

Biokemijska raznolikost prirodnih populacija dalmatinskog buhača (*Tanacetum cinerariifolium*)

Osredečki, Anja

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:309649>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



**BIOKEMIJSKA RAZNOLIKOST PRIRODNIH
POPULACIJA DALMATINSKOG BUHAČA
(*Tanacetum cinerariifolium*)**

DIPLOMSKI RAD

Anja Osredečki

Zagreb, srpanj, 2019.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Biljne znanosti

**BIOKEMIJSKA RAZNOLIKOST PRIRODNIH
POPULACIJA DALMATINSKOG BUHAČA
(*Tanacetum cinerariifolium*)**

DIPLOMSKI RAD

Anja Osredečki

Mentor:

doc. dr. sc. Martina Grdiša

Neposredni voditelj:

Filip Varga, mag. biol. exp.

Zagreb, srpanj, 2019.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Anja Osredečki**, JMBAG 0178092691, rođena 9.11.1992. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

BIOKEMIJSKA RAZNOLIKOST PRIRODNIH POPULACIJA DALMATINSKOG

BUHAČA (*Tanacetum cinerariifolium*)

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studentice



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZVJEŠĆE O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice Anje Osredečki, JMBAG 0178092691, naslova

BIOKEMIJSKA RAZNOLIKOST PRIRODNIH POPULACIJA DALMATINSKOG BUHAČA (*Tanacetum cinerariifolium*)

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

- | | | | |
|----|------------------------------|--------|-------|
| 1. | doc. dr. sc. Martina Grdiša | mentor | _____ |
| 2. | prof. dr. sc. Zlatko Šatović | član | _____ |
| 3. | doc. dr. sc. Sanja Radman | član | _____ |

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Martini Grdiša na stručnoj pomoći, uloženom trudu, vremenu i strpljenju pri izradi ovog diplomskog rada.

Također zahvaljujem mag. biol. exp. Filipu Vargi na pomoći tijekom eksperimentalnog dijela rada te na podršci i nesebičnim savjetima.

Najviše od svega zahvaljujem dečku, obitelji i prijateljima koji su mi bili velika podrška tijekom studiranja.

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Hipoteze i cilj istraživanja	2
3. Pregled literature	3
3.1. Sistematika i rasprostranjenost	3
3.2. Morfološka svojstva	4
3.3. Kemijska svojstva	5
3.4. Upotreba buhača kroz povijest	8
3.5. MSPD (Disperzija matrice u čvrstoj fazi)	9
4. Materijali i metode	12
4.1. Biljni materijal	12
4.2. Ekstrakcija piretrina disperzijom matrice u čvrstoj fazi (MSPD).....	12
4.3. HPLC – Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	15
4.4. Statistička obrada podataka	16
5. Rezultati i rasprava	17
6. Zaključak	27
7. Popis literature	28
Životopis	33

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Anja Osredečki**, naslova

BIOKEMIJSKA RAZNOLIKOST PRIRODNIH POPULACIJA DALMATINSKOG BUHAČA (*Tanacetum cinerariifolium*)

Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./ Sch. Bip.) je endemična biljna vrsta istočne obale Jadranskog mora. Ističe se zbog sadržaja prirodnog insekticida piretrina. Kemijska raznolikost prirodnih populacija dalmatinskog buhača slabo je istražena, a nužan je preduvjet za razvoj budućih oplemenjivačkih programa i ponovno uvođenje dalmatinskog buhača u poljoprivrednu proizvodnju. Cilj ovog rada bio je utvrditi sastav i sadržaj piretrina pet prirodnih populacija dalmatinskog buhača. Za ekstrakciju piretrina iz suhih cvjetnih glavica dalmatinskog buhača korištena je ekstrakcija disperzijom matrice u čvrstoj fazi (MSPD), dok je utvrđivanje sastava i sadržaja piretrina provedeno tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Sadržaj ukupnih piretrina dalmatinskog buhača se kretao od 0.39% do 0.80% mase suhih cvjetova, dok su se prosječne vrijednosti omjera piretrina I i piretrina II kretale od 0.93 do 2.14.

Ključne riječi: dalmatinski buhač, prirodni insekticid, piretrin, kemijski sastav, MSPD, HPLC

Summary

Of the master's thesis - student **Anja Osredečki**, entitled

BIOCHEMICAL DIVERSITY OF THE NATURAL POPULATIONS OF DALMATIAN PYRETHRUM (*Tanacetum cinerariifolium*)

Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./ Sch. Bip.) is a plant species endemic to the east coast of the Adriatic Sea. It represents a valuable source of natural insecticide pyrethrin. Chemical diversity of the natural populations of Dalmatian pyrethrum is poorly explored and it is a prerequisite for the development of future breeding programs and reintroduction of Dalmatian pyrethrum into agricultural production. The aim of this paper was to determine content and composition of pyrethrin in five natural populations of Dalmatian pyrethrum. Matrix solid phase dispersion (MSPD) was used for the extraction of pyrethrins from dried pyrethrum flowers samples, while High performance liquid chromatography (HPLC) was used for determination of composition and content of pyrethrin. The total pyrethrin content ranged between 0.39 and 0.80% of the dry flower weight, while pyrethrin I / pyrethrin II ratio ranged between 0.93 and 2.14.

Keywords: Dalmatian pyrethrum, natural insecticide, pyrethrin, chemical composition, MSPD, HPLC

1. Uvod

Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./ Sch. Bip.) je višegodišnja biljna vrsta iz porodice Asteraceae. Endem je istočne obale Jadranskog mora (Grdiša i sur. 2009.). U Hrvatskoj ga se može pronaći od Istre (sjeverno područje Jadranske obale) pa sve do poluotoka Prevlake (krajnjeg juga), dok se najbrojnije populacije nalaze u Dalmaciji na izrazito degradiranim staništima (Nikolić i sur. 2015.). Osim u Hrvatskoj, rasprostranjen je u Bosni i Hercegovini, Crnoj Gori i Albaniji (Heywood 1976.). Prema Pravilniku o strogo zaštićenim vrstama (Narodne novine 144/2013.), buhač je u Hrvatskoj strogo zaštićena biljna vrsta te je njegovo sakupljanje iz prirodnih staništa zakonom zabranjeno.

Dalmatinski buhač je najvažnija vrsta roda *Tanacetum* (Hedayat i sur. 2009.). Predstavlja jedini izvor prirodnih insekticida - piretrina, njegovih sekundarnih metabolita. Piretrin je kontaktni insekticid koji djeluje na živčani sustav kukaca te u vrlo kratkom vremenskom periodu uzrokuje paralizu i smrt (Davies i sur. 2007.). Zbog svoje nestabilnosti, odnosno brze biorazgradivosti pod utjecajem visokih temperatura, vode, zraka i sunčevog svjetla mogu se koristiti bez negativnog utjecaja na okoliš. Ne zadržavaju se u hranidbenim lancima i ne prodiru do podzemnih voda (Jovetić i De Gooijer 1995., Casida i Quistad 1995., Todd i sur. 2003.). Slabo se apsorbiraju u ljudskom organizmu, a u slučaju apsorpcije se brzo izlučuju putem urina (Macan i sur. 2006.).

Dalmatinski buhač je na našem području desetljećima bio izvozna kultura, a njegova insekticidna svojstva poznata su od davnina (Kolak i sur. 1999.). Najveći značaj na našim prostorima imao je između I. i II. svjetskog rata, u vrijeme vinske krize. Uzgajao se u zapuštenim vinogradima te je često bio kombiniran s drugim kulturama poput masline (Benić Penava 2012.), gdje je do izražaja dolazilo i njegovo repelentno djelovanje. Svojim specifičnim mirisom odbija velik broj kukaca što mu omogućuje primjenu u zaštiti bilja kao i hrane u skladištima (Crombie 1980.). Tijekom II. svjetskog rata, otkrićem sintetskog insekticida DDT-a (*dikloro-difenil-trikloretan*) došlo je do drastičnog smanjenja u proizvodnji na našem području (Bakarić 2005.).

Unatoč tome što je dalmatinski buhač autohtona biljna vrsta ovih područja, danas nije zastupljen u uzgoju u značajnoj količini. Zbog sve veće potražnje za ekološkim načinom proizvodnje ponovno se budi zanimanje za buhačem kao izvorom prirodnog insekticida. Proveden je velik broj istraživanja o različitim svojstvima dalmatinskog buhača, ali je do danas kemijska raznolikost prirodnih populacija ostala slabo istražena. Odabir najboljih populacija prema kemijskom sastavu nužan je preduvjet za razvoj budućih oplemenjivačkih programa i ponovo uvođenje dalmatinskog buhača u poljoprivrednu proizvodnju.

2. Hipoteze i cilj istraživanja

Pretpostavlja se da se prirodne populacije dalmatinskog buhača razlikuju po sastavu i sadržaju piretrina, stoga i u insekticidnom potencijalu.

Cilj ovog istraživanja je utvrditi sastav i sadržaj piretrina kod pet prirodnih populacija dalmatinskog buhača, te odabrati populacije s najvećim insekticidnim potencijalom.

3. Pregled literature

3.1. Sistematika i rasprostranjenost

Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./ Sch. Bip.) višegodišnja je biljna vrsta, koja pripada porodici Asteraceae (glavočiike), rodu *Tanacetum* (Tablica 3.1.1.). Porodica Asteraceae jedna je od najbrojnijih porodica kritosjemenjača koja obuhvaća oko 22 750 vrsta raspoređenih u 1 620 rodova i 12 potporodica (Kumar i Tyagi 2013.). Vrste roda *Tanacetum* rasprostranjene su diljem Europe, Azije, Sjeverne Amerike i Sjeverne Afrike. Rod *Tanacetum* broji više od 100 vrsta (70 – 150; Abad i sur. 1995.), oko 20 ih se može pronaći u Europi, od kojih pet u Hrvatskoj (Grdiša 2011.). Jedino se dalmatinski buhač ističe po ekonomskoj važnosti (Ramirez 2013.) zbog sekundarnog metabolita insekticidnih djelovanja - piretrina (Jovetić i De Gooijer 1995., Babić i sur. 2012.).

Dalmatinski buhač poznat je i pod sinonimima *Pyrethrum cinerariifolium* Trevir. i *Chrysanthemum cinerariifolium* (Trevir.).

Tablica 3.1.1. Taksonomska pripadnost dalmatinskog buhača (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./ Sch. Bip.)

KLASIFIKACIJSKA KATEGORIJA	NAZIV
Red	Asterales
Porodica	Asteraceae
Rod	<i>Tanacetum</i> L.
Vrsta	<i>Tanacetum cinerariifolium</i> (Trevir.) Sch. Bip.

Dalmatinski buhač je endem istočne obale Jadranskog mora (Grdiša i sur. 2009.). Osim na području Hrvatske, samoniklo raste i na području južne Bosne i Hercegovine kao i na obalnim područjima Crne Gore i Albanije (Heywood 1976.).



Slika 3.1.1. Prirodna populacija dalmatinskog buhača na Biokovu (Izvor: Grdiša 2019)

Može ga se pronaći diljem Jadranske obale u naturaliziranom obliku: od sjevera Istre i Kvarnerskih otoka (Krk, Cres, Lošinj), Velebita i Biokova (Slika 3.1.1.) te dalmatinske obale i otoka (Ugljan, Dugi otok, Brač, Hvar, Korčula, Vis, Mljet, Lastovo) (Grdiša i sur. 2009.).

3.2. Morfološka svojstva

Dalmatinski buhač (Slika 3.2.1.) je višegodišnja zeljasta biljna vrsta koja doseže visinu od 30 do 100 cm, ovisno o genotipu i uvjetima uzgoja (Kolak i Rozić 1997., Kolak i sur. 1999.). Visina biljke mjeri se kao dužina centrale stabljike od površine tla do visine zadnjeg cvata biljke (Bhat 1995.). Rast biljke u visinu započinje već pri samom nicanju. Uz glavnu stabljiku formira i velik broj sekundarnih stabljika (300 – 400). Stabljike su brazdaste i prekrivene sivozelenim dlačicama (Kolak i Rozić 1997., Kolak i sur. 1999.). Duguljasti, perasto sastavljeni i dvostruko urezani listovi razvijaju se pri površini tla, na prvoj trećini stabljike, formirajući polugrm tamnozeleno boje (Kušan 1969.). Korijen buhača razgranat je i dubok (od 30 do 35 cm dubine), vrlo dobre apsorpcijske snage (Kolak i sur. 1999.). Podzemni i nadzemni dijelovi buhača vrlo su intenzivnog i ugodnog mirisa (Nikolić i sur. 2015.).



Slika 3.2.1. Poljski pokus na pokušalištu Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu (Izvor: Grdiša 2018)

Na vrhovima i granama cvatnih stabljika nalaze se cvjetovi grupirani u glavičaste cvatove. Cvatovi buhača karakteristični su porodici glavočika, izgledom vrlo slični cvatovima ivančica, promjera 3 do 5 cm (Nikolić i sur. 2015.). Sastoje se od dvaju tipova cvjetova: cjevastih, hermafroditnih cvjetova, žute boje, koji se nalaze u sredini cvata i jezičastih (neplodnih) cvjetova, bijele boje, smještenih na rubovima cvata (Brewer 1968., Cantele 2001., Greenhill 2007., Catalano i sur. 2014.). Cjevasti (trubasti) cvjetovi građeni su od 5 čašičnih i 5 kruničnih listića, 5 kratkih prikrivenih prašnika i ploda (Kolak i sur. 1999., Skender 1999.) Cvjetovi se otvaraju oko mjesec dana nakon pojavljivanja prvih pupova (Grdiša 2011.). Cvatnja započinje početkom svibnja i traje do kraja lipnja. Biljke stare 1 do 2 godine mogu formirati 200 – 400 cvjetova, dok biljke starosti 3 do 6 godina mogu razviti 800 – 900 cvjetova (Kolak i

sur. 1999.). Svi nadzemni dijelovi biljke prekriveni su sitnim sivkastim dlačicama (Nikolić i sur. 2015.).

Plod buhača je peterostrana jednosjemena roška, pri osnovi sužena, sivožute boje, mase 1000 sjemenki od 0.8 do 1.1 g (Nikolić i sur. 2015.). Na površini roške nalaze se sitne uljne žlijezde koje sadrže najveći udio piretrina (Grdiša i sur. 2009.).

Buhač je alogamna, isključivo stranooplodna biljna vrsta (Cantele 2001., Catalano i sur. 2014.). Upravo zbog stranooplodnje je izrazito heterozigotna vrsta, varijabilna u velikom broju agronomskih i drugih svojstava. U većini slučajeva oprašuju ga kukci iz reda opnokrilaca (Hymenoptera) koji odlažu pelud na potpuno otvorene cvjetove. Razmnožava se i spolno i nespolno. Spolnim načinom razmnožavanja nastaju plodovi – roške, a nespolno se razmnožava vegetativnim dijeljenjem busenova, reznicama i kulturom tkiva (Grdiša 2011.).

3.3. Kemijska svojstva

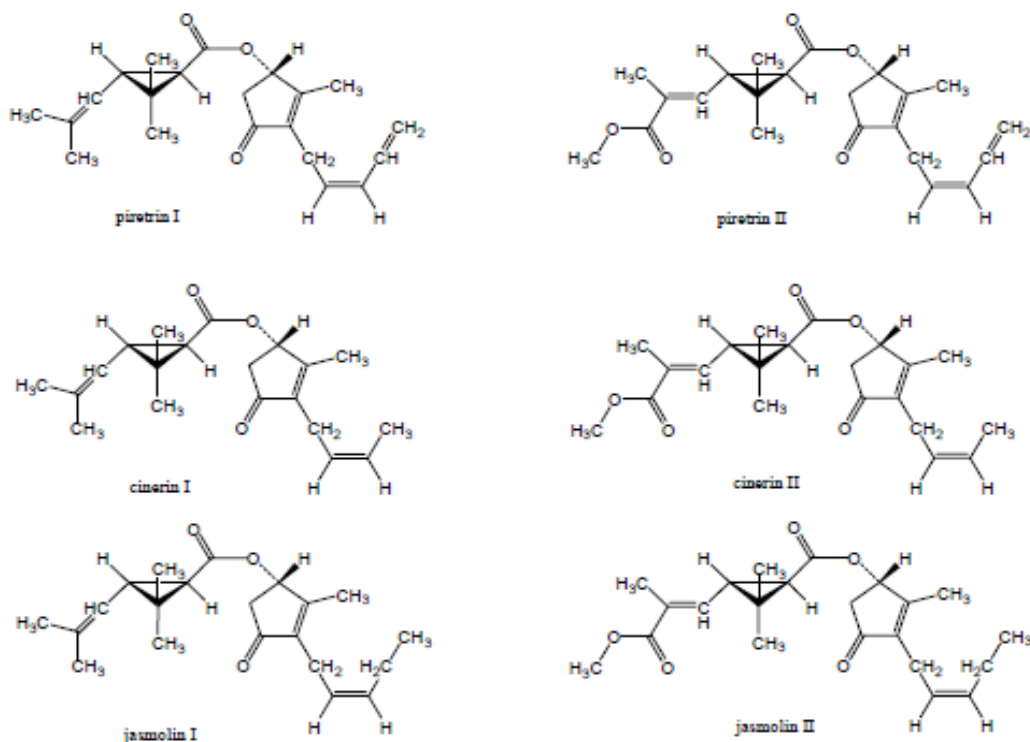
Upotreba piretrina kao prirodnog insekticida je široko rasprostranjena u cijelom svijetu. Smatra se jednim od najsigurnijih insekticida zbog izrazito niske toksičnosti za ljude i toplokrvne životinje (Kasaj i sur. 1999.). Razlog tome je visoka biorazgradivost pri izloženosti sunčevom svjetlu, vodi, zraku i visokim temperaturama. Zbog biorazgradivosti se ne zadržava u hranidbenim lancima i ne prodire do podzemnih voda. Piretrin predstavlja učinkovit i za okoliš siguran način suzbijanja kukaca (Jovetić i De Gooijer 1995., Casida i Quistad 1995., Todd i sur. 2003.) te samim time svoje mjesto pronalazi i u organskoj proizvodnji (Wei i sur. 2006.).

Svi nadzemni dijelovi dalmatinskog buhača sadrže piretrine. U listovima su piretrini zastupljeni samo u tragovima, u jezičastim listićima od 0.2 % do 0.4 %, a u plodnici sa sjemenom od 2.2 % do 4.5 % (Kolak i Rozić 1998.). Suha stabljika (ovisno o genotipu) može imati od 0.1 do 1.15 % piretrina. Suhe cvatne glavice samoniklog domaćeg dalmatinskog buhača sadrže 0.7 %, a suhe cvatne glavice kultiviranog kenijskog buhača 2.8 % piretrina (Filipaj i Blažević 1994., Kolak i sur. 1999.). Grdiša i sur. (2013) proveli su istraživanje na 25 prirodnih populacija dalmatinskog buhača s područja Jadranske obale i otoka s ciljem utvrđivanja sadržaja i sastava piretrina, kao i identifikacije različitih kemotipova. Sadržaj piretrina kretao se u rasponu od 0.36% do 1.30% suhe mase cvijeta, dok se omjer piretrina I i II kretao od 0.64% do 3.33% te je identificirano pet različitih kemotipova. Oplemenjivačkim programima su stvoreni kultivari sa dvostruko ili trostruko većim sadržajem piretrina u odnosu na naše domaće samonikle biljke (Morris i sur. 2005.).

Naziv piretrin obuhvaća grupu od šest monoterpenskih estera: piretrin I i II, cinerin I i II te jasmolin I i II. Piretrin I, cinerin I i jasmolin I su esteri krizantemske kiseline, skupno nazvani piretrini I. Dok su piretrin II, cinerin II i jasmolin II esteri piretrinske kiseline, skupno nazvani piretrini II (Godin i sur. 1963., Hitmi i sur. 2001.). Krizantemska i piretrinska kiselina vežu se s jednim od tri alkohola (piretrolon, cinerolon, jasmololon) i tvore spomenute aktivne sastavnice piretrina (Head 1973.). Od navedenih sastavnica, piretrin I i II su najzastupljeniji i najaktivniji (Casida i Quistad 1995.). Na slici 3.3.1. prikazane su strukturne formule piretrina. Tipičan ekstrakt buhača sadrži piretrine, cinerine i jasmoline u omjeru 10:3:1 (Crombie 1995.). Iz omjera piretrina I i piretrina II određuje se kvaliteta ekstrakta, a njegovim povećanjem raste

i sama insekticidna aktivnost (Maciver 1995., Grdiša 2011.). Ekstrakt buhača mora sadržavati od minimalnih 45 % do maksimalnih 50 % ukupnih piretrina I i II. Omjer piretrina I i II u ekstraktu iznosi od 0.8 do 2.8 (Kolac i sur. 1999.).

Djelovanje piretrina I počinje u roku nekoliko minuta, izrazito je toksičan i smrtonosan. Dok piretrin II ima *knockdown* djelovanje, kukci ga lako razgrade i oporave se u roku nekoliko sati. Kombinacija piretrina I i II djeluje vrlo učinkovito na velik broj kukaca (Winney 1979.; Babić i sur. 2012.). Piretrini djeluju kontaktno, pogađajući živčani sustav kukaca.



Slika 3.3.1. Strukturne formule piretrina (Izvor: Grdiša 2011.)

Onemogućuju normalan rad natrijevih kanala (prijenos natrijevih iona koji omogućuju prijenos živčanih signala) prilikom čega dolazi do blokade živčanih funkcija (Sonderlund 1995., Ambrožič-Dolinšek i sur. 2007.), *knockdown* djelovanja, uzrokujući nekontroliranu kontrakciju mišića te pokrete nogama i krilima (Catalano i sur. 2014.) sve do potpune paralize i smrti kukaca (Davies i sur. 2007.).

Sadržaj piretrina ovisi o nizu čimbenika kao što su: genotip, zrelost cvjetova, vrijeme berbe, metoda sušenja, klimatski uvjeti (Zieg i sur. 1983.), kao i uvjeti skladištenja (Morris i sur. 2005.). Vrijeme berbe određeno je razvojnim stadijem cvjetova (Gnadinger i Corl 1930.), a otežano zbog nejednoličnog dozrijevanja. Prema Kolaku i sur. (1999.) najveći sadržaj piretrina u cvijetu je u fazi kada se otvore 2-3 kruga cjevastih cvjetova, odnosno kad je $\frac{3}{4}$ cvjetova otvoreno. U Keniji se berba provodi dok je 4-5 redova cjevastih cvjetova otvoreno (Casida 1980.). Prema Bakarić (2005) optimalno vrijeme berbe je kada je oko pola cjevastih

cvjetova otvoreno. Cvjetovi se mogu brati već u prvoj godini vegetacije, ali buhač svoj puni potencijal postiže narednih godina kad se po biljci formira više cvjetova (Kolac i sur. 1999.).

Piretrini imaju široku primjenu u kućanstvima kao i u vanjskim uvjetima: u obliku sprejeva protiv raznih vrsta kukaca, u šamponima za kućne ljubimce, kao i u obliku aerosola (Metcalf 1989.). Također svoju primjenu nalaze i u zaštiti voća, povrća, žitarica kao i stoke. Korištenje piretrina kao prirodnog insekticida ima niz pozitivnih kao i negativnih strana, odnosno nedostataka uzrokovanih nestabilnošću. Jedan od glavnih nedostataka je brza razgradnja u poljskim uvjetima (Demoute 1989.). Smatra se da zbog svoje osjetljivosti na visoke temperature, sunčevu svjetlost, zrak, kao i sposobnosti kukaca da se oporave od subletalnih doza nije dovoljno učinkovit protiv poljoprivrednih štetnika. Provedena su brojna istraživanja kako bi se utvrdio utjecaj navedenih čimbenika na sadržaj piretrina. Utjecaj sunčevog svjetla na razgradnju piretrina istraživao je Crosby (1995). U dobivenim rezultatima došli su do zaključka da je gubitak u mraku bio zanemariv, dok je pod utjecajem svjetla došlo do značajnih gubitka u sadržaju piretrina (gubitak od 99% u roku 5 sati). Pan i sur. (2017) uspoređivali su razgradnju piretrina na tretiranoj zelenoj salati u stakleniku i u poljskim uvjetima. Sadržaj piretrina zelene salate u stakleniku bio je viši (0.57 mgkg^{-1}), od sadržaja piretrina u poljskim uvjetima (0.25 mgkg^{-1}). Također su ustanovili da se poluživot piretrina na tretiranoj zelenoj salati u poljskim uvjetima (0.7 dana) razlikuje od poluživota u stakleniku (1.1 dan). Dobiveni rezultati razlikovali su se od istraživanja koje su proveli Antonious i sur. (2004) i ustanovili da je poluživot piretrina I i II na tretiranim listovima rajčice i paprike traje manje od dva sata.

Procesom oksidacije mikroorganizmi u tlu razgrađuju piretrine koji se vežu za čestice tla (Gunasekara 2004.). S obzirom da se piretrini čvrsto vežu za čestice tla, ne pronalazi ih se često u zabrinjavajućim koncentracijama u podzemnoj i pitkoj vodi. Iznimka su površinske vode i bunari blizu poljoprivrednih površina i postrojenja u kojima se proizvode pesticidi (Todd i sur. 2003.). Poluživot piretrina I u tlu je 8,6 dana, a piretrina II 3,1 dan (Antonious i sur. 1997). U vodi se nešto sporije razgrađuju te je iz tog razloga toksičan za neke ribe i morske beskralježnjake, ali u puno manjoj mjeri od sintetičkih insekticida.

U uvjetima skladištenja, temperatura na kojoj se čuva biljni materijal ima najveći utjecaj na razlaganje piretrina. Prema rezultatima istraživanja koje su proveli Atkinson i sur. (2004) povećanje temperature znatno ubrzava proces razlaganja piretrina.

Kako bi se utvrdio utjecaj klimatskih uvjeta na sadržaj piretrina Ambrožić-Dolinšek i sur. (2007) proveli su istraživanje u kojem su uspoređivali sadržaj piretrina dalmatinskog buhača uzorkovanog na otoku Cresu s onima iz Botaničkog vrta u Ljubljani. Udio piretrina u uzorcima s otoka Cresa iznosio je 1.2%, dok je kod uzoraka iz Botaničkog vrta u Ljubljani iznosio 1.1% piretrina po suhoj masi cvijeta. Klimatski uvjeti nisu značajno utjecali na ukupan sadržaj piretrina, međutim značajna je razlika utvrđena između omjera piretrina I i II. Kod uzoraka s otoka Cresa omjer piretrin I/piretrin II iznosio je 1.4 dok je kod uzoraka iz Botaničkog vrta u Ljubljani iznosio 0.6.

Nekada se smatralo da je piretrin neotrovan za ljude i toplokrvne životinje, ali danas takve tvrdnje nisu dozvoljene i opravdane. Unatoč tome i dalje se smatra jednim od najsigurnijih insekticida. U ljudskom organizmu piretrini se slabo apsorbiraju u probavnom i dišnom traktu te putem kože, a u slučaju apsorpcije brzo se izlučuju iz organizma uglavnom putem urina (Macan i sur. 2006). Osim poljoprivrednih radnika, proizvođača insekticida,

veterinara, kao i osoba koje redovito tretiraju svoje kućne ljubimce s insekticidima na bazi piretrina, vrlo je mala vjerojatnost da će ostatak ljudske populacije tijekom svog životnog vijeka biti izložen većim (štetnim) dozama piretrina (Todd i sur. 2003.).

O utjecaju piretrina na zdravlje ljudi i životinja provedena su brojna istraživanja. Pokazali su se izričito toksičnima za pčele, već 0.02 μ g djeluje smrtonosno na njih (Casida i Quistad 1995.). Izričito su opasni po život mačaka jer njihova jetra ne može detoksificirati piretrine (Campbell i Chapman 2000.). *Environmental Protection Agency* (EPA; 1999) je u pregledu prijašnjih istraživanja o kancerogenom djelovanju piretrina došla do zaključka da bi ih se trebalo klasificirati kao 'vjerojatno kancerogene za ljude putem oralne primjene'. Ta procjena se bazirala na kancerogenom djelovanju ekstrakta piretrina koji je bio uveden u prehranu štakora i miševa u pokusnim istraživanjima, pri čemu je primijećena povećana učestalost pojave raka. Kod štakora izloženih djelovanju piretrina je primijećena veća stopa raka jetre, kao i hepatocelularnog adenoma (nekancerogeni tumor jetre), raka štitnjače i doštitne žlijezde, dok kod tretiranih miševa piretrin nije djelovao onkogeno (EPA 1994.; Schoenig 1995.). Piretrini mogu uzrokovati alergijske reakcije koje variraju od neugodnih (osip) do životno opasnih (astma) (Adams 1983.). Najčešći zdravstveni problemi uzrokovani su dermalnim putem, odnosno izazivaju kožne alergijske reakcije i dermatitis (O'Malley 2004.). Zabilježena su dva smrtna slučaja u kojima su osobe ženskog spola koje su bolovale od astme, nakon tretiranja svojih pasa šamponima koji su sadržavali piretrine (0.2% i 0.06%), preminule zbog teških astmatičnih napada uzrokovanih piretrinima iz šampona (Wax i Hoffman 1994; Wagner 2000.). Nema daljnjih zabilježenih podataka o problemima sa bilo kojim tjelesnim sustavom pri udisanju piretrina, kao niti zavedenih podataka o kancerogenom djelovanju piretrina unesenih oralnim putem kod ljudi (Todd i sur. 2003.).

Nakon ponovljenog istraživanja o kancerogenom djelovanju piretrina 2008. od strane Odbora za procjenu kancerogenog djelovanja EPA-e piretrin je klasificiran kao 'vjerojatno nekancerogen za ljude u dozama koje ne potiču proliferaciju stanica jetre'.

3.4. Upotreba buhača kroz povijest

Najstariji zapisi o korištenju buhača na našem području pronađeni su kod franjevaca u Dubrovniku, Mostaru i Splitu (Ožanić 1955.). Usitnjen, u obliku praha od davnina se upotrebljavao u kućanstvima protiv različitih štetnika (Benić Penava 2012.), protiv komaraca i u suzbijanju uši kod ljudi i životinja (Macan i sur. 2006.). Trgovina ovim prahom postojala je stoljećima; prodavao se u ljekarnama pod imenom „*Flores chrisanthemi*“. Smatra se da je dubrovački ljekarnik Antun Drobac (1810-1882) otkrio njegova insekticidna svojstva i proširio ga u upotrebi (Bakarić 2005.). Uzgajao se i na oranicama te je desetljećima bio izvozna kultura ovih područja (Koljak i sur. 1999.). Sam uzgoj započeo je sredinom 19. stoljeća (Kathe i sur. 1993., Ambrožić-Dolinšek 2007.) u okolici Dubrovnika, a zatim se zbog sve veće potražnje proširio i na druge dijelove Dalmacije (Bakarić 2005.). Najveću vrijednost na našim prostorima imao je u vrijeme vinske krize i vremena haranja filoksere (80-tih godina 19. tog stoljeća). Bio je jedina isplativa kultura za uzgoj i spasio je brojne obitelji od gladi i iseljenja. Uzgajao se u napuštenim vinogradima i često je bio kombiniran s drugim kulturama, osobito maslinom (Benić Penava 2012.).

Iako se buhač dugo vremena koristio zbog svojih insekticidnih svojstva, struktura aktivnih komponenti nije bila poznata. Nakon višegodišnjih istraživanja, 1924. godine njemački kemičar Hermann Staudinger (1881-1965) i hrvatski znanstvenik Lavoslav Ružička (1887-1976) uspjeli su identificirati metabolite koji buhaču daju insekticidna svojstva – piretrin I i II (Bakarić 2005.).

Piretrin je prvi puta registriran kao insekticid za korištenje u poljoprivredi, kućanstvima, komercijalnim, industrijskim i javnim zdravstvenim ustanovama, 50-ih godina 20. stoljeća. S obzirom da se piretrin pokazao iznimno djelotvornim u suzbijanju komaraca, imao je veliki značaj u borbi protiv malarije 1942. godine. Međutim, 1945. godine otkriven je sintetski insekticid DDT-a (*dikloro-difenil-trikloretan*) što je dovelo do drastičnog smanjenja proizvodnje buhača kod nas (Bakarić 2005.). Nekoliko godina prije Drugog svjetskog rata dalmatinski buhač je introduciran u Keniju, koja je ubrzo postala glavni proizvođač dalmatinskog buhača u svijetu (Grdiša i sur. 2009.). Ubrzo nakon otkrića DDT-a uslijedio je razvoj sintetske verzije piretrina, piretroida (Gunasekara 2004.). S obzirom na nestabilnost piretrina, osobito na sunčevom svjetlu, njihovu primjenu u poljskim uvjetima zamijenili su piretroidi. Iako su im kemijska struktura i biološka aktivnost vrlo slične piretrinima, piretroidi su proizvedeni opsežnim kemijskim modifikacijama te su dobiveni spojevi veće toksičnosti i stabilnosti (Todd i sur. 2003.). Zbog sve veće svjesnosti o toksičnom djelovanju sintetičkih pesticida na ljude i okoliš, kao i zbog razvoja rezistentnosti kukaca, ponovo se javlja sve veće zanimanje za dalmatinskim buhačem kao izvorom najznačajnijeg prirodnog insekticida (Grdiša 2011.).

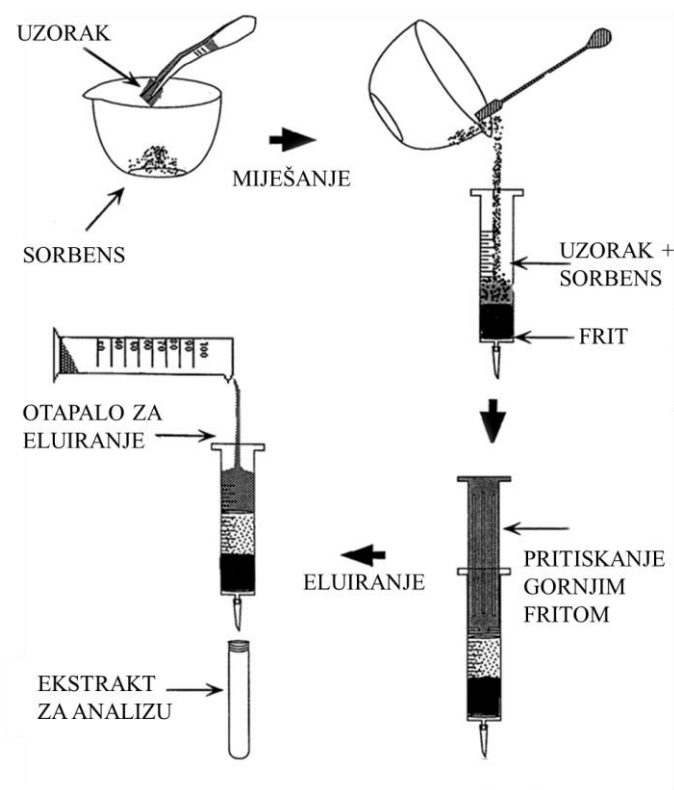
3.5. MSPD (Disperzija matrice u čvrstoj fazi)

Disperzija matrice u čvrstoj fazi (*Matrix Solid Phase Dispersion; MSPD*) je metoda ekstrakcije koju je razvio Barker 1989. godine, kako bi se pojednostavila priprema uzoraka s visokim udjelom masnoća. Ova metoda našla je primjenu kao analitički proces za pripremu, ekstrakciju i frakcioniranje polučvrstih, čvrstih i visoko viskoznih bioloških uzoraka. Od svog uvođenja do danas, MSPD ekstrakcija je citirana u više od 250 publikacija te su njene mnoge primjene opsežno opisane (Barker 2007.).

Korištena je za ekstrakciju lijekova iz tkiva životinja, poput penicilina iz mišića (McGrane i sur. 1998.), u analizi pesticida iz različitih vrsta voća (Soler i sur. 2005.) i povrća (Feng i sur. 2004.), maslina i maslinovog ulja (Ferrer i sur. 2005.), različitih zeljastih biljnih vrsta (Łozowicka i sur. 2013.), meda (Albero i sur. 2001.) i pčela (Morzycka 2002.). Korištena je i za ekstrakciju herbicida iz sokova od voća i povrća (Albero i sur. 2004), zagađivača/onečišćenja iz životinjskih tkiva kao npr. mikotoksina iz životinjske jetre (van Bennecom i sur. 2002.) i ribe (Lagana i sur. 2004.), DDT-a iz životinjskih masti (Furusawa 2005.), voća i povrća te za izolaciju različitih analita kao što su masne kiseline iz čokolade (Perret i sur. 2004.) i karotenoidi iz špinata (Putzbach i sur. 2005.).

Priprema uzorka je ključni korak u analitičkom procesu (Chen i sur. 2008.). Postupak pripreme uzorka u MSPD ekstrakciji sastoji se od miješanja male mase uzorka s puno većom količinom čvrstog, praškastog sorbensa (najčešće u omjeru 1:2 ili 1:4 u korist sorbensa). Najčešće korišteni sorbensi su C₈ ili C₁₈ (vezani silikagel), također se često koriste anorganski

sorbensi poput florisila i Al_2O_3 (aluminijev oksid), te organski sorbensi kao što su grafitna vlakna (Dassanayake i sur. 2009.). Potpunim miješanjem i raspršenjem uzorka preko sorbensa, dolazi do povećanja površine na kojoj se odvija ekstrakcija uzorka. Sorbens i uzorak potrebno je ručno umiješati koristeći stakleni ili ahatni tučak i tarionik, a taj proces traje oko 30 sekundi (Kristenson i sur. 2006.). Dobivenom polusuhom praškastom smjesom pune se kolone iz kojih se željeni analiti eluiraju odgovarajućim otapalom (Barker 2000.). Kolone su obično prazne šprice ili patrone od nehrđajućeg čelika ili propilena. Na dno kolone postavlja se frit, dok se drugi frit postavlja na uzorak pažljivim tlačenjem pomoću klipa šprice (Kristenson i sur. 2006.). Nečistoće se zadržavaju na sorbentu te dolazi do istovremene ekstrakcije i pročišćavanja uzorka. Navedenim postupkom smanjuje se vrijeme trajanja analize i količina potrebnog otapala (Barker 2000.). Izbor sorbensa ovisi o polarnosti analita i interferencijama koje se mogu ekstrahirati iz matrice uzorka (Đurović i Đorđević 2011.). Konačni ekstrakt može se analizirati nekom od kromatografskih analitičkih metoda (npr. HPLC). Na slici (3.5.1.) prikazani su osnovni koraci u MSPD ekstrakciji.



Slika 3.5.1. Prikaz osnovnih koraka MSPD ekstrakcije (Barker 2007.)

Koraci u MSPD ekstrakciji, učinkovitost i selektivnost ekstrakcijskog procesa određeni su nizom čimbenika kao što su fizičko stanje i porijeklo uzorka, relativne koncentracije i svojstva analita (npr. kemijska stabilnost i polarnost), kao i odgovarajuća kombinacija sorbensa, kosorbensa i otapala za ispiranje (García-López i sur. 2008.).

U usporedbi s tradicionalnim metodama ekstrakcije, MSPD ima nekoliko prednosti: pojednostavljenu i brzu obradu uzoraka, smanjenu upotrebu toksičnih otapala, eliminirano formiranje emulzija, povećanu selektivnost i osjetljivost (Đurović i Đorđević 2011.). Time doprinosi smanjenju onečišćenja okoliša te boljoj sigurnosti laboratorijskog osoblja. Također jedna od prednosti je što se MSPD može provesti u blagim ekstrakcijskim uvjetima (sobna temperatura i atmosferski tlak) (Tan i Chai 2011.). Ekstrakcija i pročišćavanje uzorka se odvijaju u istom koraku, čime je omogućeno korištenje malih količina sorbensa i otapala što dovodi do smanjenja vremena i troškova potrebnih za provedbu analize (Đurović i Đorđević 2011.). Negativna strana je nedostatak automatizacije u procesu ekstrakcije (Gilbert-López i sur. 2009.).

4. Materijali i metode

4.1. Biljni materijal

U istraživanje je bilo uključeno pet primki dalmatinskog buhača (*Tanacetum cinerariifolium*), prikupljenih s različitih lokacija duž područja prirodnog rasprostranjenja vrste u Republici Hrvatskoj. Sve su primke dio Kolekcije ljekovitog i aromatičnog bilja Zavoda za sjemenarstvo Agronomskog fakulteta (Tablica 4.1.1.). Poljski pokus je postavljen na pokusnom polju Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu. Tijekom lipnja 2018. godine uzorkovane su cvatne glavice koje su zatim osušene u tamnom i prozračnom prostoru do sadržaja vlage od 10 do 12%. Uzorkovano je 20 jedinki iz svake populacije. Osušene cvatne glavice su zatim spremljene u staklene posude, hermetički zatvorene i čuvane u tamnom i hladnom prostoru do analize.

Tablica 4.1.1. Podaci o primkama dalmatinskog buhača uključenim u istraživanje

Populacija	P01	P02	P03	P04	P05
Lokacija	Cres	Sv. Juraj (Senj)	Ugljan	Kotiški stanovi (Biokovo)	Konavle
Broj primke*	MAP02797	MAP02799	MAP02800	MAP02809	MAP02769
Zemljopisna širina	44°59'00"N	44°55'20"N	44°06'25"N	43°18'49"N	42°35'48"N
Zemljopisna dužina	14°24'39"E	14°55'00"E	15°08'03"E	17°03'56"E	18°14'55"E
Nadmorska visina	151 m	862 m	50 m	1350 m	448 m

* Broj primke u Kolekciji ljekovitog i aromatičnog bilja, Agronomski fakultet; pristup podacima dostupan preko Hrvatske baze podataka o biljnim genetskim izvorima (<http://cpgrd.hcphs.hr/>)

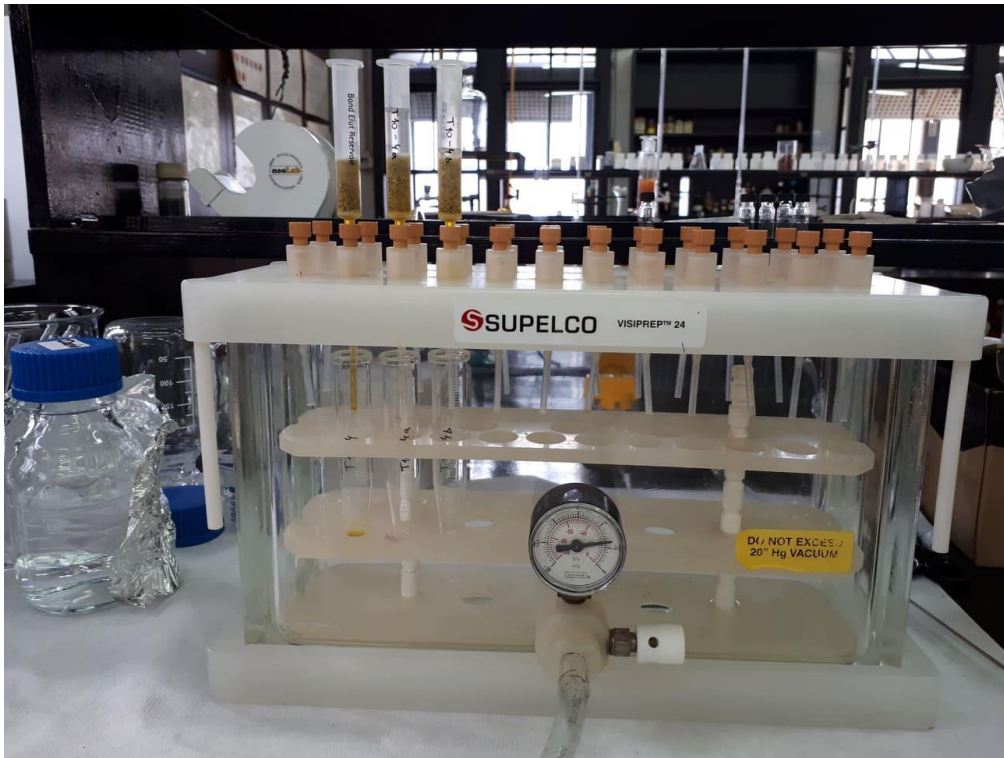
4.2. Ekstrakcija piretrina disperzijom matrice u čvrstoj fazi (MSPD)

Prije ekstrakcije, cvatne su glavice mehanički usitnjene pomoću aparata za usitnjavanje Microtron MB 550 (KINEMATICA AG, Luzern, Švicarska). Florisil koji je korišten kao sorbens aktiviran je na 160 °C i nakon toga ispran *n*-heksanom i metanolom (Kemika, Zagreb). Kao sredstvo za dehidraciju korišten je bezvodni natrijev sulfat (Na₂SO₄). Koristeći analitičku vagu (Mettler Toledo AB104) (Slika 4.2.1.) odvagano je 0.25 g usitnjenih cvatnih glavica, 0.5 g florisila i 0.4 g natrijevog sulfata te je reakcijska smjesa temeljito promiješana u tarioniku koristeći tučak, kako bi se postiglo potpuno raspršenje uzorka. Nakon miješanja, homogena

smjesa kvantitativno je prenesena u polipropilensku praznu kolonu u koju je na dno prethodno stavljen polietilenski frit, dok je drugi frit stavljen iznad smjese pažljivim tlačenjem pomoću klipa šprice. Ekstrakcija piretrina provedena je koristeći aparaturu za ekstrakciju Visiprep™ 24, Supelco, s protokom prilagođenim na 1 mL min^{-1} (Slika 4.2.2.). Piretrini su eluirani korištenjem 5 mL smjese aceton-etil acetat (1:1) kao otapala. Prvi mililitar otapala ostavljen je u koloni 5 minuta kako bi se smjesa natopila otapalom. Nakon toga kroz kolonu je propušten preostali volumena otapala. Ekstrakt je uparen do suhog na $40 \text{ }^\circ\text{C}$ korištenjem uparivača Büchi Waterbath B-480 (Slika 4.2.3.) na vodenoj kupelji te nakon toga ponovno otopljen u $900 \mu\text{l}$ smjese acetonitril-voda (1:1) i prenesen u tamnu vijalu. Otopini je dodano $100 \mu\text{l}$ unutarnjeg standarda 4' – metoksiflavanona (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka).



Slika 4.2.1. Analitička vaga (Mettler Toledo AB104)



Slika 4.2.2. Visiprep™ 24, Supelco



Slika 4.2.3. Uparivač Büchi Waterbath B-480

4.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Identifikacija i kvantifikacija sastavnica piretrina provedena je na Varian ProStar 500 HPLC sustavu (Slika 4.3.1.) koji se sastojao od automatskog uzorkivača ProStar 410, tercijarne pumpe Prostar 230 te detektora s nizom dioda ProStar 330. Za razdvajanje sastavnica je korištena kolona Luna C18 dimenzija 250 mm x 4.6 mm, veličine zrnaca 5 μm . Analiza je provedena korištenjem 0.1% mravlju kiselinu u MilliQ vodi (pročišćenoj pomoću sustava *Simplicity water purification System*, Millipore, Milford, MA, SAD) kao pokretne faze A i 0.1% mravlje kiseline u acetonitrilu kao pokretne faze B. Eluiranje je započelo sa 40% pokretne faze A u trajanju 15 minuta. Sljedećih 10 minuta sastav pokretne faze A se mijenjao do 20% i zadržao izokratski 20 minuta. Tijekom sljedećih 5 minuta sastav se vratio u početno stanje. Protok je iznosio 1.4 ml min⁻¹. Razdvajanje sastavnica piretrina je praćeno na valnoj duljini apsorpcije 225 nm. Kalibracijske krivulje za svaku piretrinsku sastavnicu napravljene su na temelju 8 radnih otopina standarda. Svaki uzorak je injektiran tri puta te je napravljen graf omjera površine pika analita i unutarnjeg standarda za svaku sastavnicu. Kromatogrami su snimljeni pomoću računalnog programa Varian ProStar 360 Star Chromatography Workstation. Za svaki uzorak očitano je vrijeme zadržavanja te površina ispod kromatografske krivulje.



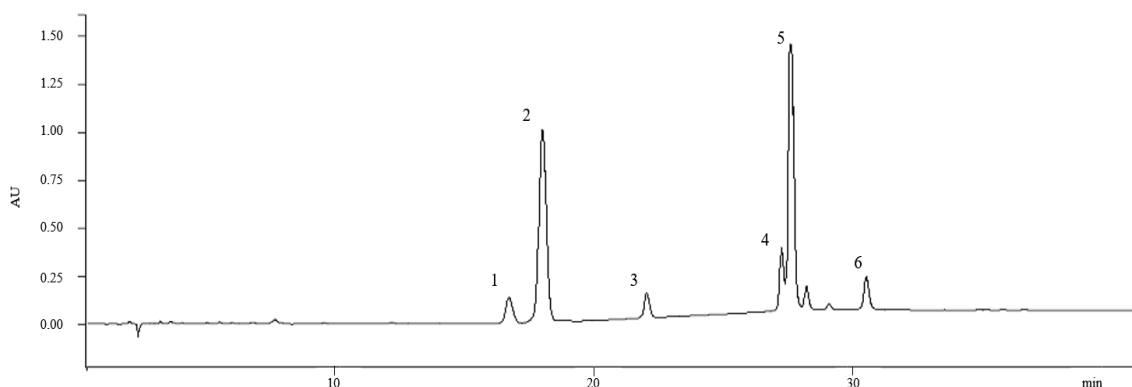
Slika 4.3.1. Varian ProStar 500 HPLC sustav

4.4. Statistička obrada podataka

Provedena je jednosmjerna analiza varijance svih šest sastavnica piretrina, ukupnog sadržaja piretrina kao i omjera piretrina I i II. Prosječne vrijednosti sastavnica piretrina, ukupnog sadržaja piretrina te omjera piretrina I i piretrina II uspoređene su pomoću Tukeyjevog *post hoc* testa. Izračunate su korelacije između šest sastavnica piretrina i ukupnog sadržaja piretrina na temelju Pearsonovog korelacijskog koeficijenta. Sve su analize provedene koristeći statistički računalni program SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC).

5. Rezultati i rasprava

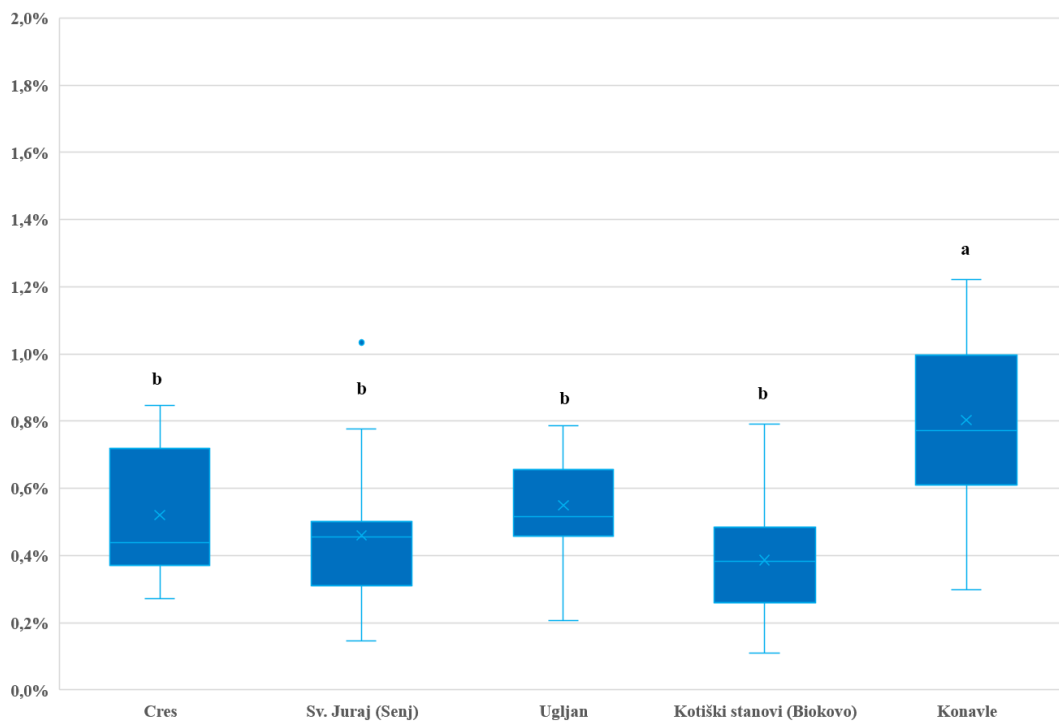
Istraživanje sastava i sadržaja piretrina provedeno je na pet prirodnih populacija dalmatinskog buhača, sakupljenih s različitih lokacija (Cres, Sv. Juraj - Senj, Ugljan, Kotiški stanovi – Biokovo i Konavle). Nakon ekstrakcije piretrina iz uzoraka suhih cvjetnih glavica i njihove identifikacije i kvantifikacije pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (Slika 5.1.) provedena je statistička obrada podataka. Sadržaja šest sastavnica piretrina (% od ukupnog sadržaja piretrina), ukupni sadržaj piretrina, omjer piretrina I/ piretrina II, kao i kemotipovi pet analiziranih populacija dalmatinskog buhača uspoređeni su s rezultatima prethodnog istraživanja populacija s istih lokaliteta.



Slika 5.1. Kromatogram standardne otopine piretrina. 1 – cinerin II.; 2 – piretrin II.; 3 – jasmolin II.; 4 – cinerin I.; 5 – piretrin I.; 6 – jasmolin I.

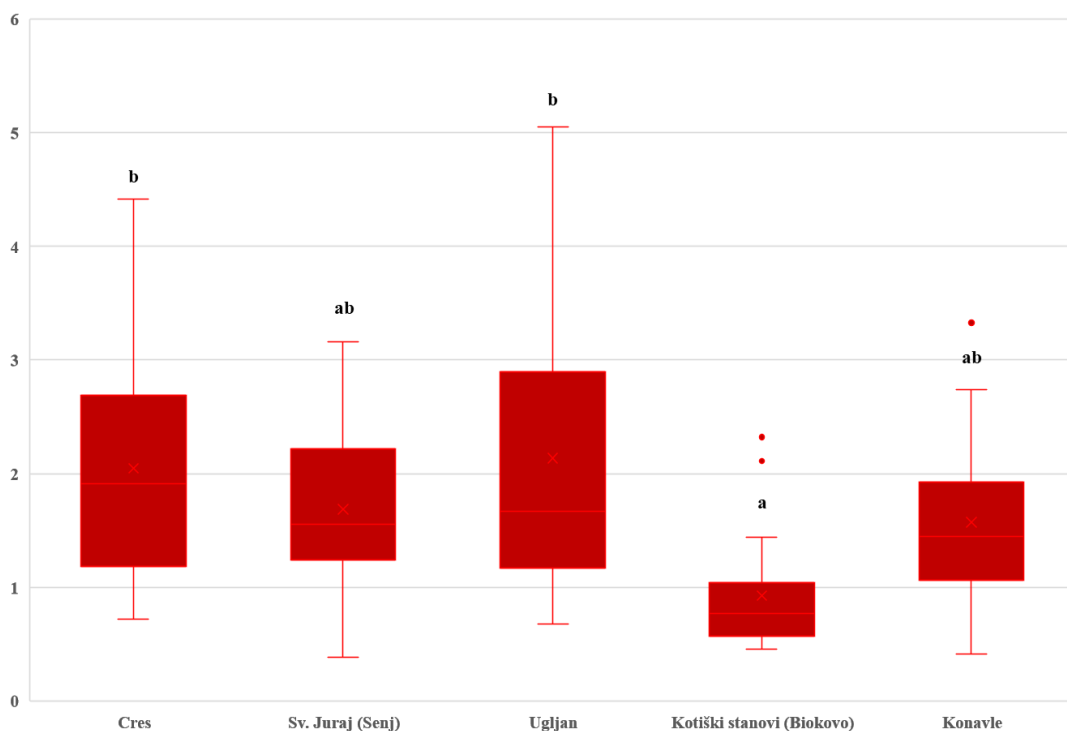
Vrijednosti ukupnih piretrina su se kretale od 0.39% mase suhih cvjetova kod populacije P04 (Biokovo) do 0.80% mase suhih cvjetova kod populacije P05 (Konavle) (Grafikon 5.1.). U istim populacijama utvrđene su jedinice s najvišim i najnižim vrijednostima ukupnih piretrina; 0.11% mase suhih cvjetova u populaciji P04 (Biokovo) i 1.22% mase suhih cvjetova u populaciji P05 (Konavle). Utvrđen je manji sadržaj piretrina u odnosu na rezultate istraživanja Ambrožić-Dolinšek i sur. (2007) gdje je udio piretrina u uzorcima s otoka Cresa iznosio 1.2%, dok je kod uzoraka iz Botaničkog vrta u Ljubljani iznosio 1.1% piretrina po suhoj masi cvijeta. Također je utvrđen manji sadržaj piretrina u odnosu na istraživanja Grdiša i sur. (2013) u kojem je utvrđen sadržaj od 0.36% do 1.30% suhe mase cvijeta.

Prosječne vrijednosti omjera piretrina I i piretrina II kretale su se od 0.93 kod populacije P04 (Biokovo) do 2.14 kod populacije P03 (Ugljan) (Grafikon 5.2.). U populaciji P03 (Ugljan) utvrđene su jedinice vrijednosti omjera piretrina I i piretrina II i do 5.05. Dobiveni omjeri piretrina I i II su viši u odnosu na istraživanja Ambrožić-Dolinšek i sur. (2007) gdje je omjer iznosio 0.6 kod uzoraka iz Botaničkog vrta u Ljubljani te 1.4 kod uzoraka s otoka Cresa. Dok su dobiveni omjeri niži u odnosu na istraživanja autora Grdiša i sur. (2013) gdje se omjer kretao od 0.64 do 3.33.



* Populacije označene istim slovom ne razlikuju se značajno na razini $P < 0.05$

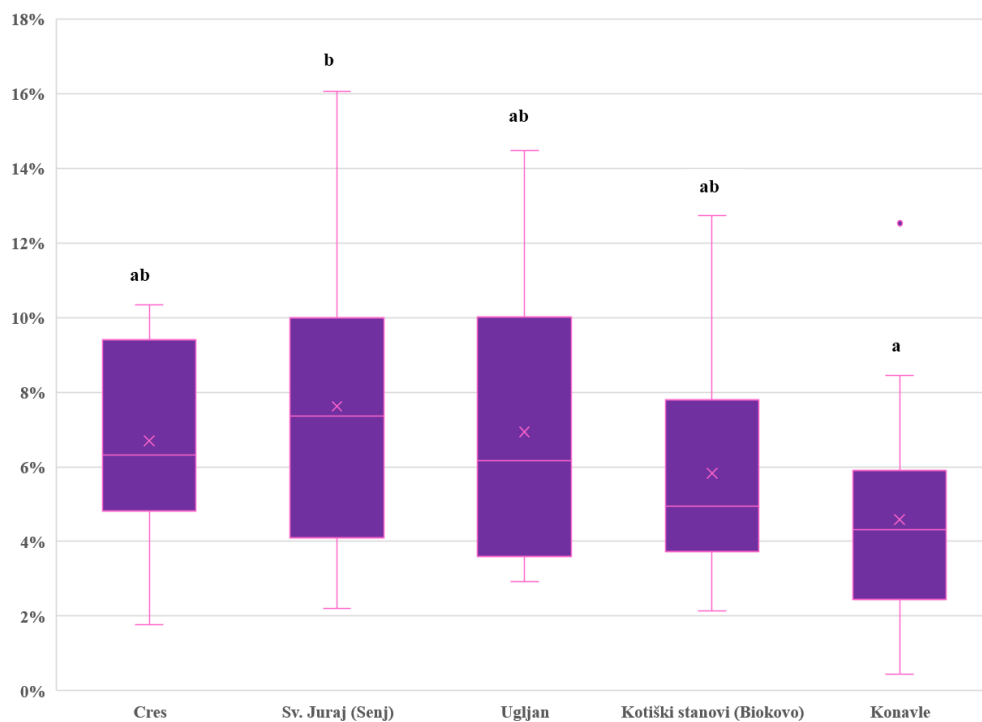
Grafikon 5.1. Udio ukupnih piretrina u istraživanim populacijama



* Populacije označene istim slovom ne razlikuju se značajno na razini $P < 0.05$

Grafikon 5.2. Omjer piretrina I/ piretrina II u istraživanim populacijama

Prosječne vrijednosti cinerina I u istraživanim populacijama kretale su se u od 4.59% ukupnih piretrina kod populacije P05 (Konavle) do 7.63% ukupnih piretrina kod populacije P02 (Senj) kao što je vidljivo na grafikonu 5.3. U istim populacijama utvrđene su jedinice s najnižim i najvišim vrijednostima cinerina I, 0.43% ukupnih piretrina (Konavle; P05) i 16.05% ukupnih piretrina (Sv. Juraj – Senj; P02).

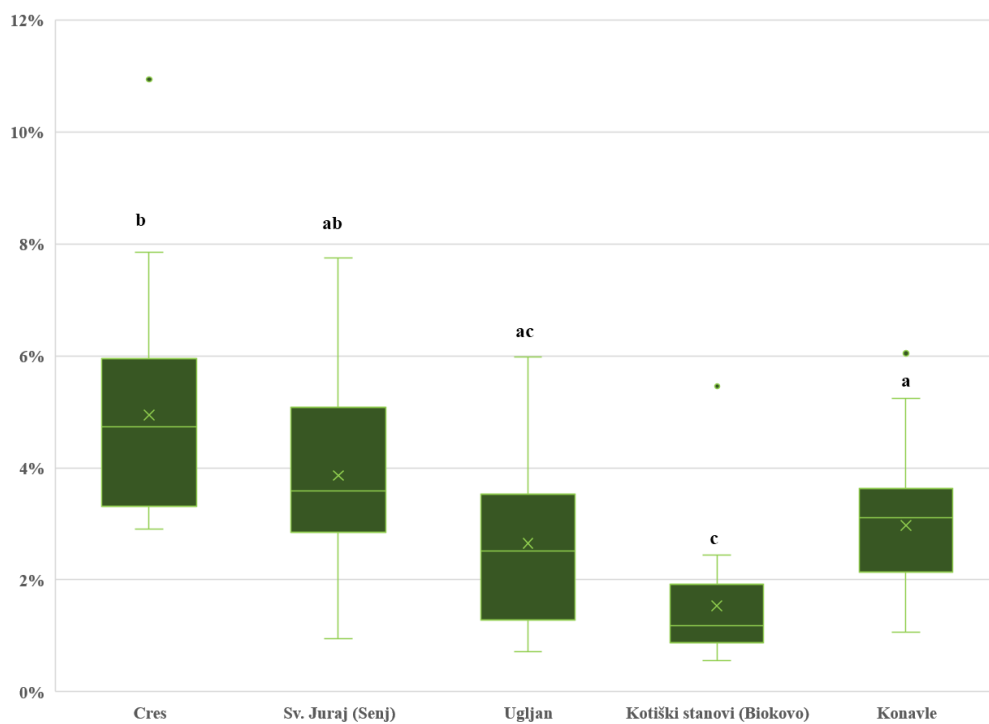


* Populacije označene istim slovom ne razlikuju se značajno na razini $P < 0.05$.

Grafikon 5.3. Udio cinerina I (% ukupnih piretrina) u istraživanim populacijama

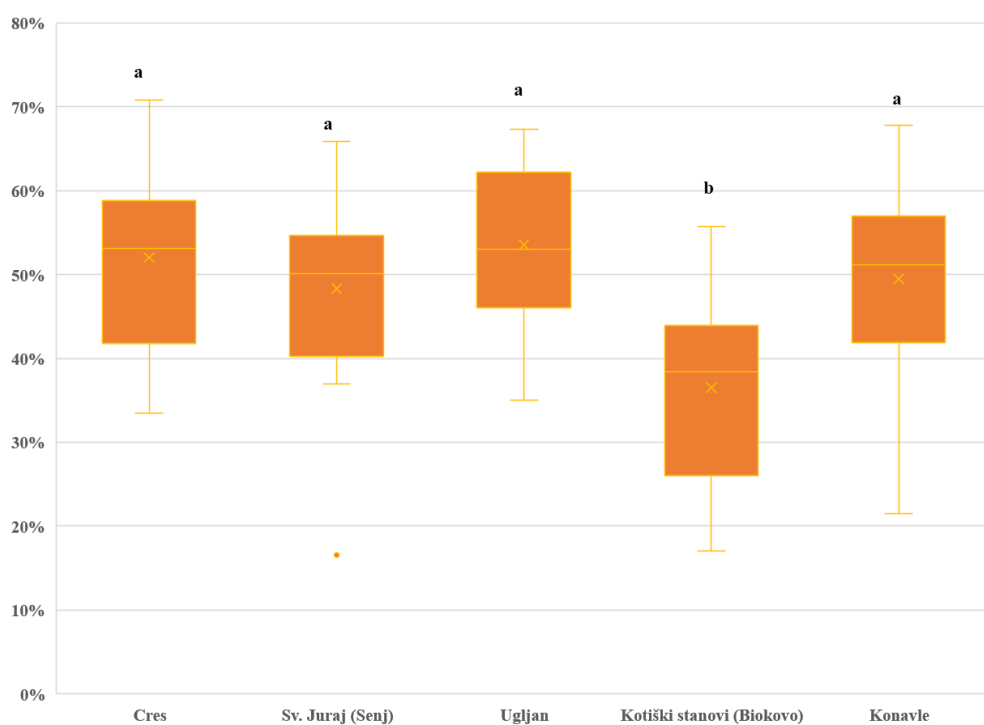
Prosječne vrijednosti jasmolina I kretale su se u rasponu od 1.54% ukupnih piretrina kod populacije P04 (Biokovo) do 4.94% kod populacije P01 (Cres) kao što je vidljivo na grafikonu 5.4. U istim populacijama utvrđene su jedinice s najnižim i najvišim vrijednostima jasmolina I, 0.55% ukupnih piretrina (P04) i 10.94% ukupnih piretrina (P01).

Najveći udio ukupnih piretrina kroz sve populacije činio je piretrin I. Njegove prosječne vrijednosti kretale su se od 36.54% ukupnih piretrina kod populacije P04 (Biokovo) do 53.56% ukupnih piretrina kod populacije P03 (Ugljan) i prikazane su na grafikonu 5.5. U populacijama P02 (Senj) i P01 (Cres) utvrđene su jedinice s najnižim i najvišim vrijednostima piretrina I, 16.55% ukupnih piretrina (Senj; P02) i 70.76% ukupnih piretrina (Cres; P01).



* Populacije označene istim slovom ne razlikuju se značajno na razini $P < 0.05$.

Grafikon 5.4. Udio jasmolina I (% ukupnih piretrina) u istraživanim populacijama



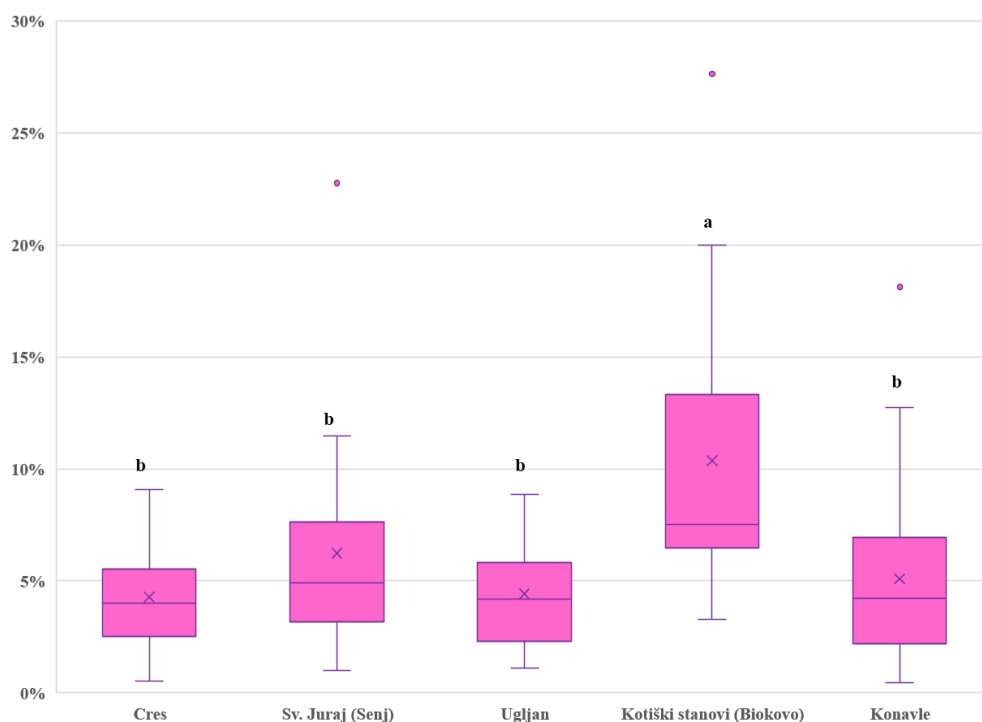
* Populacije označene istim slovom ne razlikuju se značajno na razini $P < 0.05$.

Grafikon 5.5. Udio piretrina I (% ukupnih piretrina) u istraživanim populacijama

Prosječne vrijednosti cinerina II kretale su se od 4.27% ukupnih piretrina u populaciji P01 (Cres) do 10.36% ukupnih piretrina kod populacije P04 (Biokovo) (Grafikon 5.6.). U populacijama P05 (Konavle) i P03 (Ugljan) utvrđene su jedinice s najnižim i najvišim vrijednostima cinerina II, 0.43% ukupnih piretrina (P05) i 27.64% ukupnih piretrina (P03).

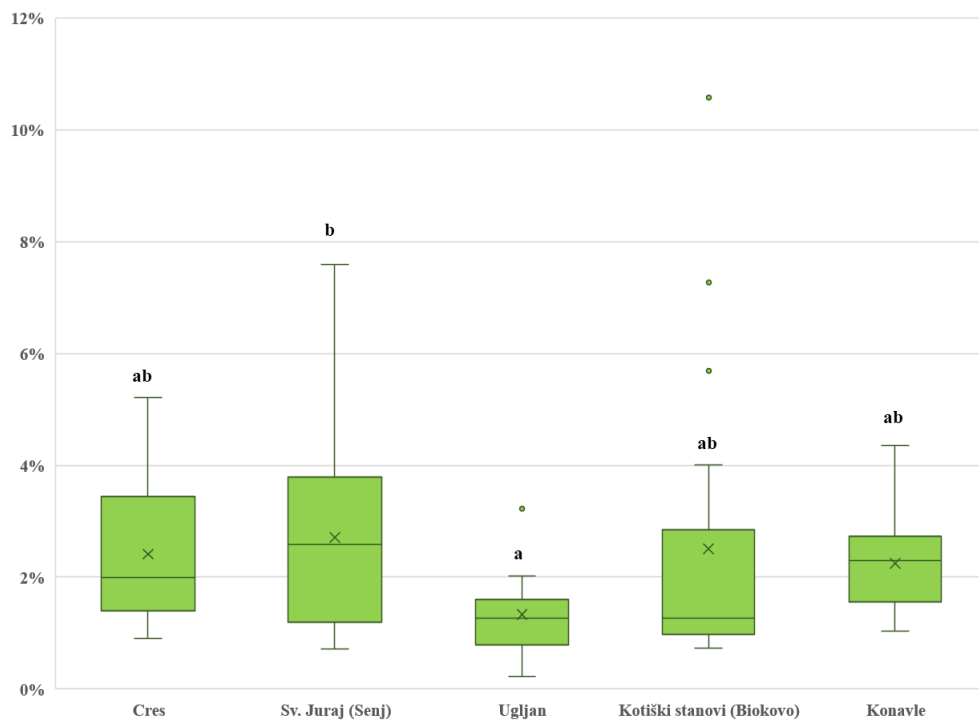
Najmanji udio ukupnih piretrina u svim analiziranim populacijama činio je jasmolin II. Njegove prosječne vrijednosti kretale su se od 1.33% ukupnih piretrina kod populacije P03 (Ugljan) do 2.71% ukupnih piretrina kod populacije P02 (Senj) (Grafikon 5.7.). U populacijama P03 (Ugljan) i P04 (Biokovo) utvrđene su jedinice s najnižim i najvišim vrijednostima jasmolina II, 0.22% ukupnih piretrina (P03) i 10.57% ukupnih piretrina (P04).

Prosječne vrijednosti piretrina II kretale su se od 29.66% ukupnih piretrina kod populacije P01 (Cres) do 43.23% ukupnih piretrina kod populacije P04 (Biokovo) (Grafikon 5.8.). U populacijama P03 (Ugljan) i P05 (Konavle) utvrđene su jedinice s najnižim i najvišim vrijednostima piretrina II, 13.15% ukupnih piretrina (P03) i 61.12% ukupnih piretrina (P05).



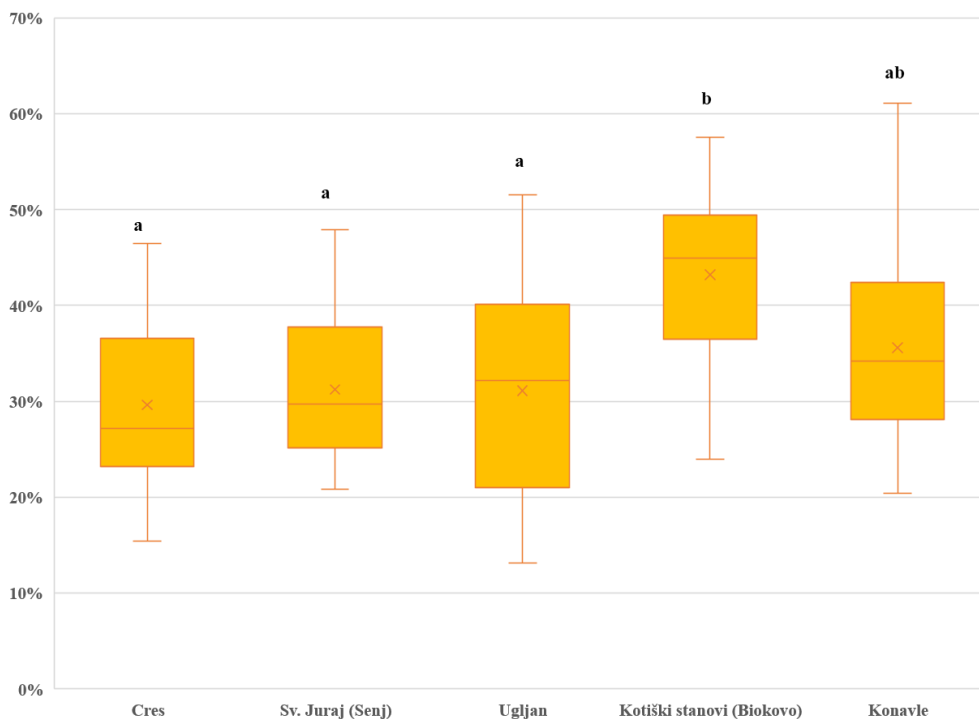
* Populacije označene istim slovom ne razlikuju se značajno na razini $P < 0.05$

Grafikon 5.6. Udio cinerina II (% ukupnih piretrina) u istraživanim populacijama



* Populacije označene istim slovom ne razlikuju se značajno na razini $P < 0.05$.

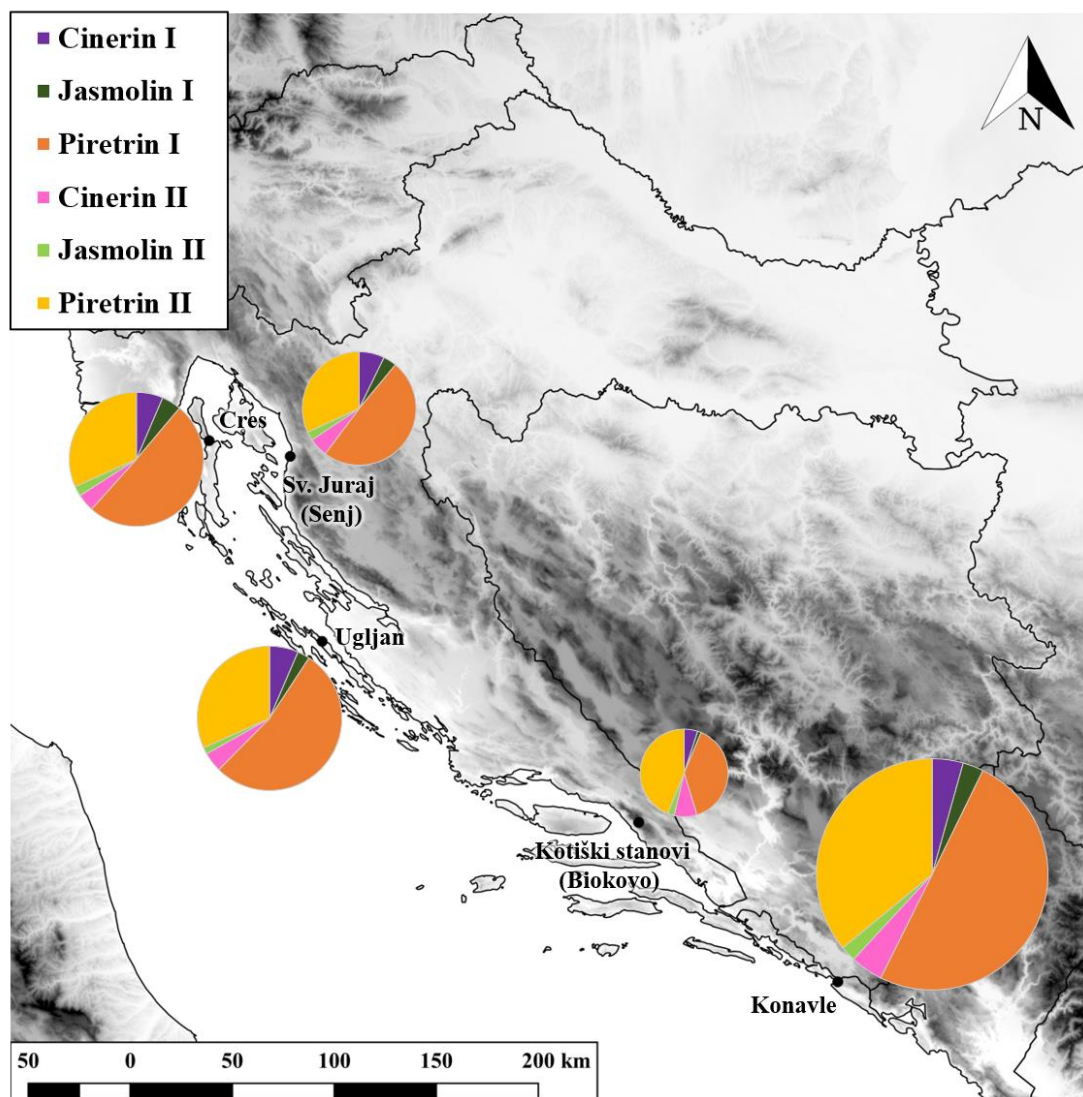
Grafikon 5.7. Udio jasmolina II (% ukupnih piretrina) u istraživanim populacijama



* Populacije označene istim slovom ne razlikuju se značajno na razini $P < 0.05$.

Grafikon 5.8. Udio piretrina II (% ukupnih piretrina) u istraživanim populacijama

Na slici 5.2. prikazan je zemljopisni položaj istraživanih populacija s udjelima pojedinih sastavnica. Istraživane populacije imaju sličan profil udjela pojedinih sastavnica piretrina te se najviše razlikuju prema sadržaju ukupnih piretrina, koji raste prema južnije uzorkovanim populacijama. Jedini izuzetak je populacija P04 (Biokovo) kod koje je piretrin II utvrđen u većem udjelu od piretrina I, a utvrđen je i najmanji udio ukupnih piretrina.



Slika 5.2. Kemijska raznolikost istraživanih populacija s obzirom na geografsko podrijetlo

Analizom varijance utvrđene su značajne razlike u svim svojstvima ($P < 0.0321$) između istraživanih populacija osim u sadržaju jasmolina II ($P = 0.0594$). Tukeyjev *post hoc* test pokazao je da postoje značajne razlike u sadržaju piretrina I i cinerina II između populacije P04 (Biokovo) i ostalih populacija. Također, populacija P05 (Konavle) se značajno razlikovala od ostalih populacija u ukupnom sadržaju piretrina.

Korelacije između udjela piretrina I i cinerina II te piretrina II bile su negativne i visokoznačajne. Udio piretrina II bio je visokoznačajno negativno koreliran sa udjelima cinerina I i jasmolina I te već spomenutim piretrinom I. Ukupni je sadržaj piretrina bio negativno koreliran sa svim sastavnicama piretrina osim sa piretrinom I i II iako je korelacija bila visokoznačajna samo u slučaju cinerina I i II (Tablica 5.1.).

U prethodnom istraživanju kemijske raznolikosti prirodnih populacija dalmatinskog buhača identificirano je pet kemotipova (A, B, C, D i E) unutar kojih su razvrstane istraživane prirodne populacije. Tih pet kemotipova razlikuje se prema udjelu pojedinih sastavnica piretrina. Kemotip A predstavlja najbolji kemotip te je za njega karakterističan najviši udio (%) piretrina I. Kemotip B okarakteriziran je visokim udjelom piretrina I i II i nižim udjelom ostalih sastavnica. Za kemotip C karakterističan je niži udio piretrina I te viši udio cinerina I i II i jasmolina II. Glavna obilježja kemotipa D su niži udio piretrina I i II te viši udio jasmolina I. Dok kemotip E karakterizira niži udio piretrina I i viši udio cinerina I i II, jasmolina II i piretrina II (Grdiša i sur. 2013.).

Zbog različitog načina djelovanja piretrina I i piretrina II, omjer između ove dvije sastavnice pokazatelj je kvalitete i učinkovitosti piretrinskog ekstrakta (Maciver 1995.). Omjer piretrina I i piretrina II kemotipova u navedenom istraživanju kretao se od 0.86 do 2.57% što pokazuje da različiti kemotipovi imaju različit stupanj insekticidne aktivnosti. Najviša vrijednost utvrđena je kod kemotipa A (2.57 %), što govori da se radi o piretrinskom ekstraktu visoke kvalitete, odnosno visoke insekticidne aktivnosti.

Na temelju prosječnih vrijednosti piretrinskih komponenti, udjela ukupnih piretrina te omjera piretrin I/piretrin II pet istraživanih populacija svrstano je u odgovarajuće kemotipove (Tablica 5.2.). Populacija P02 (Senj) svrstana je u kemotip C zbog nižeg udjela piretrina I, višeg udjela cinerina I i II te jasmolina II. Populacija P03 (Ugljan) svrstana je u kemotip B zbog visokog udjela piretrina I te visokog omjera pir I/ pir II. Populacija P04 (Biokovo) najviše odgovara kemotipu E zbog svog niskog udjela ukupnih piretrina i piretrina I te višeg udjela piretrina II. Populacije P05 (Konavle) i P01 (Cres) se prema parametrima nalaze između kemotipova B i C, no u konačnici su svrstane u kemotip C zbog nižeg udjela piretrina I. Nijedna populacija nije svrstana u kemotip A koji se smatra najkvalitetnijim. Unatoč tome, unutar spomenutih populacija postoje jedinke koje ipak možemo svrstati u taj kemotip. Unutar populacije P01 (Cres) istaknulo se najviše jedinki čak njih devet, unutar P02 (Senj) i P03 (Ugljan) po sedam, u P04 (Biokovo) samo dvije, a unutar populacije P05 (Konavle) četiri jedinke. Većina populacija imala je prilično nizak udio ukupnih piretrina što predstavlja nedostatak jer unatoč izuzetnoj kvaliteti, ekstrakcijom se iz njih može dobiti mala količina piretrina (potencijalni problem prilikom uzgoja). Izuzetak predstavljaju jedinke populacije P05 (Konavle) kod kojih je i udio ukupnih piretrina bio viši, zbog čega su one idealan polazni materijal za daljnje programe oplemenjivanja.

Tablica 5.1. Pearsonov korelacijski koeficijent između šest sastavnica piretrina (% ukupnih piretrina) i ukupnog sadržaja piretrina (% po suhoj masi cvijeta).

Sastavnica	Jasmolin I		Piretrin I		Cinerin II		Jasmolin II		Piretrin II		Ukupni piretrini	
Cinerin I	0.279	**	0.031	ns	0.311	**	0.102	ns	-0.549	***	-0.393	***
Jasmolin I			0.381	***	-0.276	**	0.304	**	-0.629	***	-0.087	ns
Piretrin I					-0.836	***	-0.476	***	-0.790	***	0.225	*
Cinerin II							0.463	***	0.405	***	-0.465	***
Jasmolin II									0.106	ns	-0.141	ns
Piretrin II											0.105	ns

ns – nije statistički značajno; * statistički značajno na razini P<0.05; ** statistički značajno na razini P<0.01; *** statistički značajno na razini P<0.001

Tablica 5.2. Usporedba sadržaja šest sastavnica piretrina (% od ukupnog sadržaja piretrina), ukupnog sadržaja piretrina, omjera piretrina I/piretrina II i kemotipova kod pet analiziranih populacija dalmatinskog buhača s prethodnim istraživanjem istih lokaliteta.

Istraživanje	Cinerin I		Jasmolin I		Piretrin I		Cinerin II		Jasmolin II		Piretrin II		Ukupni piretrini		Piretrin I/ Pietrin II		Kemotip	
	2013.	2019.	2013.	2019.	2013.	2019.	2013.	2019.	2013.	2019.	2013.	2019.	2013.	2019.	2013.	2019.	2013.	2019.
Cres	4.16	6.70	2.30	4.94	60.51	52.03	2.67	4.26	1.18	2.41	29.69	29.66	1.05	0.52	2.04	2.05	A	C
Sv. Juraj (Senj)	4.10	7.63	4.58	3.86	65.66	48.33	1.94	6.23	1.42	2.71	21.05	31.24	1.07	0.46	3.09	1.69	A	C
Ugljan	10.73	6.94	4.28	2.65	35.54	53.56	10.67	4.42	4.37	1.33	34.31	31.10	0.36	0.55	2.14	2.14	E	B
Kotiški stanovi (Biokovo)	4.90	5.83	1.71	1.54	53.03	36.54	5.30	10.36	0.95	2.51	34.20	43.23	0.40	0.39	0.90	0.92	B	E
Konavle	5.42	4.59	1.56	2.97	52.98	49.49	4.58	5.10	1.52	2.25	32.97	35.61	0.87	0.80	1.18	1.57	B	C

Usporedbom podataka dobivenih u ovom istraživanju sa onima iz prethodnog istraživanja (Grdiša i sur., 2013.) vidljivo je da postoje određene razlike (Tablica 5.2.). Kod populacije sa otoka Cresa udio piretrina II bio je isti u oba istraživanja. Udio piretrina I u prethodnom istraživanju bio je veći dok su udjeli svih ostalih sastavnica bili veći u ovom istraživanju. Također udio ukupnih piretrina u spomenutom radu bio je čak dvostruko veći (1.05% u odnosu na 0.52% u ovom radu), dok je omjer piretrin I/piretrin II ostao isti. Kada uspoređujemo populacije s područja Senja uočljivo je da je udio piretrina I u ovom istraživanju bio znatno manji. Valja istaknuti da je Senj jedina populacija u kojoj je omjer piretrin I/piretrin II znatno manji (1.69%) nego u navedenom radu (3.09%). Udjeli cinerina I i II, jasmolina II i piretrina II u ovom istraživanju bili su veći dok su udio jasmolina I kao i udio ukupnih piretrina manji u odnosu na prethodno istraživanje. Udjeli svih sastavnica piretrina u populaciji s Ugljana u ovome radu bili su manji, osim udjela piretrina I koji je u ovom slučaju bio znatno veći u ovome radu. Omjer piretrin I/piretrin II kod populacija s Ugljana bio je jednak u oba rada. Kod populacije s Biokova (Kotiški stanovi) udjeli sastavnica je u ovom radu bili su veći, osim piretrina I, koji je u prethodnom istraživanju bio znatno veći. Udio ukupnih piretrina i omjer piretrin I/piretrin II se nisu razlikovali u uspoređivanim istraživanjima. U populaciji s područja Konavala jedina razlika bila je u omjeru piretrin I/piretrin II, koji je bio nešto viši u ovom istraživanju.

6. Zaključak

Cilj istraživanja bio je utvrditi sastav i sadržaj piretrina pet prirodnih populacija dalmatinskog buhača. Za ekstrakciju piretrina iz suhih cvatnih glavica dalmatinskog buhača korištena je metoda disperzije matrice u čvrstoj fazi (MSPD). Utvrđivanje sastava i sadržaja piretrina provedeno je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Za sve statističke analize korišten je SAS računalni program. Na temelju dobivenih rezultata doneseni su zaključci:

1. Sadržaj piretrina kod pet prirodnih populacija kretao se od 0.39% (Biokovo; P04) do 0.80% (Konavle; P05) po masi suhog cvijeta, dok se omjer piretrina I i piretrina II kretao od 0.93 (Biokovo; P04) do 2.14 (Ugljan; P03). Iako nisu utvrđene visoke koncentracije ukupnih piretrina, omjer piretrina I i II pokazuje da se radi o visokokvalitetnom ekstraktu.
2. Analizirane populacije svrstane su u kemotipove. Iako niti jedna populacija nije svrstana u kemotip A koji se smatra najkvalitetnijim, unutar svake populacije isticalo se nekoliko jedinki koje bi se na temelju sadržaja sastavnica mogle uvrstite u kemotip A. Posebno se ističu četiri jedinke iz populacije P05 (Konavle) koje predstavljaju idealan polazni materijal za programe oplemenjivanja.
3. Na osnovu Pearsonovog korelacijskog koeficijenta određene su korelacije između šest sastavnica piretrina (% ukupnih piretrina) i ukupnog sadržaja piretrina (% po suhoj masi cvijeta). Korelacije između udjela piretrina I i cinerina II te piretrina II bile su negativne i visokoznačajne. Ukupni je sadržaj piretrina bio negativno koreliran sa svim sastavnicama piretrina osim sa piretrinom I i II iako je korelacija bila visokoznačajna samo u slučaju cinerina I i II.
4. Navedeni rezultati i zaključci mogu poslužiti kao temelj za daljnja istraživanja, koja su nužna kako bi se preciznije utvrdio sastav i sadržaj piretrina prirodnih populacija dalmatinskog buhača. Selekcija najboljih prirodnih populacija na temelju analiza kemijskog sastava, ključna je za razvoj budućih oplemenjivačkih programa i ponovno uvođenje dalmatinskog buhača u poljoprivrednu proizvodnju.

7. Popis literature

1. Abad M. J., Bermejo P., Villar A. (1995). An approach to the genus *Tanacetum* L. (Compositae): Phytochemical and pharmacological review. *Phytotherapy Research* 9: 79 – 92
2. Adams R. M. (1983). Occupational skin disease. Grune & Stratton. New York, str. 362
3. Albero B., Sanchez-Brunete C., Tadeo J. L. (2001). Multiresidue determination of pesticides in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with electron-capture detection. *J AOAC Int* 84: 1165 – 1171
4. Albero B., Sanchez-Brunete C., Tadeo J. L. (2004). Determination of thiabendazole in orange juice and rind by liquid chromatography with fluorescence detection and confirmation by gas chromatography/mass spectrometry after extraction by matrix solid-phase dispersion. *J AOAC Int* 87:664 – 670
5. Ambrožić-Dolinšek J., Kovač M., Žel J., Camloh M. (2007). Pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*) from the Northern Adriatic as a potential source of natural insecticides. *Annales. Ser His Nat* 17 (1): 39 – 46
6. Antonious G. F., Byers M.E., Kerst W.C. (1997). Residue levels of pyrethrins and piperonyl butoxide in soil and runoff water. *J Environ Sci Health B* 32(5): 621 – 644
7. Antonious G. F. (2004). Residues and Half-Lives of Pyrethrins on Field-Grown Pepper and Tomato. *Journal Environmental Science Health B* 39(4): 491 – 503
8. Atkinson R. L., Blackman A. J., Faber H. (2004). The degradation of the Natural Pyrethrins in Crop Storage. *Journal of agricultural and food chemistry*. 52: 280 – 287
9. Babić S., Grdiša M., Periša M., Ašperger D., Šatović Z., Kaštelan-Macan M. (2012). Ultrasound-assisted extraction of pyrethrins from pyrethrum flowers. *Agrohimica-Pisa* 56 (4-5): 193 – 206
10. Bakarić P. (2005). Buhač-prirodni insekticid. *Gospodarski list* 17: 41 – 45
11. Barker S. A. (2000). Matrix solid-phase dispersion – a review. *J. Chromatogr. A*. 885: 115 – 127
12. Barker S. A. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD) - a review. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 70: 151 – 162
13. Benić Penava M. (2012). Proizvodnja buhača u Dubrovačkom kotaru između dva Svjetska rata. *Ekonomika i ekohistorija* 8: 108 – 115
14. Bhat B. K. (1995). Breeding Methodologies Applicable to Pyrethrum. In: *Pyrethrum Flowers: Production, Chemistry, Toxicology and Uses* (JE Casida, GB Quistad, eds) Oxford University Press, New York, str. 67 – 94
15. Brewer J. K. (1968). Flowering and seedsetting in pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.). A review. *Pyrethrum Post* 9(4): 18 – 21
16. Cantele A. (2001). Piretro (*Tanacetum cinerariifolium* o *Chrysanthemum cinerariaefolium* L.) Coltivazioni erbacee – Piante oleifere, da zucchero, da fibra, orticole e aromatiche. 449 – 452
17. Casida J. E. (1980). Pyrethrum Flowers and Pyrethroid Insecticides. *Environmental Health Perspectives* 34: 189 – 202

18. Casida J. E., Quistad G. B. (1995). *Pyrethrum flowers: Production, Chemistry, Toxicology, and Uses*. Oxford University Press, New York.
19. Campbell A., Chapman M. (2000). *Handbook of poisoning in dogs and cats*. Blackwell Science Ltd. Oxford, UK.
20. Catalano C., Abbate L., Fata del Bosco S., Motisi A., Carrubba A. (2014). Micropropagation and in vitro culture of *Pyrethrum* (*Chrysanthemum cinerariifolium* (Trev.) Vis.). *Natural Products: Research Reviews* 2: 189 – 212
21. Chen Y., Guo Z., Wang X., Qiu C. (2008). Sample preparation. *J. Chromatogr* 1184: 191 – 219
22. Crombie L. (1980). Chemistry and biosynthesis of natural pyrethrins. *Pest Management Science* 11(2): 102 – 118
23. Crombie L. (1995). Chemistry of Pyrethrins. *Pyrethrum flowers: Production, Chemistry, Toxicology, and Uses*. (JE Casida, GB Quistad, ur.). Oxford University Press, New York, USA, str. 102 – 122
24. Crosby D. G. (1995). Environmental fate of pyrethrins. *Pyrethrum flowers: Production, Chemistry, Toxicology, and Uses*. (JE Casida, GB Quistad, ur.). Oxford University Press, New York, str. 194 – 213
25. Dassanayake R. M., Wei H., Chen R. C., Li A. (2009). Optimization of the matrix solid phase dispersion extraction procedure for the analysis of polybrominated diphenyl ethers in human placenta. *Anal Chem* 81(23): 9795 – 801
26. Davies T. G. E., Field L. M., Usherwood P. N. R., Williamson M. S. (2007). DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life* 59: 151 – 162
27. Demoute J. P. (1989). A brief review of the environmental fate and metabolism of pyrethroids. *Pesticide science* 27(4): 375 – 385
28. Đurović R., Đorđević T. (2011). Modern extraction techniques for pesticide residues determination in plant and soil samples. *Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis* 221 – 247
29. Feng X., Chen W., Wang Z., Chen J., Cai J. (2004). A rapid and simple method for determination of organochlorine multipesticides in fruits and vegetables. *Chinese Journal of Health Laboratory Technolog* 14: 701 – 702
30. Ferrer C., Gomez J. M., Garcia-Reyes J. F., Ferrer I., Thurman M. E., Fernandez-Alba A. R. (2005). Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1069: 183 – 94
31. Furusawa N. (2005). Determination of DDT in animal fats after matrix solidphase dispersion extraction using an activated carbon fiber. *Chromatographia* 62:315 – 8
32. García-López M., Canosa P., Rodríguez I. (2008). Trends and recent applications of matrix solid-phase dispersion. *391(3):963 – 974*
33. Gilbert-López B., García-Reyes J. F., Molina-Díaz A. (2009). Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: a review. *Talanta* 79(2):109 – 128
34. Godin P. J., Inglis H. S., Snarey M., Thain E. M. (1963). Biosynthesis of the pyrethrins. Part II. Pyretric acid and the origin of ester-methyl groups. *Journal of Chemical Society (B): 5878 – 5890*

35. Gnadinger C. B., Corl C. S. (1930). Studies on pyrethrum flowers II: The relation between maturity and pyrethrin content. *J Am Chem Soc* 52 (2) 680 – 684
36. Grdiša M., Carović–Stanko K., Kolak I., Šatović Z. (2009). Morphological and biochemical diversity of Dalmatian Pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch. Bip.). *Agriculturae Conspectus Scientificus* 74(2): 73 – 80
37. Grdiša M. (2011). Morfološka, kemijska i genetska raznolikost dalmatinskog buhača (*Tanacetum cinerariifolium* /Trev. / Schultz Bip.). Doktorski rad. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
38. Grdiša M., Babić S., Periša M., Carović-Stanko K., Kolak I., Liber Z., Jug-Dujaković M., Šatović Z. (2013). Chemical diversity of the natural populations of Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir. /Sch. Bip.) in Croatia. *Chemistry & biodiversity*. 10(3): 460 – 472
39. Greenhill M. (2007). Pyrethrum production: Tasmanian success story. *Chronica Horticulturae* 47(3): 5 - 8
40. Gunasekara A.S. (2004). Environmental Fate of Pyrethrins. Environmental Monitoring Branch, Department of Pesticide Regulation. Sacramento, CA
41. Head S. W. (1973). Composition of pyrethrum extract and analysis of pyrethrins. *Pyrethrum; The Natural Insecticide* (JE Cadisa, ur.). Academic Press. New York 25 – 49
42. Hedayat M., Abdi Gh., Khosh–Khui M. (2009). Regeneration via Direct Organogenesis from Leaf and Petiole Segments of Pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir. / Schultz– Bip.). *American–Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science* 6(1): 81 – 87
43. Heywood V.H. (1976). *Tanacetum*. In: *Flora Europaea, Plantaginaceae to Compositae (and Rubiaceae)*. Volume 4. (TG Tutin, VH Heywood, NA Burges, DM Moore, DH Valentine, SM Walters, DA Webb, ur.). Cambridge University Press, Cambridge, str. 169 – 171
44. Hitmi A., Sallanon H., Barthomeuf C. (2001). Effects of plant growth regulators on the growth and pyrethrin production by cell cultures of *Chrysanthemum cinerariaefolium*. *Australian Journal of Botany* 49: 81 – 88
45. Jovetić S., De Gooijer C. (1995). The production of pyrethrins by in vitro systems. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 15: 125 – 138
46. Kasaj D., Rieder A., Krenn L., Kopp B. (1999). Separation and Quantitative analysis of Natural Pyrethrins by High Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia* 50 (9/10): 607 – 610
47. Kathe W., Hoonef S., Heym A. (1993). *Medical and aromatic plants in Albania, Bosnia–Herzegovina, Bulgaria, Croatia and Romania*. German Federal Agency for Nature Conservation. Bonn, Germany.
48. Kolak I., Rozić I. (1997). *Poznavanje ljekovitog, aromatičnog i medonosnog bilja*. Praktikum I. Zagreb - Mostar.
49. Kolak I., Rozić I. (1998). *Droge i metabolite ljekovitog, aromatičnog I medonosnog bilja*. Praktikum II. Zagreb - Mostar.
50. Kolak I., Šatović Z., Rukavina H., Filipaj B. (1999). Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium*). *Sjemenarstvo*. 16(5): 425 – 440

51. Kristenson E. M., Ramos L. and Brinkman U. A. T. (2006). Recent advances in matrix solidphase dispersion. *Trends Anal. Chem.* 25(2): 96 – 111
52. Kumar V., Tyagi D. (2013). Chemical composition and biological activities of essential oils of genus *Tanacetum* – a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.* 2(3): 155 – 159
53. Kušan F. (1947). *Naše ljekovito bilje.* Zagreb
54. Kušan F. (1969). *Biljni pokrov Biokova.* Zagreb
55. Lagana A., Faberi A., Fago G., Marino A., Pastorini E., Samperi R. (2004). Application of an innovative matrix solidphase dispersion–solid–phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry analytical methodology to the study of the metabolism of the estrogenic mycotoxin zearalenone in rainbow trout liver and muscle tissue. *Int J Environ Anal Chem* 84: 1009 – 1016
56. Łozowicka B., Jankowska M., Rutkowska E., Hrynko I., Kaczyński P., Miciński J. (2013). The evaluation of a fast and simple pesticide multiresidue method in various herbs by gas chromatography. *J Nat Med* 68(1):95 – 111
57. Macan J., Varnai V. M., Turk R. (2006). Zdravstveni učinci piretrina i piretroida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju.* 57(2): 237 – 243
58. MacDonald W.L. (1995). *Pyrethrum flowers–production in Australia. Pyrethrum flowers: Production, Chemistry, Toxicology, and Uses (JE Casida, GB Quistad, ur.).* Oxford University Press, New York, str. 55 – 66
59. Maciver D.R. (1995). *Constituents of pyrethrum extracts. Pyrethrum flowers: Production, Chemistry, Toxicology, and Uses (JE Casida, GB Quistad, ur.).* Oxford University Press, New York, str. 108 – 122
60. McGrane Marie, O'Keeffe Michael, Smyth Malcolm R. (1998). Multi–residue analysis of penicillin residues in porcine tissue using matrix solid phase dispersion. *Analyst (Cambridge, United Kingdom)* 123:2779 – 2783
61. Metcalf R. L. (1989). Insect resistance to insecticides. *Pest Management Science.* 26(4): 333 – 358
62. Morris S. E., Davies N. W., Brown P.H., Groom T. (2005). Effect of drying conditions on pyrethrins content. *Ind Crop Prod* 23 (1): 9 – 14
63. Morzycka B. (2002). Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honeybees using matrix solid–phase dispersion and gas chromatography. *J Chromatogr A* 982: 267 – 273
64. Nikolić T., Milović M., Bogdanović S., Jasprica N. (2015). Endemi u hrvatskoj flori. *Alfa d.d., Zagreb* 434 – 436
65. Ozola S.M. (1971). Effect of micronutrients on yields of flower clusters and green mass of *Pyrethrum cinerariaefolium* grown in Latvia. *Trudy Latviiskaia Sel'skokhoziaistvennaia Akademiia* 29: 89 – 99
66. Ožanić S. (1955). *Poljoprivreda Dalmacije u prošlosti.* Izdanje društva agronoma NRH-Podružnica Split. 230-231
67. O'Malley M. (2004). Pesticides. *Current occupational & environmental medicine* 3: 554 – 601

68. Pan L., Feng X., Zhang H. (2017). Dissipation and Residues of Pyrethrins in Leaf Lettuce under Greenhouse and Open Field Conditions. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14(7)
69. Perret D., Gentili A., Marchese S., Sergi M., Caporossi L. (2004) Determination of fatty acids in chocolate by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18: 1989 – 1994
70. Putzbach K., Krucker M., Albert K., Grusak M. A., Tang G., Dolnikowski G. G. (2005). Structure determination of partially deuterated carotenoids from intrinsically labeled vegetables by HPLC–MS and ¹H NMR. *J Agric Food Chem* 53:671 – 677
71. Ramirez A. (2013). Pyrethrum Secondary Metabolism: Biosynthesis, Localization and Ecology of Defence Compounds. Thesis.
72. Schoenig G. P. (1995). Mammalian toxicology of pyrethrum extract. *Pyrethrum flowers: Production, Chemistry, Toxicology, and Uses* (JE Casida, GB Quistad, ur.), Oxford University Press, New York, str. 249 – 257
73. Soler C., Manes J., Pico Y. (2005). Routine application using single quadrupole liquid chromatography–mass spectrometry pesticides analysis in citrus fruits. *J Chromatogr A* 1088:224 – 233
74. Sonderlund D. M. (1995). Mode of action of pyrethrins and pyrethroids. *Pyrethrum flowers: Production, Chemistry, Toxicology, and Uses* (JE Casida, GB Quistad, ur.), Oxford University Press, New York, str. 217 – 233
75. Tan G. H., Chai M–K. (2011). Sample Preparation in the Analysis of Pesticides Residue in Food by Chromatographic Techniques. *Pesticides – Strategies for Pesticides Analysis* 27 – 58
76. Todd D. G., Wohlers D., Citra M. (2003). Toxicological profile for pyrethrins and pyrethroids. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1–287
77. Wagner S. L. (2000). Fatal asthma in a child after use of animal shampoo containing pyrethrin. *West J Med.* 173: 86 – 87
78. Wax P. M., Hoffman R. S. (1994). Fatality associated with inhalation of a pyrethrin shampoo. *Clin Toxicol* 32(4): 457 – 460
79. Wei D., Li Z., Wang G., Yang Y., Li Y., Xia Y. (2006). Separation and Purification of Natural Pyrethrins by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry.* 34(12): 1776 – 1779
80. Winney R. (1979). Performance of pyrethroids as domestic insecticides. *Pyrethrum Post* 13(4): 132 – 136
81. Zieg R. G., Zito S. W., Staba E. J. (1983). Selection of high pyrethrin production tissue cultures. *Planta Medica* 48: 88 – 89

Izvori s web stranica:

1. Narodne novine. (2013). Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama. NN 144/2013 https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2013_12_144_3086.html - pristupljeno 19.06.2019

Životopis

Anja Osredečki rođena je 09. studenog 1992. godine u Zagrebu. Osnovnu školu „Pavleka Miškine“ pohađala je u Zagrebu. Srednjoškolsko obrazovanje stekla je u Zagrebu u općoj gimnaziji „Tituš Brezovački“ u periodu od 2008. do 2012. godine. Nakon srednjoškolskog obrazovanja 2012. godine upisuje preddiplomski studij „Biljne znanosti“ na Agronomskom fakultetu u Zagrebu gdje njegovim završetkom 2016. godine stječe naziv sveučilišna prvostupnica inženjerka biljnih znanosti. Nakon preddiplomskog studija 2016. godine upisuje diplomski studij „Biljne znanosti“. Tijekom studija radila je različite studentske poslove u kojima je naučila važnost timskog rada, komunikacije, upornosti i brzog učenja. Od stranih jezika koristi engleski u govoru i pismu, kao i osnove njemačkog jezika. U radu na računalu koristi se Microsoft Office programima.