

Kemijski sastav i antikolinesterazna aktivnost eteričnih ulja dalmatinskog buhača

Tutek, Klaudia

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:174618>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-16**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

**KEMIJSKI SASTAV I ANTIKOLINESTERAZNA
AKTIVNOST ETERIČNIH ULJA DALMATINSKOG
BUHAČA**

ZAVRŠNI RAD

KLAUDIA TUTEK

Matični broj: 305

Split, rujan 2017

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

KEMIJSKI SASTAV I ANTIKOLINESTERAZNA
AKTIVNOST ETERIČNIH ULJA DALMATINSKOG
BUHAČA

ZAVRŠNI RAD

KLAUDIA TUTEK

Matični broj: 305

Split, rujan 2017.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

**THE CHEMICAL COMPOSITION AND
ANTICHOLINESTERASE ACTIVITY OF THE
ESSENTIAL OILS FROM DALMATIAN PYRETHRUM
PLANT**

BACHELOR THESIS

KLAUDIA TUTEK

Parent number:305

Split, September 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet
Preddiplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: izv.prof.dr.sc. Olivera Politeo

KEMIJSKI SASTAV I ANTIKOLINESTERAZNA AKTIVNOST ETERIČNIH ULJA DALMATINSKOG BUHAČA

Klaudia Tutek, 305

Sažetak: Dalmatinski buhač (lat. *Chrysanthemum cinerariifolium*, Vis., sinonim *Tanacetum cinerariifolium*) pripada porodici *Asteraceae*. Biljka raste u suhim i kamenitim područjima i strogo je zaštićena vrsta. Biljka uz farmakološko, antioksidacijsko i inhibicijsko djelovanje pokazuje i insekticidno svojstvo. Piretrini koji se nalaze u sjemenkama buhača djeluju toksično na živčani sustav insekata, riba i zmija, dok je toksičnost puno manja prema sisavcima i pticama. Acetilkinesteraza je serinska esteraza koja razgrađuje neurotransmiter acetilkolin na acetat i kolin. Inhibicija tog enzima ima ključnu ulogu u ublažavanju simptoma Alzheimerove demencije. Alzheimerova demencija je teška neizlječiva bolest koja svojim napredovanjem vodi do gubitka pamćenja, nemogućnosti rasuđivanja i obavljanja svakodnevnih aktivnosti.

Cilj ovog rada bio je ispitati kemijski sastav i antikolinesterazno djelovanje eteričnih ulja buhača izoliranih iz cvjetnih glavica biljke tijekom različitih vremena cvatnje, u prirodnim populacijama biljke na otoku Braču. Korištena je instrumentalna tehnika GC/MS kojom je utvrđen kemijski sastav i sadržaj prisutnih terpenkih i neterpenkih sastojaka, te Ellmanova metoda za ispitivanje inhibicije enzima acetilkolinesteraze. Najzastupljenije komponente ulja su neoksidirani seskviterpenki spojevi β -himahalen, β -gvajen, β -selinen, γ -himahalen i δ -selinen. Krizantemska kiselina, kiselina čiji esteri sudjeluju u tvorbi piretrina, je identificirana samo kao sastojak ulja izoliranog iz cvjetova biljke ubrane u najkasnijem vremenu cvatnje. Izolirana eterična ulja nemaju sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze.

Ključne riječi: *Chrysanthemum*, eterično ulje, acetilkolinesteraza, GC/MS, terpeni

Rad sadrži: 40 stranica, 26 slika, 6 tablica, 29 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. doc. dr. sc. Mila Radan - predsjednik
2. doc. dr. sc. Ivica Blažević - član
3. izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo – mentor

Datum obrane: 29.9.2017.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Undergraduate study of Chemistry

Scientific area: Natural science

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 21

Mentor: Olivera Politeo, PhD, Associate prof.

THE CHEMICAL COMPOSITION AND ANTICHOLINESTERASE ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OILS FROM DALMATIAN PYRETHRUM PLANT

Klaudia Tutek, 305

Abstract: Dalmatian chrysanthemum belongs to the family of Asteraceae. The plant inhabits dry and rocky areas and it is a strictly protected species. The plant, other than having pharmacological, antioxidative and inhibitory activity also possesses insecticidal properties. Pyrethrins found in the seeds of the plant have a toxic effect on the nervous system of insects, fish and snakes, while the toxicity is far less effective with mammals and birds. Acetylcholinesterase (E.C.3.1.1.7.) is a serine esterase that breaks down the neurotransmitter acetylcholine to acetate and choline. Inhibition of this enzyme plays a key role in alleviating the symptoms of Alzheimer's dementia. Alzheimer's dementia is a severe incurable illness that, with its progress, leads to loss of memory, inability to think and conduct daily activities.

The aim of this paper was to examine the chemical composition and the anticholinesterase activity of essential oils of the plant isolated from the head of the plant during different flowering times in the natural population of the plant on the island of Brač. GC/MS instrumental technique was used to determine the chemical composition and the amount of terpene and non-terpene active substances present and for testing the inhibition of the enzyme AchE Ellman's method was used. The most common components of the oil are non-oxidized sesquiterpene compounds β -himachalene, β -guaiene, β -selenine, γ -himachalene and δ -selenine. Chrysanthemic acid, the acid whose esters participate in the formation of the pyrethrins, is identified only as an ingredient of the oil isolated from the flowers of the plant harvested in the latest flowering time. Isolated essential oils do not have the ability to inhibit the acetylcholinesterase

Keywords: *Chrysanthemum*, essential oil, acetylcholinesterase, GC/MS, terpenes

Thesis contains: 40 pages, 26 pictures, 6 tables, 29 literary references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Mila Radan, PhD, Assistant prof. - chair person
2. Ivica Blažević, PhD, Assistant prof. - member
3. Olivera Politeo, PhD, Associate prof. - supervisor

Defence day: September 29th, 2017.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

*Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta
u Splitu pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Olivere Politeo tijekom mjeseca lipnja,
2017. godine.*

Iskreno zahvaljujem svim članovima Zavoda za biokemiju, a posebno svojoj mentorici izv.prof.dr.sc. Oliveri Politeo na pomoći, stručnim savjetima i strpljenju pri izradi ovog rada.

Posebno se zahvaljujem svojim najbližima, obitelji i prijateljima, na neizmjernoj podršci tijekom studiranja.

Klaudia Tutek

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- 1. Određivanje kemijskog sastava i sadržaja eteričnih ulja biljke buhač, izoliranih iz prethodno osušenog biljnog materijala metodom hidrodestilacije, u tri različite sezone branja metodom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC/MS).*
- 2. Ispitivanje sposobnosti inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE) izoliranim eteričnim uljima metodom po Ellmanu.*

SAŽETAK

Dalmatinski buhač (*Chrysanthemum cinerariifolium* Vis., sinonim *Tanacetum cinerariifolium*) je autohtona hrvatska biljka o kojoj se prvi puta opjevalo na strmim stijenama iznad Omiša početkom 19.st. Izgledom je nalik na ivančicu i raste samoniklo na krškom području. Na biološku aktivnost tvari utjecaj imaju nadmorska visina, sunčeva svjetlost i blizina mora. Biološka aktivnost je raznolika, od farmakološkog i toksičnog djelovanja, no buhač je ipak najpoznatiji i najkorišteniji zbog svojih insekticidnih djelovanja. Acetilkolineseteraza razgrađuje neurotransmiter acetilkolin i ima nezamjenjivu ulogu u živčanom sustavu. Inhibicija tog enzima ima ključnu ulogu u ublažavanju simptoma Alzheimerove demencije. Bolest se najčešće javlja u starijoj dobi i dovodi do gubitka pamćenja, nemogućnosti rasuđivanja, a u kasnim i teškim stadijima do smrti.

Cilj ovog rada bio je ispitati kemijski sastav i antikolinesterazno djelovanje eteričnih ulja buhača izoliranih iz cvjetnih glavica biljke tijekom različitih vremena cvatnje, u prirodnim populacijama biljke na otoku Braču. Korištena je instrumentalna tehnika GC/MS kojom je utvrđen kemijski sastav i sadržaj prisutnih terpenskih i neterpenskih sastojaka, te Ellmanova metoda za ispitivanje inhibicije enzima acetilkolinesteraze. Najzastupljenije komponente ulja su neoksidirani seskviterpenski spojevi β -hamahalen, β -gvajen, β -selinen, γ -himahalen i δ -selinen. Krizantemska kiselina, kiselina čiji esteri sudjeluju u tvorbi piretrina, je identificirana samo kao sastojak ulja izoliranog iz cvjetova biljke ubrane u najkasnijem vremenu cvatnje. Izolirana eterična ulja nemaju sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze.

Ključne riječi: *Chrysanthemum*, eterično ulje, acetilkolinesteraza, GC/MS, terpeni

SUMMARY

Dalmatian chrysanthemum (*Chrysanthemum cinerariifolium* Vis., synonyme *Tanacetum cinerariifolium*) is an autochthonous Croatian plant, mentioned for the first time on the steep cliffs above Omis at the beginning of 19th century. It looks like a daisy and grows wild in a karst area. The biggest influence on the biological activity of the substance have the altitude, sunlight and the vicinity of the sea. Biological activity is diverse, from the pharmacological and toxic effects, but chrysanthemum is best known and most used for its insecticidal activity. Acetylcholinesterase breaks down the neurotransmitter acetylcholine and has an irreversible role in the nervous system. Inhibition of this enzyme plays a key role in alleviating the symptoms of Alzheimer's dementia. The disease is most common at an old age and leads to loss of memory, inability to reason, and in late and difficult stages to death.

The aim of this paper was to examine the chemical composition and the anticholinesterase activity of essential oils of the plant isolated from the head of the plant during different flowering times in the natural population of the plant on the island of Brac. GC/ MS instrumental technique was used to determine the chemical composition and the amount of terpene and non-terpene active substances present and for testing the inhibition of the enzyme AchE Ellman's method was used. The most common components of the oil are non-oxidized sesquiterpene compounds β -himachalene, β -guaiene, β -selenine, γ -himachalene and δ -selenine. Chrysanthemic acid, the acid whose esters participate in the formation of the pyrethins, is identified only as an ingredient of the oil isolated from the flowers of the plant harvested in the latest flowering time. Isolated essential oils do not have the ability to inhibit the acetylcholinesterase.

Keywords: *Chrysanthemum*, essential oil, acetylcholinesterase, GC/MS, terpenes

SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO.....	2
1.1. DALMATINSKI BUHAČ.....	2
1.1.1. Izgled dalmatinskog buhača.....	3
1.1.2. Upotreba buhača.....	3
1.2. ETERIČNA ULJA.....	5
1.2.1. Kemijski sastav eteričnih ulja.....	5
1.2.1.1. Terpeni.....	6
1.2.1.1.1. Monoterpeni.....	7
1.2.1.1.2. Seskviterpeni.....	7
1.3. ŽIVČANI SUSTAV.....	8
1.3.1. Acetilolin.....	9
1.3.2. Acetilolinesteraza.....	11
1.3.2.1. Struktura i djelovanje acetilolinesteraze.....	11
1.3.3. Alzheimerova demencija.....	13
1.4. BIOLOŠKA AKTIVNOST ETERIČNOG ULJA DALMATINSKOG BUHAČA.....	14
1.4.1. Spektrofotometrija.....	15
1.4.2. Određivanje sposobnosti inhibicije enzima acetilolinesteraze Ellmanovom metodom.....	17
1.4.3. GC/MS analiza.....	18

2. EKSPERIMENTALNI DIO.....	19
2.1. Kemikalije.....	19
2.2. Biljni materijal.....	19
2.3. Izolacija eteričnog ulja.....	20
2.4. Ispitivanje inhibicijske sposobnosti Ellmanovom metodom.....	21
2.4.1. Priprava kemikalija.....	21
2.4.2. Postupak.....	23
2.5. Određivanje kemijskog sastava i sadržaja eteričnog ulja buhača GC/MS analizom.....	25
2.5.1. Postupak.....	25
3. REZULTATI.....	26
3.1. Kemijski sastav i sadržaj eteričnih ulja dalmatinskog buhača sakupljenog u različitim sezonama cvatnje.....	26
3.2. Sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraza eteričnim uljima biljke buhač ...	34
4. RASPRAVA.....	35
5. ZAKLJUČAK.....	37
6. LITERATURA.....	38

UVOD

Eterična ulja su smjese biološki aktivnih kemijskih spojeva lako hlapljivih svojstava. Kemijski spojevi koji ulaze u sastav eteričnih ulja su terpeni, terpenoidi i neterpenski spojevi. Međusobno se razlikuju u broju ugljikovih atoma i u vezanim funkcionalnim skupinama. Eterična ulja dobivaju se različitim fizikalnim postupcima, a najčešće su korištena u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji.

Biljke roda *Chrysanthemum* (*Tanacetum*) nazivaju se piretrinima. Neke vrste rastu samoniklo, dok se ostale uzgajaju za dekoraciju u vrtovima zbog svojih raznobojnih i velikih cvjetova. Dalmatinski buhač je višegodišnja biljka i strogo je zaštićena vrsta. Izgledom je nalik na ivančicu, a cvjetovi su najčešće bijeli sa žutim centrima.

Enzimi su biokatalizatori koji usmjeravaju kemijske pretvorbe. Ubrzavaju kemijsku reakciju tako da snižavaju energiju prijelaznog stanja čime omogućavaju stanicama organizma obavljanje funkcije pri normalnim tjelesnim uvjetima. Enzimi supstrate postavljaju u optimalnu orijentaciju, što prethodi kidanju ili stvaranju kemijskih veza. Aktivnost enzima može se inhibirati vezanjem malih molekula ili iona i na taj način djeluju mnogi lijekovi i otrovi.

Acetilkinesteraza (AChE; E.C. 3.1.1.7.) je enzim iz skupine hidrolaza. Nalazi se u postsinaptičkoj membrani i hidrolizira neurotransmiter acetilkolin, te na taj način omogućava prijenos živčanih impulsa. Prekid prijenosa je smrtonosan, a promjene u prijenosu vode do narušavanja kognitivnih i neuromišićnih funkcija, kao što je u slučaju Alzheimerove bolesti.

U radu su korištena eterična ulja dalmatinskog buhača. Prema eksperimentalnim rezultatima može se zaključiti da u sastavu ima najviše seskviterpena, približno jednak broj oksidiranih i neoksidiranih seskviterpena, a trostruko manji broj monoterpena.

1. OPĆI DIO

1.1. DALMATINSKI BUHAČ

Balkanski poluotok predstavlja jedinstveni ekološki fenomen koji posjeduje veliki broj biljnih i životinjskih vrsta, te izrazito bogatstvo endemskih vrsta. Ova raznolikost rezultat je geološke povijesti, klimatskih uvjeta i interakcija između ekosustava. Dalmatinski buhač je dugoživuća endemska vrsta. Cvjeta između srpnja i rujna, a sjemenke sazrijevaju od kolovoza do rujna. Biljka je dvospolna, ima muške i ženske cvjetove, te je samo-rasplodna¹. Rod *Asteracea*, glavočike, predstavlja veoma brojnu porodicu cvjetova široko rasprostranjenu diljem svijeta. Najuobičajenije su u tropskim, suhim i polusuhim područjima. Većina *Asteracea* su zeljaste biljke, no značajan broj biljaka javlja se u obliku grmova ili drveća. Glavočike imaju ekonomsku vrijednost, jer daju proizvode značajne za prehrambenu, kozmetičku, farmaceutsku i ostale oblike industrije, što im omogućava njihova široka rasprostranjenost i hortikulturni uzgoj



Slika 1. Poster predstavlja 12 različitih vrsta roda *Asteracea*³

1.1.1. Izgled dalmatinskog buhača

Chrysanthemum cinerariifolium (sin. *Tanacetum cinerariifolium*) latinski je naziv dalmatinskog buhača. Latinsko ime ovog roda potječe od grčke riječi *asthanasia* (besmrtnost, dugotrajan život), što upućuje na dugo trajanje cvjetova, dok naziv vrste *cinerariifolium* potječe od riječi *cinis* (pepeo) zbog pepeljastih dlačica na listovima. Dalmatinski buhač nalikuje običnoj tratinčici i strogo je zaštićena vrsta. Cvatovi, najčešće bijeli sa žutim centrima, dolaze na vrhu prilično krutih stabljika koje mogu narasti od 45 do 100cm, a listovi su plavo-zelene boje⁴.



Slika 2. Cvijet dalmatinskog buhača⁴

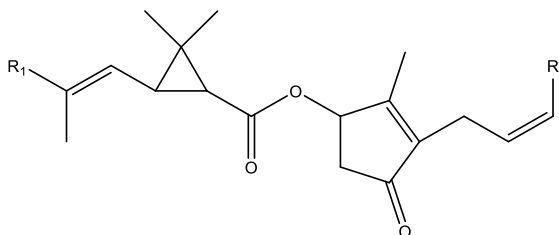


Slika 3. List i stabljika dalmatinskog buhača⁴

1.1.2. Upotreba buhača

Piretrum je naziv za prirodni insekticid dobiven različitim fizikalnim postupcima iz cvjetova vrste *Chrysanthemum cinerariifolium* Vis.. Ekonomska važnost biljke je njena upotreba kao izvora prirodnog insekticida u agronomiji. Piretrini kao aktivne komponentne nalaze se u sjemenkama i dobivaju ekstrakcijom. Prodaju se u obliku uljnih smola koje se primjenjuju kao suspenzija u vodi ili ulju, ili kao prašak. Piretrini napadaju živčani sustav svih insekata, čak i mala količina piretruma može biti pogubna. Oni su štetni za ribu, ali daleko su manje toksični za sisavce i ptice od mnogih sintetičkih insekticida. Svojstvo biorazgradivosti i lake razgradnje pri izlaganju svjetlosti označavaju ga jednim od najsigurnijih insekticida za upotrebu oko hrane⁵. Kao prirodni insekticidi poznati su i kamfor, cedrovina, metvica, limunovac, targok. Rastu uglavnom na kamenitim staništima, pašnjacima, te u svjetlim šumama.

Biološki aktivni sastojci odgovorni za insekticidna svojstva piretruma su piretrini. Piretrini su esteri formirani kombinacijom dviju kiselina, krizantemske i piretrinske, s tri različita alkohola, cinerolom, jasmolom i piretrolom. Esteri krizantemske kiseline (cinerin I i piretrin I) su 1,3 puta toksičniji od estera piretrinske kiseline (cinerin II i piretrin II)⁶.



	R ₁	R ₂
Piretrin I	CH ₃	CH=CH ₂
Piretrin II	COOCH ₃	CH=CH ₂
Cinerin I	CH ₃	CH ₃
Cinerin II	COOCH ₃	CH ₃

Slika 4. Esteri krizantemske i piretrinske kiseline s alkoholima cinerolom i piretrolom⁶

Dalmatinski buhač strogo je zaštićena biljna endemska vrsta hrvatskim Pravilnikom o proglašenju zaštićenih i strogo zaštićenih divljih vrsta⁷. Danas je ugrožen degradacijom staništa, urbanizacijom i ekološkim promjenama.

1.2. ETERIČNA ULJA

Eterična ulja su smjese biološki aktivnih kemijskih spojeva lako hlapljivih svojstava. Nastaju u biljnoj citoplazmi i imaju značajnu ulogu u zaštiti organizma u obrani od insekata, kod nedostatka vlage, hrane i sl. Eterična ulja stvaraju se u listovima, cvjetovima, plodovima i korijenu, a rijede i u stabljici i kori⁸. Uljne žlijezde *T.Cinerariifolium* Vis. obuhvaćaju nekoliko stanica stabljike i cvijeta⁹. Svježe izolirana ulja su bezbojne ili blijedožućkaste boje, netopljiva u vodi, ali dobro topljiva u otapalima kao što su eter, kloroform, pentan. Odlikuju se intenzivnim karakterističnim mirisima, a iz aromatičnog se bilja izoliraju fizikalnim postupcima kao što su hidrodestilacija, ekstrakcija, te hladno prešanje. Eterična ulja pronalaze svoju ulogu u pripravi hrane (začini, arome), parfema, te u farmaceuticima zbog farmakološkog djelovanja ili korekcije okusa i/ili mirisa¹⁰.

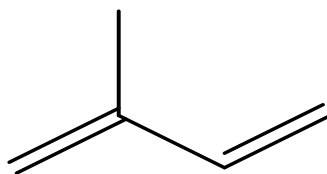
1.2.1. Kemijski sastav eteričnih ulja

Eterična ulja su smjese alifatskih, cikličkih, acikličkih, zasićenih i nezasićenih prirodnih organskih spojeva. Prema građi ugljikovog kostura, komponente eteričnih ulja dijele se u tri glavne skupine¹¹:

- terpeni
- fenilpropanski spojevi
- ostali spojevi

1.2.1.1. Terpeni

Terpeni su glavni sastojci eteričnih ulja. Osnovna građevna jedinica terpena je izopren, spoj od 5 ugljikovih atoma. Prekursor u sintezi terpena je izopentil-difosfat (IPP), dok složeniji terpeni nastaju enzimsko kataliziranim povezivanjem izoprenskih jedinica. Tako nastaju terpeni različitog broja ugljikovih atoma, odnosno izoprenskih jedinica (Tablica 1.). Prvo nastaje ugljikov kostur, a različite funkcijske skupine se povezuju na različite načine, ovisno o klasi terpena.



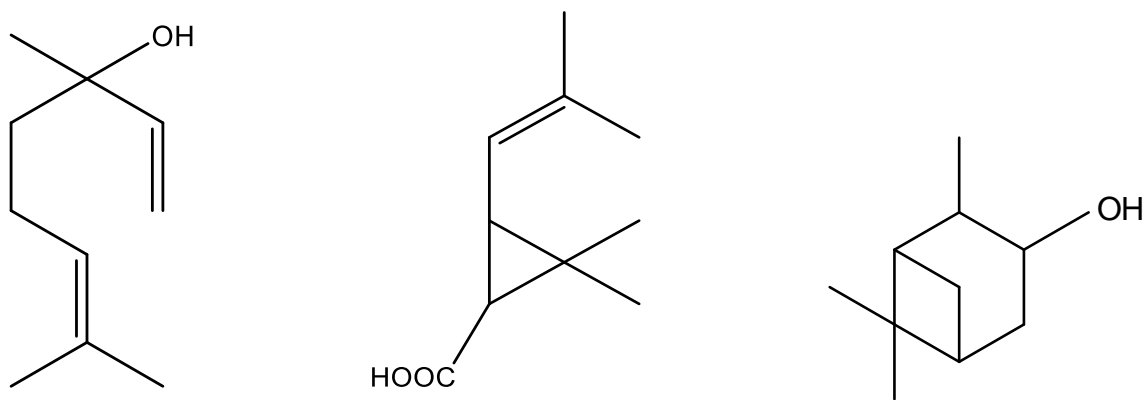
Slika 5. Izopren

Tablica 1. Podjela terpena s obzirom na broj izoprenskih jedinica.

VRSTA	Broj C-atoma	Broj izoprenskih jedinica
semiterpeni	5	1
monoterpeni	10	2
seskviterpeni	15	3
diaterpeni	20	4
triterpeni	30	6
tetraterpeni	40	8
politerpeni	5n	n

1.2.1.1.1. Monoterpeni

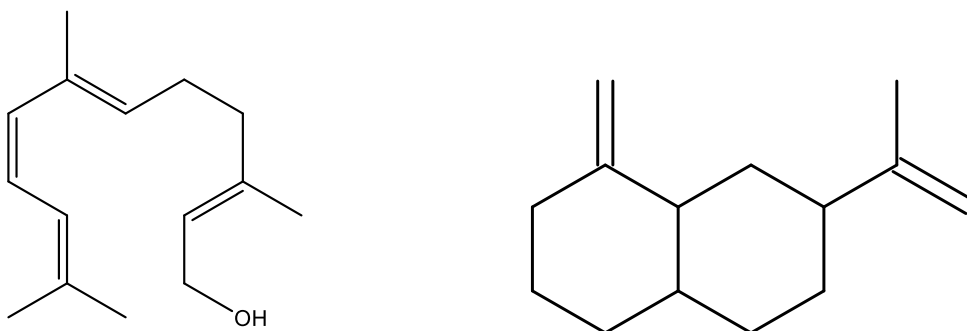
Monoterpeni nastaju ciklizacijom prekursora geranil-pirofosfata (GPP) ili njegovog *cis*-izomera neril-pirofosfata (NPP). Ciklizacija se vrši po principu „glava-rep“, te mogu nastati aciklički, monociklički i biciklički monoterpeni . Na sljedećim slikama nalazi se primjer svakog od navedenih, a prikazani spojevi su identificirani u eteričnom ulju buhača.



Slika 6. Strukture monoterpena: linaloola, *trans*-krizantemske kiseline i pinokamfeola

1.2.1.1.2. Seskviterpeni

Seskviterpeni biogenetski nastaju iz farnezil-pirofosfata koji može izomerizirati u odgovarajući alilni izomer, nerolidil-pirofosfat. Velikoj strukturalnoj raznolikosti seskviterpena doprinosi vezanje funkcijskih skupina i supstituenata na ugljikovu skeletu na različite regio- i stereospecifične načine.



Slika 7. Strukture seskviterpena farnezola i β -selinena

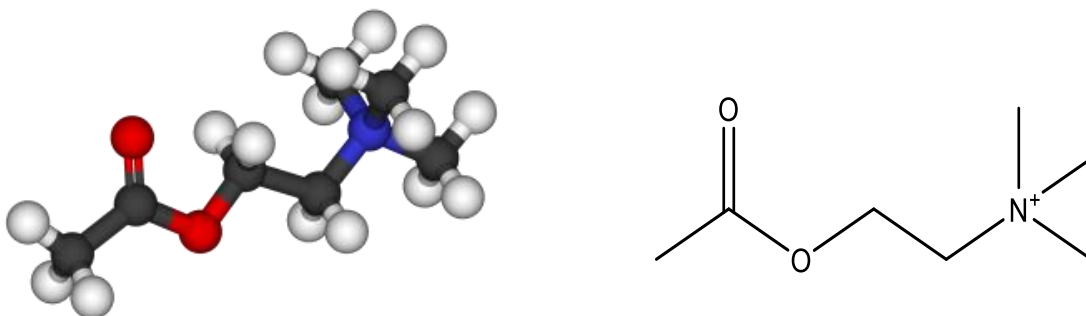
1.3. ŽIVČANI SUSTAV

Živčani sustav nadzire i usklađuje većinu funkcija ljudskog organizma. Morfološka podijela živčanog impulsa može se izvršiti na periferni i središnji živčani sustav, a funkcionalno na tjelesni središnji (somatski ili dobrovoljni) i autonomni (vegetativni). Autonomni živčani sustav regulira određene tjelesne procese, poput krvnog tlaka i brzine disanja, odnosno regulira procese koji nisu pod utjecajem čovjekove volje ni svijesti. Suprotno, somatski živčani sustav čine mozak, leđna moždina i živci koji primaju vanjske podražaje, a čovjek na njih reagira pokretom, govorom, i dr.¹¹

Autonomni živčani sustav može biti simpatički i parasimpatički. Funkcija parasimpatičkog živčanog sustava jest održavanje homeostaze organizma tijekom odmora („feed and breed“), dok sinaptički omogućava obranu organizma od vanjskih podražaja („fight or flight“). Dvije vrste neurotransmitera sudjeluju u autonomnom živčanom sustavu: acetilkolin i norepinefrin. Živčana vlakna koja luče acetilkolin nazivaju se kolinergičnim vlaknima, a norepinefrin luče andenergična vlakna. Općenito, acetilkolin ima parasinaptičke, a norepinefrin stimulirajuće sinaptičke učinke. Međutim, acetilkolin također reagira obrambeno na vanjske podražaje stimulirajući znojenje ili drhtavicu tijela¹²

1.3.1. Acetilkolin

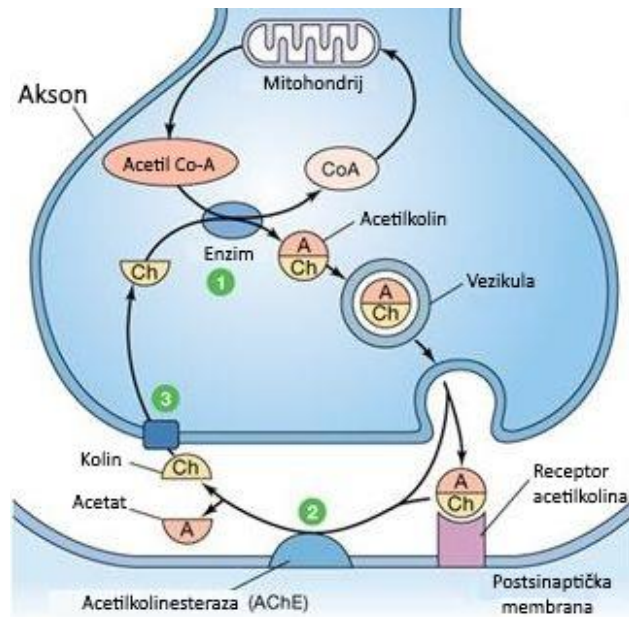
Acetilkolin (ACh) je neurotransmiter neuromišićne sinapse i jedini klasični neurotransmiter koji nije aminokiselina ili izravno sintetiziran iz aminokiseline. Samo ime predstavlja derivat, odnosno ester acetilne kiseline i kolina¹³.



Slika 8. Kemijska struktura acetilkolina¹⁴

U perifernom živčanom sustavu acetilkolin izaziva kontrakciju mišića, suženje zjenice, pojačavanje peristaltike crijeva, te usporavanje rada srca. U središnjem živčanom sustavu acetilkolin ima važnu ulogu u održavanju stanja svijesti i u procesima učenja i pamćenja. Kolin-acil-transferaza sintetizira acetilkolin (ACh) iz acetyl-CoA i kolina. Neuronima ne mogu sintetizirati kolin, već se on unosi hranom. Acetilkolin oslobođen u sinaptičku pukotinu se hidrolizira enzimom acetilkolinesteraza (AChE), a u presinaptički završetak se ponovno unosi kolin koji služi kao preteča za sintezu ACh. Acetilkolin djeluje na način da pobuđuje prijenos signala među neuronima, te njegov prijenos do mišića. Djeluje preko dvije vrste receptora¹⁵:

- muskularinski – vezani su za periferni živčani sustav; vezanje ACh rezultira smanjenje krvnog tlaka, sužavanje bronha, itd.
- nikotinski – vezani su za središnji živčani sustav; vezanje ACh djeluje na kognitivne procese i pamćenje



1. Kolin-acetil-transferaza katalizira sintezu acetilkolina (ACh) iz acetil-CoA i kolina
2. Acetilkolinesteraza (AChE) cijepa ACh u sinaptičkoj pukotini
3. Kolin se transmembranskim prijenosnicima vraća u akson i služi za sintezu novih molekula ACh

Slika 9. Shematski prikaz kolinergične sinapse i kružnog ciklusa acetilkolina¹⁶

Dolaskom živčanog impulsa ACh se oslobađa u prostor sinaptičke pukotine gdje se veže na kolinergične receptore (muskularinski i nikotinski) vezanih na postsinaptičku membranu kolinergične sinapse ili mišićne stanice. Acetilkolin se iz sinaptičke pukotine uklanja hidrolizom uz pomoć enzima acetilkinesteraze (AChE) čime se kontolira prijenos živčanih impulsa. Vezanje acetilkolina na postsinaptičku membranu mijenja njenu propustljivost za ione. Prilikom vezanja acetilkolina dolazi do depolarizacije postsinaptičke membrane i živčani impuls se nastavlja prenositi. Hidrolizom s AChE postsinaptička membrana se polarizira i signal se prestaje prenositi.

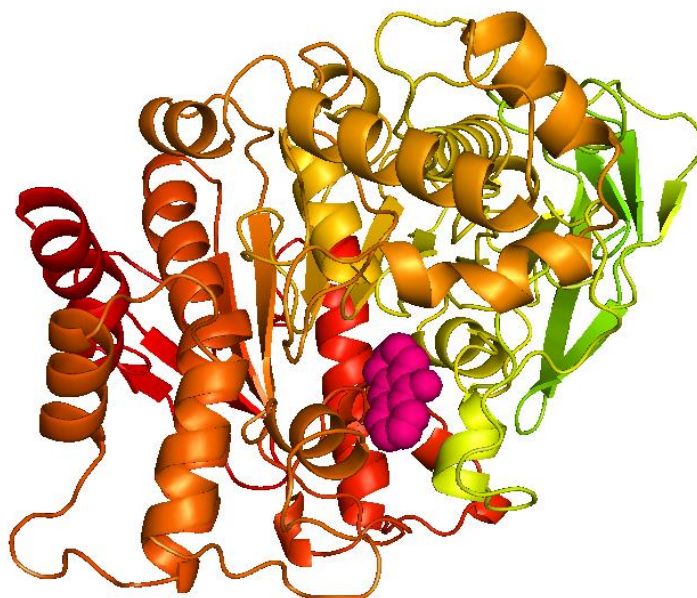
1.3.2. Acetilkinesteraza

Acetilkinesteraza (EC 3.1.1.7.), AChE je enzim koji pripada klasi hidrolaza, podklasi serinskih esteraza i skupini hidrolaza karboksilnih kiselina. AChE hidroliriza do 25000 molekula acetilkolina po sekundi, tako da je brzina hidrolize supstrata strogo ograničena brzinama difuzijskih kontroliranih reakcija. Ta činjenica čini AChE jednim od najučinkovitijih enzima¹⁷. Njezina fiziološka uloga jest hidroliza acetilkolina na acetyl i kolin prilikom prijenosa živčanog impulsa, čime se omogućava normalan prijenos signala u živčano-mišićnim sinapsama. ACh-om posredovani prijenosi živčanih impulsa od životne su važnosti. Prekid prijenosa je smrtonosan, a promjene u prijenosu vode do narušavanja kognitivnih i neuromišićnih funkcija, kao što je u slučaju Alzheimerove bolesti.

1.3.2.1. Struktura i djelovanje acetilkolinesteraze

Prva molekulska struktura acetilkolinesteraze otkrivena je rendgenskom strukturnom analizom čime je potvrđeno da je ovaj enzim serinska hidrolaza. Prva otkrivena (riješena) trodimenzionalna struktura AChE (*Torpedo californica*, TcAChE)¹⁸ je pokazala da se katalitička trijada, slična onima u drugim serinskim hidrolazama i proteazama, sastoji od sljedećih aminokiselina: serina, histidina i glutaminske kiseline odnosno glutamata. Puno privlačnije je bilo istraživanje acetilkolinesteraze sisavaca, te je u 1990. razjašnjena struktura enzima iz miša, vola i čovjeka. Kako su strukture međusobno vrlo slične, istraživanja *in vitro* se vrše na TcAChE kao modelu.

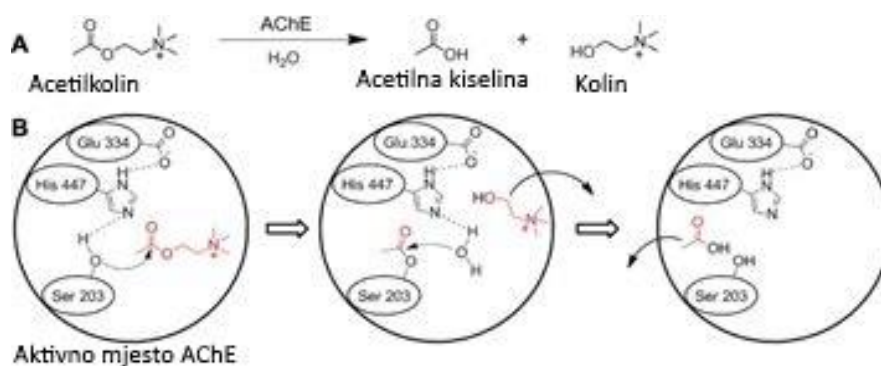
AChE je alosterički enzim, a na tu alosteričku stranu se vežu određeni supstrati, reverzibilni inhibitori i organofosforni spojevi. Kada je ligand vezan na perifernu stranu, on može spriječavati ulazak supstrata u ždrijelo, te može promijeniti konformaciju samog aktivnog mjesta. U visokoj koncentraciji sam ACh inhibira, alosteričkim mehanizmom, AChE tako što se veže na periferno mjesto i time mijenja konformaciju aktivnog mjesta, te sprječava vezanje u aktivni centar i hidrolizu



Slika 10. Trodimenzionalna struktura acetilkolinesteraze³⁰

Četiri podregije aktivnog mjesta koje sudjeluju u hidrolizi su:

1. periferno mjesto smješteno na rubu ždrijela
2. anionsko mjesto (mjesto vezanja kolina ili hidrofobno mjesto)
3. esterazno mjesto (katalitičko mjesto, katalitička trijada s oksianionskom "rupom")
4. acilni "džep" odgovoran za smještanje acilnog dijela supstrata



Slika 11. Prikaz aktivnog mjesta AchE¹⁸

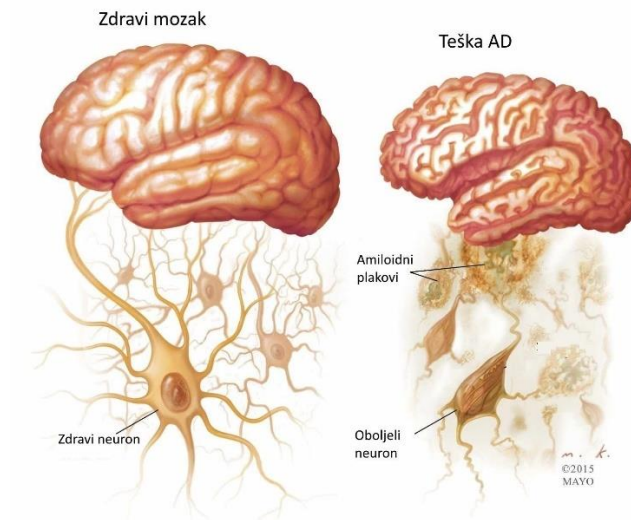
1.3.3. Alzheimerova demencija

Alzheimerova demencija je teška, neizlječiva, degenerativna bolest mozga, koja može uzrokovati smrt. Svojim napredovanjem dovodi do gubitka pamćenja, promijena mišljenja, poremećaja pamćenja, te promijena u ponašanju i osobnosti bolesnika.

Alzheimerova bolest je dobila ime po njemačkom liječniku Aloisu Alzheimeru koji ju je prvi puta dijagnosticirao 1906. godine. To je progresivna atrofija kognitivnih funkcija karakteristična po abnormalnm naslagama proteina amiloida na mozgu. Glavna komponenta proteinskih naslaga je β -amiloid. Bolest je praćena smanjenjem koncentracije acetilkolina kao glavnog neurotransmitera. Poremećaji uzrokuju prestanak rada živčanih stanica, odnosno gubitka veze s drugim živčanim stanicama što u konačnici izaziva uništenje i smrt neurona. Kao posljedica toga javljaju se promijene u ponašanju, gubitak pamćenja i teškoće u obavljanju svakodnevnih aktivnosti.

Enzimi potrebni za sintezu i razgradnju acetilkolina smanjeni su za 30% kod oboljelih od Alzheimerove demencije. Povećanje razine acetilkolina na način da se inhibicijom enzima acetilkolinesteraze uspori degradacija acetilkolina još uvijek predstavlja jedini način liječenja Alzheimerove bolesti. Tvari koje se danas koriste u liječenju bolesti (donepezil, galantamin i rivastigmin kao inhibitori kolinestezara, te memantin koji djeluje kao aktivator glutamata, čime omogućava lakši prijenos kalcijevih iona)¹⁹ imaju i štetnih djelovanja na zdravlje ljudi. Oksidacijski procesi također imaju utjecaj na oštećenja metabolizma acetilkolina. Zbog tih i sličnih razloga nastoje se pronaći tvari prirodnog porijekla koje će ih uspješno zamijeniti. Uz inhibicijsko djelovanje pojedinih tvari ispituju se i njihova antioksidacijska svojstva.

Bolest je dvostruko češća u žena u odnosu na muškarce, djelomično zato što žene imaju očekivano duži životni vijek. Najbrojnije su teorije koje govore o genetskim uzrocima bolesti, a uz to djeluje i niz faktora rizika koji povećavaju vjerojatnost oboljenja; prije svega starija životna dob, visoki krvni tlak, pretilost, depresija, teže ili česte povrede mozga, alkoholizam i drugi.



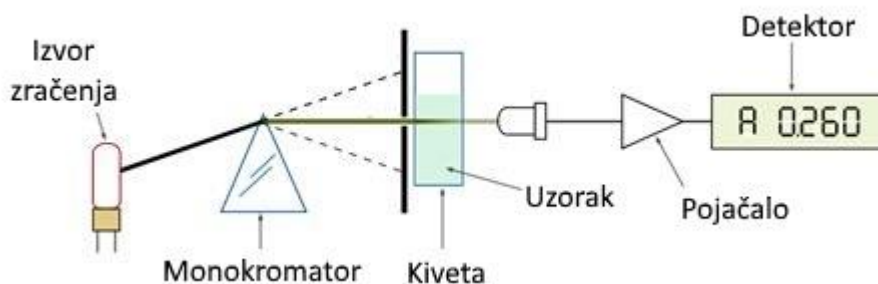
Slika 12. Usporedba zdravog mozga i neurona s oboljelim od Alzheimerova²⁰

1.4. BIOLOŠKA AKTIVNOST ETERIČNOG ULJA DALMATINSKOG BUHAČA

Istraživanjem različitih vrsta roda *Chrysanthemum*, dobiven je uvid u biološke aktivnosti. Biljke pokazuju farmakološko, insekticidno, toksično, antioksidacijsko, antibakterijsko i inhibicijsko djelovanje. Kemijska i biološka raznolikost posljedica je čimbenika kao što su klimatski uvjeti, vegetacijska faza, površina uzgoja i geografsko područje.

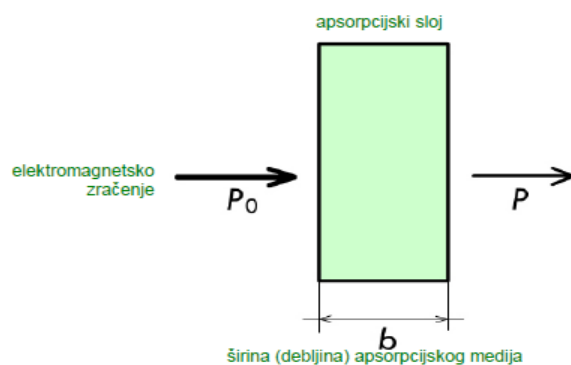
1.4.1. Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je spektrometrijska metoda kojom se mjerenjem količine apsorbirane svjetlosti na određenoj valnoj duljini određuje koncentracija tvari u uzorku. Spektrofotometrija se koristi za područje koncentracija od 10^{-6} do 10^{-3} mol/L i vrlo je selektivna tehnika. Spektrofotometar je uređaj koji se koristi u spektrofotometriji²¹.



Slika 13. Shematski prikaz spektrofotometra²²

Osnovni pojmovi u spektrofotometriji:



Slika 14. Apsorpcija elektromagnetnog zračenja²³

Apsorbancija (A) je bezdimenzijska veličina, opisana logaritamskim odnosom:

$$A = \log \frac{P_0}{P} \quad (1)$$

Apsorbancija je omjer upadnoga i apsorbiranoga elektromagnetskog zračenja ili svjetlosnog toka.

Beer-Lambertov zakon opisuje odnos između apsorbancije i koncentracije tvari u uzorku. Snaga zračenja smanjuje se s P_0 na P .

$$A = abc = \log \frac{P_0}{P} \quad (2)$$

- A - apsorbancija tvari pri određenoj valnoj duljini
- a - apsorptivnost (apsorpcijski koeficijent)
- b - širina (debljina) apsorpcijskog medija
- c - koncentracija apsorbirajuće vrste.

Kada je koncentracija tvari u otopini izražena u molL^{-1} , a debljina apsorpcijskog medija (duljina puta zračenja kroz uzorak) u cm, onda je $a = \epsilon$. To je molarna apsorptivnost (molarni apsorpcijski koeficijent), a mjerna jedinica mu je $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Apsorptivnost i molarna apsorptivnost su konstante koje su karakteristične za određenu tvar i valnu duljinu.

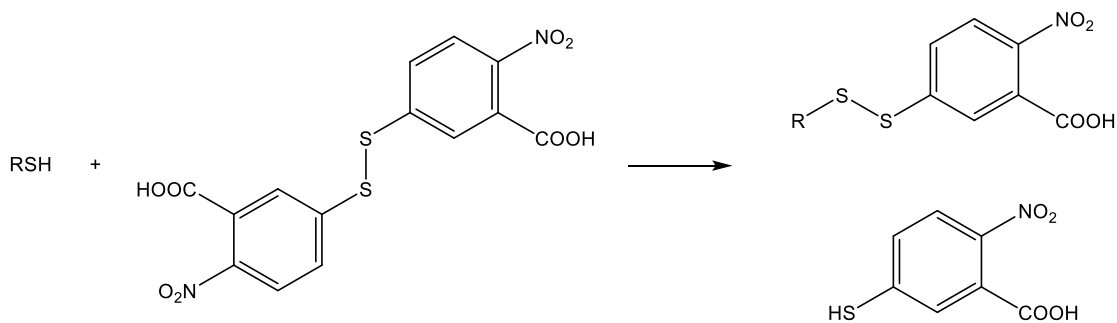
Transmitancija (T) je omjer snage propuštenog zračenja i upadnog zračenja. Transmitancija predstavlja udio upadnog zračenja koji je prošao kroz otopinu koja je podvrgnuta zračenju. Mjeri se pri određenoj valnoj duljini (kao i apsorbancija).

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (3)$$

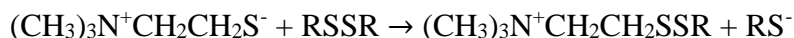
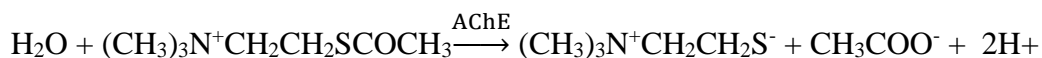
1.4.2. Određivanje sposobnosti inhibicije enzima acetilkolinesteraze Ellmanovom metodom

Za mjerenje aktivnosti enzima acetilkolinesteraze (AChE) koristi se spektrofotometrijska metoda, metoda po Ellmanu. Reagens koji se koristi u ovoj metodi je DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina))

Reakcijom tiolnih skupina supstrata acetiltiokolina (AChI) s DTNB-om (Ellman-ov reagens) uz pomoć enzima AChE dolazi do porasta koncentracije žuto obojenog aniona 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline. Tiol naime reagira s reagensom (DTNB) cijepajući disulfidnu vezu pri čemu nastaje 2-nitro-5-merkaptobenzojeva kiselina (TNB) koja zatim ionizira u TNB^- u neutralnom ili alkalnom mediju. Navedeni anion TNB^- je žute boje. Ova reakcija je brza. Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini od 412 nm jer je to apsorpcijski maksimum TNB^- .



Slika 15. Ellmanova reakcija za određivanje tiola²⁴



Porast apsorbancije mjeri se pri valnoj duljini $\lambda = 412$ nm. Sposobnost inhibicije enzima izražava se:

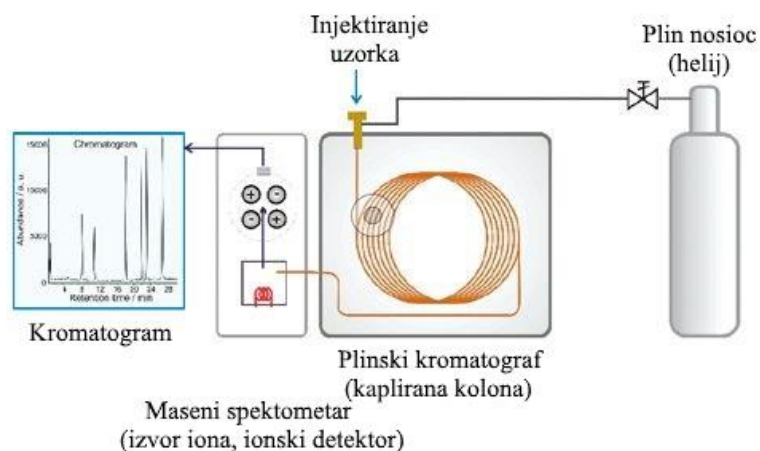
$$\% \text{ inhibicije} = \frac{(A_k - A_u)}{A_k} \times 100 \quad (4)$$

gdje je A_k apsorbancija kontrolnog uzorka, a A_u apsorbancija ispitivanog uzorka.

Ellmanov test je brza, jednostavna i jeftina spektrofotometrijska metoda koja se koristi za dijagnosticiranje toksina, terapijsko praćenje i *in vitro* kinetička ispitivanja. Ellmanov test omogućava precizno i reproducibilno određivanje kinetičkih konstanti kao osnova za razumijevanje toksičnih učinaka organofosfornih spojeva²⁵.

1.4.3. GC/MS analiza

GC/MS (eng. *gas chromatography mass spectrometry*) je instrumentalna tehnika koja predstavlja kombinaciju plinske kromatografije i masene spektrometrije. Tom kombinacijom moguće je odvojiti i identificirati sastojke iz kompleksne smjese uzorka. Tehnika je pogodna za detekciju sastojaka hlapljivih bioloških uzoraka čak i kada dolaze s veoma malim udjelima u smjesi. Za upotrebu ove tehnike uzorak mora biti termički stabilan. Ionizacija uzorka postiže se alternativnim metodama ionizacije, a može biti električna ili kemijska. Ionizacijom sastojak gubi elektron, te se u obliku iona M^+ ili $[M+H]^+$ zabilježava u obliku pika na masenom spektru koji daje uvid u molekulsku masu sastojka. Djelovanjem energije na ione, pojedini fragmenti sastojka bilježe se na kromatogramu u obliku „otiska prsta“ koji služi za identifikaciju molekulske strukture, odnosno kvalifikaciju analita od interesa²⁶.



Slika 16. Shematski prikaz GC/MS analize²⁷

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Kemikalije

Prilikom izrade ovoga rada korištene su sljedeće kemikalije:

Enzim: acetilkolinesteraza Tip V-S (E.C. 3.1.1.7. iz elektorofora električne jegulje) /Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka/

DTNB (5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina)) 99% /Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka/

ATChI (Acetiltiokolin-jodid) /Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka/

Fosfatni pufer, pH=7, pH=8

Ostale kemikalije: etanol, pentan, dietileter

2.2. Biljni materijal

Biljni materijal prikupljen je iz prirodnih populacija otoka Brača, u proljeće 2017. godine. Ispitivani uzorci su brani u različitim fazama cvatnje. Za istraživanje su korišteni cvjetovi buhača prethodno osušeni u laboratoriju Zavoda za biokemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta.



Slika 17. Osušeni biljni materijal *Chrysanthemum cinerariifolium*, Vis.

2.3. Izolacija eteričnog ulja

Za izolaciju eteričnog ulja iz biljnog materijala buhača korištena je metoda hidrodestilacije u aparaturi po Clevengeru. Biljni uzorak koji sadrži eterično ulje je u direktnom kontaktu s kipućom vodom pri atmosferskom tlaku. Eterično ulje destilira zajedno s vodom, vodene pare nose uzorak kroz hladilo koje omogućava kondenzaciju, a eterično ulje hvata se u tzv. „klopku“ organskih otapala dietiletera i pentana.

Nedostatak ove metode je stvaranje artefakata zbog utjecaja vode i/ili visoke temperature. Unatoč tome, ova metoda izolacije eteričnih ulja je brza, jednostavna i često korištena.

Tablica 2. pokazuje iscrpak eteričnih ulja iz pojedinih uzoraka biljaka buhač, w/w.

Tablica 2. Iscrpak eteričnih ulja iz suhog biljnog materijala biljke buhač, ubranih u različitim fazama cvatnje.

	m (biljnog materijala)/g	m (eteričnog ulja)/g	iscrpak w/w /%
<i>buhač</i> (16.5.2017.)	198,54	0,0598	0,03
<i>buhač</i> (23.5.2017.)	203,88	1,4447	0,71
<i>buhač</i> (30.5.2017.)	200,59	1,0061	0,50



Slika 18. Aparatura za hidrodestilaciju aparat po Clevengeru

2.4. Ispitivanje inhibicijske sposobnosti Ellmanovom metodom

Za ispitivanje sposobnosti inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE) eteričnim uljima biljke buhač korištena je metoda po Ellmanu. Kao enzim, u ovoj je metodi upotrijebljen enzim acetilkolinesteraza (AChE) koji je izoliran iz elektrofora električne jegulje (TipV-S). Kao supstrat u reakciji korišten je acetiltiokolin-jodid (ATChI). U toj metodi kao tiolni reagens je korišten DTNB. Enzimskom hidrolizom supstrata nastaje tiokolin koji reagira s DTNB-om pri čemu se oslobađa žuto obojeni anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline, a porast apsorbancije aniona mjeri se pri valnoj duljini $\lambda = 412 \text{ nm}$.

2.4.1. Priprava kemikalija

Korištene su sljedeće otopine:

- Enzim AChE otopljen u puferu (pH=8), $c=0,03 \text{ UmL}^{-1}$
- Fosfatni pufer (0,1 M, pH=7 i pH=8)
- Otopina supstrata (ATChI), $c=0,5 \text{ mM}$
- DTNB otopljen u puferu (pH=7 + 0,12 mM NaHCO_3), $c=0,3 \text{ mM}$
- Eterično ulje buhača, $\gamma=1 \text{ gL}^{-1}$

Tablica 3. Priprava kemikalija za rad

<i>KEMIKALIJE</i>	<i>OSNOVNA OTOPINA</i>	<i>KONAČNA KONCENTRACIJA</i>	<i>VOLUMEN</i>
PUFER		0,1 mmol L ⁻¹	190 μL
DTNB	13,1 mg u 5 mL pufera (pH 8)	0,3 mmol L ⁻¹	10 μL
ATChI	16,0 mg u 5 mL pufera (pH 8)	0,5 mmol L ⁻¹	10 μL
AchE	6,6 μL u 5 mL pufera (pH 8)	0,03 mmol L ⁻¹	10 μL
UZORAK/EtOH		1 gL ⁻¹ /96%	10 μL



Slika 19. Priprava kemikalija za eksperimentalno ispitivanje inhibicijske aktivnosti dalmatinskog buhača

2.4.2. Postupak

Uzorci se otpipetiraju u jažice prema Tablici 3. Acetiltiokolin-jodid (ACThI) se dodaje u jažice neposredno prije početka mjerenja zato što on započinje reakciju. Slijepa proba služi za praćenje neenzimske reakcije hidrolize. U slijepim probama volumen AChE, odnosno ATChI, zamijenjen je istim volumenom pufera. Mjerenje se vrši pomoću višekanalnog čitača mikrotitarskih pločica „Sunrise“ (Tecan, GmbH, Austrija), uz automatsko miješanje i pohranjivanje podataka na računalo.

Tablica 4. Shema pripreme eksperimenta

	KONTROLA	BL1	BL2	UZORAK M	UZORAK BL
PUFER	180	190	190	180	190
DTNB	10	10	10	10	10
UZORAK/EtOH	0/10	0/10	0/10	10/0	10/0
AChE	10	/	10	10	/
ATChI	10	10	/	10	10



Slika 20. Višekanalni čitač mikrotitarskih pločica Sunrise
(Tecan, GmbH, Austria)

Sposobnost inhibicije enzima AChE računa se prema sljedećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije AChE} = \frac{A_K - A_A}{A_K} * 100 \quad (4)$$

gdje je:

- A_K apsorbancija test otopine
- A_A apsorbancija test uzorka

2.5. Određivanje kemijskog sastava i sadržaja eteričnog ulja buhača GC/MS analizom

2.5.1. Postupak

Smjesa koja se želi razdvojiti injektirana je u struji plina pri povišenoj temperaturi, pri čemu dio isparava, odnosno otapa se u plinu. Plin struji i odnosi uzorak na kolonu gdje, kao i pri kromatografiji na stupcu dolazi do niza adsorpcija na stacionarnu fazu i ponovnog isparavanja tvari u mobilnu fazu. Zbog različite hlapljivosti i polarnosti pojedine komponente imaju različit koeficijent razdiobe, pa različitim brzinama putuju kolonom. Na taj način razdvojene čiste komponente izlaze iz kolone.

Mjerenja su vršena koristeći plinski kromatograf model 3900 (tvrtke Varian Inc., LakeForest, CA, SAD) sa spektrometrom masa (MS), Varian Inc., model 2100T. Za analize je korištena nepolarna kapilarna kolona VF-5MS dužine 30m×0,25mm debljine stacionarne faze 0,25mm. Temperaturni program za VF-5MS kolonu bio je kroz 3 minute izoterman na 60°C, zatim se povisio na 246°C stopom od 3°C min⁻¹ i zadržao izotermno kroz 25 min na toj temperaturi. Nosač plina bio je helij, sa stopom protoka 1mL min⁻¹, temperaturom injektora od 250°C, injekcijskim volumenom od 1 μL; omjerom raspodjele od 1:20. Ionizacijska voltaža masenog spektrometra bila je 70 eV, raspon skeniranja masa: 40-350 masenih jedinica i temperatura izvora iona od 200°C.



Slika 21. GC/MS

3. REZULTATI

3.1. Kemijski sastav i sadržaj eteričnih ulja dalmatinskog buhača sakupljenog u različitim sezonama cvatnje

Eterično ulje iz prethodno osušenih cvjetova dalmatinskog buhača (*C. Cinerariifolium* L.), u tri faze cvatnje, analizirano je vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) uz korištenje VF-5MS kromatografske kolone. Identifikacija pojedinih spojeva izvršena je na osnovi vremena zadržavanja pojedinih spojeva na koloni (retencijska vremena-Rt i iz njih izračunati kovačevi indeksi-KI), njihovom usporedbom s poznatim literaturnim vrijednostima za svaku pojedinu komponentu te usporedbom spektra masa dobivenih spojeva sa spektrima masa spojeva Wiley-eve i NIST datoteke. Kemijski sastav i sadržaj pojedinih komponenti eteričnih ulja iz cvjetova dalmatinskog buhača prikazan je Tablicom 5.

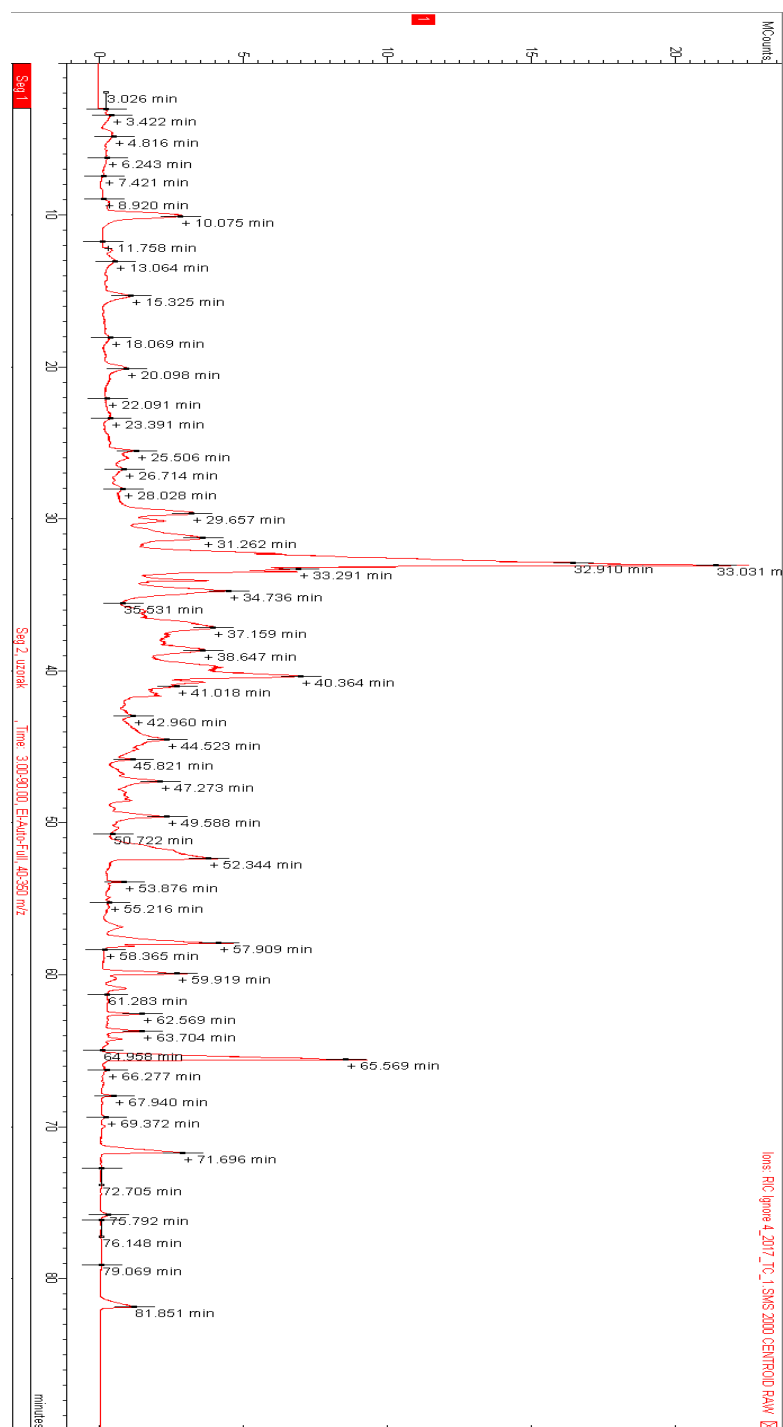
Kromatogrami dobiveni analizama prikazani su na Slikama 22, 23 i 24..

Tablica 5. Kemijski sastav eteričnih ulja biljke buhač, sakupljenog u različitim vremenima cvatnje.

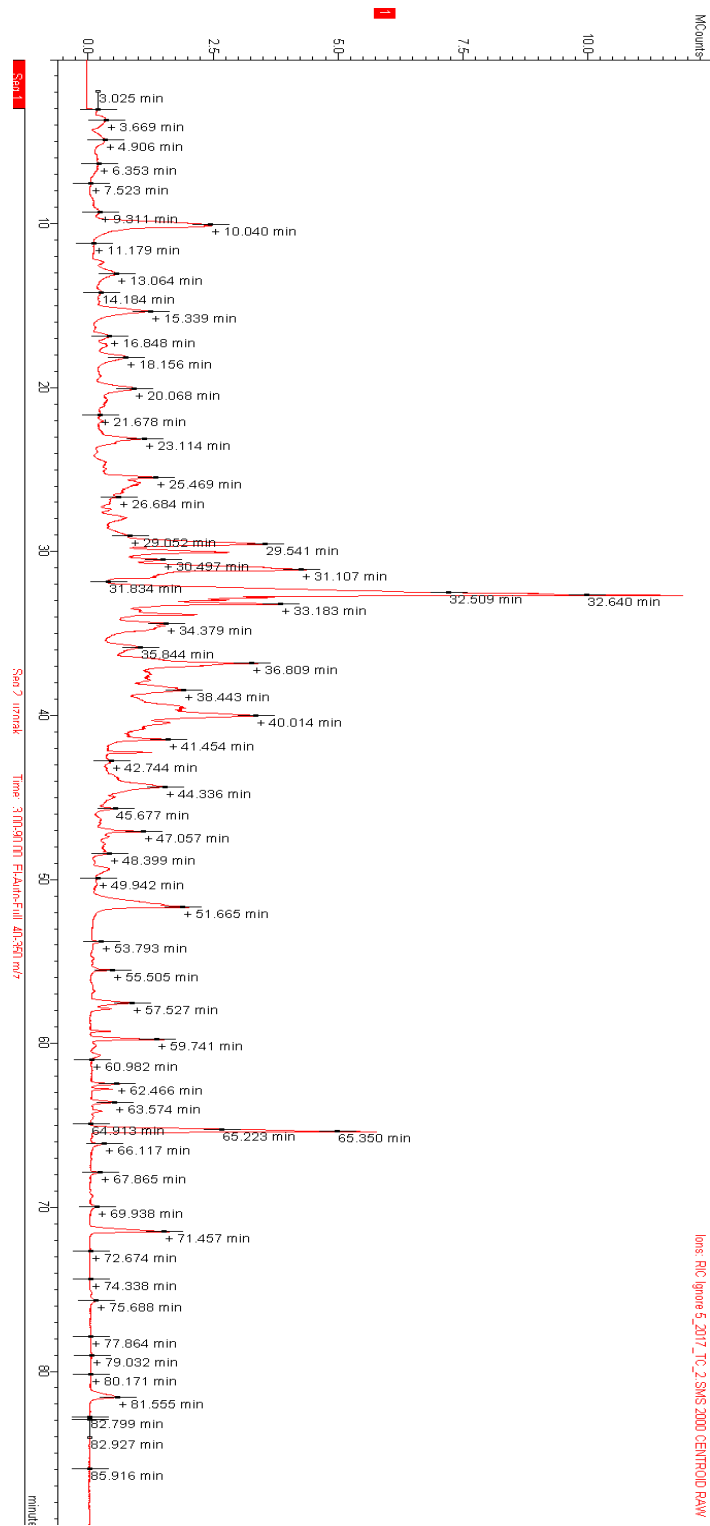
	buhač 10.5.2017.	buhač 23.5.2017.	buhač 30.5.2017.	KI	Način identifi kacije
	[% , w/w]	[% , w/w]	[% , w/w]		
Naziv komponente					
Terpenski spojevi					
<i>Oksidirani monoterpeni</i>					
1.	<i>cis</i> -sabinen hidrat	0,5	1,5	1,5	1064 KI/MS
2.	linalool	1,2	2,2	3,8	1104 KI/MS
3.	pinokamfeol	-	1,6	1,3	1170 KI/MS
4.	verbenon	-	1,8	-	1207 KI/MS
5.	<i>Trans</i> -krizantemska kiselina	-	-	1,7	1344 KI/MS
<i>Neoksidirani seskviterpeni</i>					
6.	α -kubeben	1,0	2,2	0,4	1348 KI/MS
7.	bicikloelemen	0,8	1,2	0,8	1338 KI/MS
8.	α -kopaen	-	1,4	0,5	1376 KI/MS
9.	β -kariofilen	3,8	4,7	4,5	1419 KI/MS
10.	α -gvajen	1,8	3,2	-	1438 KI/MS
11.	<i>Cis</i> - β -farnezen	-	1,4	1,8	1443 KI/MS
12.	γ -himahalen	3,9	7,3	7,1	1477 KI/MS
13.	germakren D	3,5	-	0,5	1480 KI/MS
14.	β -selinen	-	8,4	-	1490 KI/MS
15.	β -gvajen	15,0	3,2	-	1493 KI/MS
16.	β -himahalen	8,4	3,4	33,5	1500 KI/MS
17.	α -farnezen	2,0	-	-	1507 KI/MS
18.	γ -kadinen	2,8	-	2,4	1513 KI/MS
19.	δ -selinen	-	6,3	-	1492 KI/MS
20.	δ -kadinen	1,1	1,8	3,0	1541 KI/MS

<i>Oksidirani seskviterpeni</i>						
21.	nerolidol	5,8	4,3	1,9	1535	KI/MS
22.	germakren D-4-ol	-	2,1	-	1577	KI/MS
23.	kariofilen-oksidi	-	1,6	-	1585	KI/MS
24.	gvajol	2,1	4,2	-	1595	KI/MS
25.	Humulene epoksid II	4,3	-	-	1609	KI/MS
26.	Alloaromadendren-epoksid	-	4,9	-	1639	KI/MS
27.	α -muurol	1,8	-	-	1640	KI/MS
28.	7-epi- α -eudezmol	-	2,1	-	1663	KI/MS
29.	α -kadinol	5,1	-	-	1655	KI/MS
30.	β -bisabolol	-	5,4	-	1673	KI/MS
31.	α -bisabolol	-	2,1	-	1685	KI/MS
32.	farnezol	6,1	-	1,3	1697	KI/MS
33.	2Z,6Z-farnezol	2,2	1,4	1,1	1698	KI/MS
34.	2Z,6E-farnezol	1,2	1,8	-	1722	KI/MS
<i>Oksidirani diterpeni</i>						
35.	fitol	-	-	0,3	2119	KI/MS
Neterpenski spojevi						
<i>Fenilpropanski spojevi</i>						
36.	Eugenol	1,1	-	0,6	1360	KI/MS
<i>Ugljikovodici</i>						
37.	Heneikozan	0,3	-	0,7	2100	KI/MS
38.	Trikozan	1,2	0,8	2,2	2300	KI/MS
39.	Tetrakozan	-	4,2	0,7	2400	KI/MS
40.	Pentakozan	5,3	-	-	2500	KI/MS
41.	Heksakozan	-	-	0,4	2600	KI/MS
42.	Heptakozan	1,6	1,3	1,9	2700	KI/MS
<i>Alkoholi</i>						
43.	3-oktanol	3,0	4,9	3,6	996	KI/MS
<i>Kiseline</i>						
44.	Heksadekanska kiselina	2,1	3,8	0,3	1977	KI/MS
<i>Esteri</i>						
UKUPNO		92,7	95,7	90,0		

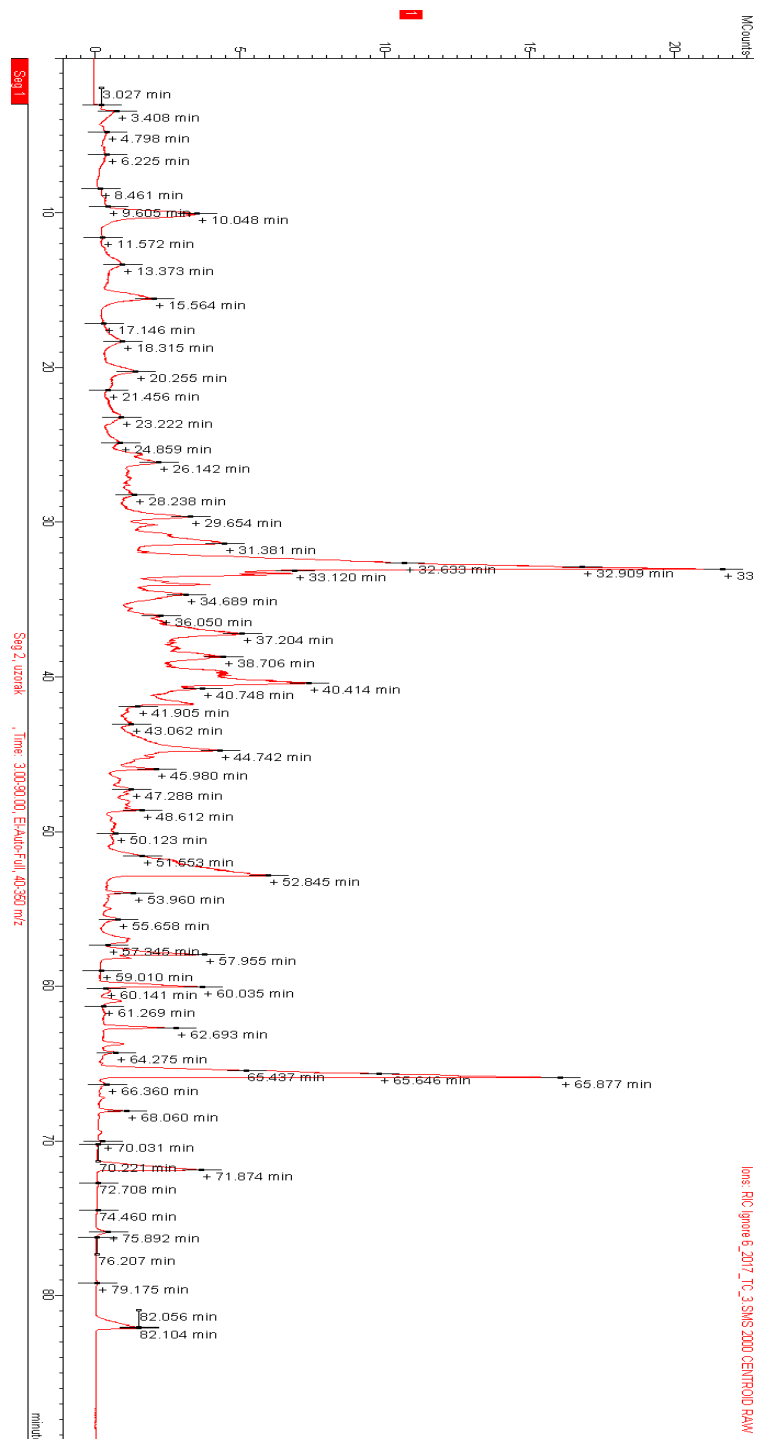
Terpenski spojevi	74,4	81,5	67,4
<i>Oksidirani monoterpeni</i>	1,7	7,1	8,3
<i>Neoksidirani seskviterpeni</i>	44,1	44,5	54,3
<i>Oksidirani seskviterpeni</i>	28,6	29,9	4,3
<i>Oksidirani diterpeni</i>	-	-	0,3
Neterpenski spojevi	15,4	15,0	10,4
<i>Fenilpropanski spojevi</i>	1,1	-	0,6
<i>Ugljikovodici</i>	8,4	6,3	5,9
<i>Alkoholi</i>	3,0	4,9	3,6
<i>Kiseline</i>	2,1	3,8	0,3
<i>Esteri</i>	0,8	-	-



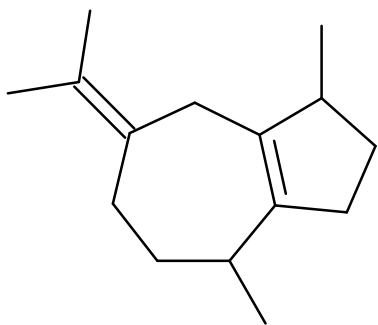
Slika 22. Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja dalmatinskog buhača, sabranog 10.5.2017.



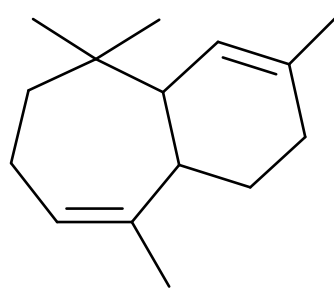
Slika 23. Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja dalmatinskog buhača, sabranog 23.5.2017.



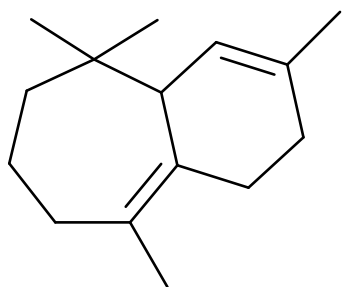
Slika 24. Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja dalmatinskog buhača, sabranog 30.5.2017.



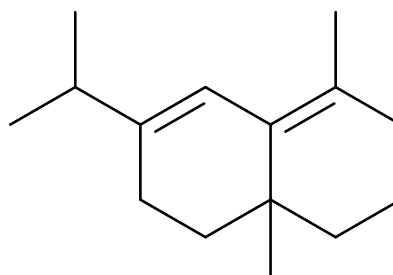
β -gvajen



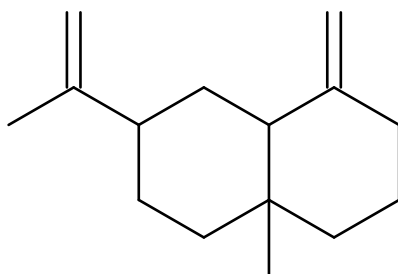
γ -himahalen



β -himahalen



δ -selinen



β -selinen

Slika 25. Kemijske strukture neoksidiranih seskviterpenskih spojeva, β -gvajena, γ -himahalena, β -himahalena, δ -selinena te β -selinena kao najznačajnijih komponenti ulja.

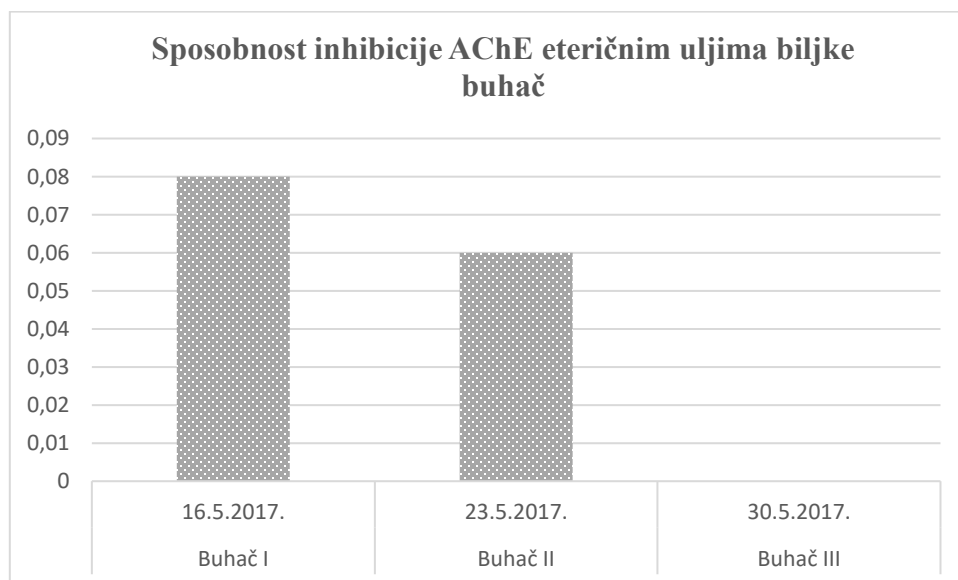
3.2. Sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraza eteričnim uljima biljke buhač

U ovom radu ispitana je inhibicijska sposobnost eteričnih ulja biljke buhač na enzim acetilkolinesterazu (AChE). Eterična ulja dobivena su iz prethodno osušenih cvjetova biljke, sakupljenih u tri različite sezone cvatnje.

Rezultati inhibicijskog djelovanja eteričnih ulja prikazani su Tablicom 6. Rezultati su prikazani na grafu na Slici 22.

Tablica 6. Inhibicijski potencijal eteričnih ulja biljke buhač, sabranim u različitim vremenima cvatnje, na enzim acetilkolinesterazu, AChE

Inhibitor	$A_{Ksr.}$	A_{BLsr}	$A_{uzorak, sr.}$	% inhibicije
Buhač (16.5.2017.)	1,1485	0,27	1,081	0,08
Buhač (23.5.2017.)			1,0955	0,06
Buhač (30.5.2017.)			1,171	0



Slika 26. Sposobnost inhibicije AChE eteričnim uljima biljke buhač, dobivenim iz prethodno osušenih cvjetova biljke u tri različite faze cvatnje

4. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je odrediti kemijski sastav i sadržaj te antikolinesterazni potencijal eteričnih ulja biljke dalmatinski buhač, sabrane u različitim vremenima cvatnje na prirodnim staništima biljke na otoku Braču.

Za izolaciju hlapljivih spojeva iz biljnog materijala korištena je metoda izolacije u aparaturi po Clevenger-u. Kemijski sastav i sadržaj pojedinih komponenti eteričnih ulja biljke (cvijetovi biljke), sakupljene u različitim vremenima cvatnje, određen je veznim sustavom plinska kromatografija-spetrometrija masa uz korištenje VF-5MS kromatografske kolone. Sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze eteričnim uljima testirana je metodom po Ellman-u.

Analizom kemijskog sastava eteričnih ulja dalmatinskog buhača identificirano je ukupno 45 komponenti (Tablica 5.). U sastav ulja ulaze terpeni i neterpeni spojevi. Od terpenih spojeva u uljima dolaze oksidirani monoterpeni, neoksidirani i oksidirani seskviterpeni spojevi te oksidirani diterpeni spojevi. Od neterpenih spojeva u uljima buhača dolaze fenilpropanski spojevi te neterpeni ugljikovodici, alkoholi, kiseline i esteri. Uvidom u kemijski sastav uočava se da su u ulju najzastupljeniji terpeni spojevi (67,4-74,4%), među kojima dominiraju neoksidirani (44,1-54,4%) i oksidirani seskviterpeni spojevi (4,3-29,9%). Među neterpenskim komponentama ulja ističu se ugljikovodične komponente (5,9-8,4%). Uvidom u kemijski sastav može se uočiti da se sadržaj terpenih spojeva u biljci tijekom cvatnje biljke povećava. Izuzetak ovog su oksidirani seskviterpeni spojevi čiji se sadržaj pred kraj sezone cvatnje biljke naglo smanjuje (s 29,9% na 4,3%). Sadržaj neterpenih spojeva biljke se s cvatnjom smanjuje. U kvantitativnom smislu, najznačajnije komponente ulja su neoksidirani seskviterpeni spojevi β -himahalen (3,4-33,5%), β -gvajen (do 15%), β -selinen (do 8,4%), γ -himahalen (3,9-7,3%) te δ -selinen (do 6,3%). Krizantemska kiselina, kiselina čiji esteri sudjeluju u tvorbi piretrina, je identificirana samo kao sastojak ulja izoliranog iz cvjetova biljke ubrane u najkasnijem vremenu cvatnje s udjelom 1,7%. Ovo je važan podatak obzirom na smjernice vremena branja biljke, u smislu njenog insekticidnog djelovanja.

Samon Shrestha i suradnici²⁸ su također odredili kemijski sastav buhača iz Nepala. Među 74 identificirane komponente ovog ulja najzastupljenije su kamfor (11,0%), krizantenon (7.6%), α -kadinol (4.8%), γ -muurolen (4.6%) i *cis*-krizantenol (4.4%). Kemijski sastav ovog ulja se dosta razlikuje od sastava ulja iste biljke koja raste u sjevernoj Indiji. Bhakuni i suradnici²⁹ identificirali su 22 komponente ulja buhača koji raste u sjevernoj Indiji. *Trans*-krizantemska kiselina (19.61%), dekanska kiselina (7.63%), nerolidol (9.63%), spatulenol (4.58%), gvajol (5.93%), β -eudesmol (9.81%) i α -eudesmol (7.07%) glavne su komponente tih ulja³¹.

Testiranje sposobnosti inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE) eteričnim uljima biljke buhač čije su cvjetne glavice sakupljene u različitim vremenima cvatnje, pokazalo je da niti jedan uzorak ulja ne inhibira testirani enzim. Uvidom u kemijski sastav eteričnih ulja buhača može se vidjeti da ulja ne sadrže niti jednu od komponenti ulja koje imaju sposobnost inhibicije ovog enzima, kakve su α -pinen, δ -3-karen, 1,8-cineol, karvakrol, himohidrokinon, α - i β -asaron.

5. ZAKLJUČAK

- Analizom kemijskog sastava eteričnih ulja dalmatinskog buhača identificirano je ukupno 45 komponenti. U sastav ulja ulaze terpeni i neterpeni spojevi. Od terpenih spojeva u uljima dolaze oksidirani monoterpeni, neoksidirani i oksidirani seskviterpeni spojevi te oksidirani diterpeni spojevi. Od neterpenih spojeva u uljima buhača dolaze fenilpropanski spojevi te neterpeni ugljikovodici, alkoholi, kiseline i esteri.
- Najzastupljenije komponente ulja su neoksidirani i oksidirani seskviterpeni
- Sadržaj terpenih spojeva u biljci se tijekom cvatnje biljke povećava. Izuzetak ovog su oksidirani seskviterpeni spojevi čiji se sadržaj pred kraj sezone cvatnje biljke naglo smanjuje.
- Sadržaj neterpenih komponenti biljke se sa cvatnjom smanjuje.
- Kvantitativno, najznačajnije komponente ulja su neoksidirani seskviterpeni spojevi β -himahalen, β -gvajen, β -selinen, γ -himahalen i δ -selinen.
- Krizantemska kiselina, kiselina čiji esteri sudjeluju u tvorbi piretrina, je identificirana samo kao sastojak ulja izoliranog i cvjetova biljke ubrane u najkasnijem vremenu cvatnje udjelom od 1,7%. Ovo je važan podatak obzirom na smjernice vremena branja biljke, u smislu njenog insekticidnog djelovanja.
- Testiranje sposobnosti inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE) eteričnim uljima biljke buhač, čije su cvjetne glavice sakupljene u različitim vremenima cvatnje, pokazalo je da niti jedan uzorak ulja ne inhibira testirani enzim.

6. LITERATURA

- [1] M. Grdiša, K. Carović-Stanko, I. Kolak, Z. Šatović - Morphological and Biochemical Diversity of Dalmatian Pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch. Bip.) *Agriculturae Conspectus Scientificus*, Vol.74, No. 2 (73-80), 2009.
- [2] https://hr.wikipedia.org/wiki/Dalmatinski_buha%C4%8D#Morfolo.C5.A1ke_osobine (19.9.2017)
- [3] https://en.wikipedia.org/wiki/Asteraceae#/media/File:Asteracea_poster_3.jpg (19.9.2017.)
- [4] <http://www.plantea.com.hr/buhac/> (19.9.2017.)
- [5] Upotreba buhača u ekološkoj poljoprivredi, 2015.
(<http://www.ekopoduzetnik.com/tekstovi/upotreba-buhaca-u-ekoloskoj-poljoprivredi-16020/>) (20.9.2017.)
- [6] A. Kumar, S. P. Singh, R. S. Bhakuni-Secondary metabolites of *Chrysanthemum* genus and their biological activities. Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, India. *Current science*, Vol. 89, No. 9, 2005.
- [7] NN 99/09; <http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/dodatni/403046.pdf>
- [8] I. Carev (2016). Fitokemijski i citogenetski profil odabranih biljaka roda *Centaurea* (*Asteraceae*), Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
- [9] T. Kobayashi, T. Tabuchi - Anatomical and histochemical characteristics of leaves and flowers of *Tanacetum cinerariifolium* and *Tanacetum coccineum*. *ISHS Acta Horticulturae 1169: II International Symposium on Pyrethrum* (20.9.2017.)

- [10] F. Bakkali, S. Adverbeck, D. Adverbeck, M. Idaomar - Biological effects of essential oils. *Food Chem Toxicol* 46(2):446-475, 2008.
- [11] K.A. Zimmermann - Nervous System: Facts, Function & Diseases.
(<https://www.livescience.com/22665-nervous-system.html>) (2016.)
- [12] P. Low, MERCK MANUAL, Consumer Version - Overview of the Autonomic Nervous System (<http://www.merckmanuals.com/home/brain-spinal-cord-and-nerve-disorders/autonomic-nervous-system-disorders/overview-of-the-autonomic-nervous-system?qt=nervous%20system&alt=sh>) (21.9.2017.)
- [13] Acetylcholine and Cognitive Function
(<https://elitenootropics.com/acetylcholine-cognitive-function/>) (21.9.2017.)
- [14] F. Burčul, Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice *Ranunculaceae*, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2014).
- [15] http://faculty.pasadena.edu/dkwon/chap%208_files/textmostly/slide58.html
(21.9.2017.)
- [16] P. Taylor, Z. Radić -The cholinesterases: from genes to proteins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 34: 281–320., 1994.
- [17] H. Dvir, I. Silman, M. Harel, T.L. Rosenberry, J.L. Sussman - Acetylcholinesterase: From 3D Structure to Function. *Chem Biol Interact*. 187(1-3): 10-22. 2010.
- [18] E. Milkania - Direct detection of acetylcholinesterase inhibitor binding with an enzyme-based surface plasmon resonance sensor. *Anal Biochem*. 408(2):212-9. 2011.
- [19] http://www.alz.org/research/science/alzheimers_disease_treatments.asp (22.9.2017.)
- [20] <http://www.healthy-holistic-living.com/alzheimers-diet-and-lifestyle.html> (22.9.2017.)
- [21] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler – Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
- [22] <https://en.wikipedia.org/wiki/Spectrophotometry> (22.9.2017.)

- [23] L.K.Modun - Spektroskopske metode, Predavanja iz Instrumentnih metoda analize.2017.
- [24] https://www.researchgate.net/figure/259768349_fig1_Fig-1-DTNB-mechanism-for-the-detection-of-sulphydryl-groups-of-l-cysteine-source (22.9.2017.)
- [25] GL. Ellman, K.D. Country, V. Andres, R.M. Featherstone – A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 7:88-95. 1961.
- [26] University of Bristol. Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS): <http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gcms.html> (21.9.2017.)
- [27] <https://www.netzsch-thermal-analysis.com/en/products-solutions/hyphenated-techniques-evolved-gas-analysis/tgasta-gc-ms-coupling/> (22.9.2017.)
- [28] S. Shrestha, P. Satyal, G. Pandit, W.N. Setzer – Chemical composition of the essential oil from the aerial parts of *Chrysanthemum cinerariifolium* growing in Nepal. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 2014; 2 (2): 01-03
- [29] R.S. Bhakuni, A.P. Kahol, S.P. Singh, A. Kumar - Composition of North Indian Pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariifolium*) flower oil. *J Essent Oil Bear Plants* 2017; 10(1):31-35)
- [30] K. Tutek, dobivanje 3D slike enzima korištenjem softvera PyMol