenytoin and testosterone (200 µM final concentration) were used. Then, 1 mL of ice-cold 1% solution of formic acid in dichloromethane was used to terminate the reaction. The samples were mixed and then centrifuged at 1900 × *g* for 10 min. After centrifugation, two layers (water and organic layer) were formed and 850 µL of the organic layer was transferred to cuvettes and evaporated.

Next, 30 µL of methanol was used to dissolve the sample, which was analyzed using HPLC Agilent Zorbax SB C18 column (4.6 × 250 mm, 3 µm) from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). To test the activity of CYP2B6, a marker reaction of *N*-demethylation of *S*-mephenytoin to *S*-nirvanol was observed. The mobile phase consisted of acetonitrile and water in a ratio of 40:60, *v/v*. The analysis was performed isocratically. The flow was set at 1.0 mL min⁻¹. The injection volume was adjusted to 10 µL. Chromatograms were recorded at 210 nm. The duration of the analysis was set to 20 min. The retention time of *S*-mephenytoin was 12.3 min and that of *S*-nirvanol was 9.3 min [25]. In the case of CYP3A4, hydroxylation of testosterone to 6β-hydroxytestosterone was observed. The mobile phase consisted of methanol and water in a ratio of 64:36, *v/v*. The analysis was performed isocratically. The flow was set to 1.0 mL min⁻¹. The injection volume was set at 10 µL. Chromatograms were recorded at 254 nm. The duration of the analysis was set at 35 min. The retention time of testosterone was 19.2 min and that of 6β-hydroxytestosterone was 5.8 min [23]. In both cases, the amount of product obtained was measured as the area under the curve (AUC) relative to the control sample (without inhibitor). Clopidogrel and troleandomycin were used as positive controls for the CYP2B6 and CYP3A4, respectively. Clopidogrel reduced the CYP2B6 activity to 41.1 ± 0.8%, and troleandomycin reduced the CYP3A4 activity to 39.2 ± 1.1%.

2.4. Hemochromopyridine Assay

The hemochromopyridine experiment was used to determine whether or not heme might be destroyed by reactive intermediates produced by the cytochrome P450 cycle. It was carried out with some changes to the procedure published by Flink and Watson [26] and Paul et al. [27]. Hemin dissolved in DMSO (0.6 to 0.1 µM) was used to create a calibration curve. A wavelength between 500 and 600 nm was used to record the spectra. Then, 200 µL of the incubation mixtures containing 25 µM inhibitor (AAE) was prepared.

The NADPH-generating system was added to the reaction to start it, and the incubation period was 30 min. After 30 min, the reaction was stopped by adding sodium hydroxide (final concentration 0.83 M) and pyridine (final concentration 0.06 M). Because the pyridine hemochromogen is unstable under basic circumstances, samples were taken and recorded on a spectrophotometer (UV-1280, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) within 1 min of the addition of an alkaline solution [23]. Using the created calibration curve, the heme concentration in the samples was calculated. This analysis was carried out in triplicate. To avoid hydrogen peroxide being produced through an ineffective catalytic cycle, the incubations were repeated with CAT and SOD (5 IU each) added to the incubation mixture.

2.5. Reversible and Pseudo-Irreversible Inhibition Assay

One of the characteristics of the catalytic cycle of cytochrome P450 enzymes is the formation of covalent complexes with the ferrous form of iron. Pseudo-irreversible inhibitors have the possibility of rehabilitating enzyme activity after oxidation of heme iron with the use of oxidants. Therefore, three types of tests were conducted to test the pseudo-irreversible nature of the inhibitor: incubation mixture without AAE (control), incubation mixture with AAE, and incubation mixture with AAE to which an oxidant was added after incubation. Incubations lasted 30 min according to the conditions described earlier. After incubation, samples were dialyzed, and 20 mM potassium hexacyanoferrate was added to certain samples [28]. The cassettes were immersed in a 50 mM potassium phosphate buffer solution (pH 7.4) for 30 min (the dialysis solution was replaced three times). After dialysis, samples were transferred from the cassette back to the glass tube, and the residual enzyme activity was determined using *S*-mephenytoin and testosterone as marker substrates (200 μ M final concentration). Since the NADPH-generating system was also dialyzed, it was again added to the incubations to initiate the enzyme reaction. Samples were incubated for 30 min with the same settings. An ice-cold solution of formic acid in dichloromethane was used to terminate the reaction process. HPLC was used to analyze the samples. In the case of CYP3A4, diltiazem was used to test out the pseudo-irreversible inhibition. A full recovery of enzyme activity was observed, and the results were used as positive control.

2.6. Statistical Analysis

All incubations in the assays in this study were done in triplicate. Residual activity calculations and statistical analysis were made using the program *R* (The R Project for Statistical Computing, Vienna, Austria) and Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA). Statistical significance between the samples and controls were tested using the Student's *t*-test for the estimation of statistical difference ($p < 0.05$) and Mann–Whitney U-test was used to test the data normality.

3. Results

3.1. Enzyme Inhibition

Of all the observed types of inhibition, AAE most strongly inhibited the activity of CYP2B6 and CYP3A4 enzymes in the metabolism-dependent inhibition assay (Figure 2). In this experiment, the lowest activity of both enzymes was observed. CYP2B6 enzyme activity decreased by 88.5% and CYP3A4 enzyme activity decreased by 70.9% (Table 2).

The remaining activity of CYP2B6 was also significantly reduced in direct inhibition assays (49.1% of the remaining enzyme activity), whereas no significant inhibition was observed in the time-dependent inhibition assay (the remaining enzyme activity was 96.4%). The remaining activity of the CYP3A4 enzyme in the direct inhibition assay was also significantly reduced and amounted to 39.7%. No decrease in enzyme activity was observed in the study of time-dependent inhibition of CYP3A4. The remaining activity was 99.9%. Direct inhibition of the enzyme was also pronounced in the direct inhibition assay. Although the remaining activity of CYP2B6 and CYP3A4 enzymes was higher by 28.5% and 20.0%, respectively, the inhibition was still statistically significant ($p < 0.05$).

The time-dependent inhibition assay showed no statistically significant inhibition of the enzymes ($p > 0.05$).

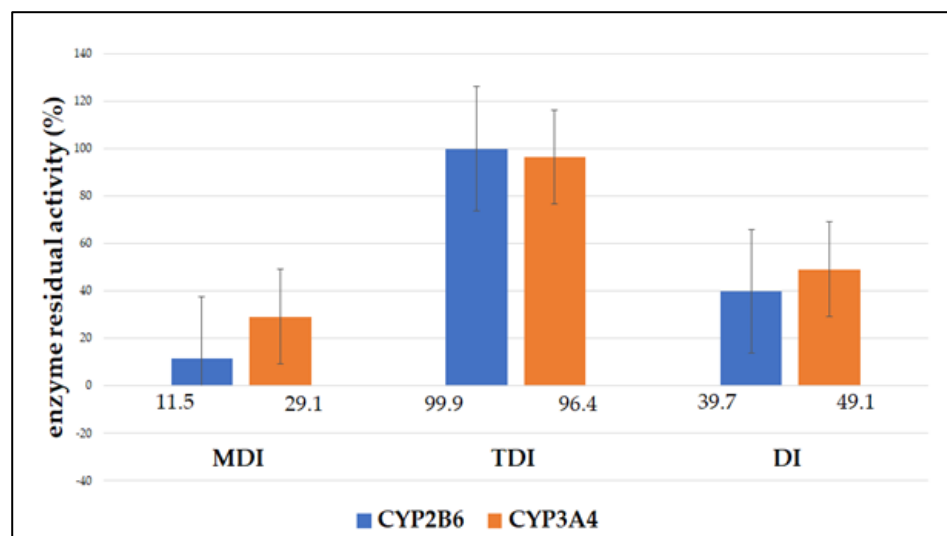


Figure 2. Residual activity (%) of CYP2B6 and CYP3A4 enzymes after incubation with AAE (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) expressed as mean of triplicate; MDI—metabolism-dependent inhibition; TDI—time-dependent inhibition; DI—direct inhibition.

Table 2. Enzyme residual activity (%) after incubation with AAE in each individual test and incubation type.

CYP2B6			
Incubation	MDI	TDI	DI
1	11.1	99.8	39.9
2	12.1	101.2	40.4
3	11.5	98.9	38.9
Mean	11.5 \pm 0.5	99.9 \pm 1.1	39.7 \pm 0.7
statistical significance	$p < 0.05$	$p > 0.05$	$p < 0.05$
CYP3A4			
1	29.9	95.4	48.8
2	29.1	96.7	48.2
3	28.2	97.1	50.2
Mean	29.1 \pm 0.8	96.4 \pm 0.8	49.1 \pm 0.9
statistical significance	$p < 0.05$	$p > 0.05$	$p < 0.05$

3.2. Heme Destruction

In order to test the potential binding of reactive metabolites to heme, a hemochrome pyridine assay was performed. It is suggested that the decrease in heme concentration is due to covalent binding of reactive metabolites to heme. In the cycles of cytochrome P450, reactive oxygen species can also be formed, which can also decrease heme concentration. However, to determine the destruction of heme concentrations by reactive metabolites of AAE, an assay was also performed using SOD and CAT. A parallel direction of the hemin solution was prepared, and heme concentrations of 0.63 μM and 0.59 μM were determined. Under reduced basic conditions, ferrous forms a complex with pyridine. Absorption maxima were observed at 531 nm and 570 nm. Incubation with AAE significantly reduced the heme concentration (Figure 3, Table 3).

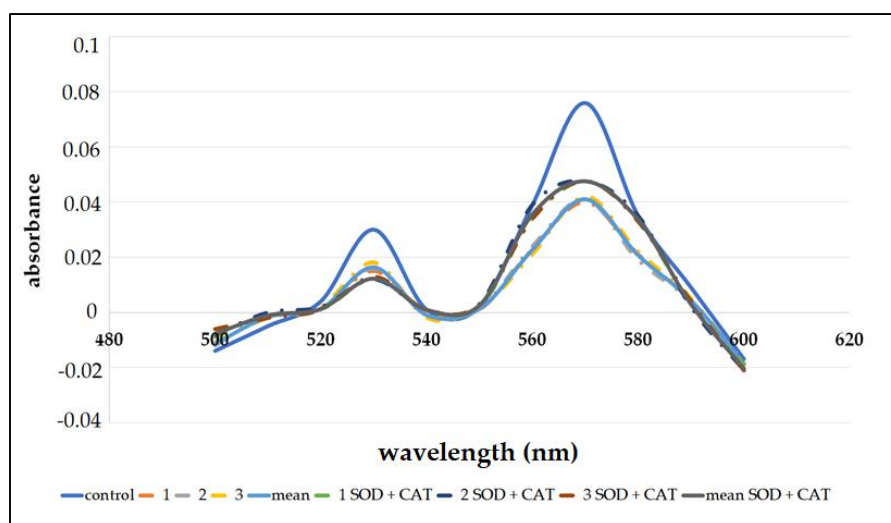


Figure 3. Spectra showing heme destruction with incubations containing AAE and AAE with SOD and CAT.

Table 3. Heme concentration (%) after incubation with AAE and with AAE containing SOD and CAT.

Incubation	Heme Concentration (%)	
	Without SOD and CAT	With SOD and CAT
1	52.9	62.5
2	53.2	61.9
3	53.5	60.9
Mean	53.2 ± 0.3	61.8 ± 0.3
statistical significance	$p < 0.05$	$p < 0.05$

The tests were confirmed by the addition of SOD and CAT. A statistically significant decrease in heme concentration was observed in both cases ($p < 0.05$). After the addition of SOD and CAT, the heme concentration was 53.2% and 61.8%, respectively, compared to the control (no AAE). These results confirm that the destruction in heme concentration is due to reactive metabolites in AAE.

3.3. Reversible and Pseudo-Irreversible Inhibition

In order to examine reversible and pseudo-irreversible inhibition, tests were performed with dialysis and the addition of an oxidant—PCF. In both cases, a statistically significant decrease in enzyme activity was observed ($p < 0.05$) (Figure 4).

The remaining activity of the CYP2B6 enzyme after incubation with AAE and dialysis was 20.3%, and the remaining activity of CYP3A4 was 20.9%. After dialysis and addition of PCF, the remaining activity of CYP2B6 and CYP3A4 was 38.4% and 36.9%, respectively. Reversible inhibition is characterized by the return of activity after dialysis. Pseudo-irreversible inhibition is characterized by the return of activity after dialysis and addition of an oxidant. In this case, no statistically significant difference was found between the two observed groups ($p > 0.05$). No reversible or pseudo-irreversible inhibition was observed.

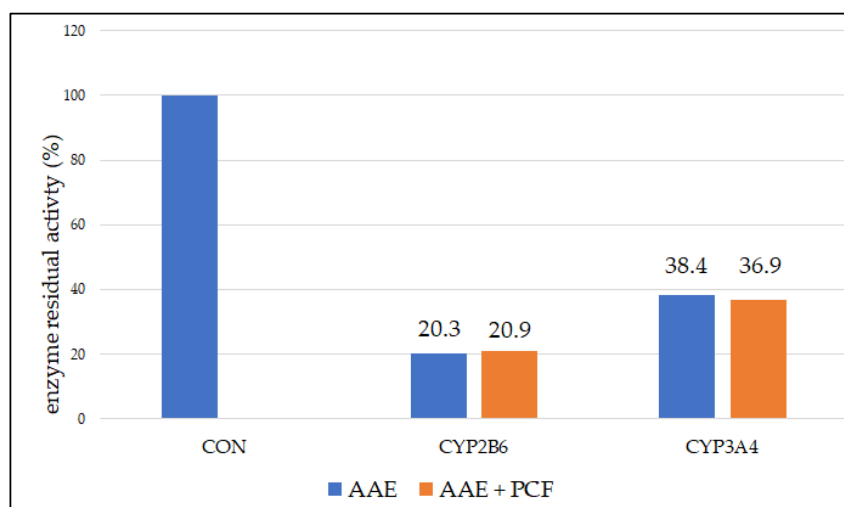


Figure 4. Residual activity (%) of CYP2B6 and CYP3A4 enzymes after incubation with AAE and dialysis and AAE with PCF and dialysis expressed as mean of triplicate; No statistically significant difference was observed between the samples with and without PCF ($p > 0.05$); CON—control.

4. Discussion

There are already numerous studies highlighting the importance of interactions of substances of natural origin with cytochrome P450 enzymes [29–31]. Although the therapeutic effects of *Artemisia annua* L. have been studied for many years, and this plant is used for nutritional and therapeutic purposes, its effect on CYP enzyme activity has been poorly studied. The authors de Magalhães et al. [32] investigated the effect of AAE in the form of tea infusions. The researchers noted the inhibitory effect of AAE on CYP3A4 enzyme activity with ketoconazole as a control, which is a known to cause complete inhibition of CYP3A4. In this study, inhibition of the CYP3A4 enzyme was observed, with the remaining enzyme activity ranging from 37% to 55%, depending on the type of AAE. Although the type of incubation tested was not described in detail, our results are somewhat consistent with the conclusions of the aforementioned study. In our study, an inhibition effect of 29.1% or 49.1% was achieved, depending on the type of inhibition. It is also important what type of extract is being tested, as this will determine the composition of the bioactive components in that extract. In our case, it was methanol extract. At this point, it should be emphasized that *Artemisia annua* L. is rich in substances of natural origin that can inhibit the activity of the CYP enzymes [13]. These are mainly sesquiterpenes [33], phenolic components [34], and coumarins [35]. Sesquiterpenes, such as artemisinin and arteannuin B; phenolic components, such as luteolin, quercetin, rutin, and apigenin; and coumarins, such as scopolin and scopoletin, are very poorly or almost not soluble in water and are soluble in organic solvents [36]. Therefore, the results of this study should also be considered in this context.

In this study, a decrease in CYP2B6 enzyme activity was observed by incubation with AAE. Enzyme activity decreased by 88.5% and 60.3%, respectively. These results are consistent with the only available research on the effect of AAE on the CYP2B6 enzyme conducted by Desrosiers et al. [37]. The effect of methanolic leaf extract of *Artemisia annua* L. on the activity of CYP2B6 and CYP3A4 enzymes in vitro was tested in comparison with artemisinin. The tested plant extract inhibited both CYP2B6 enzyme ($IC_{50} = 6.07 \mu\text{M}$) and CYP3A4 ($IC_{50} = 4.93 \mu\text{M}$) enzyme activity. In addition, this study compared the effect of *Artemisia annua* leaves in the form of tea on the activity of the above enzymes. The inhibition of the enzymes was also observed, namely $IC_{50} = 2.31 \mu\text{M}$ for CYP2B6 and $IC_{50} = 5.67 \mu\text{M}$ for the CYP3A4. In the case of the methanolic extract, the observed inhibitory effect was significantly stronger than that of artemisinin. This was also confirmed for the extract in tea form, except that no statistically significant difference in the inhibition CYP3A4 was observed in comparison with artemisinin at the highest tested dose of 600 μM . Although

these studies were performed on human liver microsomes (HLM) and not on single isolated enzymes as in this case, positive agreement with the results of this study can be confirmed. In addition, further research should be directed toward the study of inhibition kinetics and the determination of kinetic parameters for individually studied enzymes, as well as the effect of AAE in *in vivo* studies.

The aforementioned could be explained by the recent results presented by Fu et al. [38]. They investigated the effects of orally administrated AAE in rats. After the ingestion, the authors detected scopolin, scopoletin, rutin, chrysosplenol D, casticin, arteannuin B, dihydroartemisinic acid, and artemisinic acid in rat plasma. Moreover, the authors investigated the binding affinity of some of these compounds and stated that coumarins and flavonoids have better binding affinity to CYP enzymes with a docking score > 5. This occurs mainly through forming hydrogen bonds and π - π stacking. The sesquiterpenes had weak interactions with proteins.

The most frequently observed type of inhibition of CYP enzymes is direct inhibition [39]. However, the most significant form of inhibition is metabolism-dependent inhibition, because it is the result of the formation of reactive metabolites that irreversibly bind to the enzyme, which leads to its inhibition. In this way, heme adducts can be formed. Therefore, in this study, the binding of AAE to heme was investigated to observe the potential destruction of heme. Destruction of heme concentration may also occur due to exposure to reactive oxygen species. Therefore, SOD and CAT are used to remove the influence of hydrogen peroxide and superoxide. We believe that the reactive forms of AAE bind irreversibly to heme in the 7th step of the catalytic cycle of the CYP enzyme [39]. In this study, a statistically significant decrease in heme was observed after the addition of SOD and CAT, being 53.2% and 61.8%, respectively. In comparison, benzbromarone, a known CYP3A4 inhibitor, causes 44% heme destruction by covalent binding to the prosthetic group and apoprotein [38]. The drug benzbromarone has been used as a powerful uricosuric. It is a non-competitive inhibitor of xanthine oxidase, and it was used to treat gout. The company that manufactured it has withdrawn this drug from the market due to its pronounced hepatotoxicity, but the drug is still approved as a generic in some countries around the world [40,41]. Ritonavir, another known CYP3A4 inhibitor, binds to heme iron via the thiazole nitrogen, forming a tight complex [42]. Therefore, the summary of product characteristics of ritonavir includes warnings of CYP3A4 inhibition and possible significant clinical effects when this drug is used with other drugs or xenobiotics administered concomitantly with ritonavir. Thus, irreversible binding of metabolites to heme may be clinically significant. In this regard, our study demonstrated the destruction of heme by incubation with AAE, an interaction not previously reported in the available literature. All health care professionals should be aware of the potential hazards of concomitant use of AAE with CYP3A4 or CYP2B6 substrates, and further research should be directed toward the development of *in vivo* interaction studies.

These results are particularly important in the context of the last test performed in this study, which confirms the irreversible nature of this inhibition. Enzyme dialysis after incubation failed to restore the activity of CYP2B6 and CYP3A4 enzymes. Addition of the oxidant PCF also did not result in a return of enzyme activity, confirming the view that this case is not a reversible or pseudo-irreversible inhibition. Irreversible inhibitors are much more dangerous in clinically relevant interactions because irreversible damage to the active site occurs in the form of covalent bonds. Such inhibition cannot be stopped by the addition of excess substrate. Therefore, the results of this study regarding the irreversibility of CYP2B6 and CYP3A4 inhibition have strong implications for further *in vivo* research.

5. Conclusions

AAE causes inhibition of the CYP2B6 and CYP3A4 enzymes *in vitro*. Inhibition was most pronounced in metabolism-dependent inhibition assays, followed by direct inhibition assays. No statistically significant enzyme inhibition was observed in time-dependent inhibition assays. In heme-binding assays, AAE was observed to cause a significant

decrease in heme concentration, excluding the effect of reactive oxygen species on this decrease. The heme destruction is the result of binding of reactive AAE metabolites to heme, i.e., irreversible inhibition. Irreversible inhibition was confirmed by additional assays, whereas reversible or pseudo-irreversible inhibition could not be confirmed. Since *Artemisia annua* L. is widely used in traditional medicine, all health care professionals and stakeholders should be aware of this inhibition and the potential clinical implications. Further in vivo studies are needed to investigate the interactions of AAE with CYP2B6 and CYP3A4 enzyme substrates.

Author Contributions: Conceptualization, M.K.; Methodology, M.K.; Investigation, M.M. and I.I.; Writing—Original Draft Preparation, M.K.; Writing—Review and Editing, S.V.-K. and I.B.; Visualization, I.I.; Supervision, S.V.-K. and I.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by The Federal Ministry of Education and Science of the Federation of Bosnia and Herzegovina as part of the scientific research project named Research on biologically active substances of species of the genus *Artemisia* L. with the potential of application in the prevention and treatment of coronavirus infection (I.B.).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the first and corresponding author, M.K., upon request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Tu, Y. The discovery of artemisinin (*qinghaosu*) and gifts from Chinese medicine. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1217–1220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Alesaeidi, S.; Miraj, S. A Systematic Review of Anti-Malarial Properties, Immunosuppressive Properties, Anti-Inflammatory Properties, and Anti-Cancer Properties of *Artemisia Annua*. *Electron. Phys.* **2016**, *8*, 3150–3155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Willcox, M. *Artemisia* Species: From Traditional Medicines to Modern Antimalarials—And Back Again. *J. Altern. Complement. Med.* **2009**, *15*, 101–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Store Norske Leksikon. Available online: <https://snl.no/malurt> (accessed on 12 November 2022).
5. Mueller, M.S.; Karhagomba, I.B.; Hirt, H.M.; Wemakor, E. The Potential of *Artemisia annua* L. as a Locally Produced Remedy for Malaria in the Tropics: Agricultural, Chemical and Clinical Aspects. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *73*, 487–493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Gupta, P.C.; Dutta, B.; Pant, D.; Joshi, P.; Lohar, D.R. In Vitro Antibacterial Activity of *Artemisia annua* Linn. Growing in India. *Int. J. Green Pharm.* **2009**, *3*, 255–258. [[CrossRef](#)]
7. Abad, M.J.; Bedoya, L.M.; Apaza, L.; Bermejo, P. The *Artemisia* L. Genus: A Review of Bioactive Essential Oils. *Molecules* **2012**, *17*, 2542–2566. [[CrossRef](#)]
8. Wang, D.; Cui, L.; Chang, X.; Guan, D. Biosynthesis and Characterization of Zinc Oxide Nanoparticles from *Artemisia annua* and Investigate Their Effect on Proliferation, Osteogenic Differentiation and Mineralization in Human Osteoblast-like MG-63 Cells. *J. Photochem. Photobiol. B* **2020**, *202*, 111652. [[CrossRef](#)]
9. Lubbe, A.; Seibert, I.; Klimkait, T.; van der Kooy, F. Ethnopharmacology in Overdrive: The Remarkable Anti-HIV Activity of *Artemisia annua*. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *141*, 854–859. [[CrossRef](#)]
10. Ho, W.E.; Peh, H.Y.; Chan, T.K.; Wong, W.S.F. Artemisinins: Pharmacological Actions beyond Anti-Malarial. *Pharmacol. Ther.* **2014**, *142*, 126–139. [[CrossRef](#)]
11. Kim, M.H.; Seo, J.Y.; Liu, K.H.; Kim, J.-S. Protective Effect of *Artemisia annua* L. Extract against Galactose-Induced Oxidative Stress in Mice. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e101486. [[CrossRef](#)]
12. Wang, Y.; Chen, J.; Zhang, D.; Zhang, Y.; Wen, Y.; Li, L.; Zheng, L. Tumoricidal Effects of a Selenium (Se)-Polysaccharide from Ziyang Green Tea on Human Osteosarcoma U-2 OS Cells. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *98*, 1186–1190. [[CrossRef](#)]
13. Septembre-Malaterre, A.; Lalarizo Rakoto, M.; Marodon, C.; Bedoui, Y.; Nakab, J.; Simon, E.; Hoarau, L.; Savriama, S.; Strasberg, D.; Guiraud, P.; et al. *Artemisia annua*, a Traditional Plant Brought to Light. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4986. [[CrossRef](#)]
14. Omura, T.; Sato, R. The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes: II. Solubilization, Purification and Properties. *J. Biol. Chem.* **1946**, *239*, 2379–2385. [[CrossRef](#)]
15. Hakkola, J.; Hukkanen, J.; Turpeinen, M.; Pelkonen, O. Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: An update. *Arch. Toxicol.* **2020**, *11*, 3671–3722. [[CrossRef](#)]
16. Hukkanen, J.; Pelkonen, A.; Hakkola, J.; Raunio, H. Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. *Crit. Rev. Toxicol.* **2002**, *32*, 391–411. [[CrossRef](#)]

17. Rendic, S.; Guengerich, F.P. Survey of Human Oxidoreductases and Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Xenobiotic and Natural Chemicals. *Chem. Res. Toxicol.* **2015**, *28*, 38–42. [CrossRef]
18. Lozić, M.; Rimac, H.; Bojić, M. Citokrom P450 i metabolizam lijekova—Značenje i novosti. *Farm. Glasnik.* **2016**, *72*, 747–760.
19. Drug Interactions. Available online: <https://drug-interactions.medicine.iu.edu/MainTable.aspx> (accessed on 30 November 2022).
20. Yim, D.; Kim, M.J.; Shin, Y.; Lee, S.J.; Shin, J.G.; Kim, D.H. Inhibition of Cytochrome P450 Activities by Sophora flavescens Extract and Its Prenylated Flavonoids in Human Liver Microsomes. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2019**, *13*, 2673769. [CrossRef]
21. Kondža, M.; Bojić, M.; Tomić, I.; Maleš, Ž.; Rezić, V.; Čavar, I. Characterization of the CYP3A4 Enzyme Inhibition Potential of Selected Flavonoids. *Molecules* **2021**, *26*, 3018. [CrossRef]
22. Hernandez-Maldonado, J.; Grundmann, O. Drug-Drug Interactions of Artemisinin-Based Combination Therapies in Malaria Treatment: A Narrative Review of the Literature. *J. Clin. Pharmacol.* **2022**, *62*, 1197–1205. [CrossRef]
23. Guengerich, F.P.; Martin, M.V.; Sohl, C.D.; Cheng, Q. Measurement of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 1245–1251. [CrossRef] [PubMed]
24. Mashati, P.; Esmaeili, S.; Dehghan-Nayeri, N.; Bashash, D.; Darvishi, M.; Gharehbaghian, A. Methanolic Extract from Aerial Parts of *Artemisia annua* L. Induces Cytotoxicity and Enhances Vincristine-Induced Anticancer Effect in Pre-B Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *Int. J. Hematol. Oncol. Stem. Cell. Res.* **2019**, *13*, 132–139. [CrossRef] [PubMed]
25. Ruan, Z.R.; Cheng, Y.S.; Ding, D.Y. Determination of mephenytoin and 4'-hydroxymephenytoin in urine by high performance liquid chromatography. *Yao Xue Xue Bao* **1994**, *29*, 624–628. [PubMed]
26. Flink, E.B.; Watson, C.J. A Method for the Quantitative Determination of Hemoglobin and Related Heme Pigments in Feces, Urine, and Blood Plasma. *J. Biol. Chem.* **1942**, *146*, 171–178. [CrossRef]
27. Paul, K.G.; Theorell, H.; Åkeson, Å.; Virtanen, A.I.; Sörensen, N.A. The Molar Light Absorption of Pyridine Ferroprotoporphrin (Pyridine Haemochromogen). *Acta Chem. Scand.* **1953**, *7*, 1284–1287. [CrossRef]
28. Bojić, M.; Barbero, L.; Dolgos, H.; Freisleben, A.; Gallemann, D.; Riva, S.; Guengerich, F.P. Time- and NADPH-dependent Inhibition of Cytochrome P450 3A4 by the Cyclopentapeptide Cilengitide: Significance of the Guanidine Group and Accompanying Spectral Changes. *Drug Metab. Dispos.* **2014**, *42*, 1438–1446. [CrossRef]
29. Zhou, S.; Gao, Y.; Jiang, W.; Huang, M.; Xu, A.; Paxton, J.W. Interactions of herbs with cytochrome P450. *Drug. Metab. Rev.* **2003**, *35*, 35–98. [CrossRef]
30. Usia, T.; Watabe, T.; Kadota, S.; Tezuka, Y. Mechanism-based inhibition of CYP3A4 by constituents of Zingiber aromaticum. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 495–499. [CrossRef]
31. Tsukamoto, S.; Aburatani, M.; Yoshida, T.; Yamashita, Y.; El-Beih, A.A.; Ohta, T. CYP3A4 inhibitors isolated from Licorice. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 2000–2002. [CrossRef]
32. Melillo de Magalhães, P.; Dupont, I.; Hendrickx, A.; Joly, A.; Raas, T.; Dessy, S.; Sergent, T.; Schneider, Y.J. Anti-inflammatory effect and modulation of cytochrome P450 activities by *Artemisia annua* tea infusions in human intestinal Caco-2 cells. *Food. Chem.* **2012**, *134*, 864–871. [CrossRef]
33. Špičáková, A.; Bazgier, V.; Skálová, L.; Otyepka, M.; Anzenbacher, P. Beta-caryophyllene oxide and trans-nerolidol affect enzyme activity of CYP3A4—In vitro and in silico studies. *Physiol. Res.* **2019**, *68*, S51–S58. [CrossRef]
34. Šarić Mustapić, D.; Debeljak, Ž.; Maleš, Ž.; Bojić, M. The Inhibitory Effect of Flavonoid Aglycones on the Metabolic Activity of CYP3A4 Enzyme. *Molecules* **2018**, *23*, 2553. [CrossRef]
35. Ueng, Y.F.; Chen, C.C.; Yamazaki, H.; Kiyotani, K.; Chang, Y.P.; Lo, W.S.; Li, D.T.; Tsai, P.L. Mechanism-based inhibition of CYP1A1 and CYP3A4 by the furanocoumarin cholepentin. *Drug. Metab. Pharmacokinet.* **2013**, *28*, 229–238. [CrossRef]
36. National Library of Medicine. Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Luteolin> (accessed on 1 December 2022).
37. Desrosiers, M.R.; Mittelman, A.; Weathers, P.J. Dried Leaf *Artemisia annua* Improves Bioavailability of Artemisinin via Cytochrome P450 Inhibition and Enhances Artemisinin Efficacy Downstream. *Biomolecules* **2020**, *7*, 254. [CrossRef]
38. Fu, C.; Zhang, K.; Wang, M.; Qiu, F. Multi-component pharmacokinetics assessment of *Artemisia annua* L. in rats based on LC-ESI-MS/MS quantification combined with molecular docking. *Arab. J. Chem.* **2022**, *15*, 104254. [CrossRef]
39. Bojić, M. Pretklinička ispitivanja inhibicijskog i interakcijskog potencijala novih lijekova na razini citokroma P450. *Farm. Glasnik.* **2015**, *71*, 229–242.
40. Tang, L.W.T.; Verma, R.K.; Fan, H.; Chan, E.C.Y. Mechanism-Based Inactivation of Cytochrome P450 3A4 by Benzbromarone. *Mol. Pharmacol.* **2021**, *99*, 266–276. [CrossRef]
41. Lee, M.H.; Graham, G.G.; Williams, K.M.; Day, R.O. A benefit-risk assessment of benzbromarone in the treatment of gout. Was its withdrawal from the market in the best interest of patients? *Drug. Saf.* **2008**, *31*, 643–665. [CrossRef]
42. Sevrioukova, I.F.; Poulos, T.L. Structure and mechanism of the complex between cytochrome P4503A4 and ritonavir. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 18422–18427. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

8 ŽIVOTOPIS



Marta (Ivan) Mandić rođena je 24. kolovoza 1995. godine u Makarskoj, Republika Hrvatska. Osnovnu školu fra Petra Bakule i Gimnaziju fra Grge Martića završava u Mostaru, Bosna i Hercegovina, gdje je pohađala i Osnovnu glazbenu školu Ivana pl. Zajca. Godine 2019. diplomirala je na Farmaceutskom fakultetu Sveučilišta u Mostaru te stekla zanimanje magistre farmacije. Iste godine položila je stručni ispit te stekla licencu Komore magistara farmacije Federacije Bosne i Hercegovine. Od svibnja 2021. godine zaposlena je na Farmaceutskom fakultetu Sveučilišta u Mostaru u zvanju više asistentice. Iste godine upisala je doktorski studij "Farmaceutsko-biokemijske znanosti" na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Područje njezinog istraživanja je fitofarmacija i farmakognozija. Aktivno sudjeluje u organizaciji i provedbi vježbi i nastave iz kolegija Farmakognozija 1, Farmakognozija 2, Kozmetologija i Odabrana poglavlja dermatofarmacije na studiju farmacije te kolegija Uvod u kozmetologiju, Kozmetički pripravci 1 i Kozmetički pripravci 2 na studiju kozmetologije Farmaceutskog fakulteta Sveučilišta u Mostaru. Sudjelovala je kao mladi istraživač na znanstveno-istraživačkom projektu „Istraživanje biološki aktivnih tvari vrsta roda *Artemisia* L. s potencijalom primjene u prevenciji i liječenju infekcije koronavirusom“ Federalnog ministarstva obrazovanja i nauke (FMON), te kao suradnica na razvojnom Erasmus+ projektu „Innovating quality assessment tools for pharmacy studies in Bosnia and Herzegovina/IQPharm“. Dobitnica je Ernst Mach stipendije za istraživački boravak na Institut für Pharmazeutische Wissenschaften-Pharmakognosie, Karl-Franzens Universität Graz (Austrija) u razdoblju od dva mjeseca. Koautorica je sedam znanstvenih i jednog stručnog rada. Aktivno je sudjelovala na međunarodnim i domaćim znanstvenim skupovima i edukacijama s tri usmena predavanja, osam poster prezentacija te dvanaest sudjelovanja u Organizacijskim odborima. Članica je Upravnog odbora Komore magistara farmacije Federacije Bosne i Hercegovine od 2021. godine. Govori engleski (C1) i talijanski jezik (A2.2).

Znanstveni radovi objavljeni u časopisima koji su zastupljeni u bazama Current Contents i Web of Science:

1. **Mandić M**, Ivančić I, Cvetnić M, Ferrante C, Orlando G, Vladimir-Knežević S. Green extraction of volatile terpenes from *Artemisia annua* L. *Molecules* 2025;30(7):1638.
2. Kondža M, **Mandić M**, Ivančić I, Vladimir-Knežević S, Brizić I. *Artemisia annua* L. extracts irreversibly inhibit the activity of CYP2B6 and CYP3A4 enzymes. *Biomedicines* 2023;11(1):232.
3. Vladimir-Knežević S, Bival Štefan M, Blažeković B, Jelić D, Petković T, **Mandić M**, Šprajc E, Lovković S. Src Tyrosine kinase inhibitory and antioxidant activity of black chokeberry and bilberry fruit extracts rich in chlorogenic acid. *Int J Mol Sci* 2023;24(21):15512.
4. Lovrić I, Tomić I, Tomić I, Zeljko I, Bevanda M, **Mandić M**, Lovrić S, Šimić D. Inappropriate Use of Topical Corticosteroides in the Dermatology Outpatient. *Psychiatr Danub* 2021 Sep;33(Suppl 10):71-75.
5. Brkić J, Gunarić A, Tomić I, Musa Leko I, Gunaric F, **Mandić M**, Šimić D. Report of two psychodermatological cases: neurotic excoriation and dermatitis artefacta. *Psychiatria Danub* 2020;32(Suppl.2):298-301.
6. Gunarić A, Tomić I, Babic R, Gunarić F, Prlic M, **Mandić M**, Šimić D. Sensitive skin in the population of Herzegovina-Neretva county: prevalence and clinical data. *Psychiatria Danub* 2020;32(Suppl.2):290-7.

***9 TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/
BASIC DOCUMENTATION CARD***

