

Mestna občina Celje
Mladi za Celje



UGOTAVLJANJE VSEBNOSTI ARTEMISININA V RAZLIČNIH PRIPRAVKIH SLADKEGA PELINA

Področje: FARMACIJA

Avtorici:

Maša Capello, 4. c

Eva Jeran, 4. č

Mentorica:

mag. Mojca Plevnik Žnidarec, prof.

KAZALO VSEBINE

KAZALO TABEL	2
KAZALO GRAFOV	2
ZAHVALA	3
POVZETEK	4
ABSTRACT	5
1 UVOD	6
1.1 Namen raziskovalne naloge	6
1.2 Hipoteze	6
1.3 Metodologija dela	7
2 TEORETIČNI DEL	8
2.1 Pravi pelin – <i>Artemisia absinthum</i>	8
2.2 Navadni pelin – <i>Artemisia vulgaris</i>	8
2.3 Sladki pelin – <i>Artemisia annua</i>	8
2.4 Artemisinin	9
2.5 Kromatografija visoke ločljivosti HPLC	10
2.5.1 Omejitve pri delu	10
2.6 Spektrometrija	11
3 EKSPERIMENTALNI DEL	12
3.1 Vzgoja sladkega pelina	12
3.2 Pridobivanje vzorcev za nadaljnjo analizo	12
3.3 Ankete in analize	14
3.3.1 Uporabljene kemikalije za umeritveno krivuljo	14
3.3.2 Pripomočki	15
3.3.3 Standardne raztopine	15
3.3.4 Naši vzorci	18
4 REZULTATI	19
4.1 Izris umeritvene krivulje	19
4.2 Razprava po hipotezah	22
4.3 Predlogi	23
4.3.1 Predlogi za rešitev oziroma izboljšanje problema	23
4.3.2 Nadaljnje raziskovanje	23
5 ZAKLJUČEK IN RAZPRAVA	25
6 VIRI IN LITERATURA	27
7 PRILOGA	29

KAZALO SLIK

Slika 1: Grm sladkega pelina [18]	8
Slika 2: Kroglična formula artemisinina [19]	9
Slika 3: Aparatura HPLC metode [20]	10
Slika 4: Spektroskopija [5]	11
Slika 5: Sladki pelin na vrtu [21]	12
Slika 6: Priprava sladkega pelina za parno destilacijo (lasten arhiv)	13
Slika 7: Pripravki iz sladkega pelina (lasten arhiv)	13
Slika 8: Uporabljene kemikalije (lasten arhiv)	14
Slika 9: Spektrometer (lasten arhiv)	15
Slika 10: Pipeta (lasten arhiv)	16
Slika 11: Tvorba rumeno obarvanih kompleksov (lasten arhiv)	17
Slika 12: Standardne raztopine in vzorci (lasten arhiv)	17
Slika 13: Prikaz rezultatov v programu UVprobe(lasten arhiv)	17
Slika 14: Priprava testnih vzorcev (lasten arhiv).....	18
Slika 15: Vzorci in standardi ob začetku (lasten arhiv)	21

KAZALO TABEL

Tabela 1: Izmerjene absorbance standardnih raztopin artemisinina.....	19
Tabela 2: Izmerjene absorbance in izračunane koncentracije artemisinina v vzorcih	20
Tabela 3: Izvorne meritve absorbanc in koncentracij artemisinina v vzorcih na spektrometru	29

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Umeritvena krivulja (program UVprobe)	19
Graf 2: Koncentracija artemisinina v pripravkih pelina	21
Graf 3: Vsebnost artemisinina v različnih delih rastlin pelinov [9].....	26

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujema mentorici mag. Mojci Plevnik Žnidarec za vso podporo in pomoč pri izdelavi raziskovalne naloge. Skozi celoten proces njenega nastajanja naju je spodbujala, usmerjala in s svojim znanjem ter nasveti vodila do končnega cilja.

Zahvaljujema se doc. dr. Katarini Vogel Mikuš s katedre za botaniko in fiziologijo rastlin Biotehniške fakultete v Ljubljani, ker nama je omogočila delo v laboratorijih in nama bila v veliko pomoč pri izbiri in postavitvi metode ter sami izvedbi izvajanja meritev.

Za usmeritve in pomoč s strokovno literaturo se zahvaljujema doc. dr. Iztoku Tomažiču prav tako iz Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Hvala mag. Katji Temnik za pomoč pri oblikovanju strokovnega angleškega povzetka.

Hvala tudi prof. Vesni Gubenšek Bezgovšek za jezikovni pregled raziskovalne naloge.

Hvala vodstvu I. gimnazije v Celju, ki nama je zagotovilo dobre pogoje za raziskovalno delo.

Iskreno se zahvaljujema najinima družinama in prijateljem, ki so naju vsestransko podpirali, spodbujali in nama pri delu pomagali po svojih najboljših močeh.

POVZETEK

V raziskovalni nalogi smo raziskovali vsebnost artemisinina v različnih pripravkih sladkega pelina (*Artemisia annua* L.). Ta naj bi poleg učinkovitega zdravljenja malarije, danes se namreč v ta namen uporablja po celem svetu, dvigovanja imunske odpornosti, blaženja bolečin, zdravljenja herpesov in glivic, predstavljal velik potencial tudi za zdravljenje rakavih obolenj.

Zanimalo nas je, ali lahko rastlino vzgojimo sami in tako iz nje pripravimo različne pripravke. Ko nam je to uspelo, smo želeli raziskati in ugotoviti, koliko artemisinina vsebujejo tako pripravljene vzorci v primerjavi z nam bolj znanim navadnim pelinom. Za ugotavljanje vsebnosti artemisinina smo uporabili spektroskopsko metodo UV-VIS in dobljene rezultate ovrednotili glede na zastavljena raziskovalna vprašanja oziroma hipoteze.

Ugotovili smo, da je vzgoja sladkega pelina zelo preprosta in obilna. Iz svežih oziroma posušenih delov rastline smo brez večjih težav predelali čaj, hidrolat in tinkture, ki so bili naši vzorci za nadaljnjo analizo. Rezultati spektroskopske analizne metode so pokazali, da je največ artemisinina v tinkturi, pridobljeni iz cvetoče rastline sladkega pelina. Iz ugotovitev sklepamo, da je vsebnost artemisinina odvisna od vrste pelina in okolja, v katerem je ta vzgojen.

Ključne besede: sladki pelin (Artemisia annua L.), artemisinin, rakave celice, spektroskopija, metoda UV-VIS

ABSTRACT

This research deals with content of artemisinin in different preparations of sweet wormwood (*Artemisia annua L.*). Artemisinin is effective in malaria healing – used all over the world –, in increasing immunity, alleviating the pain, healing herpes and fungal skin infection, moreover, it should also have the potential for healing cancer.

We were interested in finding out if we could grow the plant and make different preparations out of it. We succeeded and wanted to find out the content of the artemisinin in our samples comparing to common wormwood. We used UV-VIS spectroscopy method and interpreted the results according to hypotheses.

We found out that cultivation of sweet wormwood is simple and abundant. We easily made tea, hydrolat and tincture out of its fresh leaves and used them for further analysis. The results showed the highest content in the tincture made out of fresh leaves of the sweet wormwood. Based on the results we conclude that the artemisinin content depends on sort of the absinthe and on its cultivation environment.

Key words: sweet wormwood (Artemisia annua L.), artemisinin, cancer cells, spectrometry, US-VIS method

1 UVOD

1.1 Namen raziskovalne naloge

Z napredkom znanosti in medicine nam je kot družbi uspelo obvladovati in v nekaterih primerih celo iztrebiti bolezni, ki so še nekaj stoletij nazaj veljale za neozdravljive in smrtno nevarne. Z odkritjem penicilina in razvojem antibiotikov sta pljučnica in tuberkuloza v večini primerov postali popolnoma ozdravljivi; s širšo uporabo cepiv so ošpice že skoraj v celoti iztrebljene. S cepivi se lahko tudi preventivno zavarujemo pred tetanusom, gripo itd. V današnjem času, zaznamovanim s hitrim tempom in stresnim ter vedno manj zdravim načinom življenja, pa se vsakodnevno pojavljajo novi (mutirani) virusi, novo odkrite bakterije in nove bolezni, "bolezni 21. stoletja". Sladkorna bolezen, multipla skleroza, avtizem, celiakija, alergije, rakava obolenja idr. postajajo naša nova normalnost. Znanstveniki po vsem svetu si zato prizadevajo, da bi našli nova, učinkovitejša zdravila, ki bi tudi ta bolezenska stanja spremenila v ozdravljiva.

Sladki pelin se s svojim velikim potencialom za zdravljenje različnih bolezenskih stanj, pri čemer je za farmacevtsko in zdravstveno stroko trenutno najbolj zanimiva njegova sposobnost uničevanja rakavih celic, v zadnjem času zelo pogosto pojavlja kot predmet raziskovanja na različnih univerzah in raziskovalnih inštitutih po celem svetu. Ključnega pomena pri njegovem zdravilnem delovanju je učinkovina artemisinin, ki v kombinaciji z drugimi snovmi zelo učinkovito pomaga pri reševanju številnih bolezni.

Z raziskovanjem smo želeli ugotoviti, ali lahko sadiko sladkega pelina vzgojimo sami in iz nje pripravimo različne pripravke (čaj, hidrolat in tinkturo). Zanimalo nas je, kakšna je vsebnost artemisinina v naših vzorcih, želeli pa smo tudi ugotoviti, kdaj in kako je najprimernejše sladki pelin obrati in predelati, da je njegovo delovanje najučinkovitejše.

1.2 Hipoteze

Pred začetkom raziskovanja smo postavili štiri hipoteze, ki smo jih z uporabo različnih raziskovalnih metod pozneje potrdili oziroma zavrgli.

1. hipoteza: Rastlino (sladki pelin) lahko vzgojimo sami.
2. hipoteza: Predvidevamo, da lahko na osnovi dobrega pridelka pripravimo vse pripravke (čaj, hidrolat oziroma rožno vodo, tinkturo oziroma alkoholni izvleček).
3. hipoteza: Predvidevamo, da se vsebnosti artemisinina v različnih pripravkih razlikujejo.
4. hipoteza: Glede na podatke iz literature [24] predvidevamo, da je vsebnost artemisinina največja v tinkturi sladkega pelina.

1.3 Metodologija dela

Pri raziskovanju smo uporabili naslednje metode:

- vzgoja rastlin in priprava pripravkov (hidrolata, tinkture),
- delo z literaturo in različnimi viri,
- kvantitativno določanje artemisinina v vzorcih s spektroskopsko metodo UV-VIS in
- vrednotenje dobljenih rezultatov.

Izhodišče raziskovalne naloge je bil internetni članek o sladkem pelinu [24]. Ta nas je tako navdušil, da smo rastlino želeli vzgojiti. Ugotovili smo, da njena vzgoja sama po sebi ni zahtevna in da jo lahko vzgoji vsak doma na svojem vrtu. Poglobili smo se v raziskovanje in prebrali različne drugotne vire: knjige, strokovne in nestrokovne članke v revijah in na spletu, raziskovalne naloge ter poročila raziskav svetovnih raziskovalnih središč. Knjižnih virov na najino temo praktično nisva našli (razen botaničnih knjig o sladkem pelinu in njegovi vzgoji), saj gre za razmeroma novo odkritje, ki je še vedno v fazi raziskovanja.

Sadiko sladkega pelina smo brez težav posadili in vzgojili. Iz vzgojene rastline smo v šolskem laboratoriju s pomočjo parne destilacije v bakrenem alembiku pridobili hidrolat in nekaj kapljic eteričnega olja. Iz svežih listov omenjene rastline smo pripravili tinkturi oziroma alkoholna izvlečka. Sladki pelin smo posušili tudi za čaj.

Ko so bili vsi pripravki izdelani, smo imeli vzorce oziroma potrebne pogoje za nadaljnjo analizo, za ugotavljanje vsebnosti artemisinina v njih. Po ponovnem pregledu virov in poročil o dosedanjih raziskavah smo ugotovili, da bi bilo to mogoče izvesti s pomočjo instrumentalne analize metode, kromatografije visoke ločljivosti ali na kratko HPLC. Kljub vztrajnemu iskanju možnosti o izvedbi te žal nismo našli nobene institucije, ki bi nam tovrstno analizo dejansko lahko omogočila. Treba se je bilo lotiti iskanja in preučevanja nove metode, ki bi bila za nas izvedljiva. Raziskovanje nas je tako privedlo do spektroskopske metode UV-VIS, v območju ultravijolične in vidne svetlobe, ki je opisana v nadaljevanju. Pridobljene rezultate smo nato analizirali in na osnovi teh potrdili oziroma ovrgli zastavljene hipoteze.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 Pravi pelin – *Artemisia absinthum*

Že v davnini je pelin veljal za zdravilo pri želodčnih, jetrnih in žolčnih težavah. Domovina pelina so stepe vzhodne Evrope in osrednje Azije. Že zelo zgodaj so ga gojili kot zdravilno rastlino, zato se je razširil po vsej Evropi in severni Afriki. V Sloveniji raste po suhih travnikih in starih zidovih od nižine do visokogorskega pasu. Julija in avgusta nabiramo cvetoče olistane poganjke in pritlične liste. Posušen pelin ima aromatičen vonj in močno grenak okus. [10]

2.2 Navadni pelin – *Artemisia vulgaris*

Pelinu podoben je navadni pelin, ki ima le na spodnji strani srebrno sivkaste dlakave liste brez tipičnega vonja in je nežno grenkega okusa. V zelišču so številni flavonoidi, predvsem glikozidi, čreslovine in veliko kalija. Eterično olje, ki ga dobimo pri parni destilaciji, vsebuje tudi tujon, ki pa je strupen. Alkoholni pripravki iz pelina tako niso primerni, saj se v alkoholu topi več eteričnega olja kot v vodi. [10]

2.3 Sladki pelin – *Artemisia annua*

Sladki pelin je nebinovka (Asteraceae), ki prav tako spada v veliko družino pelinov. V višino lahko zraste več kot dva metra, navadno pa od 30 do 100 centimetrov. Raste kot enoletna grmovnica s 3–5 centimetrov dolgimi listi in majhnimi rumenimi cvetovi, ki sladko dišijo. Izhaja iz Azije, v Evropo pa naj bi ga prinesli Turki, ki so ga uporabljali za odganjanje mrčesa. Njegovi pripravki naj bi v kombinaciji z železom in s C- vitaminom tvorili proste kisikove radikale in tako med drugim uspešno uničevali rakaste celice. [14]



Slika 1: Grm sladkega pelina [18]

2.4 Artemisinin

Kemijsko je modificiran lakton, ki vsebuje nenavaden peroksidni mostiček -O-O-. Prav temu mostičku pripisujejo zdravilno učinkovanje. [23]

Artemisinin je naravno sintetiziran peroksid, izoliran iz kitajske tradicionalne rastline, *Artemisia annua* – sladkega pelina. Že več stoletji se v azijski tradicionalni medicini uporablja za zmanjšanje vnetij in zniževanje povišane telesne temperature, uveljavlja pa se tudi kot zdravilo proti malariji. Zaradi izvrstnega varnostnega profila so v zadnjih dveh desetletjih začeli raziskovati njegov vpliv na rakave celice. Rezultati so pokazali, da se njegova sposobnost uničenja rakavih celic razlikuje glede na to, kako se molekule povezujejo v dimere in s katero funkcionalno skupino se vežejo. [1] [8]

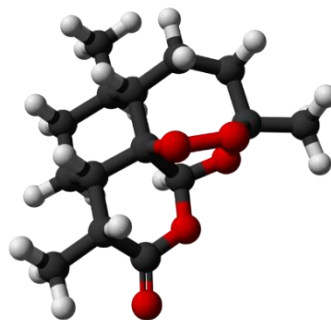
Leta 2015 je kitajska farmakologinja Youyou Tu dobila Nobelovo nagrado za odkritje protimalarika Artemisinina. Do danes je ta pozdravil že na milijone obolelih z malarijo, pomagal pa naj bi tudi pri nekaterih drugih bolezenskih stanjih. [3]

Artemisinin sam po sebi nima tako intenzivnega učinka na rakave celice, temveč pravo orožje postane šele v kombinaciji s C-vitaminom in železom. [7] [8]

Glavna razlika med vplivom kemoterapije, ki se zdaj uporablja, in artemisininom je ta, da slednji povzroči precej manj škode v zdravih celicah, zaznana je le majhna poškodba DNK, ki pa se je v nadaljnjem razvoju te snovi, kot vrsto kemoterapije, ne sme zanemariti. Za najbolj učinkovitega se je izkazal pri uničevanju celic raka na dojki, pljučih, trebušni slinavki in pri akutni levkemiji. [4] [6]

Prav tako bi lahko artemisinin v prihodnosti uporabljali kot preventivo pred nastajanjem rakavih celic v človeškem telesu, saj bi z njim okrepili imunski sistem in tako zmanjšali možnosti pojava malignih celic. [12]

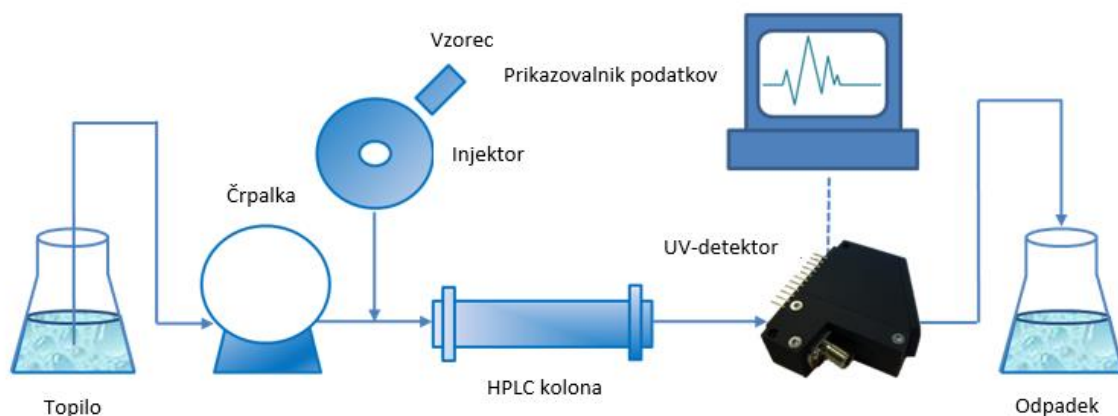
Poleg zdravljenja malarije in raka se je artemisinin izkazal kot potencialno zdravilno sredstvo pri zdravljenju virusa HIV, RNA in DNA virusov, npr. hepatitisa B in C, herpesa virusa 6. Dosedanje raziskave so pokazale, da ima precej večjo učinkovitost na DNA viruse kot na RNA. [3]



Slika 2: Kroglična formula artemisinina [19]

2.5 Kromatografija visoke ločljivosti HPLC

Po študiju literature in virov bi bilo določanje vsebnosti artemisinina najboljše opraviti z instrumentalno analizo metodo, s kromatografijo visoke ločljivosti oziroma HPLC.



Slika 3: Aparatura HPLC metode [20]

S prošnjami za pomoč pri izvedbi analize smo se tako obrnili na različne laboratorije, vendar so nam vsi vključeni pojasnili, da gre za nerutinsko metodo, za katero v laboratorijih še nimajo postavljene ustrezne kolone in primernih detektorjev. Prav tako je izbrana metoda finančno precej zahtevna in bi, v primeru izvajanja, morala biti sprejeta, podprta in financirana od širše raziskovalne skupine.

2.5.1 Omejitve pri delu

Za ugotavljanje artemisinina v naših pripravkih smo uporabili spektroskopsko analizo metodo UV-VIS, ki je bila za nas sprejemljiva in nam je obljubljala zelo primerljive rezultate. Ko je bila kvantitativna metoda določanja vsebnosti artemisinina enkrat določena, smo naleteli na nov problem. Za omenjeno metodo smo morali glede na preučeno literaturo naročiti potrebne kemikalije, safranin O in standard artemisinina. Omenjeni kemikaliji namreč potrebujemo za pripravo standardnih raztopin, ki so izhodišče za izris umeritvene krivulje.

2.6 Spektrometrija

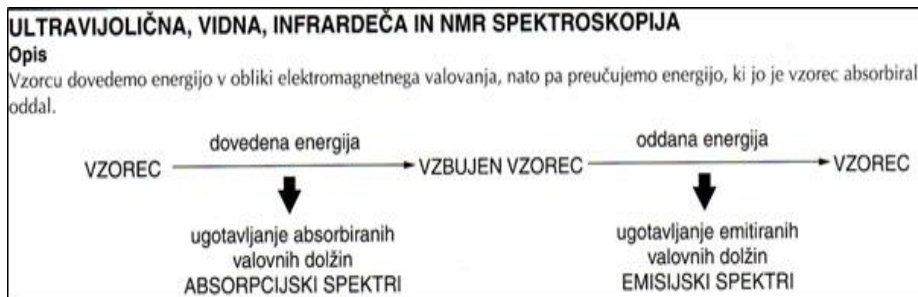
Spektrometrija spada med najboljčutilnejše in najpomembnejše metode v kemijski analizi, s katerimi določamo kemijsko sestavo materiala, ugotavljamo vsebnost določenih kemijskih elementov ali spojin v vzorcu. [5]

Molekularna absorpcijska spektrometrija temelji na merjenju absorpcije svetlobe, ki prehaja skozi preiskovano raztopino. Običajno absorpcijo merimo v ultravijoličnem, vidnem in infrardečem spektralnem območju, navadno pri absorpcijskem maksimumu. [5]

Za absorpcijo svetlobe velja Beer-Lambertov zakon:

$$\log \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} = A = k \cdot b \cdot c \quad \dots \text{matematični izraz za merjenje absorbanca (1)}$$

- I_0 – jakost svetlobe vpadnega žarka
- I – jakost svetlobe po prehodu skozi snov
- A – je absorbanca (ekstinkcija)
- k – molarni absorpcijski (ekstinkcijski) koeficient
- b – dolžina svetlobne poti skozi snov
- c – koncentracija določane zvrsti



Slika 4: Spektroskopija [5]

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 Vzgoja sladkega pelina

Ugotovili smo, da je vzgoja sladkega pelina zelo preprosta. Kot je navedeno v številnih virih in literaturi, rastlina najbolje uspeva na odcednih, nevtralnih oziroma rahlo alkalnih ilovnatih tleh. Sejemo jo zgodaj spomladi, na prosto pa jo presadimo maja, ko je nevarnost pozebe mimo. Ko je enkrat v zemlji, brez posebne skrbi z zalivanjem zelo hitro zraste v visoko, dišečo grmovnico.



Slika 5: Sladki pelin na vrtu [21]

3.2 Pridobivanje vzorcev za nadaljnjo analizo

Grm smo pustili rasti do konca poletja, nato smo ga dvakrat obirali. Prvič avgusta, ko rastlina še ni zacvetela, in drugič septembra, ko je bilo polno cvetov. Iz svežih listov in cvetov smo nato pridobili material, iz katerega smo v šolskem laboratoriju pridobili hidrolat in nekaj kapljic eteričnega olja, v bakrenem alembiku – destilatorju. Odprtine smo zatesnili s pasto iz ržene moke in vode ter s tem zagotovili popolno tesnjenje, da ne bi produkti uhajali. Destilator je sestavljen iz treh delov, in sicer iz:

- posode, v kateri je voda in ob segrevanju iz nje nastaja para,
- posode, v katero naložimo rastlinski material in
- hladilnika, v katerem se para utekočini – kondenzira.

Para pri prehodu skozi rastline povzroča pokanje celic in veže nase hlapne komponente eteričnega olja ter vodne faze ali hidrolat. Eterično olje je lažje od hidrolata, zato plava na njem.

Čaj smo naredili tako, da smo sladki pelin preprosto posušili na sobni temperaturi v zatemnjenem, dobro prezračnem prostoru in ga posušenega shranili v papirno embalažo.

Tinkture smo naredili tako, da smo namočili 100 g sveže zeli v litrsko steklenico etanola za tri tedne. Pripravili smo dve tinkturi sladkega pelina. V prvi tinkturi smo za ekstrakcijo v etanolu uporabili zelene dele rastline sladkega pelina pred cvetenjem, za vzorec druge tinkture pa smo uporabili zelene dele rastline s cvetovi. Že na prvi pogled je bila dobro vidna razlika med vzorcem tinkture iz rastline pobrane pred in tisto med cvetenjem. Prva je bila intenzivne temno zelene barve, medtem ko je bila druga blede rumena do svetlo zelena. Razlog za to je večja oziroma manjša prisotnost klorofila v listih in cvetovih rastline.

Vzporedno smo pripravili še tinkturo oziroma alkoholni izvleček navadnega pelina, saj nas je zanimalo, ali se tudi vzorca tinktur sladkega in pravega pelina razlikujeta v vsebnosti artemisinina.



Slika 6: Priprava sladkega pelina za parno destilacijo (lasten arhiv)



Slika 7: Pripravki iz sladkega pelina (lasten arhiv)

3.3 Ankete in analize

Iz literature [24] smo dobili podatek, da sta tako hidrolat kot tinktura sladkega pelina zelo učinkovita pri zdravljenju herpesov, kožnih izpuščajev in mozoljev. To trditev smo se odločili preizkusiti. Ob omenjenih težavah smo sorodnikom in znancem ponudili omenjena pripravka, pridobili njihova soglasja ter jih poučili, da na prizadeto mesto nanesejo kapljico oziroma dve pripravka.

Pri vseh testnih osebah s herpesom (v začetni ali v napredovani fazi) je ta v zelo kratkem času izginil. Nanos pripravkov je bil prav tako pri večini uporabnikov uspešen pri zdravljenju manjših kožnih izpuščajev.

Zavedamo se, da bi bilo treba dobljene rezultate še klinično preveriti, da bi lahko zdravilnost obeh pripravkov resnično strokovno potrdili. Vseeno pa smo z njimi zadovoljni, saj potrjujejo, da sladki pelin res vsebuje zdravilne učinkovine, ki smo jih skozi postopke predelave uspeli ohraniti in izolirati.

3.3.1 Uporabljene kemikalije za umeritveno krivuljo

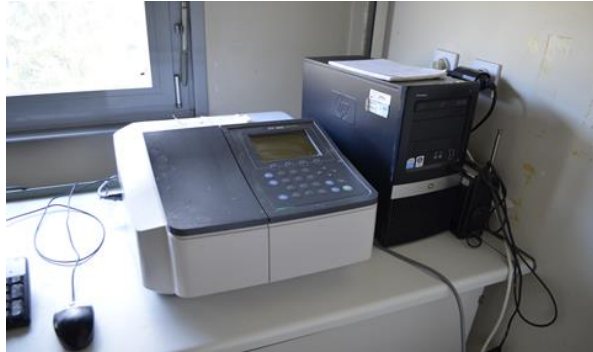
- Standard artemisinina 10 mg
- 50 % etanol
- 2 % raztopina kalijevega jodida
- Raztopina klorovodikove kisline z množinsko koncentracijo 5 mol/L
- 0,01 % raztopina safranina O v etanolu
- Raztopina natrijevega acetata z množinsko koncentracijo 2 mol/L
- Destilirana voda



Slika 8: Uporabljene kemikalije (lasten arhiv)

3.3.2 Pripomočki

- Merilne bučke s pokrovčki (10 mL, 50 mL, 250 mL)
- Mikrolitrski pipeta
- Kivete
- Spektrometer Shimadzu UV-1800
- Merilni program UVprobe



Slika 9: Spektrometer (lasten arhiv)

3.3.3 Standardne raztopine

Za pripravo standardnih raztopin potrebujemo standard artemisinina. Iz njega pripravimo osnovno raztopino, z začetno koncentracijo 10 mg artemisinina na 10 mL etanola. Ker ne poznamo območja, v katerem se bodo nahajale koncentracije vsebovanega artemisinina v naših vzorcih, smo se odločili pripraviti več raztopin, da bi pokrili dovolj široko merilno območje.

Iz pripravljene osnovne raztopine standarda artemisinina v nadaljevanju odpipetiramo 10 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 500 μ L, 800 μ L, 1000 μ L, 2000 μ L in 4000 μ L v merilne bučke in dodamo pripravljene raztopine, ki so navedene pod točko 3.4.1 in opisane v postopku spodaj. Tako pripravljenim standardnim raztopinam artemisinina, z znanimi koncentracijami, merimo absorbance pri valovni dolžini 521 nm. [10]

Meritve in analitsko eksperimentalni del smo v celoti opravili na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

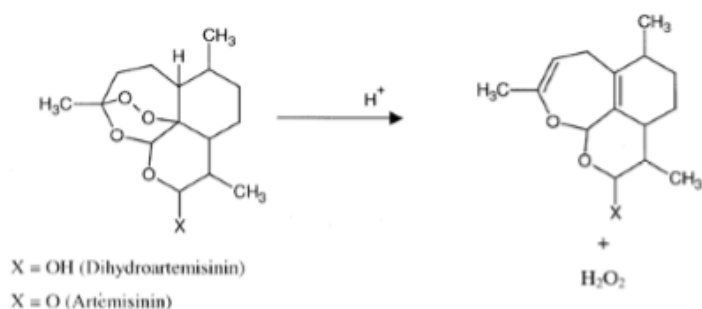
Postopek priprave standardnih raztopin

1. Za kontrolo uporabimo 50 % etanol.
2. V 10 mL bučke odpipetiramo 10 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 500 μ L, 800 μ L, 1000 μ L, 2000 μ L in 4000 μ L standardne raztopine artemisinina.

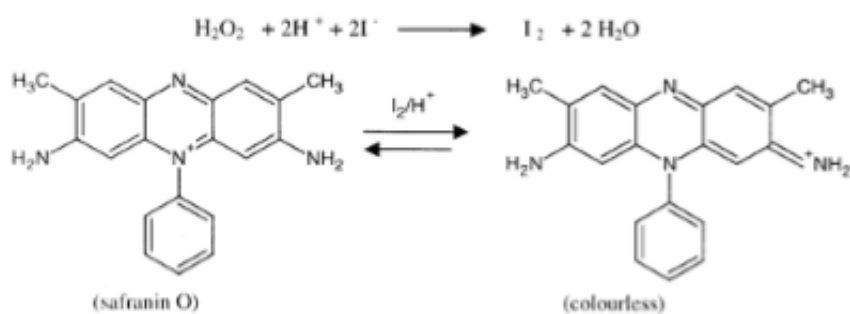


Slika 10: Pipeta (lasten arhiv)

- V vsako bučko nato dodamo 1 mL raztopine kalijevega jodida in 1 mL raztopine klorovodikove kisline ter dobro premešamo. Opazimo rumeno obarvanje, ki je posledica reakcije jodidnega iona (reakcijska shema 2).



... reakcijska shema 1 [10]



...reakcijska shema 2 [10]

- Premešani zmesi dodamo 0,5 mL raztopine safranina O, raztopljenega v etanolu, in 2 mL raztopine natrijevega acetata ter vse skupaj dobro mešamo 5 minut.
- Po mešanju v posamezno bučko dodamo do oznake 10 mL destilirane vode in še enkrat dobro premešamo, da postane zmes homogena.

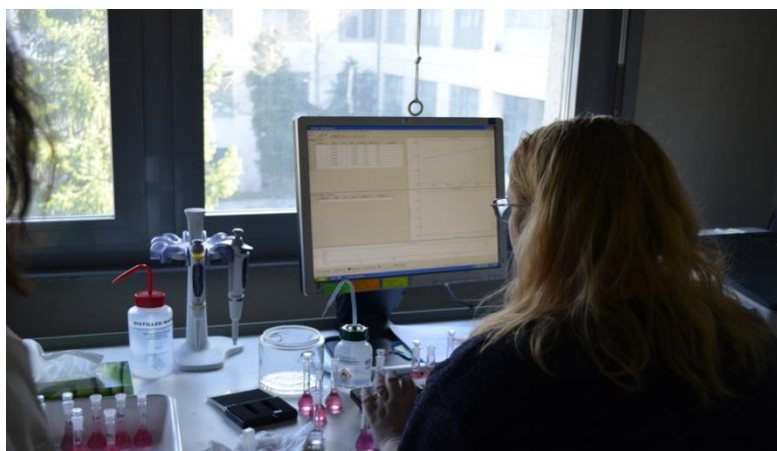
6. Tako pripravljene standardne raztopine vsako posebej prelijemo v kiveto in jim posamezno, v spektrometru, izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 521 nm. Barve se standardnim raztopinam pravilno obarvajo po približno eni uri (slika 12). [10]
7. Program UVprobe nam izriše umeritveno krivuljo, ki je linearna funkcija.



Slika 11: Tvorba rumeno obarvanih kompleksov (lasten arhiv)



Slika 12: Standardne raztopine in vzorci (lasten arhiv)

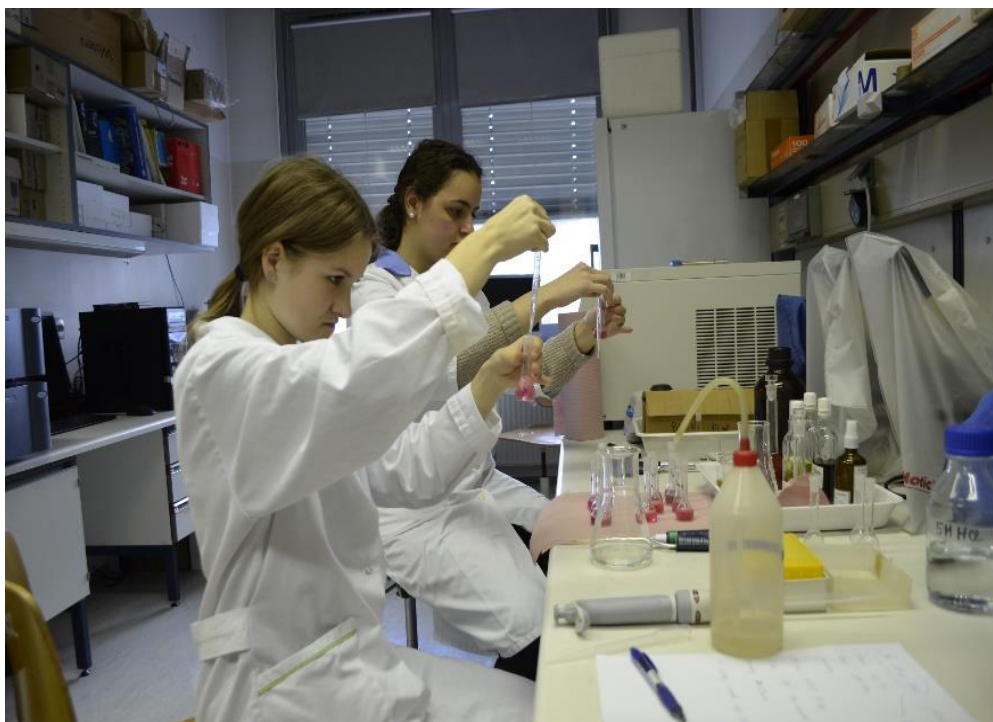


Slika 13: Prikaz rezultatov v programu UVprobe (lasten arhiv)

3.3.4 Naši vzorci

- Hidrolat sladkega pelina – HP
- Tinktura sladkega pelina, pobranega avgusta 2018 – SP_r
- Tinktura sladkega pelina, pobranega septembra 2018 – SP_z
- Tinktura navadnega pelina – NP

Za vsak vzorec smo naredili tri paralelke, v dveh ponovitvah. Prvič smo odpipetirali 1 mL vzorca in dodali vse ostale raztopine, enako kot pri standardnih raztopinah. Drugič smo odpipetirali 5 mL vzorca in ponovili postopek merjenja absorbance pri 521 nm. S pomočjo enačbe linearne premice, ki nam jo izpiše program UVprobe, lahko na osnovi izmerjenih absorbanc vzorcem izračunamo koncentracije artemisinina.



Slika 14: Priprava testnih vzorcev (lasten arhiv)

4 REZULTATI

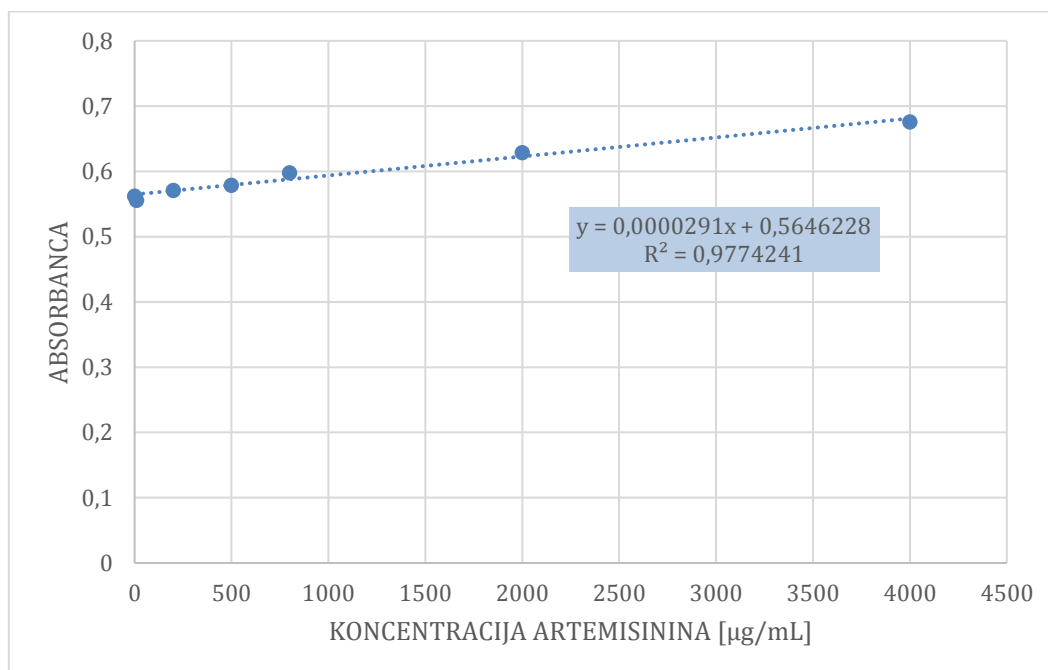
4.1 Izris umeritvene krivulje

V program UVprobe smo vnesli koncentracije naših standardnih raztopin artemisinina in izmerili absorbance pri 521 nm. Rezultati meritev so zbrani v tabeli 1. Zatem je program izrisal umeritveno krivuljo in izpisal linearno enačbo, oboje je prikazano v grafu 1.

Za natančno optimizacijo umeritvene krivulje bi morali še večkrat ponoviti pripravo standardnih raztopin in meritve njihovih absorbanc.

Tabela 1: Izmerjene absorbance standardnih raztopin artemisinina

Koncentracija artemisinina [$\mu\text{g}/10\text{ mL}$]	Izmerjena absorbanca
10	0,556
200	0,571
500	0,579
800	0,598
2000	0,629
4000	0,676



Graf 1: Umeritvena krivulja (program UVprobe)

V tabeli 2 so prikazane izmerjene absorbance naših vzorcev, izračunane koncentracije artemisinina za posamezen vzorec, povprečne koncentracije paralelnih meritev in še končne povprečne koncentracije za posamezen vzorec.

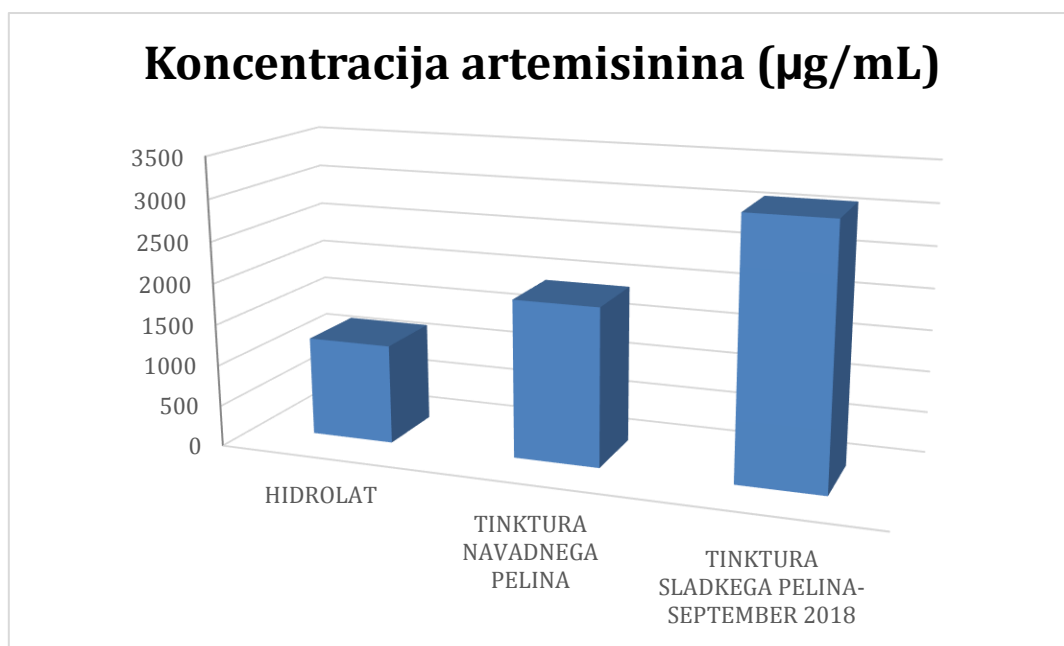
Tabela 2: Izmerjene absorbance in izračunane koncentracije artemisinina v vzorcih

Vzorec	Absorbanca	Koncentracija artemisinina [µg/mL]	Povprečna koncentracija artemisinina [µg/mL]	Končna povprečna koncentracija [µg/mL]
H1	0,591	910,34	956,32	1209,20 odstopa
H1	0,596	1082,76		
H1	0,590	875,86		
H2	0,631	2289,66	2726,44	
H2	0,576	1117,24		
H2	0,593	979,31		
NP1	0,591	910,34	737,93	1732,18
NP1	0,591	910,34		
NP1	0,576	393,10		
NP2	0,650	2944,83	2726,44	
NP2	0,639	2565,52		
NP2	0,642	2668,97		
SP1r	0,732	5772,41	5760,92	4048,28
SP1r	0,731	5737,93		
SP1r	0,732	5772,41		
SP2z	0,610	1565,52	1479,31	
SP2z	0,605	1393,10		
H5	0,596	1082,76	841,48	168,28 odstopa
H5	0,584	668,97		
H5	0,587	772,41		
NP5	0,840	9496,55	9588,51	1917,70
NP5	0,843	9600		
NP5	0,845	9668,97		
SP5r	0,991	14703,45	15531,03	3106,21
SP5r	1,025	15875,86		
SP5r	1,029	16013,79		

Legenda:

- Hidrolat sladkega pelina – H1, H2 (1 mL hidrolata) – paralelke pripravka
- Hidrolat sladkega pelina – H5 (5 mL hidrolata)
- Tinktura sladkega pelina, pobranega avgusta 2018 – SP2z (1 mL zelene tinkture)
- Tinktura sladkega pelina, pobranega avgusta 2018 – SP1r (1 mL rumene tinkture)
- Tinktura sladkega pelina, pobranega avgusta 2018 – SP5r (5 mL rumene tinkture)
- Tinktura navadnega pelina – NP1, NP2 (1 mL tinkture) – paralelke pripravka
- Tinktura navadnega pelina – NP5 (5 mL tinkture)

Za vsak pripravek smo meritve ponovili v več paralelkah.



Graf 2: Koncentracija artemisinina v pripravkih pelina

Vzorec, z oznako SP2z (tinktura sladkega pelina, pobranega avgusta 2018, ki je bila močno zeleno obarvana raztopina), nam je povzročal težave. Pri pripravi vzorčne raztopine za merjenje absorbance se je pri dodajanju potrebnih raztopin pojavila motnost, ki je onemogočila prehod žarka skozi raztopino, zato izmerjena absorbanca ni bila realna. Motnost smo želeli izločiti, zato smo vsebino prefiltrirali in meritev ponovili. Poskusili smo še s centrifugiranjem, vendar spet zaman. Rezultati meritev so bili pod mejo detekcije oziroma zaznavanja. Iz omenjenega sklepamo, da prisotnost klorofila onemogoča natančno določitev artemisinina v tem vzorcu.



Slika 15: Vzorci in standardi ob začetku (lasten arhiv)

Iz rezultatov v tabeli 2 je lepo razvidno, da tinktura sladkega pelina vsebuje največjo koncentracijo artemisinina (**3106,21 µg/mL**). Temu sledi vzorec tinkture navadnega pelina s **1917,70 µg/mL**, najmanj pa ga določimo v hidrolatu (**168,28 µg/mL**). Pri hidrolatu je vsebnost artemisinina čisto na meji detekcije.

4.2 Razprava po hipotezah

Na podlagi empirično, predvsem pa eksperimentalno pridobljenega znanja in rezultatov smo svoje izsledke analizirali in na podlagi ugotovitev te analize ovrgli oziroma potrdili hipoteze, ki smo jih postavili na začetku svojega raziskovalnega dela.

1. HIPOTEZA: potrdimo

Naša prva hipoteza je bila, da lahko rastlino sladkega pelina vzgojimo sami. To trditev lahko potrdimo, saj smo jo brez večjih težav vzgojili in pridelali na šolskem vrtu. Ugotovili smo, da je po svetu veliko različnih vrst pelina, ki rastejo v zelo različnih okoljih in podnebnih razmerah. Temu primerni so posebni pogoji, ki jih zahtevajo sadike. Sladki pelin iz Švice, ki je najbolj podoben tistemu, ki smo ga posadili (geografsko gledano spadamo v zelo podobno okolje), tako zahteva popolnoma drugačne pogoje za rast kot tisti iz Indonezije. Kot smo ugotovili pozneje, vplivajo ti tudi na vsebnost učinkovin v rastlini.

2. HIPOTEZA: potrdimo

Tudi drugo hipotezo, da lahko iz rastline pripravimo vse pripravke (čaj, hidrolat in tinkturo), lahko potrdimo. Sušenje listov, cvetov in stebelc je bilo zelo enostavno. Hidrolat in tinkturo smo brez težav pridobili s parno destilacijo v šolskem laboratoriju. Ko je enkrat rastlina vzgojena in obrana, z njeno predelavo ni večjih zapletov.

3. HIPOTEZA: potrdimo

Da se vsebnosti artemisinina v različnih pripravkih razlikujejo, drži. Iz rezultatov spektroskopske analize ugotovimo, da je največja vsebnost artemisinina v vzorcu tinkture iz sladkega pelina, nato v tinkturi navadnega pelina, sledi pa hidrolat. Na to kolikšna je v pripravkih količina iskane snovi, po ugotovitvah vpliva vrsta rastline (sladki pelin vsebuje bistveno več artemisinina kot navadni pelin), pogoji, v katerih je bila vzgojena (večja je koncentracija v pripravkih rastline, ki je rasla v bolj sušnem okolju, zaradi česar je ta bolj aromatična), in čas obiranja listov ter cvetov (največ artemisinina je v pripravkih sladkega pelina obranega septembra). Potrdili smo torej tudi tretjo hipotezo.

4. HIPOTEZA: potrdimo

Na osnovi podatkov iz strokovne literature smo predpostavili četrto hipotezo, da tinktura sladkega pelina vsebuje največ artemisinina. Izmerjena vsebnost artemisinina je bila v tem vzorcu res največja (**3106,21 µg/mL**).

4.3 Predlogi

4.3.1 Predlogi za rešitev oziroma izboljšanje problema

Artemisinin predstavlja velik potencial v farmaciji, kemijski in živilski industriji. Predlagamo, da podjetja in država vlagajo v raziskovanje te snovi ter skupaj razvijajo nove metode njenega raziskovanja in pridobivanja.

4.3.2 Nadaljnje raziskovanje

Predvsem zaradi velikega zdravilnega potenciala sladkega pelina oziroma njegovih pripravkov menimo, da bodo znanstveniki in raziskovalci po svetu zelo kmalu razvozlati in odkrili mehanizem delovanja artemisinina in drugih zdravilnih učinkovin v njem. Ker je tematika najine raziskovalne naloge še precej neraziskana, imava kar nekaj predlogov za nadaljnje raziskovanje. Predlagava:

- meritve s HPLC metodo, primerjanje rezultatov,
- cvetovi/listi/korenine – količina artemisinina,
- meritve tujona v vzorcih,
- količinsko razmerje med vsebnostjo artemisinina in tujona,
- poskusi zdravljenja (nekaj jih je že bilo, številni po svetu že/še potekajo).

Dobro bi bilo opraviti še dodatne meritve z metodo HPLC in dobljene rezultate, za večjo zanesljivost, primerjati z našimi. Metoda je sicer precej draga, vendar zelo natančna. Prepričani smo, da bi s primerjavo uporabe različnih analiznih metod prišli do pomembnih zaključkov in odgovorov.

Zanimivo bi bilo ugotoviti, kakšna je razlika v vsebnosti artemisinina v različnih delih rastline sladkega pelina. Pripravili bi lahko nove pripravke iz listov, cvetov, korenin in stebelc ter ponovili kvantitativno metodo določanja.

Zelo smiselno bi bilo določiti še vsebnost tujona v naših vzorcih. Ta je namreč eden izmed redkih spremljevalcev artemisinina v rastlinah pelina, ki ima negativne učinke na človeško telo. Dobljene rezultate bi lahko z analizo primerjali s količinami artemisinina v posameznih

pripravkih in morda ugotovili, kakšno je količinsko razmerje med vsebnostjo tujona in artemisinina v vzorcih sladkega pelina.

Če bi izmerili vsebnosti tujona, bi lahko izračunali, v kolikšnih količinah je uživanje pripravkov sladkega pelina (in s tem tudi artemisinina) za človeka priporočljivo/zdravilno oziroma škodljivo.

Vsekakor pa je pomembno, da se artemisinin tudi farmacevtsko in medicinsko preizkusi ter potrdi ali ovrže kot priznano zdravilo, predvsem za zdravljenje rakavih obolenj.

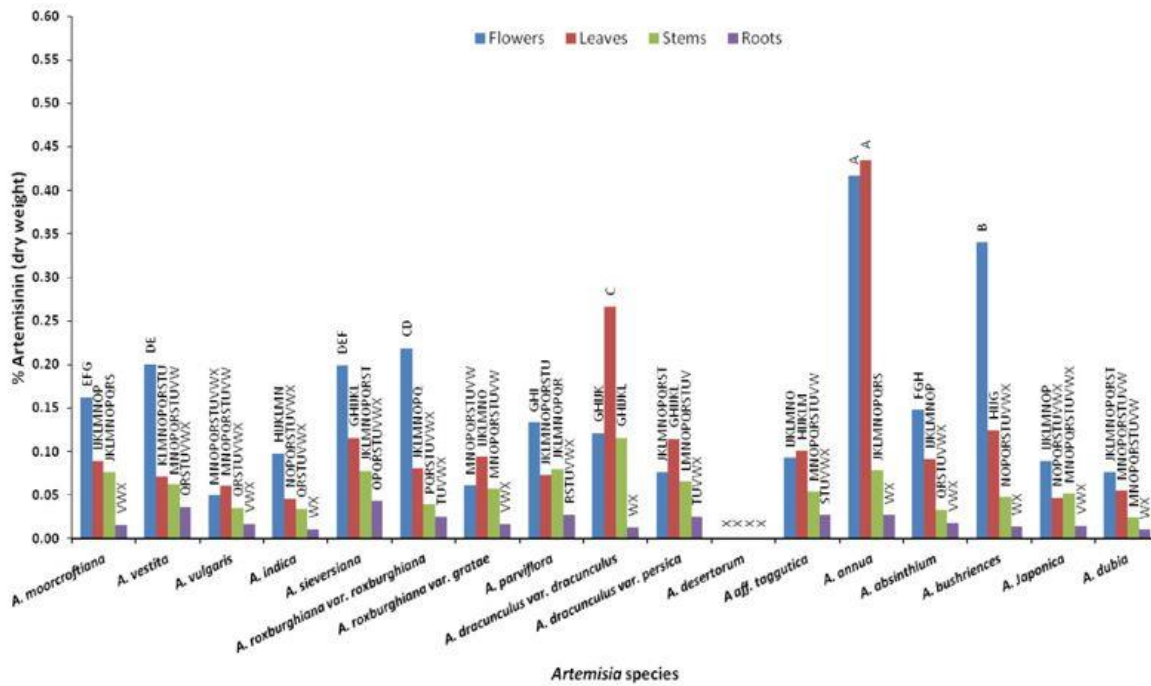
5 ZAKLJUČEK IN RAZPRAVA

V raziskovalni nalogi smo ugotavljali vsebnost artemisinina v različnih pripravkih sladkega pelina. Za raziskovanje nas je navdušil članek o sladkem pelinu in njegovem zdravilnem učinkovanju. Takoj, ko smo začeli z iskanjem informacij v virih in literaturi, smo ugotovili, da je glavna zdravilna učinkovina rastline artemisinin (od tod tudi latinsko poimenovanje *Artemisia annua L.*). Tako smo se odločili, da bomo v naši raziskovalni nalogi ugotavljali in določali vsebnost artemisinina v različnih pripravkih (hidrolat, tinktura) sladkega pelina.

Najprej smo želeli rastlino sami posejati in vzgojiti. Ko nam je to uspelo, smo želeli iz nje pripraviti hidrolat, tinkturo in čaj. Ti pripravki so pozneje postali naši vzorci, v katerih smo ugotavljali vsebnost zdravilne učinkovine artemisinina.

Ko smo zbrali in predelali literaturo, smo se ukvarjali z iskanjem kvantitativne analizne metode za določanje artemisinina, ki bi nam podala dejansko vsebnost preiskovane učinkovine v vzorcih. Ker nismo našli ustanove, ki bi nam lahko omogočila izvajanje meritev z metodo HPLC, smo morali poiskati novo pot. Za nasvet smo se obrnili na strokovnjake, ki so nam priporočali uporabo metode UV-VIS spektroskopije. Raziskavo smo izpeljali na Biotehniški fakulteti v Ljubljani, na katedri za botaniko.

Z dobljenimi rezultati smo zadovoljni, saj smo z njimi uspeli doseči na začetku zastavljene cilje. Ugotovili smo, da sta tako vzgoja sladkega pelina kot tudi njegova predelava v različne pripravke zelo preprosta. Meritve s spektroskopsko metodo UV-VIS so pokazale, da je vsebnost artemisinina v različnih pripravkih sladkega pelina različna. Ugotovili smo, da je največ artemisinina v tinkturi, ki je izdelana iz sveže cvetoče rastline, obrane septembra, v etanolu. Sklepamo, da je torej vsebnost preučevane učinkovine odvisna od vrste rastline, kontinenta, na katerem jo vzgojimo, količine prejete sončne svetlobe v času cvetenja itd. V članku iz *Malaria Journal* (2008), z naslovom *Survey of artemisinin production by diverse Artemisia species in northern Pakistan* [8], smo našli podatke o tem, kako zelo se, glede na prej omenjene dejavnike, spreminja vsebnost artemisinina v njegovih pripravkih.



Graf 3: Vsebnost artemisinina v različnih delih rastlin pelinov [9]

Literatura [9] navaja, da je koncentracija artemisinina v listih sladkega pelina okoli 0.44 ± 0.03 %. To je bil tudi razlog za neuspešne meritve prvih vzorcev, saj ti niso bili dovolj koncentrirani, da bi lahko metoda vrednosti zaznala. Količino preparata smo tako povečali iz 1 mL na 5 mL in pripravili nove raztopine vzorcev, ki so bile torej 5-krat bolj koncentrirane. Končno smo dobili rezultate, s katerimi smo bili zadovoljni. Z uporabljenno metodo smo prišli do orientacijskih vrednosti. Za določitev natančnih koncentracij artemisinina bi bilo potrebno določiti ustrezno merilno območje, v katerem je metoda najbolj občutljiva in sposobna identificirati preiskovano učinkovino.

6 VIRI IN LITERATURA

1. Abba, M. L., Patil, N., Leupold, J. H., Saeed, M. E. M., Efferth, T., Allgayer, H. 2018. Prevention of carcinogenesis and metastasis by Artemisinin-type drugs. *Cancer Letters*, 429: 11–18.
2. Efferth, T. 2018. Beyond malaria: The inhibition of artemisinin-type compounds. *Biotechnology Advances*, 36: 1730–1737.
3. Efferth, T. 2017. From ancient herb to modern drug: Artemisia annua and artemisinin for cancer therapy, 46: 65–83.
4. Letis, A. S., Seo, E., Nikolaropoulos, S. S., Efferth, T., Giannis, A., Foustieris M. A. 2017. Synthesis and cytotoxic activity of new artemisinin hybrid molecules against human leukemia cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25: 3357–3367.
5. Lewis, M. Kemija: Shematski pregledi. Ljubljana, TZS, 1997, 7.
6. Li, X., Gu, S., Sun, D., Dai, H., Chen, H., Zhang Z. 2018. The selectivity of artemisinin-based drugs on human lung normal and cancer cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 57: 86–94.
7. Luan, S., Zhong, H., Zhao, X., Yang, J., Jing, Y., Liu, D., Zhao, L. 2017. Synthesis, anticancer evaluation and pharmacokinetic study of novel 10-O-phenyl ethers of dihydroartemisinin, 141: 584–595.
8. Magoulas, G. E., Tsigkou, T., Skondra, L., Lamprou, M., Tsoukala, P., Kokkinogouli, V., Pantazaka, E., Papaioannou, D., Athanassopoulos, C. M., Papadimitiriou, E. 2017. Synthesis of novel artemisinin dimers with polyamine linkers and evaluation of their potential as anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25: 3756–3767.
9. Mannan, A., Ahmed, I., Arshad, W., Asim, M. F., Qureshi, R. A., Hussain, I., Mirza, B. 2010. Survey of artemisinin production by diverse Artemisia species in northern Pakistan. *Malaria Journal*, 9: 310.
10. Sreevidya, T. V., Narayana, B. 2008. Spectrophotometric determination of artemisinin and dihydroartemisinin. *Indian Journal of Chemical Technology*, 59–62.
11. Toplak, Galle K. Zdravilne rastline na Slovenskem, Ljubljana, Mladinska knjiga, 2002, 60–70.
12. Wang, S., Sasaki, T. 2013. Synthesis of artemisinin dimers using the Ugi reaction and their in vitro efficacy on breast cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23: 4424–4427.
13. Zhang, Y., Xu, G., Zhang, S., Wang, D., Prabha, P.S., Zuo, Z. 2018. Antitumor Research on Artemisinin and Its Bioactive Derivatives. *Natural Products and Bioprospecting*, 8: 303–319.
14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3106422/> (datum dostopa: 28. 2. 2019).
15. Saupe, J. Naravni Zdravniki: Zdravje iz zdravilnih rastlin. Ljubljana: Slovenska knjiga, 1996. ISBN 961-210-008-X.
16. <https://en.wikipedia.org/wiki/Artemisinin> (datum dostopa: 3. 3. 2019).

17. https://en.wikipedia.org/wiki/Artemisia_annua (datum dostopa: 3. 3. 2019).
18. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/db/Artemisia_annua.jpg/220px-Artemisia_annua.jpeg (datum dostopa: 10. 3. 2019).
19. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fd/Artemisia_annua_West_Virginia.jpg (datum dostopa: 10. 3. 2019).
20. [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/58/Artemisinin_3D_balls_2.png/800px Artemisinin_3D_balls_2.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/58/Artemisinin_3D_balls_2.png/800px_Artemisinin_3D_balls_2.png) (datum dostopa: 10. 3. 2019).
21. https://ibsen.com/wp-content/uploads/HPLC-illustration_T.png (datum dostopa: 10. 3. 2019).
22. <http://www.bolha.com/rastline/zunanje-rastline/sadike-semena/semena-sladki-pelin-zdravilo-pri-rakovih-obolenjih-1331305530.html> (datum dostopa: 10. 3. 2019).
23. <http://www.proteus.si/wp-content/uploads/2015/10/proteus-maj-2016-za-net.pdf> (datum dostopa: 10. 3. 2019).
24. <http://www.ognjic-logatec.si/zelisaron269a/sladki-pelin> (datum dostopa 20. 2. 2018).

7 PRILOGA

Tabela 3: Izvirne meritve absorbanca in koncentracij artemisinina v vzorcih na spektrometru

Vzorec	Koncentracija	Absorbanca	
H1	1333,699	0,591	
H2	2452,284	0,631	
NP1	1331,973	0,591	
NP2	2986,772	0,65	
SP1	5310,652	0,732	
SP2	1865,167	0,61	
SP1a	5295,985	0,731	
NP2a	2678,331	0,639	
NP2b	2785,746	0,642	
SP2b	1739,202	0,605	
H1a	1459,664	0,596	
H1b	1299,188	0,59	
H2a	1500,214	0,597	
H2b	1381,583	0,593	
SP1Z	10108,535	0,901	
NP1a	1333,267	0,591	
NP1b	907,489	0,576	
SP1b	5323,594	0,732	
SP2(7)	-8077,864	0,258	odstopanje
SP2(7)a	-8110,65	0,257	odstopanje
SP1(z)	-2047,51	0,472	odstopanje
SP1(z)a	-2060,452	0,471	odstopanje
H5	1468,723	0,596	
H5a	1133,967	0,584	
H5b	1218,518	0,587	
NP5	8372,203	0,84	
NP5a	8449,853	0,843	
NP5b	-19840,916	-0,158	odstopanje
NP5c	-19758,089	-0,155	odstopanje
Np5d	8517,581	0,845	
SP5	12647,677	0,991	
SP5a	13592,845	1,025	
SPb	13710,613	1,029	
SP5(2)	40369,015	1,972	