

Učinkovitost različitih metoda ekstrakcije na izdvajanje piretrina iz dalmatinskog buhača

Ptiček, Barbara

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:204:506590>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Učinkovitost različitih metoda ekstrakcije na izdvajanje piretrina iz dalmatinskog buhača

DIPLOMSKI RAD

Barbara Ptiček

Zagreb, rujan 2019.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Ekološka poljoprivreda i agroturizam

Učinkovitost različitih metoda ekstrakcije na izdvajanje piretrina iz dalmatinskog buhača

DIPLOMSKI RAD

Barbara Ptiček

Mentor:
doc. dr. sc. Martina Grdiša

Komentor:
dr. sc. Martina Biošić

Zagreb, rujan 2019.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, Barbara Ptiček, JMBAG 0178102078, rođena 20. prosinca 1994. godine u Zaboku, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

UČINKOVITOST RAZLIČITIH METODA EKSTRAKCIJE NA IZDVAJANJE PIRETRINA IZ DALMATINSKOG BUHAČA

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 Barbare Ptiček, JMBAG 0178102078, naslova

UČINKOVITOST RAZLIČITIH METODA EKSTRAKCIJE NA IZDVAJANJE PIRETRINA IZ DALMATINSKOG BUHAČA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. doc. dr. sc. Martina Grdiša

2. doc. dr. sc. Jana Šic Žlabur

3. izv. prof. dr. sc. Klaudija Carović-Stanko

Zahvaljujem doc. dr. sc. Martini Grdiša na mentorstvu i pomoći pri odabiru teme za izradu ovog diplomskog rada, kao i na uloženom trudu i vremenu.

Zahvaljujem i komentorici dr. sc. Martini Biošić na pomoći i uloženom vremenu kod provedbe praktičnog dijela ovog rada.

Zahvaljujem kolegicama Luciji i Matei na nesebičnoj pomoći i prijateljstvu kroz ovih pet godina studiranja.

Na kraju, zahvaljujem svojoj obitelji, a najviše majci bez koje moje studiranje ne bi bilo moguće.

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Cilj istraživanja	2
3. Pregled literature	3
3.1. Dalmatinski buhač	3
3.1.1. Sistematska klasifikacija i rasprostranjenost	3
3.1.2. Morfološka svojstva	4
3.1.3. Kemijska svojstva	5
4. Materijali i metode	10
4.1. Kemikalije	10
4.2. Biljni materijal	10
4.3. Instrumenti	11
4.3.1. Analitička vaga	11
4.3.2. Aparat za usitnjavanje	12
4.3.3. Magnetska miješalica	12
4.3.4. Ultrazvučna kupelj	13
4.3.5. Aparatura za disperziju matice uzorka kroz čvrstu fazu	13
4.3.6. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti	14
5. Rezultati i rasprava	18
6. Zaključak	23
7. Popis literature	24
Životopis	27

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Barbare Ptiček**, naslova

UČINKOVITOST RAZLIČITIH METODA EKSTRAKCIJE NA IZDVAJANJE PIRETRINA IZ DALMATINSKOG BUHAČA

Dalmatinski buhač autohtona je biljna vrsta Republike Hrvatske, rasprostranjena na obalnom dijelu i otocima Jadranskog mora. Važnost ove biljke krije se u sadržaju sekundarnog metabolita, piretrina, zbog čega je prepoznata i uzgajana diljem svijeta. Piretrin djeluju kao prirodni insekticid na veliki broj kukaca, a najvećim je dijelom lokaliziran u cvatnim glavicama. Cilj ovog rada bio je optimizirati postupak maceracije za izdvajanje piretrina iz biljaka dalmatinskog buhača te istražiti utjecaj različitih postupaka ekstrakcije (maceracija, ultrazvučna ekstrakcija i ekstrakcija metodom raspršenja matice u čvrstom uzorku) na koncentraciju izdvojenih ukupnih piretrina kod triju samoniklih populacija dalmatinskog buhača (Krk, Kozjak i Senj). Utvrđeno je da su optimalni uvjeti maceracije za najviši prinos piretrina sljedeći: 0,25 g biljnog materijala u 5 ml acetona, pri brzini okretaja mućkalice od 400 rpm, u trajanju od 3 h. Ovisno o analiziranoj populaciji, sadržaj piretrina se kod maceracije kretao od 0,29 – 0,62%, ultrazvučnom metodom utvrđen je sadržaj piretrina u rasponu od 0,46 – 0,49% dok se sadržaj piretrina dobiven metodom raspršenja matice u čvrstom uzorku kretao od 0,45 – 0,59%. Primjenom različitih metoda na istoj populaciji sadržaj piretrina se razlikovao, međutim razlike su bile neznatne.

Ključne riječi: dalmatinski buhač, piretrini, ekstrakcija, HPLC-DAD

Summary

Of the master's thesis – student **Barbara Ptiček**, entitled

EFFICIENCY OF DIFFERENT EXTRACTION METHODS ON THE ISOLATION OF PYRETHRIN FROM DALMATIAN PYRETHRUM

Dalmatian pyrethrum is an autochthonous plant species of the Republic of Croatia. It is widespread along the Adriatic coastal region and islands. The importance of this plant species lies in the content of secondary metabolite pyrethrin, which is why it is recognized and cultivated worldwide. Pyrethrin acts as a natural insecticide on a large number of insects and is mostly localized in the flower heads. The aim of this paper was to optimize the maceration process for the extraction of pyrethrin from Dalmatian pyrethrum and to investigate the impact of different extraction methods (maceration, ultrasonic extraction, and extraction by matrix solid phase dispersion) on the concentration of isolated total pyrethrins, in three natural populations of Dalmatian pyrethrum (Krk, Kozjak and Senj). The optimal maceration conditions for the highest pyrethrin yield were found to be maceration of 0.25 g of plant material in 5 ml of acetone at a speed of 400 rpm for 3 h. Depending on the analyzed population, the pyrethrin content obtained by maceration ranged from 0.29 – 0.62%, %, in the extraction employing ultrasonic technique pyrethrin content ranged from 0.46 – 0.49%, while with the matrix solid phase dispersion method the obtained pyrethrin content ranged from 0.45 – 0.59%. By the application of different methods, the pyrethrin content varied, however, the differences were not significant.

Keywords: Dalmatian pyrethrum, pyrethrin, extraction, HPLC-DAD

1. Uvod

Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./ Sch. Bip.) je endemska vrsta Republike Hrvatske. Kao što mu ime govori, prirodno stanište dalmatinskog buhača je duž Jadranske obale i otoka. Svojim polugrmolikim rastom, dubokim korijenom i dlačicama koje prekrivaju nadzemni dio, ova se biljna vrsta prilagodila rastu na opustošenim, kamenitim staništima. Cvatovi nalik tratinčici sadrže dvije vrste cvjetova; bijele, jezičaste koji čine vanjski dio cvata i žute, cjevaste koji čine unutarnji dio. Cvatnja se odvija tijekom svibnja i lipnja (Nikolić i sur., 2015.).

Iz pripadajućeg roda *Tanacetum* te porodice Asteraceae, ističe se po svojem kemijskom sastavu, sadržaju prirodnog sekundarnog metabolita piretrina koji djeluju insekticidno na široki raspon kukaca. Upravo je sadržaj smjese tih insekticidnih sastavnica (piretrina I, piretrina II, cinerina I, cinerina II, jasmolina I i jasmolina II) razlog uporabe dalmatinskog buhača u domaćinstvima od davnih vremena te razlog sve veće kultivacije ove biljne vrste u svijetu (Grdiša i sur., 2009.). Piretrini, kao prirodni insekticidi, nestabilni su pod utjecajem sunčeve svjetlosti, vode i visoke temperature, što ujedno predstavlja njihovu prednost i nedostatak. Della Porta i Reverchon (2002.) navode da degradacija piretrina počinje kod temperature od 40°C.

Zbog brze razgradnje, ne narušavaju prirodne ekosustave. Također, ne akumuliraju se u tlu i biljkama (Antonious, 2004.). Upravo nestabilnost i mogućnost kukaca da se brzo oporave od prvobitnog učinka ograničava razvoj i upotrebu preparata na bazi piretrina (Atkinson i sur., 2004.). Unatoč manama, Crosby (1995.) navodi da se u svrhu zaštite od različitih štetnika godišnje koristi oko 200 000 kg piretrina diljem svijeta.

U ekstrakciji piretrina korištene su brojne metode poput ekstrakcije po Soxhlet-u, ekstrakcije superkritičnim fluidima, ultrazvučne ekstrakcije i dr. (Babić i sur., 2012.), a nedavno je optimizirana i metoda disperzije matrice u čvrstoj fazi (eng. *Matrix solid phase dispersion*; MSPD) (Biošić i sur., 2019.; u postupku objavljivanja). Za razliku od navedenih metoda za čiju su provedbu potrebna specifična znanja i laboratorijska oprema, u ekstrakciji piretrina koristi se i metoda maceracije koja ne zahtjeva posebne vještine, a niti laboratorijsku opremu.

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je provesti optimizaciju metode ekstrakcije piretrina maceracijom, te usporediti učinkovitost navedene metode na izdvajanje piretrina s ultrazvučnom ekstrakcijom i metodom raspršenja matice uzorka kroz čvrstu fazu. Usporedba učinkovitosti navedenih metoda u smislu dobivanja po sastavu i sadržaju kvalitetnijeg piretrinskog ekstrakta do sada nije provedena.

3. Pregled literature

3.1. Dalmatinski buhač

3.1.1. Sistematska klasifikacija i rasprostranjenost

Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./ Sch. Bip.) višegodišnja je zeljasta biljna vrsta iz porodice Asteraceae – glavočika, porodice koja je široko rasprostranjena te obuhvaća preko 1528 rodova i 22 750 biljnih vrsta rasprostranjenih diljem svijeta (Bremer, 1994.; Sharafzadeh, 2011.). Rod *Tanacetum* obuhvaća više od 150 različitih biljnih vrsta, a dalmatinski buhač jedina je vrsta u spomenutom rodu koja ima agronomsku važnost (Catalano i sur., 2014.). U Europi je poznato 17 vrsta iz roda *Tanacetum* (Koljak i sur., 1999), a u Hrvatskoj su osim dalmatinskog buhača (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./ Sch. Bip.), također prisutne i vrste *Tanacetum vulgare* L. – obični vratić, *T. macrophyllum* /Waldst. & Kit./ Sch. Bip.) – gronjasti vratić, *T. parthenium* /L./ Sch. Bip.) – majčinski vratić i *T. corymbosum* /L./ Sch. Bip.) (FCD, 2019.).

Izvorno porijeklo buhača je Dalmacija, a stanište ove samonikle biljne vrste proteže se od Italije do sjeverne Albanije te planinskog područja Hrvatske, Bosne i Hercegovine i Crne Gore (Grdiša i sur., 2009.). Prirodno stanište dalmatinskog buhača u Hrvatskoj je duž cijele obale Jadranskog mora i otoka s najučestalijom pojavom u Dalmaciji (slika 1.), što mu i samo ime govori.



Slika 1. Rasprostranjenost dalmatinskog buhača u Republici Hrvatskoj

Izvor:

Flora Croatica baza podataka (<http://hirc.botanic.hr/fcd>)– pristupljeno: 14. svibnja 2019).

U Hrvatskoj, osim uz obalu Dalmacije i otoke (Brač, Hvar, Biševo, Vis, Korčula, Lastovo i Mljet), prirodne populacije dalmatinskog buhača nastanjuju i submediteranske suhe travnjake južnih dijelova Istre, te Kvarnerske otoke Krk, Cres i Lošinj. Uobičajeno se rasprostire do 200

metara nadmorske visine iako je primijećen i njegov rast u mjestu Sv. Ilija na Pelješcu, koje se nalazi iznad 500 metara nadmorske visine. Za svoj rast dalmatinski buhač odabire izuzetno degradirana staništa na kamenim tlima, suhim travnjacima te kamenjarskim pašnjacima (Nikolić i sur., 2015.).

Insekticidna svojstva ove biljke službeno su otkrivena 1840. godine u Dalmaciji što je potaknulo masovni uzgoj buhača 1860. godine (McLaughlin, 1973.). 'Zlatno doba' uzgoja buhača u Hrvatskoj trajao je do 1930. godine. Krajem 19. stoljeća buhač se počinje kultivirati i u Japanu te mu se uskoro priključuju i zemlje Europe (Catalano i sur., 2014.). U 2017. godini Tanzanija je najveći proizvođač dalmatinskog buhača (6 472 t), slijedi Ruanda (5 082 t) te Papua Nova Gvineja (1209 t), a uzgaja se još i u Italiji, Keniji, Maroku, Tunisu i Ekvadoru (FAOSTAT, 2019.).

3.1.2. Morfološka svojstva

Buhač je višegodišnja biljna vrsta, zeljastog, polugrmolikog nadzemnog dijela (slika 2.). Njegova razgranata stabljika visine je 80 – 100 cm i često je prekrivena sivim dlačicama što biljci daje srebrno-zelenu boju (Kolak i sur., 1999.). Degradiranim, kamenitim staništima buhač se prilagodio svojim jakim, razgranatim podzemnim dijelom koji prodire duboko „tražeći“ potrebnu vodu i hranjiva. Iz čvrstog korijena svake godine izbijaju zeljasti izbojci koji na vrhu nose glavičasti cvat (slika 3.). Pojedinačni cvatovi na vrhu stabljike promjera su 40 – 50 mm. Sastoje se od dvije vrste cvjetova: centralno smještenih, cjevastih, žutih cvjetova koji su dvospolni, te jezičastih bijelih cvjetova koji su ženski i smješteni postrano. Cvat obavijaju tvrdi ovojni listovi, dlakavi s vanjske, a glatki s unutarnje strane. Obje vrste cvjetova u cvatu formiraju plod, rošku, a oprašuju se uz pomoć insekata. Cvatnja biljke dalmatinskog buhača odvija se u svibnju i lipnju (Nikolić i sur., 2015.). Mlađe biljke, starosti do dvije godine, formiraju 200 – 400 cvjetova dok biljke starije od tri godine razvijaju do 900 cvjetova (Kolak i sur., 1999.). Cilindrična roška ili ahenij dužine je 2,5 – 3,5 mm, svijetlo smeđe boje s 5 – 7 nabora. Površina roške je sjajna, a sjaj dolazi od uljnih žlijezdi koje se nalaze na površini roški koje sadrže piretrine (Grdiša i sur., 2009.).



Slika 2. Polugrmoliki oblik dalmatinskog buhača



Slika 3. Cvat dalmatinskog buhača

Autor: Grdiša, 2019.

Vrstu je moguće razmnožavati vegetativnim i generativnim načinom (Nikolić i sur., 2015., Catalano i sur., 2004.). Masa 1000 sjemenki je 0,8 – 1,1 gram (Nikolić i sur., 2015.).

Prizemni listovi dalmatinskog buhača nalaze se na dugoj peteljci, dužine su 10 – 20 cm, nepravilno razdijeljeni i dvostruko su perasti. Za razliku od prizemnih listova, listovi smješteni na gornjem dijelu stabljike su sjedeći (Nikolić i sur., 2015.). Najpovoljnija fotosintetska aktivnost biljke odvija se kod temperaturnog raspona od 15°C do 20°C (Catalano i sur., 2014.). Dessalgne i sur. (2011.) navode da je vernalizacija ključna za razvoj cvatova.

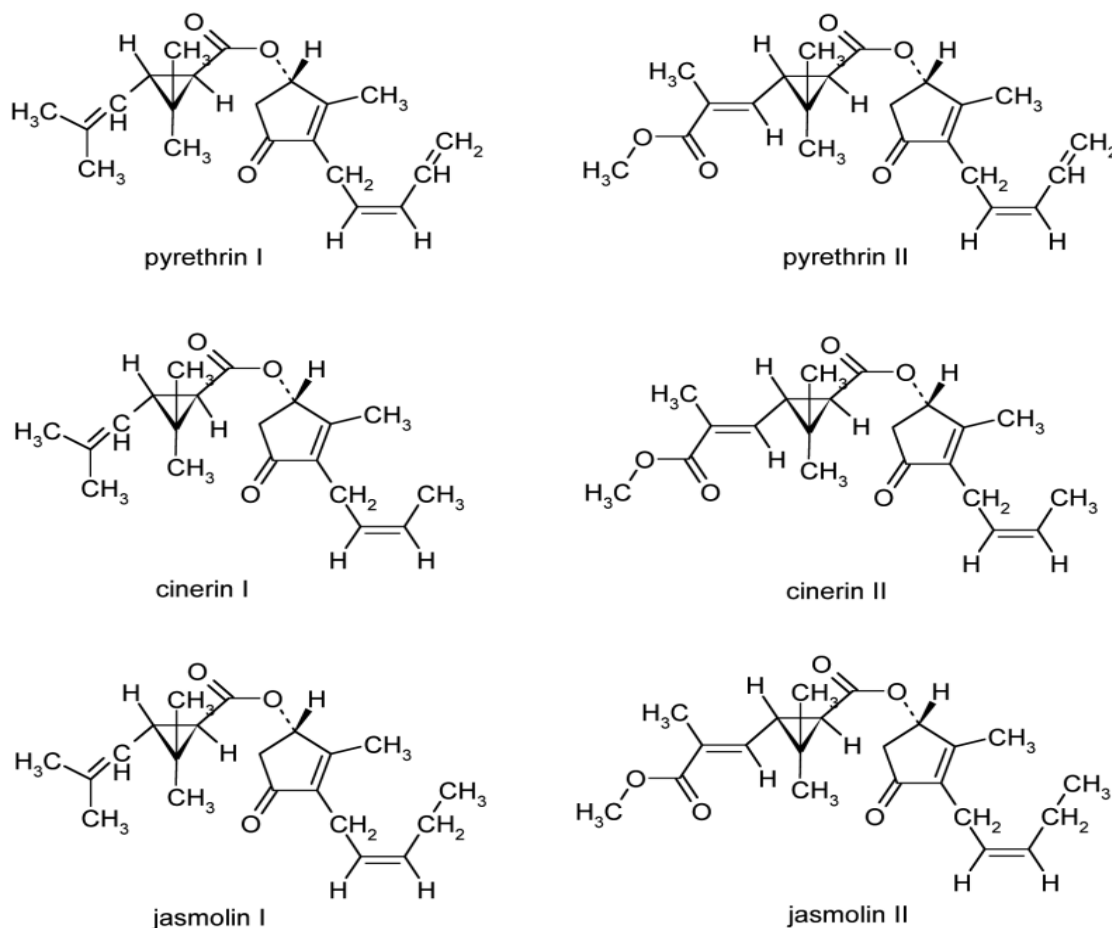
3.1.3. Kemijska svojstva

Kao što je već spomenuto, dalmatinski buhač je jedina vrsta iz roda *Tanacetum* koja ima poljoprivrednu važnost (Catalano i sur., 2014.). Važnost i sama isplativost uzgoja ove biljne vrste krije se upravo u njezinom kemijskom sastavu, sadržaju piretrina i njegovoj insekticidnoj aktivnosti zbog koje se koristi već 160 godina diljem svijeta. Iako se sinteza odvija u svim biljnih dijelovima, najveća količina piretrina lokalizirana je u cvatnim glavicama buhača (Atkinson i sur., 2004.). U istraživanju iz 1930. godine Gnadinger i Corl primjećuju ovisnost samog sadržaja piretrina u biljci o vremenu formiranja cvjetnih pupova odnosno njihovom dozrijevanju. Naime, u korijenu, listovima i stabljici biljaka koje još nisu formirale cvjetne pupove nije utvrđen piretrin. Piretrini se pojavljuju formiranjem pupova, a njihovim sazrijevanjem koncentracija raste. Najveće količine sadržane su unutar uljnih žlijezda smještenih na vanjskoj površini roški buhača (93,7%), dok su manje količine također zastupljene i u jezičastim i cjevastim cvjetovima. Osim o stupnju razvoja biljke, sadržaj piretrina ovisi o samom genotipu, vremenu berbe, klimi, metodama sušenja (Zieg i sur., 1983.) i uvjetima skladištenja (Morris i sur., 2006.). Zajednički naziv „piretrini“ obuhvaća više aktivnih sastavnica, monoterpene estere, izolirane iz dalmatinskog buhača: piretrin I ($C_{21}H_{28}O_3$), cinerin I ($C_{20}H_{28}O_3$) i jasmolin I ($C_{21}H_{30}O_3$) koji su esteri krizantemske kiseline, te piretrin II ($C_{22}H_{28}O_5$), cinerin II ($C_{21}H_{28}O_5$), i jasmolin II ($C_{22}H_{30}O_5$) koji su po strukturi esteri piretrične kiseline (slika 4.) (Grdiša i sur., 2009; Joffe, 2011.; Babić i sur.; 2012.). Zahvaljujući sinergističkom djelovanju, piretrini imaju širi raspon insekticidnog djelovanja za razliku od ostalih insekticida (Rehman i sur., 2014.).

U sastavu aktivnih tvari dalmatinskog buhača dominiraju piretrin I i piretrin II s udjelom do 67%, zatim cinerin I i cinerin II sa 24%, te jasmolin I i jasmolin II s udjelom do 9% (Joffe, 2011.). Drugim riječima, u ekstraktu dominiraju piretrini nad cinerinima i jasmolinima, u omjeru 10 : 3 : 1, s omjerom između piretrina I i piretrina II oko 1. Omjer piretrina I i II određuje insekticidnu aktivnost, a samim time i samu kvalitetu ekstrakta (Babić i sur., 2012.). Također, između piretrina I i piretrina II postoji razlika i u djelovanju na kukce; piretrin II brže „obori“ kukce tj. ima „*knock-down*“ učinak.

Međutim, kukci svojim enzimom imaju mogućnost razgradnje piretrina II u metabolizmu i nakon nekoliko sati od kontakta dolazi do njihovog oporavka. Da bi se osiguralo letalno djelovanje, piretrinima se mogu dodati sinergisti koji odgađaju rad enzima (Rehman i sur., 2014.). Piretrin I uzrok je većeg postotka mortaliteta kukaca te primijenjen samostalno pokazuje toksičnost (Grdiša i sur., 2013.).

Toksičnost piretrina utvrđena je prvenstveno na hladnokrvne životinje, kukce, dok su za sisavce i ostale toplokrvne životinje potpuno sigurni. Također, zbog svoje brze razgradnje u prirodnim uvjetima ne akumuliraju se u hranidbenom lancu i podzemnim vodama zbog čega su često korišteni u ekološkom gospodarenju (Babić i sur., 2012.).



Slika 4. Strukturne formule piretrina I, piretrina II, cinerina I, cinerina II, jasmolina I i jasmolina II

Izvor: Grdiša i sur., 2009.

Brza razgradnja često ograničava njihovu primjenu u poljoprivredi, zbog čega se u komercijalnim formulacijama često dodaju male količine antioksidansa ili stabilizatora i sinergista u svrhu poboljšanja njihove stabilnosti i učinkovitosti (Jovetić i de Gooijer, 1995.; Hitmi i sur., 2000.; Minello i sur., 2005.; Ambrožić Dolinšek i sur., 2007.). Piretrini ne djeluju selektivno, imaju širok raspon djelovanja, a najbolju insekticidnu aktivnost pokazuju prema vrstama iz reda *Lepidoptera*, kornjašima i lisnim moljcima (Rehman i sur., 2014.). Osim insekticidnih svojstava, piretrini djeluju i repelentno na veliki broj kukaca (Gallo i sur., 2017.). U današnje se vrijeme koriste u zaštiti mračnih spremišta, u sastavu šampona protiv uši, sprejevima protiv kućnih kukaca te je također dozvoljena i njihova upotreba na poljoprivrednim gospodarstvima koje primjenjuju ekološke metode zaštite (Hitmi i sur., 2000.; Ambrožić Dolinšek i sur., 2007.).

3.1.3.1. Metode ekstrakcije, detekcije i kvantifikacije piretrina

Kompleksni uzorci iz okoliša s velikim brojem prisutnih interferencija kao i niske koncentracije ispitivanih analita onemogućavaju njihovo izravno mjerenje. U tom slučaju je neophodna prethodna priprava uzorka s ciljem prevođenja analita u oblik pogodan za analizu. Prvi korak u pripravi uzorka je filtriranje ili centrifugiranje kako bi se odvojila kruta faza od tekućeg ekstrakta (Baker, 2007.). Drugi korak je ekstrakcije analita iz uzorka. Otapala imaju važnu ulogu u samoj ekstrakciji te je važno kod korištenja svake metode odabrati odgovarajuće otapalo koje će ekstrahirati najveću količinu analita iz uzorka. Primjena velikih količina organskih otapala može predstavljati opasnost za ljude i okoliš dok duže trajanje same ekstrakcije može biti uzrok potencijalne degradacije biološkog uzorka i aktivnih spojeva koji se ekstrahiraju (Babić i sur., 2012.).

Zbog složenosti izdvajanja piretrina iz smjese i nedostatka standarda, njihova ekstrakcija iz uzorka odnosi se na ukupne piretrine. Dobiveni ekstrakt piretrina, bez obzira na korištenu metodu, trebao bi biti svjetlo žute boje sa visokim sadržajem piretrina kao aktivnih sastavnica (Kiriamiti i sur., 2003.). Sadržaj piretrina u usitnjenom biljnom materijalu odnosno kasnije dobivenom sirovom ekstraktu iznosi 30 – 35%, uz određeni sadržaj stranih primjesa (Catalano i sur., 2014.). Sadržaj pojedinih sastavnica ovisi o genotipu biljke, zemljopisnom podrijetlu i vremenu berbe.

Za ekstrakciju sintetičkih piretroida koriste se različite ekstrakcijske metode kao što su ekstrakcija tekuće-tekuće (eng. *Liquid-liquid extraction*, LLE), mikroekstrakcija tekuće-tekuće (eng. *Micro liquid-liquid extraction*, MLLE), ekstrakcija čvrstom fazom (eng. *Solid-phase extraction*, SPE), ekstrakcija mješalom (eng. *Stir bar sorptive extraction*, SBSE), mikroekstrakcija čvrstom fazom (eng. *Solid-phase micro extraction*, SPME), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. *Microwave-assisted extraction*, MAE), ekstrakcija superkritičnim fluidima (eng. *Supercritical fluid extraction*, SFE), ubrzana ekstrakcija otapalima uz visoki tlak (eng. *Accelerated solvent extraction*, ASE), ekstrakcija po Soxhlet– u (eng. *Soxhlet extraction*, SXE) te ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija (eng. *Ultrasound-assisted extraction*, UAE).

Prethodna istraživanja vezana uz ekstrakciju piretrina iz dalmatinskog buhača uglavnom obuhvaćaju usporedbu nekoliko metoda ekstrakcije te postizanje optimalnih uvjeta, pri čemu su korištene metode kao što je ekstrakcija po Soxhlet-u (Ban i sur., 2010.), ultrazvučna ekstrakcija, (Babić i sur., 2012.) i ekstrakcija superkritičnim fluidima (Kiriamiti i sur., 2003.).

Nagar i sur. (2015.) opisuju provođenje dvadeset načina izdvajanja piretrina iz cvatova dalmatinskog buhača uzorkovanih u CSIR-u (*Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants*, Indija). Izdvajanje obuhvaća pet metoda ekstrakcije; Soxhlet ekstrakciju, perkolaciju, ekstrakciju mućkanjem uz povećanje temperature i ultrazvučnu metodu ekstrakcije. U istraživanju su korišteni heksan, etil acetat, aceton, acetonitril i metanol kao otapala. Kod svih metoda korišteno je 10 g usitnjenog biljnog materijala. Perkolacija je provedena na način da je biljni materijal pojedinačno ekstrahiran u perkolatoru s heksanom, etil acetatom, acetonom, acetonitrilom i metanolom u pet ispiranja sa 100 mL otapala. Vrijeme svake ekstrakcije trajalo je 5 h. Ultrazvučna je ekstrakcija provedena je na način da je u bočicu preko biljnog materijala dodano po 100 mL jednog od ispitivanih otapala. Ekstrakcija je provedena u četiri

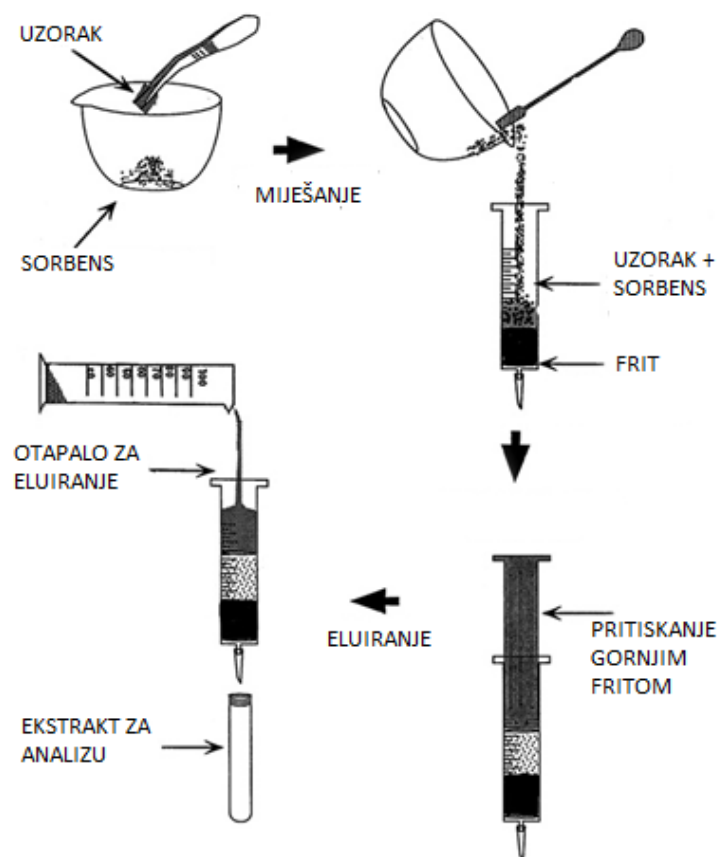
ispiranja (s po 100 mL) kod temperature od 30°C s vremenom ekstrakcije od 2 h. Kod provođenja mućkanja uz povišenu temperaturu biljni materijal je prenesen u koničnu tikvicu sa magnetom smještenih na magnetsku mućkalicu uz kontroliranje temperature. Provedeno je četiri ispiranja sa 100 mL otapala kod temperature od 40°C. Soxhlet ekstrakcijom biljni materijal je ekstrahiran koristeći po 100 mL svakog otapala. Ekstrakcija je provedena u termostatski kontroliranoj vodenoj kupelji u trajanju od 8 h. Analizom ekstrakata dobivenih različitim metodama ekstrakcije utvrđeno je da je Soxhlet metoda najučinkovitija u ekstrakciji piretrina.

Maceracija je jedna od jednostavnijih metoda ekstrakcije. Primjena različitih otapala, ali i same vode, za ekstrakciju aktivnih tvari iz različitih uzoraka koristi se od davnih vremena te se može nazvati tradicionalnim načinom ekstrakcije. Na povećanje „produktivnosti“ maceracije može se utjecati kontroliranjem brzine mućkanja i temperature, odabirom vrste otapala, volumena otapala itd. Nedostatak maceracije je da zahtijeva veću količinu otapala i utrošenog vremena. Navedeno su zaključili Gallo i sur. (2017.) koji su uspoređivali učinkovitost ekstrakcije superkritičnim fluidima, maceracije i ubrzane kruto-tekuće dinamične ekstrakcije (*Rapid solid-liquid dynamic extraction*) na izdvajanje piretrina.

Babić i sur. (2012.) opisuju provođenje optimizacije ultrazvučne ekstrakcije i analize šest sastavnica piretrina iz sjemena dalmatinskog buhača. Cilj optimizacije bio je ispitivanje različitih parametara u svrhu postizanja najveće iskoristivosti sa minimalnom potrošnjom otapala, minimalnim vremenom trajanja ekstrakcije i minimalne temperature da bi se izbjegla degradacija biljnog materijala. Prilikom optimizacije ispitivani su utjecaji različitih faktora kao što su vrste otapala, volumen otapala, količinu uzorka te trajanje i temperatura provedene ekstrakcije. Krajnja identifikacija i kvantifikacija ekstrahiranih piretrina izvedena je pomoću HPLC-DAD. Provedeno je ispitivanje otapala, metanola, etanola, acetona, heksana i petrol etera, u različitim volumenima, kod temperature od 50°C, pri čemu 5 mL acetona kao otapala pokazuje najbolje rezultate. Vezano uz količinu biljnog materijala, optimalne rezultate pokazuje 0,25 g osušenih i usitnjenih cvatova dalmatinskog buhača. Temperatura same ekstrakcije je jako bitna. Kod više temperature smanjuje se gustoća otapala, a stupanj difuzije raste. U ovom radu opisani temperaturni raspon ekstrakcija bio je od 35°C do 50°C, a kao optimalna odabrana je temperatura od 50°C. Viša temperatura dovodi do ključanja acetona i do degradacije piretrina u uzorku. Kao optimalno vrijeme, između ispitivanih 30, 40, 50 i 60 minuta, pokazalo se vrijeme ekstrakcije od 60 minuta. Navedenom se metodom, zajedno sa superkritičnom fluidnom ekstrakcijom, ekstrakcijom potpomognute mikrovalovima i ubrzanom ekstrakcijom otapalima uz visoki tlak, nastoji smanjiti vrijeme trajanja ekstrakcije i količine korištenog otapala u usporedbi sa klasičnim metodama ekstrakcije. Za visoku učinkovitost ultrazvučne ekstrakcije zaslužna je kombinacija visoke temperature i visokog tlaka; visoka temperatura povećava samu topljivost dok visoki tlak pogoduje samom transportu spojeva između korištenog otapala i čvrste faze (uzorka) (Babić i sur., 2012.).

Predstavljena javnosti 1989., a patentirana 1993. godine, MSPD metoda (eng. *Matrix solid phase dispersion*) ili metoda raspršenja matice uzorka kroz čvrstu fazu, pokazala se vrlo učinkovitom u ekstrakciji raznih aktivnih sastavnica krutih, polukrutih i visoko viskoznih biljnih i životinjskih uzoraka, pa tako i u ekstrakciji piretrina (Periša i sur.; *u postupku objavljivanja*) U usporedbi s ostalim, klasičnim metodama ekstrakcije, MSPD objedinjuje homogenizaciju uzorka, narušavanje stanične strukture, ekstrakciju i pročišćavanje uzorka u

jednom koraku i na taj način zahtijeva otprilike 95% manje utrošenog otapala i 90% manje vremena (Wei i sur., 2011.; Rallis i sur., 2012.). Temelji se na miješanju male količine ispitivanog uzorka s većom količinom čvrstog, praškastog sorbensa (najčešći omjeri su 1:2 ili 1:4) koji djeluje kao abrazivno sredstvo. Između sorbensa i uzorka stvara se trenje pri čemu dolazi do razaranja strukture uzorka. Jednolično pomiješana masa sorbensa i uzorka stavlja se u MSPD kolone koje se ispiru s odgovarajućim otapalom (Baker, 2007.). Nekoliko je čimbenika koji utječu na ekstrakciju raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu, od kojih su najvažniji odabir sorbensa i otapala kojim se provodi ekstrakcija (Dassanayake i sur., 2009.). Koraci MSPD ekstrakcije prikazani su na slici 5.



Slika 5. Koraci provođenja MSPD ekstrakcije

Izvor: Baker, 2007.

Različite analitičke metode se koriste za separaciju, identifikaciju i kvantifikaciju prirodnih piretrina i sintetskih piretrida, kao što su superkritična fluidna kromatografija (eng. *Supercritical fluid chromatography*, SFC), micelarna elektrokinetička kromatografija (eng. *Micellar electrokinetic chromatography*, MEKC), plinska kromatografija (eng. *Gas chromatography*, GC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High performance liquid chromatography*, HPLC) zajedno sa masenom spektrometrijom (eng. *Mass spectrometry*, MS) i tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti također u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (eng. *Ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry*, UPLC-MS) (Babić i sur., 2012.).

4. Materijali i metode

4.1. Kemikalije

Popis korištenih kemikalija tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada, njihove molekulske formule, čistoća te proizvođači navedeni su u tablici 1.

Tablica 1. Popis korištenih kemikalija

Naziv	Molekulska formula	Čistoća	Proizvođač
Pestanal 4'-metoksiflavanon Acetonitril	CH ₃ CN	p.a.	Sigma-Aldrich, Njemačka Sigma-Aldrich, Njemačka Kemika, Hrvatska
Mravlja kiselina	CO ₂ H ₂	p.a.	T.T.T., Hrvatska
Aceton	C ₃ H ₆ O	p.a.	Kemika, Hrvatska
Etil acetat	C ₄ H ₈ O ₂	p.a.	Kemika, Hrvatska
Etanol	C ₂ H ₅ OH	p.a.	Kemika, Hrvatska
Florisil	MgO ₃ Si		Agilent, USA
Metanol	CH ₃ OH	p.a.	Kemika, Zagreb
Natrijev sulfat	Na ₂ SO ₄	p.a.	Kemika, Zagreb
<i>n</i> -heksan	C ₆ H ₁₄	p.a.	Kemika, Zagreb

4.2. Biljni materijal

U ovom istraživanju kao biljni materijal korišteni su ručno sakupljeni cvatovi dalmatinskog buhača (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./ Sch. Bip.), triju samoniklih populacija. Populacije iz Senja, Krka i Kozjaka uzgojene su u poljskom pokusu postavljenom na polju Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu. Sjeme ispitivanih populacija (tablica 2.), dio je Kolekcije ljekovitog i aromatičnog bilja Zavoda za sjemenarstvo Agronomskog fakulteta. Podaci o primkama dostupni su u Hrvatskoj bazi podataka o biljnim genetskim izvorima (<http://cpgrd.hcphs.hr/>).

Tablica 2. Podaci o primkama dalmatinskog buhača uključenih u istraživanje

Populacija	P01	P02	P03
Lokacija	Senj	Krk	Kozjak
Broj primke	MAP02799	MAP02156	MAP02810
Zemljopisna širina	44°55'20"N	45°04'33"N	43°35'10"N
Zemljopisna dužina	14°55'00"E	14°40'21"E	16°24'49"E
Nadmorska visina (m)	6	45	479

4.3. Instrumenti

4.3.1. Analitička vaga

Analitička vaga je instrument za precizno određivanje mase tvari. Osjetljiv je i skup instrument, a o njezinoj ispravnosti i preciznosti ovisi točnost rezultata analize. Zbog svoje osjetljivosti, analitička vaga mora biti zaštićena staklenim pokrovom ili kućištem. Korištena je analitička vaga XS204 Delta Range proizvođača Mettler Toledo (Greifensee, Švicarska) (slika 6.).



Slika 6. Analitička vaga

4.3.2. Aparat za usitnjavanje

Korišteni aparat za usitnjavanje osušenih cvatnih glavica buhača marke je Microtron MB 550 (KINEMATICA AG, Luzern, Švicarska) (slika 7.). Aparat se koristi za intenzivno miješanje, dispergiranje, homogenizaciju, emulgiranje i mljevenje suhih ili tekućih uzoraka na veličinu potrebnu za provođenje analiza. Prilikom usitnjavanja potrebno je koristiti zaštitni pokrov koji dolazi uz aparat. Raspon brzine usitnjavanja iznosi 1000 – 15000 rpm.



Slika 7. Aparat za usitnjavanje Microtron MB 550

4.3.3. Magnetska miješalica

Digitalna magnetska miješalica RO 10 (IKA Magnetic Stirrers) (slika 8.) korištena je za miješanje uzoraka kod ekstrakcije piretrina maceracijom. Miješalica može postići brzinu do 1200 rpm koja ostaje konstantna na svih deset pozicija, čak i kod mijenjanja opterećenja.



Slika 8. Digitalna magnetska miješalica

4.3.4. Ultrazvučna kupelj

Ekstrakcija piretrina iz cvjetnih glavica dalmatinskog buhača provedena je na ultrazvučnoj kupelji Sonorex Digital 10P, Bandelin (Berlin, Njemačka) (slika 9.). Ultrazvučna kupelj je programibilna, tj. omogućuje podešavanje temperature kupelji, vremena trajanja ekstrakcije i snage ultrazvuka. Maksimalna temperatura koju je moguće podesiti iznosi 80 °C s jačinom ultrazvuka od 1200 W i frekvencijom od 35 kHz.



Slika 9. Ultrazvučna kupelj

4.3.5. Aparatura za disperziju matice uzorka kroz čvrstu fazu

Aparatura za disperziju matice uzorka kroz čvrstu fazu sastoji se od vakuum pumpe s poklopcem koji može istovremeno sadržavati i obrađivati 24 kolonice. Poklopac ima jedinstvenu kontrolu protoka ventilima. U radu je korištena aparatura Visiprep™ 24, Supelco, s protokom podešenim na 1 mL min⁻¹, prikazana na slici 10.



Slika 10. Vakuumski uređaj za ekstrakciju

4.3.6. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u svrhu kvalitativnog i kvantitativnog određivanja ukupnog piretrina i svih šest sastavnica piretrina, provedena je na Varian Pro Star 500 sustavu (Walnut Creek, California, USA), prikazanog na slici 11. HPLC kromatograf se sastoji od Pro Star 330 detektora s nizom dioda (DAD), ProStar 230 tercijarne pumpe, ProStar 410 uređaja za automatsko dodavanje uzorka, te računala s programom Varian ProStar 360 Star Chromatography Work Station verzija 5.5 za prikupljanje i obradu podataka.



Slika 11. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti, Varian ProStar 500, s detektorom s nizom dioda (HPLC - DAD)

4.4. Metode rada

4.4.1. Priprema uzorka cvjetova dalmatinskog buhača

Cvatovi dalmatinskog buhača su sušeni na sobnoj temperaturi kroz period od oko 30 dana, do sadržaja vlage od 10% - 12%. Nakon sušenja skladišteni su u staklene posude koje su čuvane na tamnom mjestu. Za potrebe istraživanja biljni materijal je usitnjen do praškaste konzistencije kako je prikazano na slici 12.



Slika 12. Postupak usitnjavanja osušenih cvatnih glavica buhača

4.4.2. Postupak ekstrakcije ultrazvukom

Ekstrakcija ultrazvukom je provedena pri optimalnim uvjetima opisanim u radu autora Babić i sur. (2012.), odnosno, usitnjeni i izvagani cvatovi dalmatinskog buhača (0,25 g) stavljeni su u plastične bočice od 100 mL, nakon čega je dodano 5 mL smjese acetona i etil acetata u omjeru 1:1 (v/v). Bočice su zatvorene i stavljene u ultrazvučnu kupelj na temperaturu od 50 °C, u trajanju od 60 minuta (slika 13.). Nakon provedene ekstrakcije, ekstrakti su filtrirani kroz filter papir promjera pora 0,45 µm (*HPLC certified*, Pall Life Sciences, Port Washington, NY) u viala.



Slika 13. Postupak ekstrakcije ultrazvukom

4.4.3. Postupak ekstrakcije maceracijom

Usitnjeni i izvagani cvatovi dalmatinskog buhača (0,25 g) preneseni su u Erlenmeyerove staklene tikvice kojima je dodan određeni volumen otapala. Zatvorene tikvice, u koje je stavljen magnet, prenesene su na magnetsku miješalicu smještenu u tamnoj komori pri sobnoj temperaturi (slika 14.). Na populaciji dalmatinskog buhača sakupljenog na Krku ispitani su optimalni uvjeti: vrsta (acetone, etil acetat i etanol) i volumen (5, 7, 9 i 11 mL) otapala, vrijeme trajanja ekstrakcije (0,5, 1, 2 i 3h) te broj okretaja miješalice (200, 300, 400 i 500 okr/min). Nakon provedene ekstrakcije, ekstrakti su filtrirani kroz isti filter papir kao i u slučaju ekstrakta dobivenih nakon ultrazvučne ekstrakcije.



Slika 14. Ekstrakcija maceracijom u tamnoj komori

4.4.4. Postupak disperzije matice uzorka kroz čvrstu fazu

Izvaganim cvatnim glavicama (0,25 g) dodano je 0,5 g florisila te 0,4 g natrijevog sulfata. Korišteni sorbens, florisil, aktiviran je na 160°C i ispran *n*-heksanom i metanolom

prije korištenja. Bezvodni natrijev sulfat (Na_2SO_4) korišten je kao sredstvo za dehidraciju. Smjesa cvatnih glavica, florisila i natrijevog sulfata pomiješana je u tarioniku s tučkom kako bi se postiglo potpuno razaranje i disperzija uzorka, a zatim kvantitativno prenesena u polipropilensku praznu kolonu na čije je dno prethodno stavljena fritra. Fritra je postavljena i na vrh kolone, odnosno smjese, kako bi se spriječilo prebrzo isparavanje otapala. U pripremljene kolone dodan je 1 mL otapala za eluiranje, smjesa acetona i etil acetata (1:1, v/v). Otapalo je ostavljeno 5 min u kontaktu sa smjesom sorbensa i uzorka. Nakon isteka spomenutog vremena ostatak otapala je propušten kroz kolonu. Ekstrakt (5 mL) je prikupljan u kivetu, uparavan do suhog i otopljen u 1 mL otapala, a potom prenesen u viala.

4.4.5. Kromatografska analiza

Ekstrakti dobiveni nakon maceracije, ultrazvučne ekstrakcije i MSPD-a su čuvani na hladnom i tamnom mjestu do analize. Količina ekstrahiranih sastavnica piretrina određena je HPLC-DAD-om. Izračunata su relativna iskorištenja (%) kao omjer količine ekstrahirane sastavnice (mg/g) i najveće detektirane količine (mg/g) iste sastavnice u svakom setu eksperimenata. Kromatografsko određivanje piretrina izvedeno je kromatografijom obratnih faza na koloni Luna C18 dimenzija 250 x 4,6 mm i promjera čestica punjenja 5 μm (Phenomenex). Kao pokretna faza u kromatografskom sustavu korištena je 0,1 % mravlja kiselina u MilliQ vodi (A) i 0,1 % mravlja kiselina u metanolu (B) uz gradijentno eluiranje. Gradijent pokretne faze prikazan je u tablici 3. Protok pokretne faze je iznosio 1,4 ml/L, dok je volumen injektiranja iznosio 10 μL . Valna duljina određivanja bila je 225 nm.

Tablica 3. Gradijent pokretne faze korišten za separaciju

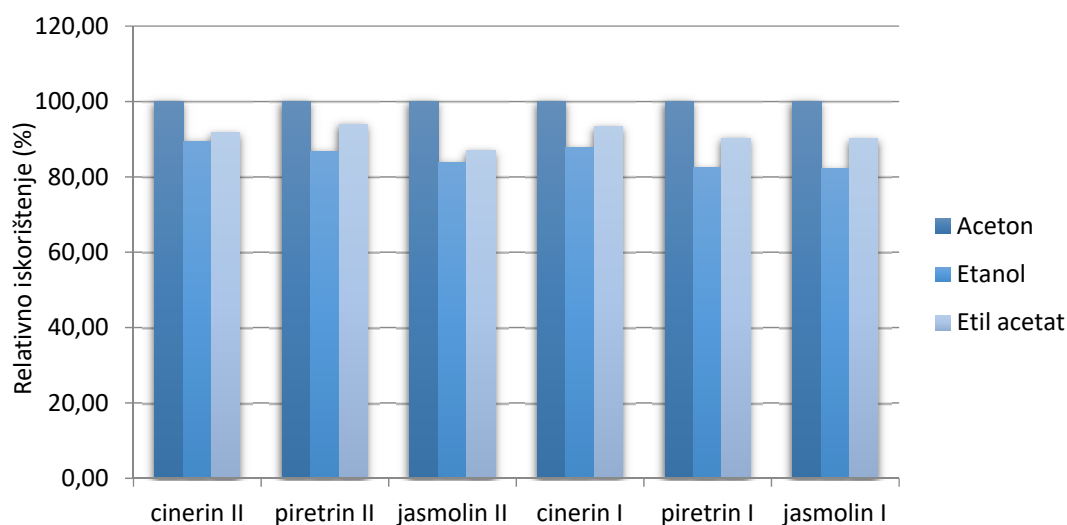
Vrijeme (min)	Volumen otapala, A (%)
0	4
15	40
25	20
45	20
45,1	40
50	40

5. Rezultati i rasprava

Cilj ovog rada bio je usporediti učinkovitost triju metoda ekstrakcije (ultrazvučna ekstrakcija, maceracija, ekstrakcija metodom raspršenja matice u čvrstom uzorku; MSPD) na izdvajanje piretrina iz dalmatinskog buhača.

Kod maceracije provedeno je ispitivanje optimalnih uvjeta; vrste otapala i volumena otapala, brzina okretaja na mućkalici i vremena trajanja ekstrakcije. Cijeli postupak optimizacije proveden je na populaciji dalmatinskog buhača sakupljenog na Krku s ciljem postizanja maksimalne učinkovitosti ekstrakcije s minimalnim volumenom korištenog otapala i minimalnog vremena trajanja ekstrakcije. Optimizacija maceracije te ostale metode provedene su na sobnoj temperaturi (~21°C).

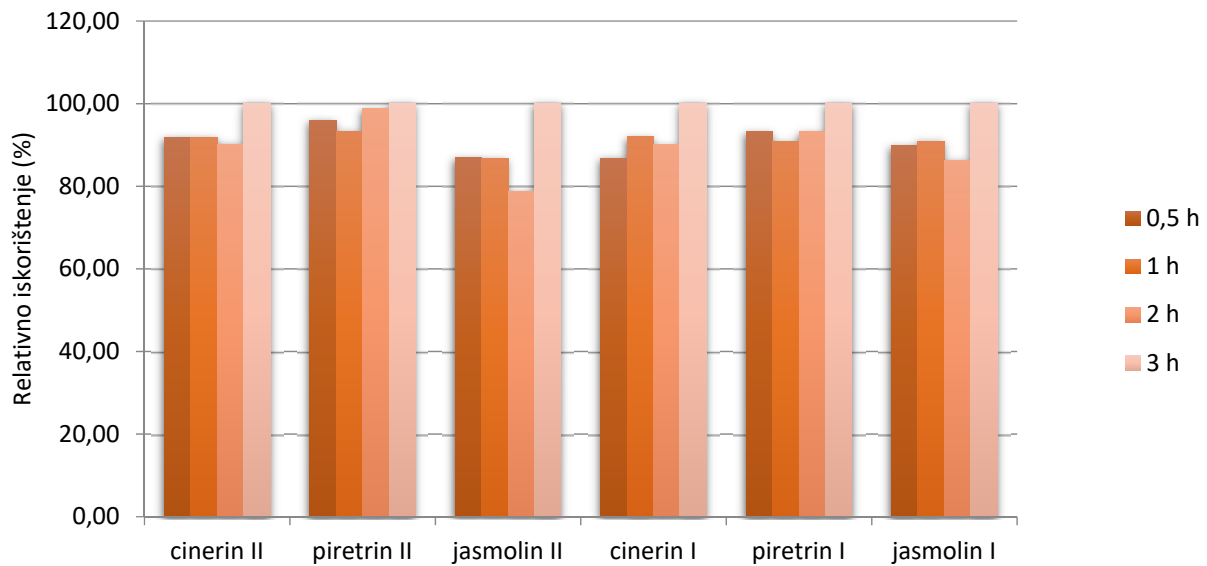
U prvom koraku ispitana je učinkovitost maceracije s tri otapala različitih fizikalno-kemijskih svojstava; aceton, etil acetat i etanol. Kod ispitivanja optimalnog otapala 0,25 g usitnjenog biljnog materijala macerirano je s 5 mL otapala, 3 h pri brzini mućkanja od 400 rpm. Kod maceracije s acetonom dobivena su najveća relativna iskorištenja svih šest sastavnica (100%), kao što je i vidljivo iz grafikona 1. Drugim najboljim otapalom se pokazao etil acetat gdje su relativna iskorištenja bila u rasponu od 87 – 94%, dok su najniže vrijednosti relativnog iskorištenja postignute s etanolom (82 – 88%) (grafikon 1.).



Grafikon 1. Grafički prikaz šest sastavnica piretrina (%) primjenom različitih otapala

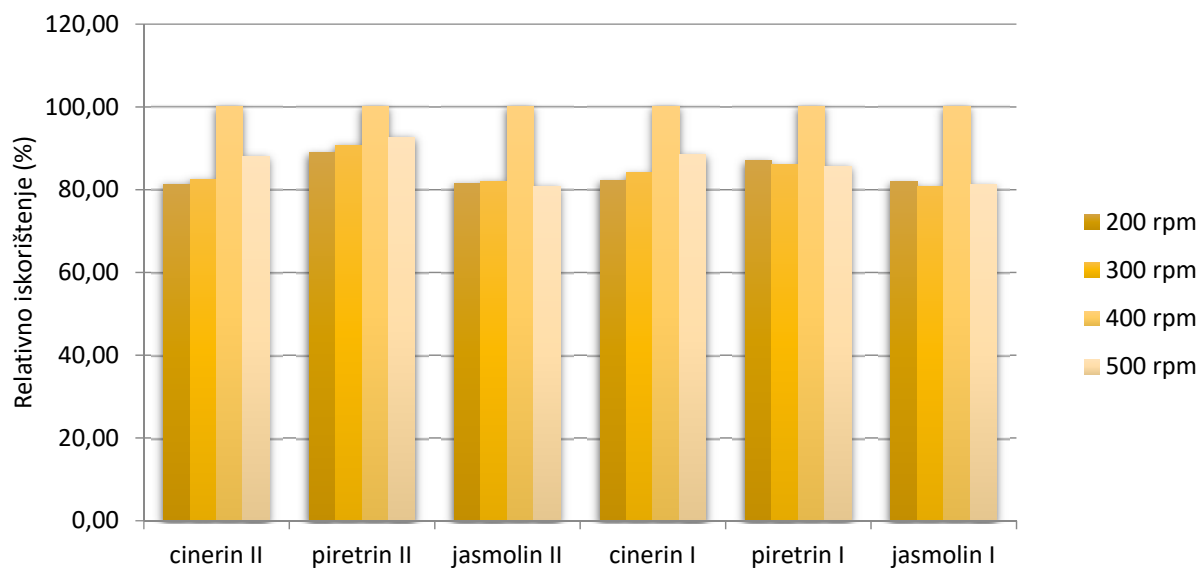
Nakon odabira optimalnog otapala, ispitan je utjecaj vremena trajanja maceracije pri čemu je 0,25 g usitnjenog biljnog materijala macerirano s 5 mL acetona u trajanju od 0,5 h, 1 h, 2 h i 3 h, također kod brzine mućkanja od 400 rpm. Rezultati su pokazali da duže vrijeme maceracije povoljno utječe na izdvajanje piretrina iz biljnog materijala te je kao optimalno vrijeme trajanja maceracije odabrano vrijeme od 3 sata (grafikon 2.), kod kojeg je utvrđeno relativno iskorištenje od 100%. Na grafikonu 2. je također vidljivo da je drugi najbolji rezultat s relativnim iskorištenjem aktivnih sastavnica u rasponu od 87 – 93% postignut prilikom maceracije u trajanju od 1 h. Provođenjem maceracije u trajanju od 0,5 h postignuta su relativna iskorištenja sastavnica u rasponu od 87 – 96%, dok je najmanje relativno iskorištenje sastavnica postignuto je s vremenom maceracije od 2 h, 79 – 99%, ovisno o aktivnoj

sastavnici. Kiriamiti i sur. (2003.) provodili su optimizaciju ekstrakcije piretrina pomoću CO₂ te su zamijetili da se sadržaj piretrina u dobivenom ekstraktu povećava s duljim vremenom ekstrakcije, što je također zamijećeno u ovom radu



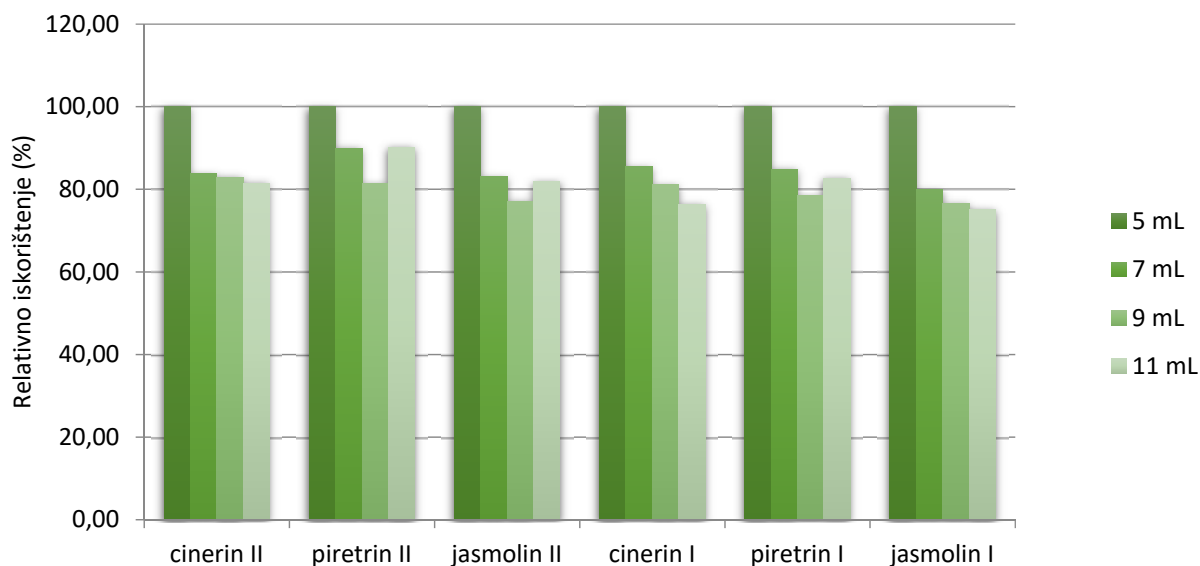
Grafikon 2. Grafički prikaz šest sastavnica piretrina (%) uz različito vrijeme trajanje maceracije

Sljedeći korak bio je ispitati optimalan broj okretaja na mućkalici. Usitnjeni biljni materijal (0,25 g) maceriran je s 5 mL acetona u trajanju od 3 h kod brzine okretaja od 200 rpm, 300 rpm, 400 rpm i 500 rpm. S postignutim 100%-tnim relativnim iskorištenjem svih aktivnih sastavnica, optimalnom brzinom pokazalo se 400 rpm (grafikon 3.). Kod broja okretaja od 500 rpm-a dobiveno je relativno iskorištenje u rasponu od 81 – 93%, s 300 rpm-a postignuto je relativno iskorištenje u rasponu od 81 – 91%, a brzina okretaja od 200 rpm-a pokazala se najlošijom a postignutim relativnim iskorištenjem aktivnih sastavnica u rasponu od 81 – 89%. Kao što je vidljivo na grafikonu 3., broj okretaja od 400 rpm-a se vidno ističe u vrijednostima relativnog iskorištenja svih aktivnih sastavnica, dok između ostalih brzina okretaja nema velikih razlika.



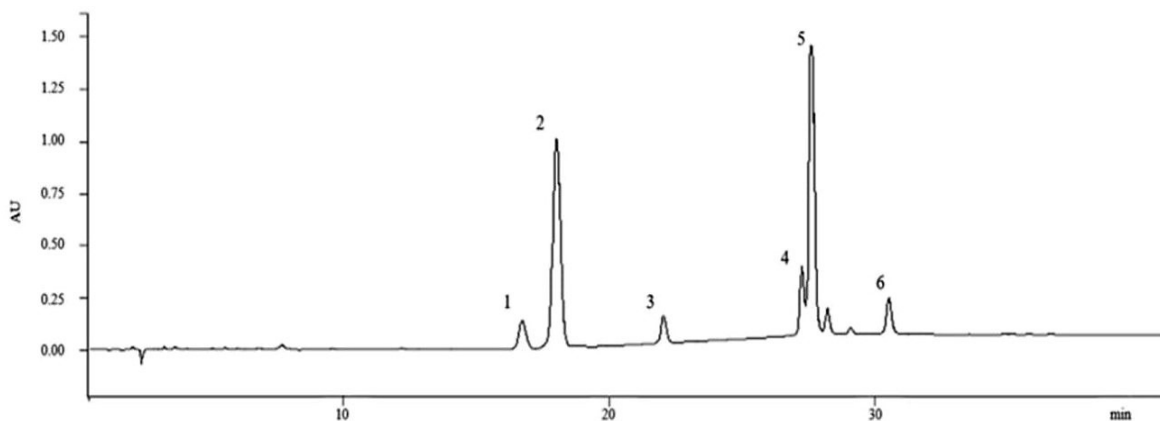
Grafikon 3. Grafički prikaz šest sastavnica maceracije piretrina (%) uz različite brzine okretaja

U zadnjem koraku ispitan je optimalan volumen otapala (acetona), pri čemu je 0,25 g usitnjenog biljnog materijala macerirano s 5 mL, 7 mL, 9 mL i 11 mL acetona u trajanju od 3 h, kod brzine mućkanja od 400 rpm. Relativno iskorištenje od 100% dobiveno je maceracijom s 5 mL otapala (grafikon 4.). Korištenjem 7 mL otapala postignuto je relativno iskorištenje od 84,5%. Najmanja vrijednost relativnog iskorištenja od 76,9% ostvarena je primjenom 9 mL acetona što ukazuje na činjenicu da su manje količine otapala više učinkovite na ekstrakciju aktivnih sastavnica iz dalmatinskog buhača. Navedena činjenica je svakako prednost, s obzirom da su manji volumeni otapala povoljniji za osobu koja provodi ekstrakciju, a i s ekološkog aspekta. Veći volumeni otapala zahtijevaju veće troškove njegovog zbrinjavanja što u konačnici i poskupljuje cijeli postupak ekstrakcije (Babić i sur., 2012.).



Grafikon 4. Grafički prikaz šest sastavnica maceracije piretrina (%) primjenom različitih volumena otapala

Nakon optimizacije uvjeta ekstrakcije maceracijom, provedena je usporedba učinkovitosti ekstrakcije piretrina maceracijom, ultrazvučnom ekstrakcijom i ekstrakcijom metodom raspršenja matice u čvrstom uzorku (MSPD) na triju populacijama dalmatinskog buhača. Kod svake metode ekstrakcija provedena su tri ponavljanja te je u interpretaciji rezultata korišten prosjek rezultata pojedine metode. Nakon ekstrakcije piretrina iz uzorka, provedena je separacija, identifikacija i kvantifikacija svih aktivnih sastavnica pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (slika 15.).



Slika 15. Kromatogram standardne otopine piretrina; 1 – cinerin II; 2 – piretrin II; 3 – jasmolin II; 4 – cinerin I; 5 – piretrin I; 6 – jasmolin I.

Svih šest sastavnica piretrina identificirano je na temelju vremena zadržavanja i apsorpcijskog spektra. Kvantitativna analiza provedena je integriranjem površine ispod odgovarajuće kromatografske krivulje za svaku od sastavnica. Ukupni sadržaj piretrina (% u suhoj masi cvijeta) triju populacija dalmatinskog buhača prikazan je u tablici 4.

Tablica 4. Ukupni sadržaj piretrina (%) dobivenih trima ekstrakcijskim metodama

	Krk	Kozjak	Senj
Maceracija	0,62	0,43	0,29
UZV	0,49	0,46	0,49
MSPD	0,59	0,45	0,54

Iz tablice 4.vidljivo je da su primjenom različitih metoda utvrđene različite vrijednosti ekstrahiranih piretrina. Kod populacije buhača s otoka Krka najbolja ekstrakcija piretrina postignuta je maceracijom (0,62%), zatim slijedi MSPD (0,59%) i ultrazvučna ekstrakcija (0,49%). Kod populacije s Kozjaka najveća vrijednost ekstrahiranih spojeva postignuta je pri ekstrakciji ultrazvukom (0,46%), neznatno veće vrijednosti 0,45% dobivene su kod MSPD ekstrakcije, dok je pri ekstrakciji maceracijom kod ove populacije buhača utvrđen najmanji sadržaj piretrina (0,43%). Kod populacije dalmatinskog buhača iz Senja najveći sadržaj piretrina utvrđen je pri MSPD ekstrakciji (0,54%), kod ultrazvučne ekstrakcije utvrđen je sadržaj piretrina od 0,49%, dok je kod ekstrakcije maceracijom utvrđen najniži sadržaj piretrina (0,29%). Na temelju dobivenih rezultata, odnosno malih razlika u dobivenom ukupnom prinosu ekstrahiranih piretrina kod različitih metoda nemoguće je izdvojiti bilo koju od njih. Sve tri primijenjene metode uspješno se mogu koristiti u ekstrakciji piretrina. Zbog svoje jednostavnosti ekstrakciju piretrina maceracijom moguće je provoditi bez sofisticirane i skupocjene opreme, što jedna od velikih prednosti. Donekle slično istraživanje učinkovitosti različitih metoda na izdvajanje piretrina proveli su Gallo i sur. (2017.). U njihovom istraživanju s metodom maceracije uspoređivane su druge metode, odnosno ekstrakcijom superkritičnim fluidima i ubrzana kruto-tekuća dinamična ekstrakcija. Autori također zaključuju da je svaka od navedenih metoda primjenjiva u ekstrakciji piretrina te da je maceracija metoda koja zahtjeva minimalne troškove. Međutim, primjenom maceracije dobiveni su niži prinosi piretrina, u odnosu na ostale metode ekstrakcije, a ujedno je i sam postupak ekstrakcije trajao duže.

6. Zaključak

Cilj ovog rada bio je optimizirati metodu ekstrakcije piretrina maceracijom, te navedenu metodu usporediti s ultrazvučnom ekstrakcijom i metodom raspršenja matice uzorka kroz čvrstu fazu (MSPD), kako bi se utvrdilo kojom ekstrakcijskom metodom se postiže najveća vrijednost ekstrahiranog piretrina.

Na temelju dobivenih rezultata doneseni su zaključci:

1. Čimbenici kao što su vrsta otapala, volumen otapala, vrijeme trajanja maceracije i brzina okretaja na mućkalici utječu na izdvajanje piretrina iz dalmatinskog buhača.
2. Optimalni uvjeti za ekstrakciju piretrina maceracijom su: maceracija s 5 mL acetona u trajanju od 3 h kod brzine mućkanja od 400 rpm iz 0,25 grama usitnjenog biljnog materijala
3. Sadržaj piretrina kod triju populacija dalmatinskog buhača dobiven primjenom triju metoda ekstrakcije kretao se od 0,29% do 0,62% po masi suhog cvijeta.
4. Kod populacije s Krka najučinkovitija metoda ekstrakcije bila je ekstrakcija metodom maceracije kod koje je udio izdvojenih piretrina iznosio 0,62% po masi suhog cvata, kod populacije s Kozjaka ekstrakcija ultrazvukom (0,46%), a kod populacije buhača iz Senja najveću učinkovitost pokazala je MSPD metoda ekstrakcije (0,54%).

7. Popis literature

1. Ambrožić Dolinšek J., Kovač M., Žel J., Camloh M. (2007). Pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*) from the northern Adriatic as potential Source of natural insecticide. Ser. hist. nat. 17: 39 – 46
2. Antonious G. F. (2004). Residues and half-lives of pyrethrins on field grown pepper and tomato. J. Environ. Sci. Health Part B. 39: 491 – 503
3. Atkinson B. 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
4. Babić S., Grdiša M., Periša M., Ašperger D., Šatović Z., Kaštelan-Macan M. (2012). Ultrasound-assisted extraction of pyrethrins from pyrethrum flowers. Agrochimica. 56
5. Baker S. A. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD). Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 70: 151 – 62
6. Ban. D., Sladonja B., Lukić M., Lukić I., Lušetić V., Kovačević Ganić K., Žnidarčić D. (2010). Comparison of pyrethrins extraction methods efficiencies. Journal of Biotechnology. 9(18): 2702 - 2708
7. Bremer K. (1994). Asteraceae: Cladistics and Classification. Timber Press. Portland
8. Catalano C., Abbate L., Fatta 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
9. Dassanayake R. M., Wei H., Chen R., 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 – 9801
10. Crosby D. G. (1995). Environmental fate of pyrethrins. U: Pyrethrum flowers; Production, Chemistry, Toxicology and uses. (Ur. Casida J. E., Quistad G. B.). Oxford University Press. New York. 194 – 213
11. Della Porta G., Reverchon E. (2002). Supercritical fluids extraction and fractionation of pyrethrins from pyrethrums. Symposium Proceedings of 4th International Symposium on High Pressure Process Tehnology and Chemical Engineering. Venecija, Italija.
12. Dessalgne F. H., Mekonnen S. A., Indris B. A. (2011). Variability of pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariifolium*) clones for chemical traits grown at Bekoja and Meraro of south east Ethiopia. Int. J. Med. Arom. Plants. 1(2): 166 – 174
13. Gallo M., Formato A., Ianniello D., Andolfi A., Conte E., Ciaravolo M., Varchetta V., Naviglio D. (2017). Supercritical fluid extraction of pyretrins from pyrethrum flowers (*Chrysanthemum cinerariifolium*) compared to traditional maceration and cyclic pressurization extraction. The Journal of Supercritical Fluids. 119: 104 – 112
14. Gnadinger C. B., Corl C. S. (1930). Studies on pyrethrum flowers II: The relation between maturity and pyrethrin content. J Am ChemSoc. 52 (2): 680 – 684
15. 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. 74:73 – 80

16. Grdiša M., Babić S., Periša M., Carović-Stanko K., Kolak I., Liber Z., Jug-Dujaković M., Satović Z. (2013). Chemical Diversity of the Natural Populations of Dalmatian Pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch. Bip.) in Croatia. *Chemistry & Biodiversity*. 10: 460 - 472
17. Hitmi A., Coudret A., Barthomeuf C. (2000). The Production of pyrethrins by plant cell and tissue cultures of *Chrysanthemum cinerariaefolium* and *Tagetes* species. *Crit. rev. Biochem. Mol. Biol.* 35: 317 – 337
18. Joffe T. (2011). Evaluation of potential pyrethrum synergist on agriculturally significant insect species. School of Agricultural Science/TIAR, University of Tasmania, Private Bag 54, Hobart, Australia
19. Jovetić S., de Gooijer C. (1995). The production of pyrethrins by *in vitro* systems. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 15: 125 – 138
20. Kiriamiti H., K., Camy S., Gourdon C., Condoret J. S. (2003). Pyrethrin extraction from pyrethrum flowers using carbon dioxide. *Journal of Supercritical fluids* 26: 193 – 200
21. Kolak I., Šatović Z., Rukavina H., Filipaj B. (1999). Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./ Sch. Bip.). *Sjemenarstvo* 16(99) 5:425 – 440
22. McLaughlin G. A. (1973). History of pyrethrum. U: *Pyrethrum flowers; Production, Chemistry, Toxicology and uses.* (Ur. Casida J. E., Quistad G. B.). Academic Press, New York: 3 – 13
23. Minello E. V., Lai F., Zonchello M. T., Melis M., Russo M., Cabras P. (2005). Effect of Sunscreen and Antioxidant on the Stability of Pyrethrin Formulations. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 53: 8302 – 8305
24. Morris S. E., Davies N. W., Brown P. H., Groom T. (2006). Effect of drying conditions on pyrethrins content. *Ind. Crops Prod.* 23: 9 – 14
25. Nagar A., Chatterjee A., Rehman L. U., Ahmad A., Tandon S. (2015). Comparative extraction and enrichment techniques for pyrethrins from flowers of *Chrysanthemum cinerariaefolium*. *Ind. Crops Prod.* 76: 955 – 960
26. Nikolić T., Milović M., Bogdanović S., Jasprica N. (2015). Endemi u Hrvatskoj flori. *Alfa, Zagreb.* 434 – 437
27. Biošić M., Varga F., Dabić D., Topalović I., Šatović Z., Grdiša M. (2019). Matrix solid-phase dispersion optimization for determination of pyrethrin content in Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./ Sch. Bip.) by liquid chromatography (*u postupku objavljivanja*)
28. Rallis G. N., Sakkas V. A., Boumba V. A., Vougiouklakis T., Albanis T. A. (2012). Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in post-mortem human lung by matrix solid-phase dispersion with the aid of response surface methodology and desirability function. *Journal of Chromatography A.* 1227: 1 – 9
29. Rehman H., Aziz A. T., Saggu S., Abbas Z. K., Mohan A., Ansari A. A. (2014). Systematic review on pyrethroid toxicity with special reference to deltamethrin. *Journal of Entomology and Zoology Studies.* 2 (6): 60 – 70
30. Sharafzadeh S. (2011). Pyrethrum, Coltsfoot and Dandelion: Important Medicinal Plants from Asteraceae Family. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences.* 5(12): 1787 – 1791

31. Wei W., Li X., Shi X., Zhou H., Yang R., Zhang H., Jin Y. (2011). Matrix Solid-phase Dispersion Extraction of Alkaloids from the Roots of *Aconitum kusnezoffii* Reichb. Chem. Res. Chinese Universities. 27(1): 23 – 27
32. Zieg R. G., Zito S. W., Staba E. J. (1983). Selection of high pyrethrin production tissue cultures. Planta Medica. 48: 88 – 91

Izvori s web stranica:

1. FAOSTAT (2019.) <<http://www.fao.org>> Pristupljeno: svibanj 2019.
2. FCD - Flora Croatica Database (2019) <<http://hirc.botanic.hr/fcd>> Pristupljeno: 14. svibanj 2019.

Životopis

Barbara Ptiček rođena je 20. prosinca 1994. godine u Zaboku, Republici Hrvatskoj. Osnovnu školu je pohađala u Oroslavju, nakon čega je svoje obrazovanje od 2009. do 2013. godine nastavila u Pregradi, usmjerenja farmaceutski tehničar. Godinu nakon završetka srednje škole provela je na stručnom stažu u Ljekarnama Vodolšak, u Oroslavju. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer Biljne znanosti upisuje 2014. godine te ga uspješno završava 2017. godine. Iste godine upisuje diplomski studij usmjerenja Ekološka poljoprivreda i agroturizam, također na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Razumijevanje engleskog jezika slušanjem C2, a čitanjem C1. U govornoj interakciji C2. U govornoj produkciji B2, a u pisanju B2. Samostalni je korisnik u obradi digitalnih informacija, rješavanju problema te sigurnosti, a iskusan korisnik u digitalnoj komunikaciji te stvaranju sadržaja.