

Miličević, B.<sup>1</sup>, Babić, J.<sup>2\*</sup>, Šubarić, D.<sup>2</sup>, Đurđica Ačkar<sup>2</sup>, Miličević, R.<sup>3</sup>,  
Petošić, E.<sup>1</sup>, Jozinović, A.<sup>2</sup>

znanstveni rad

## Kemijski sastav eteričnih ulja biljke *Artemisia vulgaris* dobivenih različitim tehnikama ekstrakcije

### Sažetak

Pelin *Artemisia absinthium* L., aromatična je biljka koja pripada porodici Asteraceae. Eterično ulje pelina sadrži široki spektar bioaktivnih kemijskih spojeva koji imaju široku primjenu u prehrambenoj, kemijskoj industriji, medicini i drugdje. Od 19. stoljeća kontroverzna rasprava vodi se oko karakteristika komponenta eteričnih ulja biljke pelina *Artemisia absinthium* L., *Artemisia vulgaris* L., *Salvia officinalis* i drugih, koji se obično koriste u procesu proizvodnje alkoholnih pića. Tako je ovo istraživanje provedeno da bi se identificirao kemijski sastav eteričnih ulja pomoću plinske kromatografije dobivenih različitim tehnikama ekstrakcije (tekuće-tekuće, hidrodestilacije, superkritične ekstrakcije te pomoću mikrovalova) iz biljke pelin *Artemisia vulgaris* L. Identificirano je ukupno 40 različitih komponenti u eteričnom ulju pelina. Osim toga, rezultati su pokazali da je udio neprihvatljive razine nekih tvari, kao što su  $\alpha$ -thujone i  $\beta$ -thujone, bio manji u uzorcima koji su dobiveni postupkom mikrovalne ekstrakcije, a njihov sadržaj je iznosio 9,86% (w/w), odnosno 11,28% (w/w).

**Ključne riječi:** *Artemisia absinthium*, eterično ulje, ekstrakcija

### Uvod

Pelin *Artemisia absinthium* je aromatična biljka koja pripada porodici Asteraceae i uglavnom raste u područjima mediteranskih zemalja (Wright, 2002.). Eterično ulje pelina sadrži različite bioaktivne kemijske spojeve koji imaju široku primjenu u prehrambenoj, kemijskoj industriji, medicini i drugdje. Najznačajnija je njihova primjena u prehrambenoj industriji gdje se koriste kao sredstva za poboljšanje okusa i mirisa prehrambenih proizvoda te u kemijskoj industriji gdje se koriste kao baze za polu-sinteze vrlo složenih molekula.

Komponente eteričnog ulja pelina *A. absinthium* imaju različita bioaktivna svojstva te se koriste kao: antibakterijsko, antifungalno te antiparazitsko sredstvo, sredstvo za uništenje/odbijanje različitih kukaca, narkotik, digestiv i dr. (Kaul i sur., 1978.; Balz, 1996.; Lawless, 1999.; Wolf, 1999.). Eterična ulja pelina imaju izrazito gorak okus zbog prisutnosti artabsina (sesquiterpen laktona) i absintina (dimer sesquiterpen laktona) (Wright, 2002.).

Sastav eteričnih ulja *A. absinthium* nije stalan i ovisi o više čimbenika (Tateo i Riva, 1991.; Maffei i sur., 1994.; Scalia i sur., 1999.; Cornu i sur., 2001.; Alvarez i Pascual, 2003.): geografskom položaju, klimatskim uvjetima, obradi zemljišta, pH tla, obradi biljke nakon branja te metodi ekstrakcije.

Cilj je ovog istraživanja identifikacija kemijskog sastava eteričnih ulja dobivenih različitim postupcima ekstrakcije iz biljke pelin *Artemisia vulgaris* L.

### Materijal i metode istraživanja

Svaki set uzoraka eteričnih ulja iz biljke pelin *Artemisia absinthium* (porijeklom iz Hrvatske) proizveden je pomoću uređaja „Destila“ GmbH, Nördlingen. Eterična ulja korištena su za proizvodnju gorkog likera „Barun“ u prehrambenoj industriji „Zvečevo“ d.d. Požega u razdoblju od 2009. do 2010. godine.

### Priprema uzoraka za analizu plinskom kromatografijom (GC)

Uzorak 1 pripremljen je ekstrakcijom tekuće-tekuće s 1,1,2-triklor-1,2,2-trifluoretanom prema metodi koju su opisali Rapp i sur. (1994.).

Za pripremu uzorka 2 ekstrakt eteričnog ulja dobiven je postupkom hidrodestilacije opisanog u *European Pharmacopoeia* (Council of Europe 2005.), pri čemu se koristi 50 g uzorka i 500 mL destilirane vode kao destilacijske tekućine, a ksilen (0,5 mL) se dodaje kako bi se izdvojilo eterično ulje.

Uzorak 3 pripremljen je postupkom superkritične ekstrakcije (SFE). SFE za biljke je napravljen prema rasporedu koji su dali Reis-Vasco i sur. (1999.), a sam eksperimentalni postupak opisali su Xu i sur. (2009.).

Uzorak 4 pripremljen je ekstrakcijom pomoću mikrovalova, prema metodi koju su opisali Kaufmann i Christen (2002.).

### Analize plinskom kromatografijom (GC)

Analiza ekstrakta eteričnih ulja plinskom kromatografijom izvedena je na uređaju Chrom-5 kromatografu s FID na dvije spojene silicijske kapilarne kolone (50 m x 0,20 mm) s dvije stacionarne faze: nepolarna poli-dimetilsiloksan (NB-30, Nordion, Finska) i polarna polietilen glikol (NB-20M, Nordion, Finska). Debljina sloja obje stacionarne faze bila je 0,25  $\mu$ m. Plin nositelj je helij u razrijeđenom obliku 1:150, uz primijenjenu brzinu protoka 20-25 cm/s. Temperaturni je program bio od 50 do 250 °C uz 2 °C/min, a temperatura injektora bila je 200 °C. Identifikacija komponenti eteričnih ulja postignuta je usporedbom njihovog indeksa zadržavanja (RI) na dvije kolone s referentnim vrijednostima indeksa zadržavanja (RI) (analitičke čistoće iz „Merck“, Darmstadt, Njemačka), naše baze RI podataka.

1 Borislav Miličević, Emil Petošić, Zvečevo dd, Kralja Zvonimira 1, Požega

2 Jurislav Babić, Drago Šubarić, Đurđica Ačkar, Antun Jozinović, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, F. Kuhača 18, Osijek

3 Radoslav Miličević, Visoka škola za sigurnost Zagreb, I. Lučića Zagreb

Postotak sastojaka eteričnog ulja izračunat je iz područja pika (nepolarna kolona) primjenom metode normalizacije bez upotrebe faktora korekcije. Relativna standardna devijacija postotka sastojaka u eteričnom ulju tri ponavljanja GC analize jednog ulja ne prelazi 5%.

### Rezultati i rasparava

Tablica 1. Sadržaj glavnih sastojaka (iznad 2%) eteričnog ulja pelina (*Artemisia vulgaris* L., %) dobivenih različitim postupcima ekstrakcije

Table 1 Content of the major components (more than 2%) of essential oil of the common wormwood (*Artemisia vulgaris* L., %) produced with different extraction techniques

Rb. Nr.	Sastojak Component	% (w/w) u eteričnom ulju % (w/w) in essential oil			
		1	2	3	4
1.	<i>α</i> -thujene	2,80	3,03	3,06	3,00
2.	<i>α</i> -thujone	10,36	10,54	10,20	9,86
3.	<i>β</i> -thujone	14,10	14,63	13,89	11,28
4.	sabinene	3,28	3,08	2,08	2,21
5.	<i>β</i> -myrcene	2,36	2,86	2,88	2,16
6.	<i>cis</i> -6,7-epoxyocimene	7,23	6,93	7,03	6,28
7.	1,8-cineole	0,98	1,08	0,88	0,66
8.	camphor	13,2	11,2	9,29	9,42
9.	artemisia ketone	5,36	5,06	4,89	4,32
10.	<i>α</i> -terpineol	4,22	5,02	4,33	3,92
11.	linalool	5,03	5,08	4,95	4,83
12.	terpinene-4-ol	5,21	5,23	5,20	5,03
13.	thujyl acetate	2,23	2,28	2,23	2,22

Sve su analize provedene u tri paralele, a srednje su vrijednosti korištene u prikazu rezultata

Složeni sastav eteričnog ulja iz pelina (*Artemisia vulgaris*) koje je izolirano različitim postupcima ekstrakcije prikazan je u tablicama 1. i 2., iz kojih je vidljivo da je identificirano ukupno 40 različitih spojeva. Osim toga, postoje značajne kvantitativne i kvalitativne razlike među uzorcima. Glavne komponente, čiji sadržaj u uljima prelazi i 5%, su *α*-thujone (9,86–10,36%), *β*-thujone (11,28–14,10%), sabinene (2,21–3,28%), *cis*-6,7-epoxyocimene (6,28–7,23%), camphor (9,42–13,20%), artemisia ketone (4,32–5,36%), *α*-terpineol (3,92–5,02), linalool (4,83–5,08%) i terpinene-4-ol (5,03–5,23%), što je u skladu s rezultatima drugih istraživanja (Nin i sur., 1995.; Blagojević i sur., 2006.).

Tablica 2. Sadržaj ostalih komponenti (sadržaj niži od 2%) eteričnog ulja pelina (*Artemisia vulgaris* L., %) dobivenih različitim postupcima ekstrakcije

Table 2 Content of the other components (less than 2%) of essential oil of the common wormwood (*Artemisia vulgaris* L., %) produced with different extraction techniques

Rb. Nr.	Sastojak Component	% (w/w) u eteričnom ulju % (w/w) in essential oil			
		1	2	3	4
14.	<i>α</i> -pinene	1,60	1,58	1,63	1,50
15.	<i>β</i> -pinene	1,89	1,80	1,99	1,69
16.	camphene	0,62	0,52	0,68	0,72
17.	<i>α</i> -phellandrene	0,09	0,19	0,29	0,07
18.	verbenone	0,07	0,09	n.i.	n.i.
19.	<i>β</i> -caryophyllene	1,36	1,56	1,26	1,32
20.	chamazulene	2,26	1,16	1,85	1,20
21.	<i>γ</i> -elemene	0,06	0,09	0,09	n.i.
22.	humulene	0,17	0,10	0,15	0,11
23.	<i>trans</i> -6,7-epoxyocimene	1,12	1,22	1,32	1,08
24.	<i>trans</i> -chrysanthenol	0,79	0,70	0,73	0,69
25.	lyratol	0,99	1,00	0,97	0,69
26.	<i>trans</i> -verbenol	1,14	1,10	1,08	1,04
27.	isoborneol	1,23	1,13	1,28	1,11
28.	borneol	1,06	1,06	1,06	1,06
29.	bicyclo[2.2.1]hept-2-en-7-ol	0,36	0,37	0,38	0,33
30.	isobornyl 2-methylbutyrate	0,95	0,85	0,97	0,99
31.	<i>cis</i> -chrysanthenyl acetate	0,27	0,32	0,31	0,09
32.	sabinyl acetate	n.i.	0,11	0,10	0,08
33.	nuciferol butanoate	n.i.	0,09	0,08	n.i.
34.	nuciferol propanoate	0,11	0,12	0,13	0,15
35.	neryl propanoate	0,16	0,13	0,19	0,17
36.	caryophyllene oxide	0,28	0,29	0,29	0,20
37.	2-heptadecanone	0,22	0,26	0,25	0,19
38.	hexadecanoic acid	0,58	0,59	0,47	0,39
39.	<i>trans</i> -isoelemicin	0,36	0,35	0,37	0,33
40.	neryl 3-methylbutanoate	0,41	0,43	0,35	0,26

Sve su analize provedene u tri paralele, a srednje su vrijednosti korištene u prikazu rezultata; n.i. – nije identificiran

Chiasson i sur. (2001.) također su objavili da je *β*-thujone sastojak s najvišim udjelom u eteričnom ulju pelina, dok su Carnat i sur. (1992.) objavili da je *cis*-chrysanthenol glavni sastojak eteričnog ulja biljaka koje rastu u Francuskoj, u Kubi bornil acetat (Pino i sur.,

1997.). Sabinil acetat prevladava u biljkama u nekim drugim zemljama (Arino i sur., 1999.; Wright, 2002.).

U eteričnom ulju izoliranom postupkom hidrodestilacije (uzorak 2) utvrđeno je da je relativni sadržaj određenih pojedinačnih sastojaka bio veći nego u uzorcima 1 koji su izolirani ekstrakcijom tekuće-tekuće. To bi povećanje moglo biti povezano s utjecajem temperature i vlažnosti tijekom procesa izolacije. Slični rezultati mogu se naći i u drugim istraživanjima (Arino i sur. 1999.; Mucciarely i sur., 1995.; Khalilov i sur. 2001.).

Različiti od ostalih uzoraka, ekstrakti eteričnih ulja izolirani superkritičnom ekstrakcijom (SFE) imali su najveći sadržaj terpenoidnih spojeva. U tom konkretnom slučaju moguće je vidjeti sličnost s procesom koji su opisali Pourmortazavi i Hajimirsadeghi (2005.) te Zougagh i sur. (2004.).

Rezultati također pokazuju da ne postoji značajnija razlika u sadržaju neprihvatljivih sastojaka:  $\alpha$ -tujone (9,86-10,36%) i  $\beta$ -tujone u uzorcima (11,28-14,10%) (tablica 1), što je u skladu s rezultatima drugih istraživanja (Emmert i sur. 2004.; Miličević i sur. 2011.; Fröhlich i Shibamoto 1990.).  $\alpha$ -tujoni i  $\beta$ -tujoni u većim količinama mogu biti toksični (Wolf, 1999.) te kod učestalog konzumiranja uzrokovati senilnost (Wright, 2002.).

U ovom istraživanju, jedina je značajna razlika u sastavu eteričnih ulja zabilježena kada su uzorci pripremljeni upotrebom ekstrakcije mikrovalovima. Rezultati analize tog ekstrakta ulja pokazuju niži sadržaj prisutnih sastojaka. Navedeno bi sniženje moglo biti rezultat kemijske transformacije prisutnih spojeva. Vjerojatno je rezultat svih tih transformacija povezan sa sušenjem uzorka do kojeg dolazi prilikom tretiranja mikrovalovima (Chang, 2000.; Chemat i sur., 2004.).

U tablici 2. prikazani su „ostali“ sastojci eteričnog ulja pelina koji čine udio niži od 2%, a ukupno ih ima 26.

### Zaključak

Na osnovi rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da postoji značajna razlika u kemijskom sastavu eteričnih ulja dobivenih različitim tehnikama ekstrakcije.

Postupak ekstrakcije mikrovalovima rezultirao je najmanjim sadržajem neprihvatljivih sastojaka kao što su  $\alpha$ -tujone i  $\beta$ -tujone u eteričnom ulju.

Prema rezultatima ovog istraživanja postupak ekstrakcije mikrovalovima mogao bi biti prihvatljiv tehnološki postupak u proizvodnom procesu proizvodnje alkoholnih pića i gorkih likera, pri čemu bi se na taj način smanjila razina neprihvatljivih sastojaka iz eteričnih ulja biljke pelina *Artemisia vulgaris* na prihvatljivu razinu, bez promjene izvornog recepta proizvodnje.

### Literatura

- Alvarez-Castellanos, P.P., Pascual-Villalobos, M. J.** (2003.): Effect of fertilizer on yield and composition of flowerhead essential oil of *Chrysanthemum coronarium* (Asteraceae) cultivated in Spain. *Ind. Crop. Prod.*, (17 (2)) 77-81.
- Arino, A., Arberas, I., Renobales, G.; Dominguez, J. B.** (1999.): Influence of extraction method and storage conditions on the volatile oil of wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Eur. Food Res. Technol.*, (209) 126-129.
- Balz, R.** (1996.): The healing power of essential oils. Lotus Light, SAD.
- Blagojević, P., Radulović, N., Palić, R., Stojanović, G.** (2006.): Chemical Composition of the Essential Oils of Serbian Wild-Growing *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*, *J. Agric. Food Chem.* (54), 4780-4789.
- Carnat, A. P., Madesclaire, M., Chavignon, O., Lamaison, J. L.** (1992.): Cis-Chrysentenol, a main component in the essential oil of *Artemisia absinthium* growing in Auvergne (Massiv Central) France. *J. Essent. Oil Res.*, 4: 487-490.
- Chang, V. C. T.** (2000.): *Understanding microwave heating cavities* 1st edition, London:Artech House Publishers.
- Chemat, F., M. E. Lucchesi and J. Smadja** (2004.): An original solvent free microwave extraction of essential oils from spices *Flavour and Fragrance Journal*, (2): 134–138.
- Chiasson, H., Belanger, A., Bostanian, N., Vincent, C., Poliquin, A.** (2001.): Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* (100): 352-356.
- Cornu, A., Carnat, A. P., Martin, B., Coulon, J. P., Lamaison, J. L., Berdague, J. L.** (2001.): Solid-Phase micro-extraction of volatile components from natural grassland plants. *J. Agric. Food. Chem.*, 49 (1): 203-109.
- Council of Europe, *European Pharmacopoeia*. (2005.) 5th ed. Vol. 2. Strasbourg, pp 2710–2711.
- Emmert, J., Sartor, G., Sporer, F., Gummersbach, J.** (2004.): Determination of  $\alpha$ - $\beta$ -tujone and related terpenes in absinthe using solid phase extraction and gas chromatography, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* (100) 352–356.
- Fröhlich, O., Shibamoto, T.** (1990.): Stability of pulegone and thujone in ethanolic solution, *J. Agric. Food Chem.* (38) 2057–2060.
- Kaufmann, B. and P. Christen** (2002.): Recent extraction techniques for natural products: microwave assisted extraction and pressurized solvent extraction. *Phytochemical analysis* 13:105-113.
- Kaul, V. K., Nigam, S. S., Banerjee, A. K.** (1978.): Insecticidal activity of some essential oils. *Indian J. Pharm.*, 40 (1): 22-26.
- Khalilov, L. M., Paramonov, E. A., Khalilova, A. Z., Odinkov, V. N., Muldashev, A. A., Baltaev, U. A., Dzhemilev, U. M.** (2001.): Identification and biological activity of volatile organic compounds emitted by plants and insects. Composition of vapor isolated from certain species of *Artemisia* plants. *Chem. Nat. Compd.* 37 (4), 339-342.
- Lawless, L.** (1999): *The illustrated Encyclopedia of essential oils*, Imago, Singapore.
- Maffei, M., Mucciarelli, M., Scannerini, S.** (1994.): Essential oils from *Achillea* species of different geographic origin. *Biochem. Syst. Ecol.*, 22 (7): 679-687.

ZVEČEVO  
1921





Miličević, B., Lukić, I., Šubarić, D., Babić, J., Miličević, R., Jašić, M. (2011.): Stability of  $\alpha$ -thujone and  $\beta$ -thujone in bitter liqueur "Pelinkovac". *Technologica acta.* (4) 1; 27-32.

Mucciarely, M., Caramiello, R., Maffei, M. (1995.): Essential oils from some *Artemisia* species growing spontaneously in northwest Italy. *Flavour Fragrance J.* (10) 25-32.

Nin, S., Afraioli, P., Bosetto, M. (1995.): Quantitative determination of some essential oil components of selected *Artemisia absinthium* plants. *J. Essent. Oil Res.* (7), 271-277.

Pino, J. A., Rosado, A., Fuentes, V. (1997.): Chemical composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* from Cuba. *J. Essent. Oil Res.*, 9 (1): 87-89.

Pourmortazavi S. M., Hajmirsadeghi S. S. (2005.): Supercritical fluid extraction of volatile components from *Bunium persicum* Boiss. (black cummin) and *Mespilus germanica* L. (medlar) seeds. *Journal of food composition and analysis* (18) 439 – 446.

Rapp, A., Hastrich, H., Yavas, I., Ullemeyer, H. (1994.): Zureinrichten, schnellen Anreicherung ("Kaltronmethode") und quantitativen Bestimmung von flüchtigen Inhaltsstoffen aus Spirituosen: Bestimmung von Thujon, Safrol, Isosafrol,  $\alpha$ -Asaron, Pulegon und Cumarin. *Branntweinwirtschaft* (134) 286–289.

Reis-Vasco, E.M.C., Coelho, J.A.P., Palavra, A.M.F. (1999.): Comparison of pennyroyal oils obtained by supercritical CO<sub>2</sub> extraction and hydrodistillation, *Flavour and Fragrance Journal* (14) 156–160.

Scalia, S., Giuffreda, L., Pallado, P. (1999.): Analytical and preparative supercritical fluid extraction of chamomile flowers and its comparison with conventional methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 21 (3): 549-558.

Tateo, F., Riva, G. (1991.): Influence of the drying process on the quality of essential oils in *Artemisia absinthium*. *Mitt. Gebiete Levensm. Hyg.*, 82: 607-614.

Wright, C. W. (2002.): *Artemisia*. Taylor and Francis Inc., New York.

Wolf, A. (1999.): Essential oil poisoning. *J. Toxicol.*, 37 (6): 721-727.

Xu Y., Marron, M. T., Seddon, E., McLaughlin S. P., Ray D.T., Whitesell, L., Gunatilaka A. A. (2009.): 2,3-Dihydrowithaferin A-3(beta)-O-sulfate, a new potential prodrug of withaferin A from aeroponically grown *Withania somnifera*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (17) 2210–2214.

Zougagh, M., Valcárcel, M., Ríos A. (2004.): Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness. *TrAC* (23) 399-405.

### Chemical composition of essential oils of wormwood plant *Artemisia Vulgaris* produced by different extraction techniques

#### Summary

Essential oils are composed of a wide range of bioactive chemical compounds. Their traditional application was for flavor and fragrances. Today, essential oils are sought-after for innumerable applications starting from food industries all the way to chemical industries where they are used as a base for semi-synthesis of highly complex molecules. The extraction of highly delicate essential oils from plants remains a crucial step in all these applications.

Since the 19th century, a controversial discussion has been going on about characteristic components of the essential oils of the wormwood plant *Artemisia absinthium* L., *Artemisia vulgaris* L., *Salvia officinalis* and other which are commonly used in the production process of alcoholic beverages.

Therefore, this research has been conducted in order to identify the chemical composition of the essential oils produced with different extraction techniques from *Artemisia vulgaris* L.

The results have shown that the portion of unacceptable level of some substances such as  $\alpha$ -thujone and  $\beta$ -thujone was the lowest in samples that were produced by microwave assisted extraction techniques and it was 9.86% (w/w) and 11.28% (w/w).

**Keywords:** *Artemisia absinthium*, essential oil, extraction



# Agromedjimurje d.d.

**Ratarska proizvodnja**

2 500 ha obradivih površina

**Stočarska proizvodnja**

20 000 tovljenika prasadi i 6 000 tovljenika junadi godišnje

**Voćarska proizvodnja**

6000 tona konzumne jabuke

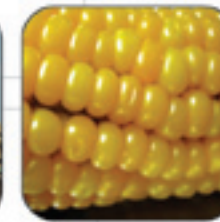
**Vinogradarska proizvodnja**

142 ha vinograda

**Uslužni pogon**

sušara, mješaona stočne hrane, hladnjača

*tradicija i kvaliteta*



[www.agromedjimurje.hr](http://www.agromedjimurje.hr)

40 000 Čakovec, Ruđera Boškovića 10

tel. 040 390 825, fax 040 390 824

e-mail: [agromedjimurje@ck.htnet.hr](mailto:agromedjimurje@ck.htnet.hr)