

Određivanje sastava eteričnog ulja nekih vrsta roda *Artemisia L.* plinskom kromatografijom

Petrović, Vesna

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:355101>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Vesna Petrović

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Vesna Petrović

**ODREĐIVANJE SASTAVA ETERIČNOG ULJA
NEKIH VRSTA RODA *Artemisia* L. PLINSKOM
KROMATOGRAFIJOM**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi ispitnog povjerenstva: Prof. dr. sc. Sandra Babić

V. pred. dr. sc. Lidija Furač

Dr. sc. Marinko Petrović

Zagreb, rujan 2015.

*Ovaj rad izrađen je u Centru za kontrolu namirnica, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu, akademske godine 2014./2015.*

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Sandri Babić na pomoći i razumijevanju koje mi je pružila pri izradi ovog rada. Također se zahvaljujem dr. sc. Marinku Petroviću i dr. sc. Dariu Kremeru te svima koji su na bilo koji način pomogli u izradi rada.

Hvala mojoj obitelji, prijateljima i Toniju. Vi ste mi davali vjeru i nadu kada mi je bilo potrebno. Hvala na strpljenju, podršci, razumijevanju i što ste bili uz mene kroz cijelo vrijeme studiranja.

Sažetak

Šest uzoraka eteričnog ulja vršnih dijelova pelina ubranih u Hrvatskoj (*A. alba*, *A. annua* (dva uzorka), *A. maritima*, *A. verlotiorum* i *A. vulgaris*) izolirano je destilacijom vodenom parom. Dobiven je različit sadržaj eteričnog ulja u uzorcima (0,4-0,9 mL/kg). Kemijski sastav dobivenih eteričnih ulja analiziran je plinskom kromatografijom vezanom sa spektrometrijom masa (GC-MS). Identificirano je 87 komponenata, a dobivene su velike razlike među uzorcima u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu. Čak i dva uzorka *A. annua* ubrana na različitim lokacijama znatno se razlikuju po sastavu. Eterično ulje *A. annua* ubrano u Zagrebu sadrži visoki postotak artemizia ketona (46,0%), artemizia alkohol (1,3%), kamfor (18,7%) i β -selinen (8,8%). Eterično ulje *A. annua* ubrano u području srednjeg Velebita sadrži puno kamfora (31,5%), β -selinena (24,6%) i najveći postotak seskviterpena (30,7%), ali sadrži malo artemizia ketona (1,9%) i artemizia alkohol (0,1%). Sastav ulja *A. vulgaris* sličan je sastavu ulju *A. annua* ubrane u području srednjeg Velebita i ima najveći udio monoterpenkih oksida (80,8%), dok ulje *A. verlotiorum* ima najveći udio tujona. Ulje *A. maritima* ima najviše seskviterpenkih oksida (22,4%), dok se ulje *A. alba* najviše kvalitativno razlikuje od ostalih uzoraka. Većina neidentificiranih komponenata pripada seskviterpenskim spojevima s kisikom koje u znatnom udjelu sadrže svi uzorci, a teško ih je identificirati.

Ključne riječi: *Artemisia* vrste, eterično ulje, fitokemija, GC-MS

Determination of essential oil composition of *Artemisia* L. using gas chromatography

Abstract

The essential oils of aerial parts of six *Artemisia* samples growing in Croatia (*A. alba*, *A. annua* (two samples), *A. maritima*, *A. verlotiorum* i *A. vulgaris*) were isolated by hydrodistillation. The oil yield varied between 0.4-0.9 (v/w). Chemical composition of the obtained essential oils were analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). A total of 87 compounds were identified. Large differences between samples were obtained in qualitative and quantitative composition. Even two samples of *A. annua* collected on different locations varied significantly in composition. Oil collected in Zagreb was characterised by high amounts of artemisia ketone (46.0%), artemisia alcohol (1.3%), camphor (18.7%) and β -selinene (8.8%). Oil collected in middle Velebit area contained higher amount of camphor (31.5%) and β -selinene (24.6%) and the highest amount of sesquiterpenes (30.7%) among all analysed samples but contained smaller amount of artemisia ketone (1.9%), artemisia alcohol (0.1%). *A. vulgaris* had similar major compounds as *A. annua* collected middle Velebit area having the highest amount of monoterpene oxides (80.8%) while *A. verlotiorum* had the highest amount of thujones. *A. maritima* had the highest amount of sesquiterpene oxides (22.4%) while *A. alba* showed the highest qualitative difference among samples. The most of unidentified compounds belongs to oxygen containing sesquiterpene compounds which were contained in all analysed samples and which are difficult to identify.

Keywords: *Artemisia* species, essential oil, phytochemistry, GC-MS

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. Pelini.....	2
2.1.1. <i>Artemisia absinthium</i> L.	2
2.1.2. <i>Artemisia annua</i> L.	3
2.1.3. <i>Artemisia vulgaris</i> L.....	4
2.1.4. <i>Artemisia alba</i> L.	5
2.1.5. <i>Artemisia verlotiorum</i> L.	5
2.1.6. <i>Artemisia maritima</i> L.	5
2.2. Eterična ulja	6
2.2.1. Metode uzgoja ljekovitog bilja.....	8
2.2.2. Patvorenja eteričnih ulja.....	8
2.2.2.1. Načini patvorenja eteričnih ulja	10
2.2.3. Dobivanje eteričnog ulja	10
2.2.3.1. Destilacija vodenom parom	11
2.2.3.2. Tiještenje.....	12
2.2.3.3. Drugi načini proizvodnje eteričnih ulja	13
2.2.4. Obrada eteričnih ulja nakon proizvodnje	14
2.2.5. Skladištenje eteričnih ulja	14
2.2.6. Kontrola kvalitete eteričnih ulja	15
2.3. Sastavnice eteričnog ulja	17
2.3.2. Fenilpropani	18
2.3.3. Ostali spojevi.....	18
2.4. Plinska kromatografija.....	19
2.4.1. Dijelovi instrumenta	20
2.4.1.1. Izvor plina nosioca.....	20
2.4.1.2. Injektor.....	20
2.4.1.3. Kromatografska kolona.....	21
2.4.1.4. Detektor	22
2.4.1.5. Uređaj za primanje i pohranu podataka	23
2.4.2. Spektrometar masa.....	23

3. EKSPERIMENTALNI DIO	25
3.1. Materijali	25
3.1.1. Pelini	25
3.1.2. Kemikalije.....	26
3.2. Instrumenti i aparature	26
3.2.1. Uređaj za destilaciju vodenom parom.....	26
3.2.2. Plinski kromatograf.....	27
3.3. Metode rada	28
3.3.1. Destilacija vodenom parom	28
3.3.2. Određivanje glavnih sastavnica eteričnog ulja plinskom kromatografijom vezanom sa spektrometrom masa.	28
3.3.2.1. Uvjeti analize na GC-MS.....	28
3.3.2.2. Kvalitativna analiza	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. Udio eteričnog ulja.....	30
4.2. Sastav eteričnog ulja.....	31
5. ZAKLJUČAK	40
7. ŽIVOTOPIS	43

1. UVOD

Pelini se kao i ostale aromatične biljke često koriste u tradicionalnoj medicini protiv bolesti uzrokovanih mikroorganizmima. Njihovo antifungalno i antibakterijsko djelovanje dokazano je u nekoliko znanstvenih studija. Posebno su se djelotvornima pokazala njihova eterična ulja koja se dobivaju destilacijom vodenom parom. Zbog tih svojstava pelini se uzgajaju kao poljoprivredna kultura u mnogim zemljama, a najviše u Argentini, Bugarskoj, Kini i Indiji. Postoji oko 400 različitih vrsta pelina u svijetu, ali nisu svi jednako potentni, pa se uzgajaju one vrste koje se više koriste u farmaceutskoj, kozmetičkoj i parfemskoj industriji. Zbog toga je potrebno odrediti udio eteričnog ulja u biljci i odrediti njegov sastav.

Cilj ovog rada bio je izolirati eterično ulje iz šest uzoraka pelina ubranih u Hrvatskoj (*A. alba* L., *A. annua* (dva uzorka), *A. maritima* L., *A. verlotiorum* L. i *A. vulgaris* L.). Nakon izolacije eterična ulja su analizirana plinskom kromatografijom vezanom sa spektrometrom masa kako bi se odredile komponente prisutne u uljima, kao i njihova količina, radi određivanja kemotipa dobivenih ulja, odnosno biljaka iz kojih je ulje dobiveno.

2. OPĆI DIO

2.1. Pelini

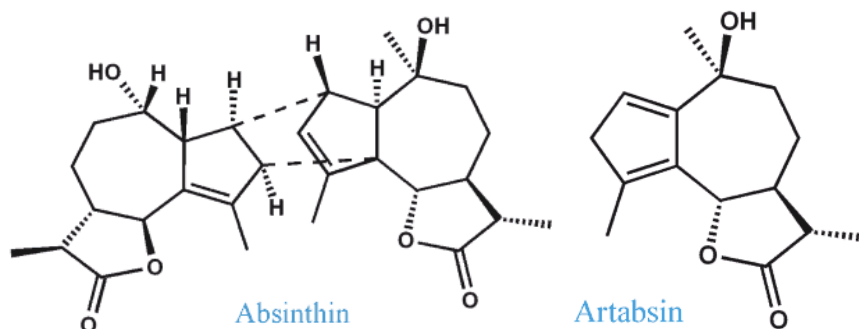
Pelini su aromatične biljke koje se često koriste u tradicionalnoj medicini zbog svojega antimikrobnog djelovanja. Najviše se koriste protiv infekcija respiratornog i probavnog trakta. Koriste se i kao antioksidansi pa se dodaju prehranbenim proizvodima da zaustave ili uspore oksidacijsku degradaciju. Zbog toga se koriste i kod pripreve jela kao začini [1]. Latinski naziv roda, *Artemisia* L., potiče od imena grčke božice Artemide. Pripadaju porodici *Asteraceae* (glavočika), jednoj od najvećih u biljnom svijetu, koja sadrži preko 20000 biljnih vrsta i 800 rodova [2]. Samih pelina ima preko 400 vrsta, a rasprostranjeni su diljem Europe, Azije, Afrike i Sjeverne Amerike. Od njih su najpoznatiji: *Artemisia absinthium* L., *Artemisia annua* L., *Artemisia alba* Turra, *Artemisia dracunculus* L., *Artemisia vulgaris* L. i druge. Eterična ulja koja se dobivaju destilacijom vodenom parom su smjese prirodnih hlapljivih spojeva za koje je dokazano antimikrobno i antifungalno djelovanje [3]. U nekim zemljama je dodavanje biljaka roda *Artemisia* zabranjeno (npr. Belgija) jer sadrže toksične komponente. U drugim zemljama je količina ograničena. Tako, u Sjedinjenim Američkim Državama ograničena je količina tujona u proizvodima, npr. 10 mg/kg u alkoholnim pićima koja sadrže gorki pelin [4]. Uredbom Europske Unije količina tujona u alkoholnim pićima ograničena je na 35 mg/kg.

2.1.1. *Artemisia absinthium* L.

Hrvatski naziv za *Artemisia absinthium* L. je gorki, gorski ili pravi pelin. Višegodišnja je u donjem dijelu drvenasta trajnica ili polugrm, aromatična i jakog mirisa te vrlo gorka okusa, visine 30-100 cm. Raste na suhom i kamenitom tlu, najčešće na zapuštenim obradivim površinama, uz staze i rubove šuma, primorskim područjima, a sadi se i u vinogradima [5]. Kao samonikla biljka rasprostranjena je u sjevernoj Africi i južnoj Europi, Turskoj i srednjoj Aziji. Prenesen je u SAD i Novi Zeland. Stabljika je svilenasto dlakava, uzdužno naborana svijetlom srčikom. Listovi imaju kratku peteljku, dvostruko ili trostruko su perasto razdijeljeni do rascijepljeni, a peraste liske najčešće su tupa vrha. S gornje strane listovi su sivozeleni, s donje sivkasti, a s obje (osobito s donje) svilenasto dlakavi. Cvate tijekom ljeta, od lipnja do kolovoza. Male, poluloptaste žute glavice na kratkim drškama su promjera oko 3 mm, a skupljene su u rastresite i

razgranate metlice. Ovoj je dug 2-3 mm, s duguljastim, zeljastim vanjskim ovojnim listićima, dok su unutarnji listići jajasti, zeljasti, sa širokim suhokožičastim rubom. Os cvata je dlakava, a cvjetovi cjevasti, plodni (rubni ženski, a ostali dvospolni), s golim, žućkastim vjenčićem [6, 7].

Gorki pelin sadrži 0,15-0,4% gorkih seskviterpenskikh laktona od kojih su glavni absintin i artabsin (slika 1), zatim, 0,2-1,5% eteričnog ulja (sastav ovisi o kemotipu), flavonoidnih glikozida, fenolkarbonskih kiselina, kumarina i lignana. Eterično ulje mora se čuvati na hladnom i suhom mjestu, zaštićenom od svjetlosti, u dobro zatvorenoj posudi (ne plastičnoj) [6].



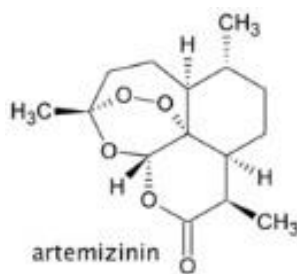
Slika 1. Struktura absintina i artabsina [6]

Gorki pelin pospješuje lučenje želučanog soka i žuči. Rabi se za izradu tinktura i ekstrakata, kao i za dobivanje eteričnog ulja. Eterično ulje stimulira živčani sustav i može se koristiti u liječenju depresije i stresa. Povoljno djeluje u liječenju kroničnog gastritisa, kod bolnih i neredovitih menstruacija, dijabetesa, bolesti crijeva, jetre, bubrega i mjehura. Pelin se rabi i u industriji alkoholnih pića. U nas je poznato piće naziva pelinkovac, dok je u svijetu poznatiji liker absint koji osim gorkog pelina sadrži anis i komorač. U pučkoj medicini se pelinova rakija ili pelinovo vino rabi protiv crijevnih nametnika. Ako je pelin sadržan u većoj koncentraciji ili se napitci uzimaju dulje vrijeme, može doći do neželjenih posljedica, odnosno do teških psihičkih poremećaja [5,6].

2.1.2. *Artemisia annua* L.

Artemisia annua L. jednogodišnja je zeljasta biljka poznata pod nazivom slatki ili mirisni pelin. Liske su pravilno češljasto pilaste ili češljasto rasperane, dok su cvjetovi

žuti. Ima jak, kamilici sličan miris, uspravno razgranate, smeđe stabljike promjera 6 mm [7, 8]. Najpoznatiji ljekoviti derivat je artemizinin prikazan na slici 2. To je spoj iz klase seskviterpenskih cikličkih peroksida koji ima antikancerogeno djelovanje, a krajem prošlog stoljeća artemizinin se uvrstio među najuspješnije lijekove za liječenje *Plasmodiumfalciparum* izazvane malarije. Najveća koncentracija nalazi se u listovima biljke, prije cvjetanja [8].



Slika 2. Struktura artemizinina [8]

Za artemizinin se tvrdi da je iznimno djelotvoran kod širokog spektra karcinoma, posebno kod onih najagresivnijih: leukemije, raka crijeva, pluća i dojke, raka jajnika, tumora na mozgu i karcinoma prostate. No, te tvrdnje smatraju se neutemeljenim jer u znanstvenoj literaturi nije pronađen niti jedan klinički pokus proveden na ljudima u kojem je istražena njegova djelotvornost i sigurnost za bilo koju vrstu karcinoma, raka i tumora. Primjena slatkog pelina tradicionalno se koristi za liječenje tuberkuloze, parazitskih bolesti, gljivičnih i virusnih infekcija, groznice, psorijaze i drugih autoimunih oboljenja [9].

2.1.3. *Artemisia vulgaris* L.

Hrvatski naziv za *Artemisia vulgaris* L. je divlji pelin. Kod nas ga još nazivaju i komonjika ili metljika. Zeljasta je trajnica uspravne i razgranate stabljike sivo zelenkaste boje, a naraste do 150 cm visine. Ima perasto razdijeljene listove, koji su odozgo tamnozeleni i goli, a odozdo bijelo pusteni. Cvjetovi su žućkasti ili crvenkasto-smeđi te tvore grozdaste cvatove. Ovojni listići su sivkasto maljavni. Divlji pelin ima vrlo dlakave listove, čime se bitno razlikuju od gorkog pelina. Izgledom i mirisom djeluje kao gorki pelin, ali je manje gorak od njega [7]. Cvatu od lipnja do rujna, a jedna biljka može dati i do 700000 sjemenki koje kličaju već u jesen. Raste na sunčanim i suhim mjestima, zapuštenim obradivim površinama. Najbolje mu odgovara hranjivo i pjeskovito tlo. Skromnih je zahtjeva i otporan je na sušu i hladnoću.

Divlji pelin ima široku primjenu u prehrambenoj i kemijskoj industriji te medicini. Blagotvorno djeluje na živce, smiruje grčeve, olakšava probavljanje masnoća, pomaže kod žutice i anemije te neredovite menstruacije kod koje je, također, dobro popiti 2-3 puta dnevno po 20-ak kapi rakije od divljeg pelina [10, 11].

2.1.4. *Artemisia alba* L.

Narodni naziv za *Artemisia alba* L. je bijeli ili pustinjski pelin. Raste na suhim površinama koje sadrže nitrata, te na kamenjarima kao višegodišnji grm zeleno-sivih do bijelih listova. Naraste otprilike 40-90 cm, a odlikuje se dobrom otpornošću na sušu, u prvom redu zbog oblika lista i korijena. Rasprostranjen je u pustinjskim područjima Bliskog Istoka i Sjeverne Afrike te u južnim dijelovima Španjolske [12]. Ova biljka se koristi za pripremu aromatičnog čaja koji pomaže kod probavnih problema i protiv dijabetesa.

2.1.5. *Artemisia verlotiorum* L.

Artemisia verlotiorum L. također je mirisni, odnosno aromatični pelin. Zeljasta je, aromatična trajnica visine do oko 2 m. Stabljika je u početku gusto maljava, a kasnije često gotovo gola. Listovi su jednostruko perasto razdijeljeni do rascijepljeni, s gornje strane zeleni i većinom goli, s donje bjelkasto pusti. Cvate od rujna do studenog. Cvjetovi su svi plodni, skupljeni u gotovo sjedeće, uspravne ili malo pognute glavice koje tvore bogati metličasti cvat. Vanjski listići cvatnog ovoja su linearni, paučinasto maljavi.

2.1.6. *Artemisia maritima* L.

Hrvatski naziv za *Artemisia maritima* L. je primorski pelin. Zeljasta je trajnica ili polugrm visine do 60 cm. Donji listovi stabljike su dvostruko do četverostruko perasto rascijepljeni, dok su najgornji cjeloviti ili samo pri osnovici slabije režnjasti. Cvate u rujnu i listopadu. Cvatne glavice su duguljasto jajolike, skupljene u metličaste, katkada gotovo grozdaste cvatove. Vanjski listići ovoja su pusti, eliptični. Najčešće raste uz more. Čaj od lišća ovog pelina se u tradicionalnoj medicini koristi kod problema s probavom, dok se čaj od stabljike koristi kod eritemije [7, 13].

2.2. Eterična ulja

Eterična, esencijalna ulja biljke sadrže u posebnim žlijezdama ili su dio stanice omeđen membranom. Smjese su lako hlapljivih spojeva koji su često biološki aktivni. Dobivaju se iz cvjetova, listova ili plodova biljaka, a rjeđe iz kore ili korijena. Destilacija vodenom parom najčešći je postupak izolacije eteričnih ulja iz biljnog materijala, a osim toga koriste se tiještenje i direktno zagrijavanje biljnog materijala. Eterična ulja imaju poseban status među biljnim ekstraktima, zbog cijene, mirisnih osobina te činjenice da se iz velike količine biljnog materijala dobije tek mala količina eteričnog ulja.

Većina eteričnih ulja slabo je viskozna, posebno slabije od biljnih ulja i vode. Također, većina eteričnih ulja manje je gustoće od vode, stoga plivaju na površini vode te se na taj način izdvajaju kod destilacije vodenom parom. Jedna od glavnih karakteristika eteričnih ulja je hlapljivost koja omogućuje jednostavnu medicinsku primjenu inhalacijom. Slabo su topljiva u vodi, ali se dobro otapaju u biljnim uljima, voskovima, koncentriranom etanolu i sličnim otapalima. Dobra topljivost u biljnim uljima, a laka apsorpcija kroz kožu omogućuje im primjenu u medicinskoj masaži. Komponente eteričnih ulja male su molekulske mase s 10-15 ugljikovih atoma u molekuli [14]. Temperature vrelišta nekih važnijih molekula u eteričnim uljima dane su u tablici 1.

Tablica 1. Temperature vrelišta za neke važnije molekule u eteričnim uljima [15]

Molekula	Grupa	Eterično ulje bogato molekulom	Temperatura vrelišta/°C
etil butanoat	alifatski ester	miris ananasa	
α -pinen	monoterpen	bor	155
1,8-cineol	monoterpenski oksid	eukaliptus globulus	176-177
linalol	monoterpenski alkohol	ružino drvo	198-199
linalil acetat	monoterpenski ester	lavanda	220
geraniol	monoterpenski alkohol	palmarosa	230
timol	monoterpenski	timijan ct. timol	232

	alkohol, aromatski		
karvakrol	monoterpenski alkohol, aromatski	mravinac	237
cinamaldehyd	derivat fenilpropana	kora cimetoanca	248
eugenol	derivat fenilpropana	klinčićevac	254

Sva eterična ulja za primjenu u aromaterapiji moraju biti botanički i kemijski definirana. Botanički definirana znači da mora biti točno označena vrsta, eventualno i podvrsta te dio biljke iz kojega su dobivena, jer botaničke karakteristike imaju veliki utjecaj na kemijski sastav ulja. Kemijsko definirano ulje ima točno definiran udio pojedinih molekula u eteričnom ulju, izražen u postocima, a određen kemijskom analizom plinskom kromatografijom. Također, eterično ulje mora biti pravilno označeno, prema međunarodnim smjernicama.

Eteričnim uljima smiju se nazivati samo oni ekstrakti koji su dobiveni:

1. destilacijom vodenom parom (većina eteričnih ulja)
2. tiještenjem (ulja usplođa citrusa)
3. direktnim zagrijavanjem biljnog materijala bez destilacije vodenom parom (iznimno rijetko, ponekad za ulje kore cimetoanca)

Svi drugi mirisni ekstrakti dobiveni na drugačiji način nazivaju se prema načinu dobivanja, primjerice n-heksanski ekstrakt i ekstrakt dobiven ugljičnim dioksidom pri superkritičnim uvjetima, i ne smiju se nazivati eteričnim uljima. Sintetske smjese ili mješavine sintetskih mirisa s prirodnim eteričnim uljima ne smiju se nazivati eteričnim uljima, već samo mirisima [14].

2.2.1. Metode uzgoja ljekovitog bilja

Za kvalitetu i kemijski sastav eteričnih ulja vrlo je bitan način na koji se biljke uzgajaju i rastu. Na tržištu se mogu naći biljke s ovakvim oznakama uzgoja i rasta:

- Divlji (samonikli) rast. Biljka se potpuno prilagodi okolišu. Ovo je najbolji način rasta biljke, a eterična ulja koja su proizvedena iz ovakvih biljaka iznimno su visoke kvalitete. Biljka proizvede upravo one tvari koje su joj potrebne kako bi funkcionirala u ekosustavu.
- Certificirani biološki divlji rast. Iako je divlji rast, stanište ovakvih biljaka pregledavaju posebne komisije koje daju certifikat da je ono pogodno za branje i da se ne nalazi u blizini zagađenog okoliša.
- Konvencionalni uzgoj. Biljke samo jedne vrste uzgajaju se na određenom zemljištu i rastu uz upotrebu umjetnih gnojiva, pesticida i herbicida. Zbog toga što neki uzgajivači ne poštuju doba između branja i zaprašivanja, ovaj uzgoj je najrizičniji, što pridonosi tome da biljke na sebi i u sebi sadrže opasne insekticide.
- Biološki uzgoj. Poznat kao ekološki uzgoj; također, i kod ovog uzgoja postoje problemi zbog uzgajivača koji uzgajaju biljke na neprikladnoj zemlji. Kao i kod konvencionalnog uzgoja, ovdje se, također, uzgajaju biljke u monokulturama. Prednost je što se ne koriste insekticidi i umjetna gnojiva. Kvalitetu uzgoja ispituje posebna komisija, obraćajući pažnju da je zemljište udaljeno od zagađivača i proizvođača koji koriste umjetna gnojiva, herbicide i insekticide.
- Biodinamički uzgoj. Jedan je od najtežih uzgoja. Biljke se uzgajaju u polikulturama te se oponaša divlji rast. Uzgojem se bave isključivo ljudi, ne koristeći mehanička sredstva. Kvaliteta biljaka je visoka jer nisu zagađene, ali su i pripravci takvih biljaka skupi [2].

2.2.2. Patvorenja eteričnih ulja

Patvorenje eteričnih ulja podrazumijeva da se dio ili cijeli volumen originalnog eteričnog ulja određene vrste zamijeni drugim tvarima prirodnog, polusintetskog ili sintetskog podrijetla, no deklarira se kao originalno eterično ulje. Dakle, eterična ulja koja se patvore nisu prirodna. Više je razloga zbog kojeg se eterična ulja patvore, a patvorenje se može odvijati na dva mjesta; kod proizvođača ili kod distributera. Glavni

razlog je cijena, odnosno novac. Neki od razloga patvorenja su nedostatak sirovine, loša berba, mala proizvodnja, no i velika potražnja određenog eteričnog ulja. Najčešće se patvore skupa ulja te jeftina eterična ulja koja imaju veliku potražnju. U tablici 2. prikazana su najčešće patvorena ulja [2, 16].

Tablica 2. Prikaz najčešće patvorenih ulja [2].

Eterično ulje koje se patvori	Patvori se s(a)...
<i>Rosmarinus officinalis</i> (ružmarin)	uglavnom sintetskim 1,8-cineolom
<i>Melissa officinalis</i> (matičnjak)	jeftinim uljima <i>Cymbopogon</i> vrsta (limun trava i razne citronele), liceom (<i>Litsea cubeba</i>), destiliranim usplođem limuna (<i>Citrus limonum</i>); sintetskim adlehidima
<i>Rosa sp.</i> (ruže)	raznim vrstama geranija (<i>Pelargonium</i> vrste kao <i>P. x asperum</i> s La Reunion-a) i palamarosom (<i>Cymbopogon martinii</i> var. <i>motia</i>). Vrlo često sintetskim mirisima
<i>Lippia citriodora</i> (limunovac)	liceom (<i>Litsea cubeba</i>) i sintetskim mirisima
<i>Santalum album</i> (sandal)	vrstama <i>Cedrus</i> , <i>Juniperus virginiana</i> i najčešće vrstom <i>Amyris balsamifera</i> ; dodavanjem otapala i sintetskim mirisima
<i>Lavandula officinalis</i> (lavanda, ljekovita)	uglavnom lavandinima koji sadrže kamfor te sintetskim linalil acetatom
<i>Citrus bergamia</i> (bergamot)	sintetskim linalil acetatom
<i>Eucalyptus sp.</i> (eukaliptusi)	dodavanjem 1,8-cineola
<i>Pinus sylvestris</i> (bijeli bor)	drugim vrstama roda <i>Pinus</i> koji sadrže bornil-acetat
<i>Gaultheria sp.</i> (zimzeleni)	sintetskim metil-salicilatom
<i>Cinammomum verum</i> (kora i list cimeta)	sintetiskim cinamaldehydom koji je vrlo toksičan. List cimeta inače sadrži vrlo malo cinamaldehyda pa se dodavanjem pojačava toksičnost
<i>Cananga odorata</i> (ylang-ylang)	sintetskim mirisima
<i>Pelargonium sp.</i> (geraniji)	sintetskim mirisima
<i>Menta sp.</i> (metvice)	sintetskim mentolom

2.2.2.1. Načini patvorenja eteričnih ulja

Neka patvorenja eteričnih ulja su gruba, a neka toliko dobro patvorena da i najiskusniji distributeri po mirisu ne prepoznaju patvorinu. Složenost i trud oko patvorenja govori nam o skupoći ulja. Neka ulja su toliko jeftina, poput palmarose, naranče ili citronele, da bi bio skuplji pokušaj patvorenja. Eterična ulja patvore se na sljedeće načine:

1. Patvorenje organskim otapalima i biljnim uljima (jeftin i čest način patvorenja),
2. Dodavanje kemijski obrađenih eteričnih ulja (jeftina eterična ulja acetiliranjem prelaze u estere čime im se poveća volumen, a miris je “mekši” s kojima se patvore ulja bogata esterima),
3. Dodavanje jeftinih u skupa ulja (npr. umjesto prave lavande prodaju se ulja lavandina),
4. Dodavanje izoliranih prirodnih spojeva u eterična ulja (konverzacija kemotipa patvorenjem),
5. Dobivanje sintetskih spojeva identičnim prirodnim tvarima,
6. Dodavanje sintetskih spojeva sličnog mirisa,
7. Kombinacija navedenih načina patvorenja,
8. Prodavanje eteričnih ulja dobivenih iz biljaka iz konvencionalnog uzgoja za ona iz organskog uzgoja [16].

2.2.3. Dobivanje eteričnog ulja

Biljka je kompleksan živi organski sustav koji sadrži stotine tisuća različitih spojeva, neki od tih spojeva prisutni su u velikim količinama u biljci, poput celuloze, dok drugih spojeva ima manje, ispod 0,1% ukupne mase biljke.

Dobivanje eteričnih ulja je izolacija određenih grupa spojeva iz biljke i njihovo koncentriranje.

Glavni načini dobivanja eteričnog ulja su destilacija vodenom parom i tiještenje, dok se direktno zagrijavanje biljnog materijala za dobivanje eteričnog ulja manje koristi [2].

2.2.3.1. Destilacija vodenom parom

Mnoge komponente eteričnih ulja imaju vrelišta između 150-200 °C. Teoretski, sva eterična ulja mogli bismo dobiti zagrijavanjem biljnog materijala na više temperature i njihovom kondenzacijom. Međutim taj proces se rjeđe koristi jer pri visokim temperaturama dolazi do oksidacije molekula što mijenja kemijski sastav ulja koje bi time bilo uništeno. Proces destilacije vodenom parom nam omogućava vrenje komponenta eteričnih ulja pri nižim temperaturama čime se znatno smanjuje oksidacija. Vodena para povećava ukupni tlak u destilacijskom sustavu koji omogućuje da zajedno s njom destiliraju tvari koje imaju vrelište više od 100 °C. Vrijedi pravilo da se uz pomoć vodene pare destiliraju tvari koje:

1. se ne otapaju u vodi,
2. imaju do 15 ili maksimalno 20 ugljikovih atoma,
3. dovoljno su stabilne da izdrže procese zagrijavanja na 100 °C,
4. kemijski ne reagiraju s vodom [2].

Neovisno o tehnološkoj izvedbi destilatora, svaki uređaj za destilaciju ima ove osnovne dijelove:

1. parogenerator - dio za proizvodnju vodene pare,
2. kotao za destilaciju - dio s biljnim materijalom kroz koji prolazi para,
3. kondenzator - dio u kojem se ukapljaju vodena para i eterično ulje hlađenjem,
4. separator - dio u kome se odvajaju eterično ulje i vodeni sloj - hidrolatili cvjetna vodica [2, 15].

Hidrolat je vodena otopina zasićena sastavnicama eteričnog ulja. U njoj se otapaju pretežno hidrofilnije tvari, tako da hidrolat ne sadrži iste omjere sastavnica kao eterično ulje. Bit će više kiselina, nekih alkohola i aldehida, no manje terpena i seskviterpena koji su vrlo hidrofobni [2].

Vodena destilacija je postupak u kojem se vodena para ne proizvodi zasebno, nego se generira u kotlu za destilaciju, tako da biljni materijal kuha, zagrijava do vrenja, u dva do šest puta većoj količini vode. Ako se iznad vode biljni materijal odvoji na mrežicu i ne dolazi u dodir s njom, tada je to vodeno-parna destilacija. Voda ne dotiče biljni materijal, nego vodena para prolazi kroz njega, odnosi čestice eteričnog ulja sa sobom, prolazi kroz

cijev koja je hlađena vodom prilikom čega dolazi do kondenzacije vode i eteričnih ulja. Oni se zajedno skupljaju u posebnu posudu, a s obzirom da se esencijalno ulje ne otapa u vodi, slojevi se odjeljuju, eterična ulja su lakša od vode pa se skupljaju na površini. Najbolji način proizvodnje je da se vodena para generira u posebnom dijelu odvojeno od kotla koji sadrži biljni materijal. To je parna destilacija. Na taj način smanjuje se doticaj vode s biljnim materijalom i hidrolitičko djelovanje vode na pojedine spojeve kao što su esteri (hidrolizom se razlažu na alkohol i kiselinu). Time se postiže bolja kvaliteta i stabilnost ulja. Hlađenje i separacija esencijalnog ulja i hidrolata je identična u oba postupka. Treba paziti na tvrdoću vode, temperaturu vodene pare, vrijeme trajanja destilacije, tlak, izvedbu i oblik kotlova, materijal (inox, bakar), ali i pripremu biljnog materijala. Katkad biljke trebaju ići bez obrade, poput cvijeta lavande koja ima žlijezde na površini pa se eterična ulja lako oslobađaju iz njih, a katkad se biljni materijal mora samljeti kako bi vodena para efikasnija prodrla do žlijezda s eteričnim uljem kao što je slučaj s ružinim drvom ili cimetovcem. Neke se biljke striktno destiliraju svježe, baš kao što je slučaj s lavandom, a neke mogu i u suhom ili polusuhom obliku [2, 15, 17].

Pri destilaciji vodenom parom potrebno je voditi računa o:

- kvaliteti biljnog materijala (količina, svježina, čistoća),
- vrsti vode koja se koristi,
- aparaturi,
- trajanju destilacije, tlaku vodene pare, temperaturi te
- odvajanju i tretiranju eteričnog ulja i hidrolata [2].

Tijekom destilacije može doći do kemijskih reakcija, najčešće su hidroliza i oksidacija. Najzanimljiviji je primjer eteričnog ulja kamilice. Kamazulen, jedan od glavnih sastojaka eteričnog ulja kamilice, nije prisutan u biljci, nego nastaje isključivo tijekom procesa destilacije. Eteričnom ulju daje antialergijsko djelovanje i intenzivnu plavu boju [2, 17].

2.2.3.2. Tiještenje

Proces tiještenja vrlo je jednostavan; u njemu se biljka ili dio biljke buši sitnim iglama ili preša da se oslobodi sadržaj iz žlijezda. Materijal se miješa s vodom, a ulje se odvaja od ostatka biljne mase metodama kao što je centrifugiranje. Taj ekstrakt, eterično ulje, ustvari je nepromijenjen sadržaj žlijezde. Ovakav način dobivanja primjenjuje se za

usplođa plodova roda Citrus, kod kojih se žlijezde nalaze na površini kore. Tako dobiveno eterično ulje sastoji se iz hlapljive i nehlapljive frakcije. Hlapljiva frakcija (dominantna) sadrži spojeve kao što su esteri, monoterpeni i aldehidi, dok nehlapljiva frakcija sadrži flavonoide, neke furanokumarine, masne kiseline, di-, tri-, i tetraterpene kao što je β -karoten [2].

2.2.3.3. Drugi načini proizvodnje eteričnih ulja

Iako se gotovo sva aromatična ulja mogu dobiti destilacijom i tiještenjem, postoje i drugi načini dobivanja eteričnih ulja poput ekstrakcije superkritičnim plinovima i ekstrakcije organskim otapalima [2].

2.2.2.3.1. Ekstrakcija superkrtičnim plinovima

Ekstrakcijom superkritičnim plinovima dobiva se tzv. apsolut. Plin pri visokim tlaku razara tkivo biljke i ekstrahira sastojke, odnosi njihov sadržaj. Padom tlaka, plin evaporira tako da eterično ulje ostaje bez primjesa plina. Najčešći plin koji se koristi je ugljikov dioksid, CO_2 . Nedostatak prilikom korištenja plina CO_2 je što se stvara kiselina u kontaktu CO_2 i vode koja može oštetiti neke sastojke, npr. estere. Nastali apsoluti nazivaju se CO_2 apsoluti. Vrlo su skupi te se primjenjuju jedino u aromaterapiji [2, 6].

2.2.3.3.2. Ekstrakcija organskim otapalima

Otapala se biraju prema polarnosti i temperaturi vrelišta, kao npr. n-heksan, benzen, izopentan, dietil-eter itd. Eterično ulje izolira se izravno iz biljnog materijala. Prvom ekstrakcijom lako hlapljive komponente mogu se izgubiti prilikom otparavanja otapala, a neki spojevi koji ne isparavaju mogu zaostati u ekstraktu. Takva ulja su polučvrste mase pa se nazivaju konkreći. Nastaju prvom ekstrakcijom, npr. n-heksanom. U drugom koraku mirisne tvari iz n-heksana ekstrahiraju u alkohol koji se ukloni destilacijom, dok je mirisna tvar koja zaostaje apsolut. Dobiveni konkreći i apsoluti nisu eterična ulja te se ne primjenjuju u aromaterapiji jer organska otapala onečišćuju konačni produkt. Jedan od glavnih nedostataka je taj što je dobiveni sastav potpuno drugačiji od onog dobivenog prilikom destilacije [2, 6].

2.2.4. Obrada eteričnih ulja nakon proizvodnje

Aromaterapiji pogoduju eterična ulja koja se nakon destilacije nisu posebno preradila, niti su im uklonjene frakcije pojedinih spojeva. Eterična ulja su često znala biti deterpenirana, kako bi se uklonili ugljikovodici, no zbog njihovog doprinosa biološkom djelovanju ne koriste se u aromaterapiji. Razlog uklanjanja ugljikovodika je povećavanje udjela mirisne frakcije, npr. u procesu deterpeniranja eteričnog ulja citrusa dobiva se ulje obogaćeno oksigeniranim spojevima (alkoholi, aldehidi, esteri itd), povećanje udjela aktivne frakcije, npr. kod lavande povećava se udio linalola i linalila acetata, te povećanje stabilnosti ulja zbog sklonosti ugljikovodika da oksidiraju i polimeriziraju. Deterpenizacija se može provesti pranjem alkalnim lužinama (natrijeva lužina) i ekstrakcijom smjesom etanola i vode.

Mnoga eterična ulja sadrže male otopljene količine vode zbog koje dolazi do hidrolize estera i brže oksidacije nekih ugljikovodika. Te malene količine prisutne su zbog neregularnog dekantiranja, odnosno odvajanja eteričnog ulja od hidrolata. Kako bi se uklonila vlaga iz eteričnih ulja, dozvoljeno je da se suše bezvodnim natrijevim sulfatom. No, ne smiju se upotrebljavati sredstva za sušenje poput kalcijevog klorida ili natrijevog hidroksida koja reagiraju s molekulama eteričnog ulja. Natrijev sulfat ne reagira s uljem i ne mijenja njegova kemijska svojstva.

Redestilacija, tj. ponovljen proces destilacije vodenom parom, koristi se kod ponekih eteričnih ulja kako bi se ono obogatilo glavnim aktivnim spojevima.

Vinerizacija je proces pri kojem se eterično ulje (npr. citrusovo ulje dobiveno tiještenjem) tijekom tjedan dana drži na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kako bi došlo do taloženja voskova. Nakon filtracije eteričnog ulja dobije se tiješteno ulje koje sadrži niži udio suhog ostatka nakon uparivanja što sprječava nastanak taloga tijekom skladištenja eteričnih ulja. Vinerizacija je dozvoljena u aromaterapiji, no samo za eterična ulja dobivena tiještenjem, jer se u uljima dobivenim destilacijom ne nalaze voskovi [15].

2.2.5. Skladištenje eteričnih ulja

Skladištenje eteričnih ulja vrlo je bitno za njihovu kvalitetu. Eterična ulja moraju se čuvati u posudama od nehrđajućeg čelika, aluminijske ili posudama presvučenim inertnim polimerima, koji ne reagiraju s molekulama eteričnog ulja. Poželjna temperatura

skladištenja je 15-20 °C, dok se čuvanje na temperaturama nižim od 10 °C ne preferiraju. Na nižim temperaturama, ako posuda nije do kraja napunjena, može doći do kondenzacije vode unutar spremnika i kontaminacije eteričnih ulja vodom. O ovim uvjetima treba voditi računa i kod distributera, proizvođača, ali i u kućnoj uporabi.

Zaštita od kisika vrlo je bitna jer kisik prisutan u zraku, spontano oksidira eterična ulja (bogata ugljikovodicima). Ona povećavaju mogućnost nastanka alergijskih reakcija te su iritirajući za sluznicu i kožu. Stoga je potrebno eterična ulja napuniti do kraja posude kako bi prisutnost kisika bila manja .

Problem predstavlja prelijevanje određene količine eteričnog ulja u manje bočice. Ako ulje potrošimo do pola, npr. eterično ulje od 100 mL potrošimo do pola, tada se preostala količina prebaci u bočicu od 50 mL. Da se spriječi oksidiranje, zrak kojim je ispunjena bočica potrebno je zamijeniti inertnom atmosferom (ugljkov dioksid, argon, dušik) tako da se u tank s eteričnim uljem stavi mala količina suhog leda (kristaliziranog CO₂). Pošto je ugljikov dioksid teži od zraka prekrije eterično ulje zaštitnim inertnim slojem te ispari istiskujući zrak [15].

2.2.6. Kontrola kvalitete eteričnih ulja

Ulja aromaterapijeske kvalitete moraju proći kontrolu kvalitete kako bi dobila certifikat koji jamči njihovu zdravstvenu ispravnost i prisutnost farmakološki aktivnih komponenata. Takav certifikat trebao bi sadržavati slijedeće podatke:

1. Točan latinski naziv biljke, s precizno navedenim imenom vrste i podvrstom ako je ima,
2. Biljni organ, dio biljke ili biljni produkt iz kojeg se dobilo eterično ulje (list, korijen, kora, usplode, drvo, cvijet, nadzemni dio biljke ili cijela bilja),
3. Način dobivanja (destilacija vodenom parom, tiještenje),
4. Vrsta uzgoja (organski uzgoj, konvencionalna kultura, biološki uzgoj, biodinamički uzgoj, samonikli rast, certificirani biološki samonikli rast),
5. Kemijski sastav eteričnog ulja: prisutnost karakterističnih spojeva koji definiraju kvalitetu ulja. Kemijski sastav pojedinog ulja može biti propisan npr. u europskoj farmakopeji ili propisima francuske agencije za normizaciju (AFNOR),
6. Geografsko podrijetlo, odnosno zemlja podrijetla,

7. Neke fizikalne karakteristike (npr. broj kapi u mililitru koji ovisi o viskoznosti ulja, boja, indeksi loma svjetlosti, zakretanje polarizirane svjetlosti...) [2].

Bez tih oznaka ne možemo govoriti o kvalitetnom ulju. S obzirom da većina eteričnih ulja dolazi iz zemalja Europske unije, laboratoriji koji rade analize moraju imati poseban certifikat kvalitete rada, kao što je GLP certifikat ili eventualno certifikat neke europske ovlaštene regulatorne agencije. Tek tada možemo prihvatiti vrijednosti tih analiza. Mnoga ulja na tržištu ne ispunjavaju ovakvu strogu kontrolu i ne smiju se primjenjivati u aromaterapiji. Takva ulja mogu biti:

1. razrijeđena organskim otapalima i masnim (baznim) uljima,
2. patvorena sintetskim kemijskim spojevima,
3. patvorena manje vrijedim eteričnim uljima,
4. onečišćena prevelikom količinom pesticida ili herbicida,
5. deterpenizirana,
6. frakcionirana,
7. lošeg kemijskog sastava zbog neprikladnih uvjeta proizvodnje,
8. oksidirana ili na neki drugi način kemijski modificirana zbog skladištenja.

Najosjetljivija eterična ulja su ona bogata terpenima, kao što su ulja iz porodice Pinaceae i Rutaceae. Nepravilnim skladištenjem u prevelikim bocama, s lošim čepovima i na povišenoj temperaturi nastaju oksidi i peroksidi terpena koji smanjuju aktivnost eteričnih ulja i mogu im povećati toksičnost. Držanjem na svjetlu i u prozirnim bočicama, neki spojevi kao ftalidi mogu posve promijeniti konfiguraciju i postati neaktivni.

U kontroli kvalitete eteričnih ulja koriste se razne analitične tehnike, poput:

1. tankoslojne kromatografije (TLC),
2. plinske kromatografije (GC),
3. refrakcija i polarizacija te
4. nuklearno-magnetska rezonancija (NMR) [2].

2.3. Sastavnice eteričnog ulja

Eterična ulja su smjese velikog broja spojeva različitih kemijskih struktura. Poznato je više od 500 sastavnica eteričnih ulja, a u pojedinim uljima njihov broj može biti veći i od 100. Međutim, uvijek je samo nekoliko sastavnica prisutno u većoj količini, tako da one određuju organoleptičke, fizikalne i kemijske osobine te farmakološki učinak eteričnih ulja, odnosno glavna obilježja. Koncentracija glavne sastavnice je u rasponu od 20-95%, sporedne 1-20% dok je koncentracija sastavnica u tragovima manja od 1% [6].

U širokom smislu kemotip označava različitost kemijskog sastava biljaka iste vrste u izdvojenim zajednicama, koji ne možemo objasniti pripadnošću drugačijim podvrstama, varijetetima i formama. Sastavnice pripadaju različitim skupinama organskih spojeva, a prema skeletu ugljikovodika dijele se na terpene, fenilpropane i ostale spojeve [6, 18].

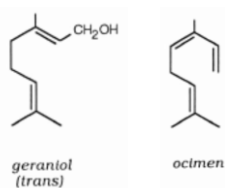
Na sastav eteričnog ulja utječe više faktora i nemoguće je svake godine dobiti ulje potpuno identičnog sastava, iako je s iste plantaže i iz genetski identičnih biljaka. Stoga su postavljene norme, koje govore o rasponu pojedinih glavnih spojeva u određenom eteričnom ulju. Rasponi, odnosno udjeli komponenata u eteričnim uljima dovoljno su veliki da poštuju varijacije ovisno o mjestu rasta, godišnjim uvjetima rasta i drugim faktorima koji definiraju kemijski sastav [18].

2.3.1. Terpeni

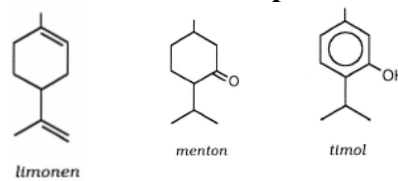
Najveći broj sastavnica eteričnih ulja su terpeni kojima pripadaju prirodni spojevi čiji se građevni princip zasniva na molekuli izoprena (2-metil-butadiena; C_5H_8). Prema broju ugljikovih atoma mogu se svrstati u sedam skupina: semiterpeni (C_5), monoterpeni (C_{10}), seskviterpeni (C_{15}), diterpeni (C_{20}), triterpeni (C_{30}), tetraterpeni (C_{40}) i politerpeni. Semiterpen je 3-izopentenil-pirofosfat ("aktivni izopren"), iz kojeg se formiraju svi terpenski spojevi prema tzv. izoprenskom pravilu.

U eteričnim uljima prisutni su monoterpeni, seskviterpeni, diterpeni i triterpeni. Monoterpeni (C_{10}) su derivati 2,6-dimetiloktana, odnosno geraniola. Poznato je oko 150 različitih monoterpenskih sastavnica koje mogu biti aciklični, mono- i biciklični spojevi. Najveću skupinu unutar terpena čine seskviterpeni (C_{15}) kao derivati 2,6,10-trimetil-n-dodekana, odnosno farnezola. Diterpene (C_{20}) i triterpene (C_{30}) nalazimo u eteričnim uljima dobivenim ekstrakcijom organskim otapalima (slika 3).

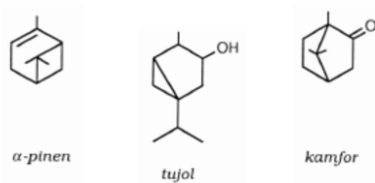
aciklični monoterpeni



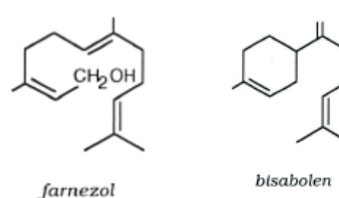
monociklični monoterpeni



biciklični monoterpeni



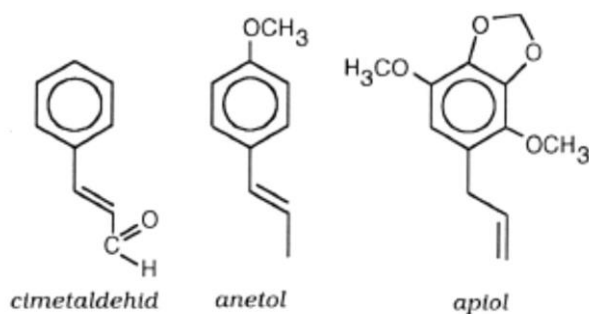
seskviterpeni



Slika 3. Primjeri seskviterpena i acikličkih, monocikličkih i bicikličkih monoterpena

2.3.2. Fenilpropani

Fenilpropanski derivati prirodni su spojevi C_6-C_3 strukture ugljikovodika. Mogu biti aldehidi, fenoli i fenileteri koji se odvođe od cimetine kiseline (slika 4).



Slika 4. Prikaz nekih fenilpropanskih derivata

2.3.3. Ostali spojevi

U sastavu eteričnih ulja pojavljuju se također acetogenini, lančani ugljikovodici i njihovi derivati s kisikom te spojevi s dušikom i sumporom: sulfidi, derivati antranilne kiseline, indol, acetilenski derivati. Ovi spojevi se rjeđe pojavljuju u sastavu eteričnih ulja i uglavnom su karakteristični za pojedine biljne vrste.

U tablici 3 dan je prikaz sastavnica eteričnih ulja i njihovih kemotipova.

Tablica 3. Prikaz sastavnica eteričnih ulja i njihovih kemotipova [19]

Sastavnice eteričnih ulja	kemotipovi
Aciklički monoterpeni	mircen, cimen
Aciklički monoterpenski alkoholi	linalol, nerol, citronelol, geraniol
Monociklički monoterpeni	kamfen, karen, limonen, pinen, felandren, sabinen, terpinen, terpinolen
Monociklički monoterpenski alkoholi	alkohol, pulegol, terpineol, karveol, mentol, neomentol, perilil
Biciklički monoterpenski alkoholi	borneol, mirtenol, sabinol
Fenol i alkohol	timol, karvakrol, anetol, eugenol
Ketoni	menton, piperiton, karvon, pulegon, tujon, jasmon, fenkon
Aldehidi, oksidi, peroksidi	citral (geraniol, neral), citronelal, kuminal, safranol, askaridol, eukaliptol (cineol)
Biciklički monoterpeni	pinen, tujen, kamfen
Monoterpenski ketoni – monociklički	menton, piperiton, pulegon
Monotropenski ketoni – biciklički	kamfor, fenhon, santenon, tujon, verbenon
Seskviterpeni	nerolidol, bisabolen, zingiberen, kurkumen, kadinen, kariofilen, kumulen, santalan, selinan (biciklički)
Seskviterpenski alkoholi – alifatski	farnesol, nerolidol
Seskviterpenski alkoholi – biciklički	kadinol, santalol
Seskviterpenski ketoni	jonon, iron
Diterpeni	kamforen, kamazulen
Fenilpropanski derivati	anetol, metilkavikol, eugenol, apiol, bergapten, cimetni aldehid

2.4. Plinska kromatografija

Kromatografija je fizikalna metoda separacije u kojoj se sastojci razdjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, stacionarna, dok se druga, pokretna, odnosno mobilna, giba u određenom smjeru [20]. Kromatografski sustav čini uz to i ispitivane

tvari, analizirani uzorak, koji je tijekom kromatografskog procesa u dinamičkoj ravnoteži između pokretne i nepokretne faze. Pokretna faza kod plinske kromatografije je inertni plin (npr. helij, dušik ili vodik), a kod tekućinske kromatografije i kromatografije na tankom sloju može biti bilo koje otapalo ili smjesa otapala, kao što su metanol ili voda. Tvar se jače ili slabije veže za nepokretnu fazu. Ako se veže slabo, onda je pokretna faza brzo odnosi. Ako se veže jako, onda je odnosi polako ili uopće ne odnosi. Smisao kromatografije u analitici je dokazivanje čistoće neke tvari i utvrđivanje spojeva u smjesi neke tvari kao što je eterično ulje [21,22].

Plinska kromatografija je kromatografska separacijska tehnika za kvalitativno i kvantitativno određivanje komponenata analiziranog uzoraka u kojoj se kao pokretna faza koristi plin pa je po tome dobila i ime [21]. Nepokretna faza je selektivna tekućina velike viskoznosti ili selektivna krutina. Obzirom da je pokretna faza plin, pri analizi komponente smjese se moraju prevesti u plinsku fazu [22]. Teško hlapljive tvari se kemijskim reakcijama (npr. esterifikacijom, siliranjem i slično) mogu prevesti u oblik pogodan za analizu plinskom kromatografijom [2, 21].

Plinska kromatografija je najčešće primjenjivana i najefikasnija tehnika analize eteričnih ulja. Jedan od glavnih uvjeta da bi se plinskom kromatografijom tvar mogla analizirati je njena hlapljivost, tj. da na određenoj temperaturi prijeđe u plinovito stanje. S obzirom da su spojevi u eteričnim uljima hlapljivi, plinska kromatografija idealan je način analize takve smjese [2].

2.4.1. Dijelovi instrumenta

2.4.1.1. Izvor plina nosioca

Najčešće se upotrebljavaju helij ili dušik, a može se koristiti i vodik uz nužne mjere opreza. Kao izvor plina nosioca koriste se boce s plinom odgovarajuće kvalitete. Kvaliteta odnosno čistoća plina nosioca može značajno utjecati na kvalitetu analize te je potrebno koristiti plinove čistoće $\geq 99,999\%$. Regulator tlaka na boci s plinom nosiocem namjesti se tako da je ulazni tlak u instrument do 6 bara [21].

2.4.1.2. Injektor

Injektor je dio plinskog kromatografa koji se nalazi na početku kromatografa, a služi za isparavanje analiziranog uzorka i njegovo miješanje s plinom nosiocem koji nosi

komponente na kolonu. Termostatiran je na temperaturu određenu metodom analize, koja je najmanje 20 °C viša od temperature vrelišta najmanje hlapljive komponente smjese. Nakon što se uzorak unese kromatografskom iglom u injektor, dolazi do isparavanja te miješanja s plinom nosiocem koji “tjera” molekule uzorka duž kolone [20]. Što se tvar slabije veže za stacionarnu fazu, to je plin brže iznese s kolone. Ukoliko uzorak sadrži nehlapljive komponente, one zaostaju u cjevčici injektora. Injektori za rada s kapilarnim kolonama su opremljeni uređajem za djelomično unošenje uzorka pri čemu se samo dio uzorka nanese na kromatografsku kolonu. Injektor može biti opremljen i uređajem za elektronsku kontrolu protoka plina nosioca što omogućava rad pri uvjetima konstantnog protoka [20, 21, 22].

2.4.1.3. Kromatografska kolona

Kromatografska kolona je dugačka staklena ili metalna cijev različitih dimenzija kojoj je na stjenci ili na ispuni od krutog nosača nanesen sloj nepokretne faze. Komponente smjese nošene plinom nosiocem se razdvajaju na osnovi njihove različite topljivosti u tekućoj nepokretnoj fazi, različitoj adsorpciji na krutoj nepokretnoj fazi ili na razlici u veličini molekula [20, 21].

Kromatografska kolona smještena je u termostatiranom prostoru jer razdvajanje komponenta smjese, odnosno afinitet komponenta prema nepokretnoj fazi ovisi o temperaturi. Razdvajanje može biti bez promjene temperature tokom analize (izotermno) ili uz programiranu promjenu temperature tokom analize (programirano).

Na razdvajanje komponenta također utječe polarnost nepokretne faze, dimenzije kolone i protok plina nosioca. Nepokretne faze mogu biti polietilenglikolnog tipa, koje su sve polarne, ili silanolnog tipa čija polarnost ovisi o polarnosti skupina vezanih na silanolni lanac. Ako su na silanolni lanac vezane samo metilne skupine kolona je nepolarna.

Kapilarne kolone imaju unutrašnji promjer od 0,10 mm do 0,53 mm, dužinu 5-60 m i više te debljinu sloja nepokretne faze 0,1-5 µm. Punjene kolone imaju unutrašnji promjer 2-4 mm dužinu 1-3 m uz različit postotak nanasene nepokretne faze u odnosu na kruti nosač (1-15%).

Optimalne brzine protoka helija korištenog kao plin nosilac za različite unutrašnje promjere kolona dane su u tablici 4 [21].

Tablica 4. Optimalne brzine protoka helija za različite unutrašnje promjere kolona

Tip kolone	Unutrašnji promjer kolone (mm)	Optimalna brzina protoka (He) (mL/min)
Kapilarne	0,25	1
	0,32	2
	0,53	4
Punjene	2	15
	4	60

2.4.1.4. Detektor

Detektor je uređaj koji na temelju nekog fizikalnog ili kemijskog svojstva tvari bilježi njenu prisutnost u plinu nositelju. Komponente smjese nakon odjeljivanja na koloni plin nosilac nosi na detektor, koji daje signal za svaku komponentu ovisno o masi ili koncentraciji komponente [20]. Tvari kemijski sličnih svojstava daju jednaku površinu pikova za istu masu ili koncentraciju, tj. jednak odgovor detektora. Ako je odgovor detektora različit površina se korigira množenjem s faktorom odziva za pojedinu komponentu [20, 21].

Vrijeme potrebno da komponenta prođe kroz kromatografski sustav do detektora zove se vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme [2]. Svaka tvar u eteričnom ulju ima svoje vrijeme zadržavanja i u jednoj analizi moguće je vidjeti nekoliko desetaka sastojaka eteričnog ulja i odrediti njihov postotak. Vrijeme zadržavanja karakterističan je parametar za svaku komponentu, pod određenim kromatografskim uvjetima i osnovni je parametar za kvalitativnu i kvantitativnu analizu [2, 20, 21].

2.4.1.5. Uređaj za primanje i pohranu podataka

Impulsi detektora prenose se preko pojačala na računalo koji nam daje kromatogram. Površina pika određuje se integriranjem površine ispod pika pomoću računala i odgovarajućeg računalnog programa. Dobiveni podaci mogu služiti za kvalitativnu i kvantitativnu analizu sastava smjese.

Kvalitativna i kvantitativna analiza bilo kojom kromatografskom tehnikom osniva se na usporedbi uzorka sa smjesom standarada. Metoda normalizacije podataka osniva se na sumiranju ukupne površine svih komponenata iz smjese ta određivanju postotka površine pojedine komponente uzevši u obzir odgovor detektora za pojedinu komponentu. Ova metoda se najviše koristi za analizu eteričnih ulja jer nije jednostavno napraviti smjesu pojedinačnih komponenata za svako eterično ulje [20,21].

Metoda vanjskog standarda je najčešće korištena metoda u kromatografiji, a zasniva se na usporedbi površine komponente u uzorku i površine komponente u jednoj ili više smjesa poznate koncentracije iz kojih se može konstruirati umjerni pravac. Princip metode unutarnjeg standarda je isti kao i kod metode vanjskog standarda, s time da se u uzorak i standard dodaje komponenta koju uzorak ne sadrži. Ta nam komponenta služi za kompenzaciju eventualnih pogrešaka u pripravi uzoraka i analizi, a za računanje se koristi omjer površina analizirane komponente i komponente koja je dodana kao unutarnji standard [21].

2.4.2. Spektrometar masa

Spektrometar masa koristi se kao detektor u plinskoj i tekućinskoj kromatografiji. Komponente nakon razdvajanja na koloni ulaze u ionizator koji je u visokom vakuumu. Molekule uzorka se bombardiraju elektronima pri čemu nastaju ioni koji se ubrzavaju u magnetskom dijelu instrumenta. Pri prolasku kroz magnetsko polje ioni dobivaju otklon razmjeran njihovoj brzini, masi i naboju. Veličina otklona obrnuto je proporcionalna masi fragmenta. Ioni zatim ulaze u detektor gdje dobivaju signal i potom se određuju putem spektrometra masa. On nam pokazuje omjer mase i naboja s obzirom na relativni intezitet pojedinog fragmenta, odnosno udio iona. Prednost ovog detektora je u tome da osim površine pikova dobivamo i spektar masa u svakoj točki kromatograma koji nam može poslužiti za kvalitativnu analizu uzorka.

Spektrometrija masa je izrazito korisna kada u uzorku nađemo pojedine molekule za koje nemamo standarde, kada analiziramo nepoznati uzorak kojem ne znamo sastav (kvalitativna analiza) [2]. Korisna je kod određivanja strukture molekula promatrajući fragmentaciju molekula, određivanje molarne mase, te određivanje fizikalnih i kemijskih svojstava tvari, određivanje izotopnog sastava uzorka [21].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Pelini

U ovom radu korišteno je 6 uzoraka pelina a lokacije branja su prikazane u tablici 5.

Tablica 5. Popis lokacija branja uzoraka

UZORAK	VRSTA	LOKACIJA
UZ1	<i>Artemisia annua</i>	Farmaceutski botanički vrt "Fran Kušan" Farmaceutsko- biokemijskog fakulteta u Zagrebu
UZ2	<i>Artemisia vulgaris</i>	Mala Kapela
UZ3	<i>Artemisia alba</i>	Sjeverni Velebit
UZ4	<i>Artemisia annua</i>	Srednji Velebit
UZ5	<i>Artemisia verlotiorum</i>	Farmaceutski botanički vrt "Fran Kušan" Farmaceutsko- biokemijskog fakulteta u Zagrebu
UZ6	<i>Artemisia maritima</i>	Farmaceutski botanički vrt "Fran Kušan" Farmaceutsko- biokemijskog fakulteta u Zagrebu

Uzorci su brani tijekom rujna 2014. godine i to gornji dijelovi biljke: stabljika, list i cvijet. Nakon branja sušeni su na zraku, zaštićeni od direktnog utjecaja sunčevih zraka. Nakon 15-20 dana sušenja uzorci su usitnjeni i čuvani na suhom i hladnom mjestu do analize. Identifikaciju biljaka napravio je dr. sc. Dario Kremer, voditelj – upravitelj Farmaceutskog botaničkog vrta "Fran Kušan" Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.2. Kemikalije

Sve korištene kemikalije su p.a. čistoće. Popis korištenih kemikalija nalazi se u tablici 6.

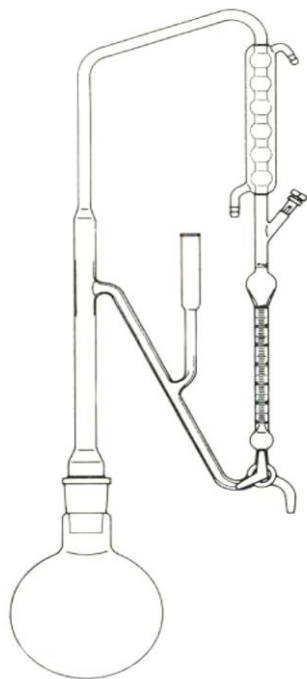
Tablica 6. Popis korištenih kemikalija

NAZIV	MOLEKULSKA FORMULA	PROIZVOĐAČ	ČISTOĆA
Dietil eter	$C_2H_5OC_2H_5$	Sigma- Aldrich, Njemačka	p.a.
Natijev sulfat, bezvodni	Na_2SO_4	Kemika, Hrvatska	p.a.

3.2. Instrumenti i aparature

3.2.1. Uređaj za destilaciju vodenom parom

Eterična ulja izolirana su aparaturom za destilaciju vodenom parom tipa Clevenger koji je u skladu sa zahtjevima Europske farmakopeje [23]. Shema aparature dana je na slici 5.



Slika 5. Shema aparature za destilaciju vodenom parom

3.2.2. Plinski kromatograf

Izolirana eterična ulja analizirana su na plinskom kromatografu Ultra GC (Thermo Scientific, Palo Alto, SAD) vezanim sa spektrometrom masa DSQ II (Thermo Scientific, Palo Alto, SAD) prikazanom na slici 6.



Slika 6. Plinski kromatograf Ultra GC vezan sa spektrometrom masa DSQ II

3.3. Metode rada

3.3.1. Destilacija vodenom parom

Izolacija eteričnih ulja na aparaturi prikazanoj na slici 5. rađena je tako da je u tikvicu s okruglim dnom volumena 1000 mL odvagano 50 g usitnjenog biljnog materijala, dodano 500 mL vode te kamenčići za vrenje. Sadržaj u tikvici zagrijan je do vrenja plinskim plamenikom i lagano je vrio 3 sata uz povremeno prelijevanje vodenog destilata natrag u tikvicu. Nakon što se aparatura ohladila pomoću pipca na aparaturi doveden je nivo ulja u graduirani dio aparature i očitana količina ulja. Nakon toga pažljivo je ispušten vodeni destilat, a dobiveno eterično ulje skupljeno je u posudicu. Tragovi vode su uklonjeni dodatkom bezvodnog natrijevog sulfata i čuvani u zamrzivaču do analize.

3.3.2. Određivanje glavnih sastavnica eteričnog ulja plinskom kromatografijom vezanom sa spektrometrom masa.

3.3.2.1. Uvjeti analize na GC-MS

Plinski kromatograf Ultra GC vezan sa spektrometrom masa DSQ II opremljen je s uređajem za djelomično unošenje uzorka (engl. *split injector*). Obzirom na veliki udio analiziranih komponenata u uzorcima eteričnih ulja omjer razdjeljenja (engl. *split ratio*) je 50:1, a temperatura injektora je bila 260 °C. Injektiran je 1 µL razrijeđenog uzorka (10 µL u 1 mL dietil etera). Uzorci su analizirani na kapilarnoj koloni ZB-5ms (Phenomenex, Torrance, SAD) duljine 30 m i unutarnjeg promjera 0,25 mm. Nepokretna faza sastojala se od 5% fenil silikona i 95% metil silikona, a debljina sloja nepokretne faze bila je 0,25 µm. Tijekom analize korišten je sljedeći temperaturni program kolone: početna temperatura je bila 60 °C/1 min, nakon toga se temperatura podizala 4 °C u minuti do 250 °C. Temperatura prenosnice je bila 270 °C, a temperatura masenog detektora je bila 230 °C. Snimano je područje omjera mase i naboja $m/z=42-350$. Računalni program Xcalibur (Thermo Scientific, Palo Alto, SAD) korišten je za obradu dobivenih podataka i kvantifikaciju komponenata.

3.3.2.2. Kvalitativna analiza

Komponente eteričnih ulja su identificirane na osnovu njihovih spektara masa i na osnovi njihovih vremena zadržavanja, odnosno retencijskih indeksa. Svaka točka na kromatogramu osim vremena zadržavanja i intenziteta sadrži i spektar masa. Dobiveni spektri masa na vrhovima kromatografskih pikova uspoređeni su s bazom podataka NIST 2.0 i s bazom koja je kreirana na instrumentu tijekom prijašnjih analiza eteričnih ulja. Obzirom da su spektri masa komponenata eteričnih ulja jako slični i ovise o instrumentu i uvjetima snimanja, dodatni kriterij za identifikaciju su retencijski indeksi komponenata koji se izračunavaju usporedbom vremena zadržavanja komponenata s vremenom zadržavanja ravnolančanih ugljikovodika. Iz tog razloga je analizirana smjesa ravnolančanih ugljikovodika C8-C20 priređena u laboratoriju prema istim uvjetima analize. Određena su vremena zadržavanja pojedinih ravnolančanih ugljikovodika te su izračunati retencijski indeksi komponenata eteričnih ulja prema jednadžbi:

$$I = 100 \times \left[n + \frac{\log(t'_{r(\text{unknown})}) - \log(t'_{r(n)})}{\log(t'_{r(N)}) - \log(t'_{r(n)})} \right]$$

gdje je:

I = retencijski indeks zadržavanja,

n = broj ugljikovih atoma u manjem n-alkanu,

N = broj ugljikovih atoma u većem n-alkanu,

t'_r = prilagođeno vrijeme zadržavanja.

Dobiveni retencijski indeksi uspoređeni su s literaturom i dodatno potvrdili identifikaciju komponenata.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Udio eteričnog ulja

Destilacijom vodenom parom vršnih dijelova biljaka dobivena su ulja svjetlo-žute do žute boje. Dobiveni udjeli eteričnih ulja su znatno varirali među analiziranim uzorcima. Najveći udio je dobiven u uzorku *A. annua* ubranom u Zagrebu u Farmaceutskom botaničkom vrtu "Fran Kušan" Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Zagreb). Za razliku od ulja pelina ubranih u Zagrebu, ulja pelina ubranih na Velebitu sadržavala su manje eteričnog ulja 0,4-0,5%. Razlog tome može biti u tome što su biljke ubrane u Zagrebu bile bolje razvijene od onih ubranih na Velebitu. Količina ulja u uzorcima dobivena u mL/kg prikazani su u tablici 7.

Tablica 7. Količina eteričnog ulja u uzorcima prikazana u mL/kg

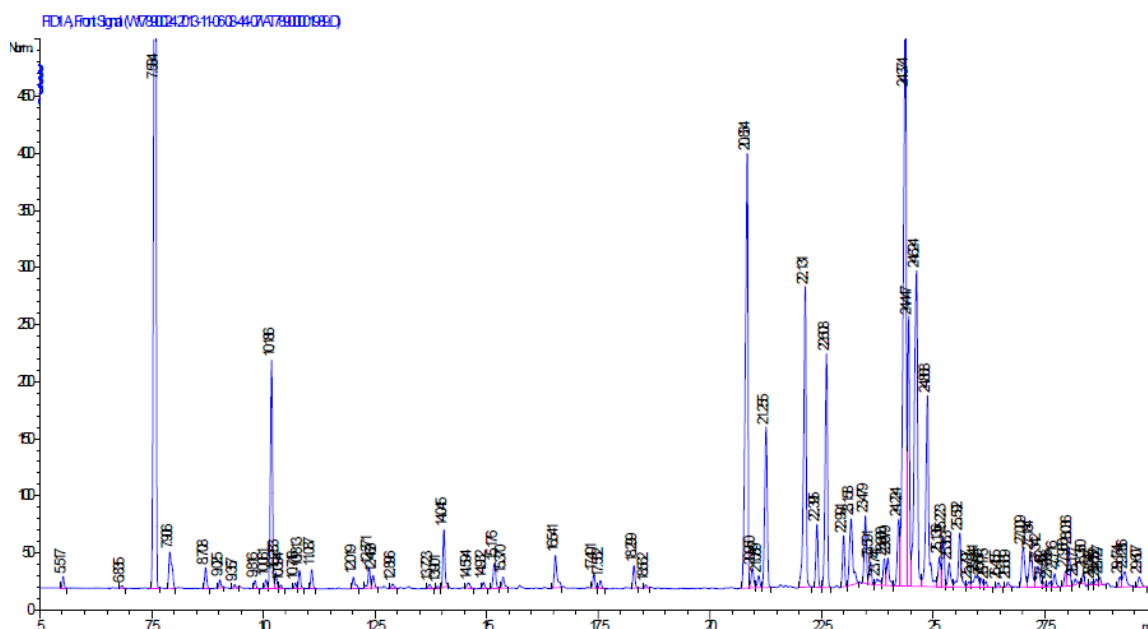
UZORAK	VRSTA	LOKACIJA	KOLIČINA ULJA (mL/kg)
UZ1	<i>Artemisia annua</i>	Bv FBF	0,9
UZ2	<i>Artemisia vulgaris</i>	Mala Kapela	0,4
UZ3	<i>Artemisia alba</i>	sjevni Velebit	0,5
UZ4	<i>Artemisia annua</i>	srednji Velebit	0,4
UZ5	<i>Artemisia verlotiorum</i>	Bv FBF	0,6
UZ6	<i>Artemisia maritima</i>	Bv FBF	0,6

Rajeswara i suradnici [24] su u svojem istraživanju dobili 0,30-0,35% (v/w) eteričnog ulja destilacijom vodenom parom uzoraka *A. annua*. Njihov rezultat je nešto manji od rezultata dobivenih u ovom radu, ali navode prema literaturnom pregledu da je udio eteričnog ulja u *A. annua* 0,11 – 0,88%. Bilia i suradnici [25] u svom preglednom radu navode da je sadržaj eteričnog ulja u *A. annua* 0,3-0,4%, ali da se može dobiti i do 4,0%. Opisali su i distribuciju eteričnog ulja u biljci. Prema njihovim podacima 36% ulja se nalazi u gornjoj trećini biljke, 47% u srednjoj trećini, a samo 17% u donjoj trećini biljke. Navode i podatak da je prinos *A. annua* 85 kg suhe biljke po hektaru. Ukoliko se bere za proizvodnju artemizina, seskviterpenskog laktona koji se koristi za liječenje

malarije, biljka ne smije procvasti, a ukoliko se bere radi proizvodnje eteričnog ulja biljka se bere u sredini cvatnje. Lopes-Lutz i suradnici [1] su proučavali udio i sastav eteričnog ulja sedam vrsta pelina. Udio eteričnog ulja kod *A. absinthium*, *A. biennis*, *A. dracunculus*, *A. longifolia* i *A. ludoviciana* je bio 0,3%-0,5%, dok je znatno više postignuto kod *A. cana* i *A. frigida*, od 1,3% do 1,5%. Mohsen i Ali [12] su proučavali udio i sastav eteričnog ulja 21 uzorka *A. alba* sakupljenih u različitim dijelovima Tunisa. Dobili su 0,7%-1,9% eteričnog ulja što je više od udjela koje smo mi postigli za uzorak *A. alba*.

4.2. Sastav eteričnog ulja

Na slici 7 prikazan je kromatogram *Artemisie annue* iz kojega se može uočiti složenost ispitivanih uzoraka.



Tablica 8. Kemijski sastav eteričnih ulja

	RT	RI	UZ 1	UZ2	UZ3	UZ 4	UZ5	UZ6
santolina trien	4,59	902	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
triciklen	5,1	927	0,1	0,0	0,0	tr	0,0	0,0
a-pinen	5,34	938	0,1	0,0	0,4	0,0	0,1	0,0
kamfen	5,75	955	2,1	2,9	tr	0,6	tr	0,1
sabinen	6,29	976	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
1-okten-3-ol	6,43	981	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0
b-pinen	6,43	981	0,2	0,0	1,0	0,0	tr	0,0
mircen	6,68	990	0,4	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0
dehidro-1,8-cineol	6,73	991	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
yomogi alkohol	6,83	996	0,6	0,0	0,0	tr	0,0	1,1
3-oktanol	6,88	997	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
p-cimen	7,7	1028	0,0	0,0	0,3	0,0	0,5	0,1
1,8-cineol	7,94	1036	0,0	0,0	2,4	0,0	3,2	2,2
artemizija keton	8,65	1060	46,0	56,9	0,0	1,9	0,0	43,6
g-terpinen	8,7	1061	0,0	0,0	tr	0,0	tr	0,0
on1	9	1071	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
cis-sabinen hidrat	9,1	1074	0,0	0,0	tr	0,0	0,2	0,0
artemizija alkohol	9,36	1082	1,3	0,6	0,0	0,1	0,0	1,1
3-metil-2-butenil 3- metil-2-butanoat	9,61	1089	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
fenhon	9,7	1091	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
trans sabinen hidrat	9,99	1099	1,3	0,4	0,0	1,2	0,4	0,0
unknown1	10,13	1104	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
mtox1	10,22	1108	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
a-tujon	10,29	1110	tr	0,0	0,2	0,0	22,5	0,5
izociklocitral??	10,55	1118	0,0	0,0	2,4	0,0	0,0	0,4
b-tujon	10,62	1121	tr	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0
krizantemon	10,7	1123	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
trans-p-menta-2,8- dienol	10,72	1124	0,2	0,0	0,0	0,0	0,2	0,4
trans rose oksid	10,82	1127	0,0	0,0	0,4	0,0	tr	0,1
mtox2	11,18	1138	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	tr
on1	11,25	1141	0,7	0,0	0,0	0,3	0,4	0,0
nopinon	11,27	1141	0,0	0,0	1,6	0,0	0,0	0,1
trans-pinokarveol	11,38	1145	0,3	0,0	1,8	0,7	0,4	0,8
trans-verbenol	11,52	1149	0,0	0,0	0,8	0,0	tr	0,1

kamfor	11,56	1150	18,7	23,5	0,0	31,5	0,3	0,1
b-pinenoksid	11,84	1158	1,2	tr	tr	1,0	0,4	0,0
pinokarvon	12,06	1165	0,2	0,0	6,6	0,8	0,3	1,3
izopulegol??	12,33	1173	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
borneol	12,41	1175	0,2	3,1	0,0	0,5	0,2	tr
cis-pinokamfon	12,53	1178	0,0	0,0	13,6	0,0	0,0	2,4
terpinen-4-ol	12,69	1183	0,3	0,0	0,5	0,2	0,3	0,4
p-cimen-8-ol	12,74	1184	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0
a-terpinol	12,93	1189	tr	0,0	0,4	tr	0,2	0,0
mirtenal+mirtenol	13,16	1195	0,2	tr	2,8	0,8	tr	0,5
verbenon	13,56	1207	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
trans-piperitol	13,64	1210	0,0	0,0	0,2	tr	tr	0,1
elsholtzia keton	13,9	1218	0,1	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0
trans-karevol	13,97	1220	tr	0,0	0,2	tr	1,5	0,0
cis-karveol	14,31	1231	tr	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
cis-p-menta-1(7),8-dien-2-ol	14,32	1231	0,0	0,0	0,4	0,0	0,1	tr
n-heksil 2-metilbutirat	14,47	1236	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
izoamil heksanoat	14,65	1242	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0
karvon	14,79	1246	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,1
karvoton aceton	15,13	1256	0,0	0,0	16,8	0,0	0,0	2,5
geraniol	15,13	1256	0,3	0,0	0,0	0,6	tr	0,0
krizantemil acetat	15,21	1258	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0
geranial	15,58	1269	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
etil fenil acetat (benzenacetaldehid)	15,84	1276	0,3	0,0	0,0	0,7	0,7	0,0
unknown2	15,93	1279	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
trans-pinokarvil acetat	16,5	1294	tr	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0
unknown3	16,66	1299	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
perila alkohol	16,66	1299	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0
mirtenil acetat	17,4	1323	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0
a-kubaben	18,21	1348	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
eugenol	18,36	1353	0,1	0,0	0,0	0,1	0,7	0,0
sq1	18,92	1369	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0
a-kopaen	19,15	1376	0,0	0,0	0,8	1,0	0,4	tr
izobutil fenilacetat	19,44	1384	0,9	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0
b-kubaben	19,54	1387	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0
cis-jasmon	19,9	1397	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0
b-kariofilen	20,57	1420	3,5	1,7	0,0	2,2	16,9	tr
unknown4	20,87	1430	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0

b-farnezen	21,59	1453	0,1	0,0	0,0	0,9	0,4	0,0
a-humulen	21,68	1456	0,1	0,0	0,0	0,1	3,0	0,0
allo-aromadendren	21,83	1460	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,3
sq1	22,24	1473	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	tr
germakren D	22,48	1480	0,0	0,0	0,1	1,6	5,8	0,1
4-kamfenil butan-2-on	22,72	1488	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2
b-selinen	22,74	1488	8,8	9,2	0,0	24,6	0,0	0,0
sq2	22,81	1490	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
biciklogermakren	22,93	1494	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7	0,0
epi-kubenol	22,94	1494	0,0	0,0	2,7	0,0	0,0	0,4
unknown5	23,47	1512	0,0	0,0	0,4	0,0	tr	0,1
kubenol	23,54	1514	0,0	0,0	3,3	0,0	0,1	0,1
d-amorfen	23,62	1517	0,0	0,0	1,7	tr	0,8	0,3
sq3	23,71	1520	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2
trans-kalamener	23,71	1520	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0
unknown6	23,92	1528	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
a-kalakoren	24,11	1534	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3
izo-kalakoren	24,3	1541	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
citronelil butanoat	24,57	1550	0,2	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0
sqepox1	24,61	1551	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0
sqol1	24,74	1555	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0
sqolepox1	24,84	1559	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0
nerolidol	24,92	1561	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0
sqepox2	25,08	1567	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
sqol2	25,1	1567	0,1	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0
ledol	25,18	1570	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,3
spatulenol	25,4	1577	0,3	0,0	2,2	1,4	5,1	2,6
kariofilen oksid	25,54	1582	1,8	tr	0,4	3,4	13,6	0,1
sqol3	25,61	1584	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,1
a-kopaen-4-ol	25,71	1587	0,0	0,0	1,8	0,0	0,0	0,0
viridiflorol	25,9	1593	0,0	0,0	4,7	0,0	0,0	2,3
sqon1	26,02	1597	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0
sqdion1	26,15	1601	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0
sqol4	26,2	1603	0,0	0,0	1,6	0,0	0,0	0,8

sqolepox2	26,3	1607	0,0	0,0	0,0	0,9	0,0	0,0
sqol5	26,34	1608	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,4
sqon2	26,35	1608	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0
sqol6	26,41	1611	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0
sqol7	26,52	1615	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0
sqol8	26,57	1616	tr	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0
sqon3	26,67	1620	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7
sqon4	26,68	1620	0,2	0,0	0,3	0,4	0,4	0,0
1,10-diepikubenol, 220, 202, 187, 162, 135	26,86	1627	0,0	0,0	2,5	0,8	0,5	1,6
sqon5	27,02	1633	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0
b-cedren-9-on, 218, 202, 176, 175, 134	27,03	1633	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0
sqol9	27,03	1633	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0	0,8
sqon6	27,15	1637	2,0	1,0	0,0	0,5	0,0	0,0
sq4	27,28	1642	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0
cis-metil-jasmonat	27,28	1642	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0
a-murolol??	27,33	1644	0,0	0,0	16,0	0,3	0,4	0,9
sqon7	27,4	1646	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0
sqon8	27,47	1649	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0
sqol10	27,58	1653	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0
a-kadinol	27,66	1655	0,1	0,0	0,0	0,4	1,5	0,0
sqol11	27,74	1658	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	1,1
sqolepox3	27,8	1660	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0
sqol12	27,95	1665	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0
sqon9	28,01	1667	0,2	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0
sqolepox4	28,1	1671	0,8	0,0	0,4	1,0	0,5	0,2
sqolepox5	28,3	1677	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0
sqolepox6	28,38	1680	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2

sqolepox7	28,47	1683	0,4	0,0	0,2	3,4	0,5	12,5
sqol13	28,64	1689	0,0	0,0	0,0	0,3	0,5	0,2
sqol14	28,75	1693	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0
sqolepox8	28,83	1695	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,1
unknown7	28,91	1698	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0
sqolepox8	29	1701	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
sqon10	29,04	1703	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0
sqonepox1	29,1	1705	0,2	0,0	0,0	0,4	0,0	0,1
sqon11	29,38	1716	0,2	0,0	0,0	1,1	0,2	2,0
sqon12	29,58	1723	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0
sqolepox9	29,64	1726	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
sqol15	29,72	1729	0,8	tr	0,0	0,3	0,0	0,0
izo-1729	29,86	1734	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
sqon13	30,13	1744	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0
ester5	30,16	1745	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
sqonepox2	30,43	1755	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0
sqol16	30,6	1761	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,1
sqolepox10	30,68	1764	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0
sqester1	30,76	1767	0,3	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0
sqdiol1	30,79	1768	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1
sqester2	30,99	1775	0,2	0,0	0,0	0,7	0,0	0,2
sqon14	31,07	1778	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
sqon15	31,35	1788	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
sqolepox11	31,6	1797	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0
sqolepox12	31,87	1805	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1
sqester3	32,1	1817	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,1
sqester4	32,38	1828	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,1
sqdion2	32,8	1844	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,5

unknown8	33,25	1862	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
sqolepox13	33,57	1874	0,2	0,0	tr	0,2	0,0	0,0
sklareol oksid	33,8	1883	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
sqdion3	34,52	1911	0,3	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0
sqdion4	35,22	1940	0,3	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0
sqester4	35,46	1949	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	tr
sqdion5	36,34	1985	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
manoil oksid	36,47	1990	0,0	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0
epimanoil oksid	36,99	2010	0,0	tr	0,0	0,0	0,3	0,1
sqester6	37,02	2011	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
unknown9	37,13	2016	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
diterp1	37,92	2046	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
ester2	39,04	2088	0,0	0,0	tr	0,4	0,2	tr
unknown10	41,61	2179	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
ester3	43,6	2246	0,4	0,0	tr	0,4	0,0	0,1
ester4	44,21	2266	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
neidentificirani	unknown1 -unknown 10	% identificiranih komponenti	91,1	98,4	74,0	79,0	90,0	66,9
monoterpenski oksid	mtox1- mtox	monoterpeni	3,0	2,9	1,6	0,7	0,7	0,2
keton	on1	monoterpenski alkoholi	3,4	3,7	7,6	3,1	3,9	4,6
ester	ester1- ester5	monoterpenski oksidi	68,7	80,8	44,0	37,0	33,3	53,5
seskviterpen	sq1-sq4	monoterpenski esteri	1,6	0,0	1,4	1,5	1,3	0,0
seskviterpenski epoksid	sqepox1- sqepox2	seskviterpeni	12,6	10,9	4,3	30,7	29,0	1,1
seskviterpenski alkohol	sqol1- sqol16	seskviterpenski i alkoholi	0,6	0,0	36,1	6,7	10,8	11,6
seskviterpenski alkohol epoksid	sqolepox1 - sqolepox1 3	seskviterpenski i oksidi	6,3	1,0	1,1	14,3	17,2	22,4
seskviterpenski keton	sqon1- sqon15	seskviterpenski i ester	1,0	0,0	0,4	1,0	0,3	0,4
seskviterpenski di- ketoni	sqdion1- sqdion5	diterpeni	0,0	0,5	0,2	0,0	0,4	0,1

seskviterpenski keton epoksid	sqonepox1 - sqonepox2	ostalo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0
seskviterpenski ester	sqester1- sqester6	zbroj	97,1	100,0	96,8	94,9	97,2	93,9
diterpen	diterp1							
seskviterpenski di-alkohol	sqdiol1							

Tablica 8 pokazuje velike razlike među uzorcima u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu. Čak i dva uzorka *A. annua* ubrana na različitim lokacijama su znatno različita po sastavu. Ulja *A. annua* ubrane u Zagrebu i *A. vulgaris* karakterizirana su visokim udjelom artemizija ketona, kamfora i seskviterpena β -selinena. *A. maritima* sadrži artemizija keton. Za razliku od prva dva uzorka, ne sadrži znatnije količine kamfora ni β -selinena. Manju količinu artemizija ketona sadrži i uzorak *A. annua* ubran na srednjem Velebitu. Udjeli artemizija alkohola su proporcionalni s udjelima artemizija ketona. Uzorak *A. verlotiorum* sadrži najviše tujona, α -izomera, od svih uzoraka. Još jedino uzorak *A. alba* sadrži znatniju količinu tujona, β -izomera. Prema identificiranim komponentama, uzorak *A. alba* najviše se razlikuje od ostalih uzoraka. Sadrži pinokarvon, cis-pinokamfon i karvoton aceton koje niti jedan uzorak ne sadrži u znatnijoj količini. Gledajući grupe komponenata taj uzorak sadrži najviše seskviterpenskih alkohola, ali i najmanje seskviterpenskih oksida, dok uzorci *A. verlotiorum* i *A. maritima* sadrže približne količine seskviterpenskih oksida i alkohola. Najveću količinu monoterpenskih oksida i oksida općenito sadrži uzorak *A. vulgaris*. Uzorak *A. alba* sadrži najviše monoterpenskih alkohola, iako se uzorci znatnije ne razlikuju po udjelu monoterpenskih alkohola i monoterpena. Fenilpropionski derivati nisu znatnije izraženi. Najviše je eugenola u uzorku *A. verlotiorum* iako su one karakteristične za neke vrste pelina, npr. *A. dracouculus* [1].

Dobivena su zadovoljavajuća slaganja s literaturnim podacima o retencijskim indeksima koji su poslužili za dodatnu potvrdu identifikacije, a u nekim slučajevima i samu identifikaciju. Najviše radova obrađuje slatki pelin *A. annua*, što je dijelom i zbog sadržaja artemizina. Nibert i Wink [26] su proučavali utjecaj ekstrakta *A. annue* i još tri vrste pelina na bolest Trypanosoma koja je dosta raširena u Etiopiji. Sastav dobivenog ekstrakta *A. annue* pokazuje visoki udjel kamfora, seskviterpena i spojeva kao npr. palmitinske kiseline koji nisu uobičajeni za eterično ulje. Nisu identificirali artemizija

keton koji je glavna komponenta našeg uzorka *A. annue*. Rajeswara i suradnici [24] također nisu postigli visoke udjele artemizija ketona i alkohola u svojoj studiji, a glavne komponente ulja *A. annua* su im mircen, 1,8-cineol i kamfor. Mohsen i Ali [12] su identificirali oko sto komponenata u uzorcima ulja *A. alba*, a postigli su visoke količine 1,8-cineola, tujona i kamfora, što nije bilo slučaj kod našeg uzorka. Iz njihovih rezultata za ulje *A. albe* vidljive su velike razlike između uzoraka iste vrste. I u ovom istraživanju uočene su razlike između dva uzorka *A. annue* ubrane na različitim lokacijama.

Općenito u usporedbi s literaturom, udio 1,8-cineola u eteričnim uljima pelina je bio znatno različit od našeg. Neki autori ističu da analizirani uzorci pelina sadrže 1,8-cineol u količini da se može govoriti o kemotipu 1,8-cineol [12, 24, 25]. Većina neidentificiranih komponenata pripada seskviterpenskima spojevima s kisikom koje u znatnom udjelu sadrže svi uzorci i koje je teško identificirati. Na osnovi karakterističnih omjera m/z za veliki dio identificiranih komponenata pretpostavljeno je kojoj grupi pripadaju, pa su njihovi udjeli dodani u te grupe.

5. ZAKLJUČAK

Uzorci eteričnih ulja različitih vrsta pelina izoliranih destilacijom vodenom parom znatno se kvalitativno i kvantitativno razlikuju. Također dva analizirana uzorka *Artemisia annua* pokazuju znatne razlike, što potvrđuje da na količinu i sastav eteričnog ulja, osim vrste, utječu i uvjeti okoliša u kome je biljka rasla. Najkarakterističnije komponente ulja bile su artemizija keton i kamfor, a 1,8-cineol nije prevladavao niti u jednom od analiziranih uzoraka, iako je njegova prisutnost u uljima pelina opisano u literaturi. Sva analizirana ulja imaju visok sadržaj seskviterpenskih alkohola i oksida, što je uzrokovalo veći broj neidentificiranih komponenata.

6. LITERATURA

- [1] Lopes-Lutz, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S. and Kolodziejczyk, P.P., Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils, *Phytochemistry*, **69** (2008) 1732-1738.
- [2] S. Marković, *Fitoaromaterapija*, Centar Cedrus, Zagreb, 2005., str. 77, 256, 80-81, 29, 161-164, 165-167, 28-29, 167-168.
- [3] Alaerts, G., Pieters, S., Logie, H., Van Erps, J., Merino-Arevalo, M., Dejaegher, B., Smeyers-Verbeke, J., Vander Heyden, Y., Exploration and classification of chromatographic fingerprints as additional tool for identification and quality control of several Artemisia species, *Journal of Pharmaceutical and biomedical Analysis*, **95** (2014) 34-46.
- [4] McGuffin, M., *Botanical Safety Handbook*, American Herbal Products Association, (1999) CRS Press LLC, FL, USA.
- [5] V. Grdinić, D. Kremer, *Ljekovito bilje i ljekovite droge: farmakopejski, botanički i farmaceutski podaci*, Zagreb, 2009., str. 231.
- [6] D. Kuštrak, *Farmakognozija, Fitofarmacija, Golden marketing- Tehnička knjiga*, Zagreb, 2005., str. 343-345.
- [7] R. Domac, *Flora Hrvatske, Priručnik za određivanje bilja, Školska knjiga*, Zagreb, 1994., str. 352-353.
- [8] Dahnum, D., Abimanyu, H., Senjaya, A., Isolation of Artemisinin as Antimalarial Drugs from Artemisia annua L. Cultivated in Indonesia, *International Journal of Basic & Sciences*, **12** (2012) 90-95.
- [9] <https://atma.hr/lijek-protiv-raka-od-slatkog-pelina-artemisinin-djelovanje-i-gdje-nabaviti/> (srpanj 2015.).
- [10] <http://www.narodnilijek.com/web/herbarium-pelin-divlji/> (srpanj 2015.).
- [11] <http://narodnidoktor.com/divlji-pelin-artemisia-vulgaris/> (srpanj 2015.).
- [12] Mohsen, H., and Ali, Ferchichi, Essential oil composition of Artemisia herba-alba from southern Tunisia, *Molecules* **14** (2009) 1585-1594.

- [13] Stappen, I., Wanner, J., Tabanca, N., Wedge, D.E., Ali, A., Khan, I.A., Kaul, V.K., Lal, B., Jaitak, V., Gochev, V., Girova, T., Stoyanova, A., Schmidt, E., Jirovetz, L., Chemical composition and biological effects of *Artemisia merittima* and *Artemisia nilagirica* essential oil from wild plants of western Himalaya, *Planta Medica*, **80** (2014) 1079-1087.
- [14] <http://www.plantagea.hr/dev/etericna-ulja> (srpanj 2015.).
- [15] <http://www.plantagea.hr/dev/dobivanje-etericnih-ulja> (srpanj 2015.).
- [16] <http://www.plantagea.hr/dev/patvorenje-etericnih-ulja> (kolovoz 2015.).
- [17] European Pharmacopoeia 4.0, 4 th edition, 2002., str. 182-183.
- [18] <http://www.plantagea.hr/dev/varijabilnost-sastava-etericnih-ulja> (kolovoz 2015.).
- [19] <http://www.tehnologijahrane.com/> (kolovoz 2015.).
- [20] Š. Cerjan-Stefanović, V. Drevenkar, B. Jurišić, M. Medić-Šarić, M. Petrović, N. Šegudović, V. Švob, S. Turina, Kromatografsko nazivlje: IUPAC preporuke 1993. i 1998., HINUS i Selekcija za kromatografiju HDKI, Zagreb, 1999., str. 23, 30, 25, 63, 47-51.
- [21] D. Rood, A Practical Guide to the Care, Maintenance, and Troubleshooting of Capillary Gas Chromatographic Systems, Wiley-VCH, Weinheim, 1999., str. 3-7, 102-103, 37-39, 156, 19, 198-199.
- [22] K. Grob, Split and Splitless Injection for Quantitative Gas Chromatography, Wiley-VCH, Weinheim, 2001., str. 2-5, 20-21, 17.
- [23] European Pharmacopoeia 6.0, 6 th edition, European Directorate for the Quality of Medicine, Council of Europe, Strassbourg, France, 2008.
- [24] Rajeswara, R., Syamasundar, K. V., Patel, R. P., Chemical profile characterization of *Artemisia annua* L. essential oils from south India through GC-FID and GC-MS analyses, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **17** (2014) 1249-1256.
- [25] 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, *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014 (2014) 1-7.
- [26] Nibret, E., Wink, M., Volatile components of four Ethiopian *Artemisia* species extracts and their in vitro antitrypanosomal and cytotoxic activities, *Phytomedicine*, **17** (2010) 369-374.

7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u 11. ožujka 1991. godine u Zagrebu. Osnovnoškolsko obrazovanje pohađala sam u OŠ „Ivana Mažuranića“. Srednjoškolsko obrazovanje završila sam u Prirodoslovno-matematičkoj Gimnaziji. 2010. godine upisala sam studij Primijenjene kemije na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. Stručnu praksu odradila sam na Institutu „Ruđer Bošković“, na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju, u laboratoriju za kemiju ugljikohidrata, peptida i glikopeptida.