

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Urša PRAH

VREDNOTENJE KAKOVOSTI PRAVEGA PELINA
(Artemisia absinthium L.)

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Urša PRAH

VREDNOTENJE KAKOVOSTI PRAVEGA PELINA
(*Artemisia absinthium* L.)

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

EVALUATION OF QUALITY OF WORMWOOD
(*Artemisia absinthium* L.)

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija agronomije. Opravljeno je bilo na Katedri za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je na 19. seji dne 1. junija 2009 za mentorico dela imenovala prof. dr. Deo Baričevič.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Katja Vadnal
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Dea Baričevič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Franc Batič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Urša PRAH

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 633.88:635.71:615.32 (043.2)
KG zdravilne rastline/pravi pelin/*Artemisia absinthium*/*Absinthii herba*/Evropska farmakopeja/absint/tujon
KK AGRIS F60
AV PRAH, Urša
SA BARIČEVIČ, Dea (mentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI 2011
IN VREDNOTENJE KAKOVOSTI PRAVEGA PELINA (*Artemisia absinthium* L.)
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 40, [1] str., 9 pregl., 5 sl., 77 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Tri populacije pravega pelina (*Artemisia absinthium* L.), katerih semena izvirajo iz naravnih rastišč na Primorskem in rastejo na Laboratorijskem polju Biotehniške fakultete, smo opisali z deskriptorji, ki so jih sestavili člani mednarodne skupine za zdravilne in aromatične rastline pri ECPGR (ECPGR Working Group on Medicinal and Aromatic Plants), in ovrednotili v skladu z Evropsko farmakopejo ter njihove vrednosti med seboj primerjali. Vse tri populacije so si po fenotipu zelo podobne in ustrezajo normam za vsebnost eteričnega olja, grenkobno število, vsebnost tujih primesi, vode, celokupnega pepela in v klorovodikovi kislini netopnega pepela. Med populacijami so opazne manjše razlike, vendar je statistično značilnih razlik malo. Vsebnosti eteričnega olja so zelo velike, saj se gibljejo od 1,0 % naprej, vzorec z največjo izmerjeno vsebnostjo eteričnega olja (1,24 %) pa ima v primerjavi s podatki iz pregledane literature drugo največjo vsebnost eteričnega olja. Za določitev kemotipa bi bila potrebna dodatna analiza eteričnega olja, hkrati pa bi na podlagi vsebnosti tujonov lahko ocenili primernost droge za uporabo v prehrabnenih izdelkih in pijačah.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn
DC UDC 633.88:635.71:615.32 (043.2)
CX medicinal plants/wormwood/*Artemisia absinthium*/*Absinthii herba*/European Pharmacopoeia/absinthe/thujone
CC AGRIS F60
AU PRAH, Urša
AA BARIČEVIČ, Dea (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY 2011
TI EVALUATION OF QUALITY OF WORMWOOD (*Artemisia absinthium* L.)
DT Graduation Thesis (university studies)
NO IX, 40, [1] p., 9 tab., 5 fig., 77 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Three populations of wormwood (*Artemisia absinthium* L.), originating from natural habitats in Slovenian Littoral and are now growing in the Laboratory field of Biotechnical faculty, were characterised with descriptors, made by members of the international working group on medicinal and aromatic plants at ECPGR (ECPGR Working Group on Medicinal and Aromatic Plants) and evaluated according to European Pharmacopoeia. In addition, the results of measurements were compared among each other. All three tested populations were found to have similar phenotype and were in accordance with the regulations as regards essential oil contents, bitterness value, foreign matter, water content, total ash and ash insoluble in hydrochloric acid. In general, small differences among populations were noticed and not many statistically significant differences established. The essential oil yields were considerably high, more than 1.0 %, and the sample with the highest content of essential oil (1.24 %) in the comparison with revised literature data was the second highest. For further characterisation of chemotype an additional analysis should be done, which would also show if the drug is safe to be used in foods and drinks with regards to the thujone content.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	VII
	KAZALO SLIK	VIII
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1	UVOD	1
1.1	PELIN SKOZI ZGODOVINO	1
1.2	NAMEN DELA IN DELOVNA HIPOTEZA	3
2	PREGLED OBJAV	4
2.1	OPIS PELINA	4
2.1.1	Poimenovanje ter taksonomska in geografska klasifikacija	4
2.1.2	Botanični opis	5
2.2	SESTAVA DROGE PRAVEGA PELINA	5
2.2.1	Eterično olje	5
2.2.1.1	Vsebnost eteričnega olja v drogi <i>Absinthii herba</i>	5
2.2.1.2	Komponente eteričnega olja pravega pelina	6
2.2.1.2.1	Tujon	7
2.2.1.3	Spremenljivost sestave in vsebnosti eteričnega olja	8
2.2.1.3.1	Geografski položaj	9
2.2.1.3.2	Kemotip	9
2.2.1.3.3	Čas žetve	10
2.2.1.3.4	Metoda ekstrakcije	10
2.2.2	Druge sestavine	11
2.3	UPORABA	11
2.3.1	<i>Amarum-aromaticum</i>	11
2.3.2	Insekticidno delovanje	13
2.3.3	Fungicidno, antibakterijsko in antihelminično delovanje	13
2.3.4	Ostala delovanja	14
2.3.5	Toksičnost in absintizem	14

2.4	IDENTIFIKACIJA IN VREDNOTENJE KAKOVOSTI ZDRAVILNIH RASTLIN	15
3	MATERIALI IN METODE	17
3.1	RASTLINSKI VZORCI	17
3.2	DESKRIPTORJI	18
3.3	MERJENJE VSEBNOSTI ETERIČNEGA OLJA	19
3.4	UGOTAVLJANJE GRENKOBNEGA ŠTEVILA	20
3.5	UGOTAVLJANJE TUJIH PRIMESI, VODE, CELOKUPNEGA PEPELA IN V KLOOROVODIKOVI KISLINI NETOPNEGA PEPELA	23
4	REZULTATI	26
4.1	DESKRIPTORJI	26
4.2	VSEBNOST ETERIČNEGA OLJA	28
4.3	GRENKOBNO ŠTEVILO	29
4.4	VSEBNOST TUJIH PRIMESI	30
4.5	IZGUBA VODE PRI SUŠENJU IN VSEBNOST CELOKUPNEGA PEPELA TER V KLOOROVODIKOVI KISLINI NETOPNEGA PEPELA	30
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	31
5.1	RAZPRAVA	31
5.2	SKLEPI	33
6	POVZETEK	34
7	VIRI	35
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Serija redčitev referenčne raztopine kininijevega hidroklorida (Q – HCl) z navadno vodo (H ₂ O)	21
Preglednica 2: Serija redčitev ekstrakta pravega pelina po pravilih Evropske farmakopeje	22
Preglednica 3: Serija redčitev ekstrakta pravega pelina po pravilih Evropske farmakopeje z našo dodano redčitvijo C2A	22
Preglednica 4: Serija redčitev raztopine D	22
Preglednica 5: Deskriptorji za vsako posamezno preučevano populacijo pelina	26
Preglednica 6: Vsebnost (volumen) eteričnega olja (ml) v 50 g posameznega vzorca droge pravega pelina (v 4 ponovitvah) pri preučevanih populacijah in masno volumski odstotek eteričnega olja (% _{EO}) ter povprečje (x_{povp}), standardni odklon (s) in koeficient variacije (KV%)	29
Preglednica 7: Velikost vzorca (N_v), povprečno grenkobno število ($G\check{S}_{povp}$) in standardni odklon (s) pri posamezni populaciji pridobljenih s serijo redčitev ekstrakta pravega pelina po pravilih Evropske farmakopeje in s prilagojeno serijo redčitev	29
Preglednica 8: Mase vzorcev droge m_0 , delež tujih organov in stebel (% _{TO/S}) in delež ostalih tujih delcev (% _{TD}) v posameznem vzorcu ter povprečje (x_{povp}), standardni odklon (s) in koeficient variacije (KV%) posameznih populacij	30
Preglednica 9: Delež izgube vode pri sušenju (% _v), delež celokupnega pepela (% _p) in v klorovodikovi kislini netopnega pepela (% _{HClp}) v absolutno suhih vzorcih (osušenih pri 105°C) ter povprečje (x_{povp}) in standardni odklon (s) posameznih populacij	30

KAZALO SLIK

Slika 1: Geografski položaj naravnih rastišč in mesta gojenja (označeni z rumenimi risalni žeblički) preučevanih populacij pravega pelina (Google Zemlja, 2011)	18
Slika 2: Primerjava povprečij in zgornje ter spodnje meje 95 % intervala zaupanja za deskriptor »Najvišji vrh rastline (cm)« preučevanih populacij	28
Slika 3: Primerjava povprečij in zgornje ter spodnje meje 95 % intervala zaupanja za deskriptor »Število internodijev« preučevanih populacij	28
Slika 4: Primerjava povprečij in zgornje ter spodnje meje 95 % intervala zaupanja za deskriptor »Širina listnega segmenta« preučevanih populacij	28
Slika 5: Primerjave povprečij in zgornje ter spodnje meje pri 95 % intervalu zaupanja za grenkobno število po tabeli Evropske farmakopeje med preučevanimi populacijami	29

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ANOVA	analiza razpršenosti (Analysis of variance)
BF	Biotehniška fakulteta
cm	centimeter
g	gram
kg	kilogram
L.	Linnaeus (Carl Linnaeus, avtor imena vrste <i>Artemisia absinthium</i>)
m	meter
m/m	masni delež
mg	miligram
min	minuta
ml	mililiter
ng	nanogram
vol. %	volumenski delež
%	odstotek
(<i>E</i>)	cis izomera
(<i>Z</i>)	trans izomera
°C	stopinja Celzija

1 UVOD

1.1 PELIN SKOZI ZGODOVINO

Najstarejši zapisi, ki opisujejo uporabo pravega pelina v zdravilne namene, segajo vse do leta 1500 pr.n.š. Zapisani so na staroegipčanskem papirusu imenovanem Ebersev papirus, ki vsebuje več kot 100 strani zapisov in je eden najstarejših ohranjenih medicinskih dokumentov. Vendar pa naj bi bil »Ebersev papirus« le kopija veliko starejših zapisov imenovanih »Knjige Tota« (Tot je v staroegipčanski mitologiji bog modrosti, začetnik znanosti in umetnosti. Je zavetnik pisarjev.). Pelin so takrat uporabljali kot antiseptik, stimulant in tonik ter kot zdravilo pri povišani temperaturi in menstrualnih bolečinah (Bryan, 1930).

Pelin omenja tudi Sveto pismo Stare zaveze (2000) (Jeremija 9:14, 13:15) in predstavlja prekletstvo, nesrečo (Žalostinke 3:15) ali nepravilnost (Amos 5:7).

Najverjetneje je grška beseda *apsinthion*, ki pomeni nepiten, prednica besede absint (Padosch in sod., 2006), rod *Artemisia* pa je poimenovan po Artemidi (grško *Ártemis*), grški boginji lova, živali, narave, rasti in rojstva (Wright, 2002). Starogrški matematik in filozof Pitagora z otoka Samos (569-475 pr.n.š.) je priporočal v vinu namočene liste pelina za lajšanje porodnih bolečin. Hipokrat (okoli 460-377 pr.n.š.), grški antični zdravnik, pa je uporabljal pelinov ekstrakt za zdravljenje menstrualnih bolečin in revmatizma (Baker, 2001). Plinij starejši (23-79), rimski pisec, učenjak in častnik, je prav tako omenjal pelin v njegovem opusu 37 knjig Naravoslovje (Pliny the Elder, cit. po Lachenmeier, 2010).

V srednjem veku se je pelin uporabljal kot čistilo in sredstvo proti glistam, hkrati pa se je uveljavil kot »splošno zdravilo za vse bolezni« in so ga zaradi vsemogočnih zdravilnih lastnosti imenovali tudi »zdravilo z Marsa« (ang. »the herb of Mars«) (Padosch in sod., 2006; Baker, 2001). Zaradi grenkega okusa pa je pelin navdušil doječe ženske, da so si ga nanesele na bradavice prsi, ko so želele prenehati dojiti, kar je mogoče prebrati tudi v Shakespearejevem romanu Romeo in Julija (Padosch in sod., 2006).

V 16. stoletju se je namembnost pelina spremenila, ko je iz zdravilstva prešel k popularni pijači. Prva taka pijača je bila »Biser Tudorja Anglije«, vroče pivo z dodatkom pelina. Pierre Ordinaire pa naj bi bil tisti, ki je ustvaril recept za absint (Padosch in sod., 2006). Po njegovi smrti pa se je leta 1797 začela komercialna proizvodnja absinta. Nagel porast porabe te pijače se je začel konec 19. stoletja, ko so se po francoski okupaciji Alžirije francoski vojaki vrnili domov in odkrili, da je absint boljša alternativa za napitek iz pelina, ki so ga uživali med vojno, da bi se obvarovali pred notranjimi zajedavci in povišano temperaturo (Lanier, 1995, cit. po Padosch in sod., 2006).

Absint je postal zelo priljubljena pijača, saj naj bi spodbujal ustvarjalnost in imel poživljavač in zdravilen učinek, hkrati pa deloval kot afrodisiak (Cambelunghe in Melai, 2002). Vincent van Gogh, Pablo Picasso, Oscar Wilde, Ernest Hemingway, Edgar Allan Poe, Henri de Toulouse-Lautrec, Paul Gauguin, Edgar Degas in Charles Baudelaire so znana imena, ki so rada posegala po absintu (Skyles in Sweet, 2004; Foster in Johnson, 2006).

Po prepovedi absinta v začetku 20. stoletja, saj naj bi ta bil vzrok absintizma, bolezenskega stanja, katerega znaki so delirij, halucinacije, drgeti in krči, pa je danes »zelena vila«, kot so ga nekoč imenovali, v večini držav spet v prosti prodaji. Razlog za to je ugotovitev, da absintizem, kot so ga nekoč opisovali, danes ne podpira nobena znanstvena raziskava in je bil najbrž le napačno tolmačen alkoholizem, saj absint vsebuje veliko alkohola. Vsebnost tujona, ki velja kot eden izmed krivcev za absintizem, pa je bila takrat v precej manjših koncentracijah, kot je danes v EU njegova največja dovoljena količina v absintu (Lachenmeier in sod., 2008).

S pelinom aromatizirana je tudi zgodovinska pijača vermut, za izumitelja njenega prednika, aromatiziranega vina, pa velja Hipokrat. V srednjem veku, ko so Benečani imeli monopol nad trgovino z začimbami, so Italijo seznanili z aromatičnimi začimbami, ki se uporabljajo za Hipokratovo vino. V poznem osemnajstem stoletju je bil Torino, skupaj s Firencami in Benetkami, glavni center proizvodnje vermuta (Liddle in Boero, 2003).

Pelin, ki se je tradicionalno uporabljal kot antihelmintik, antiseptik, spazmolitik, antipiretik, stomahik, srčni stimulant in sredstvo za obnovo in zdravljenje vnetja ledvic ter za izboljšanje spomina, je danes znan kot *amarum-aromaticum* in ima dokazano antibakterijsko, fungicidno in insekticidno delovanje, deluje pa tudi proti malariji (Bora in Sharma., 2010a; Hernandez in sod., 1990; Kordali in sod., 2005; Jaenson in sod., 2005). Obetajoči so tudi rezultati znanstvenih raziskav vpliva pelina na kronovo bolezen (Omer in sod., 2007; Krebs in sod., 2010).

1.2 NAMEN DELA IN DELOVNA HIPOTEZA

Namen dela je ovrednotiti kakovost gojenih populacij pravega pelina, katerih semena izvirajo iz naravnih rastišč pelina v slovenskem Primorju. Semena so bila nabrana leta 2006 na treh različnih lokacijah v slovenskem Primorju (Zgornji Kras, Petrinjski Kras in Ležeški Gabrk pod Gabrško Goro) in maja 2008 posajena *ex situ* na Laboratorijskem polju Biotehniške fakultete v Ljubljani. Kakovost populacij smo vrednotili po predpisih Evropske farmakopeje in populacije med seboj primerjali glede na predpisane farmakopejske vrednosti.

Delovna hipoteza predvideva, da bo kakovost preizkušenih populacij pravega pelina ustrezala kakovosti, ki jo predpisuje Evropska farmakopeja za drogo *Absinthii herba*. Prav tako predvidevamo, da zaradi majhne medsebojne oddaljenosti naravnih rastišč izbranih populacij pelina med posameznimi genskimi viri ne bo statistično značilnih razlik v kakovosti.

Rezultati bodo lahko uporabljeni pri nadaljnjem vrednotenju naravnih populacij pravega pelina in načrtovanju strategij pridobivanja in uporabe pelina.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OPIS PELINA

2.1.1 Poimenovanje ter taksonomska in geografska klasifikacija

V Sloveniji se za pravi pelin (*Artemisia absinthium* L.) uporablja tudi samo izraz pelin, zasledimo pa še tretje ime, pelinka (Pahlow, 1987). V angleško govorečih deželah največkrat uporabljajo izraz wormwood, lahko pa tudi green ginger, wermut in absinthe. Nemški izraz za pelin je Wermut, italijanski assenzio maggiore, francoski pa absinthe. Pri naših južnih sosedih uporabljajo isto besedo kot mi, pelin, v Srbiji pa zraven dodajo še pridevnik beli, torej beli pelin (Skyles in Sweet, 2004; Valenčič in Spanring, 2000; Blagojević in sod., 2006).

Pravi pelin (*Artemisia absinthium* L.) uvrščamo v poddeblo kritosemenk (Angiospermae), razred dvokaličnic (Magnoliatae), red Asterales, družino nebinovk (Asteraceae), poddružino Asteroideae in tribus Anthemideae ter rod *Artemisia* (Wright, 2002; Baričević, 1996a).

Rod *Artemisia* sestavlja okoli 500 vrst po celem svetu in je največji rod skupine Anthemideae in eden večjih in najbolj porazdeljenih rodov družine nebinovk. Široko je razširjen v srednjih do večjih zemljepisnih širinah, kjer grmičaste vrste prevladujejo predvsem v hladnejših pa tudi vročih puščavah severne poloble. Vrste rodu *Artemisia* tvorijo obilo cvetnega prahu, ki ga lahko najdemo v sedimentih različnih geoloških dob in ga uporabljajo za pokazatelja stepskega podnebja (Bora in Sharma, 2010a; Watson in sod., 2002).

Rod *Artemisia* je po Bremerju in Humphriesu (1993) monofiletski, za katerega so značilni heterogamni sploščeni koški (krožčevi cvetovi so navadno dvospolni in plodni, jezičasti cvetovi pa enospolni, ženski) ali homogamni sploščeni koški (krožčevi cvetovi običajno dvospolni in plodni, jezičasti cvetovi pa manjkajo), pelod s kratkimi bodičkami ali brez njih (povezano z vetrocvetnostjo) in rožkami z debelimi stenami, brez reber (neizrazita rebra so včasih prisotna pri rodovih *Sphaeromeria* in *Crossostephium*).

Bora in Sharma (2010a) pa označujeta rod *Artemisia* s skupnimi glavnimi fitološkimi komponentami: terpenoidi, flavonoidi, kumarini, fenolnimi kisljinami, steroli in acetileni.

Pravi pelin (*Artemisia absinthium* L.) se pojavlja v različnih kemotipih eteričnega olja po celem svetu, glavna komponenta olja pa je tujon (Juteau in sod., 2003; Wright, 2002). Za pelin, ki se pojavlja v Evropi so bili ugotovljeni štiri značilni kemotipi: s sabinenom in z mircenom bogato eterično olje, olje bogato z α - in β -tujonom, z epoksicimenom bogato olje in olje bogato s (*E*)-sabinil acetatom. Najdeni so bili tudi nekateri mešani kemotipi (Orav in sod., 2006).

Čeprav naj bi pravi pelin izviral iz centralne Azije in step vzhodne Evrope ter se od tam prenesel po celotni Evropi in severni Afriki (Toplak Galle, 2000), pa največkrat velja za samoniklo rastlino zmerno toplega evropskega pasu, rastlino Azije in severne Afrike

(Assessment..., 2009). Razširil se je tudi v Severno Ameriko in Novo Zelandijo (Baričevič, 1996a), Wright (2002) pa zraven dodaja še severno in zahodno Azijo ter Afriko. Pridelujejo ga predvsem v Severni Ameriki, Franciji in Rusiji (Baričevič, 1996a).

2.1.2 Botanični opis

Pravi pelin (*Artemisia absinthium* L.) je dišavna zelnata trajnica, ki uspeva v kulturi do 6 let (Valenčič in Spanring, 2000; Baričevič, 1996a). Je srednje visoke rasti (60 do 100 cm), ima pokončne srebrno sive veje z manjšimi zelenimi zgornjimi in večjimi sivkastimi spodnjimi listi. List so dvojno do trojno pernati z ozkimi segmenti, ki so na koncu topi, posamezni listi pa so suličasti. Spodnji listi so na daljših pecljih. Socvetja so koški rumene barve velikosti 3 do 4 mm, kimasti, polobli in v večkrat sestavljenem socvetju, prekrite z belimi dlačicami, ki pa jih obdajajo beli čašni listi. Kromosomsko število je $2n = 18$ (Pahlow, 1987; Derwich in sod., 2009; Tutin in sod., 1996).

Pelin raste v neobdelanih, zračnih (peščeno-ilovnatih ali apnenčastih) tleh, na skalnatih pobočjih in ledinah. Najbolje uspeva na sončnih do delno senčnih legah in precej dobro prenaša sušo (Baričevič, 1996a; Foster in Johnson, 2006; Assessment..., 2009).

Poleg generativnega razmnoževanja lahko pelin razmnožujemo še z delitvijo starih korenin spomladi ali jeseni. Najuspešnejše pa sami vzgojimo pelin tako, da zgodaj spomladi posejemo pelin v zabožčke in maja sadike presadimo na stalno mesto na razdaljo 50×40 cm. V prvem letu pelin še ne cveti, zato je možno obirati le liste, ki pa jih je malo. Od drugega leta naprej pa sta možni dve žetvi, poletna in jesenska (Valenčič in Spanring, 2000; Baričevič, 1996a).

Pelinu podoben je navadni pelin (*Artemisia vulgaris* L.), ki je brez tipičnega vonja in okusa (Toplak Galle, 2000).

2.2 SESTAVA DROGE PRAVEGA PELINA

Drogo pravega pelina (*Absinthii herba*) predstavljajo posušeni nadzemni deli rastline. Evropska farmakopeja definira surovo drogo kot bazalne liste ali rahlo olistane cvetoče vrhove, ali pa mešanico obeh posušeni, celih ali narezanih organov.

2.2.1 Eterično olje

Eterična olja so hlapne zmesi biogenih spojin, med katerimi prevladujejo mono- in seskviterpeni in aromatski fenilpropanovi derivati (Baričevič, 1996b).

Ena izmed značilnosti eteričnega olja je tudi ta, da ko kanemo kapljico olja na papir in ga pustimo čez noč, se drugi dan na papirju oljni madež več ne pozna.

2.2.1.1 Vsebnost eteričnega olja v drogi *Absinthii herba*

V literaturi lahko najdemo dva zapisa količine eteričnega olja, kot koncentracijo v ml na kg suhe snovi ali kot masni delež (% m/m).

Znanstvena posvetovalna komisija za zdravljenje z rastlinami ESCOP (2003) objavlja razpon vsebnosti eteričnega olja pravega pelina med 0,2–1,5 %.

V raziskavi droge pravega pelina, ki so bila na voljo v lekarnah različnih evropskih držav med letoma 2000 in 2004, so Orav in sod. (2006) ugotovili razpon vsebnosti eteričnega olja od 0,1–1,1 %. Največjo vsebnost olja je dosegla droga pelina iz Estonije (0,8-1,1 %), prav tako visoko pa se je z vsebnostjo eteričnega olja uvrstila Škotska (0,8 %). Vzorci iz Armenije in Španije niso zadostovali zahtevam Evropske farmakopeje (>0,2%), saj so vsebovali le 0,1 % eteričnega olja. V analizi so bili še vzorci iz Francije, Madžarske, Belgije, Rusije, Grčije, Ukrajine, Moldavije, Latvije, Litve, Italije in Nemčije.

Derwich in sod. (2009) so v drogi *Absinthii herba* iz pokrajie Guigou in Errachidia v Maroku izmerili 0,57 % eteričnega olja (ml/100 mg suhe snovi).

Izplen eteričnega olja droge pravega pelina iz divjih rastišč v Iranu je 1,3 % (Rezaeinodehi in Khangholi, 2008).

Pelin, nabran v vzhodni Turčiji, je vseboval 0,15 % eteričnega olja (Kordali in sod., 2006).

V španskih Pirenejih rastoči pelin vsebuje 0,28–0,42 % eteričnega olja brez vsebnosti tujona, kar je zanimivo za industrijo pijač (Ariño in sod., 1999a).

V Srbiji so Blagojević in sod. (2006) preučevali dve populaciji pravega pelina iz jugovzhodne Srbije. Vsebnost eteričnega olja v drogi *Absinthii herba* je bila 0,29 %, meritve pa so ponovno izvedli tudi po enem letu skladiščenja droge in donos je bil znatno manjši, 0,08 %.

2.2.1.2 Komponente eteričnega olja pravega pelina

Glavne funkcionalne skupine v eteričnem olju predstavljajo (Judþentienë in Mockutë, 2004; Kordali in sod., 2006; Rezaeinodehi in Khangholi, 2008):

- monoterpeni ogljikovodiki (0,4-47,8 %),
- oksigenirani monoterpeni (23,5-66,7 %),
- seskviterpeni ogljikovodiki (5,1-10,8 %),
- oksigenirani seskviterpeni (4,3-19,9 %)
- spojine s sabinenskim ogrodjem (29,3–61,0 %).

V ESCOP monografiji *Absinthii herba* (2003) so za glavne komponente eteričnega olja zeli pravega pelina označene cis-epoksiocimen, β -tujon, trans-sabinil acetat in/ali krizantenil acetat. Vsaka izmed njih lahko predstavlja preko 40 % eteričnega olja. V manjših količinah je lahko prisoten tudi α -tujon (ponavadi manj kot 3 %), prisotni pa so tudi mnogi drugi monoterpeni in seskviterpeni.

Eterično olje *Absinthii herba* vsebuje β -tujon kot glavno komponento kot tudi tujil alkohol, azulen, bisabolen in druge. Seskviterpeni laktoni so prav tako prisotni, še posebej absintin, anabsintin, artemetin, artabsinolidi A, B, C in D, artemolin in drugi. V olju so tudi flavonoidi (Heinrich in sod., 2004).

Foster in Johnson (2006) sta kemične komponente eteričnega olja droge pravega pelina razdelila v tri glavne skupine: seskviterpenski laktoni (absintin, anabsintin, artabsin), azuleni in tujon.

Sestava eteričnega olja droge pravega pelina (*Absintii herba*) zavisi od izvora, kemotipa in sezone. Glavne štiri komponente so α -tujon, (*Z*)-epoksiocimen, trans-sabinil acetat in krizantenil acetat (Carnat in sod., 1992; Blaschek in sod., 2006).

Glavne komponente eteričnega olja pelina iz regije Gigou v Maroku so α -tujon (39,69 %), sabinil acetat (10,96 %), β -tujon (7,25 %), 1,8-cineol (2,10%), krizantenil acetat (2,05 %), krizantenon (1,35 %) in spatulenol (1,12 %) (Derwich in sod. 2009).

Ariño in sod. (1999b) so ugotovili, da so *cis*-epoksiocimen in *cis*-krizantenil acetat glavne komponente v eteričnem olju pelina iz Španije in predstavljajo 75–80 % eteričnega olja. Ostale pomembne komponente so še linalool, *cis*-krizantenol, *cis*-ocimen in *trans*-epoksiocimen.

Jaenson in sod. (2005) so kot karakteristične komponente eteričnega olja listov pelina iz južne Švedske ugotovili sabinen, oksigenirane monoterpe (tujenol in linalool) in geranil acetat.

Orav in sod. (2006) so v eteričnem olju identificirali 107 komponent, ki so predstavljale več kot 85 % celotne mase olja. Glavne komponente, katerih vsebnost je bila več kot 6 %, so bile: sabinen (0,9-30,1 %), mircen (0,1-38,9 %), α -felandren (0-7,2 %), *p*-cimen (0,2-9,6 %), 1,8-cineol (0,1-18,0 %), artemisia keton (0-14,9 %), linalool in α -tujon (1,1-10,9 %), β -tujon (0,1-64,6 %), *trans*-epoksiocimen (0,1-59,7 %), *trans*-verbenol (0-11,7 %), karvon (0-18,5 %), (*E*)-anetol (0-7,1 %), (*E*)-sabinil acetat (0-70,5 %), timol (0-10,2 %), karvakrol (0-9,7 %), kurkumen (0-7,0 %), neril butirrat (0,1-13,9 %), neril 2-metilbotanoat in spatilenol (0,1-9,2 %), neril 3-metilbutanoat (0,4-7,3 %), α -bisabolol (0-7,5 %) in kamazulen (0-6,6 %).

Rezaeinodehi in Khangholi (2008) ugotavljata, da največji delež eteričnega olja iranskega pelina predstavlja skupina terpenoidov (75,4 %) od skupno prepoznanih 93 % spojin. Glavni sestavini sta β -pinen (23,8 %) in β -tujon (18,6 %). Sledijo jima sabinen, kubenol, linalool, mircen, α -pinen, α -dehidro-ar-himakalen, α -felandren in germacren.

Judpēntienē in Mockutē (2004) sta v analizi olja pravega pelina iz divjih rastišč v Vilni (Litva) ugotovili, da je glavna komponenta tujon (*cis* in *trans*: 11,2-36,3 %) ali *trans*-sabinil acetat (20,0–36,0 %). Druga glavna sestavina je *trans*-sabinil acetat (9,8-22,1 %), tujon (10,2-12,5 %), *trans*-sabinil acetat (9,8-22,1 %) ali *cis*-krizantenil acetat (11,1 %). Tretja prevladujoča komponenta je predvsem β -pinen (4,3-10,4%) in pa mircen (3,9%), 1,8-cineol (7,1 %) ter *trans*-sabinil acetat (8,8 %). Največji delež olja predstavljajo oksigenirani monoterpeni (47,1-66,7 %).

2.2.1.2.1 Tujon

α - in β - tujon (*cis*- in *trans*-) se nahajata skupaj v eteričnih oljih in delih rastline pravega pelina (*Artemisia absinthium*), žajblja (*Salvia officinalis*), muškatne kadulje (*Salvia*

sclarea), navadnega vratiča (*Tanacetum vulgare*) ter v vrstah brinov (*Juniperus* spp.) in ceder (*Cedrus* spp.) (EU Scientific Committee on Food, 2003).

Monoterpen α -tujon je modulator γ -masleno kislinskega (GABA) tipa A receptorjev zato pospešuje delovanje možganov. Kot ostali monoterpeni je lahko presnovljiv, produkta encimske redukcije pa sta tujol in neotujol. Po vnosu v organizem ledvični sistem pospešeno pretvori α -tujon v 7-hidroksi- α -tujon, diastereomere 4-hidroksitujon in druge hidroksitujone. V primerjavi z β -tujonom je α -tujon 2,3 krat bolj toksičen (Höld in sod., 2000).

Čeprav naj bi tujon veljal kot aktivator receptorjev odgovornih za zastrupitev z marihuano, je pokazal majhno afiniteto za kanabinoidne receptorje pri podganah (Meschler in Howlett, 1999).

Zaradi zgodovine pelina, predvsem absinta in domnevnih posledic, za katere naj bi bil odgovoren tujon, je danes po predpisih Evropske unije največja dovoljena vrednost alfa in beta tujona v prehrabnih izdelkih in brezalkoholnih napitkih 0,5 mg/kg. Zakonodaja pa je drugačna za naslednje izjeme: 5 mg/kg v alkoholnih pijačah z največ 25 vol.% alkohola, 10 mg/kg v alkoholnih pijačah z več kot 25 vol.% alkohola, 25 mg/kg v prehrani iz pripravkov, ki so osnovani na žajblju in 35 mg/kg v grenčicah (Annex..., 1988).

Lachenmeier in sod. (2006b) ugotavljajo, da je vsebnost tujona v pelinu zelo spremenljiva glede na kemotip rastline, čas žetve in klimatske ter sušilne razmere.

Zaradi velike vsebnosti tujona v eteričnem olju pravega pelina ta deluje insekticidno (Derwich in sod., 2009).

2.2.1.3 Spremenljivost sestave in vsebnosti eteričnega olja

Rezaeinodehi in Khangholi (2008) povzemata različne dejavnike, ki vplivajo na sestavo in donos eteričnega olja skupine rastlin iz poddružine Anthemideae. Te so čas žetve, gnojenje in pH tal, način in čas sušenja, geografski položaj, podvrsta, rastlinski del, genotip in metoda ekstrakcije.

Kot smo omenili že prej, pa velja, da sestava eteričnega olja droge pravega pelina (*Absinthii herba*) zavisi od izvora, kemotipa in sezone (Carnat in sod., 1992; Blaschek in sod., 2006).

Chialva in sod. (1983) ter Ariño in sod. (1999b) ugotavljajo tudi, da so sezonska nihanja v sestavi olja skozi leto in razlike med svežimi in posušenimi rastlinami zanemarljive v primerjavi z razlikami med različnimi kemotipi.

Relativna vsebnost oksigeniranih monoterpenov, kot sta npr. sabinol in sabinil acetat, je pri pravem pelinu večja v listih kot pa v cvetovih (Judpientienė in Budiene, 2010).

2.2.1.3.1 Geografski položaj

Orav in sod. (2006) so preučevali eterično olje pravega pelina iz različnih evropskih držav. Italijansko eterično olje pravega pelina vsebuje veliko vsebnost karvona (18,5 %) in karvakrola (9,7 %). Največja vsebnost neril butanoata (13,9 %) in spojina s kurkumensko strukturo (11,3 %) je bila ugotovljena v vzorcu iz Francije. Največja vsebnost 1,8-cineola (18,0 %) je bila značilna za vzorec iz Španije; največja vsebnost *trans*-verbenola je bila ugotovljena v vzorcih Latvije in Litve (9,2 % in 11,7 %). Velika vsebnost oksigeniranih seskviterpenov (11,9–29,8 %) je bila značilna za vzorce iz Italije, Latvije, Litve in Nemčije. Glavne komponente v tej skupini so bile kurkumenske oksigenirane spojine (2,2–7,4 %). Eterično olje nemškega pelina je vsebovalo 7,5 % α -bisabola. Le armenski pelin pa je bil bogat s hamazulenom (6,6 %), medtem ko je bila njegova vsebnost v ostalih vzorcih 0–2,1 %.

Bononi in sod. (2006) so primerjali gojen pelin istega genetskega izvora, kemotipa bogatega z α - in β -tujonom, ki raste na različnih nadmorskih višinah v dolini Valcamonica v vzhodnem delu regije Lombardija v Italiji. Povprečna proizvodnja stebel in suhe biomase v naravnih tleh pod nadmorsko višino 1000 m (240 in 650 m) je bila znatno manjša, kot tista na tej nadmorski višini in višje (1000, 1100 in 1250 m). Analize eteričnega olja pa so pokazale, da sestava eteričnega olja droge pravega pelina in nadmorska višina rasti nista soodvisni.

2.2.1.3.2 Kemotip

Kemijska sestava eteričnega olja pravega pelina določa kemotaksonomske lastnosti. Opisani so bili mnogi kemotipi, njihove glavne komponente pa se razlikujejo predvsem glede na izvor rastline, pa tudi po rasti in razvojnih fazah rastline (Martín in sod., 2010).

Chialva in sod. (1983) so opisali štiri različne kemotipe, ki vsebujejo sabinil acetat, epoksiocimen, tujon in krizantil acetat.

Prav tako so Orav in sod. (2006) ugotovili, da so za pelin iz Evrope značilni štiri kemotipi: s sabinenom in miricenom bogato eterično olje, z α - in β -tujonom bogato olje, z epoksiocimenom bogato olje in s (*E*)-sabinil acetatom bogato olje.

Judpientienė in Mockutė (2004) ugotavljata, da pelin proizvede več različnih kemotipov eteričnega olja v različnih državah. Kemotip (*trans*-) tujon iz Hrvaške poleg glavne komponente vsebuje tudi večje količine (*Z*)-6,7-epoksiocimena. Nekatera olja iz severne Italije, Francije in Španije veljajo za kemotip (*Z*)-6,7-epoksiocimen in kemotip (*Z*)-krizantenil acetat in ne vsebujejo tujona. V Španiji sta bila določena še 2 kemotipa: olje s prej opisanimi komponentama, le da je v drugem (*Z*)-6,7-epoksiocimen prevladoval nad (*Z*)-krizantenil acetatom. (*Z*)-krizantenol je glavna sestavina različnih olj iz centralne Francije. V nekaterih oljih iz različnih držav pa je bila prevladujoča sestavina sabinil acetat. V nekaterih eteričnih oljih je tudi velika vsebnost tujenola in tujil acetata, mircena, kafre in 1,8-cineola. Najpogostejši so torej tujon, *trans*-sabinil acetat, *cis*-krizantenil acetat in epoksiocimen kemotip.

2.2.1.3.3 Čas žetve

Danes kombinacija mikrodestilacije in plinske kromatografije (GC) omogoča hitro testiranje kakovosti olja in s tem določitev optimalnega časa žetve (Hüsnü Can Baser in Buchbauer, 2010).

Judþentienë in Budiene (2010) ugotavljata, da v prvih listih pravega pelina prevladujejo frakcije monoterpenških ogljikovodikov, njihova količina pa se manjša v času razvoja plodov. Vsebnost *trans*-sabinil acetata je bila v času olistanja najmanjša (0,8 %), največja pa v času razvoja plodov, ko se je povzpela do 52,5 %. Največja vsebnost tujona je bila v času cvetenja.

Ariño in sod. (1999b) so naredili analize eteričnega olja droge pravega pelina, nabrane v 3-mesečnih intervalih. Sestava eteričnega olja listov in cvetočih vršičkov je imela podobno sestavo, letna nihanja vsebnosti sestavin pa so bila majhna. *Cis*-epoksiocimen in *cis*-krizantil acetat sta bili glavni sestavini olja (75–80 %), prvega je bilo več v olju iz listov pelina, drugega pa v olju iz cvetnih vršičkov.

Thao in sod. (2004) so pri navadnem pelinu (*Artemisia vulgaris* L.) merili vsebnost 1,8-cineola in β -pinena pred cvetenjem kot tudi na koncu cvetenja. Meritve so pokazale, da je vsebnost 1,8-cineola in β -pinena manjša pred cvetenjem, 10,0 % in 1,2 %, medtem ko sta vsebnosti teh komponent ob koncu cvetenja navadnega pelina večji, 24,0 % in 10,4 %.

2.2.1.3.4 Metoda ekstrakcije

Chiasson in sod. (2001) so ugotovili, da ekstrakcijske metode vplivajo na sestavo ekstrakta tako kvantitativno kot kvalitativno.

Arino in sod. (1999c) so izolirali olje s štirimi različnimi ekstrakcijskimi metodami: z vodno destilacijo (simultaneous distillation-extraction, SDE), z ekstrakcijo z mikrovalovi (microwave extraction, MWE), ekstrakcijo z ultrazvokom (ultrasonic extraction, USE) in s plinsko ekstrakcijo s tehniko vzorčenja iz nadprostora (headspace extraction, HSE). Pri vodni destilaciji se precejšen del eteričnega olja pridobi v kratkem času z enostavnim postopkom. Po 30 minutah so se ekstrahirale še visoko molekularne spojine in hamazulen ter neznane strukture amazulenskega tipa. Hamazulen se v eteričnem olju pojavi zaradi termične razgradnje artabsina. Pri HSE analizi, ki je enostavna, hitra in zelo občutljiva, so bile določene le najbolj hlapne spojine, visoko molekularne pa se niso pojavile. MWE in USE ekstrakcijski metodi se razlikujeta od SDE in HSE po obratnih vrednostih *cis*-epoksiocimena in *cis*-krizantenila in po tem, da ne ustvarita toplotno razgradljivih komponent (kot npr. hamazulen). Za najprimernejšo se je izkazala izolacija SDE, saj je sestava olja primerljiva s tisto, ki je pridobljena z MWE in USE. Vendar pa je zaradi pojava toplotne razgradnje potrebno izolacijo ustaviti po 30 minutah.

Martín in sod. (2010) so naredili poskus s superkritično tekočo ekstrakcijo (SFE) in izolirano eterično olje pelina primerjali s tistim, ki so ga dobili vzporedno z vodno destilacijo (HD) in ekstrakcijo v organskem topilu (OSE). Donos je bil največji pri ekstrakciji z organskim topilom, sledila je SFE in nato vodna destilacija. Vendar pa so se

destilati, pridobljeni z OSE in SFE ekstrakcijo v sestavi in izgledu močno razlikovali od tistih s HD ekstrakcijo (Martín in sod., 2010).

2.2.2 Druge sestavine

Poleg eteričnega olja se v drogi pravega pelina nahajajo še (Bora in Sharma, 2010a):

- seskviterpenski laktoni (arabsin, artabin, ketopelenolid, santoninu sorodni laktoni),
- tanini,
- karotenoidi,
- lignani,
- glukozidi absintina in anabsintina,
- fenoli,
- flavonoidi (flavoni, artemitin, rutin, glikozidi kvercetina ter klogenska in kavna kislina),
- grenčine (artamarin, artamaridin, artamaridinin, artamarinin, kebrahitol).

2.3 UPORABA

Droga pravega pelina deluje zaradi eteričnega olja in prisotnih grenkih spojin kot *amarum-aromaticum*, kar pomeni, da povzroča reflektorno sekrecijo želodčnega soka in s tem pospešuje in izboljšuje prebavo (Baričevič, 1996b). Poleg tega droga deluje še fungicidno (Badillo in sod., 2010;), insekticidno (Kordali in sod., 2006), antibakterijsko (Kordali in sod., 2005), kot repelent (Rezaeinodehi in Khangholi 2008; Jaenson in sod. 2005) in antihelmintik (Tariq in sod., 2009).

2.3.1 *Amarum-aromaticum*

Za grenak okus pelina so odgovorni seskviterpenski laktoni absintin, anabsintin in artabsin, v manjši meri pa tudi matricin (Toplak Galle, 2000; Skyles in Sweet, 2004; Kreft, 2000; Blaschek in sod., 2006; Hänsel in sod., 1999). Grenke sestavine stimulirajo okušalne živce v ustih in povečajo izločanje želodčnih sokov in žolča ter tako spodbudijo tek in prebavo. Nedavne raziskave pa kažejo, da okušalne receptorje ne najdemo le v ustnem epitelu, marveč tudi v želodčno-črevesnem traktu živali (Rozengurt, 2006).

Zaradi spodbujanja teka je pelinov prevretek ali preliv, ki se ga zaužije pol ure pred obrokom, učinkovit pri zdravljenju anoreksije. Pri dispepsiji pa topel napitek zaužijemo po jedi (ESCOP, 1996).

Grenkost, ki jo povzročajo seskviterpenski laktoni, je organoleptično še vedno moč čutiti tudi pri tako majhni koncentraciji, kot je 1 g na okoli 70 litrov (Padosch in sod., 2006).

Kot začimba in zaradi boljše prebavljivosti se dodaja zel pravega pelina tudi hrani, ki je sicer težje prebavljiva, predvsem mesnim jedem (gosja in račja pečenka, svinjina), lahko pa tudi juham, enolončnicam in ribam (Pahlow, 1987).

Pravi pelin je zelo pogost v grenkih alkoholnih pijačah (vermut, absint, pelinkovec), zato se te največkrat uporabljajo pred jedjo, kot aperitiv, ali po jedi, kot digestiv.

Absint in pelinkovec

Hribar in Vidrih (2009) sta v Tehnični dokumentaciji za geografsko označbo žgane pijače PELINKOVEC zapisala: Z geografsko označbo »Pelinkovec« se označi liker, proizveden izključno v Republiki Sloveniji, izdelan iz etanola ali destilata kmetijskega izvora oziroma ene ali več žganih pijač ali mešanice teh, z dodatkom sladkorja in naravnih izvlečkov pelina. Lahko se dodajo tudi izvlečki drugih zelišč ter arome in naravna barvila. Pelinkovec mora imeti intenzivno izražen okus in vonj po pelinu. Vsebovati mora najmanj 80 g sladkorja na liter in najmanj 25 vol. % alkohola in maksimalno vsebnostjo tujona iz prej omenjene direktive (glej 2.2.1.2.1).

V Idriji je poznana pijača geruš, ki je prav tako narejena iz pelina. Nekoč je bila priljubljena med rudarji, ker je bila, za razliko od vina, zelo poceni. Njena priprava je zelo enostavna, saj potrebujemo le pelin, alkohol in vodo. Pelin vremo v vreli vodi, nato precedimo in ohladimo ter na koncu sestavine zmešamo (Idrija Turizem, 2011).

Medtem ko je pelinkovec geografsko omejen, pa je absint lahko pijača proizvedena v katerikoli državi. Med bolj zgodovinsko znanimi so tisti iz Švice, Francije in Češke. Stari recepti ločijo med tremi kakovostmi absinta, *absint Suisse* (68–72 vol.% alkohola), *absint demi-fine* (50–68 vol.% alkohola) in *absint ordinaire* (45–50 vol.% alkohola). *Absint suisse* je veljal za najkvalitetnejšega in je bil pridobljen samo z destilacijo zelišč, medtem ko je bil pri ostalih dveh destilat pomešan z etanolom. V švicarskem zakonu v času prohibicije absinta je bila ta pijača definirana kot vsaka žgana pijača, ki je vsebovala aromatične spojine pelinove zeli v kombinaciji z drugimi aromatičnimi spojinami iz rastlin kot npr. janež ali komarček.

Prvi korak v tradicionalni proizvodnji absinta je maceracija zelišč. Sledi destilacija macerata, kjer dobimo destilat brez grenkih sestavin, saj so te večinoma nehlapne. Destilacija je opravljena v destilatorju v zelo tanki plasti, ki se počasi segreva v vodi ali vodni kopeli, da se izognemo prevretju, ki bi negativno vplivalo na kakovost izdelka. Destilacija se prekine pri alkoholni stopnji okoli 60 vol.%. Značilne, lahko hlapne, rahlo aromatične komponente pelinove arome se pojavijo v prvi frakciji med 80 in 60 % volumna. Destilacija se nikoli ne sme izvesti do konca, saj bi bil končen okus premočan in ne tako rahel. V naslednjem koraku se brezbarvnemu destilatu dodajo pelin in ostala zelišča za dosego tipične zelene obarvanosti pijače, ki je posledica vsebnosti klorofila, hkrati pa pridobimo blag grenak okus in ekstrakt nekaterih drugih aromatičnih sestavin. Ker se klorofil na svetlobi in povišani temperaturi zraka zlahka razgradi, je tipična barva tradicionalno pridelanega absinta blede zeleno-rumena. Na koncu pijačo zmešamo še z vodo, da dosežemo pitno jakost.

Tipične zgodovinske recepte so zapisali Duplais (1882), Fritsch (1891), Bedel (1899) in de Brevans (1908), zeliščna sestava, ki se uporablja poleg pelina, pa se od recepta do recepta razlikuje. Za dodaten okus ali/in obarvanje so bili dodani še janež, zvezdasti janež, navadna melisa, ožepok, brin, muškadni orešček, jetičnik, korenika angelike, koriander, kamilica ali peteršilj. Za vsako državo je bil tudi značilen svoj tip absinta. Npr. na Češkem so dodajali poprovo meto in nikoli janeža ali komarčka. V Švici so dodajali meliso, ožepok in koreniko angelike, v Franciji pa koriander (cit. po Padosch in sod., 2006).

2.3.2 Insekticidno delovanje

Kordali in sod. (2006) so testirali delovanje eteričnih olj treh vrst rastlin iz rodu *Artemisia* na črnem žitnem žužku (*Sitophilus granarius* L.). Tako pravi pelin kot ostali dve vrsti so na črnega žitnega žužka učinkovale podobno toksično (do 90 %), za toksične komponente pa so veljale glavne spojine njihovega eteričnega olja (1,8-cineol, kafra, terpinel-4-ol, α -terpineol, borneol in bornil acetat).

Insekticidno delovanje treh različnih vrst iz rodu *Artemisia* so testirali tudi Derwich in sod. (2009). Olje pravega pelina je glede na koncentracijo in čas tretiranja delovalo različno uspešno (50–90 % umrljivost) na fižolarja (*Acanthoscelides obtectus*).

Ne le da eterično olje pravega pelina deluje kot strup na določene insekte, deluje nanje še preden se približajo tarči. Repelentno delovanje so ocenjevali Jaenson in sod. (2005) in ugotovili, da so zanj odgovorne glavne hlapne komponente mirtenil acetat, β -felandren, tujenol, sabinen, geranil acetat in linalool. Te so na zdravstveno najpomembnejšo vrsto klopa (*Ixodes ricinus* L.) delovale v različnih topilih različno repelentno (44,6-78,1 %).

Duke (2001) pa po Erichsen-Brown (1997) povzema, da so zaradi repelentnega značaja včasih pelin dodajali črnilu, s katerim so pisali knjige, in tako preprečili, da bi jih uničile miši.

2.3.3 Fungicidno, antibakterijsko in antihelmintično delovanje

Martín in sod. (2010) poročajo, da sta komponenti eteričnega olja pravega pelina, ki lahko delujeta fungicidno, (*Z*)-epoksiocimen in krizantil acetat.

Kordali in sod. (2005) so ugotavljali fungicidno delovanje olja pelina kot tudi drugih vrst iz rodu *Artemisia* na 34 kmetijsko patogenih vrst gliv. Po tretiranju se je rast gliv znatno zmanjšala, kar so pripisali glavnim komponentam eteričnega olja (hamazulen, nuciferol butanoat, nuciferol propionat, kariofilen oksid, (*Z*)-anetol, (*Z*)- β -ocimen, (*E*)- β -ocimen in limonen).

Poleg fungicidnega so Kordali in sod. (2005) dokazali tudi antibakterijsko delovanje pravega pelina in ostalih vrst rodu *Artemisia*. Testirali so delovanje vrst na 64 različnih sevov bakterij, pri čemer se je poleg vrste *Artemisia santonicum* najboljše izkazal tudi pravi pelin.

Tariq in sod. (2009) so ocenjevali učinkovitost surovega vodnega in alkoholnega ekstrakta nadzemnih delov pravega pelina in jih primerjali z albendazolom, zdravilom zoper infestacijo z notranjimi zajedavci, pri zdravljenju želodčno-črevesnih nematod (*Haemonchus contortus*) pri ovcah. Čeprav je zdravilo po pričakovanjih delovalo najhitreje in najbolj učinkovito, pa sta se oba ekstrakta prav tako zelo dobro izkazala, alkoholni malo bolje kot vodni.

2.3.4 Ostala delovanja

Krizantil acetat je tudi spojina, ki zavira encime sinteze prostaglandina in deluje analgetično (Hendrik in sod., 1996).

Bora in Sharma (2010b) sta preučevala nevroprotektivni vpliv pravega pelina na lokalno ishemijo, ki je lahko tudi vzrok kapi, in možgansko poškodbo po reperfuziji. S svojo raziskavo sta pokazala, da pravi pelin znatno zmanjša možganski infarkt in oksidativni stres in tudi znatno izboljša vedenjske posledice med poškodbo po reperfuziji.

Antioksidativno delovanje so dokazovali Candanovic-Brunet in sod. (2005). V ekstraktu pravega pelina je precejšnja aktivnost zaznavnih prostih radikalov. Ugotovili so, da so za antioksidativno delovanje odgovorni fenoli in flavonoidi.

Mahmoudi in sod. (2009) so ugotovili dobro antioksidativno aktivnost metalnovega ekstrakta nadzemnih delov pravega pelina v času cvetenja. Antioksidativne učinke so pripisali fenolnim spojinam in označili pelin za lahko dostopen vir naravnih antioksidantov.

Prav tako so Mahmoudi in sod. (2009) vzporedno s poskusom antioksidativne vrednosti pravega pelina ugotavljali njegove antidepresivne potenciale. Izvedli so dva testa na miših, prisiljen plavalni test (FST) in test na repu (TST), kjer so rezultati pokazali znatno antidepresivno delovanje.

Poleg antioksidativnega delovanja flavonoidov pa so Lee in sod. (2004) ugotovili, da lahko pelin deluje tudi protivnetno.

Hernandez in sod. (1990) so pripravili tako vodni ekstrakt kot seskviterpen-laktonsko frakcijo iz pravega pelina in z njima testirali oviranje rasti povzročitelja malarije *Plasmodium falciparum*. Medtem ko je prva snov ovirala rast do 89,9 %, je druga delovala protozoicidno.

Že leta 1943 je Funkle pisal o alelopatičnem delovanju pravega pelina. Z zaviranjem kalitve nekaterih travniških rastlin z ekstrakti iz rodu *Artemisia* sta se ukvarjali tudi Hoffman in Hazlett (1977). Ugotovila sta, da vodni ekstrakt listov pravega pelina zavira kalitev semen vrste *Haplopappus spinulosus* in njivskega mošnjaka (*Thlaspi arvense*), najbolj pa vpliva na kalitev vrste trave iz rodu bodalice (*Stipa comata*).

2.3.5 Toksičnost in absintizem

Zaradi vsebnosti tujona, je uporaba pelina omejena na dobo 3–4 tednov (ESCOP, 2003), Assessment report on *Artemisia absinthium* L., herba (2009) pa dopušča uporabo droge pravega pelina trikrat dnevno v skupni količini 3.0 mg za obdobje največ 2 tednov.

Droga *Absinthii herba* je kontraindicirana med nosečnostjo, saj deluje abortivno, vpliva pa tudi na plodnost - ovira ovulacijo in implantacijo ploda. Uporabo prav tako odsvetujejo bolnikom s čiroso na želodcu in dvanajstniku (ESCOP, 2003; Rao in sod., 1987).

Prekomerno uživanje pripravkov iz pravega pelina lahko povzroči bruhanje, hudo drisko, zadrževanje urina ali občutek omamljenosti (Roth in sod., 2008).

Weisbord in sod. (1997) poročajo o primeru, ko je 31-letni moški preko spleta kupil eterično olje pravega pelina misleč, da je absint. Po zaužitju približno 10 ml kupljenega olja, je bil čez nekaj ur, kot ga je opisal njegov oče, vznemirjen, nekoherenten in zmeden, reševalci pa so opazili epileptiformne napade in krčevito držo telesa. Po sprejetju v bolnišnico je bil lenoben vendar agresiven, ravnodušen, vendar je lahko komuniciral in prepoznal ljudi, prostor in čas. Laboratorijski testi so pokazali hipernatriemijo (povečanje koncentracije natrija v krvi), hipokaliemijo (znižanje serumske koncentracije kalija) hipobikarbonatemijo (nenormalno znižana koncentracija bikarbonata v krvi). Naslednji dan je imel pacient precej intenzivne bilateralne bolečine v mišicah nog. 17. dan po zaužitju je bila koncentracija pacientovih krvnih elektrolitov, kinaze in kreatin kinaze normalna.

Večina podatkov o absintizmu je bila pridobljenih s kliničnimi raziskavami v 19. stoletju, ki pa jim primanjkuje zanesljivosti in klinične teže. Opažanja obnašanja pri kroničnih uporabnikih absinta so bila opisana kot epileptiformni napadi, okvara govora, motnje v spanju, duševna izčrpanost, slišne in vidne halucinacije ter tudi posledično smrt (Padosch in sod., 2006; Amory, 1868). Vsi ti znaki pa so tudi značilni za močan alkoholizem, ki se pri rednem in velikem uživanju visoko alkoholne pijače, kot je absint (do 72 vol.% alkohola) nedvomno pojavi. Zato danes znanstveniki (Lachenmeier in sod., 2010; Lachenmeier in sod., 2008) domnevajo, da je bil absintizem le napačno tolmačen alkoholizem. Še več, analize starih absintov, ki so jih opravili Lachenmeier in sod. (2008) kažejo, da je vsebnost tujona zelo majhna, saj je njegova vsebnost celo do 100-krat manjša od vrednosti NOEL (vrednost neopaznega učinka).

Kröner in sod. (2005) so ugotavljali učinke absinta na dva 65-kilogramska človeka. Vsak od njiju je v času 15 minut zaužil 110 ml absinta z vsebnostjo tujona 3,85 mg/l. 15, 30, 60 in 90 minut po zaužitju so osebama odvzeli vzorce krvi in preverili vsebnost alkohola in tujona. Medtem ko so vsebnost alkohola potrdili (koncentracija alkohola v krvi >1 g/l), tujona niso zaznali (zaznavna meja je 0,34 ng/ml). Osebi sta kazali očitne znake alkoholiziranosti, halucinogenega delovanja pa osebi nista opisali.

2.4 IDENTIFIKACIJA IN VREDNOTENJE KAKOVOSTI ZDRAVILNIH RASTLIN

Ne samo da se znotraj vrste *Artemisia absinthium* pojavljajo osebki, ki se razlikujejo po kemotipu, pač pa se genetski material pod različnimi vplivi okolja izrazi tudi različno fenotipsko. Da si lahko predstavljamo, kaj se bo iz semenskega materiala razvilo, moramo matične rastline čim podrobneje opisati. Prav v ta namen so pri Bioversity International skupaj z njihovimi predhodniki (International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) in International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI)) razvili deskriptorje, nekakšen potni list za posamezno rastlinsko vrsto, ki poda njen opis in oceno. Takšen točen zapis podatkov o izvoru, karakterizaciji in proizvodnosti semenskega materiala je ključnega pomena za njegovo učinkovito rabo in ohranitev vrste. Deskriptorji so torej *lingua franca* pri uporabnikih rastlinskih genetskih virov. Člani mednarodne skupine za zdravilne in aromatične rastline pri ECPGR (ECPGR Working Group on Medicinal and Aromatic Plants, ECPGR MAP WG) so na podlagi smernic za oblikovanje deskriptorjev Bioversity

International oblikovali deskriptorje za zdravilne rastline. Prav te smo uporabili v tem diplomskem delu za opis izbranih treh populacij pravega pelina (*Artemisia abinthium* L.).

Med najpomembnejše standarde vrednotenja kakovosti rastlinskih drog spadajo Evropska farmakopeja, ISO standardi in WHO direktive.

Vse tri populacije pravega pelina smo vrednotili po Evropski farmakopeji (Evropska farmakopeja 5.0, 2004). Ta predpisuje za drogo *Absinthii herba* mejne vrednosti za vsebnost eteričnega olja, tuje snovi, vode, celokupnega pepela in v klorovodikovi kislini netopnega pepela ter za grenkobno število, ki so:

- najmanj 2 ml/kg eteričnega olja v posušeni drogi,
- največ 5 % stebel s premerom večjim kot 4 mm in največ 2 % ostalih tujih snovi,
- največ 10 % izgube vode pri sušenju,
- največ 12 % celokupnega pepela,
- največ 1 % v HCl netopnega pepela,
- najmanjše grenkobno število 10 000.

3 MATERIALI IN METODE

Vrednotili smo kakovost treh populacij pravega pelina (*Artemisia absinthium* L.), katerih semena izvirajo iz slovenskega Primorja, gojili pa smo jih na Laboratorijskem polju Biotehniške fakultete v Ljubljani. Vrednotenje zeli pravega pelina (*Absinthii herba*) je potekalo po protokolih Evropske farmakopeje za to drogo, pri čemer smo opravili meritve eteričnega olja, grenkobnega števila, vsebnosti vode, celokupnega pepela in v klorovodikovi kislini netopnega pepela. Preden smo drogo poželi, smo vse tri populacije opisali z deskriptorji, ki so jih sestavili člani ECPGR MAP WG.

Delo je potekalo v obdobju med avgustom 2009 in novembrom 2010 na Laboratorijskem polju ter na Katedri za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko in Katedri za pedologijo in varstvo okolja Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

3.1 RASTLINSKI VZORCI

Rastlinski semenski material izvira iz treh lokacij iz slovenskega Primorja:

BFL34: Zgornji Kras, Petrinje, brežina na južnem robu glavne ceste, vzhodno od podvoza

Geografska širina (S): 45°34'26.74"

Geografska dolžina (V): 13°54'30.9"

Nadmorska višina: 410 m;

BFL35: Petrinjski kras, Petrinje, zahodno od ceste proti Črnotičam, pri odcepu kolovozov

Geografka širina (S): 45°34'19.69"

Geografska dolžina (V): 13°54'4.75"

Nadmorska višina: 449 m;

BFL47: Ležeški Gabrk pod Gabrško goro, ob železniški progi Divača – Vreme

Geografska širina (S): 45°40'56.99"

Geografska dolžina (V): 14°1'11.41"

Nadmorska višina: 467 m.

Preučevane populacije BFL34, BFL35 in BFL47 so bile posejane zgodaj spomladi leta 2008 in maja istega leta presajene na Laboratorijsko polje Biotehniške fakultete v Ljubljani:

Ljubljana, Jamnikarjeva 101, Laboratorijsko polje

Geografska širina (S): 46°2'54"

Geografska dolžina (V): 14°28'30.37"

Nadmorska višina: 292 m.

Na tej lokaciji smo pelin v fazi cvetenja v drugi polovici avgusta 2009 (v drugem letu starosti) fenotipsko opisali, nadzemne dele poželi in jih 2-3 dni sušili v sušilnikih pri 40 °C ter jih spravili v vreče in skladiščili v suhem prostoru do nadaljnjih analiz.

Ker so bile meritve opravljene z večjim medsebojnim časovnim razmikom (destilacija eteričnega olja v oktobru 2009, ocena grenkobnega števila v februarju 2010 in vsebnost vode ter pepela v novembru 2010), dopuščamo možnost, da se je kvaliteta droge v tem času spremenila oz. je padla.



Slika 1: Geografski položaj naravnih rastišč in mesta gojenja (označeni z rumenimi risalni žeblički) preučevanih populacij pravega pelina (Google Zemlja, 2011)

3.2 DESKRIPTORJI

Uporabljen material:

- Pravi pelin (*Artemisia absinthium* L),
- Posušena zel pravega pelina (*Absinthii herba*).

Uporabljeni pripomočki:

- seznam deskriptorjev ECPGR Working Group on Medicinal and Aromatic Plants,
- merilni trak,
- RHS barvna lestvica,
- tehtnica,
- trsne škarje,
- leseni zaboji,
- samokolnica,
- sušilnik s krožno ventilacijo,
- aparature ki se uporabljajo za določanje vsebnosti eteričnega olja (glej 3.3).

Postopek:

Za vsak deskriptor smo pri posamezni populaciji opravili naključnih dvajset meritev, vsako na drugi rastlini, če je le bilo možno. Večina deskriptorjev je bila številskih, zato smo te opravili s pomočjo merilnega traku ali štetja, pri opisnih deskriptorjih pa smo ravnali po subjektivni oceni (npr. oblika razraščanja, oblika lista ipd.). Pri deskriptorju »Barva stebela« smo uporabili RHS barvno lestvico. Ko smo zabeležili vse deskriptorje, smo rastline poželi, jih stehali in jih posušili v ventilacijskem sušilniku ter ponovno stehali biomaso. Pri tem moramo omeniti, da sta sveža in posušena biomasa vključevali tudi stebela, se pravi vse nadzemne dele rastline, in ne le listov ter cvetnih vrhov.

3.3 MERJENJE VSEBNOSTI ETERIČNEGA OLJA

Uporabljen material:

- droga pravega pelina (*Absinthii herba*),
- deionizirana voda,
- detergent za čiščenje aparature,
- droga poprove mete (*Menthae piperitae folium*) za čiščenje azulenskih ostankov na hladilnem delu Clevenger aparata.

Uporabljene aparature:

- buča (1000 ml),
- stojalo,
- tehtnica,
- čaše,
- grelec,
- pinceta,
- viala,
- Clevenger aparat.

Postopek:

Eterično olje smo dobili z vodno destilacijo droge s Clevenger aparatom.

Delovanje Clevenger aparata

Za izolacijo eteričnega olja iz pravega pelina v analitske namene je najpogosteje uporabljen Clevenger aparat, ki deluje na principu vodne destilacije. Ta poteka tako, da rastlinski material vpije vodo v procesu vrenja in ta prodre v oljne celice. Zaradi visoke temperature se vsebina oljnih celic razteza, kar poveča tlak znotraj celic, dokler te končno ne popokajo. Olje iz celic nato z difuzijo preide skozi celične stene in izpari s tokom vodne pare.

50 g nadrobljene droge pravega pelina smo pripravili v bučo in jo prelili s 500 ml deionizirane vode. Evropska farmakopeja narekuje tudi uporabo organskega topila ksilena za boljšo ločljivost eteričnega olja od vode in s tem točnejšo oceno njegovega volumna, vendar smo v našem primeru ksilen izpustili, saj je eterično olje pravega pelina dobro vidno zaradi svoje temne barve, prav tako pa je ksilen zdravju škodljiv.

Vzorci smo postavili na večji vrelci in segrevali na maksimalni stopnji (10), dokler vsebina buče ni zavrela. Da smo preprečili nastajanje mehurčkov, smo takoj po začetku vrenja prilagodili temperaturo na stopnjo 5. Ob koncu destilacije, ki je trajala 3 ure, smo odčitali volumen eteričnega olja in destilat ujeli v vialo.

Po vsaki destilaciji smo bučo izpraznili in jo umili z detergentom, navadno in deionizirano vodo. Clevenger aparat smo prav tako umivali na enak način kot bučo, le na vsake 2 do 3 destilacije je bilo potrebno hladilni del aparata očistiti vidnih azulenskih ostankov, kar nam je uspelo z vmesno destilacijo droge poprove mete (*Menthae piperitae folium*).

Izračun vsebnosti eteričnega olja v drogi [ml/kg]:

$$1000 * V_{EO} / m_0 \quad \dots(1)$$

kjer je:

V_{EO} - odčitani volumen eteričnega olja (destilata) [ml],

m_0 - masa vzorca (droge) [g].

3.4 UGOTAVLJANJE GRENKOBNEGA ŠTEVILA

Uporabljen material:

- droga pravega pelina (*Absinthii herba*),
- kininijev hidroklorid,
- voda,
- deionizirana voda.

Uporabljene aparature:

- vodna kopel,
- čaše,
- steklene palčke,
- erlenmajerice,
- plastični kozarčki za okušanje,
- merilni valj,
- pipeta,
- filtri,
- lijak.

Postopek:

Grenke sestavine lahko določimo kemično, vendar je skupni rezultat posameznih komponent (2 ali več) mogoče ugotoviti le s pokušanjem.

Kakovost oz. grenkost grenkih drog in grenčin podajamo s t.i. grenkobno vrednostjo, ki nam pove tisto redčenje droge ali grenčine z vodo (g/ml), pri katerem še čutimo grenak okus raztopine (izvlečka). Ker je pokušanje lahko zelo subjektivno, vzporedno testiramo kininijev hidroklorid z znano grenkobno vrednostjo in s tem omilimo napako.

Test naj bi opravilo vsaj 7 ljudi (neparno število), v našem primeru pa je bilo teh znatno več, saj so grenkobno število določevali študenti v okviru laboratorijskih vaj.

Raztopina kininijevega hidroklorida

Pred okušanjem raztopine pelina smo določiti korekcijski faktor, s katerim smo zmanjšali subjektiven vpliv rezultatov okušanja raztopine pravega pelina. Založno raztopino kininijevega hidroklorida smo pripravili tako, da smo 0,100 g kininijevega hidroklorida razredčili z navadno vodo do volumna 100,0 ml, 1,0 ml te raztopine pa nadaljnje redčili z istim topilom ponovno do 100,0 ml. Serijo redčitev, ki so nam služile kot referenčne raztopine kininijevega hidroklorida so podane v preglednici 1.

Preglednica 1: Serija redčitev referenčne raztopine kininijevega hidroklorida (Q – HCl) z navadno vodo (H₂O)

Redčitev	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Q - HCl (ml)	4,2	4,4	4,6	4,8	5,0	5,2	5,4	5,6	5,8
H ₂ O (ml)	5,8	5,6	5,4	5,2	5,0	4,8	4,6	4,4	4,2
Ocena (+/-)									

Referenčne raztopine poskušamo od redčitve 1 proti redčitvi 9. Pri raztopini, kjer začutimo grenak okus se test konča, koncentracijo kininijevega hidroklorida v tej redčitvi pa uporabimo v enačbi za korekcijski faktor:

$$k = n / 5,00 \quad \dots(2)$$

kjer je:

n – število ml založne raztopine kininijevega hidroklorida v raztopini z najmanjšo koncentracijo, pri kateri še čutimo grenak okus.

Ekstrakt pelina

1,0 g uprašene droge pelina smo dodali 1000 ml vrele vode in ob neprestanem mešanju na parni kopeli segrevali 30 minut. Nato smo v ohlajen ekstrakt dodali toliko vode, da je bil volumen ponovno 1000 ml, ga pretresli in prefiltrirali. Prvih 20 ml filtrata smo zavrgli, preostali del pa smo označili za izhodni ekstrakt C1. Nadaljnje smo C1 redčili kot prikazuje preglednica 2. Določanje grenkobne vrednosti se začne pri raztopini C4 in se nadaljuje proti C1. Testna skupina, pri kateri še čutimo grenak okus, dobi oznako D. Dilucijski faktor raztopine D je Y.

Preglednica 2: Serija redčitev ekstrakta pravega pelina po pravilih Evropske farmakopeje

Oznaka	Priprava	Dilucijski faktor (Y)	Ocena (+/-)
C1	filtrat	100	
C2	10,0 ml C1 razredčimo z vodo do 100 ml	1000	
C3	10,0 ml C2 razredčimo z vodo do 100 ml	10000	
C3A	20,0 ml C3 razredčimo z vodo do 100 ml	50000	
C4	10,0 ml C3 razredčimo z vodo do 100 ml	100000	

Zaradi velikih razlik pri okušanju smo poskus grenkobnega števila opravili v dveh serijah. V drugi je bila poleg ostalih na razpolago še redčitev 2A (Preglednica 3).

Preglednica 3: Serija redčitev ekstrakta pravega pelina po pravilih Evropske farmakopeje z našo dodano redčitvijo C2A

Oznaka	Priprava	Dilucijski faktor (Y)	Ocena (+/-)
C1	filtrat	100	
C2	10,0 ml C1 razredčimo z vodo do 100 ml	1000	
C2A	20,0 ml C2 razredčimo z vodo do 100 ml	5000	
C3	10,0 ml C2 razredčimo z vodo do 100 ml	10000	
C3A	20,0 ml C3 razredčimo z vodo do 100 ml	50000	
C4	10,0 ml C3 razredčimo z vodo do 100 ml	100000	

Ko smo določili raztopino D, smo naredili nadaljnje testiranje z redčitvami raztopine D, kot prikazuje preglednica 4.

Preglednica 4: Serija redčitev raztopine D

Raztopina D (ml)	1,2	1,5	2,0	3,0	6,0	8,0
Voda (ml)	8,8	8,5	8,0	7,0	4,0	2,0
Ocena (+/-)						

Volumen raztopine D, ki je razredčena do 10 ml, kjer v nadaljnjem testu še čutimo grenak okus, je dilucijski faktor X.

Grenkobno število izračunamo po naslednji formuli:

$$(Y * k) / (X * 0,1) \quad \dots(3)$$

kjer je:

Y – dilucijski faktor raztopine D

k - korekcijski faktor

X – dilucijski faktor razredčitve raztopine D, kjer še čutimo grenak okus.

3.5 UGOTAVLJANJE TUJIH PRIMESI, VODE, CELOKUPNEGA PEPELA IN V KLOOROVODIKOVI KISLINI NETOPNEGA PEPELA

Uporabljeni material:

- droga pravega pelina,
- 10 % HCl raztopina (270 ml 37 % HCl razredčene do 1000 ml),
- deionizirana voda za spiranje ostankov v HCl netopnega pepela iz talilnih lončkov.
-

Uporabljene aparature:

- vodno hlajeni analizni mlinček,
- steklene posodice z navijalnimi pokrovčki za shranjevanje zmletih vzorcev,
- tehtiči za določanje izgube vode pri sušenju,
- talilni lončki za določanje celokupnega pepela in v HCl netopnega pepela
- eksikator,
- sušilnik,
- žarilnik,
- peč,
- erlenmajerice,
- brezprašni filtri,
- steklene palčke,
- steklene čaše,
- stekleni lijaki,
- kovinska zajemalka,
- pincete,
- puhalka,
- električni kuhalnik,
- urna stekla,
- peščena kopel,
- kovinsko prijemalo za talilne lončke,
- tehtnica.

Postopek:

Ugotavljanje tujih primesi

Vsebnost tujih primesi smo ugotavljali z metodo makroskopske determinacije.

50 g droge smo razprostrli po papirnati podlagi. Najprej smo poiskali vsa stebela, ki imajo premer večji od 4 mm in jih stehali, nato pa izločili in stehali posebej še ostale tuje primesi. Vsebnost tujih primesi smo podali v masnih odstotkih glede na celotno suho maso vzorca za vsako kategorijo primesi posebej.

Izračun vsebnosti tujih primesi, podane kot masni delež [%]:

$$100 * m_x / m_0 \quad \dots(3)$$

kjer je:

m_x – masa suhega rastlinskega vzorca [g]

m_0 – masa tujih primesi [g].

Merjenje vsebnosti vode

V tehtiče, ki smo jih predhodno stehtali, smo dodali približno 2 g zmletega posameznega vzorca, ga pokrili s pokrovčkom in ponovno stehtali. Tehtiče smo nato z rahlo odkritimi pokrovčki čez noč sušili v sušilniku pri 105 °C. Naslednji dan smo popolnoma pokrili tehtiče in jih ohlajali v eksikatorju. Ohlajene smo nato stehtali.

Čeprav Evropska farmakopeja narekuje določanje vode pri 1 g vzorca, smo naše vzorce stehtali na okoli 2 g. S tem smo omogočili natančnejši izračun vsebnosti vode.

Izračun izgube pri sušenju, podane kot masni delež [%]:

$$100 * (m_0 - m_1) / (m_0 - m_r) \quad \dots(4)$$

kjer je:

m_0 – masa tehtiča in vzorca [g]

m_1 – masa tehtiča in zračno osušenega vzorca [g]

m_r – masa pripravljene tehtiča [g].

Merjenje celokupnega pepela

Talilne lončke smo oštevilčili, jih 1 uro žarili v peči pri 550 °C, ohladili v eksikatorju in stehtali. Vanje smo dodali absolutno suhe vzorce in lončke ponovno stehtali. Nato smo talilne lončke postavili na sežigalnik, da se je rastlinski material sežgal. Po sežiganju smo talilne lončke z vzorci postavili v peč in jih čez noč pustili pri 550 °C. Naslednji dan smo jih ohladili v eksikatorju in ponovno stehtali.

Izračun vsebnosti pepela, podane kot masni delež [%] :

$$100 * (m_1 - m_L) / (m_0 - m_L) \quad \dots(5)$$

kjer je:

m_0 - masa talilnega lončka in absolutno suhega vzorca [g]

m_1 – masa talilnega lončka in ostanka po žarenju [g]

m_L - masa pripravljene talilnega lončka [g].

Merjenje v HCl netopnega pepela

Celokupnemu pepelu smo v talilni lonček dodali 15 ml 10 % HCl, pokrili z urnim steklom in pustili vreti v peščeni kopeli 10 min ter ohladili. Medtem smo pripravili erlenmajerice z lijaki in vanje namestili brezprašne filtre. Ohlajeno vsebino talilnih lončkov smo prefiltrirali skozi brezprašni filter v erlenmajerice. S predhodno segreto deionizirano vodo smo sprali lončke in urna stekla ter nadaljevali s spiranjem filtrov dokler filtrat ni postal brezbarven (do oznake 100 ml v erlenmajerici). Po koncu spiranja smo brezprašne filtre zložili v talilne lončke, te pa ponovno postavili na sežigalnik in vsebino sežgali. Talilne lončke smo nato čez noč žarili v peči pri 550 °C. Po žarjenju smo lončke ohladili v eksikatorju in jih stehtali.

Izračun vsebnosti v klorovodikovi kislini netopnega pepela, podane kot masni delež [%]:

$$[(m_3 - m_1) / (m_2 - m_1)] * 100 \% \quad \dots(6)$$

kjer je:

m_1 - masa pripravljenega talilnega lončka [g]

m_2 - masa talilnega lončka in absolutno suhega vzorca [g]

m_3 - masa talilnega lončka in ostanka po determinaciji [g].

4 REZULTATI

4.1 DESKRIPTORJI

Deskriptorje smo večinoma popisali na Laboratorijskem polju BF, le meritve eteričnega olja in biomase smo opravili v laboratorijih. Številске vrednosti so povprečja opravljenih meritev (20 pri vsaki populaciji), opisne deskriptorje pa smo označili z znakom +. Pri številskih deskriptorjih smo preverili tudi statistično značilne razlike med populacijami z F-testom pri 95 % intervalu zaupanja (ANOVA, Statgraphics Plus). Ugotovili smo, da obstajajo statistično značilne razlike pri naslednjih deskriptorjih: »Najvišji vrh rastline«, »Število internodijev« in »Širina listnega segmenta«. Vendar pa v nadaljnji analizi s Kruskal-Wallis testom pri 95 % intervalu zaupanja, kjer smo primerjali mediane, statistično značilnih razlik ni bilo. Pri deskriptorjih, ki v tabeli nimajo vpisanih vrednosti, meritve niso bile izvedene.

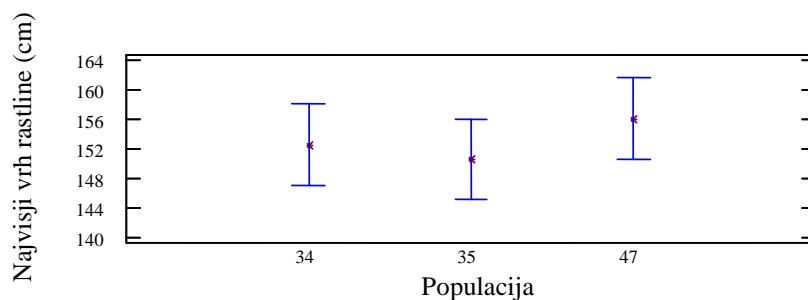
Preglednica 5: Deskriptorji za vsako posamezno preučevano populacijo pelina

	Populacija		
	BFL47	BFL35	BFL34
7.4 MORFOLOŠKI DESKRIPTORJI			
7.4.1 Rastlinski deskriptorji			
7.4.1.1. Razvojnja stopnja			
1 - Vegetativna faza			
3 - Brstenje			
5 - Začetek cvetenja			
7 - V polnem razcvetu	+	+	+
9 - Po cvetenju	+	+	+
11 - Semenska zrelost			
7.4.1.2 Smer rasti			
1 - Položno			
2 - Pokončno	+	+	+
7.4.1.3 Število stebel na rastlino	9,65	12,70	11,56
7.4.1.4 Najvišji vrh rastline	156,05	150,60	152,50
7.4.1.5 Variabilnost populacije			
1 - Visoka			
3 - Srednja	+		
5 - Nizka		+	+
7.4.2 Steblo			
7.4.2.1 Razrast stebela			
1 - Malo			
3 - Srednje	+		
5 - Močno		+	+
7.4.2.2 Barva stebela	148D	148D	148D
7.4.2.3 Število internodijev	29,90	28,60	30,10
7.4.2.4 Dolžina najdaljšega internodija	3,65	3,83	4,33
7.4.2.5. Gostota olistanosti			
1 - Redka			
3 - Srednje	+	+	+
5 - Gosta			

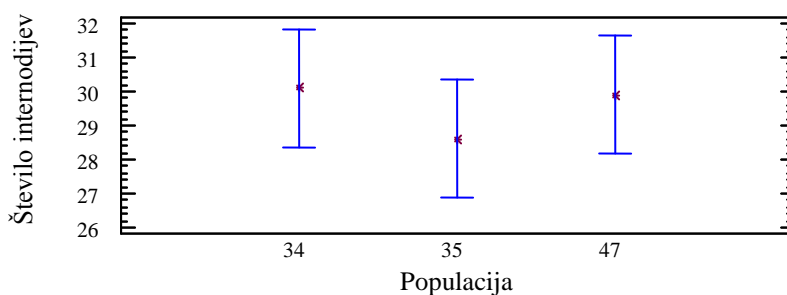
se nadaljuje

nadaljevanje

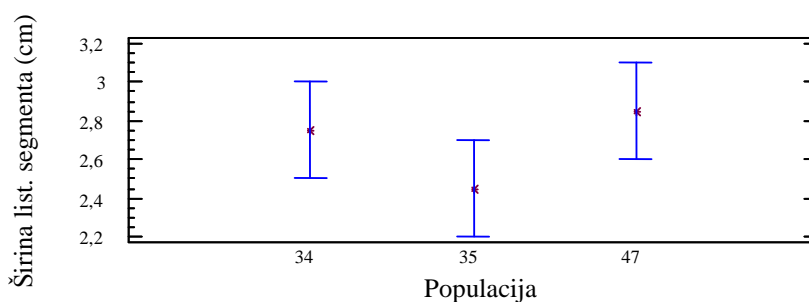
	Populacija		
	BFL47	BFL35	BFL34
7.4.3 List			
7.4.3.1 Oblika lista			
1 – Cel			
3 - Trikrat deljeni	+	+	+
5 - Spodnji listi dvakrat deljeni			
7 - Spodnji listi dvakrat ali trikrat deljeni			
7.4.3.2 Listni pecelj			
1 - Prisoten			
3 - Ni prisoten	+	+	+
7.4.3.3 Oblika listov cvetnega stbla			
1 - Večinoma celi			
3 - Večinoma deljeni	+	+	+
7.4.3.4 Oblika listnih segmentov			
1 - Topa			
3 - Okrogla			
5 - Ošiljena	+	+	+
7.4.3.5 Širina listnega segmenta	2,85	2,45	2,75
7.4.3.6 Spodnji listi v času cvetenja			
1 - Niso prisotni	+	+	+
3 - Prisotni			
7.4.3.7. Spodnji listi			
1 - Brez peclja			
3 - Pecljati			
7.4.4 Steblo s cvetovi			
7.4.4.1 Razdalja med tlemi in prvim cvetnim nodijem	69,70	70,00	75,25
7.4.4.2 Število cvetnih koškov na terminalnem nodiju	28,40	29,15	25,95
7.4.4.3 Dolžina cvetnih koškov	3,00	2,40	2,90
7.4.4.4 Širina cvetnih koškov	3,80	3,60	3,75
7.5 CITOLOŠKE LASTNOSTI			
7.5.1 Kromosomsko število			
2n = 18			
2n = 36			
7.6 KEMIJSKE LASTNOSTI			
Vsebnost eteričnega olja (%)	0,518	0,585	0,540
Eterično olje vsebuje večinoma			
1 - (Z) epoksiocimen in krizantenil acetat			
3 - (Z) epoksiocimen in β - tujon			
7.7 DESKRIPTORJI LETINE			
7.7.1 Starost rastline			
7.7.2 Čas cvetenja			
1 - Zgodnje cvetenje (1.-15. julij)			
3 - Srednje pozno cvetenje (15.-31. julij)			
5 - Pozno cvetenje (1.-15. avgust)	+	+	+
7 - Zelo pozno cvetenje (15.-31. avgust)			
7.7.3 Sveža biomasa na rastlino (g)	350,0	642,86	340,0
7.7.4 Suha biomasa na rastlino (g)	185,71	269,05	157,14
7.7.5 Pridelek rastlin (kg/ha)			
7.8 DOVZETNOST ZA BIOTSKI STRES			
7.8.1 Prisotnost bolezni			
1 - Da			
3 - Ne	+	+	+



Slika 2: Primerjava povprečij in zgornje ter spodnje meje 95 % intervala zaupanja za deskriptor »Najvišji vrh rastline (cm)« preučevanih populacij



Slika 3: Primerjava povprečij in zgornje ter spodnje meje 95 % intervala zaupanja za deskriptor »Število internodijev« preučevanih populacij



Slika 4: Primerjava povprečij in zgornje ter spodnje meje 95 % intervala zaupanja za deskriptor »Širina listnega segmenta« preučevanih populacij.

4.2 VSEBNOST ETERIČNEGA OLJA

Vsi vzorci so vsebovali znatno več eteričnega olja (od 0,98–1,24 %), kot je najmanjša vrednost predpisana po Evropski farmakopeji (najmanj 0,2 %). Ponovno smo opravili analizo z F-testom pri intervalu zaupanja 95 % in ugotovili, da se populacije med seboj statistično ne razlikujejo glede na vsebnosti eteričnega olja.

Preglednica 6: Vsebnost (volumen) eteričnega olja (ml) v 50 g posameznega vzorca droge pravega pelina (v 4 ponovitvah) pri preučevanih populacijah in masno volumski odstotek eteričnega olja (%_{EO}) ter povprečje (x_{povp}), standardni odklon (s) in koeficient variacije (KV%)

Vzorec	V (ml)	% _{EO}	Vzorec	V (ml)	% _{EO}	Vzorec	V (ml)	% _{EO}
BFL47/1	0,49	0,98	BFL35/1	0,55	1,10	BFL34/1	0,50	1,00
BFL47/2	0,54	1,08	BFL35/2	0,56	1,12	BFL34/2	0,56	1,12
BFL47/3	0,53	1,06	BFL35/3	0,61	1,22	BFL34/3	0,55	1,10
BFL47/4	0,51	1,02	BFL35/4	0,62	1,24	BFL34/4	0,55	1,10
x_{povp}	0,52	1,04		0,59	1,17		0,54	1,08
s	0,02	0,04		0,04	0,07		0,03	0,05
KV%	0,04	0,04		0,06	0,06		0,05	0,05

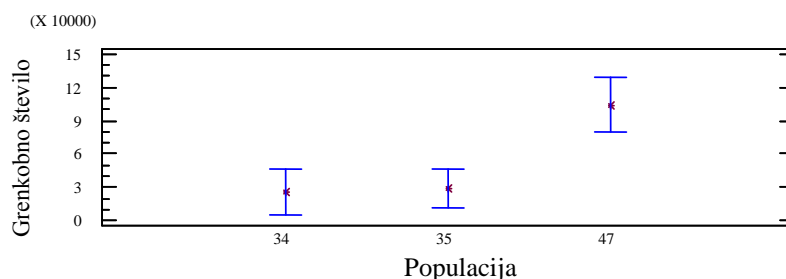
4.3 GRENKOBNO ŠTEVILO

Povprečne vrednosti grenkobnega števila vseh populacij so v skladu s predpisanim grenkobnim številom po Evropski farmakopeji, kar pomeni najmanj 10.000.

V prvem primeru, ko smo ugotavljali grenkobno število po izvorni redčitveni tabeli iz Evropske farmakopeje, so se populacije med seboj v ANOVA analizi z F–testom pri 95 % intervalu zaupanja statistično razlikovale, medtem ko po dodatni redčitvi 2A razlik ni bilo. V prvem primeru smo podatke nadaljnje analizirali s Kruskal-Wallis testom s prav tako 95 % intervalom zaupanja in statistično značilnih razlik med populacijami ni bilo. Pri tem je še vredno omeniti, da populacije niso imele enako število vzorcev, kar je tudi vplivalo na razlike statističnih analiz med populacijami.

Preglednica 7: Velikost vzorca (N_v), povprečno grenkobno število ($G\check{S}_{\text{povp}}$) in standardni odklon (s) pri posamezni populaciji pridobljenih s serijo redčitev ekstrakta pravega pelina po pravilih Evropske farmakopeje in s prilagojeno serijo redčitev

Populacija	Tabela Evropske farmakopeje			Prilagojena tabela		
	N_v	$G\check{S}_{\text{povp}}$	s	N_v	$G\check{S}_{\text{povp}}$	s
BFL47	15	104258,0	132769,0	21	59841,3	131650,0
BFL35	28	28416,3	22039,2	13	68257,7	172969,0
BFL34	21	25809,5	18605,4	21	101746,0	148227,0



Slika 5: Primerjave povprečij in zgornje ter spodnje meje pri 95 % intervalu zaupanja za grenkobno število po tabeli Evropske farmakopeje med preučevanimi populacijami

4.4 VSEBNOST TUJIH PRIMESI

Vse meritve tujih primesi so v skladu s predpisi Evropske farmakopeje (največ 5 % stebel, s premerom večjim od 4 mm, in 2 % drugih tujih primesi). Med populacijami ni statistično značilnih razlik pri 95 % intervalu zaupanja z F–testom pri ANOVA analizi.

Preglednica 8: Mase vzorcev droge m_0 , delež tujih organov in stebel ($\%_{TO/S}$) in delež ostalih tujih delcev ($\%_{TD}$) v posameznem vzorcu ter povprečje (x_{povp}), standardni odklon (s) in koeficient variacije (KV%) posameznih populacij

Vzorec				Vzorec				Vzorec			
BFL	m_0 (g)	$\%_{TO/S}$	$\%_{TD}$	BFL	m_0 (g)	$\%_{TO/S}$	$\%_{TD}$	BFL	m_0 (g)	$\%_{TO/S}$	$\%_{TD}$
47/1	50,118	0,162	0,000	35/1	50,029	0,000	0,212	34/1	50,060	0,000	0,040
47/2	50,016	0,000	0,066	35/2	50,001	0,000	0,306	34/2	50,021	0,000	0,048
47/3	50,061	0,000	0,120	35/3	50,091	0,000	0,084	34/3	50,038	0,000	0,002
47/4	50,114	0,000	0,100	35/4	50,085	0,383	0,070	34/4	50,048	0,498	0,064
x_{povp}		0,040	0,071	x_{povp}		0,096	0,168	x_{povp}		0,124	0,038
s		0,081	0,053	s		0,192	0,112	s		0,249	0,026
KV%		2,000	0,736	KV%		2,000	0,667	KV%		2,000	0,683

4.5 IZGUBA VODE PRI SUŠENJU IN VSEBNOST CELOKUPNEGA PEPELA TER V KLOORODIKOVI KISLINI NETOPNEGA PEPELA

Vzorci vseh populacij so vsebovali manj kot 12 % celokupnega pepela, manj kot 1 % v klorovodikovi kislini netopnega pepela in niso pri sušenju pri 105 °C izgubili več kot 10 % vode. Za vsako izmed kategorij smo z ANOVA analizo z F–testom pri 95 % intervalu zaupanja primerjali populacije in ugotovili, da se statistično ne razlikujejo.

Preglednica 9: Delež izgube vode pri sušenju ($\%_v$), delež celokupnega pepela ($\%_p$) in v klorovodikovi kislini netopnega pepela ($\%_{HClp}$) v absolutno suhih vzorcih (osušenih pri 105°C) ter povprečje (x_{povp}) in standardni odklon (s) posameznih populacij

Vzorec BFL	$\%_v$	$\%_p$	$\%_{HClp}$	Vzorec BFL	$\%_v$	$\%_p$	$\%_{HClp}$	Vzorec BFL	$\%_v$	$\%_p$	$\%_{HClp}$
47/1	9,47	7,29	0,49	34/1	9,06	6,94	0,42	35/1	8,97	6,69	0,15
47/2	9,56	7,52	0,48	34/2	8,94	6,81	0,47	35/2	9,58	7,32	0,49
47/3	9,56	7,09	0,43	34/3	9,31	7,24	0,49	35/3	9,52	7,38	0,43
47/4	9,35	6,58	0,08	34/4	9,17	7,27	0,57	35/4	9,61	7,43	0,74
47/5	9,34	7,27	0,81	34/5	9,47	6,66	0,29	35/5	9,29	6,66	0,24
x_{povp}	9,46	7,15	0,46	x_{povp}	9,19	6,99	0,45	x_{povp}	9,39	7,10	0,41
s	0,11	0,35	0,26	s	0,21	0,26	0,10	s	0,27	0,39	0,23

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Lastnosti populacij BFL47, BFL35 in BFL34 so pri opisnih deskriptorjih večinoma enake, tako velja, da je bila njihova razvojna stopnja v času opisovanja proti koncu polnega razcveta, kar pomeni, da populacije cvetijo pozno, to je med 1. in 15. avgustom. Barva stebela je prav tako pri vseh izenačena, sivo-zelena (148D). Vse tri populacije so pokončne rasti in so srednje gosto olistane. Listi so trikrat deljeni brez listnega peclja, oblika listnih segmentov pa je ošiljena. Širina listnega segmenta se med populacijami statistično razlikuje, njene vrednosti pa so 2,85 cm za BFL74, 2,45 cm za BFL35 in 2,75 cm za BFL34. Spodnji listi v času cvetenja niso prisotni. Populacija BFL47 je srednje variabilna in srednje razvejana, BFL34 in BFL35 pa sta močno razvejani in nizko variabilni. Čeprav vsi avtorji navajajo, da pravi pelin zraste nekje do največ 100 cm, so povprečne vrednosti vseh treh populacij precej višje in se gibljejo malo nad 150 cm, vendar se populacije med seboj statistično razlikujejo. Največ stebel imajo grmički populacije BFL35 (12,70), malo manj jih imata BFL34 (11,56) in BFL47 (9,65). Število internodijev se med populacijami prav tako statistično razlikuje, najdaljše ima populacija BFL34, 4,33 cm, nakrajše pa BFL47, 3,65 cm. Najdaljši internodij ima BFL34 (4,33 cm), BFL35 ji sledi z dolžino 3,83 cm in nato BFL35, 3,65 cm. Največ cvetnih koškov na terminalnem cvetnem nodiju ima populacija BFL35, 29,15, sledi ji BFL47 z 28,40 koški in BFL34 s 25,95 koški. Koški so široki 3,80 cm, 3,60 cm in 3,75 cm in dolgi 3,00 cm, 2,40 cm in 2,90 cm (BFL47, BFL35, BFL34). Barva koškov je rumena, vendar natančnega odtenka nismo zabeležili, saj ni bilo takega deskriptorja. Zato predlagamo dopolnitev seznama deskriptorjev za zdravilne rastline z deskriptorjem »Barva cvetov«. Pri nobeni izmed populacij pa nismo opazili prisotnosti bolezni, kar pomeni, da so rastline dobro dovzetne za biotski stres. To lahko pripišemo aktivnim sestavinam z dokazanim delovanjem, bodisi protimikrobnim, insekticidnim ali alelopatskim.

Zaradi enkratnega tehtanja biomase požetih nadzemnih delov, njihova statistična analiza ni bila mogoča in je predvsem pri populaciji BFL35 vidno veliko odstopanje, kar je še posebej nenavadno, saj so vrednosti meritev te populacije vedno na sredini (razen pri številu cvetnih koškov), medtem ko si največje in najmanjše vrednosti izmenjujeta ostali populaciji, BFL47 in BFL34.

Povprečne vsebnosti eteričnega olja v drogi so 5–krat tolikšne kot je najmanjša dovoljena meja (0,2 %) po Evropski farmakopeji. V najdeni literaturi smo zasledili večje vsebnosti le še v eteričnih oljih pravega pelina iz Estonije, 1,1 %, (Orav in sod, 2006), Sibirije, 1,2 %, (Chialva in sod., 1983) in Irana, 1,3 % (Rezaeinodehi in Khangholi, 2008). Največjo povprečno vsebnost eteričnega olja je imela populacije BFL35, 1,17 %. Največja izolirana vsebnost eteričnega olja pravega pelina vzorca BFL35/4 (1,24 %) pa je manjša le od tiste, ki jo navajata Rezaeinodehi in Khangholi (2008). Lahko bi rekli, da je vsak vzorec vseboval vsaj 1,0 % eteričnega olja (le vzorec BFL47/1 ima manjšo vsebnost, 0,98 %, vendar smo pri začetku destilacije imeli težave s penjenjem in uhajanjem olja, zato je možno, da se je nekaj olja porazgubilo). Povprečni vsebnosti eteričnega olja populacij BFL34 in BFL47 sta 1,08 % in 1,04 %.

Čprav je povprečno grenkobno število pri vseh treh populacijah v skladu z Evropsko farmakopejo (najmanj 10 000), je njihova teža vprašljiva, saj smo pri metodi naleteli na mnogo pomanjkljivosti. Prva pomanjkljivost nastane pri okušanju redčitev založne raztopine kininijevega hidroksida. Navodila narekujejo, da moramo izločiti osebe, ki ne zaznajo grenkega okusa pri najmanjši referenčni raztopini, to je 5,8 ml založne raztopine razredčene z vodo do volumna 10 ml. Zato velikosti vzorcev močno variirajo, razmerje populacije BFL47 proti populaciji BFL35 je skoraj 2:1 (28:15). Ker smo grenkobno število ugotavljali s pomočjo študentov pri laboratorijskih vajah, je najbrž prišlo do črednega nagona in s tem do izpada večjega števila ponovitev. Napako pri tem je treba tudi pripisati slabše izbranim okuševalcem in ne le temu delu metode samemu. Druga in velika pomanjkljivost je preozko nastavljena širina izbora dilucijskega faktorja, torej prevelike razlike med redčitvami ekstrakta pelina na prvi stopnji. Preskok med dilucijskim faktorjem dveh redčitev je po večini 10–kratno (100, 1000, 10 000, 50 000 in 100 000). Mi smo zato ponovno opravili meritve grenkobnega števila s prilagojeno tabelo, dodali smo namreč redčitev C2A (5000). Morda ravno zaradi dodane redčitve v tem primeru med populacijami v grenkobnem številu ni statistično značilnih razlik, kar pa za okušanje po izvorni redčitveni tabeli Evropske farmakopeje ne velja. Nenazadnje pa ne smemo pozabiti na subjektivnost metode, saj kljub temu, da imamo ljudje enako zasnovana čutila za okušanje, med posamezniki prihaja do razlik. Vendar pa je določanje grenkosti snovi organoleptično veliko bolj primeren in enostaven način, kot kemijska analiza grenkobnih sestavin. Povprečne vrednosti grenkobnega števila vseh populacij pri obeh načinih merjenja je med 25 809,5 in 104 258,0, kar je primerljivo z grenkobno vrednostjo pravega pelina analiziranega na Poljskem, to je 34 000–83 000 (Geszyrch in sod., 2008).

Izguba vode pri sušenju je pri vseh vzorcih v skladu s pravili Evropske farmakopeje (največ 10 %), kar pomeni, da smo požeto drogo pravega pelina ustrezno posušili in skladiščili. Najmanjšo vsebnost vode ima populacija BFL34, malo večjo pa BFL35 in največjo BFL47, vendar so razlike v vsebnosti vode med populacijami zelo majhne.

Tudi vsebnost celokupnega pepela (manj kot 12 %) in v klorovodikovi kislini netopnega pepela (manj kot 1 %) se povsem sklada z Evropsko farmakopejo. Povprečna vsebnost celokupnega pepela se pri vseh populacijah giblje okoli 7 % (glej preglednico 9), največja pa je pri populaciji BFL47, sledi BFL35 in BFL34. Ker pravega pelina na polju nismo tretirali s fitofarmaceutskimi sredstvi ali kakršnimi koli drugimi pripravki, predstavlja analizirana vsebnost celokupnega pepela le mineralne snovi.

Prav tako so povprečne vsebnosti v klorovodikovi kislini netopnega pepela med populacijami precej izenačene (0,41–0,46 %). Predstavljajo vsebnost peska.

Vsebnost tujih organov in stebel pri večini vzorcev nismo našli. Pri vsaki populaciji je le eden vzorec kontaminiran s tujim organom/stebлом in je zato povprečje populacije nad 0 %, vendar še vedno nizko (0,040–0,124 %) pod dovoljeno vsebnostjo (največ 5 %) po Evropski farmakopeji. Vsebnost tujih delcev smo opazili pri večini vzorcev vseh treh populacij, vsebnost pa je ponovno v skladu s pravili Evropske farmakopeje (največ 2 %), saj so povprečja po populacijah med 0,038 in 0,168 %.

5.2 SKLEPI

- Fenotipsko so populacije zelo izenačene, zato pri opisovanju deskriptorjev med posameznimi populacijami skoraj nismo opazili razlik.
- Droga *Absinthii herba* vseh treh populacij, ki izvirajo s Primorske, je skladna s predpisi Evropske farmakopeje
- Vsebnosti eteričnega olja so zelo velike, saj so primerljive z največjimi, ki smo jih zasledili v literaturi, nekatere meritve pa te celo presegajo. Povprečja posameznih populacij se gibljejo nad 1,0 %.
- Grenkobno število je primerljivo s podatki, najdeni v literaturi, vendar vrednosti med populacijami, pa tudi med vzorci iste populacije močno nihajo. Vzroki so predvsem subjektivnost metode in zasnova metode določevanja grenkobnega števila po Evropski farmakopeji.
- Pri analizah vsebnosti tujih primesi, vode, celokupnega pepela in v klorovodikovi kislini netopnega pepela so populacije med seboj zelo izenačene.

Zgoraj navedeni sklepi kažejo na kakovost in primernost preučevanih populacij droge pravega pelina, ki smo jih vzgojili na Laboratorijskem polju Biotehniške fakultete, tako za gojenje kot za uporabo. Vendar pa bi bile potrebne dodatne analize sestave eteričnega olja, predvsem zaradi vsebnosti tujonov, ki ne smejo presegati norm evropske zakonodaje.

6 POVZETEK

Zdravilnih učinkov pravega pelina (*Artemisia absinthium* L.) so se zavedali že zelo zgodaj v zgodovini. Čeravno nekaterih do danes niso nikoli dokazali, pa mnoge druge, kot npr. insekticidno, antimikrobno, antipiretično, analgetično in antioksidativno delovanje, predvsem pa vpliv na prebavni trakt, podpirajo mnoge znanstvene raziskave. Kakor v preteklosti največ polemik tudi danes predstavlja sestavina eteričnega olja tujon, zaradi katerega je Evropska unija izdala omejitve vsebnosti pri prehrabnih izdelkih in pijačah.

Ker je pravi pelin zelo razširjen po svetu, se lahko populacije glede na podnebje in genetsko zasnovu semenskega materiala značilno razlikujejo. Razlike so predvsem opazne v vsebnosti in sestavi eteričnega olja. Kakovost droge pravega pelina treh populacij, ki naravno rastejo na Primorskem, mi pa smo jih iz semena vzgojili na Laboratorijskem polju Biotehniške fakultete, smo ocenjevali po kriterijih Evropske farmakopeje.

Populacije smo na polju opisali s pomočjo deskriptorjev, pri čemer smo za vsak deskriptor pri določeni populaciji napravili 20 opisov. Nadaljnje smo štirim vzorcem posušene droge vsake populacije določili vsebnost tujih primesi, vsebnosti vode, celokupnega pepela in v klorovodikovi kislini topnega pepela, grenkobno število ter vsebnost eteričnega olja. Podatke smo statistično analizirali s programom Statgraphics Plus.

Populacije so med seboj precej izenačene, hkrati pa njihova droga popolnoma ustreza predpisom Evropske farmakopeje. Vsebnosti eteričnega olja so visoko nad najmanjšo dovoljeno spodnjo mejo, povprečja po populacijah znašajo 1,17, 1,08 in 1,04 % (BFL35, BFL34, BFL47). Vsekakor pa bi bilo v prihodnje tudi smiselno napraviti analize sestave eteričnih olj, da bi posamezno populacijo lahko uvrstili k določenemu znanemu kemotipu, hkrati pa bi ugotovili vsebnost tujonov in s tem primernost droge za uporabo v prehrani in pijačah.

Največje razlike smo opazili pri meritvah grenkobnega števila, kar smo pripisali predvsem zasnovi metode določevanja grenkobnega števila po Evropski farmakopeji in subjektivnosti metode. Postopek smo v prilagojeni različici ponovili in s tem zmanjšali razlike med populacijami. Za bolj realno oceno grenkobnega števila bi bilo v poskus smiselno vključili le usposobljene poskuševalce z razvitimi organoleptičnimi sposobnostmi.

Ugotovili smo, da je droga preučevanih populacij pravega pelina primerna za uporabo v zdravstvene namene. Prav tako smo tudi potrdili hipotezo, da med populacijami ne bo prišlo do velikih razlik zaradi bližine naravnih rastišč genskega materiala.

7 VIRI

- Amory R. 1868. Experiments and observations on absinth and absinthism. *Boston Medical and Surgical Journal*, 78, 1: 68-71, 83-85
- Annex II of Council Directive 88/388/EEC of 22 June 1988 on the approximation of the laws of the Member States relating to flavourings for use in foodstuffs and to source materials for their production. 1988. European Economic Community (EEC). (88/388/EEC) (OJ L 184, 15.7.198, p. 61-66)
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1988L0388:20031120:EN:PDF>
- Ariño A., Arberas I., Renobales G., Arriaga S., Domínguez J. B. 1999a. Essential oil of *Artemisia absinthium* L. from the Spanish Pyrenees. *Journal of Essential Oil Research*, 11: 182-184
- Ariño A., Arberas I., Renobales G., Arriaga S., Domínguez J. B. 1999b. Seasonal variations in wormwood (*Artemisia absinthium* L.) essential oil composition. *Journal of Essential Oil Research*, 11: 619-622
- Ariño A., Arberas I., Renobales G., Domínguez J. B. 1999c. Influence of extraction method and storage conditions on the volatile oil of wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *European Food Research and Technology*, 209, 2: 126-129
- Assesment report on *Artemisia absinthium* L., herba. 2009. London, European Medicines Agency: 26 str.
- Baker P. 2001. *The book of absinthe: A cultural history*. New York, USA, Grove Press: 297 str.
- Baričević D. 1996a. Priročnik za ciklus predavanja pridelovanje zdravilnih rastlin – I. del. 1. izd. Ljubljana, samozaložba: 117 str.
- Baričević D. 1996b. Rastlinske droge in njihovi sekundarni metaboliti – surovina rastlinskih zdravilnih pripravkov. Ljubljana, samozaložba: 81 str.
- Bioversity Technical Bulletin No.13. Guidelines for the development of crop descriptor lists. 2007. Rim, Bioversity International: 84 str.
- Blagojević P., Radulović N., Palić R., Stojanović G. 2006. Chemical composition of the essential oils of Serbian wild-growing *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 13: 4780-4789
- Blaschek W., Ebel S., Hackenthal E., Holzgrabe U., Keller K., Reichling J., Schulz V. 2006. HagerROM, Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe. Berlin, Springer: CD rom
- Bononi M., Giorgi A., Cocucci M., Tateo F. 2006. Evaluation of productivity and volatile compound quality of *Artemisia absinthium* L. planted in Valle Camonica (Italy). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 15: 2592–2596

- Bora K. S., Sharma A. 2010a. Phytochemical and pharmacological potential of *Artemisia absinthium* Linn. and *Artemisia asiatica* Nakai: A review. *Journal of Pharmacy Research*, 3, 2: 325-328
- Bora K. S., Sharma A. 2010b. Neuroprotective effect of *Artemisia absinthium* L. on local ischemia in reperfusion-induced cerebral injury. *Journal of Ethnopharmacology*, 129: 403-409
- Bremer K., Humphries C. 1993. Generic monograph of the Asteraceae- Anthemideae. *The Bulletin of The Natural History Museum*, 23, 2: 55-177
- Bryan C. P. 1930. *The papyrus Ebers*. Letchworth, The Garden City Press: 167 str.
http://oilib.uchicago.edu/books/bryan_the_papyrus_ebers_1930.pdf (marec, 2011)
- Cambelunghe C., Melai P. 2002. Absinthe: enjoying a new popularity among young people? *Forensic Science International*, 6: 130-183
- Canadanovic-Brunet J. M., Djilas S. M., Cvetkovic G. S., Tumbas V. T. 2005. Free-radical scavenging activity of wormwood (*Artemisia absinthium* L) extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 265-272
- Carnat A.P., Madesclaire M., Chavignon O. 1992. cis-Chrysanthenol, a main component in essential oil of *Artemisia absinthium* L. growing in Auvergne, (Massif Central), France. *Journal of essential oil research*, 4, 5: 487-490
- Chialva F., Liddle P. A. P., Doglia G. 1983. Chemotaxonomy of wormwood (*Artemisia absinthium* L.): I. Composition of the essential oil of several chemotypes. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 176, 5: 363-366
- Chiasson H., Bélanger 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. *Journal of Economic Entomology*, 94, 1: 167-171
- Derwich E., Benziane Z., Boukir A. 2009. Chemical composition of and insecticidal activity of three plants *Artemisia* sp: *Artemisia herba-alba*, *Artemisia absinthium* and *Artemisia pontica*. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 8, 11: 1202- 1211
- Duke J. A. 2001. *Handbook of medicinal herbs*. London, New York, Washington D.C., Boca Raton, CRC Press: 677 str.
- ESCOP Monographs: The scientific foundation for herbal medicinal products 2.0. *Absinthii herba*. Stuttgart, Thieme: 567 str.
- EU Scientific Committee on Food. 2003. Opinion of the Scientific Committee on Food on Thujone (expressed on 2 December 2002). Bruselj, European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General: 11 str.
- Evropska farmakopeja 5.0. 2004. Wormwood (*Absinthii herba*). *European Pharmacopoeia 5.0*. Strasbourg, Council of Europe: 3086 str.
- Foster S., Johnson R. 2006. *Desk reference to nature's medicine*. Washington, DC, National Geographic Press: 416 str.

- Funkle G. L. 1943. The influence of *Artemisia absinthium* on neighboring plants. *Blumea*, 5: 211-293
- Geszprych A., Weglarz Z., Kosakowska O. 2008. Ex situ study on chemical variability of wormwood (*Artemisia absinthium* L.). African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines (AJTCAM), Abstract of the world congress on medicinal and aromatic plants, Cape Town November 2008.
- Google Zemlja 6.0 (beta)
<http://www.google.com/intl/sl/earth/index.html> (marec, 2011)
- Hänsel R., Sticher O., Steinegger E. 1999. *Pharmakognosie – Phytopharmazie*. Berlin, Springer: 1403 str.
- Heinrich M., Barnes J., Gibbons S., Williamson E. M. 2004. *Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy*. Edinburgh ; New York , Churchill Livingstone, 309 str.
- Hendrik H., Bos R., Woerdenbag H. J. 1996. The essential oil of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip. *Flavour and Fragrance Journal*, 11, 6: 367–371
- Hernandez H., Mendiola J., Torres D, Garrido N., Pérez N. 1990. Effect of aqueous extracts of *Artemisia* on the in vitro culture of *Plasmodium falciparum*. *Fitoterapia*, 61, 6: 540-541
- Hoffman G. R., Hazlett D. L. 1977. Effects of aqueous *Artemisia* extracts and volatile substances on germination of selected species. *Journal of Range Management*, 30, 2: 134-137
- Hribar J., Vidrih R. 2009. Tehnična dokumentacija (specifikacije) za geografsko označbo žgane pijače pelinkovec. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 13 str.
- Höld K. M., Sirisoma N. S., Ikeda T., Narahashi T., Casida J. E. 2000. α -Thujone (the active component of absinthe): γ -aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 97, 8:3826-3831
- Hüsniü Can Baser K., Buchbauer G. 2010. *Handbook of essential oils : science, technology, and applications*. Boca Raton; London, CRC Press: 975 str.
- Idrija Turizem
<http://www.idrija-turizem.si/> (marec, 2011)
- Jaenson T. G. T., Pålson K., Borg-Karlson A. K. 2005. Evaluation of extracts and oils of thick-repellent plants from Sweden. *Medical and Veterinary Entomology*, 19: 345-352.
- Judpientienė A., Budiene J. 2010. Compositional Variation in Essential Oils of Wild *Artemisia absinthium* from Lithuania. *Journal of Essential oil Bearing Plants*, 13, 3: 275-285
- Judpientienė A., Mockutė D. 2004. Chemical composition of essential oils of *Artemisia absinthium* L. (wormwood) growing wild in Vilnius. *Chemija*, 15, 4: 64–68

- Juteau F., Jerković I., Masotti V., Miloš M., Mastelić J., Bessiere J. M., Viano J. 2003. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France. *Planta Medica*, 69, 2: 158-161
- Kordali S., Kotan R., Mavi A., Cakir A., Ala A., Yildirim A. 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 24: 9452-9458
- Kordali S., Aslan I., Calmasur O., Cakir A. 2006. Toxicity of essential oils isolated from three *Artemisia* species and some of their major components of granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Industrial Crops and Products*, 23: 162- 170
- Krebs S., Omer T. N., Omer B. 2010. Wormwood (*Artemisia absinthium*) suppresses tumour necrosis factor alpha and accelerates healing in patients with Crohn's disease—a controlled clinical trial. *Phytomedicine*, 17: 305-309
- Kreft S. 2000. Pravi pelin in kolmež: strupene rastline. *Herbika*, 11/12: 28-29
- Kröner L. U., Padosch S. A., Lachenmeier D. W. 2005. Untersuchungen zur forensischen Relevanz thujonhaltiger Spirituosen unter besonderer Berücksichtigung toxikologisch-analytischer Aspekte. *Blutalkohol*, 42, 1-6: 263-271
- Lachenmeier D. W. 2010. Wormwood (*Artemisia absinthium* L.)—A curious plant with both neurotoxic and neuroprotective properties? *Journal of Ethnopharmacology*, 131, 1: 224-227
- Lachenmeier D. W., Emmert J., Kuballa T., Sartor G. 2006a. Thujone – Cause of absinthism? *Forensic Science International*, 158, 1: 1-8
- Lachenmeier D. W., Walsch S. G., Padosch S. A., Kröner L. U. 2006b. Absinthe—a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 5: 365-377
- Lachenmeier D. W., Nathan-Maister D., Breaux T. A., Sohnius E. M., Schoeberl K., Kuballa T. 2008. Chemical composition of vintage preban absinthe with special reference to thujone, fenchone, pinocamphone, methanol, copper, and antimony concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3073-3081
- Lachenmeier D. W., Nathan-Meister D., Breaux T. A., Luauté J. P., Emmert J. 2010. Absinthe, absinthism and thujone – New insight into the spirit's impact on public health. *The Open Addiction Journal*, 3, 1: 32-38
- Lee H. G., Kim H., Oh W. K., Yu K. A., Choe Y. K., Ahn J. S., Kim D. S., Kim S. H., Dinarello C. A., Kim K., Yoon D. Y. 2004. Tetramethoxy hydroxyflavone p7F downregulates inflammatory mediators via the inhibition of nuclear factor kB. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1030: 555–568
- Liddle P., Boero L. 2003. Vermouth. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Caballero B., Finglas P. M., Trugo L. (eds). 2nd edition. Amsterdam, Academic Press 5980-5984

- Mahmoudi M., Ebrahimzadeh M. A., Ansaroudi F., Nabavi S. F., Nabavi S. M. 2009. Antidepressant and antioxidant activities of *Artemisia absinthium* L. at flowering stage. *African Journal of Biotechnology*, 8, 24: 7170-7175
- Martín L., Mainar A. M., González-Coloma A., Burillo J., Urieta J. S. 2010. Supercritical fluid extraction of wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *The Journal of Supercritical Fluids*, 2010: 1-8
- Meschler J. P., Howlett A. C. 1999. Thujone exhibits low affinity for cannabinoid receptors but fails to evoke cannabimimetic responses. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 62, 3: 473-480
- Omer B., Krebs S., Omer H., Noor T.O. 2007. Steroid-sparing effect of wormwood (*Artemisia absinthium*) in Crohn's disease: a double-blind placebo-controlled study. *Phytomedicine*, 14: 87-95
- Orav A., Raal A., Arak E., Müürisepp M., Kailas T. 2006. Composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* L. of different geographical origin. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences. Chemistry*, 55, 3: 155-165
- Padosch S. A., Lachenmeier D. W., Kröner L. U. 2006. Absinthism: a fictitious 19th century syndrome with present impact. *Substance Abuse Treatment, Prevention, and Policy*, 1:14
<http://www.substanceabusepolicy.com/content/pdf/1747-597X-1-14.pdf> (december, 2010)
- Pahlow M. 1987. Velika knjiga o zdravilnih rastlinah. Ljubljana, Cankarjeva založba: 465 str.
- Rao V. S. N., Menezes A. M. S., Gadelha M. G. T. 1987. Antifertility screening of some indigenous plants of Brasil. *Fitoterapia*, 59, 1: 17-20
- Rezaeinodehi A., Khangholi S. 2008. Chemical composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* grown wild in Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11, 6: 946-949
- Roth L., Daunderer M., Kormann K. 2008. Giftpflanzen-Pflanzengifte. Hamburg, Nikol: 1122 str.
- Rozengurt E. 2006. Taste receptors in the gastrointestinal tract. I. Bitter taste receptors and α -gustducin in the mammalian gut. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 291: G171-G177
- Skyles A. J., Sweet B. V. 2004. Alternative therapies. Wormwood. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 61, 3: 239-242
- Sveto pismo Stare in Nove zaveze: slovenski standardni prevod. 2000. Ljubljana, Svetopisemska družba Slovenije, 329 str.
- Tariq K.A., Chishti M.Z., Ahmada F., Shawl A.S. 2009. Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. *Veterinary Parasitology*, 160: 83-88

- Thao N. T. P., Thuy N. T., Hoi T. M., Thai T. H., Muselli A., Bighelli A., Castola V., Casanova J. 2004. *Artemisia vulgaris* L. from Vietnam: Chemical variability and composition of the oil along the vegetative life of the plant. *Journal of Essential Oil Research*, 16, 4: 358-361
- Toplak Galle K. 2000. Zdravilne rastline na Slovenskem. Ljubljana, Mladinska knjiga: 312 str.
- Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A. 1996. *Flora Europaea*. Vol. 4. Cambridge, Cambridge University Press: 505 str.
- Valenčič D., Spanring J. 2000. Gojenje zdravilnih rastlin in dišavnic. 2. izdaja, Portorož, Inštitut za kulturne stike: 173 str.
- Watson L. E., Bates P. L., Evans T. M., Unwin M. M., Estes J. R. 2002. Molecular phylogeny of subtribe Artemisiinae (Asteraceae), including *Artemisia* and its allied and segregate genera. *BMC Evolutionary Biology*, 2, 17: 1-12
- Weisbord S. D., Soule J. B., Kimmel P. L. 1997. Poison on line – Acute renal failure caused by oil of wormwood purchased through the Internet. *The New England Journal of Medicine*, 337, 12: 825-827
- Wright C. W. 2002. *Artemisia*. New York, Taylor and Francis Inc.: 360 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Dei Baričevič za strokovno pomoč in svetovanje pri izdelavi diplomskega dela ter prof. dr. Francu Batiču za pregled in predlagane popravke.

Za vso pomoč pri organizaciji in izvajanju dela se zahvaljujem Petri Ratajc.

V veliko pomoč pri eksperimentalnem delu sta mi bili tudi Andreja Hodnik in Zalka Ilc s Katedre za pedologijo in varstvo okolja.

Hvala družini, ki mi je omogočila študij in mi vedno stoji ob strani.