

Botanička i fitokemijska karakterizacija nekih vrsta roda Plantago L.

Jurišić Grubešić, Renata

Doctoral thesis / Disertacija

2003

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:236666>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

**Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Renata Jurišić

**Botanička i fitokemijska karakterizacija
nekih vrsta roda *Plantago* L.**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2003.

Doktorski rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja znanstvenog stupnja DOKTORA ZNANOSTI
za polje FARMACIJE u području BIOMEDICINE I ZDRAVSTVA

Doktorski rad izrađen je u Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova i
Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu, u suradnji s tvrtkom PLIVA d.d. i Kliničkom bolnicom
Dubrava u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Zdenke Kalođere i
doc. dr. sc. Sande Vladimir-Knežević.

*Prof. dr. sc. Zdenki Kalođeri zahvaljujem na stručnom vodstvu,
pomoći i podršci u radu.*

*Dragoj voditeljici, doc. dr. sc. Sandi Vladimir-Knežević, najveća hvala za
strpljenje i trud, za vrijeme uloženo u moj znanstveni rad, za svesrdnu pomoć
koju mi je pružila, uz nadu u uspješan nastavak našega zajedničkog rada.*

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Vladimиру Grdiniću na
korisnim savjetima tijekom znanstvenog rada.*

*Na ostvarenoj znanstvenoj suradnji i velikoj pomoći u izradi
eksperimentalnog dijela doktorskog rada, iskreno zahvaljujem
dipl. ing. Željku Debeljaku, dipl. ing. Goranu Srečniku i ostalim djelatnicima
HPLC laboratorija odjela Razvojne analitike tvrtke PLIVA d.d.,
doc. dr. sc. Željku Romiću iz Kliničke bolnice Dubrava i
doc. dr. sc. Toniju Nikoliću iz Botaničkog zavoda
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.*

*Izražavam zahvalnost prof. dr. sc. Ivanu Šugaru i dipl. ing. Dragomiru
Brkiću na pomoći pri sabiranju i identifikaciji biljnog materijala, kao i
članovima Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju
na susretljivosti i ljubaznosti tijekom mikroskopske analize.*

*Mojim dragim suradnicima,
članovima Zavoda za analitiku i kontrolu lijekova FBF-a,
najveća hvala na razumijevanju i moralnoj podršci
u izradi doktorskog rada.*

*Hvala svim djelatnicima Zavoda za Farmakognoziju –
– tu se uvijek osjećam dobrodošlom i domaćom!*

*Dragoj Jadranki, prijateljici i kolegici,
želim izreći sveobuhvatnu hvalu za veliku pomoć i podršku,
kao i za dosadašnji zajednički rad.*

*Od srca zahvaljujem Tomislavu i svim dragim prijateljima
koji su mi bili vrijedna pomoć na znanstvenom putu.*

***Mojim najdražima, mami, tati i Dadi,
posvećujem i darujem ovaj rad.***

Umjesto predgovora:

Radosti mudraca

**Blago čovjeku koji je stekao mudrost
i čovjeku koji je zadobio
razboritost.**
**Jer bolje je steći nju nego steći
srebro,
i veći je dobitak ona i od zlata.**
**Skupocjenija je od bisera,
i što je god tvojih dragocjenosti,
s njome se poređiti ne mogu;**
**dug joj je život u desnoj ruci,
a u lijevoj bogatstvo i čast.**
**Njezini su putovi putovi miline,
i sve su njene staze pune spokoja.**
**Životno je drvo onima koji se nje
drže,
i sretan je onaj tko je zadrži.**

Biblijka (Izreke 13-18)



S A D R Ž A J

UVOD	1
1. TEORIJSKI DIO	
1.1. BOTANIČKI PODACI	3
1.1.1. Porodica <i>Plantaginaceae</i> (trputac)	3
1.1.2. Rod <i>Plantago</i> L. (trputac)	3
1.1.2.1. <i>Plantago altissima</i> L. (visoki trputac)	4
1.1.2.2. <i>Plantago argentea</i> Chaix (srebrnolisni trputac)	5
1.1.2.3. <i>Plantago coronopus</i> L. (busenasti trputac)	6
1.1.2.4. <i>Plantago holosteum</i> Scop. (uskolisni trputac)	7
1.1.2.5. <i>Plantago lagopus</i> L. (izbrzdani trputac)	9
1.1.2.6. <i>Plantago maritima</i> L. (primorski trputac)	9
1.2. BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI VRSTA RODA <i>PLANTAGO</i> L.	11
1.2.1. Iridoidi	11
1.2.1.1. Kvalitativna analiza iridoida	12
1.2.1.2. Kvantitativna analiza iridoida	13
1.2.1.3. Biološki učinci iridoida	14
1.2.2. Flavonoidi	15
1.2.2.1. Kvalitativna analiza flavonoida	17
1.2.2.2. Kvantitativna analiza flavonoida	19
1.2.2.3. Biološki učinci flavonoida	21
1.2.3. Trjeslovine	25
1.2.3.1. Kvalitativna analiza trjeslovina	26
1.2.3.2. Kvantitativna analiza trjeslovina	27
1.2.3.3. Biološki učinci trjeslovina	27
1.2.4. Triterpeni	28
1.2.4.1. Kvalitativna analiza triterpena	29
1.2.4.2. Biološki učinci triterpena	29
1.2.5. Saponini	29
1.2.5.1. Kvalitativna analiza saponina	31

1.2.5.2. Biološki učinci saponina	32
1.2.6. Steroli	32
1.2.6.1. Kvalitativna analiza sterola	33
1.2.6.2. Biološki učinci sterola	33
1.2.7. Rezultati dosadašnjih istraživanja vrsta roda <i>Plantago</i> L.	34

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. BILJNI MATERIJAL	36
2.2. APARATURA I REAGENSI	36
2.3. METODE I POSTUPCI ISTRAŽIVANJA	38
2.3.1. Morfološko-anatomska istraživanja	38
2.3.2. Histokemijske reakcije	38
2.3.3. Iridoidi	39
2.3.3.1. Kvalitativna analiza iridoida	39
2.3.3.2. Karakterizacija iridoida metodom micelarne elektrokinetičke kromatografije (MEKC)	40
2.3.4. Flavonoidi	41
2.3.4.1. Kvalitativna analiza flavonoida	41
2.3.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida	41
2.3.4.3. Karakterizacija flavonoida metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)	42
2.3.5. Trjeslovine	43
2.3.5.1. Kvalitativna analiza trjeslovina	43
2.3.5.2 Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina	44
2.3.6. Saponini i triterpeni	45
2.3.6.1. Kvalitativna analiza saponina i triterpena	45
2.3.7. Steroli i triterpenske kiseline	45
2.3.7.1. Kvalitativna analiza sterola i triterpenskih kiselina	45
2.3.8. Prosudba postupka određivanja trjeslovina primjenom programskog paketa ESKULAP	46
2.3.9. Analiza fitokemijskih rezultata metodom multivarijatne statistike	49

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. REZULTATI MORFOLOŠKIH ISTRAŽIVANJA	50
3.2. REZULTATI ANATOMSKIH ISTRAŽIVANJA	52
3.2.1. Anatomija listova	52
3.2.2. Anatomija stabljika	60
3.3. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI I PRIČUVNE TVARI	68
3.3.1. Rezultati histokemijskih reakcija	68
3.3.2. Iridoidi	70
3.3.2.1. Kvalitativna analiza iridoida	70
3.3.2.2. MEKC analiza iridoida	74
3.3.3. Flavonoidi	78
3.3.3.1. Kvalitativna analiza flavonoida	78
3.3.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida	81
3.3.3.3. HPLC karakterizacija flavonoida i fenolnih kiselina	84
3.3.4. Trjeslovine	90
3.3.4.1. Kvalitativna analiza trjeslovina	90
3.3.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola i trjeslovina	90
3.3.5. Saponini i triterpeni	97
3.3.4.1. Kvalitativna analiza saponina i triterpena	97
3.3.6. Steroli i triterpenske kiseline	99
3.3.4.1. Kvalitativna analiza sterola i triterpenskih kiselina	99
3.3.7. Rezultati matematičko-statističke prosudbe postupka spektrofotometrijskog određivanja trjeslovina	101
3.3.8. Rezultati "cluster" analize eksperimentalnih fitokemijskih podataka	108

4. ZAKLJUČCI	111
---------------------------	-----

5. LITERATURA	117
----------------------------	-----

6. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

7. ŽIVOTOPIS

8. PRILOZI

UVOD

Hrvatska flora obuhvaća velik broj biljnih vrsta, a za mnoge još nisu u potpunosti riješeni taksonomski odnosi, niti su botanički i kemijski detaljno istražene.

Rod trputac (*Plantago* L.), iz porodice trpućovki (*Plantaginaceae*), polimorfan je rod koji obuhvaća oko 265 vrsta (1) i krije u svojim pojedinim svojstama mnoge botaničke, fitokemijske i farmakološke nepoznanice. Neke vrste roda *Plantago*, primjerice *Plantago major* L., *Plantago lanceolata* L. i *Plantago psyllium* L., dosad su dobro istražene i poznate pučkoj i službenoj medicini kao sredstva za iskašljavanje, liječenje rana i upala, te kao laksansi (2-9). Ostale se vrste toga roda tek rijetko spominju, i to samo u narodnoj medicini.

U Hrvatskoj raste oko 15 vrsta roda *Plantago* (10, 11). U svrhu proučavanja srodstvenih odnosa među vrstama i nižim taksonima toga roda, te izučavanja biološki aktivnih tvari potencijalnih novih fitoterapeutika, provedena su opsežna botanička i fitokemijska istraživanja biljnih uzoraka iz zapadnog dijela Hrvatske: *Plantago altissima* L., *P. argentea* Chaix, *P. coronopus* L., *P. holosteum* Scop. subsp. *depauperata*, *P. holosteum* Scop. subsp. *holosteum*, *P. holosteum* Scop. subsp. *scopulorum*, *P. lagopus* L. i *P. maritima* L. Navedene biljne vrste dosad su vrlo slabo izučavane, ali su pretpostavljeno bogati izvori djelatnih tvari, po uzoru na već istražene srodne vrste.

U okviru doktorskog rada provedena je detaljna morfološko-anatomska karakterizacija zapadnohrvatskih vrsta roda *Plantago*, s posebnim naglaskom na izučavanje unutarnje građe lista i stabljike, te oblika i rasporeda trihoma.

Kvalitativna fitokemijska istraživanja spomenutih biljnih vrsta obuhvatila su histokemijsku analizu djelatnih i pričuvnih tvari, te dokazivanje iridoida, flavonoida, fenolnih kiselina, trjeslovina, triterpenskih kiselina, saponina i sterola. Primjenom spektrofotometrijskih metoda određeni su ukupni polifenoli, trjeslovine i flavonoidi u različitim biljnim organima analiziranih taksona. Za prosudbu valjanosti postupka određivanja trjeslovina primijenjen je programski paket ESKULAP. Unaprijedena je metoda micelarne elektrokinetičke kromatografije (MEKC) za analizu iridoidnih sastavnica, te postignuta njihova selektivna i ponovljiva karakterizacija, dok su flavonoidi i fenolne kiseline uspješno karakterizirani primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Kao doprinos kemotaksonomiji roda *Plantago*, svi su eksperimentalni fitokemijski rezultati obrađeni metodom multivarijatne statistike.

Provđena botanička i fitokemijska istraživanja navedenih biljnih taksona predstavljaju vrijedan doprinos rješavanju srodstvenih odnosa među vrstama i nižim svojtama roda *Plantago* L. te šire saznanja o njihovim biološki aktivnim tvarima. Time se otvaraju daljnje mogućnosti prepoznavanja i istraživanja novih kvalitetnih fitoterapeutika.

1. TEORIJSKI DIO

1.1. BOTANIČKI PODACI

1.1.1. Porodica *Plantaginaceae* (trpucovke)

Porodica *Plantaginaceae* spada u farmaceutski značajan red *Scrophulariales*, koji još uključuje važne biljne porodice, primjerice *Solanaceae* i *Scrophulariaceae*. Prema nekim autorima (npr. Engler), trpucovke se dovoljno razlikuju od ostalih porodica toga reda te ih oni podižu na razinu reda *Plantaginales*.

Trputcovke su jednogodišnje ili trajne zeljaste biljke ili polugrmovi. Listovi su jednostavni i nerazdijeljeni, rjeđe perasto urezani ili rascijepljeni, većinom skupljeni u prizemnu rozetu. Rijetko se nalaze na stabljikama, nasuprotno ili naizmjenično postavljeni, bez palistića (12). Cvjetovi su većinom skupljeni na vrhu stabljike u guste cvatove tipa izduženog ili kuglastog klasa. Pravilni su, većinom dvospolni, rijetko jednospolni i jednodomni. Imaju brakteje. Ocvijeće je dvostruko, sastavljeno iz čaške i vjenčića. Čaška dvospolnih cvjetova razdijeljena je na četiri režnjića, a u jednospolnih je na ženskim cvjetovima sastavljena većinom iz tri uska lapa. Vjenčić je sulatičan i suhokožičast. Cjevast je i ima četverokrpasti obod koji je samo u ženskih cvjetova nejasno razvijen. Cvijet ima četiri prašnika jednake duljine koji obično strše daleko iz vjenčića i jedan tučak s nadraslom plodnicom koja je razdijeljena na dva do četiri pretinca, s po jednim ili više sjemenih zametaka. Vrat tučka je dugačak i nerazdijeljen. Plod je većinom tobolac koji se otvara zaklopcem i sadrži dvije ili više sjemenaka, a tek vrlo rijetko plod može biti i jednosjemeni nepucavac (11, 13).

Porodica *Plantaginaceae* obuhvaća tri roda (*Plantago* L., *Littorella* Bergius i *Bougueria* Decne.), s oko 260 vrsta, rasprostranjenih uglavnom u umjerenim i svježim područjima gotovo cijelog svijeta (14, 15).

1.1.2. Rod *Plantago* L. (trputac)

Pripadnici roda *Plantago* su zeljaste biljke ili polugrmovi. Listovi su u prizemnim rozetama, rijetko nasuprotni ili naizmjenični na razgranjenim stabljikama, a stapke s cvatovima stoje u njihovim pazućima. Cvjetovi su tetramerni, uglavnom dvospolni, skupljeni u guste klasove koji su često skraćeni poput glavice. Režnjevi vjenčića su najčešće odmaknuti (otvoreni, stršeći) ili svinuti

prema natrag. Prašnici su uklopljeni u cijev vjenčića. Plodnica je dvo- do četveropregradna, s po dva ili više sjemenih zametaka. Plod je kružno urezani tobolac, koji sadrži dvije ili više sjemenaka i otvara se zaklopcem (11, 15).

Rod *Plantago* obuhvaća 6 podrobova: *Plantago*, *Coronopus*, *Littorella*, *Psyllium*, *Bougueria* i *Albicans* (1). U Hrvatskoj raste oko 15 vrsta roda *Plantago*. Široko su rasprostranjene, te ih ima i u nizinskim krajevima, i u planinama. Mnoge od njih rastu u neposrednoj blizini naselja, zatim uz putove, na livadama i pašnjacima, na pjeskovitim i kamenim obroncima, čak i u neposrednoj blizini mora, a rjeđe u živicama i šumama (10, 11).

Podrijetlo naziva *Plantago* objašnjava se kao sastavnica od imenice *planta* (biljka, ali i taban) i glagola *agere* (voditi, slijediti). Tako, primjerice, veliki ili širokolisni trputac (*Plantago major* L.) raste najčešće na putovima kojima hodaju ljudi, slijedi ljudske stope. Zanimljiv je i domorodački naziv za širokolisni trputac u Americi: "tragovi bljedolikog" ili "tragovi blijedih lica", jer se trputac javlja na putovima kojima su se kretali bijeli osvajači Amerike (16).

1.1.2.1. *Plantago altissima* L. (visoki trputac)

Sinonimi: *P. irrigua* Fisch, *P. dalmatica* Schott, *P. lanceolata* subsp. *altissima* (L.) Kelln.

To je trajnica s prilično debelim, kratkim ili malo produženim podankom, koji prelazi u pravi korijen koji odumire, pa se na podanku stvaraju brojni mesnati adventivni korijeni. Listovi su uspravni, lancetasti (suličasti) ili usko lancetasti, tupog vrha, s malim šiljkom. Prema osnovici se sužavaju u dugačku peteljku koja prelazi u uski trokutasti rukavac. Duljina listova iznosi 20-40 cm, a širina 1,5-4 cm. Mlađi listovi su slabo obrasli bjeličastim prilegnutim dlakama. Izraženo su rebrasti, s 5-9 žlijebova. Kratki i široki klasasti cvatovi vrlo su gusti, valjkastog oblika, dugi 2,5-5 cm. Brakteje donjih cvjetova su jajolike i duge 6-7 mm, a u gornjih su cvjetova kratko sužene, duljine 4-6 mm. Listovi čaške dugi su 4 mm, a prednji su međusobno srasli. Obrnuto su jajoliki, pri vrhu izrbljeni, suho kožičasti. Vjenčić je dug 3 mm, režnjevi vjenčića su jajoliki, kratko suženi i tupasti, dugi 2,5 mm i, osim tri uska rebra, smeđe isprugani. Žućkaste su prašnice duge oko 3 mm, a prašnička nit (filament) 2-3 puta je dulja od vjenčića. Sjemenke su usko jajaste, 3,25-3,5 mm duge, crvenosmeđe i djelomice sjajne.

Biljka raste na vlažnim, često zasoljenim livadama, na naplavljenim pješčanim tlima, pretežno u ravničarskim područjima. Njezin se areal proteže od sjevera Italije do Dunava u Mađarskoj i Češkoj. U Hrvatskoj se javlja samonikla u Istri (12, 14).

1.1.2.2. *Plantago argentea* Chaix (srebrnolisni trputac)

Sinonimi: *P. gerardi* Pourr, *P. sericea* Waldst. et Kit., *P. capitata* Hoppe et Hornschuch

Plantago argentea Chaix je trajnica s kratkim, tankim podankom, pokrivenim odozgo rukavcima listova. Pravi korijen naknadno odumire, a adventivni korijeni su dugi, debeli i kruti. Listovi su najčešće pri dnu rozetasto raspoređeni, uspravni, lancetasti do linealno-lancetasti. Postepeno prelaze u uski, tupasti vrh, dok se prema osnovici lista sužavaju u usku peteljku koja se potom širi u dugi trokutasti rukavac. Dugi su 10-30 cm, a široki 4-20 mm. Dok su mlađi, nose bjelkaste ili žućkaste, manje-više duge, priljubljene svilaste dlake koje kasnije potpuno izgube. Listovi su cjelovita ruba i imaju 3-5 odozdo jako ispuštenih žila. Vunaste dlake oskudne su pri osnovici lista. Svaka rozeta najčešće nosi samo jedan do dva cvata. Cvatna stapka (batvo), koja uglavnom jako nadvisuje listove, vitka je, uspravna ili se lučno uzdiže. Duga je 15-50 cm i rijetko ima priljubljene trihome. U mlađih je biljaka okruglastog presjeka, a kasnije je plitko žljebasta. Klasovi su vrlo gusti, kratki, jajasti ili gotovo kuglasti. Prije cvatnje su stožasti, dugi 1-1,5 cm. Brakteja je jajasta s dugim suženjem, sprijeda suho kožičasta, duga 3,5-5 mm, a u donjih cvjetova do 6 mm. Čaška je duga 3-3,5 mm, prednji su lapovi srasli, a udvostručeni lap je široko eliptičan, nepravilno izrubljen ili režnjevit, prema gornjem rubu smeđ. Stražnji lapovi su goli, sužavaju se u kožasti šiljak, prilično su nesimetrični i često svilasto-trepavičasti. Režnjevi vjenčića usko su jajasti, tupasti, dugi 2,25-5 mm, svijetlosmeđi i prozirni, s jedva istaknutim rebrom. Prašnici su bijeli, eliptični, s malim šiljkom, dugi 2-2,25 mm. Plod je tobolac, dug 3,5-4 mm, eliptičan, na vrhu zaokružen, a prema osnovici s kružnim urezom. Sjemenke su duge oko 3 mm.

Biljka raste na suhim, sunčanim kamenjarima, kamenitim brdskim livadama ili kamenitim grmovitim obroncima, u krškim područjima, najčešće na vapnenačkom tlu. Njezin se areal proteže od sjevera Španjolske, preko južnih dijelova Alpa, do Istre, Mađarske i Rumunjske (12, 15).

1.1.2.3. *Plantago coronopus* L. (busenasti trputac)

Narodni nazivi: vranina noga, svračja noga, jelenji rog, oraljnokat, kamenjarski trputac (17, 18).

To je jednogodišnja, dvogodišnja ili višegodišnja biljka s jednom ili nekoliko rozeta. Listovi su 3-20 cm dugi, 0,5-2 cm široki, linealni do suličasti, složeni u prizemnu rozetu. Zupčasti su ili perasto razdijeljeni, rijetko cjelovita ruba, goli ili s kratkim dlačicama na obje epiderme. Zeljaste bezlisne stabljike (batva) obično su brojne, kraće ili dulje od listova, polegnute ili pridignute i na vrhu nose duguljasti klasasti cvat. Brakteje su jajaste i blago zašiljene ili sužene u dugi vršak, kraći ili jednak čaški. Plod je tropogradni tobolac koji sadrži tri do šest eliptičnih smedih sjemenaka dugih 1 mm.

Vrsta *Plantago coronopus* L. rasprostranjena je na europskim obalama, istočno do Poljske i Krima te sjeverno do Švedske. U unutrašnjosti raste u većem dijelu Zapadne, Sjeverne i Središnje Europe te u mediteranskom području (12). U Hrvatskoj se javlja samonikla u Istri, Hrvatskom Primorju i Dalmaciji, većinom na pjeskovitom i slanom tlu obalnog područja (17).

Poznate su četiri podvrste biljne vrste *Plantago coronopus* L.: subsp. *coronopus*, subsp. *commutata*, subsp. *cupanii* te subsp. *purpurascens* (15).



Plantago coronopus L.

1.1.2.4. *Plantago holosteum* Scop. (uskolisni trputac)

Sinonim: *P. carinata* L.

Uskolisni trputac je višegodišnja vrsta. Korijen mladih biljaka produženo je vretenast i tanak, a u starijih je jako produžen, vretenast i debeo. Mlade cvatuće biljke imaju vrlo kratku razgranjenu stabljiku, prekrivenu rukavcima odumrlih listova, koja kasnije stvara busenove. Drvenasta stabljika, promjera 5-7 mm, duga je oko 10 cm. Pri dnu je gola i nepravilno razgranjena, a prema gore je prekrivena odumrlim lisnim rukavcima i nosi gustu rozetu listova. Listovi su 3-15 cm dugi, plosnati ili na rubovima blago uvrnuti, te oskudno i kratko čekinjasto trepavičasti. Srednja žila je istaknuta, a postrane su međusobno paralelne. Primarni listovi su kratki i svijeni unatrag, dok su mlađi listovi uspravni (rijetko polegnuti), tanki i kožasti. Iznad listova uzdiže se uspravna ili malo svijena cvatna stapka (batvo), koja nosi manje ili više klasastih cvatova. Klasovi su uski, dugi 4-10 cm, valjkasti, s gusto zbijenim cvjetovima. Brakteje su lancetaste (suličaste), podjednako duge kao čaška ili je nešto nadmašuju. Vjenčić je dug 3-4 mm. Cijev vjenčića je uska, kratka i oskudno dlakava. Plod je prilično uzak i jajolik tobolac, duljine oko 4 mm, s 3 sjemena zametka, od kojih se razvija samo jedna smeđa lancetasto-jajolika sjemenka.

Vrsta *Plantago holosteum* Scop. raste na suhim i sunčanim travnjacima, na kamenjarskim pašnjacima, kamenitim obroncima i stjenovitim padinama te u suhim šumama. Zastupljena je od morskih obala do planinskog pojasa (do 1650 m). Njezin se areal proteže preko europskog mediteranskog područja, Julijskih Alpa, Balkanskog poluotoka i Male Azije. U Hrvatskoj se javlja samonikla u Istri (12).



Plantago holosteum Scop. subsp. *holosteum*



Plantago holosteum Scop. subsp. *scopulorum*

1.1.2.5. *Plantago lagopus* L. (izbrazdani trputac)

Vrsta *Plantago lagopus* L. višegodišnja je biljka s nekoliko rozeta, a ponekad i jednogodišnja s jednom rozetom listova. Ima snažan korijen i debelu kratku stabljiku, na kojoj se nalaze ostaci odumrlih listova i klasa ili je potpuno ogoljena. Stabljika je uspravna, s izmjeničnim, slabo zupčastim listovima, visoka 10-20 cm. Brakteje su ovalno-lancetaste, te kao i latice, gusto prekrivene dugim trihomima. Plod je tobolac duljine 2-5 mm. Sjemenka je duga 1-5 mm.

Izbrazdani trputac raste na suhom tlu, kamenim brežuljcima, pjeskovitim zaravnima, pašnjacima nižih područja i blizu morske obale. Rasprostranjena je duž Sredozemlja: u Sjevernoj Africi (Maroko, Egipat), u Portugalu, središnjem, istočnom i južnom dijelu Španjolske, na obalnom području Južne Francuske, preko Italije, Istre i Dalmacije, do juga Bugarske, Makedonije, Grčke i Male Azije (14, 15).

1.1.2.6. *Plantago maritima* L. (primorski trputac)

To je višegodišnja biljka koja cvate već prve godine. Korijen mladih biljaka je jak, mesnat i vretenast, a u starijih je razgranat i s više glavica. Podanak je kratak i mesnat, prekriven ljkastim ostacima listova koji su često obrasli vunastim dlakama. Listovi su sivozeleni, manje-više mesnati, linealni do kopljasti i čine gustu prizemnu rozetu. Goli su ili oskudno dlakavi, čitava ruba ili rijetko nazubljeni. Široki su 2 do 6 mm. Mlađi listovi su žljebasti, dok su stariji uglavnom ravni, s 3 do 5 podjednako udaljenih žila. Gusto dlakave cvatne stapke su malobrojne, neznatno uzdužno izbrazdane, visoke 15-40 cm. Cvatori su malobrojni. Klasovi su gusti, valjkasti, dugi 3 do 11 cm. Brakteja je nešto kraća od čaške, gola je ili oskudno dlakava, više-manje udubljena, jajolika, kožasta, zašiljena ili tupa, duga 2 do 3 mm. Vjenčić je dug 4-5 mm i ima dlakavu cijev. Režnjevi vjenčića su smeđi, jajoliki, šiljasti ili tupi, dugi oko 1,5 mm, s prašnicima veličine 2-2,5 mm. Plod je tobolac s 2 pretinca, jajolik, dug 3-4 mm. Ima dvije sjajne, nepravilno eliptične sjemenke, smeđe do tamnosmeđe boje, duge oko 2 mm. Biljka cvate od srpnja do listopada.

Vrsta *Plantago maritima* L. raste u pukotinama stijena, između klisura i kamenja, uz morsku obalu ili na drugom slanom tlu. Ponekad se javlja na neslanom i suhom tlu (fakultativni halofit), najčešće na otvorenim, pjeskovitim područjima siromašnim vegetacijom, te na alkalnim, vapnenačkim mjestima. Uz jadransku se obalu može susresti kao jedna od čestih biljaka koje rastu u neposrednoj blizini mora. Široko je rasprostranjena u Europi. Raste na Islandu, na cijelom obalnom području Velike Britanije, ponegdje u unutrašnjosti i uz gorske rijeke, na obalnim područjima Norveške, Švedske, Finske i Danske, rijetko u unutrašnjosti. Također raste na obalama Belgije, Nizozemske, Francuske i Španjolske, zatim u Poljskoj, Češkoj, Slovačkoj i Austriji, u Mađarskoj u blizini Dunava, u Rumunjskoj, te na obalama Sredozemnog mora, od Lionskog zaljeva, preko Apeninskog poluotoka, do Dalmacije (12, 14, 15).



Plantago maritima L.

* Problematika hrvatskog nazivlja unutar roda *Plantago* L. u literaturi nije jednoznačno riješena. U ovom su radu korištena hrvatska znanstvena imena koja navodi Domac (11).

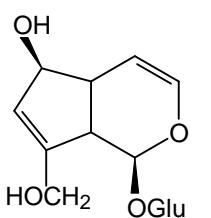
1.2. BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI VRSTA RODA *PLANTAGO* L.

1.2.1. Iridoidi

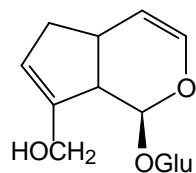
Iridoidi su prirodne monoterpenske biljne tvari koje se mogu podijeliti u četiri osnovne skupine: iridoidni glikozidi, aglikoni ili neglikozidni iridoidi, sekoiridoidi i bisiridoidi. Sintetiziraju se putem mevalonske kiseline i predstavljaju ciklopentanske derivate monoterpena. Aglikoni iridoidnih glikozida imaju furansku ili piransku strukturu (19). Prvi poznati iridoid je verbenalin (kornin), izoliran još 1835. godine, ali mu je tek 1963. godine određena struktura i ustanovljena njegova sličnost s iridodijalom, spojem dobivenim iz argentinskih mrava roda *Iridomyrmex*. Neki leptiri također sadrže iridoidne glikozide podrijetlom iz biljaka kojima se hrane njihove larve. No, iridoidi se uglavnom javljaju u biljnom svijetu. Njihova prisutnost nije dosad utvrđena u nižeg bilja, golosjemenjača i jednosupnica, a sadrži ih 6-8% dvosupnica, većinom iz porodica *Rubiaceae*, *Lamiaceae*, *Scrophulariaceae*, *Acanthaceae* i *Plantaginaceae* (20). Dosad je opisano preko 300 iridoidnih glikozida, 60 sekoiridoida i 90 neglikozidnih iridoida (21).

Aukubin je najpoznatiji i najrasprostranjeniji iridoidni glikozid. Ime mu potječe od biljke *Aucuba japonica* Thbg. (*Cornaceae*), koja služi za dobivanje toga iridoida. Aukubin se prije nazivao rinantin - prema rodu *Rhinanthus* (*Scrophulariaceae*), gdje je prvi puta pronađen 1968. godine. Utvrđena je njegova prisutnost u 13 porodica dvosupnica, a osobito se često javlja u vrsta porodica *Scrophulariaceae* i *Plantaginaceae*. Epoksidni derivat aukubina, katalpol, pojavljuje se u svojstama redova *Scrophulariales*, *Lamiales* i *Gentianales*. Ime potječe od biljke *Catalpa bignonioides* Walt. (*Bignoniaceae*), u čijim je plodovima utvrđena prisutnost njegova estera još u drugoj polovici 19. stoljeća. Poznato je da više od 30 rodova porodice *Scrophulariaceae* sadrži katalpol, a svojstven je i nekim sekcijama podroda *Plantago* (20).

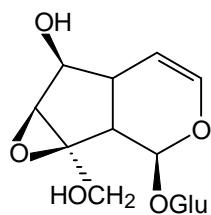
Osim kao bioaktivne tvari, iridoidne supstancije imaju važnu ulogu kemotaksonomske markera, te tako pridonose rješavanju srodstvenih odnosa među nižim svojstama unutar biljnih rodova (20-30).



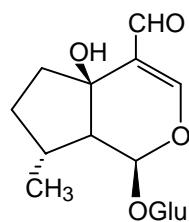
aukubin



bartsiozid



katalpol



plantarenalozid

1.2.1.1. Kvalitativna analiza iridoida

Odjeljivanje i detekciju iridoidnih supstancija moguće je provesti na tankom sloju adsorbensa Kieselgela 60 F₂₅₄, s razvijačem etilacetat-etilmetylketon-mravlja kiselina-voda (5:3:1:1, V/V). Kromatogram se promatra pod UV svjetлом (365 nm), pri čemu iridoidne supstancije modro fluoresciraju (31). Iridoidi se također mogu uspješno odijeliti pomoću razvijača: etilacetat-mravlja kiselina-ledena octena kiselina-voda (100:11:11:27, V/V), etilacetat-mravlja kiselina-voda (8:1:1, V/V) i propanol-toluen-ledena octena kiselina-voda (25:20:10:10, V/V). Detekcija iridoidnih supstancija provodi se prskanjem s 0,5% HCl ili benzidin reagensom (32a).

U bilnjom materijalu iridoidni glikozid aukubin može se dokazati Ehrlichovim reagensom. Svježi ili suhi biljni dijelovi izrežu se i stave na filter-papir, kapne se reagens, ostavi nekoliko minuta, a potom se biljni dijelovi uklone. Papir se osuši vrućim zrakom (80-100 °C), a u prisutnosti aukubina pojavi se plava mrlja koja je pod UV svjetлом crvena.

Aukubin je također moguće detektirati u biljnoj iscrpini, nakon uklanjanja pigmenata na stupcu aluminij-oksida. Profiltriranim vodenom ekstraktu doda se isti volumen otopine reagensa: ledena octena kiselina-koncentrirana kloridna kiselina-0,2%-tina otopina bakar(II)-sulfata, u omjeru 10:0,5:1. Smjesa se zagrije do vrenja, a ovisno o sadržaju aukubina, pojavi se više ili manje intenzivno plavo obojenje (33).

1.2.1.2. Kvantitativna analiza iridoida

Iridoidne supstancije moguće je učinkovito odijeliti i odrediti metodom kapilarne elektroforeze (*capillary electrophoresis*, CE) (34). U novije vrijeme CE postaje sve značajnijom metodom u području separacijske analize (35). Godine 1967. Hjertén je uspješno izveo elektroforezu u uskoj cjevčici unutarnjeg promjera 3 mm (36). Njegovi su sljedbenici bili Virtanen (37) i Mikkens (38), a Jorgenson i Lukacs su usavršili tehniku s kapilarama unutarnjeg promjera manjeg od 100 μm (39-41). Pokazali su značajke suvremene CE: dovoljno rasipanje topline koja potječe od visokog napona, detekcija na koloni i visoko učinkovito odjeljivanje supstancija.

Primjenom elektrokinetičkih načela elektroforeze i elektroosmoze, komponente uzorka razdvajaju se unutar kvarcne kapilare koja s unutrašnje strane nosi silanolne skupine. U području pH iznad 3, negativni naboji silanolnih skupina i mobilni kationi iz difuznog sloja tvore dvosloj suprotnog naboja, koji pokreće elektroosmotski tok (EOF) prema katodi i predstavlja pokretačku silu za ionske i neionske supstancije (35).

Razdvajanje tvari kapilarnom elektroforezom zasniva se na razlici električnih naboja pojedinih supstancija. No, ako se elektrolitu doda aditiv, koji stupa u interakciju s molekulama uzorka posredstvom elektrostatske sile, koordinacijskih, hidrofobnih i drugih veza, moguće je razdvojiti i neutralne supstancije. Na tom se načelu zasniva metoda micelarne elektrokinetičke kromatografije (*micellar electrokinetic chromatography*, MEKC). Natrij-dodecil-sulfat (SDS) dodaje se elektrolitu kao površinski aktivna tvar te stvara micle kada se postigne kritična micelarna koncentracija u puferu. Micle u elektroforetskom sustavu putuju različitom brzinom od molekula vode. Brzina putovanja analita ovisi o njegovoj hidrofobnosti u prisutnosti micle, a razdvajanje se zasniva na raspodjeli analita između vodene i micelarne faze. Gibljivost analita ovisi o njegovoj

elektroforetskoj mobilnosti, o partijskom koeficijentu između vode i micele, te o gibljivosti vode (EOF) i micela. Ta je tehnika pogodna za razdvajanje neutralnih i nepolarnih supstancija, primjerice iridoida (19, 42, 43).

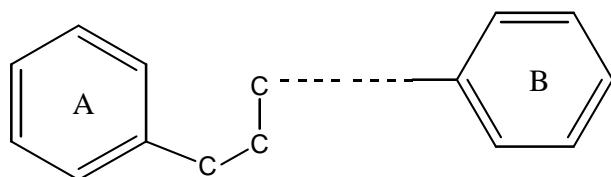
Osim kapilarnom elektroforezom, iridoidne supstancije moguće je identificirati, odijeliti i odrediti metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (*high performance liquid chromatography*, HPLC) (44), koja je još uvijek superiorna u odnosu na CE s obzirom na osjetljivost, selektivnost, reproducibilnost, izbor analitičkih optimizacijskih uvjeta, a posebice u području kliničke dijagnostike. Značajna prednost CE u odnosu na HPLC odnosi se na primjenu manje količine uzorka za analizu te na mogućnost istodobne analize polarnih i nepolarnih spojeva.

1.2.1.3. Biološki učinci iridoida

Iridoidni spojevi su predmet brojnih suvremenih istraživanja zbog velike raznolikosti bioloških djelovanja, a zanimljivi su i kao strukturalna spona između terpena i alkaloida (45a). Imaju obrambenu ulogu u kukaca, djeluju kao feromoni, služe kao hranidbeni stimulansi za neke leptire i imaju ekscitirajući učinak na mačke. Neki iridoidni glikozidi i sekoiridoidi (npr. iz *Gentiana* sp.) djeluju kao gorki tonici (46, 47). Potvrđen je sedativni učinak neglikozidnih iridoida valepotriata iz vrsta roda *Valeriana* (48-51). Sekoiridoid oleuropein djeluje hipotenzivno, izaziva koronarnu dilataciju te ima antiaritmički i spazmolitički učinak (52, 53). Analgetične i antiflogistične iridoidne supstancije su harpagozid i aukubin (54, 55). Također je dokazan antibakterijski učinak iridoidnog glikozida aukubina. U prisutnosti β -glukozidaze, 1 mL 2%-tne vodene otopine aukubina djeluje na kulturu *Staphylococcus aureus* kao 600 i.j. penicilina. Aukubin pokazuje i antifungalni učinak (44, 56). Epoksidni derivat aukubina, katalpol, diuretički je aktivna tvar (57), dok aukubin potiče bubrežno izlučivanje mokraće kiseline (58). Laksativno djelovanje uočeno je u nekim iridoidnim glikozidima, primjerice verbenalina, plumierida i genipozida (59-61). Lakton iridoidne strukture, alamandin, ima znatan *in vivo* učinak protiv P-388 leukemije u miševa te *in vitro* djelovanje protiv stanica ljudskog karcinoma nazofarinks (62).

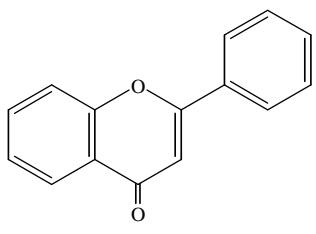
1.2.2. Flavonoidi

Flavonoidi pripadaju velikoj skupini prirodnih polifenolnih spojeva koji imaju strukturu tipa C₆-C₃-C₆ (dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem). U većine flavonoida središnji fragment, C₃, stvara s atomom kisika heterociklični prsten. Ako su aromatski prstenovi međusobno odijeljeni jednim tročlanim mostom, onda su to pravi flavonoidi. Strukturne varijante s etilenskim mostom su izoflavonoidi, dok je u neoflavonoida most jednočlan.

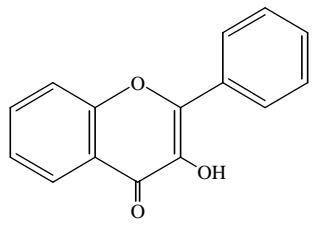


C₆-C₃-C₆ struktura flavonoida

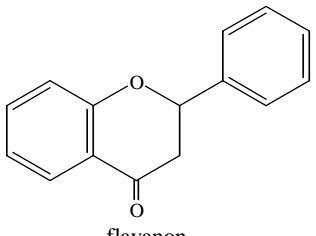
Raznolikost flavonoidnih spojeva uvjetovana je stupnjem oksidacije heterocikličkog prstena te brojem i položajem hidroksilnih skupina na benzenskim jezgrama. Flavonoidnim derivatima (slika 1) pripadaju: flavoni, flavonoli (3-hidroksiflavoni), flavanoni (2,3-dihidroflavoni), flavanonoli (3-hidroksi-2,3-dihidroflavoni), izoflavoni (5-fenilbenzo-γ-pironi), antocijanidini (derivati 2-fenil-3,5,7-trihidrobenzopirilijeva hidroksida), leukoantocijanidini (flavan-3,4-dioli), katehini (flavan-3-oli), kalkoni (derivati benzalacetofenona) i auroni (derivati benzalkularan-3-ona) (63a, 64a, 65).



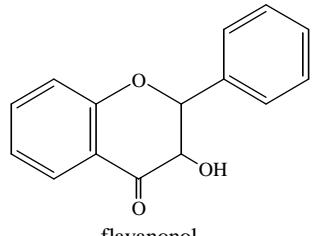
flavon



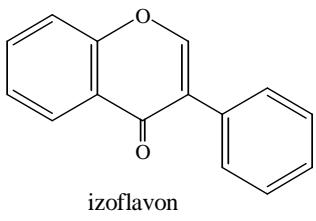
flavonol



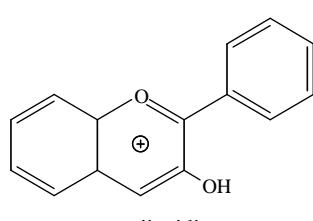
flavanon



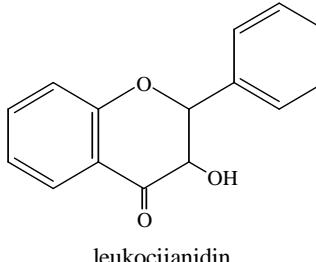
flavanone



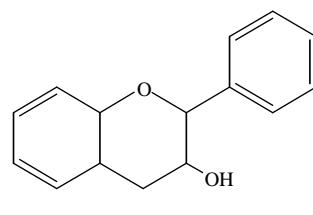
izoflavon



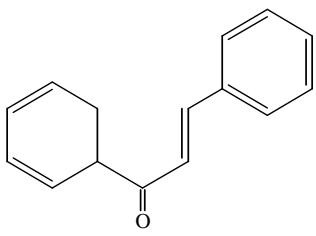
antocijanidin



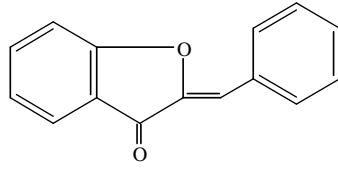
leukocijanidin



katehin



kalkon



auron

Slika 1. Osnovne strukture flavonoida

Flavonoidi se u prirodi pretežno javljaju u glikozidnom obliku, građeni iz dva dijela: aglikonske (nešećerne) i glikonske (šećerne) komponente. Aglikonski dio flavonoida je derivat 2-fenil-dihidrobenzopirana (flavana). Iako šećerni ostatak može biti vezan gotovo u bilo kojem položaju, uglavnom prevladavaju 3- i 7-heterozidi. Od monosaharida su najzastupljeniji D-glukoza, D-galaktoza, L-ramnoza, D-ksiloza i L-arabinoza, a od disaharida rutinoza (L-ramnozido-6-D-glukoza), soforoza (D-glukozido-2-D-glukoza) i sambubioza (D-ksilozido-2-D-glukoza) (66a).

Flavonoidi su široko rasprostranjeni spojevi u biljnem svijetu, od alga do kritosjemenjača. Nalaze se gotovo u svim dijelovima viših biljaka. Najviše ih ima u mladim listovima, cvjetnim popoljcima i nezrelim plodovima. Hidrofilni flavonoidi nalaze se otopljeni u staničnom soku vakuola, dok se lipofilni (tetra-, penta- i heksametoksilirani) flavonoidi javljaju u idioblastima i ekskretornim stanicama (67).

1.2.2.1. Kvalitativna analiza flavonoida

Flavonoidi stvaraju različita obojenja dodatkom natrij-hidroksida, koncentrirane sulfatne kiseline, magnezija i kloridne kiseline te natrij-amalgama (68). Redukcijom flavonoida s magnezijem i kloridnom kiselinom nastaju flavilijum-soli (Shinoda test) (67).

U reakciji između flavonoida sa slobodnom hidroksilnom skupinom na položaju C-4 i natrij-acetata ili lužina nastaje crvena boja otopine reduciranih flavona i crvenoljubičasta otopina čistih flavilijum-soli. U reakciji s natrij-amalgamom, uz naknadno zakiseljavanje, flavoni, 3-metoksi flavoni i flavonol-3-glikozidi reduciraju se do antocijanidina, pri čemu jasnoća boje i apsorpcijsko područje produkata reakcije ovise o broju i položaju hidroksilnih skupina.

Kalkoni u reakciji s antimon(V)-kloridom u tetraklorugljiku daju crveni ili ljubičasti talog, dok flavanoni, flavoni i flavonoli daju žut ili narančast talog.

5-hidroksiflavoni stvaraju sa željezo(III)-kloridom u slabo kiselom mediju obojene kelate.

Flavonoli se mogu razlikovati od flavona reakcijom s otopinom natrij-hidroksida, dajući žuto obojenje, koje zbog oksidacije ubrzo prelazi u smeđe (68).

Flavonoidi stvaraju taloge s reagensima poput olovnog i kalijskog acetata, pikrinske kiseline, barij-hidroksida, piridina i dr. Osobito je pogodan neutralni ili bazični olovoacetat. Flavonoidi se iz olovnog taloga mogu osloboditi dodatkom razrijeđene sulfatne kiseline ili hidrogen-sulfida, pri čemu oovo ostaje u obliku netopljivog olovnog sulfata ili sulfida.

Izlaganjem parama amonijaka, antocijani daju crvenoljubičasto do plavo obojenje, flavoni i flavonoli žuto, flavanoni narančastocrveno, kalkoni i auroni crveno do ljubičasto, a flavanonoli narančastu do smeđu boju (66b).

Analitička kemija flavonoidnih supstancija često uključuje primjenu različitih kromatografskih tehnika: papirne, tankoslojne, kolonske i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).

Za kvalitativnu analizu flavonoida primjenjuje se kromatografija na tankom sloju poliamida, celuloze ili silikagela G po Stahlu (65).

Redoslijed odjeljivanja flavonoida prema polarnosti na tankom sloju silikagela postavili su Bate-Smith i Westal:



Prisutnost polarne skupine (karboksilne ili hidroksilne) uvjetuje smanjenje referentnih vrijednosti (R_F). Uvođenjem alkilne skupine povećava se R_F -vrijednost jer se zapravo povećava lipofilnost molekule. Prema polarnosti flavonoidnog spoja odabiru se otapala za njihovo odjeljivanje.

Za razdvajanje flavonoidnih heterozida na tankom sloju silikagela primjenjuju se polarne smjese otapala (V/V): etilacetat-mravlja kiselina-voda 65:15:20, etilacetat-metiletilketon-mravlja kiselina-voda 5:3:3:1, butanol-ledena octena kiselina-voda 66:17:17. Flavonoidni aglikoni odjeljuju se pomoću nepolarnijih smjesa otapala, kao što su toluen-etilformijat-mravlja kiselina 5:4:1, toluen-kloroform-aceton 40:25:35, benzen-piridin-mravlja kiselina 36:9:5, kloroform-heksan-metanol 40:40:3, V/V.

Flavonoidni heterozidi i aglikoni mogu se također odjeljivati na tankom sloju poliamida, uz jednostavne smjese otapala, npr. metanol-voda 4:1 i aceton-voda 1:1 (V/V). Od složenijih bezkiselinskih sustava otapala mogu se primijeniti toluen-metanol-butanol-voda 70:35:10:4, voda-butanol-aceton-dioksan 15:3:2:1 i toluen-petroleter-metiletilketon-metanol 30:60:5:5 (V/V).

Za odjeljivanje flavonoidnih heterozida i aglikona na tankom sloju celuloze koriste se uglavnom otapala i smjese otapala koje sadrže kiselinu, kao npr. 50%-tna octena kiselina ili butanol-octena kiselina-voda 3:1:1, V/V.

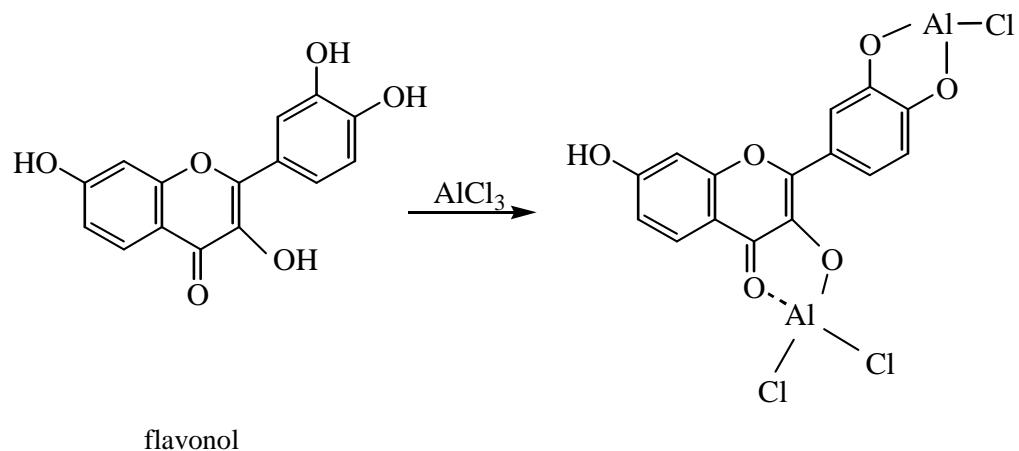
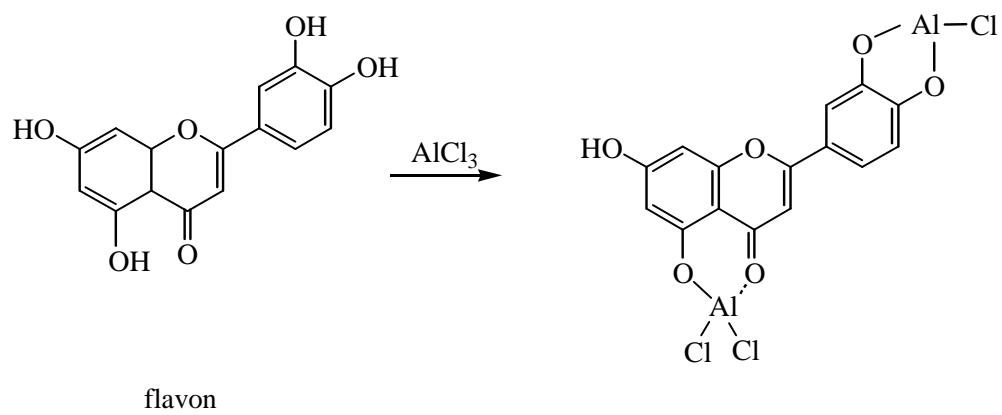
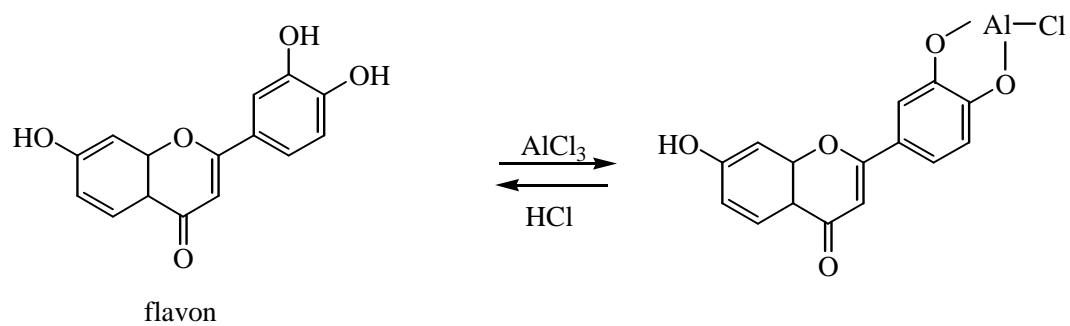
Detekcija flavonoida može se provesti primjenom različitih reagensa: aluminij-klorida, cirkonij-oksitetračlorida, bazičnog olovo-acetata, željezo(III)-klorida, difenilboril-oksietilamina, smjese boratne i oksalatne kiseline 3:1 (V/V), te Naturstoff reagensa (67).

1.2.2.2. Kvantitativna analiza flavonoida

Za određivanje sadržaja flavonoida u drogama primjenjuju se spektrofotometrijske metode prema Römischi te prema Christu i Mülleru. U novije vrijeme koristi se i HPLC metoda za odjeljivanje, identifikaciju i određivanje pojedinačnih flavonoida.

Metodom prema Römischi biljni se materijal obrađuje metanolom. Klorofil se uklanja pomoću tetraklorugljika, a ukupni se flavonoidi određuju nakon tvorbe kompleksa s aluminijem u otopini piridin-octene kiseline (69).

Metoda prema Christu i Mülleru (70) officinalna je u 9. njemačkoj farmakopeji (DAB 9) (71), a zasniva se na stvaranju kompleksa flavonoidnih aglikona s AlCl_3 (slika 2). Biljni materijal se ekstrahira smjesom kloridne kiseline i acetona, pri čemu dolazi do hidrolize flavonoidnih heterozida. Nastali se aglikoni ekstrahiraju acetonom, a nakon tvorbe kompleksa s aluminijem u smjesi metanola, etilacetata i octene kiseline, spektrofotometrijski se određuju. Kompleksi nastali između aluminij-klorida i ortodihidroksilnih skupina A i B prstena većinom se raspadaju u kiselom mediju, dok su Al-kompleksi nastali s C-4 keto-skupinom i 3- ili 5-hidroksilnom skupinom stabilni u prisutnosti kiseline (72).



Slika 2. Kompleksi flavona i flavonola s AlCl_3

Osim spektrodenzitometrijskog određivanja pojedinih flavonoidnih spojeva u biljnom materijalu, za karakterizaciju pojedinačnih flavonoidnih supstancija često se primjenjuje HPLC metoda (73-82). Prednosti su spomenute tehnike u odnosu na ranije tipove kromatografije (kolonska, papirna, tankoslojna) jednostavnija obrada uzorka, poboljšano razlučivanje odijeljenih sastavnica uzorka, znatno kraće vrijeme analize te velika reproducibilnost rezultata. Zasniva se na istim načelima odjeljivanja kao i ostale kromatografske metode, a to su: adsorpcija, razdjeljivanje ili particija (uključujući i reverzno-faznu particiju), ionska izmjena i gel-permeacija ili kromatografija isključivanja po veličini. Za razliku od klasične kolonske kromatografije, gdje mobilna faza slobodnim padom prolazi duž kolone, u HPLC metodi se pokretna faza uz pomoć pumpi pod visokim tlakom protiskuje kroz kolonu. Kao i u plinske kromatografije, identifikacija i određivanje provode se izravno nakon kromatografskog odjeljivanja na odgovarajućim detektorima, uz izrazito povećanje točnosti, preciznosti i osjetljivosti. To je osobito pogodna tehnika za analizu termički labilnih i teško hlapljivih supstancija, koje nije moguće izravno analizirati plinskom kromatografijom, a nalazi široku primjenu u farmaciji (kvalitativna i kvantitativna analiza ljekovitih supstancija, praćenje stabilnosti ljekovitih pripravaka, proučavanje farmakokinetike, terapijskog i toksičnog učinka lijekova, te istraživanje njihova metabolizma).

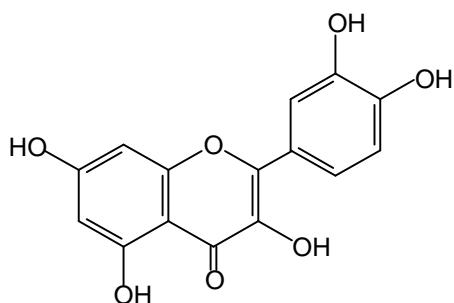
HPLC također dobiva sve veći značaj u analizi biljnih ekstrakata. Kvalitativna analiza koja rezultira "fingerprint" kromatogramom može biti vrlo korisna u fitokemijskoj kontroli kakvoće (73). HPLC se također može primijeniti u biljnoj kemosistematici, karakterizacijom vrsta na osnovi sadržaja njihovih sekundarnih metabolita. Analiza flavonoida u biljkama, posebice u svrhu međusobnog razlikovanja vrsta na temelju kvalitativne i kvantitativne varijabilnosti flavonoidnog sadržaja, uspješno se provodi metodom reverzno-fazne HPLC (75, 78, 82).

1.2.2.3. Biološki učinci flavonoida

Postoje različite teorije o ulozi flavonoida u biljnom organizmu. Smatra se da se sintezom flavonoida iz stanica uklanjuju štetni fenoli. Neki ih smatraju zaštitom od ultraljubičastog zračenja. Mnogi autori ipak prihvataju hipotezu o ulozi flavonoida u metaboličkim redoks-procesima (67).

Dokazana su različita biološka djelovanja flavonoida: antiinflamatorno, antimikrobro, antiviralno, antifungalno, diuretičko, dijaforetičko, antihepatotoksično, antihipertenzivno, antiaritmično, antikoagulirajuće, spazmolitičko, kardiotoničko, antialergično, antiulkusno, analgetično, antimalarično, hipoglikemično i antioksidativno. Poznato je da flavonoidi mogu inhibirati neke enzime, primjerice hijaluronidazu, aldozareduktazu, ksantinoksidazu, ciklooksigenazu, lipooksigenazu, fosfolipazu, histidin-dekarboksilazu, cAMP-fosfodiesterazu i dr. Flavonoidi mogu i inducirati enzime, kao npr. arilhidrolazu i epoksid-hidrolazu. Spominje se također citotoksični i citostatični učinak flavonoida te njihovo profilaktičko djelovanje (83-92).

U novije vrijeme znatno se istražuje bioaktivna uloga flavonola kvercetina i njegovih derivata (tablica 1).



kvercetin

Tablica 1. Kvercetinski derivati

Aglikon	Šećer	3-O-glikozid
Kvercetin	Galaktoza	Hiperozid
Kvercetin	Glukoza	Izokvercitrin
Kvercetin	Ramnoza	Kvercitrin
Kvercetin	Rutinoza	Rutin

Kvercetin je široko rasprostranjen u biljnom svijetu i zastupljen u većini namirnica biljnog podrijetla. Aglikon je velikog broja flavonoida, uključujući rutin, kvercitrin, izokvercitrin i hiperozid. Te se molekule međusobno razlikuju sadržajem određenih šećera na mjestu jedne hidroksilne skupine u C-prstenu kvercetinske molekule, što utječe na biološku aktivnost tih spojeva.

Kvercetin je često glavna biološki aktivna sastavnica biljaka i ima brojne potvrđene biološke učinke. Njegova blagotvorna djelovanja na ljudski organizam uključuju kardioprotektivnu ulogu, antikancerogene učinke, antialergijsku i antiviralnu aktivnost, te protuupalna djelovanja.

Važna je i antioksidativna uloga kvercetina. Uklanja radikale kisika, inhibira ksantin-oksidazu te inhibira lipidnu peroksidaciju *in vitro* (84-87). Daljni pokazatelji kvercetinske antioksidativne uloge jesu inhibicija oksidacije LDL kolesterola *in vitro*, vjerojatno inhibicijom same LDL oksidacije putem zaštite vitamina E u LDL-u od oksidacije ili njegova regeneracija iz oksidiranog oblika (88). Kvercetin sâm, kao i njegova kombinacija s askorbinskom kiselinom, smanjuju nastanak oksidacijske štete na neurovaskularnim strukturama u koži te sprečavaju oštećivanje neurona nakon pokusnog uklanjanja glutationa (93).

Protuupalno djelovanje kvercetina posljedica je njegove antioksidativne uloge i inhibicijskih učinaka na enzime koji sudjeluju u upali (ciklooksigenaza, lipooksigenaza), te na taj način inhibira medijatore upale, uključujući leukotriene i prostaglandine (89, 90). Sprečavanjem oslobođanja histamina, kvercetin također pridonosi protuupalnom djelovanju.

Aldoza-reduktaza, enzim koji katalizira prijelaz glukoze u sorbitol, ima znatnu ulogu u razvoju dijabetičkih katarakti. Dokazano je da kvercetin djeluje kao snažan inhibitor aldoza-reduktaze u humanoj leći (91).

Kvercetin pokazuje antiviralnu aktivnost protiv reverzne transkriptaze HIV-a i drugih retrovirusa, te smanjuje infektivnost i staničnu replikaciju *Herpes simplex* virusa tipa 1, poliovirusa tipa 1, virusa parainfluence tipa 3 te respiratornog sincicijskog virusa (RSV) (92).

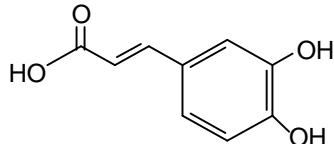
Nova istraživanja kvercetina pokazala su njegov antikancerogeni karakter prema velikom broju staničnih karcinoma, uključujući karcinom dojki (94-96), jajnika (97, 98), debelog crijeva (99), skvamoznih stanica (100), endometrija (97), želuca (101), te makroceliularni karcinom pluća (102) i leukemiju (103, 104).

Klinička indikacija kvercetina su i alergije jer sprečava oslobađanje histamina iz mastocita. Također je dokazano znatno smanjivanje rizika smrtnosti od bolesti srca s povećanjem unosa flavonoida (105). Kvercetin je indiciran u svim upalnim stanjima, budući da inhibira nastanak medijatora upale prostaglandina i leukotriena, kao i oslobađanje histamina. To posebice može biti značajna pomoć astmatičarima jer je leukotrien B4 snažan bronhokonstriktor. Kvercetinska inhibicija ksantin-oksidaze smanjuje stvaranje mokraćne kiseline, te tako može biti od koristi u liječenju gihta. Antiulkusno i gastroprotektivno djelovanje dokazano je brojnim animalnim studijama. Pokazalo se da kvercetin štiti od gastričkih ulceracija izazvanih alkoholom, vjerojatno putem inhibicije lipidne peroksidacije želučanih stanica (106, 107) i/ili inhibicijom sekrecije želučane kiseline (108). Osim znatne antikancerogene djelotvornosti u ljudi i životinja, utvrđeni su i antiproliferativni učinci kvercetina, kao i njegov utjecaj na povećanje učinkovitosti kemoterapeutika (97, 98).

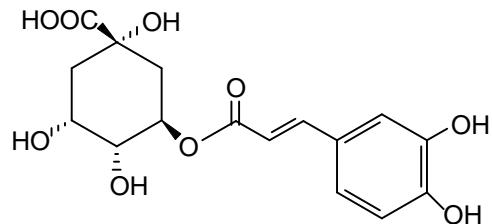
Farmakokinetičke studije humane apsorpcije kvercetina nakon oralne doze pokazale su apsorpciju od 24% za čisti aglikon, a 52% za kvercetinske glikozide (109). Kvercetin podliježe bakterijskom metabolizmu u intestinalnom traktu i prelazi u fenolne kiseline. Apsorbirani kvercetin prenosi se u jetru vezan na albumin, gdje djelomice podliježe metilaciji, hidroksilaciji ili konjugaciji. Preporučene doze kvercetina u kliničkoj praksi iznose 400-500 mg aglikona tri puta dnevno, dok se topljivi kvercetin-kalkon dozira u dvostruko nižoj dozi (110).

Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su široko rasprostranjene u bilnjom i životinjskom svijetu i predstavljaju vrlo važnu skupinu spojeva u prehrambenom i fitoterapijskom smislu. Njihovi derivati, primjerice kavena kiselina (3,4-dihidroksicimetna kiselina) i klorogenska kiselina (3-kafeoil-ester kininske kiseline), često prate flavonoide i pridonose njihovim biološkim učincima (protoupalni, antikancerogeni). Klorogenska kiselina se javlja i u nekoliko izomernih oblika (izoklorogenska, neoklorogenska i pseudoklorogenska kiselina), koji također predstavljaju biološki aktivne sastavnice biljnih droga (66c).



kavena kiselina



klorogenska kiselina

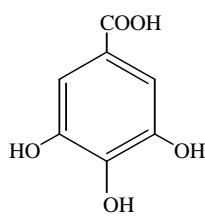
1.2.3. Trjeslovine

Trjeslovine su derivati fenola i fenilkarboksilnih kiselina. Mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine (63b):

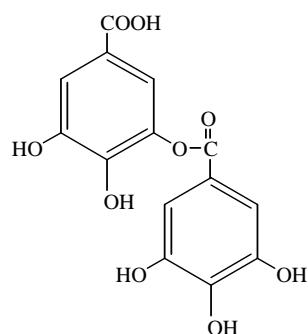
- 1) trjeslovine koje hidroliziraju (galotanini, elagnatanini);
- 2) kondenzirane trjeslovine (catehinske trjeslovine).

Trjeslovine koje hidroliziraju

Ta skupina trjeslovina obuhvaća dve podskupine: tanine i depside. Tanini su esteri galne kiseline, ili esterskih anhidrida više galnih kiselina sa šećerom. Pod depsidima se podrazumijevaju esterski vezane fenilkarboksilne kiseline. Česta su komponenta galotaninskih trjeslovina, a mogu se javljati i samostalno u drogi, nevezani na šećer.



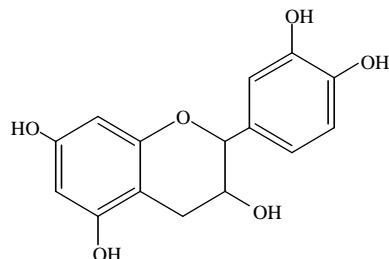
galna kiselina



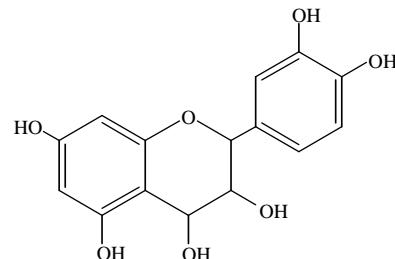
m-digalna kiselina

Kondenzirane trjeslovine (katehinske)

Katehinske trjeslovine su kondenzirani produkti katehina i leukoantocijanidina, bezbojnih, često kristaliničnih tvari, koje nemaju trjeslovinska svojstva. U slabo kiselom mediju staničnog soka odvija se polimerizacija katehina ili leukoantocijanidina, pri čemu nastaju visokomolekularni spojevi topljivi u vodi (catehinske trjeslovine). Taj se proces može zbivati posredstvom enzima, ali i neenzimskim putem. Tijekom skladištenja, jedan dio katehinskih trjeslovina kondenzacijom prelazi u produkte netopljive u vodi (flobafene).



katehin



leukoantocijanidin

1.2.3.1. Kvalitativna analiza trjeslovina

Kvalitativne reakcije na trjeslovine osnivaju se na prisutnosti fenolnih hidroksilnih skupina. Budući da u bilnjom organizmu postoji velik broj supstancija fenolnog karaktera, to je većina reakcija nespecifična, te se primjenjuju samo za orijentacijska ispitivanja (111).

Soli metala stvaraju s trjeslovinama taloge, obojenja ili obojenja i taloge. Taloženje olovo-acetatom nije kvantitativno jer se oslobađa octena kiselina u kojoj se olovo-tanati djelomice otapaju. Pri toj se reakciji takože i druge tvari netrjeslovinskog karaktera. Reakcija sa solima željeza također je nespecifična za trjeslovine. U prisutnosti trjeslovina koje hidroliziraju nastaje plavo obojenje. Istu reakciju daju vanilin, morfin i neke druge tvari. Za katehinske trjeslovine karakteristična je zelena boja, koja dodatkom natrij-acetata prelazi u ljubičastu. Amonij-željezo(III)-sulfat pogodniji je za izvođenje te reakcije od željezo(III)-klorida zbog manje kiselosti.

Jedan od najstarijih reagensa za dokazivanje trjeslovina je otopina želatine. Osjetljivost reakcije ovisi o pH-vrijednosti otopine. Optimum taloženja postiže se između pH 3,5 i 4,5.

Za razlikovanje trjeslovina koje hidroliziraju od kondenziranih trjeslovina mogu se primijeniti formaldehid i kloridna kiselina, te olovo-acetat, bromna voda i amonij-sulfat. Obradom spomenutim reagensima, kondenzirane trjeslovine se talože, a trjeslovine koje hidroliziraju ostaju u otopini. Filtriranjem se mogu odijeliti i zasebno dokazati.

1.2.3.2. Kvantitativna analiza trjeslovina

Trjeslovine se mogu odrediti različitim metodama: taloženjem solima teških metala, kolorimetrijskom analizom, biološkom metodom s glistama (*Enchytraeus albidus*), aglutinacijskom metodom s eritrocitima, taloženjem s kazeinom te metodom kožnog praška.

Kombinacijom različitih metoda, npr. taložne metode s aglutinacijskom ili kolorimetrijskom, nastoji se povećati reproducibilnost određivanja. Schneider je za određivanje količine trjeslovina upotrijebio kazein (112). Puferirana razrjeđenja ekstrakata droga daju nakon mućkanja s kazeinom veće vrijednosti u usporedbi s metodom kožnog praška. Istraživanja su pokazala da kazein veže i trjeslovine koje hidroliziraju i katehinske trjeslovine.

1.2.3.3. Biološki učinci trjeslovina

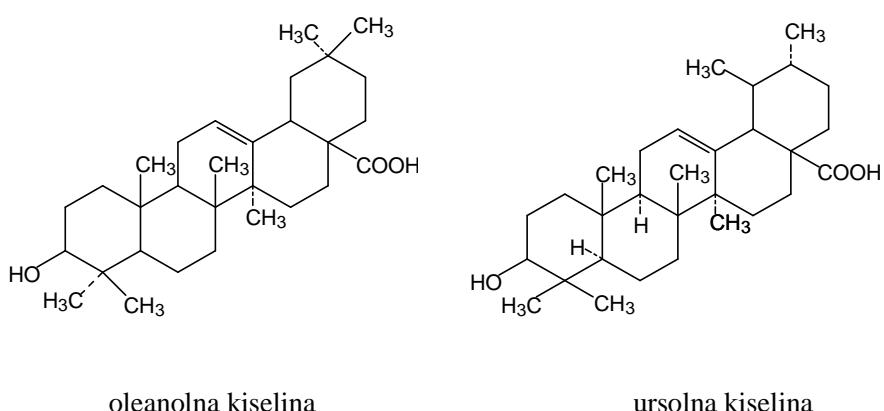
Fiziološko značenje trjeslovina prilično je nejasno. Smatralo se da njihov gorki i trpki okus štiti biljku od štetočina, što se kasnije pokazalo netočnim. Niti prepostavka da su trjeslovine pričuvne tvari nije se pokazala ispravnom, jer se rijetko nalaze u biljnim dijelovima koji služe kao spremnici pričuvnih tvari. No, sa sigurnošću se može ustvrditi da u nekih biljaka trjeslovine sudjeluju u tvarnoj izmjeni stvaranjem redoks-sustava. Također je dokazano da te tvari mogu djelovati na neke heterozide kao konzervansi (npr. na arbutin), jer inhibiraju β -glukozidazu, enzim koji cijepa spomenuti glikozid.

Primjena trjeslovina u terapiji, kao i u kožarskoj industriji, zasniva se na njihovom osnovnom zajedničkom svojstvu da s proteinima stvaraju netopljive ili teško topljive adicijske spojeve. Zbog sposobnosti tvorbe koagulacijskih membrana na sluznicama i ranama, tj. adstringirajućeg svojstva, rabe se u terapiji stomatitisa, angine, bronhitisa, hemoroida, manjih opeklina i ozeblina, crijevnog i želučanog katara te kao antidiijaroici. Budući da s alkaloidima i solima teških metala stvaraju taloge, primjenjuju se i kao antidoti (113).

1.2.4. Triterpeni

Triterpeni pripadaju velikoj skupini prirodnih spojeva koje nazivamo terpenima. Tu se ubrajaju svi prirodni spojevi koji imaju strukturu izoprena (2-metil-butadiena, C_5H_8) ili njegovih polimera. Struktura molekule terpena može biti alifatska ili ciklična. Prema broju izoprenskih jedinica mogu se svrstati u 7 skupina: semiterpeni (C_5), monoterpeni (C_{10}), seskviterpeni (C_{15}), diterpeni (C_{20}), triterpeni (C_{30}), tetraterpeni (C_{40}) i politerpeni (C_n). Semiterpen je izopentenil-pirofosfat iz kojega biosintezom nastaju terpenske tvari.

Triterpeni su široko rasprostranjeni prirodni spojevi koji se uglavnom javljaju u višem bilju, iako ih mogu sintetizirati i gljive. Najvažniji su triterpeni pentaciklične strukture, među koje spadaju i triterpenske kiseline, primjerice oleanolna i ursolna kiselina. Uglavnom ih sadrže sjemenjače, slobodne ili u glikozidnom obliku (114a).



1.2.4.1. Kvalitativna analiza triterpena

Triterpeni daju pozitivnu Liebermann-Burchardovu reakciju (s acetanhidridom i koncentriranom sulfatnom kiselinom daju zeleno obojenje).

Primjenom razvijača benzen-aceton, u volumnom omjeru 9:1, moguće je odijeliti triterpenske spojeve na tankom sloju adsorbensa. Detekcija se vrši klorsulfonskom kiselinom, uz zagrijavanje na 105 °C. Triterpeni se oboje intenzivno crvenoljubičasto (67).

1.2.4.2. Biološki učinci triterpena

Triterpeni i saponini iz biljnih izvora poznati su po svojim antineoplastičkim, anthelmintičkim, antiprotozoalnim i antivirallnim učincima, ali mogu izazvati i toksične reakcije u ljudi i ostalih sisavaca.

Ursolna kiselina, također poznata kao urson, prunol, mikromerol ili malol, pentaciklička je triterpenska supstancija često prisutna u biljnom svijetu (115, 116). Rijetko se javlja bez svog izomera, oleanolne kiseline, koja pokazuje sličnu farmakološku aktivnost. Utvrđena je medicinska djelotvornost njihove interne i topičke primjene: antitumorska (posebice na koži) (117-119), hepatoprotективna, protuupalna (oralna i topička) (120-122), antiulkusna, antimikrobna (123), antihiperlipemička i antiviralna (115). Ursolna i oleanolna kiselina također potiču rast kose i djeluju kao agensi protiv starenja kože (124, 125).

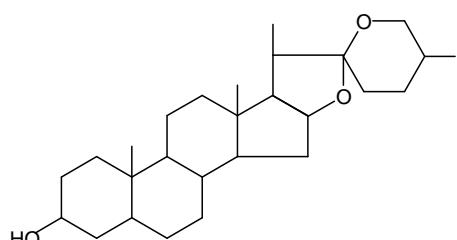
1.2.5. Saponini

Saponini su glikozidni spojevi široko rasprostranjeni u biljnom svijetu, ali ih stvaraju i neki drugi organizmi (npr. zvjezdače i trpovi) (45b). Imaju visoku moć pjenjenja (poput sapuna po kojima su i dobili ime), otrovni su za ribe i školjkaše, razaraju eritrocite, a sa sterolima u etanolu stvaraju teško topljive taloge. Sadržaj saponina u biljkama varira od 0,1 do 30%. Smješteni su u živim tkivima kao složena otopina brojnih, teško odjeljivih spojeva.

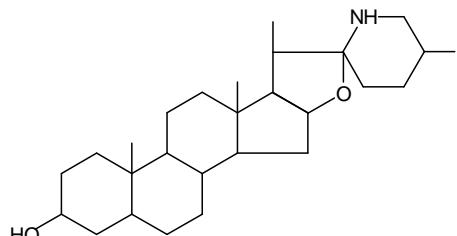
Saponini su građeni od aglikonskog dijela (sapogenina) i šećerne komponente. Aglikoni se mogu podijeliti u 3 skupine:

- a) spirostanolski sapogenini;
 - b) steroidno-alkaloidni sapogenini;
 - c) triterpenski sapogenini.

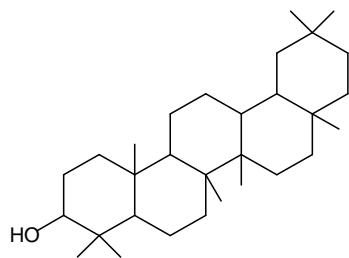
Svi tipovi aglikona u položaju C-3 imaju hidroksilnu skupinu na koju se veže šećerna komponenta. Ona može biti u obliku jednog šećernog lanca (monodezmozidi) ili dva lanca (bisdezmozidi; desmos_{grč.}=lanac), koji mogu biti manje ili više razgranjeni. Kao šećerne komponente, na aglikon se mogu vezati: glukoza, galaktoza, ksiloza, arabinoza, ramnoza, fukoza, riboza, te uronske kiseline (D-glukuronska i D-galakturonska kiselina) (63c).



a) spirostanolski sapogenin



b) steroidno-alkaloidni sapogenin



c) triterpenski sapogenin

Slika 3. Saponinski aglikoni

1.2.5.1. Kvalitativna analiza saponina

Test pjenjenja

Praškasta droga (oko 0,5 g) prelje se vrućom vodom i nakon hlađenja snažno izmućka. U prisutnosti saponina stvori se pjena visine 1 do 10 cm.

Test hemolize

Određena količina (obično 0,5 g) praškaste droge ekstrahira se s 50 ml vrućeg fosfatnog pufera, izotoničnog s krvi ($\text{pH} = 7,4$). Nakon hlađenja, iscrpina droge pomiješa se sa svježom, citiranim govedom krvi. U prisutnosti hemolitički aktivnih saponina, smjesa postaje bistra i prozirna. Svojstvo saponina da izazivaju hemolizu koristi se i za određivanje vrijednosti saponinskih droga.

Tankoslojna kromatografija

Ta se metoda primjenjuje za dokazivanje saponina i njihovo odjeljivanje iz smjese. Pri tome su uvjeti odvijanja postupka različiti za svaku drogu, ovisno o svojstvima saponina koji se odjeljuju. Neutralni saponini dobro se kromatografski odjeljuju primjenom razvijača kloroform-metanol-voda (64:50:10) ili (65:35:10) (32b). Bolje odjeljivanje kiselih saponina postiže se bazičnim smjesama otapala (npr. n-butanol-metanol-amonijak). Za detekciju se primjenjuju različiti reagensi za prskanje. Najčešće su to mineralne kiseline oksidirajućeg djelovanja. Njemačka farmakopeja (DAB 9) daje prednost anisaldehid-sulfatnoj kiselini. Saponinske zone oboje se modro, modroljubičasto, sivoljubičasto ili zeleno, ovisno o vrsti saponina. Koristi se i klorsulfonska kiselina, koja saponinske zone oboji ljubičasto. Svojstvo izazivanja hemolize također može poslužiti u svrhu detektiranja saponina odijeljenih tankoslojnom kromatografijom. Pritom se primjenjuje ploča prevučena otopinom krvi u želatini, koja nakon hlađenja očvsne i služi kao dobra stacionarna faza. Nakon razvijanja kromatograma, saponine je moguće odmah detektirati prema postojećim prozirnim mrljama nastalim hemolizom.

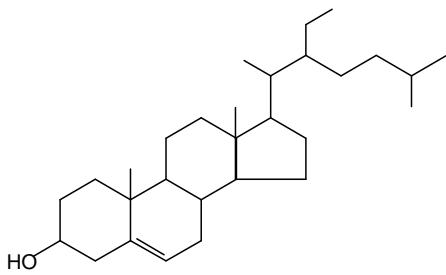
1.2.5.3. Biološki učinci saponina

Saponini djeluju ekspektorirajuće. Pomažu izbacivanju sluzi iz bronhijalnog sustava, povećanjem površinske aktivnosti i istjecanjem žilave sluzi, te lokalnim podraživanjem sluznica, što refleksno dovodi do pojačanog lučenja žljezda. Djelovanje saponina često je praćeno i osjećajem mučnine pa mogu izazvati i izbacivanje želučanog sadržaja. Diuretičko djelovanje saponina ostvaruje se osmotskim putem ili neposrednim podraživanjem bubrežnog epitela. Diuretični učinak saponina često je potpomognut djelovanjem flavonoida i eteričnih ulja. Neki saponini imaju sposobnost sprečavanja nastanka edema i njihova uklanjanja (antieksudativno i edem-protektivno djelovanje), te na taj način smanjuju početni stupanj upale (antiflogističko djelovanje). Saponinske droge takvog učinka upotrebljavaju se u liječenju varikoznih vena. Većina saponina pokazuje slab antibakterijski učinak, ali snažnu antimikotičku aktivnost. Steroidni saponini s četiri do pet šećera vrlo su djelotvorni protiv gljivica, dok triterpenski saponini imaju slabiju aktivnost, ali široki spektar djelovanja. Smatra se da te tvari štite biljku od mikroorganizama (64b).

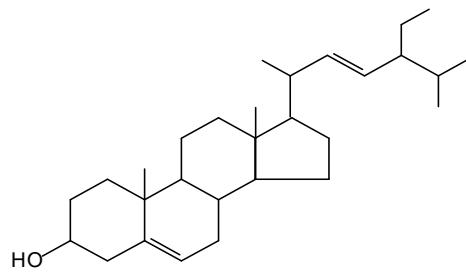
1.2.6. Steroli

Steroli su organski spojeva koji obično prate masti ili su sastavni dio molekule voskova. Kao i druge steroidne tvari, odvode se od ugljikovodika sterana (ciklopantanoperhidrofenantrena, $C_{17}H_{22}$). Steroli mogu biti animalnog podrijetla (zoosteroli) ili biljni (fitosteroli).

Najčešći steroli viših biljaka su sitosteroli. Dobivaju se iz ulja različitih sjemenaka (pšeničnih, ražovih, kukuruznih, pamučnih i dr.). Predstavljaju smjesu β -sitosterola (stigmast-5-en-3 β -ol; $C_{29}H_{50}O$) i nekih zasićenih sterola. Strukturno vrlo sličan β -sitosterolu je stigmasterol (63d).



β-sitosterol



stigmasterol

1.2.6.1. Kvalitativna analiza sterola

Steroli daju pozitivnu Liebermann-Burchardovu reakciju, a s digitoninom stvaraju kristalinične spojeve. Prvu reakciju mogu dati i neki drugi spojevi (npr. triterpeni), dok se stvaranje spoja s digitoninom zasniva na prisutnosti OH-skupine u položaju 3 i CH₃-radikala u položaju 10 sterolne jezgre.

Prisutnost sterola u pojedinim biljnim dijelovima može se utvrditi primjenom tankoslojne kromatografije. Ekstrakt droge (petroleterski ili metanolni) nanese se na kromatografsku ploču i razvija u sustavu otapala benzen-aceton (9:1). Nakon sušenja, ploča se prska klorsulfonskom kiselinom i zagrijava nekoliko minuta na 105 °C. Na pločama se javljaju ljubičastoplava obojenja sterolnih spojeva (126).

1.2.6.2. Biološki učinci sterola

Sitosteroli djeluju hipokolesterolemički i primjenjuju se u liječenju ateroskleroze. Slabo se apsorbiraju i natječu s kolesterolom za apsorpcijska mjesta u probavnom traktu. Smanjena apsorpcija kolesterola može rezultirati smanjenjem razine β-lipoproteina u krvi, te tako spriječiti odlaganje aterosklerotičnih naslaga u krvnim žilama.

Uloga sterola u biljkama još nije u potpunosti poznata, dok u animalnom metabolizmu sudjeluju kao hormoni, koenzimi, žučne kiseline i provitamin D. Neki animalni steroidi također snažno utječu na rast biljaka, pa se smatra da bi takvu ulogu mogli imati i još nepoznati biljni steroli (114b).

1.2.7. Rezultati dosadašnjih istraživanja vrsta roda *Plantago* L.

Osim aukubina i katalpola, iz vrsta roda *Plantago* L. izolirano je više od dvadeset iridoidnih spojeva koji imaju važnu ulogu u biljnoj sistematici. Podrod *Plantago* karakterizira prisutnost iridoidnog glikozida aukubina, dok podrod *Psyllium* sadrži bartsiozid, što ukazuje na njihovu znatnu biokemijsku različitost. Epoksidni derivat aukubina, katalpol, svojstven je nekim sekcijama podroda *Plantago*. Asperulozid je izoliran iz vrsta *P. major* L. i *P. lanceolata* L. Melitozid je iridoidni diglikozid koji se javlja u porodici *Plantaginaceae* (127). Genipozidnu kiselinu sadrže istočnoazijske vrste roda *Plantago*, *P. japonica* Franchet et Savat. i *P. asiatica* L., te vrsta *P. alpina* L. (128). Plantarenalozid (yuheinozid), slično kao bartsiozid, ne pojavljuje se u svojstama podroda *Plantago*, dok je prisutan u vrstama podroda *Psyllium* (23). Iz vrsta roda *Plantago* izolirani su i neki novi iridoidni glikozidi: 10-acetoksimajorozid (*P. major*, *P. cornuti*) (129), hokeriozid (130) 10-o-acetylgenipozidna kiselina i alpinozid (*P. alpina*), te deacetilhokeriozid (*P. altissima*) (128).

Dokazano je da se različiti biljni dijelovi kvalitativno i kvantitativno razlikuju sadržajem iridoida. Primjerice, aukubin i katalpol se javljaju u svim biljnim organima, ali prvi većinom u vegetativnim, a drugi u generativnim. Sjemenke sadrže samo male količine iridoida. Nadzemni dijelovi vrste *P. asiatica* sadrže više aukubina od podzemnih, a mlado lišće više od starijega. Utvrđeno je da je sadržaj aukubina i katalpola u vrste *P. lanceolata* genetički određen, a ovisan je i o starosti listova (20).

U nekim vrstama roda *Plantago* utvrđena je prisutnost flavonoidnih glikozida u čijoj se strukturi najčešće nalaze aglikoni: apigenin, luteolin, krizoeriol, tricin, hispidulin, nepetin, 5,6,7,3'-tetrahidroksi-4'-metoksiflavon i izoramnetin (131).

Saponini su slabo istraženi u rodu *Plantago*. Dokazana je njihova prisutnost u vrsti *P. lanceolata* (31).

Literurni podaci govore o prisutnosti sterola u vrsti *P. bismarckii* (132).

U nekih je vrsta roda *Plantago* dokazana prisutnost polifenola (*P. lanceolata*, *P. hookeriana*, *P. myosuros*), kumarina (*P. lanceolata*), sluzi (*P. lanceolata*, *P. psyllium*, *P. ovata*), eteričnog ulja (*P. lanceolata*), gorkih tvari (*P. lanceolata*), te vitamina A, C i K (*P. lanceolata*) (130, 133).

Utvrđeno je da vrsta *P. lanceolata* djeluje protuupalno, antimikrobnog i hepatoprotektivno, te kao antitusik, ekspektorans i adstringens (2, 4), a vrsta *P. major* diuretično i protuupalno (3). Dokazan je laksativni učinak vrste *P. ovata* (9). Također je znanstveno potvrđeno da vrsta *P. psyllium* djeluje hipoglikemijski i laksativno, te da smanjuje količinu kolesterola i plazmatskih lipida (5-8).

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. BILJNI MATERIJAL

Istraživanju su podvrgnuti na zraku osušeni nadzemni dijelovi vrsta roda *Plantago* L. koje rastu na području zapadnog dijela Hrvatske. Biljni materijal je skupljen u lipnju godine 2000. u dolini rijeke Mirne (*Plantago altissima* L.), na području Gornjeg Jelenja (*Plantago argentea* Chaix i *Plantago holosteum* Scop. subsp. *holosteum*), u Medulinu (*Plantago coronopus* L., *Plantago maritima* L. i *Plantago lagopus* L.), između Vodnjana i Bala (*Plantago holosteum* Scop. subsp. *depauperata*), te na području lošinjske strane Osora (*Plantago holosteum* Scop. subsp. *scopulorum*).

Identifikacija biljnog materijala i utvrđivanje morfoloških obilježja navedenih biljnih vrsta provedeni su usporedbom s dostupnim literaturnim podacima (12, 14, 15, 134), u suradnji sa Zavodom za farmaceutsku botaniku Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

2.2. APARATURA I REAGENSI

Aparati i pribor

- » svjetlosni mikroskop Carl Zeiss, Jena;
- » svjetlosni mikroskop Olympus System (model BX 50), povezan s kamerom i računalom;
- » ultraljubičasta lampa (Camag, Muttenz);
- » UV/VIS spektrofotometar Agilent 8453 E (Hewlett Packard, Germany);
- » PC-HP 845x UV-Visible System (Hewlett-Packard, Germany);
- » ^3D CE sustav za kapilarnu elektroforezu, opremljen UV/VIS DA-detektorom (*diode array detector*) (Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA);
- » kvarcne kapilare (*fused silica capillary*) za kapilarну elektroforezu Composite Metal Services (The Chase, Hallow, UK).
- » Waters sterilni filtri, veličine pora 0,20 i 0,45 μm ;
- » aparat za destilaciju i deionizaciju vode, Clear instrument (SG, Hamburg, Germany);
- » HPLC instrument, Agilent 1100 Series Liquid Chromatograph, opremljen binarnom pumpom, vakuum-degazerom, termostatiranim automatskim injektorom, komorom za termostatiranje kolone i UV/VIS DA-detektorom (Agilent, USA);
- » LC-3D Chem Station Version 8, sustav za prikupljanje i obradu podataka (Agilent, USA);
- » HPLC kolona, Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm × 4,6 mm i.d., veličina čestica punila 5 μm), s pretkolonom istog tipa punila (Agilent, USA);

Reagensi i standardi

- aceton (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska);
- acetonitril (Merck, Darmstadt, Germany);
- aluminij-klorid heksahidrat (Kemika);
- benzidin (Merck);
- dietil-eter (Kemika);
- etanol (Kemika);
- etilacetat (Kemika);
- etilmetylketon (Merck);
- Folin-Ciocalteusov fenolni reagens (Merck);
- heksametilentetramin (Kemika);
- kazein (Merck);
- kloridna kiselina (Kemika);
- kloroform (Kemika);
- klorsulfonska kiselina (Merck);
- metanol (Kemika);
- mravlja kiselina (Kemika);
- natrij-dodecil-sulfat (Merck);
- natrij-hidroksid (Kemika);
- natrij-tetraborat dekahidrat (Kemika);
- Naturstoff-reagens (Fluka, Buchs, Switzerland);
- octena kiselina (Kemika);
- polietilenglikol 4000 (Fluka);
- n-propanol (Kemika);
- standardne supstancije: aukubin (Phytoplan, Heidelberg, Germany); katalpol (donacija: dr. Søren Rosendal Jensen, Technical University, Lyngby, Denmark); kvercetin (Roth, Karlsruhe, Germany); rutin (Roth); hiperozid (Roth); izokvercitrin (Roth); kvercitrin (Roth); klorogenska kiselina (Fluka), izoklorogenska kiselina (Fluka), kavena kiselina (Roth);
- toluen (Kemika);
- trifluorocetna kiselina (Merck);
- triklorocetna kiselina (Merck).

2.3. METODE I POSTUPCI ISTRAŽIVANJA

2.3.1. Morfološko-anatomska istraživanja

U istraživanju mikromorfoloških i anatomskih obilježja vrsta roda *Plantago* L. primijenjena je metoda mikroskopije.

Polutrajni mikroskopski preparati pripremljeni su uklapanjem ručno izrađenih poprečnih i površinskih prereza listova i stabljika istraživanih biljnih vrsta u kap glicerola na objektnom staklu, zaštićeni pokrovnim stakalcem, te kratko zagrijani na plamenu. Anatomski elementi promatrani su pod binokularnim svjetlosnim mikroskopom, uz kompjutorsku obradu slike.

2.3.2. Histokemijske reakcije

Poprečni ili površinski prerezi listova i stabljika vrsta roda *Plantago* L. ili prašci biljnih droga uklopljeni su u kap reagensa na objektnom staklu ili je reagens dodavan drogi. Preparat je zaštićen pokrovnim stakalcem i rekcija promatrana pod svjetlosnim mikroskopom. Histokemijskom analizom (135, 136) obuhvaćeni su sljedeći biološki aktivni spojevi i pričuvne tvari:

- a) eterično ulje (reakcija sa sudanom III);
- b) trjeslovine (reakcija s otopinom željezo(III)-klorida);
- c) sluzi (15 minuta nakon dodavanja otopine metilenplavila, preparat se ispire 50%-nim etanolom);
- d) glikozidi (reakcija s 80%-tnom sulfatnom kiselinom);
- e) antrakinoni (reakcija s etanolnim kalij-hidroksidom);
- f) saponini (reakcija s krvnom želatinom);
- g) alkaloidi (reakcija s vanilinom i koncentriranom sulfatnom kiselinom);
- h) monosaharidi (reakcija s Fehlingovim reagensom uz zagrijavanje; reakcija s fenilhidrazin-natrij-acetatom uz grijanje 30 sekundi);
- i) škrob (reakcija s jodom);

- j) inulin (reakcija s α -naftolom i koncentriranom sulfatnom kiselinom; reakcija s apsolutnim etanolom);
- k) proteini (reakcija s koncentriranom nitratnom kiselinom);
- l) masti (20 minuta nakon dodatka reagensa sudana III, preparat se ispere 50%-tним etanolom i doda kap glicerola).

2.3.3. Iridoidi

2.3.3.1. Kvalitativna analiza iridoida

- a) Ekstrakcija 1 g listova samljevenih u prah provedena je s 20 mL metanola na vodenoj kupelji uz povratno hladilo 10 minuta. Nakon filtriranja, ekstrakt je uparen do suha na rotacijskom vakuum-uparivaču. Suhi je ostatak zagrijavan u 20 mL vode, 10 minuta na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Ekstrakt je profiltriran i ekstrahiran tri puta s po 10 mL etera, a zatim dva puta s po 10 mL etilacetata. Nakon dodatka 2 g bezvodnog natrij-sulfata, etilacetatna frakcija je profiltrirana i uparena do suha na rotacijskom vakuum-uparivaču, a ostatak otopljen u 1 mL metanola. 10 μ L metanolne otopine naneseno je kapilarom na staklenu ploču s adsorbensom Kieselgel 60 F₂₅₄. Odjeljivanje supstancija postignuto je razvijačem etilacetat-etilmekton-mravlja kiselina-voda 5:3:1:1, V/V. Dobiveni kromatogram promatran je pod UV svjetлом, na 365 nm. (31).
- b) Listovi samljeveni u prah (1 g) ekstrahirani su 10 minuta s 10 mL metanola na vodenoj kupelji (60 °C). Iridoidi su odijeljeni na tankom sloju Kieselgela 60 F₂₅₄, uz razvijače etilacetat-etilmekton-mravlja kiselina-voda (5:3:1:1, V/V), etilacetat-mravlja kiselina-ledena octena kiselina-voda (100:11:11:27, V/V) te etilacetat-mravlja kiselina-voda (8:1:1, V/V). Detekcija je provedena prskanjem s 0,5%-tnom otopinom kloridne kiseline. Također je primijenjen razvijač propanol-toluen-ledena octena kiselina-voda (25:20:10:10, V/V), a detekcija izvršena prskanjem benzidin reagensom (32a).

2.3.3.2. Karakterizacija iridoida metodom micelarne elektrokinetičke kromatografije (MEKC)

Ekstrakcija droge

Izvagano je po 200 mg sitno mljevenih listova svih biljnih uzoraka, preliveno s 10 mL destilirane vode i ostavljeno 40 minuta na sobnoj temperaturi, uz povremeno miješanje. Potom je smjesa zagrijavana 60 minuta u vodenoj kupelji na 100 °C. Nakon hlađenja i filtriranja, voden je ekstrakt uparen do suha, a suhi ostatak otopljen u 3 mL vode. Otopina je prenesena u mali lijevak za odjeljivanje te izmućkana tri puta s po 3 mL dietil-etera. Voden sloj nadopunjeno je vodom do 4 mL (19).

MEKC analiza

Kvantitativna analiza vodenih ekstrakata provedena je primjenom ^{3D}CE Hewlett-Packard kapilarnog elektroforetičkog sustava, opremljenog UV/VIS DA-detektorom. Uvjeti rada:

U analizi su korištene kvarcene kapilare, ukupne duljine 35 cm, a efektivne duljine 26,5 cm (duljina od ulaznog dijela kapilare do detektora). Unutarnji promjer kapilare iznosio je 50 µm, a vanjski 375 µm. Najpovoljniji uvjeti za odjeljivanje i određivanje iridoida uključuju elektrolit sastavljen od 50 mM boratnog pufera i 180 mM natrij-dodecil-sulfata (pH-vrijednost podešena je na 9,35 s 1 M NaOH), valne duljine 200 ± 2 nm i 250 ± 30 nm (referentna valna duljina), napon 10 kV, jakost struje 80 µA, injektiranje 50 mbar × 5 s i temperaturu CE kasete od 25 °C. Predobrada kapilare provedena je ispiranjem elektrolitom 3 minute, a nakon šest uzastopnih analiza provedeno je kondicioniranje kapilare. Ono je uključivalo 10 minuta ispiranja kapilare s 0,1 M NaOH, 20 minuta ispiranja elektrolitom i 15 minuta slijepog pokusa (*blank run*, *electrophoretic run* = elektroforeza elektrolita). Za uzastopnu analizu većeg broja uzoraka primijenjen je sustav kontinuirane izmjene elektrolita (*replenishment*).

Otopine standarda:

Izvagani standardi iridoidnih glikozida otopljeni su u vodi. Kako bi se povećala točnost analitičke metode, pripremljene su dvije koncentracije katalpola (0,05 i 0,07 mg/mL) i tri koncentracije aukubina (0,05, 0,075 i 0,1 mg/mL). Prije analize, sve otopine standarda i uzoraka profiltrirane su kroz sterilne filtre veličine pora 0,20 µm. Vrsta *P. lanceolata* korištena je kao referentni uzorak.

2.3.4. Flavonoidi

2.3.4.1. Kvalitativna analiza flavonoida

Listovi samljeveni u prah (1 g) ekstrahirani su s 10 mL metanola, 10 minuta na vodenoj kupelji (60 °C). Ispitivanje prisutnosti flavonoida provedeno je na tankom sloju Kieselgela 60 F₂₅₄, uz razvijače etilacetat-mravlja kiselina-voda (8:1:1, V/V) i etilacetat-mravlja kiselina-ledena octena kiselina-voda (100:11:11:27, V/V). Nakon prskanja Naturstoff-reagensom i 5%-tnom etanolnom otopinom polietilenglikola 4000 (NST/PEG), kromatogrami su promatrani pod UV svjetлом na 365 nm (32c). Naturstoff-reagens pripremljen je otapanjem 1 g β-etilaminoestera difenilboratne kiseline u 100 mL metanola.

2.3.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida

Količina ukupnih flavonoida u nadzemnim dijelovima istraživanih biljnih uzoraka određena je spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru (70).

Listovi, stabljike i cvatovi u obliku finog praška (0,2 g) pojedinačno su ekstrahirani 30 minuta s 20 mL acetona, 2 mL 25%-tne kloridne kiseline i 1 mL 0,5%-tne otopine heksametilentetramina, zagrijavanjem do vrenja na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Hidrolizat je propušten kroz vatu, a ostaci droge na vati ponovo su ekstrahirani s 20 mL acetona, grijanjem do vrenja 10 minuta. Ta je otopina također propuštena kroz vatu, a prethodno opisana ekstrakcija acetonom ponovljena je dva puta. Sjedinjeni filtrati razrijeđeni su acetonom do 100 mL. 20 mL hidrolizata pomiješano je s 20 mL vode, a zatim ekstrahirano najprije s 15 mL, te tri puta s po 10 mL etilacetata. Sjedinjene etilacetatne faze isprane su dva puta s po 40 mL vode, propuštene kroz vatu i razrijeđene etilacetatom do 50 mL. Po 10 mL te otopine preneseno je u dvije odmjerne tikvice od 25 mL. U svaku je tikvicu dodano 0,5 mL 0,5%-tne vodene otopine natrij-citrata. U jednu tikvicu dodano je još 2 mL otopine aluminij-klorida (2 g aluminij-klorida heksahidrata otopljeno je u 100 mL 5%-tne metanolne otopine octene kiseline). Potom su obje tikvice

dopunjene do 25 mL 5%-tnom metanolnom otopinom octene kiseline. Nakon 45 minuta, izmjerene su apsorbancije otopina s aluminij-kloridom, u sloju debljine 1 cm, na 425 nm. Slijepi pokus bila je prethodno pripremljena otopina bez aluminij-klorida. Maseni udio flavonoida izračunat je kao kvercetin, prema izrazu:

$$\% = A \times 0,772 / b \quad (A = \text{apsorbancija}; b = \text{masa droge izražena u g}).$$

2.3.4.3. Karakterizacija flavonoida metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Ekstrakcija droge

Izvagano je 500 mg praškaste biljne droge i preneseno u odmjernu tikvicu od 25 mL. Zatim je dodano oko 20 mL smjese metanola i vode (1:1, V/V) i ostavljeno 60 minuta u ultrazvučnoj kupelji. Tikvica je do 25 mL nadopunjena istom smjesom metanola i vode te sadržaj dobro promućkan. Nakon filtriranja kroz filtre veličine pora 0,45 μm , alikvot uzorka za analizu prenesen je u bočicu za HPLC.

Otopine standarda

Flavonoidne standardne supstancije (kvercetin, rutin, hiperozid, izokvercitrin i kvercitrin), iridoidni glikozid aukubin, te fenolne kiseline (klorogenska i kavena kiselina) otopljljene su pojedinačno u smjesi metanola i vode (1:1, V/V), u koncentraciji 0,1 mg/mL (osnovne otopine standarda). Radni standardi, koncentracije 0,01 mg/mL, pripremljeni su iz osnovnih otopina standarda. Također je priređena smjesa standarda, razrjeđivanjem osnovnih otopina standarda istom smjesom otapala, konačne koncentracije pojedinog standarda 0,01 mg/mL.

HPLC analiza

Uzorci su analizirani Agilent 1100 Series HPLC sustavom, koji je opremljen binarnom pumpom, vakuum-degazerom, termostatiranim automatskim injektorom, komorom za termostatiranje kolone i UV/VIS DA-detektorm, Reverzno-fazna separacija provedena je pri temperaturi od 30 °C, na koloni Zorbax Eclipse XDB-C₁₈, duljine 250 mm, unutarnjeg promjera 4,6 mm, s punilom veličine čestica 5 μm i pretkolonom istog tipa punila.

U HPLC analizi primijenjena je gradijentna metoda, mijenjanjem udjela pojedinih sastavnica mobilne faze tijekom kromatografskog odjeljivanja. Mobilna faza je uključivala dvije komponente: otapalo A (voda, pH-vrijednosti podešene na 2,50 dodatkom trifluoroctene kiseline, TFA) i otapalo B (acetonitril). Na početku analize udio acetonitrila iznosio je 15%, te se postupno povećavao na 22,5% (15. min), sve do 40% (20. min) i u tom se udjelu zadržao do 30. minute analize. U sljedećih 5 minuta postupno su uspostavljeni početni uvjeti analize. Injektirano je po 25 µL otopina standarda i biljnih uzoraka. Protok mobilne faze bio je 1,0 mL/min. Pikovi odijeljenih flavonoidnih supstancija i fenolnih kiselina detektirani su na valnoj duljini od 365 ± 8 nm, a iridoidni glikozid aukubin na 204 ± 4 nm. Referentna valna duljina iznosila je 550 ± 80 nm.

2.3.5. Trjeslovine

2.3.5.1. Kvalitativna analiza trjeslovina

Priprava ekstrakta

0,5 g u prah samljevenih nadzemnih biljnih dijelova analiziranih vrsta ekstrahirano je 15 minuta s 50 mL destilirane vode, u tirkici s povratnim hladilom, u kipućoj vodenoj kupelji. Ohlađeni ekstrakti su profiltrirani.

Opće reakcije s metalnim solima i želatinom

1. Dvije kapi 5%-tne otopine željezo(III)-klorida dodane su u 2 mL filtrata.
2. U 2 mL filtrata dodane su 2-3 kapi 1%-tne otopine željezo(III)-amonij-sulfata.
3. 0,5 mL 10%-tne otopine olovo-acetata dodano je u 5 mL filtrata.
4. U 2 mL filtrata dodano je 2 mL 1%-tne otopine želatine.

Dokazivanje kondenziranih trjeslovina

U 6 mL ekstrakta droge dodane su 3 kapi otopine formaldehida i 6 kapi 10%-tne kloridne kiseline. Sadržaj je ugrijan do vrenja, a nakon hlađenja profiltriran. Potom je filter-papir ispran s 1 mL tople vode. Dokaz kondenziranih trjeslovina predstavlja talog na filter-papiru koji je netopljiv u toploj 5%-tnoj otopini kalij-hidroksida.

Dokazivanje trjeslovina koje hidroliziraju

U 5 mL filtrata, koji je dobiven u prethodnoj reakciji taloženja kondenziranih trjeslovina s formaldehidom i kloridnom kiselinom, dodan je 1 g natrij-acetata (bez potresivanja epruvete), a zatim 1 mL 1%-tne otopine željezo(III)-amonij-sulfata. U prisutnosti trjeslovina koje hidroliziraju javlja se ljubičasti prsten na mjestu prikladnog pH.

2.3.5.2. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina

Količina ukupnih flavonoida u nadzemnim dijelovima istraživanih biljnih uzoraka određena je spektrofotometrijskom metodom prema Schneideru (112).

0,25 g fino usitnjene droge (listovi, stabljike i cvatovi) ekstrahirano je s 80 mL 30%-tnog metanola u tikvici s povratnim hladilom, zagrijavanjem na kipućoj vodenoj kupelji oko 15 minuta. Nakon hlađenja, iscrpna je profiltrirana u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopunjena do oznake 30%-tним metanolom. 2 mL filtrata pomiješano je s 8 mL destilirane vode i 10 mL otopine natrij-acetata (1,92 g natrij-acetata trihydrata i 0,34 mL octene kiseline pomiješano je i nadopunjeno destiliranom vodom do 100 mL). Pufer-otopina održava stalnu pH-vrijednost medija ($\text{pH}=5$), koja je optimalna za taloženje trjeslovina. Otopina dobivena na opisani način označena je kao *otopina 1*. 10 mL *otopine 1* mučkano je s 50 mg kazeina na mučkalici 45 minuta. Potom je otopina profiltrirana, a dobiveni je filtrat predstavlja *otopinu 2*.

Po 1 mL *otopine 1* i *otopine 2* pomiješano je u odmjernim tikvicama od 10 mL s po 0,5 mL Folin-Ciocalteusova reagensa i nadopunjeno do oznake s 33%-tnom otopinom natrij-karbonata dekahidrata (Folin-Ciocalteusov fenolni reagens sadrži natrij-volframat, natrij-molibdat, destiliranu vodu, 85%-tnu fosfatnu kiselinu, 36%-tnu kloridnu kiselinu, litij-sulfat i brom). Apsorbancije dobivenih plavih otopina izmjerene su na 720 nm, uz destiliranu vodu kao slijepi pokus. Vrijednost koju daje *otopina 1* odgovara količini ukupnih polifenola, dok razlika vrijednosti dobivenih za *otopinu 1* i *otopinu 2* predstavlja količinu trjeslovina vezanih na kazein.

Za izračunavanje koncentracije trjeslovina izrađen je baždarni pravac. U tu je svrhu 10 mg tanina (*Acidum tannicum*) osušeno na 80 °C i otopljeno u 100 mL destilirane vode (osnovna otopina standarda). Radni standard pripremljen je miješanjem 5 mL osnovne otopine standarda

i 5 mL pufer-otopine. Koncentracijski niz, dobiven razrjeđivanjem volumena od 0,2 do 1,2 mL radnog standarda do 10 mL pufer-otopinom (što odgovara koncentraciji trjeslovina od 0,001 do 0,006 mg/mL), daje linearni porast apsorbancije.

Za izmjerene vrijednosti apsorbancija *otopine 1* i 2 očitaju se pripadajuće koncentracije iz baždarnog dijagrama i izraze kao grami ukupnih polifenola, odnosno trjeslovina, na 100 g droge (%).

2.3.6. Saponini i triterpeni

2.3.6.1. Kvalitativna analiza saponina i triterpena

Metanolni ekstrakti listova pripremljeni su ekstrakcijom 1 g pulveriziranih listova s 10 mL 70%-tnog metanola, na vodenoj kupelji, uz povratno hladilo, u trajanju od 30 minuta. Bistri filtrat uparen je do suha, a ostatak otopljen u malo metanola. 20 µL metanolne otopine naneseno je na tanki sloj adsorbensa Kieselgela 60 F₂₅₄. Odjeljivanje supstancija postignuto je pomoću razvijača kloroform-metanol-voda 64:50:10 (V/V), a njihova detekcija provedena je prskanjem kromatograma reagensom i zagrijavanjem na 105 °C. Reagens je pripremljen miješanjem 5 mL klorsulfonske kiseline s 10 mL ledene octene kiseline, uz oprezno hlađenje (32b).

2.3.7. Steroli i triterpenske kiseline

2.3.7.1. Kvalitativna analiza sterola i triterpenskih kiselina

Metanolni ekstrakti listova, pripremljeni prethodno opisanim postupkom ekstrakcije saponina (poglavlje 2.3.6.1.), podvrgnuti su kromatografskom odjeljivanju na tankom sloju. Primijenjen je adsorbens Kieselgel 60 F₂₅₄ i razvijač benzen-aceton u omjeru 9:1 (V/V). Detekcija sterola i triterpenskih kiselina provedena je prskanjem kromatograma klorsulfonskom kiselinom, uz zagrijavanje nekoliko minuta na 105 °C (126).

2.3.8. Prosudba postupka određivanja trjeslovina primjenom programskog paketa ESKULAP

Programski paket ESKULAP predstavlja kompjutorski program za elektroničku obradu standardiziranih mjernih podataka i predstavlja sustav za optimiranje i prosudbu laboratorijskih metoda i analitičkih postupaka.

Temelj standardizirane obrade, kako je predložio Gottschalk (137-142), jest blok od 24 podatka, koji su poredani u standardiziranom obliku u 6 skupina, a svaka obuhvaća po četiri podatka. Taj koncept je informativan i jednostavan, a sadrži stalnu opću shemu mjerena. Matematičko-statističkom analizom procjenjuje se kakvoća podataka i metrološke karakteristike istraživanog analitičkog sustava. Postupak su usavršili V. Grdinić i suradnici i primijenili ga na neke analitičke sustave (143-145).

U postupku prosudbe spektrofotometrijskog određivanja trjeslovina metodom prema Schneideru (112), analit predstavlja tanin. Osnovni eksperimentalni parametri za analitički sustav dani su tablicama 2 i 3. Za svaku količinu tvari usporedno su provedene i slijepo prosudbe. Korigirana vrijednost apsorbancije analita dobije se iz razlike izmjerene apsorbancije analita i pripadajuće vrijednosti apsorbancije koja potječe od slijepog pokusa.

Tablica 2. Priprema uzorka za mjerjenje

Postupak pripreme uzorka

-
- 1 10 mg tanina otopi se u 100 mL vode
 - 2 5 mL standardne otopine pomiješa se s 5 mL acetatnog pufera
 - 3 razrjeđivanjem se pripreme otopine analita određene koncentracije (tablica 4)
 - 4 u otopinu analita doda se 0,5 mL Folin-Ciocalteusova reagensa i nadopuni do 10 mL s 33% Na_2CO_3
 - 5 mjeri se apsorbancija nastalog obojenja na 720 nm
 - 6 slijepi uzorci pripreme se na isti način (1-5), ali bez analita (tanin)
-

Tablica 3. Analitički i instrumentalni parametri

Radni parametri

Analitički

analit	tanin
radno područje (μg)	50,0 - 5,0
reagens	Folin-Ciocalteus
ukupni volumen (mL)	10,0
matrica	nema

Instrumentalni

metoda	spektrometrija u otopini
instrument	UV/VIS spektrofotometar
valna duljina	720 nm
signal, informacija	apsorbancija, srednja vrijednost tri mjerena
kivete ($d = 1 \text{ cm}$)	kvarcene
radna temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	22-23

Model standardiziranog kvantitativnog analitičkog postupka prikazan je tablicom 4. Statistička analiza opisana je u grupama koje obuhvaćaju prethodna ispitivanja za obradu podataka, ispitivanja varijabilnosti rezultata s prepoznavanjem bjegunaca, postavljanje kalibracijske i procjenske analitičke funkcije, te granične vrijednosti postupka.

Tablica 4. Model standardiziranog analitičkog postupka

Mjerenja

tip mjerenja	apsorbancija ispitivane otopine (A_x) apsorbancija slijepih prosudbi (A_B)
broj analitičke skupine	$J = 1 - 6$
broj pojedinačnih mjerenja	$L = 4, i = 1, 2, 3, 4$
ukupni broj mjerenja	$N = 24$
radno područje analita (μg)	$1,0 \cdot 50 = 50$, gornja granica analita, $(n_a)_g$ $0,8 \cdot 50 = 40$ $0,6 \cdot 50 = 30$ $0,4 \cdot 50 = 20$ $0,2 \cdot 50 = 10$ $0,1 \cdot 20 = 5$, donja granica analita, $(n_a)_d$
redoslijed mjerenja po skupinama	1, 6, 2, 5, 3, 4

Matematičko-statistička obrada podataka

- prethodno ispitivanje graničnih skupina 1 i 6
 - ispitivanje homogenosti podataka
 - postavljanje kalibracijske funkcije
 - postavljanje procjenske analitičke funkcije
 - prepoznavanje bjegunaca
 - izračunavanje graničnih vrijednosti postupka
-

Realizacija linearne kalibracijske funkcije važan je zahtjev za primjenu standardnog postupka.

2.3.9. Analiza fitokemijskih rezultata metodom multivariatne statistike

Eksperimentalno dobiveni rezultati kvantitativne karakterizacije iridoida, flavonoida i fenolnih kiselina vrsta roda *Plantago* L. obradeni su metodom multivariatne statistike – "cluster" analizom.

"Cluster" analiza obuhvaća veći broj tehnika za grupiranje primarno neklasificiranih objekata – OUT-a (*operational taxonomic unit*). Svrha njezine primjene u taksonomiji svodi se na otkrivanje *a priori* nepoznate strukture podataka, odnosno međusobnog odnosa OUT-a ili skupine OUT-a. Ulazna informacija za neku od "cluster" tehnika (hijerarhijska, optimizacijska, tehnika traženja gustoće, "clumping" tehnika i dr.) jest matrica sličnosti, udaljenosti ili korelacije. Krajnji rezultat te analize uglavnom se prikazuje dendrogramom (također fenogramom).

U taksonomiji se najčešće primjenjuju hijerarhijske aglomerativne tehnike SAHN (*sequential agglomerative hierachic nonoverlapping clustering methods*), u kojima jedan OUT ili skupina OUT-a mogu biti istovremeno pripojeni drugom OUT-u ili skupini. Takve se tehnike zovu metode "parnih grupa" (*pair-group methods*). Svaki korak u postupku prate dva razmatranja: preračunavanje koeficijenta sličnosti ili udaljenosti između novostvorene skupine i potencijalnih kandidata za daljnja spajanja, te kriterij pripajanja dalnjih članova u već postojeću skupinu (146).

Primjenom UPGMA metode (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*), koja se najčešće koristi u hijerarhijskoj "cluster" analizi, obradeni su eksperimentalni fitokemijski podaci, a rezultat je prikazan dendrogramom. Svi su postupci provedeni programom NTSYS-pc ver. 2.1 (147).

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. REZULTATI MORFOLOŠKIH ISTRAŽIVANJA

Utvrđena su morfološka obilježja istraživanih vrsta roda *Plantago* L. iz zapadnog dijela Hrvatske. Potvrđena je vjerodostojnost prethodno provedene identifikacije sabranog biljnog materijala prema dostupnim literurnim podacima (12, 14, 15, 134), a zabilježene manje morfološke različitosti mogu se pripisati ekološkim čimbenicima.

***Plantago altissima* L.**

- trajnica visine do 1 m;
- podanak kratak i debeo;
- listovi uspravni, lancetasti, dugi do 40 cm;
- klasasti cvatovi široki i kratki.

***Plantago argentea* Chaix**

- trajnica visine do 50 cm;
- podanak kratak i tanak, pokriven odozgo rukavcima listova;
- listovi lancetasti, dugi 10-30 cm, smješteni u prizemnoj rozeti;
- cvatovi gusti, kratki, kuglasti klasovi.

***Plantago coronopus* L.**

- jedno-, dvo- ili višegodišnja biljka, visine oko 20 cm;
- listovi široki, linealni do suličasti, perasto razdijeljeni, duljine do 20 cm, smješteni u jednu ili više rozeta;
- na vrhu bezlisne stabljike (batva) smješteni su duguljasti, klasasti cvatovi.

Plantago holosteum* Scop. subsp. *depauperata

- trajnica visine oko 10 cm;
- korijen tanak i vretenast, u starijih biljaka odebljan;
- stabljika drvenasta, na vrhu nosi duguljast klasasti cvat;
- listovi cjelovita ruba, uski, do nekoliko centimetara dugi, raspoređeni u rozete.

Plantago holosteum* Scop. subsp. *holosteum

- višegodišnja biljka;
- korijen vretenast i tanak, kasnije produžen i debeo;
- stabljika kratka i razgranjena, duljine oko 10 cm, u starijih biljaka drvenasta;
- listovi plosnati ili na rubovima blago uvrnuti i kratko trepavičasti, do 15 cm dugi;
- uspravna ili malo svijena cvatna stapka (batvo) s manje ili više klasastih cvatova.

Plantago holosteum* Scop. subsp. *scopulorum

- trajnica visine 5-10 cm;
- korijen dug i vretenast;
- stabljika kratka, tanka i drvenasta, na vrhu nosi okruglasti cvat;
- listovi uski i kratki, cjelovita ruba, smješteni u više rozeta.

***Plantago lagopus* L.**

- višegodišnja biljka s nekoliko rozeta listova ili jednogodišnja s jednom rozetom;
- snažan korijen;
- stabljika kratka i debela, često potpuno ogoljena, uspravna, visoka 10-20 cm;
- listovi izmjenično postavljeni, slabo zupčasti;
- cvat kuglasti klas.

***Plantago maritima* L.**

- višegodišnja biljka;
- korijen mladih biljaka jak i vretenast, u starijih vretenast s više glavica;
- podanak kratak, prekriven ljkastim ostacima listova;
- listovi sivozeleni, linealni, goli i cjelovita ruba ili rijetko nazubljeni; čine gustu prizemnu rozetu;
- gusto dlakave cvatne stapke visoke do 40 cm;
- cvatovi malobrojni, gusti, valjkasti klasovi.

3.2. REZULTATI ANATOMSKIH ISTRAŽIVANJA

3.2.1. Anatomija listova

Plantago altissima L.

List je dorziventralne građe (slike 4 i 5). Epiderma lica i naličja lista prekrivena je bradavičastom kutikulom. Puči su okružene s tri stanice pratileće i prisutne na obje epiderme (slika 6). Manje nakupine mehaničkog staničja (kolenhima) nalaze se ispod epiderme na rubovima listova i na naličju prema glavnoj žili. Trihomi su rijetki. Mezofil lista diferenciran je na palisadni i spužvasti parenhim. Stanice jednoslojnog palisadnog parenhima kratke su i gusto poredane. U mezofilu se ističe jedna glavna i više manjih postranih kolateralnih žila. Okružuje ih prsten parenhimskih stanica. Oko ksilemskih i floemskih elemenata središnje žile proteže se slojevi mehaničkog staničja (slika 7).



Slika 4. Poprečni prerez lista



Slika 5. Dorziventralni list



Slika 6. Puči



Slika 7. Središnja žila

***Plantago argentea* Chaix**

Na slikama 8, 9 i 10 prikazani su poprečni prerezi lista koji je dorziventralne građe. Velike i izdužene epidermske stanice lica i naličja lista prekrivene su jakom bradavičastom kutikulom. Dijacitične puči prisutne su na obje epiderme. Manje nakupine mehaničkog staničja (kolenhima) nalaze se ispod epiderme na rubovima lista i na naličju prema glavnoj žili. Trihomii nisu uočeni. Mezofil lista čine palisadni i sružasti parenhim. Palisadni parenhim građen je od jednog sloja kratkih stanica. Istiće se jedna glavna i više manjih postranih kolateralnih žila, okruženih prstenom parenhimskih stanica. Ksilem i floem središnje žile okružuju mehanički elementi (slika 11).



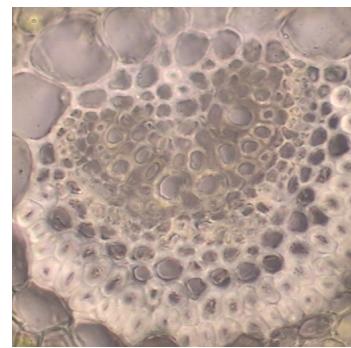
Slika 8. Poprečni prerez lista



Slika 9. Dorziventralni list



Slika 10. Mezofil lista



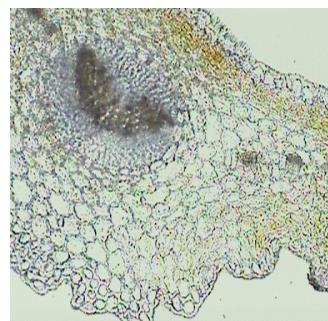
Slika 11. Glavna žila

***Plantago coronopus* L.**

Na poprečnom prerezu lista busenastog trpuca uočava se izolateralna građa (slike 12 i 13). Epiderma lica i naličja lista prekrivena je debelom i vrlo naboranom kutikulom. Stanice gornje epiderme okruglaste su do poligonalne, dok su na naličju nejednakih veličina i oblika zbog vrlo istaknutih rebara. Postrane membrane su im odebljale i valovite. Dijacitične puči prisutne su na gornjoj i donjoj epidermi (slika 14). Nakupine mehaničkog staničja nalaze se na rubovima lista i uz glavnu žilu prema naličju. Dlake su većinom jednostanične do trostanične, šiljaste, široke osnovice i bradavičaste kutikule (slika 15), a ponekad imaju i kolabiranu stanicu. Mezofil lista podijeljen je na palisadni i spužvasti parenhim. Stanice palisadnog parenhima (2-3 sloja) vrlo su kratke i ponekad se teško razlikuju od stanica gustog spužvastog parenhima. U mezofilu se ističu tri veće i više manjih kolateralnih žila. Središnja žila okruglastog oblika okružena je prstenom parenhimskih stanica. Iznad ksilemskih elemenata nalazi se tanji sloj floema. Provodne elemente okružuje mehaničko staničje.



Slika 12. Poprečni prerez lista



Slika 13. Izolateralni list



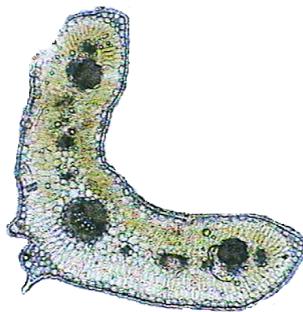
Slika 14. Dijacitične puči



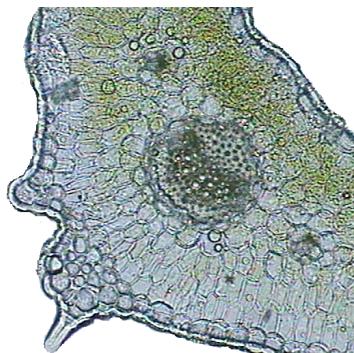
Slika 15. Trostanični trihom

Plantago holosteum* Scop. subsp. *depauperata

Na slikama 16 i 17 prikazani su poprečni prerezi lista izolateralne građe. Izdužene epidermske stanice lica i naličja lista prekrivene su jakom kutikulom. Puči se nalaze na obje epiderme. Manje nakupine kolenhima nalaze se ispod epiderme na rubovima lista i na naličju prema glavnoj žili. Uočeni su jednostanični trihomi (slika 18). Palisadni i spužvasti parenhim čine mezofil lista. Duge stanice dvoslojnog ili troslojnog palisadnog parenhima gusto su zbijene. U mezofilu se uočava jedna glavna i više manjih postranih kolateralnih žila koje su okružene prstenom parenhimskih stanica. Oko ksilemskih i floemskih elemenata središnje žile nalaze se slojevi mehaničkog staničja (slika 19).



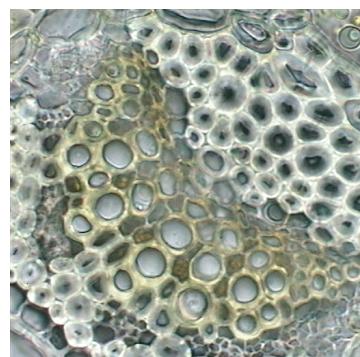
Slika 16. Poprečni prerez lista



Slika 17. Izolateralni list



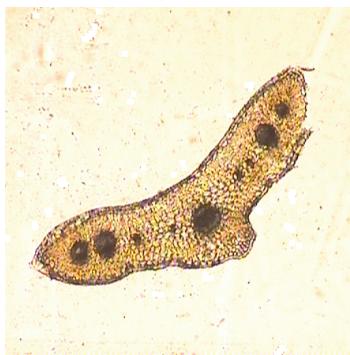
Slika 18. Jednostanični trihom



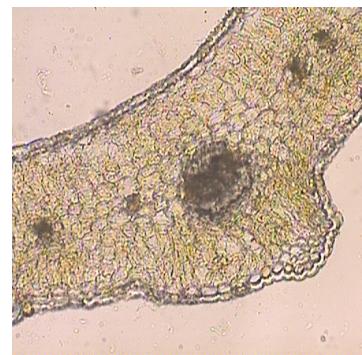
Slika 19. Središnja žila

Plantago holosteum* Scop. subsp. *holosteum

List je izolateralne građe (slike 20 i 21). Epiderma lica i naličja lista prekrivena je debelom i blago bradavičastom kutikulom. Dijacitične puči prisutne su na obje epiderme. Kolenhim u manjim nakupinama uočen je na rubovima lista ispod epiderme, kao i na naličju prema glavnoj žili. Nije zabilježena prisutnost trihoma. U mezofilu lista uočavaju se odijeljena područja palisadnog i sružvastog parenhima (slika 22). Kratke palisade smještene su u dva sloja. Mjestimice se teško razlikuju od stanica gustog sružvastog parenhima. U mezofilu se ističe pet većih i četiri manje kolateralne žile (slika 20), obrubljene prstenom parenhimskih stanica. Provodni elementi središnje žile i većih postranih žila okruženi su slojevima mehaničkog staničja (slika 23).



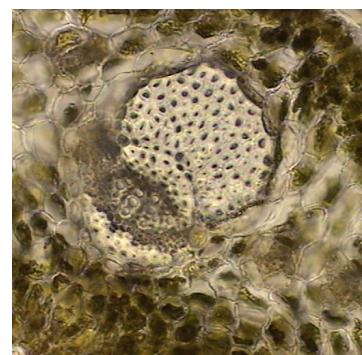
Slika 20. Poprečni prerez lista



Slika 21. Izolateralni list



Slika 22. Mezofil lista



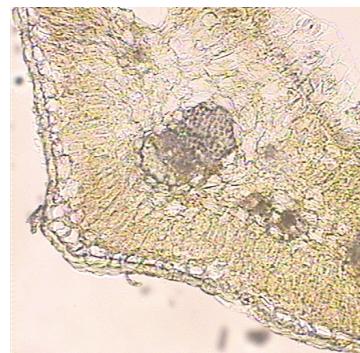
Slika 23. Žila

Plantago holosteum* Scop. subsp. *scopulorum

Na slikama 24 i 25 prikazani su poprečni prerezi lista koji je izolateralne građe. Izdužene epidermske stanice lica i naličja lista prekrivene su jakom kutikulom. Dijacitične puči nalaze se na obje epiderme (slika 26). Rijetko se mogu uočiti pojedinačne kolenhimske stanice ispod epiderme. Mezofil lista diferenciran je na palisadni i spužvasti parenhim. Duge stanice dvoslojnog ili troslojnog palisadnog parenhima gusto su zbijene. U mezofilu se ističe jedna glavna i više manjih postranih kolateralnih žila koje okružuje prsten parenhimskih stanica. Oko ksilemskih i floemskih elemenata središnje žile nalaze se slojevi mehaničkog staničja (slika 27).



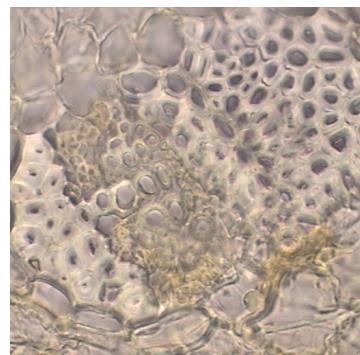
Slika 24. Poprečni rez lista



Slika 25. Izolateralni list



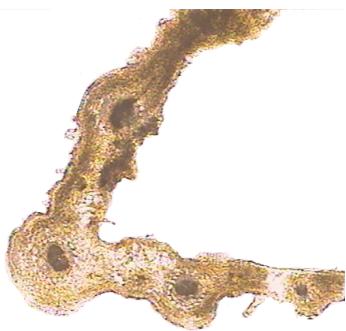
Slika 26. Dijacitične puči



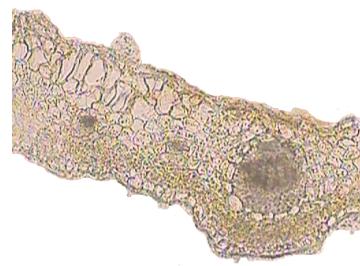
Slika 27. Središnja žila

***Plantago lagopus* L.**

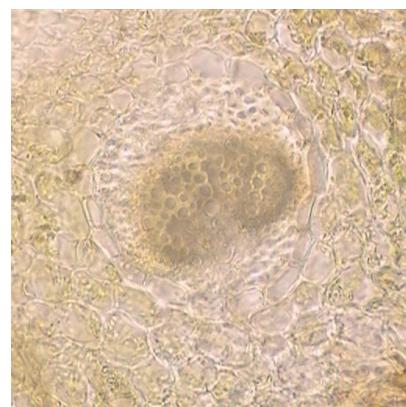
List izbrazdanog trpuca je dorziventralne građe (slike 28 i 29). Epiderme lica i naličja lista prekrivene su jakom, ispruganom kutikulom. Uočeni su ostaci višestaničnih trihoma. U mezofilu lista razlikuju se palisadni i spužvasti parenhim. Stanice jednoslojnog do dvoslojnog palisadnog parenhima nisu gusto zbijene. Prstenovi parenhimskih stanica oružuju jednu glavnu i više manjih postranih kolateralnih žila u mezofilu lista. Ksilem i floem središnje žile okruženi su slojevima mehaničkog staničja (slika 30).



Slika 28. Poprečni prerez lista



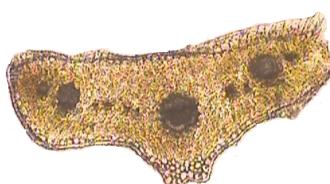
Slika 29. Dorziventralni list



Slika 30. Središnja žila lista

***Plantago maritima* L.**

Slike 31 i 32 prikazuju poprečne prereze izolateralnog lista. Lice i naličje lista prekriveni su izrazito debelom i blago bradavičastom kutikulom. Dijacitične puči prisutne su na gornjoj i donjoj epidermi (slika 33). Nakupina mehaničkog staničja uočena je ispod epiderme naličja prema glavnoj žili. Nije zabilježena prisutnost trihoma. Mezofil je diferenciran na palisadni i sružasti parenhim. Kratke palisade smještene su u dva sloja. Ponekad se teško razlikuju od stanica gustog sružastog parenhima. U mezofilu se ističu tri veće i nekoliko manjih kolateralnih žila. Okružuje ih prsten parenhimskih stanica. Oko provodnih elemenata središnje žile, kao i oko većih postranih žila, nalaze se slojevi mehaničkog staničja.



Slika 31. Poprečni rez listne lopatice



Slika 32. Izolateralni list

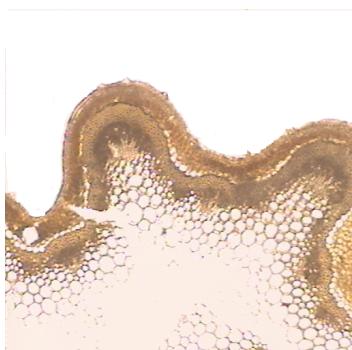


Slika 33. Puči

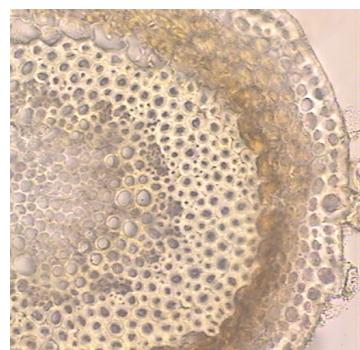
3.2.2. Anatomija stabljika

Plantago altissima L.

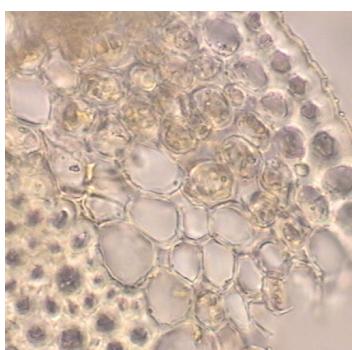
Poprečni presjeci stabljike prikazani su na slikama 34 i 35. Stabljiku s istaknutim rebrima oblažu sitne, zaobljene epidermske stanice odebljalih membrana i debele bradavičaste kutikule. Na epidermi se mogu uočiti papile i ostaci višestaničnih pokrovnih šiljastih dlaka s bradavičastom kutikulom. Njihova osnovna stanica veća je od ostalih epidermskih stanica. Na epidermu se nastavlja jedan sloj kolenhimske hipoderme te višeslojni parenhim primarne kore (slika 36). Jednoslojna endoderma vrlo je izražena. Pericikl je dobro razvijen, a čini ga prsten mehaničkih elemenata unutar kojega se nalaze floem i ksilem. U središtu stabljike ističe se opsežno parenhimsko tkivo srčike (slika 37).



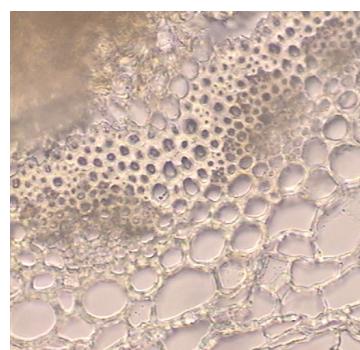
Slika 34. Poprečni presjek stabljike



Slika 35. Presjek rebra stabljike



Slika 36. Primarna kora



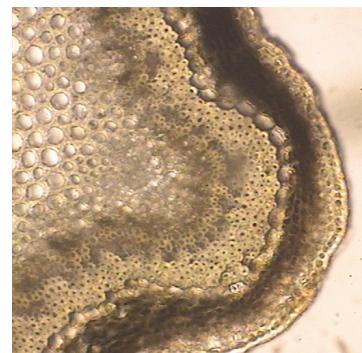
Slika 37. Pericikl

***Plantago argentea* Chaix**

Na slikama 38-41 prikazani su poprečni prerezi stabljike srebrnolisnog trpuca. Istaknuta rebra obložena su sitnim, okruglastim epidermskim stanicama, odebljalih membrana i debele bradavičaste kutikule. Na epidermu se nastavlja sloj kolenhimske hipoderme i višeslojni parenhim primarne kore koji završava jednoslojnom endodermom velikih i zaobljenih stanica (slika 41). Prsten mehaničkih elemenata, unutar kojega se nalaze floem i ksilem, čini dobro razvijeni pericikl. Opsežno parenhimsko tkivo srčike zauzima središnji dio stabljike.



Slika 38. Poprečni prerez stabljike



Slika 39. Presjek rebra stabljike



Slika 40. Primarna kora i pericikl



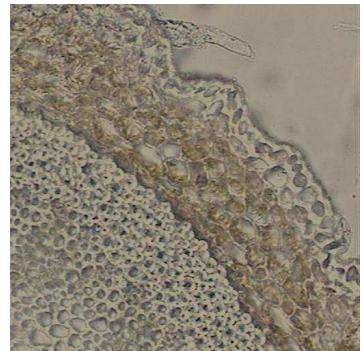
Slika 41. Endoderma

Plantago coronopus L.

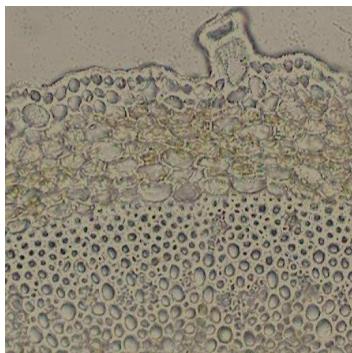
Poprečni prerez stabljike prikazan je na slikama 42, 43 i 44. Okruglastu stabljiku oblažu sitne, zaobljene epidermske stanice, s odebljalim membranama i snažno razvijenom bradavičastom kutikulom. Ponegdje se mogu uočiti papile i ostaci višestaničnih šiljastih dlaka (slika 45). Na epidermu se nastavlja jedan sloj kolenhimske hipoderme. Zatim slijedi višeslojni parenhim koji završava jednim nizom većih i izduženijih stanica endoderme. U središtu stabljike nalazi se opsežno parenhimsko tkivo srčike. Srčiku okružuju provodni snopići ksilema, orijentirani prema unutra, dok su sitasti dijelovi floema okrenuti prema van. Provodni elementi zaštićeni su prstenom mehaničkih elemenata koji je građen od sklerenhimskih vlakana.



Slika 42. Okrugla stabljika



Slika 43. Poprečni prerez stabljike



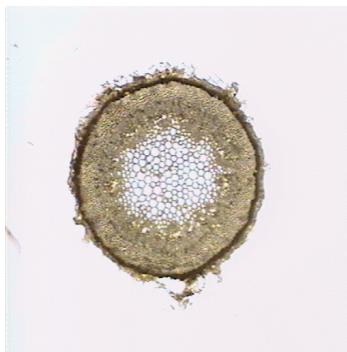
Slika 44. Primarna kora i pericikl



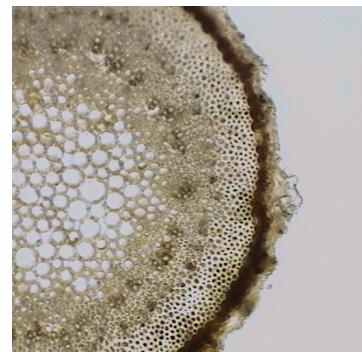
Slika 45. Ostaci trihoma

Plantago holosteum Scop. subsp. depauperata

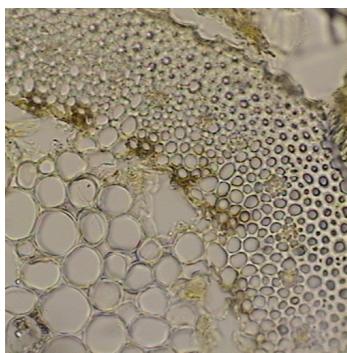
Poprečni prerezi stabljike navedenog biljnog taksona prikazani su na slikama 46-48. Okruglu stabljiku oblažu sitne, zaobljene epidermske stanice, odebljalih stijenki i jake kutikule. Zabilježena je prisutnost višestaničnih šiljastih trihoma (slika 49). Ispod epiderme proteže se višeslojni parenhim primarne kore. Ističe se jednoslojna endoderma većih stanica. Pericikl je dobro razvijen, a čini ga prsten mehaničkih elemenata unutar kojega se nalaze provodna staničja – ksilem i floem. Prostrano središte stabljike zauzima opsežno parenhimsko tkivo srčike.



Slika 46. Okrugla stabljika



Slika 47. Poprečni rez stabljike



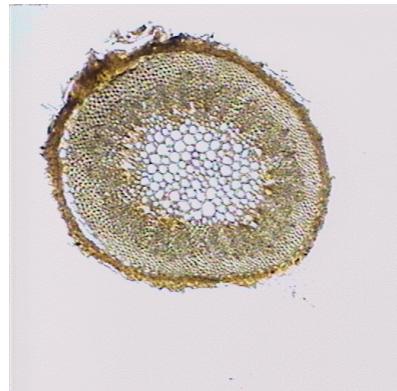
Slika 48. Primarna kora i pericikl



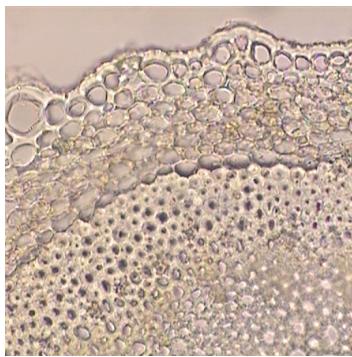
Slika 49. Višestanični šiljasti trihom

Plantago holosteum* Scop. subsp. *holosteum

Slike 50 i 51 daju mikroskopski prikaz poprečnog presjeka okruglaste stabljike uskolisnog trpuca. Epiderma je građena od sitnih, zaobljenih stanica, odebljalih membrana i bradavičaste kutikule. Na epidermi se mogu uočiti papile i ostaci višestaničnih pokrovnih šiljastih dlaka s bradavičastom kutikulom (slika 52). Njihova bazna stanica znatno je veća u odnosu na ostale epidermske stanice. Na epidermu se nastavlja jedan sloj kolenhimske hipoderme, a potom višeslojni parenhim primarne kore. Vrlo izražena jednoslojna endoderma građena je od krupnih izduženih stanica. Pericikl sačinjavaju floem i ksilem koji su okruženi prstenom mehaničkih elemenata. Središnji dio stabljike zauzima parenhimsko tkivo srčike.



Slika 50. Okruglasta stabljika



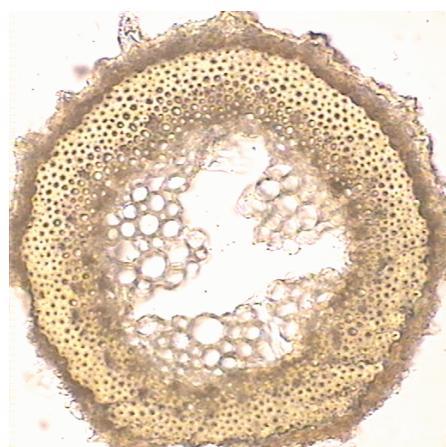
Slika 51. Poprečni prerez stabljike



Slika 52. Ostaci pokrovnih trihoma

Plantago holosteum Scop. subsp. *scopulorum*

Poprečni prerezi stabljike vrste *Plantago holosteum* L. subsp. *scopulorum* prikazani su na slikama 53 i 54. Okruglu stabljiku oblažu sitne, zaobljene epidermske stanice, odebljalih stijenki i jake bradavičaste kutikule. Slijedi višeslojni parenhim primarne kore, koji završava slojem krupnih, izduženih stanica endoderme. Pericikl je dobro razvijen, a čini ga prsten mehaničkih elemenata, unutar kojega su smješteni floem i ksilem. Opsežno parenhimsko tkivo srčike zauzima veliki prostor središnjeg dijela stabljike.



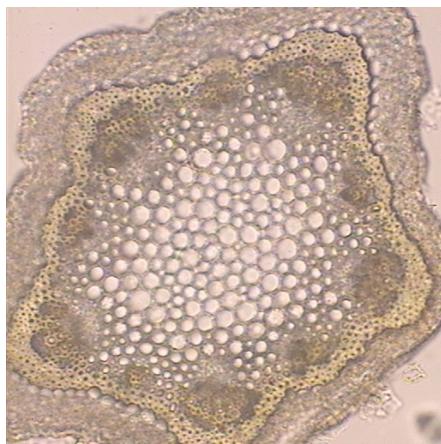
Slika 53. Okrugla stabljika



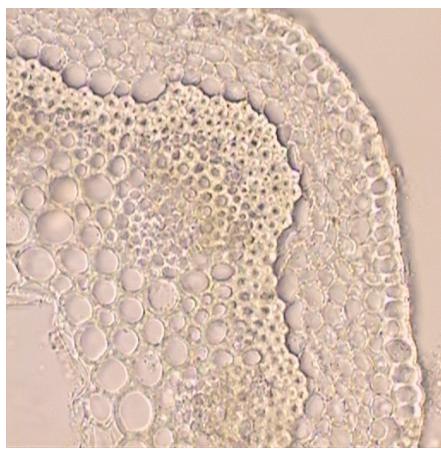
Slika 54. Poprečni prerez stabljike

Plantago lagopus L.

Na poprečnim prerezima stabljike izbrazdanog trpuca uočavaju se više ili manje istaknuta rebra (slike 55 i 56). Epiderma je građena od sitnih, zaobljenih epidermskih stanica, odebljalih stijenki i debele prugaste kutikule. Uočeni su ostaci višestaničnih trihoma. U rebrima su smješteni provodni elementi. Ispod epiderme proteže se višeslojni parenhim primarne kore. Jednoslojna endoderma građena je od većih okruglastih ili slabo izduženih stanica. Mehanički elementi pericikla okružuju provodna staničja floema i ksilema. Središte stabljike ispunjava parenhimsko tkivo srčike.



Slika 55. Poprečni rez stabljike



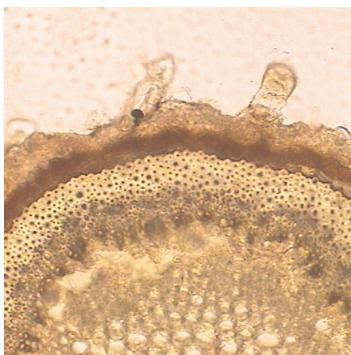
Slika 56. Presjek kroz rebro stabljike

Plantago maritima L.

Okruglastu stabljiku primorskog trpuca (slika 57) oblažu male epidermske stanice s debelom bradavičastom kutikulom. Uočena je prisutnost papila i ostataka višestaničnih pokrovnih šiljastih dlaka s bradavičastom kutikulom (slika 58). Njihova je osnovica puno veća od ostalih epidermskih stanica u okruženju. Na epidermu se nastavlja jedan sloj kolenhimske hipoderme, višeslojni parenhim primarne kore i jednoslojna endoderma. Pericikl je građen od prstena mehaničkih elemenata, unutar kojega se prostiru provodni elementi ksilema i floema. Prostrano parenhimsko tkivo srčike zauzima središnji dio stabljike (slika 59).



Slika 57. Okruglasta stabljika



Slika 58. Ostaci pokrovnih trihoma



Slika 59. Poprečni prerez stabljike

3.3. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI I PRIČUVNE TVARI

3.3.1. Rezultati histokemijskih reakcija

Rezultati histokemijske analize izučavanih vrsta roda *Plantago* prikazani su tablicom 5.

Tablica 5. Histokemijske reakcije

BIOLOŠKI AKTIVNE I REZERVNE TVARI	REAGENS	OPIS PRODUKTA REAKCIJE	REZULTAT
Eterično ulje	sudan III	narančastocrveno obojene kapljice ulja	– ¹
Trjeslovine	željezo(III)-klorid	tamnoplava do tamnozelena boja	+
Sluzi	metilenplavilo	plavo obojena sluz	+
Glikozidi	80%-tna sulfatna kiselina	zeleno, modro, te crveno obojenje	+
Antrakinoni	etanolni kalij-hidroksid	ljubičastocrvena boja	–
Alkaloidi	vanilin + konc. sulfatna kiselina	crvena boja	+
Monosaharidi	a) Fehlingov reagens b) fenilhidrazin-natrij-acetat	a) žutocrveni talog b) žuti igličasti kristali	a) – ² b) – ²
Škrob	jod	plavoljubičasta boja	– ³
Inulin	a) α-naftol + konc. sulfatna kiselina b) apsolutni etanol	a) ljubičasta boja b) sferokristali	a) – ⁴ b) – ⁴
Proteini	konz. nitratna kiselina	žuta boja	+
Masti	sudan III	narančastocrveno obojene kapljice masti	–

¹ osim vrsta *P. lagopus* i *P. maritima*;

² osim vrsta *P. coronopus*, *P. lagopus* i *P. maritima*;

³ osim vrste *P. coronopus*;

⁴ osim vrsta *P. coronopus*, *P. holosteum* subsp. *holosteum* i *P. maritima*.

Histokemijskim reakcijama na biološki aktivne tvari listova i stabljika vrsta roda *Plantago* L. utvrđeno je da su svi istraženi biljni uzorci sadržavali trjeslovine, sluzi,

glikozide i alkaloide, dok su reakcije na antrakinone bile negativne. Prisutnost eteričnog ulja utvrđena je samo u vrsta *P. lagopus* i *P. maritima*.

Reakcije na pričuvne tvari dokazale su prisutnost proteina u svih biljnih vrsta, dok su reakcije na masti za sve bile negativne. Monosaharidi su zabilježeni u vrsta *P. coronopus*, *P. lagopus* i *P. maritima*, dok je škrob dokazan samo u nadzemnim dijelovima vrste *P. coronopus*. Reakcijama na inulin utvrđena je njegova prisutnost u uzorcima vrsta *P. coronopus*, *P. holosteum* subsp. *holosteum* i *P. maritima*.

3.3.2. Iridoidi

3.3.2.1. Kvalitativna analiza iridoida

Primjenom metode tankoslojne kromatografije utvrđena je prisutnost iridoidnih supstancija u listovima istraživanih vrsta roda *Plantago* L.

Suhi etilacetatni ekstrakti istraživanih biljnih vrsta, pripremljeni postupkom opisanim u poglavlju 2.3.3.1., otopljeni su u metanolu i razvijeni na tankom sloju adsorbensa Kieselgela 60 F₂₅₄, primjenom razvijača etilacetat-etilmetylketon-mravlja kiselina-voda 5:3:1:1 (V/V). Razvijeni kromatogram promatran je pod UV svjetлом na 365 nm. Uočene su zone svijetloplave fluorescencije: *P. altissima* (R_F -vrijednosti 0,55 i 0,69), *P. argentea* (R_F -vrijednosti: 0,19; 0,30; 0,37; 0,53; 0,60; 0,69 i 0,76), *P. coronopus* (R_F -vrijednosti 0,46 i 0,74), *P. holosteum* subsp. *depauperata* (R_F -vrijednosti: 0,62; 0,69 i 0,86), *P. holosteum* subsp. *holosteum* (R_F -vrijednosti: 0,60; 0,69 i 0,83), *P. holosteum* subsp. *scopulorum* (R_F -vrijednosti: 0,61; 0,69 i 0,85), *P. lagopus* (R_F -vrijednosti: 0,54; 0,69 i 0,92) i *P. maritima* (R_F -vrijednosti 0,69 i 0,85). Usporedbom s literurnim podacima (31), može se prepostaviti da zona R_F -vrijednosti 0,69 odgovara iridoidnom glikozidu aukubinu. Njegova prisutnost ovim postupkom nije dokazana samo u vrste *P. coronopus*.

Iridoidi iz metanolnih ekstrakata listova (poglavlje 2.3.3.1.) vrsta roda *Plantago* L. podvrgnuti su odjeljivanju na tankom sloju Kieselgela 60 F₂₅₄, uz razvijače (1) etilacetat-etilmetylketon-mravlja kiselina-voda (5:3:1:1, V/V), (2) etilacetat-mravlja kiselina-ledena octena kiselina-voda (100:11:11:27, V/V) te (3) etilacetat-mravlja kiselina-voda (8:1:1, V/V). Detekcija razvijenih kromatograma provedena je prskanjem s 0,5%-tnom otopinom kloridne kiseline (postupci 1 i 2) i benzidin reagensom (postupak 3).

Postupkom 1 razvijeno je 13 kromatografskih zona različitih obojenja. Crvenonarančaste zone niskih R_F -vrijednosti (0,03 i 0,05) vjerojatno predstavljaju šećerne komponente. Iridoidne supstancije su narančastosmeđe boje (R_F -vrijednosti od

0,13 do 0,24), među kojima se posebno ističu iridoidni glikozidi katalpol ($R_F = 0,20$) i aukubin ($R_F = 0,22$). Kromatografske zone R_F -vrijednosti od 0,37 do 0,95, koje su nakon prskanja 0,5%-tnom HCl poprimile zelenosmeđu boju, odgovaraju flavonoidnim sastavnicama i fenolnim kiselinama, koje su također dobro razdvojene u navedenim kromatografskim uvjetima.

Usporedbom sa standardnim supstancijama, prisutnost iridoidnog glikozida katalpola utvrđena je u vrsta *P. altissima*, *P. argentea* i *P. lagopus*, dok su aukubin sadržavali svi istraženi biljni uzorci, osim vrste *P. coronopus*.

Postupak **2** omogućio je razdvajanje 16 sastavnica metanolnih ekstrakata listova istraživanih vrsta. Prskanjem s 0,5%-tnom HCl nastala su različita obojenja razvijenih kromatografskih zona. Narančastocrvene mrlje R_F -vrijednosti 0,05 predstavljaju šećere, iridoidne supstancije su narančastosmeđe boje (katalpol, $R_F = 0,15$ i aukubin $R_F = 0,19$), dok su narančaste, zelenkaste i plave zone R_F -vrijednosti od 0,22 do 0,97 označavale odijeljene flavonoidne spojeve i fenolne kiseline.

Prisutnost katalpola potvrđena je u metanolnim ekstraktima vrsta *P. altissima*, *P. argentea* i *P. lagopus*. Aukubin nije dokazan u vrsta *P. coronopus*, *P. holosteum* subsp. *holosteum* i *P. holosteum* subsp. *scopulorum*.

Nakon razvijanja kromatograma postupkom **3** i prskanja benzidin reagensom, na tankom sloju Kieselgela 60 F₂₅₄ detektirano je 11 odijeljenih supstancija. Svijetloplave zone šećera imale su najnižu R_F -vrijednost (0,03). Standard katalpola detektiran je kao žutosmeđa zona R_F -vrijednosti 0,08, dok je zona aukubina bila plavosmeđe boje, R_F -vrijednosti 0,13. Svijetlonarančaste odijeljene zone flavonoida i fenolnih kiselina imale su R_F -vrijednosti od 0,22 do 0,93.

Ovim kromatografskim postupkom nije detektirana prisutnost iridoidnog glikozida katalpola u metanolnim ekstraktima listova istraživanih vrsta, dok je aukubin dokazan u svim uzorcima, osim u vrste *P. coronopus*.

Kvalitativna analiza iridoida listova istraživanih vrsta roda *Plantago* L. metodom tankoslojne kromatografije uspješno je provedena primjenom razvijača koji je sadržavao

smjesu otapala n-propanol-toluen-ledena octena kiselina-voda, u omjeru 25:20:10:10 (V/V), a potom detekcijom s benzidin reagensom (slika 60).

Odijeljeno je 8 supstancija, R_F -vrijednosti od 0,10 do 0,51. Šećerne komponente su kao najpolarnije imale najnižu R_F -vrijednost (0,10) i bile smeđe obojene. Iridoidne supstancije bile su narančastosmeđe do smeđe boje, R_F -vrijednosti od 0,15 do 0,30. Usporedbom sa standardnim supstancijama, katalpol je detektiran u većine biljnih uzoraka ($R_F = 0,25$). Njegova prisutnost nije bila utvrđena u vrsta *P. altissima* i *P. coronopus*. Iridoidni glikozid aukubin ($R_F = 0,30$) ovim kromatografskim postupkom nije detektiran samo u vrsta *P. coronopus* i *P. holosteum* subsp. *holosteum*. Narančasto obojenje s benzidin reagensom dale su flavonoidne sastavnice, čije su odijeljene zone na kromatogramu imale R_F -vrijednosti od 0,43 do 0,51.

Razvijač: n-propanol – toluen – ledena octena kiselina – voda (25:20:10:10, V/V)

Detekcija: benzidin reagens



- | | | |
|--|------------------------|-------------------------|
| 1. <i>P. holosteum</i> subsp. <i>holosteum</i> | 5. <i>P. argentea</i> | 9. <i>P. lanceolata</i> |
| 2. <i>P. holosteum</i> subsp. <i>scopulorum</i> | 6. <i>P. lagopus</i> | A. aukubin |
| 3. <i>P. holosteum</i> subsp. <i>depauperata</i> | 7. <i>P. maritima</i> | C. katalpol |
| 4. <i>P. altissima</i> | 8. <i>P. coronopus</i> | |

Slika 60. Kromatogram iridoida vrsta roda *Plantago* L.

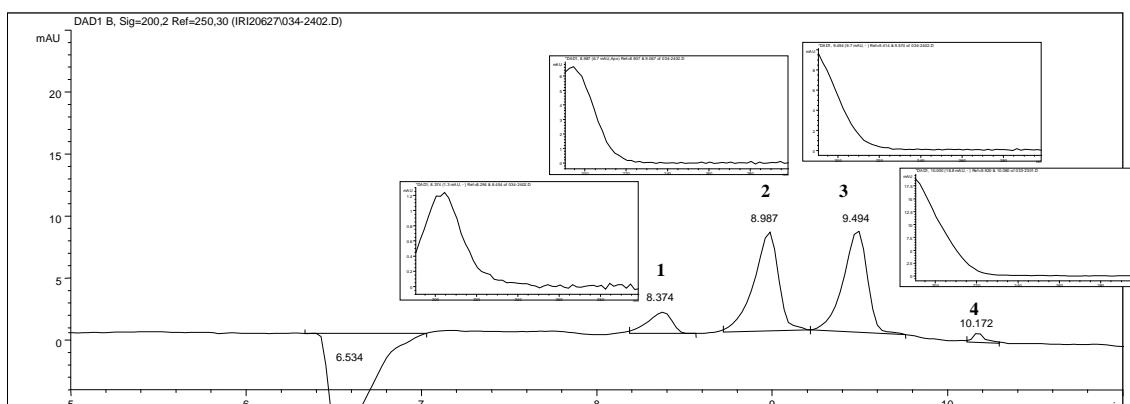
3.3.2.2. MEKC analiza iridoida

Metoda micelarne elektrokinetičke kromatografije (MEKC) primijenjena je za odjeljivanje, identifikaciju i određivanje iridoida u vodenim ekstraktima listova istraživanih taksona roda *Plantago*, uz vrstu *P. lanceolata* kao referentni uzorak. Metoda se pokazala vrlo učinkovitom u odjeljivanju i kvantitativnoj analizi aukubina i katalpola, unatoč kompleksnosti biljnog materijala i strukturnoj sličnosti spomenutih iridoidnih glikozida (prilozi 1-10).

Prvi izbor u odjeljivanju iridoidnih sastavnica bila je metoda tankoslojne kromatografije (TLC), no problem je predstavljala slaba rezolucija. Srodne iridoidne supstancije, prisutne u biljnom materijalu, bile su slabo odijeljene od aukubina i katalpola, što je moglo dovesti do krive procjene rezultata TLC analize. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) nije dala zadovoljavajuće rezultate, zbog nemogućnosti izdvajanja zasebne skupine pikova iridoida iz složene matrice biljnih uzoraka i vrlo dugog vremena analize. Rješenje spomenutih problema omogućeno je primjenom metode kapilarne elektroforeze (CE). No, budući da aukubin i katalpol imaju vrlo visoke pK_a -vrijednosti (> 12), ne mogu se prevesti u ionski oblik, pa ih se ne može uspješno odijeliti uobičajenom kapilarno-zonskom elektroforezom (CZE). Stoga je primijenjena MEKC metoda. Natrij-dodecil-sulfat (SDS) upotrijebljen je za stvaranje micela u elektrolitnoj otopini. Za odvajanje iridoida od matriksa uzorka, kao i za njihovo međusobno odjeljivanje, s obzirom na veliku strukturnu sličnost tih supstancija, bila je potrebna vrlo visoka micelarna koncentracija.

Kako bi se poboljšala separacija pikova aukubina i katalpola, primijenjena je nešto dulja kapilara u usporedbi s metodom koju su opisali Suomi i sur. (19). Umjesto kapilare ukupne duljine 33,5 cm, korištena je kapilara od 35 cm, efektivne duljine 26,5 cm. Predobrada kapilare prije pokretanja analize uzorka izmijenjena je u odnosu na spomenutu metodu. Umjesto 8 minuta ispiranja elektrolitom, provedeno je ispiranje od 3 minute. Nakon šest uzastopnih analiza, izvršeno je kondicioniranje kapilare: 10 minuta ispiranja s 0,1 M NaOH, 20 minuta ispiranja elektrolitom i 15 minuta slijepog pokusa (*blank run, electrophoretic run*). Postavljen je konstantni strujni prag od 80 μ A. Injekcijski volumen ($50 \text{ mbar} \times 5 \text{ s}$) nije smanjen, jer bi to utjecalo na osjetljivost metode, iako bi moglo poboljšati rezoluciju. Konačna rezolucija između analita iznosila je približno 2, mjereno metodom tangente. Posljedica toga bilo je malo produljeno

vrijeme analize (12 minuta). No, problemi vezani uz slabu rezoluciju, opisani u literaturi (19), na taj su način uspješno riješeni (slika 61, prilozi 1-10).

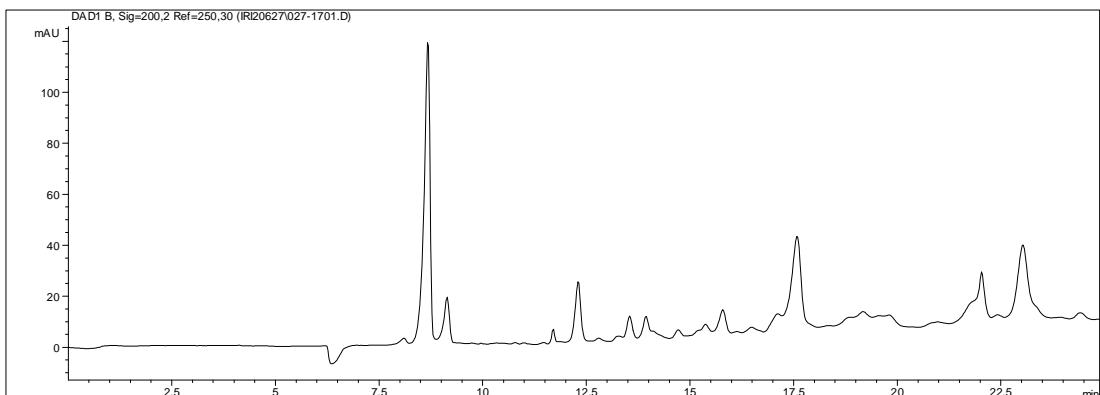


Slika 61. Elektroferogram iridoidnih supstancija **1-4** vrste *Plantago lanceolata* L. s pripadajućim UV spektrima. **1** – iridoidna supstancija A; **2** – katalpol; **3** – aukubin; **4** – iridoidna supstancija B. Uvjeti MEKC analize: kvarcna kapilara, 50 μm i.d. \times 35 cm; pufer, 180 mmol/L SDS i 50 mmol/L natrij-tetraborat (pH = 9,35); napon, 10 kV; struja, 80 μA ; injektiranje, 50 mbar \times 5 s; valne duljine, 200 \pm 2 nm i 250 \pm 30 nm (referentna); temperatura CE kasete, 25 °C.

Poboljšanje osjetljivosti metode postignuto je smanjenjem vremena odziva detektora na 2,6 s, u kombinaciji s uskim rasponom valnih duljina oko glavnog signala (\pm 2 nm). Sporija migracijska vremena obaju analita povećala su osjetljivost. Niži strujni limit uzrokuje sporiju pokretljivost analita, no površina pikova se povećava, bez njihovog značajnog širenja. Odnos signala i šuma za koncentracije od 0,05 mg/mL iznosio je 150 za aukubin i 102 za katalpol. Iz toga su proizašle njihove vrlo niske granice određivanja (*quantification limits, LOQ*) od 5 mg/L ili manje.

Sustav kontinuirane izmjene elektrolita (*replenishment*) omogućio je postavljanje sekvencijske analize. Uvedene promjene uvelike su poboljšale, olakšale i ubrzale analizu.

Opisana MEKC metoda može se također uspješno primijeniti u tzv. "fingerprint" analizi (slika 62). Na taj se način znatno olakšava identifikacija biljnog materijala i pridonosi razvoju kemotaksonomije.



Slika 62. Elektroferogram vodenog ekstrakta vrste *Plantago argentea* Chaix

Rezultati dobiveni opisanom analitičkom metodom pokazali su zнатне različitosti u sadržaju aukubina i katalpola među istraživanim biljnim taksonima (tablica 6). Ovisno o uzorku, količina aukubina iznosila je do 0,27%, dok je udio katalpola bio do 0,16%. Iznimka je uzorak vrste *P. argentea*, gdje je određeno 1,81% katalpola.

U svim analiziranim ekstraktima, koji su sadržavali iridoide u količini većoj od granice dokazivanja (LOD), aukubin je bio češće prisutan od katalpola. Samo u uzorku vrste *P. coronopus* aukubin nije dokazan. Vrste *P. holosteum* subsp. *holosteum* i *P. maritima* također nisu sadržavale značajne udjele iridoidnih glikozida. Sadržaj katalpola bio je u pravilu veći od udjela aukubina u onim vrstama u kojima su oba analita bila prisutna (*P. altissima*, *P. argentea* i *P. lagopus*). Jedino je takson *P. holosteum* subsp. *depauperata* sadržavao aukubin, dok katalpol nije bio zabilježen. To bi se moglo povezati s metaboličkim putovima iridoidnih supstancija i njihovom kinetikom, iako bi također moglo biti posljedica različite uspješnosti ekstrakcije pojedinog iridoida iz biljnog materijala.

Tablica 6. Sadržaj aukubina i katalpola u vrstama roda *Plantago* L.

Aukubin	Katalpol
---------	----------

Biljna vrsta	Udio (%)	LCL ^a (0,05%)	UCL ^b (0,05%)	Udio (%)	LCL (0,05%)	UCL (0,05%)
<i>P. altissima</i>	0,09	0,090	0,094	0,13	0,127	0,135
<i>P. argentea</i>	0,27	0,267	0,278	1,81	1,767	1,852
<i>P. coronopus</i>	<LOD ^c	–	–	<LOD	–	–
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>depauperata</i>	0,08	0,068	0,086	<LOD	–	–
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>holosteum</i>	<LOQ ^d	–	–	<LOD	–	–
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>scopulorum</i>	<LOQ	–	–	<LOD	–	–
<i>P. lagopus</i>	0,07	0,063	0,082	0,08	0,079	0,085
<i>P. maritima</i>	0,03	0,021	0,034	<LOD	–	–
<i>P. lanceolata</i>	0,12	0,098	0,132	0,16	0,152	0,166

^a Donja granica pouzdanosti (*lower confidence limit*)

^b Gornja granica pouzdanosti (*upper confidence limit*)

^c Prag dokazivanja (*limit of detection*)

^d Prag određivanja (*limit of quantification*)

Budući da opisana analitička metoda uspješno razdvaja iridoide od ostalih komponenata matriksa (slika 61), dva nepoznata pika detektirana u većine uzoraka mogla bi se pripisati iridoidnim supstancijama. Štoviše, slika 61 pokazuje da UV spektar supstancije **A** sliči UV spektru katalpola, dok UV spektar supstancije **B** korespondira s aukubinom. Kako bi se izbjegla moguća pogrešna tumačenja, primijenjene su relativne retencije svih pikova (RR_t). Retencijsko vrijeme negativnog pika, koji vrlo vjerojatno odgovara kloridnom anionu, korišteno je kao referentno vrijeme. Osim toga, neki su uzorci sadržavali tri ili četiri pika, od kojih su dva zasigurno aukubin i katalpol, što isključuje mogućnost pogrešnog tumačenja. Nepoznata iridoidna supstancija **A** ($RR_t = 1,28$) bila je prisutna u svim uzorcima, dok iridoidna sastavnica **B** ($RR_t = 1,54$) nije detektirana u vrsta *P. altissima*, *P. argentea* i *P. coronopus*.

3.3.3. Flavonoidi

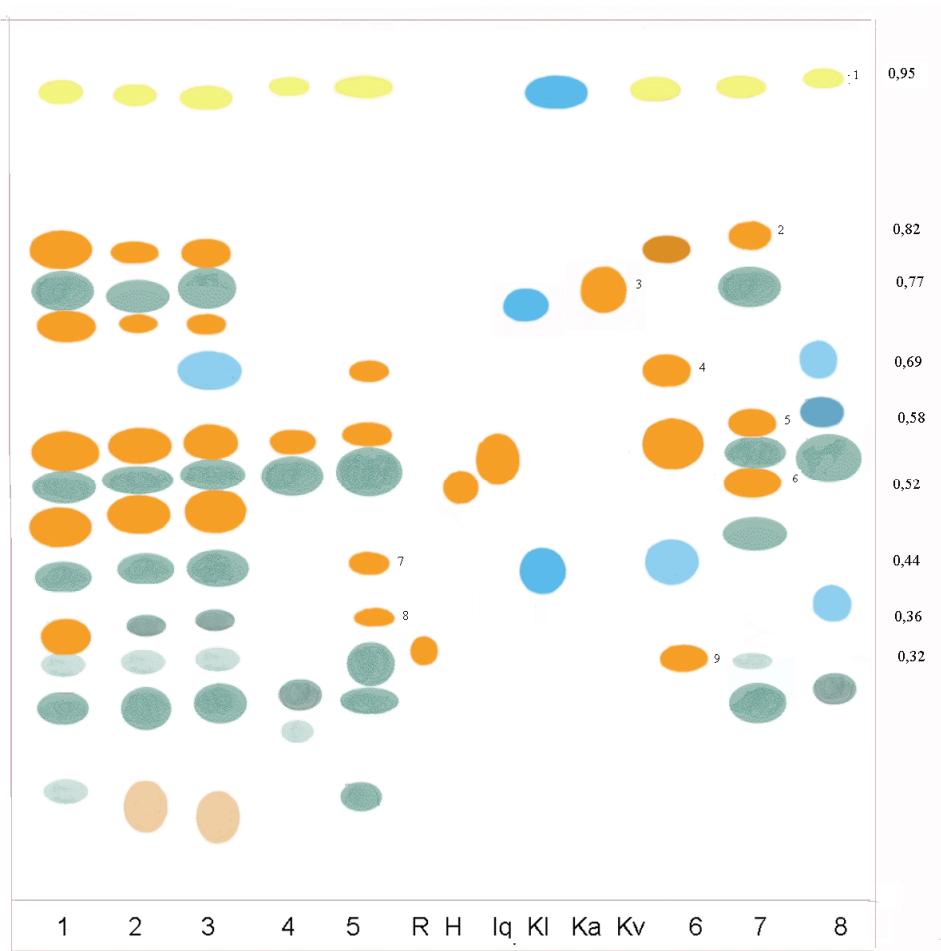
3.3.3.1. Kvalitativna analiza flavonoida

Prisutnost flavonoida i fenolnih kiselina u metanolnim ekstraktima listova vrsta roda *Plantago* L. dokazana je na tankom sloju Kieselgela 60 F₂₅₄, uz razvijače etilacetat-mravlja kiselina-voda (8:1:1, V/V) (slika 63) i etilacetat-mravlja kiselina-ledena octena kiselina-voda (100:11:11:27, V/V) (slika 64). Nakon detekcije NST/PEG reagensom, kromatogrami su promatrani pod UV svjetlom (365 nm).

Na kromatogramima su uočene brojne narančasto fluorescirajuće zone flavonoida, plave zone fenolnih kiselina, te zelenoplavo fluorescirajuće iridoidne supstancije. Po boji i fluorescenciji flavonidnih sastavnica može se ustvrditi njihova pripadnost kvercetinskom tipu.

Glikozid kvercitrin (označen brojem 3) uočen je u sve tri niže svoje vrste *Plantago holosteum* (subsp. *depauperata*, subsp. *holosteum* i subsp. *scopulorum*), dok su izokvercitrin (5) sadržavali svi istraženi biljni uzorci. Hiperozid (6) je bio prisutan u nižim taksonima vrste *P. holosteum* te u listovima vrste *P. maritima*. Prisutnost rutina (9) zabilježena je samo u vrste *P. lagopus*.

Metodom TLC nije dokazana prisutnost kavene kiseline u metanolnim ekstraktima listova istraživanih biljnih vrsta, dok je klorogenska kiselina zabilježena samo u listovima vrste *P. lagopus*.

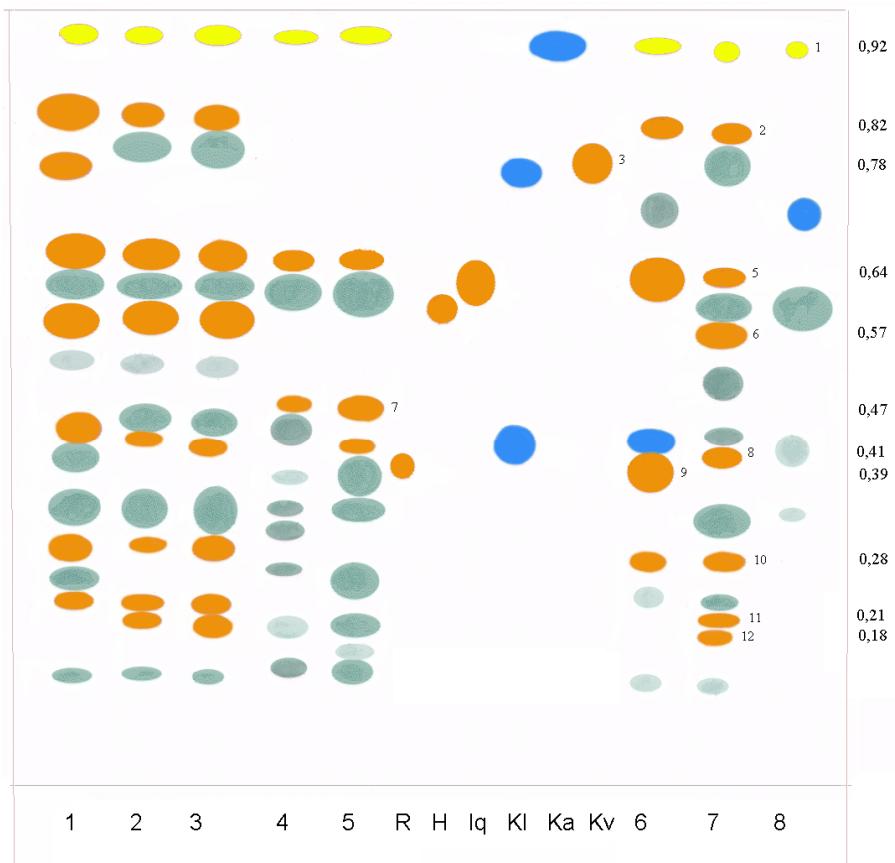


1. *P. holosteum* subsp. *holosteum*
2. *P. holosteum* subsp. *scopulorum*
3. *P. holosteum* subsp. *depauperata*
4. *P. altissima*
5. *P. argentea*
6. *P. lagopus*
7. *P. maritima*
8. *P. coronopus*

R – rutin
 H – hiperozid
 Iq – izokvercitrin
 KI – klorogenska kiselina
 Ka – kavena kiselina
 Kv – kvercitrin

Slika 63. Kromatogram flavonoida vrsta roda *Plantago* L.

Razvijač: etilacetat–mravlja kiselina–voda (8:1:1, V/V); detekcija: NST/PEG, UV-365 nm.



- | | |
|--|---------------------------|
| 1. <i>P. holosteum</i> subsp. <i>holosteum</i> | R – rutin |
| 2. <i>P. holosteum</i> subsp. <i>scopulorum</i> | H – hiperozid |
| 3. <i>P. holosteum</i> subsp. <i>depauperata</i> | Iq – izokvercitrin |
| 4. <i>P. altissima</i> | KI – klorogenska kiselina |
| 5. <i>P. argentea</i> | Ka – kavena kiselina |
| 6. <i>P. lagopus</i> | Kv – kvercitrin |
| 7. <i>P. maritima</i> | |
| 8. <i>P. coronopus</i> | |

Slika 64. Kromatogram flavonoida vrsta roda *Plantago* L. Razvijač: etilacetat–mravlja kiselina–ledena octena kiselina–voda (100:11:11:27, V/V); detekcija: NST/PEG, UV-365 nm.

3.3.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida

Kvantitativna analiza flavonoida u nadzemnim dijelovima vrsta roda *Plantago* L. provedena je spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru (poglavlje 2.3.4.2.), koja se zasniva na tvorbi kompleksa između flavonoidnih aglikona (nakon kisele hidrolize flavonoidnih heterozida) s Al^{3+} . Iz izmjerene apsorbancije izračunat je udio flavonoida prema formuli: $\% = A \times 0,772 / \text{masa droge (g)}$, izražen kao kvercetin. Prilozi 11-18 prikazuju UV/VIS spektre kompleksa flavonoida s Al^{3+} , a tablica 7 donosi udjele flavonoida u pojedinim biljnim organima istraživanih biljnih uzoraka.

Tablica 7. Sadržaj flavonoida u vrstama roda *Plantago* L.

Udio flavonoida (%); $\bar{x} \pm SD$, n = 3			
Biljna vrsta	List	Stabljika	Cvat
<i>P. altissima</i>	$0,095 \pm 0,017$	$0,013 \pm 0,001$	$0,024 \pm 0,001$
<i>P. argentea</i>	$0,110 \pm 0,037$	$0,044 \pm 0,002$	$0,067 \pm 0,002$
<i>P. coronopus</i>	$0,053 \pm 0,015$	$0,008 \pm 0,001$	$0,025 \pm 0,002$
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>depauperata</i>	$0,115 \pm 0,019$	$0,065 \pm 0,003$	$0,039 \pm 0,002$
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>holosteum</i>	$0,093 \pm 0,019$	$0,047 \pm 0,002$	$0,032 \pm 0,002$
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>scopulorum</i>	$0,065 \pm 0,018$	$0,049 \pm 0,002$	$0,011 \pm 0,001$
<i>P. lagopus</i>	$0,094 \pm 0,019$	$0,038 \pm 0,001$	$0,026 \pm 0,005$
<i>P. maritima</i>	$0,131 \pm 0,011$	$0,038 \pm 0,001$	$0,007 \pm 0,001$

Udio flavonoida u listovima istraženih vrsta roda *Plantago* L. iznosio je od 0,053% (*P. coronopus*) do 0,131% (*P. maritima*). Najveći sadržaj flavonoida stabljike zabilježen je u vrste *P. holosteum* subsp. *depauperata* (0,065%), dok je najmanja količina određena u vrste *P. coronopus* (0,008%). U cvatovima je udio flavonoida bio u granicama od 0,007% (*P. maritima*) do 0,067% (*P. argentea*).

Općenito se može ustvrditi da su listovi analiziranih biljnih taksona sadržavali najviše flavonoida. U cvatovima vrsta *P. altissima*, *P. argentea* i *P. coronopus* utvrđen je veći udio spomenute skupine spojeva nego u pripadajućim stabljikama, dok je obrnut slučaj zabilježen u ostalih biljnih vrsta.

Rezultati su statistički obrađeni primjenom Studentova *t*-testa. Uspoređeni su udjeli flavonoida u pojedinim biljnim organima iste vrste, kao i odnosi udjela flavonoida među listovima, stabljikama i cvatovima nižih svojti vrste *P. holosteum* (tablice 8 i 9).

Tablica 8. Statistička usporedba udjela flavonoida različitih biljnih organa pojedinih vrsta roda *Plantago* L.

Vjerojatnost (p)			
Biljna vrsta	list-stabljika	list-cvat	stabljika-cvat
<i>P. altissima</i>	<0,010	<0,010	<0,001
<i>P. argentea</i>	<0,050	<0,200	<0,001
<i>P. coronopus</i>	<0,010	<0,050	<0,001
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>depauperata</i>	<0,020	<0,010	<0,001
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>holosteum</i>	<0,020	<0,010	<0,001
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>scopulorum</i>	<0,300	<0,010	<0,001
<i>P. lagopus</i>	<0,010	<0,010	<0,020
<i>P. maritima</i>	<0,001	<0,001	<0,001

Iz tablice 8 vidljivo je da su najveće razlike flavonoidnog sadržaja među pojedinim biljnim organima zabilježene u vrste *P. maritima* ($p < 0,001$). Između lista i stabljike vrste *P. holosteum* subsp. *scopulorum* utvrđena je najmanja razlika u količini flavonoida ($p < 0,3$). Uglavnom su se statistički najviše razlikovali udjeli flavonoida stabljika i cvatova istih vrsta ($p < 0,001$, osim u *P. lagopus*: $p < 0,02$).

Tablica 9. Statistička usporedba udjela flavonoida među nižim svojtama vrste *Plantago holosteum* Scop.

Vjerojatnost (p)			
<i>P. holosteum</i> Scop.	L – L	S – S	C – C
<i>depauperata</i> / <i>holosteum</i>	<0,300	<0,001	<0,020
<i>depauperata</i> / <i>scopulorum</i>	<0,050	<0,010	<0,001
<i>holosteum</i> / <i>scopulorum</i>	<0,200	<0,300	<0,001

L – L statistička usporedba listova

S – S statistička usporedba stabljika

C – C statistička usporedba cvatova

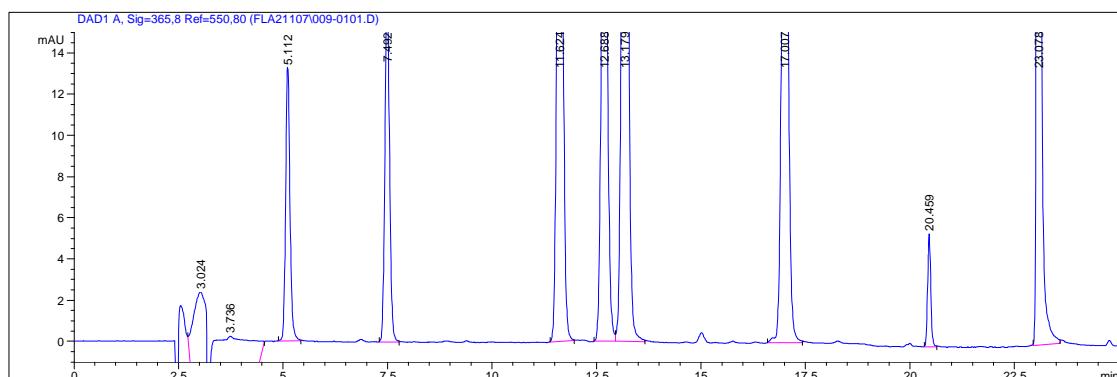
Statističkom prosudbom rezultata dobivenih za niže svojte vrste *P. holosteum*, utvrđeno je da se sadržajem flavonoida međusobno najviše razlikuju listovi podvrsta *depauperata* i *scopulorum*, stabljike podvrsta *depauperata* i *holosteum*, te cvatovi podvrste *scopulorum* u odnosu na ostala dva taksona (tablica 9).

Općenito se može ustvrditi da su flavonoidnim supstancijama najbogatiji nadzemni dijelovi (list + stabljika + cvat) vrste *P. argentea* (0,221%), dok ih je najmanje sadržano u nadzemnim dijelovima vrste *P. coronopus* (0,089%).

3.3.3.3. HPLC karakterizacija flavonoida i fenolnih kiselina

Reverzno-fazna HPLC analiza metanolno-vodenih ekstrakata listova istraživanih vrsta roda *Plantago* L. provedena je Agilent 1100 Series HPLC sustavom, na koloni Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (veličina čestica 5 µm, 250 × 4,6 mm i.d.), s pretkolonom istog tipa punila. Primijenjena je gradijentna metoda (poglavlje 2.3.4.3.) za dvokomponentnu mobilnu fazu (A – voda i TFA, pH = 2,50; B – acetonitril), uz protok od 1,0 mL/min i temperaturu od 30 °C. Otopine standardnih supstancija (0,01 mg/mL) i biljni ekstrakti (20 mg suhe droge/mL) injektirani su u volumenima od 25 µL. Pikovi odijeljenih flavonoida i fenolnih kiselina detektirani su DA-detektorom, na valnim duljinama od 365 ± 8 nm i 204 ± 4 nm, uz referentnu valnu duljinu od 550 ± 80 nm.

U navedenim uvjetima uspješno je provedeno odjeljivanje pojedinih komponenata smjese standarda (slika 65, prilog 19), a njihov je identitet potvrđen usporedbom s retencijskim vremenima dobivenim analizom otopina svakog pojedinog standarda, kao i usporedbom s njihovim originalnim UV spektrima.



Slika 65. HPLC kromatogram smjese standarda. Kolona: Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (250 × 4,6 mm, 5 µm); mobilna faza: voda/acetonitril, 85:15 (0-15 min), 77,5:22,5 (15-20 min) i 60:40 (20-30 min); protok: 1,0 mL/min; detekcija: 365 nm.

Pikovi sastavnica biljnih ekstrakata identificirani su usporedbom s odgovarajućim standardima, čiji su eksperimentalni podaci prikazani tablicom 10.

Tablica 10. Rezultati HPLC analize standarda flavonoida i fenolnih kiselina

Analit	Rt	PA	Udio (%)	S/N	LOQ/konc.	LOQ/%
Klorogenska kis.	5,115	97,9	98,8	457,3	0,000219	0,0011
Kavena kis.	7,485	142,8	100,0	555,9	0,000180	0,0009
Rutin	11,613	361,0	98,8	1078,0	0,000093	0,0005
Hiperozid	12,668	304,2	96,0	1130,4	0,000088	0,0004
Izokvercitrin	13,152	440,5	98,0	1279,3	0,000078	0,0004
Kvercitrin	16,976	358,8	90,7	1131,7	0,000088	0,0004
Kvercetin	23,075	759,2	96,6	1535,7	0,000065	0,0003

Rt – retencijsko vrijeme (*retention time*)

PA – površina pika (*peak area*)

S/N – omjer signala i šuma (*signal/noise*)

LOQ – granica određivanja (*limit of quantification*)

Kako bi se izbjeglo pogrešno tumačenje rezultata analize, primijenjena je metoda standardnih dodataka. Postavljena je sekvenca uzoraka i provedena analiza početno injektiranih $25 \mu\text{L}$ pojedinih biljnih ekstrakata. U svakoj sljedećoj analizi, u originalni uzorak dodan je određeni volumen smjese standarda (3 i $15 \mu\text{L}$) i praćeno je povećanje originalnih pikova analiziranih flavonoidnih supstancija i fenolnih kiselina. Na taj način izbjegnuta je nesigurnost u tumačenju slabije odijeljenih pikova. Kvantifikacija rezultata analize provedena je metodom vanjskog standarda.

Najveći problem u interpretaciji razvijenih HPLC kromatograma predstavlja je slučaj flavonoidnog glikozida izokvercitrina. Prethodno je dokazan pomoću TLC u svih analiziranih uzoraka, dok ga je HPLC potvrdila jedino u uzorku *P. argentea* ($\text{Rt} = 13,049$ min, udio $0,02\%$), a u ostalim je uzorcima bio djelomice ili potpuno prekriven pikom neke druge supstancije (različiti UV spektri). Iridoidni glikozid aukubin također nije uspješno analiziran opisanom metodom. U 30 minuta analize, uz praćenje DAD-signala na 204 i 365 nm, nije potvrđena njegova prisutnost u analiziranim uzorcima.

Maseni udjeli praćenih flavonoida kvercetinskog aglikona (tablice 11-14) i fenolnih kiselina (tablice 15 i 16) znatno su varirali u istraživanim biljnim vrstama.

Tablica 11. Sadržaj rutina u listovima vrsta roda *Plantago* L.

Takson	Rutin		
	Rt	PA	%
<i>P. altissima</i>	11,40	0	0,000
<i>P. argentea</i>	11,59	178,6	0,024
<i>P. coronopus</i>	11,40	0	0,000
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>depauperata</i>	11,54	36,9	0,005
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>holosteum</i>	11,51	38,2	0,005
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>scopulorum</i>	11,51	53,5	0,007
<i>P. lagopus</i>	11,40	0	0,000
<i>P. maritima</i>	11,50	54,9	0,007

Tablica 12. Sadržaj hiperozida u listovima vrsta roda *Plantago* L.

Takson	Hiperozid		
	Rt	PA	%
<i>P. altissima</i>	12,60	75,3	0,012
<i>P. argentea</i>	12,68	42,6	0,007
<i>P. coronopus</i>	12,58	104,3	0,017
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>depauperata</i>	12,60	0	0,000
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>holosteum</i>	12,58	68,2	0,011
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>scopulorum</i>	12,60	0	0,000
<i>P. lagopus</i>	12,54	123,2	0,020
<i>P. maritima</i>	12,60	0	0,000

Tablica 13. Sadržaj kvercitrina u listovima vrsta roda *Plantago* L.

Takson	Kvercitrin		
	Rt	PA	%
<i>P. altissima</i>	16,88	15,9	0,002
<i>P. argentea</i>	16,89	11,4	0,001
<i>P. coronopus</i>	17,05	69,2	0,009
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>depauperata</i>	16,74	7,4	0,001
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>holosteum</i>	16,97	102,9	0,013
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>scopulorum</i>	16,92	38,0	0,005
<i>P. lagopus</i>	16,86	61,8	0,008
<i>P. maritima</i>	16,89	3,2	0,000

Tablica 14. Sadržaj kvercetina u listovima vrsta roda *Plantago* L.

Takson	Kvercetin		
	Rt	PA	%
<i>P. altissima</i>	23	0	0,000
<i>P. argentea</i>	23	0	0,000
<i>P. coronopus</i>	23	0	0,000
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>depauperata</i>	23,05	128,1	0,008
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>holosteum</i>	23,02	233,7	0,014
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>scopulorum</i>	23,02	465,8	0,028
<i>P. lagopus</i>	23	0	0,000
<i>P. maritima</i>	23,02	94,3	0,006

Tablica 15. Sadržaj klorogenske kiseline u listovima vrsta roda *Plantago* L.

	Klorogenska kiselina		
Takson	Rt	PA	%
<i>P. altissima</i>	5,10	45,2	0,023
<i>P. argentea</i>	5,05	13,5	0,007
<i>P. coronopus</i>	5,07	6,4	0,003
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>depauperata</i>	5,07	7,3	0,004
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>holosteum</i>	5,06	21,3	0,011
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>scopulorum</i>	5,00	4,2	0,002
<i>P. lagopus</i>	5,06	226,4	0,115
<i>P. maritima</i>	5,06	12,7	0,006

Tablica 16. Sadržaj kavene kiseline u listovima vrsta roda *Plantago* L.

	Kavena kiselina		
Takson	Rt	PA	%
<i>P. altissima</i>	7,50	85,2	0,033
<i>P. argentea</i>	7,40	0	0,000
<i>P. coronopus</i>	7,40	120,0	0,046
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>depauperata</i>	7,40	59,3	0,023
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>holosteum</i>	7,39	0	0,000
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>scopulorum</i>	7,38	87,7	0,034
<i>P. lagopus</i>	7,42	2,5	0,001
<i>P. maritima</i>	7,36	0	0,000

Najviše rutina sadržavala je vrsta *P. argentea* (0,024%), dok su ostale vrijednosti iznosile od 0,005 do 0,007%. U vrstama *P. altissima*, *P. coronopus* i *P. lagopus* njegova prisutnost nije potvrđena. Udio hiperozida u analiziranim biljkama iznosio je od 0,007% (*P. argentea*) do 0,02% (*P. lagopus*). Taksoni *P. holosteum* subsp. *depauperata*, *P. holosteum* subsp. *scopulorum* i *P. maritima* nisu sadržavali spomenuti glikozid. Kvercitrin je bio prisutan u svim biljnim uzorcima, osim u vrste *P. maritima*. Dobivene vrijednosti bile su u rasponu od 0,001% (*P. argentea* i *P. holosteum* subsp. *depauperata*) do 0,013% (*P. holosteum* subsp. *holosteum*). Slobodni aglikon kvercetin nije dokazan u vrsta *P. altissima*, *P. argentea*, *P. coronopus* i *P. lagopus*, dok je u ostalih vrsta njegov udio iznosio od 0,006% (*P. maritima*) do 0,028% (*P. holosteum* subsp. *scopulorum*). Prisutnost klorogenske kiseline potvrđena je opisanom metodom u svim biljnim uzorcima, a sadržaj joj je bio u širokom rasponu masenih udjela, od 0,002% (*P. holosteum* subsp. *scopulorum*) do 0,115% (*P. lagopus*). Kavena kiselina određena je u metanolno-vodenim ekstraktima listova taksona *P. altissima*, *P. coronopus*, *P. holosteum* subsp. *depauperata*, *P. holosteum* subsp. *scopulorum* i *P. lagopus*. Njezin je udio u analiziranom biljnom materijalu iznosio od 0,001 do 0,046%.

Opisana HPLC metoda pokazala se uspješnom u odvajanju fenolnih kiselina i većine flavonoidnih sastavnica iz složene matrice biljnih uzoraka, kao i za njihovo međusobno odjeljivanje, identifikaciju i određivanje (prilozi 20-27). Također se može kvalitetno primijeniti u svrhu "fingerprint" analize, kao doprinos kemotaksonomskom proučavanju određenih biljnih svojti.

3.3.4. Trjeslovine

3.3.4.1. Kvalitativna analiza trjeslovina

Prisutnost trjeslovina u nadzemnim dijelovima analiziranih biljaka roda *Plantago* dokazana je općim reakcijama s metalnim solima i želatinom. Dodatkom željezo(III)-klorida u vodene ekstrakte (poglavlje 2.3.5.1.) nastao je maslinastozeleni talog. U reakciji sa željezo(III)-amonij-sulfatom uočeno je maslinastozeleno obojenje. Nakon dodatka olovo-acetata, nastao je tamnonarančasti talog, dok se vrlo blago zamućenje otopine pojavilo u reakciji sa želatinom.

Dodatkom formaldehida i kloridne kiseline nastao je zelenkasti talog u vodenim ekstraktima taksona *P. holosteum* subsp. *depauperata*, *P. holosteum* subsp. *scopulorum* i *P. maritima*, dok se plavoljubičasti prsten pojavio u svim analiziranim uzorcima nakon dodatka natrij-acetata i željezo(III)-amonij-sulfata. Navedenim razlučnim reakcijama dokazano je da listovi svih analiziranih uzoraka sadrže trjeslovine koje hidroliziraju. Prisutnost kondenziranih trjeslovina potvrđena je za *P. holosteum* subsp. *depauperata*, *P. holosteum* subsp. *scopulorum* i *P. maritima*.

3.3.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola i trjeslovina

Kvantitativna analiza trjeslovina u nadzemnim dijelovima istraživanih vrsta roda *Plantago* provedena je metodom prema Schneideru (poglavlje 2.3.5.2.), koja se zasniva na prethodnom taloženju trjeslovina s kazeinom, a potom reakciji s Folin-Ciocalteusovim fenolnim reagensom.

Količina ukupnih polifenola i trjeslovina određena je pomoću baždarnog pravca, na osnovi izmjerениh apsorbancija analiziranih otopina (tablice 17 i 20). Tablice 18, 19, 21 i 22 donose statističke prosudbe dobivenih kvantitativnih rezultata primjenom Studentova *t*-testa. Uspoređeni su udjeli ukupnih polifenola i trjeslovina pojedinih biljnih organa istog taksona, te udjeli analiziranih spojeva u listovima, stabljikama i cvatovima nižih svojti vrste *P. holosteum*.

Tablica 17. Sadržaj ukupnih polifenola u vrstama roda *Plantago* L.

Udio ukupnih polifenola (%); $\bar{x} \pm SD$, n = 3			
Biljna vrsta	List	Stabljika	Cvat
<i>P. altissima</i>	4,55 ± 0,16	3,57 ± 0,10	3,07 ± 0,09
<i>P. argentea</i>	7,51 ± 0,30	3,68 ± 0,21	5,56 ± 0,18
<i>P. coronopus</i>	5,45 ± 0,25	3,55 ± 0,17	3,13 ± 0,11
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>depauperata</i>	5,05 ± 0,21	3,25 ± 0,13	2,79 ± 0,09
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>holosteum</i>	10,15 ± 0,52	4,13 ± 0,29	3,91 ± 0,22
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>scopulorum</i>	7,39 ± 0,31	4,34 ± 0,25	4,93 ± 0,07
<i>P. lagopus</i>	4,59 ± 0,26	3,15 ± 0,16	3,71 ± 0,15
<i>P. maritima</i>	7,32 ± 0,35	2,80 ± 0,23	3,57 ± 0,08

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola u istraživanim biljnim vrstama, prikazani tablicom 17, pokazuju da najveću količinu ukupnih polifenola sadrže listovi, od 4,55% (*P. altissima*) do 10,15% (*P. holosteum* subsp. *holosteum*). U stabljikama je njihov sadržaj bio u granicama od 2,80% (*P. maritima*) do 4,34% (*P. holosteum* subsp. *scopulorum*), dok je polifenolnih spojeva u cvatovima bilo od 2,79% (*P. holosteum* subsp. *depauperata*) do 5,56% (*P. argentea*).

Statističkom procjenom rezultata određivanja ukupnih polifenola primjenom Studentova *t*-testa (tablica 18), moguće je uočiti znatne razlike polifenolnog sadržaja listova u odnosu na stabljike i cvatove istih vrsta ($p < 0,001$, osim *P. lagopus*, gdje je $p < 0,01$). U vrste *P. argentea* uočena je najveća različitost udjela polifenolnih spojeva cvata i stabljike ($p < 0,001$), dok su za ostale vrste utvrđene statistički manje razlike: *P. altissima*, *P. holosteum* subsp. *depauperata* i *P. maritima* za $p < 0,01$; *P. holosteum* subsp. *scopulorum* i *P. lagopus* za $p < 0,02$; *P. coronopus* za $p < 0,05$ te *P. holosteum* subsp. *holosteum* za $p < 0,4$.

Tablica 18. Statistička usporedba udjela ukupnih polifenola u različitim biljnim organima pojedinih vrsta roda *Plantago* L.

Vjerojatnost (p)			
Biljna vrsta	list-stabljika	list-cvat	stabljika-cvat
<i>P. altissima</i>	<0,001	<0,001	<0,010
<i>P. argentea</i>	<0,001	<0,001	<0,001
<i>P. coronopus</i>	<0,001	<0,001	<0,050
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>depauperata</i>	<0,001	<0,001	<0,010
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>holosteum</i>	<0,001	<0,001	<0,400
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>scopulorum</i>	<0,001	<0,001	<0,020
<i>P. lagopus</i>	<0,010	<0,010	<0,020
<i>P. maritima</i>	<0,001	<0,001	<0,010

Usporedbom nižih svojti vrste *P. holosteum* (tablica 19), utvrđena je najveća razlika u polifenolnom sadržaju listova podvrste *depauperata* u odnosu na ostala dva taksona, te u količini polifenola cvatova podvrsta *depauperata* i *scopulorum* ($p < 0,001$). Najmanje su se razlikovali udjeli polifenolnih spojeva u stabljikama podvrsta *holosteum* i *scopulorum* ($p < 0,4$).

Tablica 19. Statistička usporedba udjela ukupnih polifenola među nižim svojstama vrste *Plantago holosteum* Scop.

Vjerojatnost (p)			
<i>P. holosteum</i> Scop.	L – L	S – S	C – C
<i>depauperata</i> / <i>holosteum</i>	<0,001	<0,010	<0,010
<i>depauperata</i> / <i>scopulorum</i>	<0,001	<0,010	<0,001
<i>holosteum</i> / <i>scopulorum</i>	<0,010	<0,400	<0,010

L – L statistička usporedba listova

S – S statistička usporedba stabljika

C – C statistička usporedba cvatova

Ukupni sadržaj polifenolnih spojeva u nadzemnim organima (list + stabljika + cvat) istraživanih vrsta roda *Plantago* najveći je u taksona *P. holosteum* subsp. *holosteum* (18,19%), dok najmanji udio ukupnih polifenola u nadzemnim dijelovima sadrži *P. holosteum* subsp. *depauperata* (11,09%).

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja trjeslovinskog udjela u nadzemnim biljnim organima analiziranih vrsta roda *Plantago* prikazani su tablicom 20.

Tablica 20. Sadržaj trjeslovina u vrstama roda *Plantago* L.

Udio trjeslovina (%); $\bar{x} \pm SD$, n = 3			
Biljna vrsta	List	Stabljika	Cvat
<i>P. altissima</i>	1,07 ± 0,15	0,28 ± 0,07	0,44 ± 0,09
<i>P. argentea</i>	2,26 ± 0,20	0,81 ± 0,16	0,96 ± 0,18
<i>P. coronopus</i>	0,82 ± 0,12	1,00 ± 0,12	1,07 ± 0,11
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>depauperata</i>	1,32 ± 0,21	0,50 ± 0,08	0,72 ± 0,09
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>holosteum</i>	1,99 ± 0,30	0,87 ± 0,21	1,03 ± 0,22
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>scopulorum</i>	0,86 ± 0,05	0,56 ± 0,05	2,21 ± 0,07
<i>P. lagopus</i>	0,56 ± 0,17	0,84 ± 0,13	1,36 ± 0,15
<i>P. maritima</i>	0,93 ± 0,13	0,49 ± 0,09	0,72 ± 0,08

Utvrđeno je da listovi sadrže trjeslovine koje se talože s kazeinom u količini od 0,56% (*P. lagopus*) do 2,26% (*P. argentea*). U stabljikama je udio analiziranih tvari bio nešto manji i iznosio je od 0,28% (*P. altissima*) do 1,00% (*P. coronopus*). Najviši trjeslovinski sadržaj cvatova zabilježen je u taksona *P. holosteum* subsp. *scopulorum* (2,21%), dok je trjeslovinama najsiromašniji cvatni uzorak vrste *P. altissima* (0,44%).

Primjenom Studentova *t*-testa provedena je statistička usporedba trjeslovinskih udjela u različitim organima pojedinih biljnih vrsta (tablica 21).

Tablica 21. Statistička usporedba udjela trjeslovina u različitim biljnim organima pojedinih vrsta roda *Plantago* L.

Vjerojatnost (p)			
Biljna vrsta	list-stabljika	list-cvat	stabljika-cvat
<i>P. altissima</i>	<0,010	<0,010	<0,100
<i>P. argentea</i>	<0,001	<0,010	<0,400
<i>P. coronopus</i>	<0,200	<0,100	<0,500
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>depauperata</i>	<0,010	<0,020	<0,050
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>holosteum</i>	<0,010	<0,020	<0,500
<i>P. holosteum</i> subsp. <i>scopulorum</i>	<0,010	<0,001	<0,001
<i>P. lagopus</i>	<0,100	<0,010	<0,020
<i>P. maritima</i>	<0,010	<0,100	<0,050

Najviše su se sadržajem trjeslovina međusobno razlikovali pojedini nadzemni organi taksona *P. holosteum* subsp. *scopulorum*, a najmanja je razlika u trjeslovinskim udjelima listova, stabljika i cvatova utvrđena za vrstu *P. coronopus*. Općenito je zapažena najveća varijabilnost sadržaja analiziranih tvari među listovima i stabljikama, dok je statistički najmanja razlika zabilježena između stabljika i cvatova istih vrsta.

Međusobnom usporedbom nižih svojti vrste *P. holosteum* (tablica 22), pokazalo se da su se cvatovi podvrste *scopulorum* znatno razlikovali sadržajem trjeslovina od cvatova ostalih taksona ($p < 0,001$). Najveća razlika trjeslovinskih udjela u listovima zabilježena je među podvrstama *holosteum* i *scopulorum* ($p < 0,01$), dok su se količinom trjeslovina u stabljikama najviše razlikovali uzorci podvrsta *depauperata* i *holosteum*. Općenito je najmanja različitost trjeslovinskog sadržaja nižih svojti vrste *P. holosteum* uočena među stabljikama taksona *depauperata* i *scopulorum* ($p < 0,4$).

Tablica 22. Statistička usporedba udjela trjeslovina među nižim svojama vrste *Plantago holosteum* Scop.

Vjerojatnost (p)			
<i>P. holosteum</i> Scop.	L – L	S – S	C – C
<i>depauperata</i> / <i>holosteum</i>	<0,050	<0,050	<0,100
<i>depauperata</i> / <i>scopulorum</i>	<0,050	<0,400	<0,001
<i>holosteum</i> / <i>scopulorum</i>	<0,010	<0,100	<0,001

L – L statistička usporedba listova

S – S statistička usporedba stabljika

C – C statistička usporedba cvatova

Općenito je najveći sadržaj trjeslovina u nadzemnim dijelovima (list + stabljika + cvat) istraživanih vrsta roda *Plantago* određen u vrste *P. argentea* (4,03%), dok je najmanji udio zabilježen u nadzemnim dijelovima vrste *P. altissima* (1,79%).

3.3.5. Saponini i triterpeni

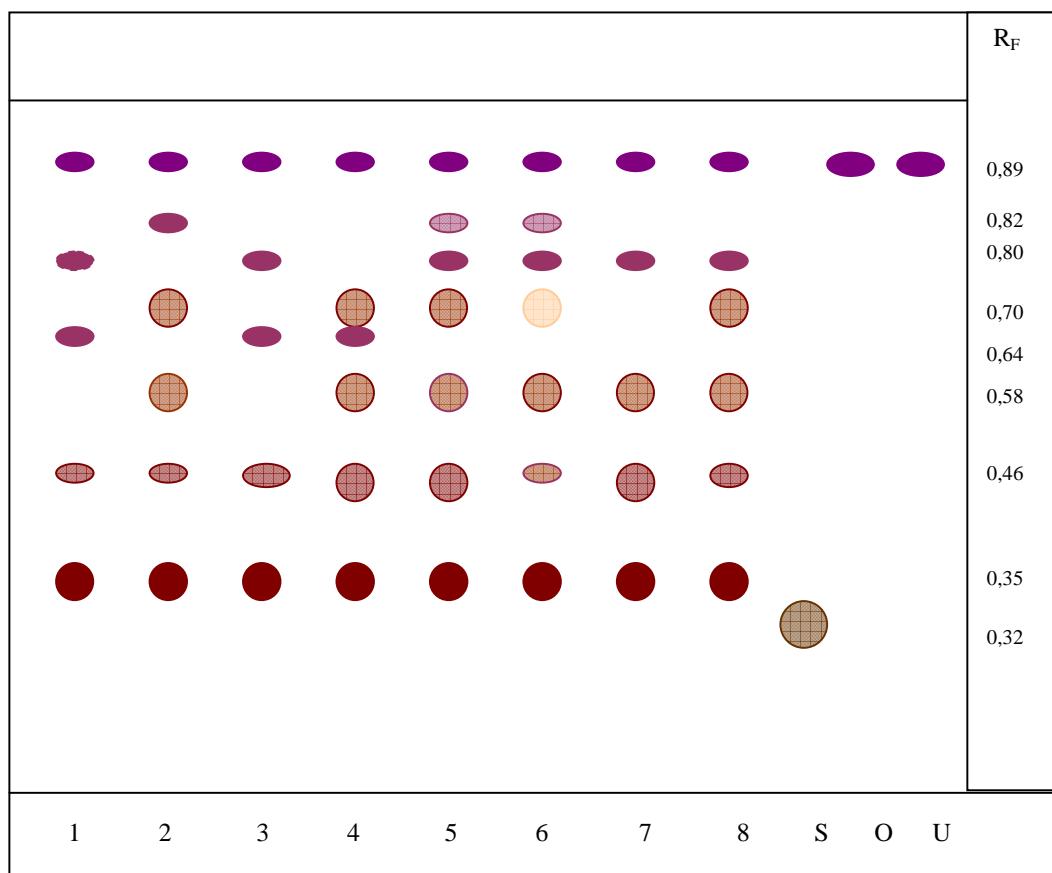
3.3.5.1. Kvalitativna analiza saponina i triterpena

Metanolni ekstrakti listova (poglavlje 2.3.6.1.) analizirani su metodom tankoslojne kromatografije. Odjeljivanje supstancija postignuto je na tankom sloju adsorbensa Kieselgela 60 F₂₅₄, pomoću razvijača kloroform-metanol-voda, 64:50:10 (V/V). Detekcija razvijenih kromatografskih zona provedena je prskanjem klorsulfonskom kiselinom i zagrijavanjem na 105 °C (slika 66).

Uočeno je osam smeđih i ljubičastih saponinskih i triterpenskih sastavnica. Veličinom kromatografske zone i intenzivnom smeđom bojom isticala se saponinska supstancija R_F- vrijednosti 0,35, koju su sadržavali svi biljni uzorci, kao i sastavnicu ljubičastosmeđe boje, R_F-vrijednosti 0,46. Ljubičasta zona ($R_F=0,89$) odgovarala je poredbenim triterpenskim kiselinama (oleanolna i ursolna kiselina), a detektirana je u svim istraženim biljkama. Najviše saponinskih i triterpenskih zona zabilježeno je u taksonima *P. holosteum* subsp. *holosteum* i *P. holosteum* subsp. *scopulorum*. Analiziranim tvarima također su obilovali taksoni *P. argentea*, *P. holosteum* subsp. *depauperata* i *P. maritima*, dok ih je nešto manje bilo prisutno u vrstama *P. altissima*, *P. coronopus* i *P. lagopus*.

Razvijač: kloroform – metanol – voda (64:50:10, V/V)

Detekcija: klorsulfonska kiselina, 105 °C



- | | |
|--|-------------------------|
| 1. <i>P. altissima</i> | S – saponinski standard |
| 2. <i>P. argentea</i> | O – oleanolna kiselina |
| 3. <i>P. coronopus</i> | U – ursolna kiselina |
| 4. <i>P. holosteum</i> subsp. <i>depauperata</i> | |
| 5. <i>P. holosteum</i> subsp. <i>holosteum</i> | |
| 6. <i>P. holosteum</i> subsp. <i>scopulorum</i> | |
| 7. <i>P. lagopus</i> | |
| 8. <i>P. maritima</i> | |

Slika 66. Kromatogram saponina i triterpena vrsta roda *Plantago* L.

3.3.6. Steroli i triterpenske kiseline

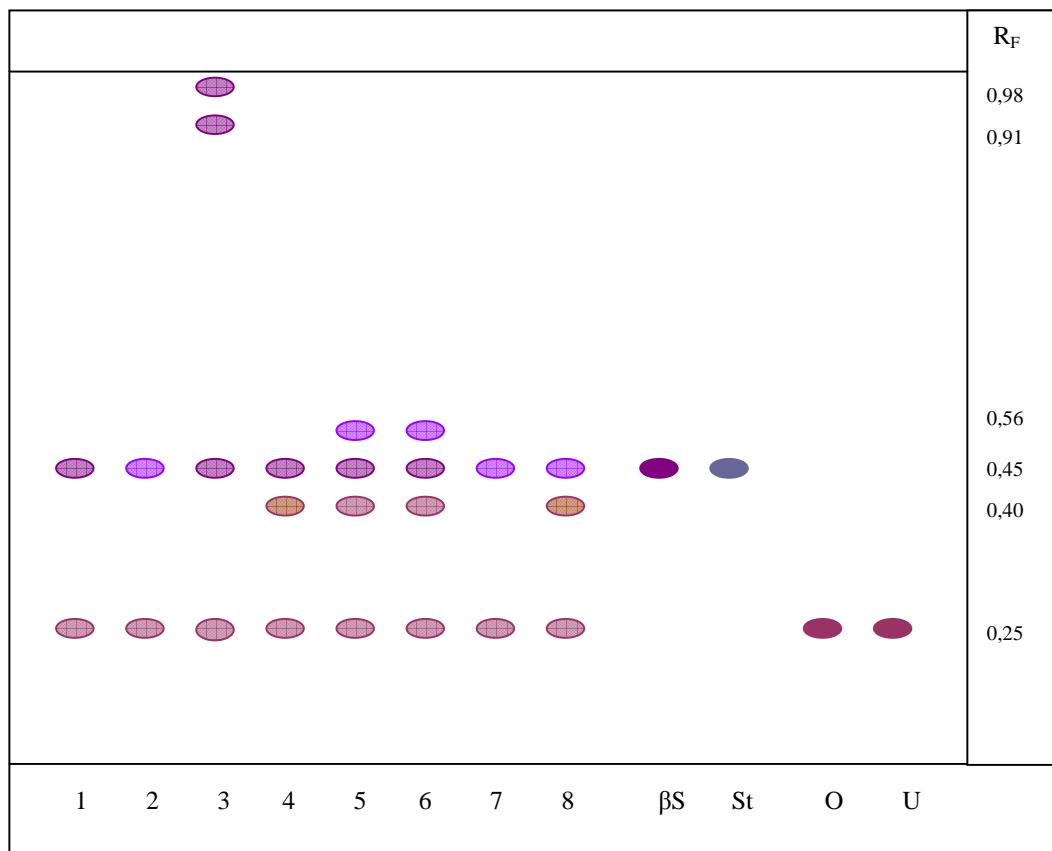
3.3.6.1. Kvalitativna analiza sterola i triterpenskih kiselina

Metanolni ekstrakti listova (poglavlje 2.3.6.1.) podvrgnuti su kromatografskom odjeljivanju na tankom sloju. Primijenjen je adsorbens Kieselgel 60 F₂₅₄ i razvijač benzen-aceton, u omjeru 9:1 (V/V). Detekcija sterola i triterpenskih kiselina provedena je prskanjem kromatograma klorsulfonskom kiselinom, uz zagrijavanje nekoliko minuta na 105 °C (slika 67).

Nakon vizualizacije, na razvijenom kromatogramu detektirano je šest zona sterolnih i triterpenskih sastavnica. Odijeljena supstancija, koja se s klorsulfonskom kiselinom obojila ljubičastocrveno, prema boji i R_F-vrijednosti (0,25) odgovara oleanolnoj i/ili ursolnoj kiselini. Ljubičastoplava zona R_F-vrijednosti 0,45 predstavlja sterolnu frakciju u kojoj su detektirani β-sitosterol i/ili stigmasterol. Nije uočena velika razlika u sastavu analiziranih tvari među istraženim biljnim uzorcima. Triterpenske kiseline, β-sitosterol i stigmasterol sadržavali su svi analizirani biljni taksoni. Utvrđena je prisutnost još četiri sastavnice metanolnih ekstrakata listova, koje su nakon prskanja reagensom poprimile ljubičastu boju različita intenziteta. Zabilježene su u sljedećih vrsta: *P. coronopus* (R_F-vrijednosti 0,91 i 0,98), *P. holosteum* subsp. *depauperata* (R_F = 0,40) *P. holosteum* subsp. *holosteum* (R_F-vrijednosti 0,40 i 0,56), *P. holosteum* subsp. *scopulorum* (R_F-vrijednosti 0,40 i 0,56) i *P. maritima* (R_F = 0,40).

Razvijač: benzen – aceton (9:1, V/V)

Detekcija: klorsulfonska kiselina, 105 °C



1. *P. altissima*
2. *P. argentea*
3. *P. coronopus*
6. *P. holosteum* subsp. *depauperata*
7. *P. holosteum* subsp. *holosteum*
6. *P. holosteum* subsp. *scopulorum*
7. *P. lagopus*
8. *P. maritima*

βS – β -sitosterol
St – stigmasterol
O – oleanolna kiselina
U – ursolna kiselina

Slika 67. Kromatogram sterola i triterpenskih kiselina vrsta roda *Plantago* L.

3.3.7. Rezultati matematičko-statističke prosudbe postupka spektrofotometrijskog određivanja trjeslovina

Standardni postupak mora biti učinkovit za mjerjenje radne mase analita, ispravan u smislu dobivanja vjerodostojnih rezultata analize i pouzdan, kako bi se osigurala ponovljivost i obnovljivost rezultata mjerjenja. Da bi se neki postupak mogao proglašiti standardnim (ili poredbenim), potrebno je objektivno odlučiti o njegovoj radnoj podobnosti i pouzdanosti.

Za radno područje tanina od 5,0 do 50,0 µg provedena su 24 mjerena (N), svrstana u 6 grupa, čiju veličinu čine četiri istovjetna mjerena jednog uzorka ($L = 4$). Izloženi plan pokusa prilagođen je programskom paketu ESKULAP (poglavlje 2.3.8.). Svako mjerjenje provedeno je pod stalnim radnim i tehničkim uvjetima i za svako je mjerjenje dobivena grupa od tri početna podatka:

A_B = apsorbancija slijepog pokusa

A_X = apsorbancija uzorka

A = korigirana vrijednost apsorbancije ($A = A_X - A_B$).

Vrijednosti koje karakteriziraju analitički sustav izračunate su iz korigirane vrijednosti apsorbancije. Tablica 23 donosi osnovne eksperimentalne podatke koji su dobiveni mjerenjem apsorbancije otopina s određenom količinom tanina, nakon reakcije s Folin-Ciocalteusovim reagensom.

Osnovna izračunavanja nalaze se u tablici 24. Vidljivo je da se relativna standardna odstupanja za slijepa mjerena (RSD_B) rasprostiru od $\pm 5,13\%$ do $\pm 18,06\%$, za izmjerenu apsorbanciju su relativna standardna odstupanja (RSD_X) bila u području od $\pm 0,60\%$ do $\pm 4,88\%$, dok su za korigiranu apsorbanciju vrijednosti RSD varirale od $\pm 0,58\%$ do $\pm 5,27\%$.

Ispitivanje homogenosti dobivenih rezultata provedeno je i prema Bartlettu, pri čemu homogenost odstupanja daje uvid u strukturu podataka i omogućava brzo otkrivanje izvora pogreške (tablica 24). Taj se test temelji na ispitivanju homogenosti standardnih odstupanja (SD) i relativnih standardnih odstupanja (RSD) za slijepu, izmjerene i korigirane vrijednosti

apsorbancije. Veličine SD i RSD za slijepe i izmjerene vrijednosti uzorka strogoo su homogene, kao i SD vrijednosti za korigiranu apsorbanciju uzorka, dok su vrijednosti RSD za korigiranu apsorbanciju homogene. Rezultati ispitivanja homogenosti prema Bartlettovu pokazuju visok stupanj homogenosti svih eksperimentalno dobivenih vrijednosti.

Tablica 23. Skupine s početnim podacima

<i>Skupine (J)</i>	<i>Mjerenje (i)</i>	n_a (μg)	A_B	A_X	A
1	1	50,0	0,01054	0,56076	0,55022
	2		0,01121	0,55667	0,54546
	3		0,01002	0,55263	0,54261
	4		0,01109	0,57030	0,54594
6	1	5,0	0,01072	0,08830	0,07758
	2		0,00955	0,08152	0,07196
	3		0,01068	0,07899	0,06831
	4		0,00910	0,08120	0,07211
2	1	40,0	0,00999	0,46364	0,45366
	2		0,01134	0,46141	0,45007
	3		0,01277	0,48195	0,46918
	4		0,00852	0,47214	0,46362
5	1	10,0	0,01118	0,13153	0,12035
	2		0,00914	0,12127	0,11213
	3		0,01363	0,12568	0,11205
	4		0,00984	0,12307	0,00323
3	1	30,0	0,01125	0,33432	0,32307
	2		0,00766	0,32467	0,31701
	3		0,01001	0,32287	0,31286
	4		0,00950	0,34330	0,33380
4	1	20,0	0,01305	0,23101	0,21796
	2		0,00998	0,22877	0,21880
	3		0,01245	0,22526	0,21281
	4		0,01087	0,22436	0,21349

Osjetljivost K u skupini s najmanjom masom analita ($5,0 \mu\text{g}$) ima najveću vrijednost, što može biti posljedica veće osjetljivosti instrumenta za vrlo male mase ili slučajne eksperimentalne pogreške. Prethodna provjera linearnosti, prikazana u tablici 25 (zahtjev 4), pokazuje odlično razlučivanje signala koji se dobije mjeranjem otopine analita i slijepo prosudbe.

Rezultati jednostavne analize varijance za slijepo vrijednosti prikazani su tablicom 26. Ti podaci uključuju rasap unutar grupa, rasap između grupa i ukupno standardno odstupanje za slijepo vrijednosti.

Rasap unutar grupa, SD_u^2 :

$$SD_u^2 = 1/6 \sum_{j=1}^6 SD_j^2 = 2,069 \times 10^{-6} \quad (f = N - K = 18)$$

Rasap između grupa, SD_I^2 :

$$SD_I^2 = 4/5 \sum_{j=1}^6 (\bar{A}_B - \bar{\bar{A}}_B)^2 = 1,956 \times 10^{-6} \quad (f = K - 1 = 5)$$

Ukupno standardno odstupanje za slijepo vrijednosti apsorbancije, SD_{Buk} :

$$SD_{Buk} = \sqrt{1/23(18SD_u^2 + 5SD_I^2)} = \pm 0,00143 \quad (f = 23),$$

gdje su SD standardna odstupanja, a f je stupanj slobode.

Ako rasap unutar pojedinih grupa (SD_u^2) nije statistički različit od rasapa između grupa (SD_I^2), to ide u prilog homogenosti podataka (zahtjev 5). Budući da je veličina za uspoređivanje $F = 2,77$, omjer $SD_I^2/SD_u^2 < 2,77$ pokazuje da su podaci homogeni.

Tablica 24. Rasap po grupama od (1) do (6)

	\bar{A}_B	SD_B	\bar{A}_X	SD_X	\bar{A}	SD	\bar{K}_a	SD_K
<i>j</i>		(RSD_B , %)		(RSD_X , %)		(RSD , %)		(RSD_K)
1	0,0107	$\pm 0,00055$ ($\pm 5,13$)	0,5568	$\pm 0,0033$ ($\pm 0,60$)	0,5461	$\pm 0,0031$ ($\pm 0,58$)	0,0109	$\pm 0,00006$ ($\pm 0,58$)
6	0,0493	$\pm 0,00082$ ($\pm 8,15$)	0,0825	$\pm 0,0040$ ($\pm 4,88$)	0,0725	$\pm 0,0038$ ($\pm 5,27$)	0,0145	$\pm 0,00076$ ($\pm 5,27$)
2	0,0499	$\pm 0,00182$ ($\pm 17,11$)	0,4698	$\pm 0,0093$ ($\pm 1,99$)	0,4591	$\pm 0,0088$ ($\pm 1,92$)	0,0115	$\pm 0,00022$ ($\pm 1,92$)
5	0,0495	$\pm 0,00198$ ($\pm 18,06$)	0,1254	$\pm 0,0045$ ($\pm 3,57$)	0,1144	$\pm 0,0040$ ($\pm 3,47$)	0,0114	$\pm 0,00040$ ($\pm 3,47$)
3	0,0493	$\pm 0,00149$ ($\pm 15,50$)	0,3313	$\pm 0,0095$ ($\pm 2,85$)	0,3217	$\pm 0,0091$ ($\pm 2,83$)	0,0107	$\pm 0,00030$ ($\pm 2,83$)
4	0,0498	$\pm 0,00141$ ($\pm 12,20$)	0,2274	$\pm 0,00309$ ($\pm 1,36$)	0,2158	$\pm 0,0031$ ($\pm 1,41$)	0,0108	$\pm 0,00015$ ($\pm 1,41$)

Bartlettovo ispitivanje, $PV_{SD} (PV_{RSD})^b$

SD	5,08 s.h.	6,80 s.h.	6,92 s.h.
RSD (%)	(4,92 s.h.)	(10,77 s.h.)	(11,64 h.)

Srednje odstupanje šest grupа^c

SD	$\pm 0,00144$	$\pm 0,00624$	$\pm 0,00592$	$\pm 0,00039$
RSD (%)	($\pm 13,55$)	($\pm 2,91$)	($\pm 3,00$)	($\pm 3,00$)

^a $K = A/n_a$

^b $PV < 11,07$ strogo homogena odstupanja (s.h.);

$11,07 < PV < 15,09$ homogena odstupanja (h.);

$15,09 < PV < 20,52$ gotovo homogena odstupanja (g.h.);

$PV > 20,52$ nehomogena odstupanja (n.h.)

^c srednje odstupanje: $(R)SD = \sqrt{\sum_{j=1}^6 (R)SD^2 / 6}$

Tablica 25. Provjera grupa (1) i (6)

<i>Zahtjev</i>	<i>Rezultat</i>	<i>Iskaz</i>
1 $\bar{A}_{x_6} / \bar{A}_{B_6} = \alpha \geq 2$	$\alpha = 8,24$	Ne treba mijenjati količine, mase ili koncentracije analita na donjoj granici radnoga mjernog područja, $(n_a)_d$.
2 $RSD_{B1}, RSD_{B6} \leq PV$ $PV = 10(\alpha - 1) \%$ $PV = 72,40\%$	$RSD_{B1} = \pm 5,13\%$ $RSD_{B6} = \pm 8,15\%$	Utjecaj rasapa slijepih signala na RSD postupka je zanemariv.
3 $RSD_{x_6} \leq \pm 25\%$ $RSD_{x_1} \leq \pm 2,5\%$	$RSD_{x_6} = 4,88\%$ $RSD_{x_1} = 0,60\%$	Prag dokazivanja je niži od donje granice radnog područja analita, $(n_a)_d$.
4 $PV = \frac{\bar{I}_1 - \bar{I}_6}{SD_{x_6} + SD_{B_6}}$ $PV < 3,182$ $3,182 \leq PV < 5,841$ $5,841 \leq PV < 12,941$ $12,941 \geq PV$	$PV = 9,33$	Oдлична sposobnost razlučivanja signala.

Tablica 26. Analiza varijance

<i>Zahtjev</i>	<i>Rezultat</i>	<i>Iskaz</i>
5 $PV = SD_I^2 / SD_u^2$ $PV < F$ $F(P = 95, f_I = 5, f_u = 18) = 2,77$	$PV = 0,96$	Slijepe vrijednosti homogene.
6 $\bar{\bar{A}}_B < 0,005 \bar{A}_{x_1} < 0,0045$ $RSD_{Buk} < \pm 50\%$	$\bar{\bar{A}}_B = 0,0496$ $RSD_{Buk} = 13,51\%$	Utjecaj slijepih vrijednosti nije zanemariv.

Tablica 27. Ispitivanje realnosti konstanti za kalibracijsku funkciju

	<i>Zahtjev</i>	<i>Rezultat</i>	<i>Iskaz</i>
7	$I = Vn_A$ $PV_V < t$ $t(P = 99, f = 23) = 2,807$	$PV_V = 129,52$ $V = 0,01107$ $SD_V = \pm 0,00009$ $SD_n = \pm 0,01270$	Kalibracijska funkcija ima samo jednu konstantu $A = 0,011 \times n_a$
8	$n_a = VI$ $PV_V < t$ $t(P = 99, f = 23) = 2,807$	$PV_V = 129,52$ $V = 90,24$ $SD_V = \pm 0,69673$ $SD_n = \pm 1,14698$	Procjenska analitička funkcija je $n_a = 90,24 \times A$

Pomoću programskog paketa ESKULAP provjerene su mogućnosti postojanja većeg broja konstanti kalibracijske, odnosno analitičke funkcije. Ispitivanje na realnost konstante provedeno je računom izjednačavanja. Računi su pokazali da je realna samo jedna konstanta, tj. konstanta V (tablica 27, zahtjevi 7 i 8).

Tablica 28. Ispitivanje na velika odstupanja – bjegunce

	<i>Zahtjev</i>	<i>Rezultat</i>	<i>Iskaz</i>
9	$ A^* - A/SD_n < 2,069$ $ TAU_i < 2,807$ (99%)	$ TAU_{1-24} < 2,807$	Niti jedna vrijednost nije izvan traženih granica za 99% vjerojatnosti
	$ TAU_i < 2,069$ (95%)	$ TAU_7 = 2,0887$ $ TAU_7 > 2,069$	1 od 24 rezultata ne odgovara uvjetu za 95% vjerojatnosti, što nije nepovoljan rezultat

Tablica 29. Granični sadržaji analita

<i>Zahtjev</i>	<i>Rezultat</i>	<i>Iskaz</i>
10 $LD = 10 \times SD_{Buk} / V$	$LD = 0,3875 \mu\text{g tanina}$	
$LI = 10 \times SD_{Buk} / V$	$LI = 0,77528 \mu\text{g tanina}$	
$LQ = 10 \times SD_{Buk} / V$	$LQ = 1,2921 \mu\text{g tanina}$	donja granica analita (n_a) _d > LQ

Matematičko-statistička prosudba dobivenih eksperimentalnih rezultata prilog je potvrdi vrijednosti izvedbenih značajki i valjanosti analitičkog postupka za spektrofotometrijsko određivanje sadržaja tanina s pomoću Folin-Ciocalteusova reagensa. Budući da je dobivena kalibracijska funkcija s jednom konstantom ($A = 0,011 \times n_a$), ispitani analitički postupak može se smatrati standardnim.

3.3.8. Rezultati "cluster" analize eksperimentalnih fitokemijskih podataka

Rezultati kvantitativne analize iridoida, flavonoida i fenolnih kiselina u istraživanim vrstama roda *Plantago* L. obrađeni su metodom hijerarhijske "cluster" analize (poglavlje 2.3.9., prilog 28). Ulagana matrica podataka prikazana je tablicom 30. U svrhu izjednačavanja varijabilnosti obrađenih varijabli, provedena je standardizacija "z-score" metodom. Na standardiziranu matricu primjenjen je koeficijent srednje taksonomske udaljenosti (*average taxonomic distance*, D). Matrica udaljenosti podvrgnuta je UPGMA "cluster" tehniči. Krajnji rezultat statističke analize prikazan je dendrogramom (slika 68).

Tablica 30. Ulagana matrica podataka za "cluster" analizu

Sadržaj bioaktivnih tvari (%)								
	Alt.	Arg.	Cor.	Dep.	Hol.	Sco.	Lag.	Mar.
Rutin	0,0000	0,0240	0,0000	0,0050	0,0050	0,0070	0,0000	0,0070
Hiperozid	0,0120	0,0070	0,0170	0,0000	0,0110	0,0000	0,0200	0,0000
Kvercitrin	0,0020	0,0010	0,0090	0,0010	0,0130	0,0050	0,0080	0,0000
Kvercetin	0,0000	0,0000	0,0000	0,0080	0,0140	0,0280	0,0000	0,0060
Klorog. kis.	0,0230	0,0070	0,0030	0,0040	0,0110	0,0020	0,1150	0,0060
Kav. kis.	0,0330	0,0000	0,0460	0,0230	0,0000	0,0340	0,0010	0,0000
Aukubin	0,0900	0,2700	0,0000	0,0800	0,0000	0,0000	0,0700	0,0300
Katalpol	0,1300	1,8100	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0800	0,0000

Alt. – *P. altissima*

Arg. – *P. argentea*

Cor. – *P. coronopus*

Dep. – *P. holosteum* subsp. *depauperata*

Hol. – *P. holosteum* subsp. *holosteum*

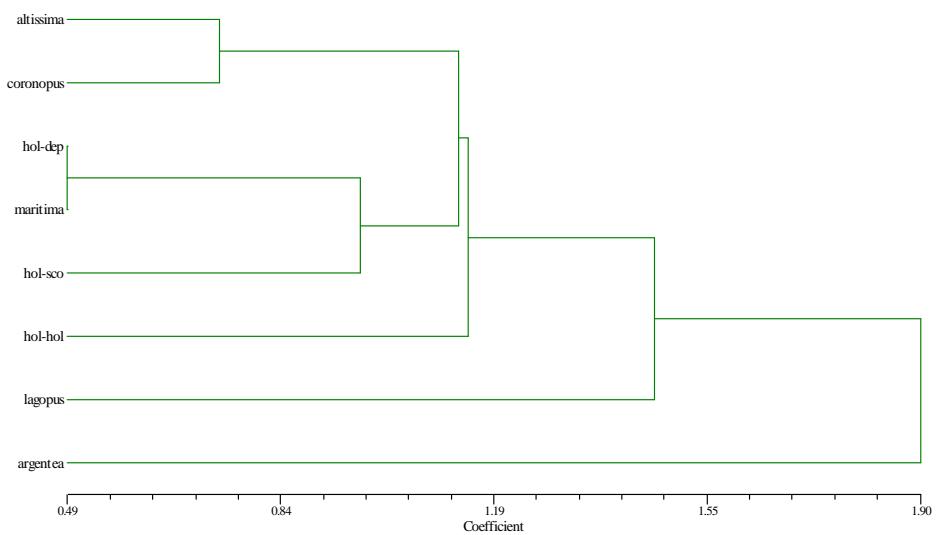
Scop. – *P. holosteum* subsp. *scopulorum*

Lag. – *P. lagopus*

Mar. – *P. maritima*

Tablica 31. Rezultati "cluster" analize eksperimentalnih fitokemijskih podataka

Sadržaj bioaktivnih tvari (%)				
n = 8	\bar{x}	SD	x_{min}	x_{max}
Rutin	0,0060	0,0079	0,0000	0,0240
Hiperozid	0,0084	0,0079	0,0000	0,0200
Kvercitrin	0,0049	0,0047	0,0000	0,0130
Kvercetin	0,0070	0,0099	0,0000	0,0280
Klorog. kis.	0,0214	0,0384	0,0020	0,1150
Kavena kis.	0,0171	0,0191	0,0000	0,0460
Aukubin	0,0675	0,0900	0,0000	0,2700
Katalpol	0,2525	0,6313	0,0000	1,8100



Slika 68. UPGMA dendrogram fitokemijskih obilježja vrsta roda *Plantago* L.

"Cluster" analiza pokazala je da se vrsta *P. argentea* fitokemijski najviše razlikuje od ostalih istraživanih taksona ($D = 1,90$). Nešto manju, ali još uvijek izraženu različitost, pokazuje *P. lagopus* u odnosu na ostale biljne vrste.

Iz dendrograma je vidljivo da niže svoje vrste *P. holosteum* ne pripadaju istoj kemotaksonomskoj skupini. Sadržajem bioaktivnih sastavnica, podvrsta *holosteum* se fitokemijski znatno razlikuje od podvrsta *depauperata* i *scopulorum*.

U zasebne grane, pri nižim koeficijentima udaljenosti, grupirana je vrsta *P. altissima* s vrstom *P. coronopus*, te vrsta *P. maritima* s taksonima *P. holosteum* subsp. *depauperata* i *P. holosteum* subsp. *scopulorum*.

Najmanja udaljenost ($D = 0,49$) postoji između taksona *P. holosteum* subsp. *depauperata* i *P. maritima*, što pokazuje njihovu fitokemijsku bliskost, a najveću različitost u odnosu na vrstu *P. argentea*.

4. ZAKLJUČCI

U okviru doktorskog rada provedena su opsežna botanička i fitokemijska istraživanja vrsta roda *Plantago* L. iz zapadnog dijela Hrvatske: *P. altissima* L., *P. argentea* Chaix, *P. coronopus* L., *P. holosteum* Scop. subsp. *depauperata*, *P. holosteum* Scop. subsp. *holosteum*, *P. holosteum* Scop. subsp. *scopulorum*, *P. lagopus* L. i *P. maritima* L.

A. Botanička karakterizacija

Utvrđena su morfološko-anatomska obilježja istraživanih biljnih taksona i detaljno opisana unutarnja građa listova i stabljika, te oblici i raspored trihoma.

Listovi vrsta *P. altissima*, *P. argentea* i *P. lagopus* imaju dorziventralnu građu, dok su izolateralni listovi uočeni u vrsta *P. coronopus* i *P. maritima*, te u nižih svojtih vrste *P. holosteum*. Okruglaste do poligonalne epidermske stanice lica i naličja lista prekrivene su jakom bradavičastom ili ispruganom kutikulom. Pući su većinom dijacitične i prisutne na obje epiderme. Samo su u listovima vrste *P. altissima* oko puči zabilježene po tri stanice pratilece. Manje nakupine mehaničkog staničja (kolenhima) nalaze se u većine vrsta ispod epiderme na rubovima lista i na naličju prema glavnoj žili, dok se u taksonu *P. holosteum* subsp. *scopulorum* tek rijetko mogu uočiti pojedinačne kolenhimske stanice ispod epiderme. Jednostanični trihomii nalaze se na listovima taksona *P. holosteum* subsp. *depauperata*, dok su šiljasti pokrovni trihomii s jednom ili više stanica zabilježeni na epidermama listova vrsta *P. coronopus* i *P. lagopus*. U vrste *P. altissima* trihomii su vrlo rijetki, a nisu uočeni na listovima taksona *P. argentea*, *P. holosteum* subsp. *holosteum*, *P. holosteum* subsp. *scopulorum* i *P. maritima*. Mezofil lista diferenciran je na palisadni i spužvasti parenhim. Palisadni parenhim vrsta *P. altissima* i *P. argentea* građen je od jednog sloja kratkih i gusto poredanih stanica. Jednoslojne ili dvoslojne palisade nalaze se u taksonu *P. holosteum* subsp. *holosteum*, *P. lagopus* i *P. maritima*, dok su palisade od dva do tri sloja stanica opisane u vrsta *P. coronopus*, *P. holosteum* subsp. *depauperata* i *P. holosteum* subsp. *scopulorum*. U mezofilu listova svih analiziranih biljaka ističe se jedna glavna i više manjih postranih kolateralnih žila koje obavija prsten parenhimskih stanica. Ksilem i floem središnje žile okruženi su slojevima mehaničkog staničja.

Na poprečnim prerezima stabljika vrsta *P. altissima*, *P. argentea* i *P. lagopus* uočena je njihova rebrasta građa, s manje ili više istaknutim rebrima. Okrugli oblik imaju stabljike vrsta *P. coronopus* i *P. maritima*, te nižih taksona vrste *P. holosteum*. Sve su stabljike obložene sitnim, zaobljenim epidermskim stanicama, odebljalih membrana i debele bradavičaste kutikule. Od epidermskih tvorevina prisutne su papile i višestanični šiljasti pokrovni trihomi. Na epidermu se nastavlja jedan sloj kolenhimske hipoderme te višeslojni parenhim primarne kore. Vrlo izražena jednoslojna endoderma građena je od krupnih izodijametričnih ili izduženih stanica. Pericikl je dobro razvijen, a čini ga prsten mehaničkih elemenata, unutar kojega se nalaze floem i ksilem. U središtu stabljike ističe se prostrano parenhimsko tkivo srčike.

B. Fitokemijska karakterizacija

Fitokemijskim istraživanjima provedena je detaljna kvalitativna i kvantitativna karakterizacija biološki aktivnih i pričuvnih tvari u listovima, stabljikama i cvatovima vrsta roda *Plantago* L.

Histokemijskim su reakcijama u svim uzorcima dokazane trjeslovine, sluzi, glikozidi, alkaloidi i proteini, dok su reakcije na antrakinone i masti za sve bile negativne. Prisutnost eteričnog ulja utvrđena je samo u vrsta *P. lagopus* i *P. maritima*, monosaharidi su zabilježeni u vrsta *P. coronopus*, *P. lagopus* i *P. maritima*, inulin su sadržavali taksoni *P. coronopus*, *P. holosteum* subsp. *holosteum* i *P. maritima*, dok je škrob dokazan samo u nadzemnim dijelovima vrste *P. coronopus*.

Primjenom metode tankoslojne kromatografije (TLC) i reakcijama stvaranja obojenja i taloga, utvrđena je prisutnost iridoida, flavonoida, fenolnih kiselina, trjeslovina koje hidroliziraju i kondenziranih trjeslovina, triterpenskih kiselina (oleanolna i ursolna kiselina), te saponina i sterola (β -sitosterol i stigmasterol) u ekstraktima nadzemnih dijelova istraživanih biljnih vrsta.

Iridoidi

TLC analiza iridoida najuspješnije je provedena primjenom razvijača n-propanol-toluen-ledena octena kiselina-voda (25:20:10:10, V/V) i detekcijom s benzidin reagensom. Katalpol je detektiran u većine biljnih uzoraka, osim u vrsta *P. altissima* i *P. coronopus*, dok aukubin nije potvrđen samo u taksona *P. coronopus* i *P. holosteum* subsp. *holosteum*.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) nije dala zadovoljavajuće rezultate u analizi iridoidnih sastavnica istraživanih biljnih vrsta, zbog nemogućnosti izdvajanja zasebne skupine iridoidnih pikova iz složene matrice biljnih uzoraka, te vrlo dugog vremena analize.

Metoda micelarne elektrokinetičke kromatografije (MEKC) usavršena je za karakterizaciju iridoidnih supstancija u vodenim ekstraktima listova istraživanih vrsta roda *Plantago* i pokazala se vrlo učinkovitom u odjeljivanju i kvantitativnoj analizi aukubina i katalpola, unatoč kompleksnosti biljnog materijala i strukturnoj sličnosti spomenutih iridoida. Rezultati MEKC analize pokazali su znatne različitosti u sadržaju aukubina i katalpola među istraživanim biljnim vrstama. Ovisno o uzorku, količina aukubina iznosila je do 0,27%, dok je udio katalpola bio do 0,16%. Iznimka je uzorak vrste *P. argentea*, gdje je određeno 1,81% katalpola. U svim analiziranim ekstraktima koji su sadržavali iridoide u količini većoj od granice dokazivanja, aukubin je bio češće prisutan od katalpola. Samo u uzorku vrste *P. coronopus* aukubin nije dokazan. Sadržaj katalpola bio je u pravilu veći od udjela aukubina u onim vrstama u kojima su oba analita bila prisutna (*P. altissima*, *P. argentea* i *P. lagopus*). Jedino je takson *P. holosteum* subsp. *depauperata* sadržavao aukubin, dok katalpol nije bio zabilježen. Osim aukubina i katalpola, u većine analiziranih uzoraka detektirane su još dvije iridoidne supstancije.

Primijenjena MEKC metoda mogla bi se uspješno koristiti i u "fingerprint" analizi za identifikaciju biljnog materijala, te kao pomoć u rješavanju srodstvenih odnosa s kemotaksonomskog gledišta.

Flavonoidi

Prisutnost flavonoida i fenolnih kiselina u metanolnim ekstraktima listova vrsta roda *Plantago* L. potvrđena je primjenom TLC. Glikozid kvercitrin uočen je u sve tri niže svoje vrste *P. holosteum*, izokvercitrin je detektiran u svim istraženim biljnim uzorcima, hiperozid je bio prisutan u nižim taksonima vrste *P. holosteum* i u listovima vrste *P. maritima*, dok je rutin zabilježen samo u vrste *P. lagopus*. Klorogenska kiselina detektirana je samo u listovima vrste *P. lagopus*.

Kvantitativna analiza flavonoida u nadzemnim organima istraživanih biljnih vrsta provedena je spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru. Listovi su sadržavali više flavonoida nego stabljike i cvatovi, od 0,053% (*P. coronopus*) do 0,131% (*P. maritima*). Njihov najveći sadržaj u stabljici zabilježen je za takson *P. holosteum* subsp. *depauperata* (0,065%), dok je najmanja količina određena u vrste *P. coronopus* (0,008%). U cvatovima je udio flavonoida bio u granicama od 0,007% (*P. maritima*) do 0,067% (*P. argentea*).

Optimirani su uvjeti za reverzno-faznu gradijentnu HPLC i uspješno je provedena karakterizacija flavonoida kvercetinskog tipa i fenolnih kiselina u metanolno-vodenim ekstraktima listova istraživanih vrsta. Maseni udjeli analiziranih biološki aktivnih tvari znatno su varirali među pojedinim taksonima. Najviše rutina sadržavala je vrsta *P. argentea* (0,024%), ostale su vrijednosti iznosile od 0,005 do 0,007%, dok u vrstama *P. altissima*, *P. coronopus* i *P. lagopus* njegova prisutnost nije potvrđena. Taksoni *P. holosteum* subsp. *depauperata*, *P. holosteum* subsp. *scopulorum* i *P. maritima* nisu sadržavali hiperozid, dok je njegov udio u ostalih vrsta iznosio od 0,007% (*P. argentea*) do 0,020% (*P. lagopus*). HPLC je potvrdila izokvercitrin jedino u uzorku *P. argentea* (0,02%). Kvercitrin je bio prisutan u svim biljnim uzorcima, osim u vrste *P. maritima*. Dobivene vrijednosti bile su u rasponu od 0,001% (*P. argentea* i *P. holosteum* subsp. *depauperata*) do 0,013% (*P. holosteum* subsp. *holosteum*). Slobodni aglikon kvercetin nije dokazan u vrsta *P. altissima*, *P. argentea*, *P. coronopus* i *P. lagopus*, dok je u ostalih taksona njegov udio iznosio od 0,006% (*P. maritima*) do 0,028% (*P. holosteum* subsp. *scopulorum*). Prisutnost klorogenske kiseline potvrđena je primjenom opisane metode u svim biljnim uzorcima, a sadržaj joj je bio u širokom rasponu masenih udjela, od 0,002% (*P. holosteum* subsp. *scopulorum*) do 0,115% (*P. lagopus*). Kavena kiselina određena je u

metanolno-vodenim ekstraktima taksona *P. altissima*, *P. coronopus*, *P. holosteum* subsp. *depauperata*, *P. holosteum* subsp. *scopulorum* i *P. lagopus*, s udjelom od 0,001 do 0,046%.

Unatoč složenosti biljnih uzoraka, opisana HPLC metoda pokazala se uspješnom za kvalitativnu i kvantitativnu karakterizaciju fenolnih kiselina i većine flavonoidnih sastavnica, a može se kvalitetno primijeniti i u svrhu "fingerprint" analize.

Trjeslovine

Spektrofotometrijskom metodom prema Schneideru određeni su ukupni polifenoli i trjeslovine u nadzemnim dijelovima istraživanih vrsta roda *Plantago*, uz prethodnu matematičko-statističku prosudbu postupka primjenom programskog paketa ESKULAP. Rezultati su potvrdili vrijednost izvedbenih značajki i valjanost analitičkog postupka za određivanje sadržaja tanina s pomoću Folin-Ciocalteusova reagensa. Budući da je dobivena kalibracijska funkcija s jednom konstantom ($A = 0,011 \times n_a$), ispitani analitički postupak može se smatrati standardnim.

Najveća količina ukupnih polifenola određena je u listovima svih analiziranih vrsta, a vrijednosti su iznosile od 4,55% (*P. altissima*) do 10,15% (*P. holosteum* subsp. *holosteum*). U stabljikama je njihov sadržaj bio u granicama od 2,80% (*P. maritima*) do 4,34% (*P. holosteum* subsp. *scopulorum*), dok je u cvatovima određeno od 2,79% (*P. holosteum* subsp. *depauperata*) do 5,56% (*P. argentea*) polifenolnih spojeva. Utvrđeno je da listovi sadrže trjeslovine koje se talože s kazeinom u količini od 0,56% (*P. lagopus*) do 2,26% (*P. argentea*), u stabljikama je njihov udio bio nešto manji i iznosio je od 0,28% (*P. altissima*) do 1,00% (*P. coronopus*). Najviši trjeslovininski sadržaj cvatova zabilježen je u vrste *P. holosteum* subsp. *scopulorum* (2,21%), dok je cvatni uzorak vrste *P. altissima* bio najsirošniji trjeslovinama (0,44%).

Ukupni sadržaj polifenolnih spojeva u nadzemnim organima istraživanih vrsta roda *Plantago* najveći je u taksona *P. holosteum* subsp. *holosteum*, a najmanji u uzorku *P. holosteum* subsp. *depauperata*. Trjeslovinama i flavonoidima najbogatiji su nadzemni dijelovi vrste *P. argentea*.

Rezultati kvantitativne analize ukupnih polifenola, trjeslovina i flavonoida statistički su obrađeni primjenom Studentova *t*-testa. Uspoređeni su njihovi udjeli u pojedinim biljnim organima iste vrste, kao i razlike udjela među listovima, stabljikama i cvatovima nižih svojti vrste *P. holosteum*, pri čemu je utvrđena znatna varijabilnost u distribuciji analiziranih tvari u različitim biljnim organima.

Eksperimentalni fitokemijski podaci, dobiveni analizom iridoida, flavonoida i fenolnih kiselina u istraživanim vrstama roda *Plantago* L., obrađeni su metodom multivarijatne statistike ("cluster" analiza). Utvrđeno je da se vrsta *P. argentea* fitokemijski najviše razlikuje od ostalih izučavanih taksona, dok je vrsta *P. lagopus* pokazala nešto manju, ali još uvijek izraženu različitost u odnosu na ostale biljne vrste. Niže svoje vrste *P. holosteum* ne pripadaju istoj kemotaksonomskoj skupini, jer se sadržajem bioaktivnih sastavnica podvrsta *holosteum* znatno razlikuje od druga dva taksona. Prema kemijskom sastavu, posebno su grupirane vrste *P. altissima* i *P. coronopus*, te vrsta *P. maritima* s taksonima *P. holosteum* subsp. *depauperata* i *P. holosteum* subsp. *scopulorum*. Od vrste *P. argentea* najviše se razlikuju taksoni *P. maritima* i *P. holosteum* subsp. *depauperata*.

Rezultati provedenih istraživanja pokazali su da vrsta *Plantago argentea* Chaix sadržajem biološki aktivnih sastavnica uvelike nadilazi ostale analizirane vrste istoga roda i u kemotaksonomskom smislu pripada zasebnoj kategoriji. S fitokemijskog gledišta može se zaključiti da ona ima najveći fitoterapijski potencijal, te bi se mogla ravnopravno primjenjivati s dokazano ljekovitim biljnim vrstama roda *Plantago* L.

5. LITERATURA

1. K. Rahn,
A phylogenetic study of the *Plantaginaceae*,
Bot. J. Linn. Soc. **120** (1996) 145-198.
2. M. Wichtl, N. G. Bisset (Ed.),
Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals, Scientific Publishers, Stuttgart 1994, 378-380.
3. T. Ringbom, L. Segura, Y. Norren, P. Perera, L. Bohlin,
Ursolic acid from *P. major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed
prostaglandin biosynthesis,
J. Nat. Prod. **61** (1998) 1212-1215.
4. M. Marchesan, D. H. Paper, S. Hose, G. Franz,
Investigation of the antiinflammatory activity of liquid extracts of *Plantago lanceolata* L.,
Phytother. Res. **12** (1998) 33-34.
5. J. G. Pastors, P. W. Blaisdell, T. K. Balm, C. M. Asplin, S. L. Pohl,
Psyllium fiber reduces rise in postprandial glucose and insulin concentrations in patients with
non-insulin dependent diabetes,
Am. J. Clin. Nutr. **53** (1991) 1431-1435.
6. E. A. Trautwein, D. Rieckhoff, H. F. Erbersdobler,
The cholesterol-lowering effect of psyllium, a source of soluble dietary fiber,
Ernahrungs-Umschau. **44** (1997) 214.
7. A. C. F. Munari, W. B. Pinto, C. R. A. Andraca, M. Casarrubias,
Lowering glycemic index of food by acarbose and *Plantago psyllium* mucilage,
Arch. Med. Res. **29** (1998) 137-141.
8. M. Moran-Rodriguez, F. Guerrero, G. Lazcano-Burciaga,
Lipid- and glucose-lowering efficacy of *Plantago psyllium* in type II diabetes,
J. Diabetes. Complicat. **12** (1998) 273-278.
9. A. U. H. Gilani, N. Aziz, M. A. Khan, S. Khan, V. Zaman,
Laxative effect of ispaghula – physical or chemical effect,
Phytother. Res. **12** (1998) 63-65.
10. F. Kušan,
Ljekovito i drugo korisno bilje, Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb 1956, 487.

11. R. Domac,
Flora Hrvatske, Priručnik za određivanje bilja, Školska knjiga, Zagreb 1994, 303-305.
12. G. Hegi,
Illustrierte Flora von Mittel-Europa, Band VI/1, Carl Hanser Verlag, München 1954, 591-593.
13. S. Forenbacher,
Velebit i njegov biljni svijet, Školska knjiga, Zagreb 1990, 619.
14. R. Pilger,
Plantaginaceae – Das Pflanzenreich von A. Engler, Band IV., Leipzig 1937, 330-332.
15. T. G. Tutin, V. H. Heywood, N. A. Burges, D. M. Moore, D. H. Valentine, S. M. Walters,
D. A. Webb,
Flora Europaea, Vol. 4, Cambridge University Press, Cambridge 1972, 38-44.
16. V. K. Medvedeva, I. Šugar,
Botanika za studente Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Zagreb 1997, 300.
17. I. Šugar, I. Gostl, K. Hazler-Pilepić,
Hrvatsko biljno nazivlje, Analiza hrvatskog biljnog nazivlja u djelu *Liber de simplicibus Benedicti Rinij*, Hrvatska sveučilišna naklada, Zagreb 2002, 74.
18. B. Šulek,
Jugoslavenski imenik bilja, Dionička tiskara, Zagreb 1879, 542.
19. J. Suomi, H. Sirén, K. Hartonen, M.-L. Riekkola,
Extraction of iridoid glycosides and their determination by micellar electrokinetic capillary chromatography,
J. Chromatogr. A **868** (2000) 73-83.
20. E. Andrzejewska-Golec,
The occurrence of the iridoids in plants,
Acta Soc. Bot. Pol. **64** (1995) 181-186.
21. P. Junior,
Recent developments in the isolation and structure elucidation of natural occurring iridoid compound,
Planta Med. **56** (1990) 1-13.

22. E. Andrzejewska-Golec, S. Ofterdinger-Daegel, I. Calis, L. Świątek,
Chemotaxonomic aspects of iridoids occurring in *Plantago* subg. *Psyllium* (*Plantaginaceae*),
Pl. Syst. Evol. **185** (1993) 85-89.
23. E. Andrzejewska-Golec,
Taxonomic aspects of the iridoid glucosides occurring in the genus *Plantago* L.,
Acta Soc. Bot. Pol. **66** (1997) 201-205.
24. C. Andary, M. E. Motte-Florac, A. Gargadennec, R. Wylde, A. Heitz,
Les esters caféiques du genre *Plantago*. Identification et valeur chimotaxinomique,
Pl. Méd. Phytothér. **22** (1988) 17-22.
25. N. Rønsted, E. Göbel, H. Franzyk, S. R. Jensen, C. E. Olsen,
Chemotaxonomy of *Plantago*. Iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glycosides,
Phytochemistry **55** (2000) 337-348.
26. H. Inouye, H. Nishimura, A. Kanomi, T. Okuda, C. H. Puff,
Chemotaxonomic studies of rubiaceous plants containing iridoid glycosides,
Phytochemistry **27** (1988), 2591-2598.
27. H. F. W. Jensen, S. R. Jensen, B. J. Nielsen,
Chemotaxonomy of the *Acanthaceae*. Iridoids and quaternary amines,
Phytochemistry **27** (1988), 2581-2589.
28. A. A. Müller, J. K. Kufer, K. G. Dietl, S. A. Reiter, J. Grau, M. Weigend,
Iridoid glucosides – chemotaxonomic markers in *Loasoideae*,
Phytochemistry **52** (1999) 67-78.
29. H. Rimpler, H. Sauerbier,
Iridoid glucosides as taxonomic markers in the genera *Lantana*, *Lippia*, *Alysia* and *Phyla*,
Biochem. Syst. Ecol. **14** (1986) 307-310.
30. R. Taskova, Lj. Evstatieva, N. Handjieva, S. Popov,
Iridoid patterns of genus *Plantago* L. and their systematic significance,
Z. Naturforsch. **57c** (2002) 42-50.
31. Đ. Tarle, J. Petričić, M. Kupinić,
Antibiotski učinak aukubina i saponina te ekstrakta trpuca – *Herba odnosno Folium Plantaginis lanceolatae*,
Farm. Glas. **37** (1981) 351-354.

32. H. Wagner, S. Bladt, E. M. Zgainski,
Drogenanalyse, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1983, a) 136-137;
b) 226; c) 163-165.
33. A. Antolić,
Izolacija i kemizam eteričnog ulja i iridoida iz konopljike – *Vites agnus-castus* L.,
Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 1988, 40-41.
34. H.-K. Wu, W.-C. Chuang, S.-J. Sheu,
Separation of nine iridoids by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography,
J. Chromatogr. A **803**(1+2), 179-187.
35. H. Shintani, J. Polonsky (Ed.),
Handbook of Capillary Electrophoresis Applications, Chapman and Hall, London 1997, 1-8.
36. S. Hjerten,
Free zone electrophoresis,
Chromatogr. Rev. **9** (1967) 122-219.
37. R. Virtanen,
Zone electrophoresis in narrow-bore tube employing potentiometric detection. A theoretical and experimental study,
Acta Polytech. Scand. **123** (1974) 1-67.
38. F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, T. P. E. M. Verheggen,
High performance zone electrophoresis,
J. Chromatogr. **169** (1979) 11-20.
39. J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs,
Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries,
Anal. Chem. **53** (1981) 1298-1302.
40. J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs,
High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis,
J. Chromatogr. **218** (1981) 209-216.
41. J. S. Green, J. W. Jorgenson,
High speed zone electrophoresis in open-tubular fused-silica capillaries,
J. High Resolut. Chromatogr. **7** (1984) 529-531.

42. J. Suomi, H. Sirén, S. S. Wiedmer, M.-L. Riekkola,
Isolation of aucubin and catalpol from *Melitaea cinxia* larvae and quantification by
micellar electrokinetic capillary chromatography,
Anal. Chim. Acta **429** (2001) 91-99.
43. J. Suomi, S. K. Wiedmer, M. Jussila, M.-L. Riekkola,
Determination of iridoid glycosides by micellar electrokinetic capillary chromatography –
mass spectrometry with use of the partial filling technique,
Electrophoresis **22** (2001), 2580-2587.
44. M. Rischer, M. Adamczyk, H. Ratz, S. Hose, M. Marchesan, D. H. Paper, G. Franz, E.
Wolf-Heuss, J. Engel,
Quantitative determination of the iridoid glycosides aucubin and catalpol in *Plantago*
lanceolata L. extracts by HPTLC and HPLC,
J. Planar Chromat. **11** (1998) 374-378.
45. H. Wagner, P. Wolff (Ed.),
New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical
Activity,
Proceedings of the First International Congress on Medicinal Plant Research, Section A, held
at the University of Munich, Germany, September 6-10, 1976, Springer-Verlag Berlin-
Heidelberg-New York 1977, a) 145-156; b) 177, 178.
46. H. Wagner, K. Vasirian,
Zur Chromatographie der Enzianbitterstoffe.
Deut. Apoth. Z. **114** (1974) 1245-1248.
47. H. Wagner, K. Münzing-Vasirian,
Eine chemische Wertbestimmung der Enziandroge,
Deut. Apoth. Z. **115** (1975) 1233-1239.
48. P. W. Thies, S. Funke,
Über die Wirkstoffe des Baldrians. Nachweis und Isolierung von sedativ wirksamen
Isovaleriansäureester aus Wurzeln und Rhizomen von verschiedenen *Valeriana*- und
Kenthrrantus-Arten,
Tetrahedron Lett. (1966) 1155-1162.

49. P. W. Thies,
Über die Wirkstoffe des Baldrians. Zur Konstitution der Isovaleriansäureester Valepotriat,
Acetoxyvalepotriat und Dihydrovalepotriat,
Tetrahedron Lett. (1966) 1163-1170.
50. P. W. Thies,
Valerosidatum, ein Iridoesterglycosid aus *Valeriana*-Arten,
Tetrahedron Lett. (1970) 2471-2474.
51. H. Inouye, S. Ueda, S. Uesato, T. Shingu, P. W. Thies,
Die absolute Konfiguration vonvalerosidatum und von Didrovaltratum,
Tetrahedron **30** (1974) 2317-2325.
52. V. Petkov, P. Manolov,
Pharmacological analysis of the iridoid oleuropein,
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) **22** (1972) 1476-1486.
53. W. M. Jr. Walter, H. P. Fleming, J. L. Etchells,
Preparation of antimicrobial compound by hydrolysis of oleuropein from green olives,
Appl. Microbiol. **26** (1973) 773-776.
54. O. Eichler, C. Koch,
Über die antiphlogistische, analgetische und spasmolytische Wirksamkeit von Harpagosid,
einem Glykosid aus der Wurzel von *Harpagophytum procumbens* DC,
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) **20** (1970) 107-109.
55. R. Kämpf,
Harpagophytum procumbens DC. Teufelskralle,
Schweiz. Apoth. Z. **114** (1976) 337-342.
56. J. Elich,
Die antibakterielle Aktivität einiger einheimischer *Plantago*-Arten,
Diss. Freie Univ. Berlin, 1962.
57. Y. Suzuki,
Diuretic action of the fruit of *Catalpa ovata*,
Nippon Yakurigaku Zasshi **60** (1964) 544-549; ref. Chem. Abstr. **62** (1965) 15300.

58. Y. Kato,
Mechanism of uric acid excretion stimulation by aucubin,
Folia Pharmacol. Japon. **42** (1946) 37-40; ref. *Chem. Abstr.* **47** (1953) 1843.
59. H. Inouye, Y. Takeda, K. Uobe, K. Yamaguchi, N. Nabuuchi, S. Kuwano,
Purgative activities of iridoid glucosides,
Planta Med. **25** (1974) 285-288.
60. K. Yamaguchi, R. Sakuragi, S. Kuwano, H. Inouye,
Biological and chemical assay of geniposide, a new laxative in the fruit of *Gardenia*,
Planta Med. **25** (1974) 219-225.
61. K. Yamaguchi, N. Fujimoto, S. Kuwano, H. Inouye, K. Inoue,
The mechanism of purgative action of geniposide, an iridoid glucoside of the fruit of
Gardenia,
Planta Med. **30** (1976) 39-47.
62. S. M. Kupchan, A. L. Dessertine, B. T. Blaylock, R. F. Bryan,
Isolation and structural elucidation of allamandin, an antileukemic iridoid lactone from
Allamanda cathartica,
J. Org. Chem. **39** (1974) 2477-2482.
63. H. Wagner,
Pharmazeutische Biologie, Drogen und ihre Inhaltsstoffe, 5. neubearbeitete Auflage, Gustav
Fischer Verlag, Stuttgart-New York 1993, a) 244-249; b) 267; c) 147; d) 39.
64. E. Steinegger, R. Hänsel,
Lehrbuch der Pharmakognosie und Phytopharmazie, 4 Auflage, Springer Verlag, Berlin-
Heidelberg-New York-London-Paris 1988, a) 389; b) 204.
65. Ž. Maleš,
Izolacija i identifikacija flavonoida drače – *Paliurus spina-christi* Mill.,
Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 1990, 49.
66. J. B. Harborne,
Biochemistry of Phenolic Compounds, Academic Press, London-New York 1964, a) 136;
b) 57-62; c) 83, 149.

67. S. Vladimir,
Izolacija i karakterizacija biološki aktivnih spojeva timijanolsnog vršića – *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch, Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 1993, 8, 20-30.
68. T. A. Geissman,
The Chemistry of Flavonoid Compounds, Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris 1962, 72.
69. H. Römisch,
Colorimetrische Bestimmung des Rutingehalts in Pflanzenextrakten und Präparaten mit Aluminiumchlorid in Eisessig-Pyridin gepufferter Lösung,
Pharmazie **15** (1960) 33-38.
70. B. Christ, K. H. Müller,
Zur serienmäßigen Bestimmung des Gehaltes an Flavanol-derivaten in Drogen,
Arch. Pharm. **293** (1960) 1033-1042.
71. Deutsches Arzneibuch, 9. Ausgabe (DAB 9), Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, Govi-Verlag GmbH, Frankfurt 1986, 575.
72. T. J. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas,
The Systematic Identification of Flavonoids, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1970, 52.
73. V. Katalinić,
High-performance liquid chromatographic determination of flavan fingerprints in plant extracts,
J. Chromatogr. A **775** (1997) 359-367.
74. P. B. Andrade, R. M. Seabra, P. Valentão, F. Areias,
Simultaneous determination of flavonoids, phenolic acids and coumarins in seven medicinal species by HPLC/diode-array detector,
J. Liq. Chromatogr. Related Tech. **21**(18) (1998) 2813-2820.
75. A. Crozier, E. Jensen, M. E. J. Lean, M. S. McDonald,
Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography,
J. Chromatogr. A **761** (1997) 315-321.

76. European Pharmacopoeia, Fourth Edition, Council of Europe, Strasbourg 2002, 40-42.
77. U. Justensen, P. Knuthsen, T. Leth,
Quantitative analysis of flavonols, flavones and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection,
J. Chromatogr. A **799** (1998) 101-110.
78. B. H. de Oliveira, T. Nakashima, J. D. de Souza Filho,
HPLC analysis of flavonoids in *Eupatorium littorale*,
J. Braz. Chem. Soc. **12**(2) (2001) 243-246.
79. G. Toker, S. Türköz, N. Erdemoglu,
High performance liquid chromatographic analysis of rutin in plants, I.,
Pharmazie **53** (1998) 494-495.
80. S. Kulevanova, M. Stefova, T. Stafilov,
Determination of total flavonoids and quercetin in *Hyperici herba* and its aqueous, aqueous-ethanolic and oil extracts,
Acta Pharm. **50** (2000) 29-37.
81. M. Brolis, B. Gabetta, N. Fuzzati, R. Pace, F. Panzeri, F. Peterlongo,
Identification by HPLC-DAD-MS and quantification by HPLC-UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*,
J. Chromatogr. A **825**(1) (1998) 9-16.
82. P. Menghinello, L. Cuccharini, F. Palma, D. Agostini, M. Dacha, V. Stocchi,
Simultaneous analysis of flavonoid aglycones in natural products using RP-HPLC method,
J. Liq. Chromatogr. Related Tech. **22** (19) (1999) 3007-3018.
83. D. Pathak, K. Pathak, A. K. Singla,
Flavonoids as medicinal agents – Recent advances. A Review,
Fitoterapia **62**(5) (1991) 371-389.
84. A. Saija, M. Scalese, M. Lanza, et al.,
Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes,
Free Radic. Biol. Med. **19** (1995) 481-486.

85. A. L. Miller,
Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage,
Alt. Med. Rev. **1** (1996) 103-111.
86. W. S. Chang, Y. J. Lee, F. J. Lu, H. C. Chiang,
Inhibitory effects of flavonoids on xantine oxidase,
Anticancer Res. **13** (1993) 2165-2170.
87. Y. T. Chen, R. L. Zheng, Z. J. Jia, Y. Ju,
Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants,
Free Radic. Biol. Med. **9** (1990) 19-21.
88. C. V. DeWhalley, J. F. Rankin, S. M. Rankin, et al.,
Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins,
Biochem. Pharmacol. **39** (1990) 1743-1749.
89. Della Loggia, E. Ragazzi, A. Tubaro, et al.,
Anti-inflammatory activity of benzopyrones that are inhibitors of cyclo- and lipo-oxygenase,
Pharmacol. Res. Commun. **20** (1988) S91-S94.
90. H. P. Kim, I. Mani, V. A. Ziboh,
Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase from
guinea pigs,
Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids **58** (1998) 17-24.
91. P. S. Chaudry, J. Cabera, H. R. Juliani, S. D. Varma,
Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac, and indomethacin,
Biochem. Pharmacol. **32** (1983) 1995-1998.
92. T. N. Kaul, E. Jr. Middleton, P. L. Ogra,
Antiviral effect of flavonoids on human viruses,
J. Med. Virol. **15** (1985) 71-79.
93. S. D. Skaper, M. Fabris, V. Ferrari, et. al.,
Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from
oxidative stress induced by glutathione depletion: cooperative effects of ascorbic acid,
Free Radic. Biol. Med. **22** (1997) 669-678.

94. G. Scambia, F. O. Raneletti, P. B. Panici, et. al.,
Quercetin induces type-II estrogen-binding sites in estrogen-receptor-negative (MDA-MB231) and estrogen-receptor-positive (MCF-7) human breast-cancer cell lines,
Int. J. Cancer. **54** (1993) 462-466.
95. G. Scambia, F. O. Raneletti, P. B. Panici, et. al.,
Quercetin inhibits the growth of a multidrug-resistant estrogen-receptor-negative MCF-7 human breast-cancer cell line expressing type II estrogen-binding sites,
Cancer Chemother. Pharmacol. **28** (1991) 255-258.
96. R. L. Singhal, Y. A. Yeh, N. Prajda, et. al.,
Quercetin down-regulates signal transduction in human breast carcinoma cells,
Biochem. Biophys. Res. Comm. **208** (1995) 425-431.
97. G. Scambia, F. O. Raneletti, P. B. Panici, et. al.,
Inhibitory effect of quercetin on primary ovarian and endometrial cancers and synergistic activity with cis-diamminedichloroplatinum(II),
Gyneco. Oncology **45** (1992) 13-19.
98. G. Scambia, F. O. Raneletti, P. B. Panici, et. al.,
Synergistic antiproliferative activity of quercetin and cisplatin on ovarian cancer cell growth,
Anticancer Drugs **1** (1990) 45-48.
99. M. A. Pereira, C. J. Grubbs, L. H. Barnes, et al.,
Effects of the phytochemicals, curcumin and quercetin, upon azoxymethane-induced colon cancer and 7,12-dimethylbenzy[a]anthracene-induced mammary cancer in rats,
Cancerogenesis **17** (1996) 1305-1311.
100. M. H. Castillo, E. Perkins, J. H. Cambell,
The effects of the bioflavonoid quercetin on squamous cell carcinoma of head and neck origin,
Am. J. Surg. **158** (1989) 351-355.
101. M. Yoshida, T. Sakai, N. Hosokawa, et al.,
The effects of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells,
FEBS Letters **260** (1990) 10-13.

102. S. Caltagirone, F. O. Raneletti, A. Rinelli, et al.,
Interaction with type II estrogen binding sites and antiproliferative activity of tamoxifen and
quercetin in human non-small-cell lung cancer,
Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol. **17** (1997) 51-59.
103. L. M. Larocca, L. Teofili, S. Sica, et al.,
Quercetin inhibits the growth of leukemic progenitors and induces the expression of
transforming growth factor-B1 in these cells,
Blood **85** (1995) 3654-3661.
104. L. M. Larocca, L. Teofili, G. Leone, et al.,
Antiproliferative activity of quercetin on normal bone marrow and leukaemic progenitors,
Br. J. Haematol. **79** (1991) 562-566.
105. S. O. Keli, M. G. Hertog, E. J. Feskens, D. Kromhout,
Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study,
Arch. Intern. Med. **156** (1996) 637-642.
106. C. Alarcón de la Lastra, M. J. Martín, V. Motilva,
Antiulcer and gastroprotective effects of quercetin: a gross and histologic study,
Pharmacology **48** (1994) 56-62.
107. T. Mizui, H. Sato, F. Hirose, M. Doteuchi,
Effect of antiperoxidative drugs on gastric damage induced by ethanol in rats,
Life Sci. **41** (1987) 755-763.
108. W. Beil, C. Birkholz, K. F. Sewing,
Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin
production and Helicobacter pylori growth,
Arzneimittelforschung **45** (1995) 697-700.
109. P. C. Hollman, J. H. de Vries, S. D. van Leeuwen, et al.,
Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers,
Am. J. Clin. Nutr. **62** (1995) 1276-1282.
110. C. Manach, F. Regerat, O. Texier, et al.,
Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids,
Nutr. Res. **16** (1996) 517-534.

111. R. Fischer, Th. Kartnig,
Drogenanalyse, Springer-Verlag, Wien-New York 1978, 423.
112. G. Schneider,
Zur Bestimmung der Gerbstoffe mit Casein,
Arch. Pharm. **309** (1976) 38-44.
113. E. Haslam,
Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action,
J. Nat. Prod. **59** (1996) 205-215.
114. T. Robinson,
The Organic Constituents of Higher Plants, Burgess Publishing Company, Minneapolis
1967, a) 121; b) 143.
115. J. Liu,
Pharmacology of oleanolic and ursolic acid,
J. Ethnopharmacol. **49** (1995) 57-68.
116. *The Merck Index* (1996) 12th edition, Merck Research Laboratories, Whitehouse Station,
NJ, 1686-1687.
117. H. Tokuda, H. Ohigashi, K. Koshimizu, Y. Ito,
Inhibitory effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate,
Cancer Letters **33** (1986) 279-285.
118. M. Huang, C. Ho, Z. Wang, T. Ferraro, Y. Lou, K. Stauber, W. Ma, C. Georgiadis,
J. Laskin, A. Conney,
Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid,
Cancer Res. **54** (1994) 701-708.
119. M. Ishida, T. Okubo, K. Koshimizu, H. Daito, H. Tokuda, T. Kin, T. Yamamoto,
N. Yamazaki, Topical preparations containing ursolic acid and/or oleanolic acid for
prevention of skin cancer,
Chem. Abstr. **113** (1990) 12173y.

120. A. Najid, A. Simon, J. Cook, H. Chable-Rabinovitch, C. Delage, A. Chulia, M. Riguad,
Characterization of ursolic acid as a lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor using
macrophages, platelets and differentiated HL60 leukemic cells,
FEBS **299**(3) (1992) 213-217.
121. M. C. Reico, R. Giner, M. Terencio, M. Sanz, J. Ríos,
Anti-inflammatory activity of *Helichrysum stoechas*,
Planta Med. **57**(2) (1991) A56-A57.
122. M. Hirota, T. Mori, M. Yoshida, R. Iriye,
Suppression of tumor promoter-induced inflammation of mouse ear by ursolic acid and
4,4- dimethylcholestane derivatives,
Agric. Biol. Chem. **54**(4) (1990) 1073-1075.
123. A. Sattar, V. Bankova, A. Kujumgiev, A. Galabov, A. Ignatova, C. Todorova, S. Popov,
Chemical composition and biological activity of leaf exudates from some *Lamiaceae* plants,
Pharmazie **50** (1995) 62-65.
124. T. Okazaki, M. Suetsugu, T. Yoshida,
Hair tonics containing oleanolic derivatives,
Chem. Abstr. **107** (1987) P161369V.
125. S. Granger, I. Scott,
Skin care compositions containing a polycyclic triterpene carboxylic acid and a retenoid,
United States Patent no. 5,723,139 (1998).
126. R. Jurišić,
Kemotaksonomska istraživanja vrsta roda *Teucrium*, Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu,
Zagreb 1998, 43.
127. L. Świątek, D. Lehmann, R. K. Chaudhuri, O. Sticher,
Occurrence of melittoside in the seeds of *Plantago media*,
Phytochemistry **20** (1981) 2023-2024.
128. S. R. Jensen, C. E. Olsen, K. Rahn, J. H. Rasmussen,
Iridoid glucosides in *Plantago alpina* and *P. altissima*,
Phytochemistry **42** (1996) 1633-1636.

129. R. Taskova, N. Handjieva, L. Evstatieva, S. Popov,
Iridoid glucosides from *Plantago cornuti*, *Plantago major* and *Veronica cymbalaria*,
Phytochemistry **52** (1999) 1443-1445.
130. S. Damtoft, E. Falkesgaard, S. R. Jensen,
Iridoid glucosides from *Plantago hookeriana*,
Phytochemistry **35** (1994) 1367-1368.
131. S. A. Kawashty, E. Gamaleldin, M. F. Abdalla, N. A. M. Saleh,
Flavonoids of *Plantago* species in Egypt,
Biochem. Syst. Ecol. **22** (1994) 729-733.
132. B. E. Malddoni,
Constituents of *Plantago bismarckii*,
An. Asoc. Quim. Argent. **87** (1999) 51-53.
133. H. Franzyk, T. L. Husum, S. R. Jensen,
A caffeoyl phenylethanoid glycoside from *Plantago myosuros*,
Phytochemistry **47** (1998) 1161-1162.
134. C. R. Metcalfe, L. Chalk,
Anatomy of the Dicotyledons, Vol. II, Clarendon Press, Oxford, 1972, 1053-1059.
135. B. Šrepel,
Vježbe iz Farmakognozije II (Mikroskopija droga), Zagreb 1999, 33-36.
136. V. Grdinić, R. Jurišić, I. Šugar,
Enciklopedijski englesko-hrvatski rječnik farmakopejskog nazivlja, Hrvatski zavod za
kontrolu lijekova, Zagreb 1999., ISBN 953-96451-3-1.
137. G. Gottschalk,
Standardisierung Quantitativer Analysenverfahren I. Allgemeine Grundlagen,
Z. Anal. Chem. **275** (1975) 1-10.
138. G. Gottschalk,
Standardisierung Quantitativer Analysenverfahren II. Standardisierte Messung
und Auswertung,
Z. Anal. Chem. **276** (1975) 81-95.

139. G. Gottschalk,
Standardisierung Quantitativer Analysenverfahren III. Standardisierte Selektivitätsuntersuchungen,
Z. Anal. Chem. **277** (1975) 257-266.
140. G. Gottschalk,
Standardisierung Quantitativer Analysenverfahren IV. Anwendung von Standarverfahren,
Z. Anal. Chem., **278** (1976) 1-12.
141. G. Gottschalk,
Standardisierung Quantitativer Analysenverfahren V. Gravimetrische Bestimmungen,
Z. Anal. Chem. **280** (1976) 205-218.
142. G. Gottschalk,
Standardisierung Quantitativer Analysenverfahren VI. Spektralphotometrie in Lösungen,
Z. Anal. Chem., **282** (1976) 1-15.
143. V. Grdinić, S. Luterotti,
Statistical evaluation of the FAAS microsampling system: analysis of the Cd(II)-ion by Delves cup,
Acta Pharm. **44** (1994) 171-181.
144. S. Luterotti, V. Grdinić,
Statistical analysis of spectrophotometric procedures for determination of Fe(III) and V(V) with desferrioxamine B,
J. AOAC Int. **78** (1995) 1112-1123.
145. J. Vuković,
Mikrokemijski modeli termoanalitičkih i oprečnih analitičkih sustava, Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 2000, 47.
146. T. Nikolić,
Numerička taksonomska analiza srodstvenih odnosa evropskih rodova porodice *Ranunculaceae*, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 1992, 112-148.
147. F. J. Rohlf,
NTSYSpc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System ver. 2.1, User Guide. Exeter Software, New York 2000.

6. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Botanička i fitokemijska karakterizacija nekih vrsta roda *Plantago* L.

Renata Jurišić

Zavod za analitiku i kontrolu lijekova, Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Provedena je botanička i fitokemijska karakterizacija vrsta roda *Plantago* L. iz zapadnog dijela Hrvatske: *P. altissima* L., *P. argentea* Chaix, *P. coronopus* L., *P. holosteum* Scop. subsp. *depauperata*, *P. holosteum* Scop. subsp. *holosteum*, *P. holosteum* Scop. subsp. *scopulorum*, *P. lagopus* L. i *P. maritima* L. Utvrđena su morfološko-anatomска obilježja istraživanih biljnih taksona i detaljno opisana građa listova i stabljika, te oblik i raspored trihomia. Histokemijskim reakcijama dokazane su trjeslovine, sluzi, glikozidi, alkaloidi i proteini. Primjenom TLC metode i taložnih reakcija utvrđena je prisutnost iridoida, flavonoida, fenolnih kiselina, trjeslovina, triterpenskih kiselina, saponina i sterola. Unaprijedena je MEKC metoda i provedena karakterizacija iridoidnih sastavnica. Vodeni ekstrakti listova sadržavali su do 0,27% aukubina i do 1,81% katalpola (*P. argentea*). U većine uzoraka detektirane su još dvije iridoidne supstancije. Spektrofotometrijski određen sadržaj polifenolnih spojeva u nadzemnim biljnim organima najveći je u taksona *P. holosteum* subsp. *holosteum*, a trjeslovinama i flavonoidima najbogatiji su nadzemni dijelovi vrste *P. argentea*. Primjenom programskog paketa ESKULAP potvrđena je valjanost analitičkog postupka za određivanje tanina s Folin-Ciocalteusovim fenolnim reagensom. Reverzno-faznom HPLC analizom uspješno je provedena karakterizacija flavonoida i fenolnih kiselina u metanolno-vodenim ekstraktima listova. Maseni udjeli tih tvari znatno su varirali među taksonima: rutin (0,005-0,024%), hiperozid (0,007-0,020%), izokvercitrin (0,020%, *P. argentea*) kvercitrin (0,001-0,013%), kvercetin (0,006-0,028%), klorogenska kiselina (0,002-0,115%) i kavena kiselina (0,001-0,046%). Utvrđena je statistički značajna varijabilnost u distribuciji analiziranih bioaktivnih tvari među analiziranim vrstama. Eksperimentalni fitokemijski podaci obrađeni su metodom multivarijatne statistike. Utvrđeno je da se vrsta *P. argentea* fitokemijski najviše razlikuje od ostalih taksona i da posjeduje najveći fitoterapijski potencijal od svih istraživanih vrsta roda *Plantago* L.

(135 stranica, 31 tablica, 68 slika, 28 priloga, 147 literaturnih citata, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u biblioteci Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, A. Kovačića 1, Zagreb.

Ključne riječi: *Plantago*, morfologija, anatomija, iridoidi, flavonoidi, fenolne kiseline, trjeslovine, saponini, steroli, MEKC, HPLC, ESKULAP, "cluster" analiza

Voditeljice: dr. sc. Zdenka Kalodera, red. prof. i dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević, doc. (FBF)

Ocenjivači: dr. sc. Vladimir Grdinić, red. prof. (FBF)
dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević, doc. (FBF)
dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek, zn. surad. (PLIVA d.d.)

Rad prihvaćen: 29. siječnja 2003.

Botanical and phytochemical characterization of some *Plantago* species

Renata Jurišić

Department of Analytics and Control of Medicines, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

Plantago altissima L., *P. argentea* Chaix, *P. coronopus* L., *P. holosteum* Scop. (subsp. *depauperata*, subsp. *holosteum* and subsp. *scopulorum*), *P. lagopus* L. and *P. maritima* L. were botanically and phytochemically investigated. Complete morphological and anatomical characterization of leaves and stems was carried out. Histochemical reactions revealed the presence of tannins, mucilage, glycosides, alkaloids, inulin and proteins. The existence of iridoids (aucubin and catalpol), flavonoids (rutin, hyperosid, isoquercitrin, quercitrin and quercetin), saponin substances, triterpenes (oleanolic and ursolic acids) and sterols (β -sitosterol and stigmasterol) was confirmed using TLC. Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) was used for characterization of iridoid substances. The yield of aucubin and catalpol was up to 0.27% and 1.81% of the dry mass of the leaves, respectively. Besides aucubin and catalpol, two related compounds were determined in plant samples. The results of spectrometric measurements showed that *P. argentea* and *P. holosteum* subsp. *holosteum* generally contained the highest amounts of total polyphenols, tannins and flavonoids, while the lowest contents were measured in samples of *P. coronopus*. Mathematical and statistical program ESKULAP was used for the evaluation of the analytical procedure for tannin determination with Folin-Ciocalteu's phenol reagent. Characterizations of flavonoids and phenolic acids were successfully performed by reversed phase HPLC. Yields of analysed substances varied among examined species: rutin (0,005-0,024%), hyperosid (0,007-0,020%), isoquercitrin (0,020%, *P. argentea*), quercitrin (0,001-0,013%), quercetin (0,006-0,028%), chlorogenic acid (0,002-0,115%) and caffeic acid (0,001-0,046%). Experimental phytochemical data were evaluated by cluster analysis. Significant differences were observed in contents and distribution of iridoids, flavonoids and phenolic acids between investigated plant species. These substances might be good chemotaxonomical markers in the study of genus *Plantago*. The results of present study showed that *P. argentea* had the highest phytotherapeutic potential of all examined *Plantago* species and it could be a good resource of biologically active compounds.

(135 pages, 31 tables, 68 figures, 28 appendices, 147 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry, A. Kovačića 1, Zagreb, Croatia

Key Words: *Plantago*, morphology, anatomy, iridoids, flavonoids, phenolic acids, tannins, MEKC, HPLC, ESKULAP, cluster analysis

Supervisors: Prof. Dr. Zdenka Kalođera
Dr. Sanda Vladimir-Knežević

Reviewers: Prof. Dr. Vladimir Grdinić
Dr. Sanda Vladimir-Knežević
Dr. Biserka Cetina-Čizmek.

Thesis accepted: January 29, 2003

7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 30. svibnja 1970. u Osijeku. Osnovnu školu završila sam u Đurđenovcu, a srednjoškolsko obrazovanje u Našicama. Godine 1989. upisala sam se na Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer Farmacija. Diplomski rad s naslovom "Ispitivanje diuretičkog učinka biljnih vrsta *Parietaria officinalis* L., *Parietaria vulgaris* Hill. i *Ononis natrix* subsp. *natrix*" izradila sam u Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i diplomirala 1994. Iste godine upisala sam sveučilišni poslijediplomski studij "Farmaceutske znanosti". Također sam odradila pripravnički staž u Gradskoj ljekarni Zagreb i 1995. položila državni stručni ispit. U razdoblju od 1995. do 1999. zaposlena sam u Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta kao znanstvena novakinja. Magistarski rad pod naslovom "Kemotaksonomska istraživanja vrsta roda *Teuerium*" izradila sam u Zavodu za farmakognoziju, a u suradnji s tvornicom Belupo d.o.o. i Zavodom za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije. Akademski stupanj magistra znanosti stekla sam 1998, a od godine 1999. radim kao asistentica u Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Aktivno sam sudjelovala u znanstveno-istraživačkom radu u okviru projekata Ministarstva znanosti i tehnologije Republike Hrvatske *Istraživanje aktivnih tvari ljekovitog bilja Hrvatske* (3-04-318) i *Istraživanje ljekovitog bilja Hrvatske* (006230), a od godine 2002. aktivni sam istraživač na projektu *Istraživanje bioaktivnih tvari i bioloških učinaka ljekovitog bilja* (0006531). Moja znanstvena djelatnost usmjerena je pretežno na farmakognosijsku problematiku. Objavila sam jednu knjigu, četiri znanstvena i tri stručna rada te sudjelovala s 14 priopćenja na domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima.

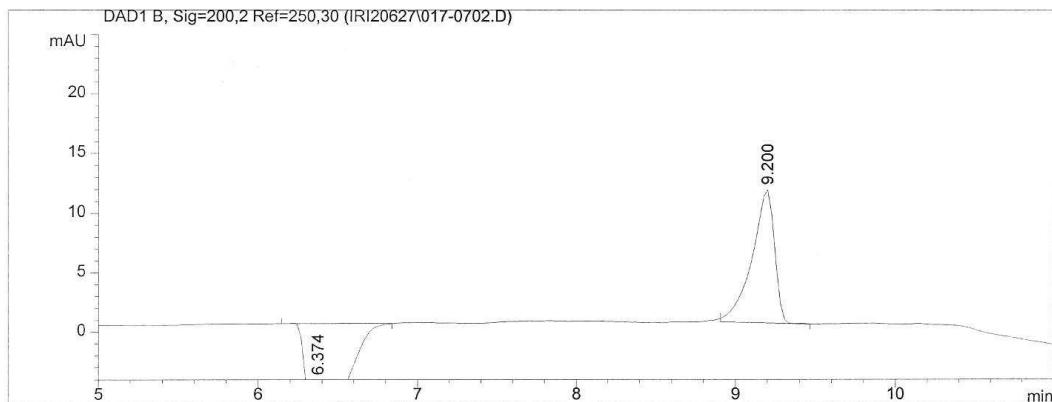
Renata Jurišić

8. PRILOZI

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\IRI20627\017-0702.D

Sample Name: Aucubin/0.1/1

=====
Injection Date : 7/1/2002 2:07:17 PM Seq. Line : 7
Sample Name : Aucubin/0.1/1 Location : Vial 17
Acq. Operator : Jurisic;Debeljak Inj : 2
Sequence File : C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\IRI20627.S
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CE\IRISTD.M
Last changed : 7/1/2002 9:42:48 AM by Jurisic;Debeljak
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CE\IRIDOIDI.M
Last changed : 7/10/2002 10:43:47 AM by Debeljak
MEKC za iridoide
=====



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Area Calculation Mode : Measured Area
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

Peak #	MigTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.374	BP N	0.2908	141.01370	8.11099	56.1395
2	9.200	BBA	0.1465	110.17081	11.22104	43.8605

Totals : 251.18452 19.33204

Results obtained with enhanced integrator! (highest datapoint)

=====
Summed Peaks Report
=====

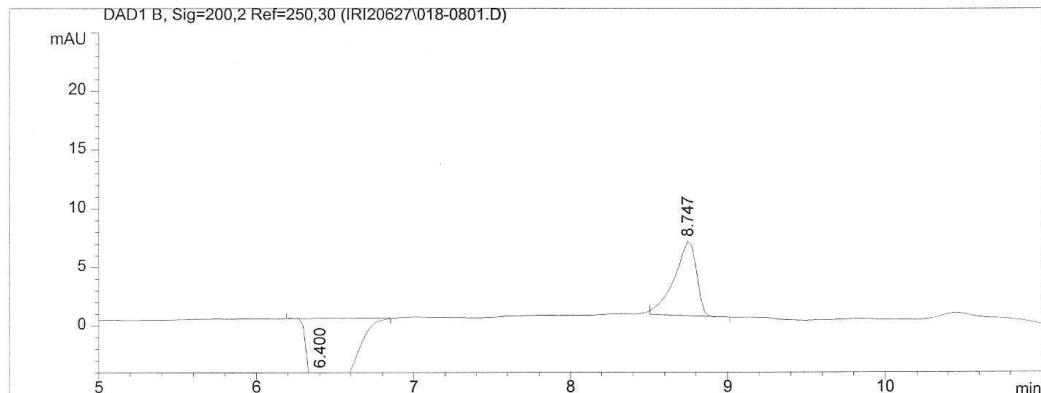
Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

=====
Final Summed Peaks Report
=====

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

Indirect UV-Mode activated: range from -200 mAU to max. absorbance
*** End of Report ***

Prilog 1. Elektroferogram aukubina



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Area Calculation Mode : Measured Area
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=200, 2 Ref=250, 30

Peak #	MigTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.400	B P N	0.2879	138.01901	8.05356	68.8757
2	8.747	BBA	0.1463	62.36960	6.36413	31.1243

Totals : 200.38861 14.41770

Results obtained with enhanced integrator! (highest datapoint)

Summed Peaks Report

Signal 1: DAD1 B Sig=200 ? Ref=250 30

Final Summed Books Report

Signal 1: DAD1 B Sig=200 ? Ref=250 30

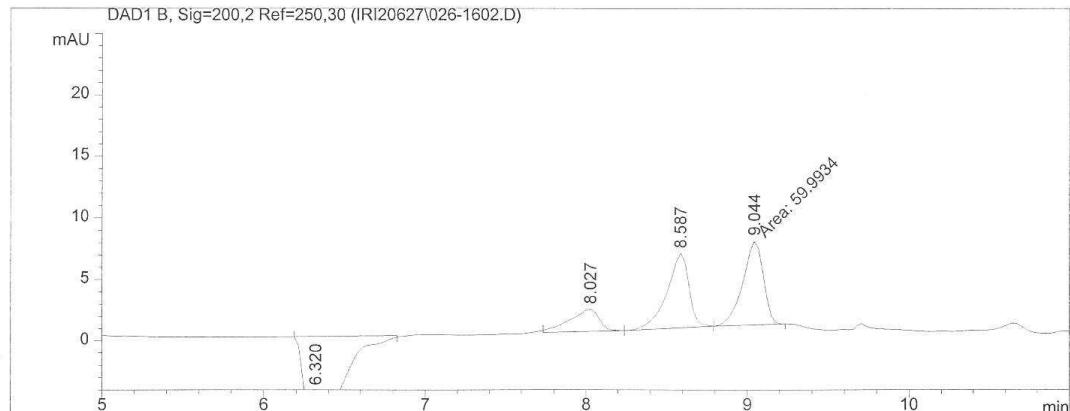
Indirect UV-Mode activated: range from -200 mAU to max. absorbance
*** End of Report ***

Prilog 2. Elektroferogram katalpola

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\IRI20627\026-1602.D

Sample Name: 1N/1

```
=====
Injection Date : 7/1/2002 8:57:38 PM      Seq. Line : 16
Sample Name   : 1N/1                   Location : Vial 26
Acq. Operator  : Jurisic;Debeljak    Inj : 2
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\CE\IRIDOIDI.M
Last changed   : 6/27/2002 4:22:51 PM by Jurisic;Debeljak
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\CE\IRIDOIDI.M
Last changed   : 7/10/2002 10:43:47 AM by Debeljak
MEKC za iridoide
```



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Area Calculation Mode : Measured Area
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

Peak #	MigTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.320	BP N	0.2799	114.46725	6.96022	44.8519
2	8.027	BB	0.1702	23.11975	1.84435	9.0591
3	8.587	BB	0.1344	57.63095	6.09161	22.5817
4	9.044	MM	0.1452	59.99338	6.88649	23.5073

Totals : 255.21132 21.78267

Results obtained with enhanced integrator! (highest datapoint)

=====
Summed Peaks Report
=====

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

=====
Final Summed Peaks Report
=====

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

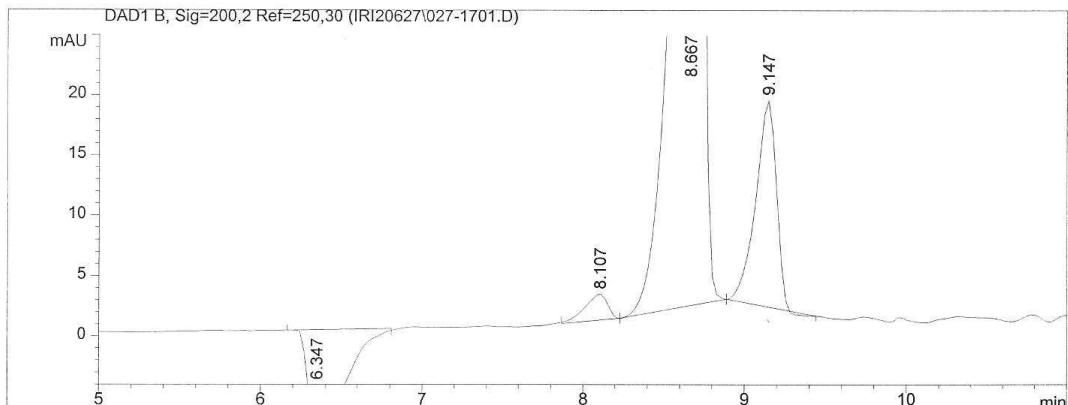
Indirect UV-Mode activated: range from -200 mAU to max. absorbance
*** End of Report ***

Prilog 3. Elektroferogram vodenog ekstrakta vrste *Plantago altissima* L.

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\IRI20627\027-1701.D

Sample Name: 2N/1

```
=====
Injection Date : 7/1/2002 9:31:53 PM          Seq. Line : 17
Sample Name   : 2N/1                         Location : Vial 27
Acq. Operator  : Jurisic;Debeljak          Inj : 1
Sequence File : C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\IRI20627.S
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\CE\IRIDOIDI.M
Last changed   : 6/27/2002 4:22:51 PM by Jurisic;Debeljak
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\CE\IRIDOIDI.M
Last changed   : 7/10/2002 10:43:47 AM by Debeljak
MEKC za iridoide
=====
```



=====

Area Percent Report

=====

```
Sorted By      : Signal
Area Calculation Mode : Measured Area
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
```

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

Peak #	MigTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.347	BP N	0.2771	119.06010	7.04762	8.1357
2	8.107	BB	0.1546	21.40417	2.17902	1.4626
3	8.667	BB	0.1489	1171.02747	116.87053	80.0198
4	9.147	BBA	0.1269	151.93022	17.21748	10.3818

Totals : 1463.42196 143.31466

Results obtained with enhanced integrator! (highest datapoint)

=====

Summed Peaks Report

=====

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

=====

Final Summed Peaks Report

=====

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

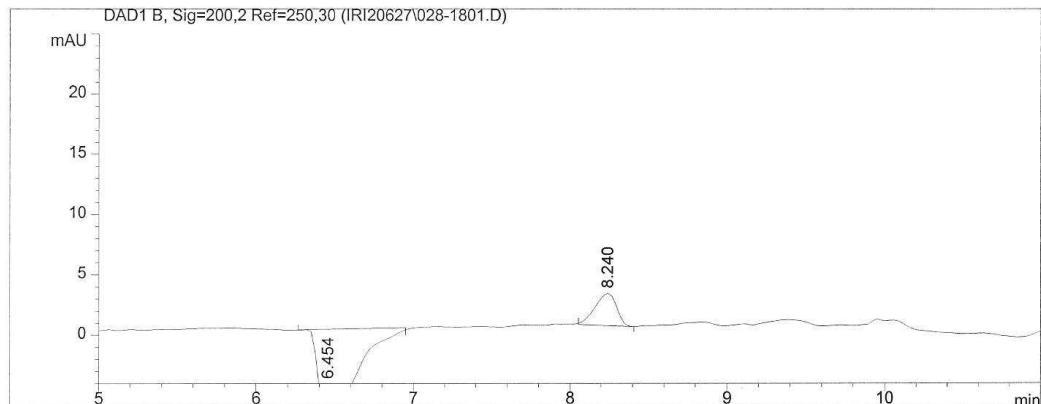
Indirect UV-Mode activated: range from -200 mAU to max. absorbance
*** End of Report ***

Prilog 4. Elektroferogram vodenog ekstrakta vrste *Plantago argentea* Chaix

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\IRI20627\028-1801.D

Sample Name: 3N/1

```
=====
Injection Date : 7/2/2002 4:00:26 PM      Seq. Line : 18
Sample Name   : 3N/1                   Location : Vial 28
Acq. Operator  : Jurisic;Debeljak        Inj : 1
Sequence File : C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\IRI20627.S
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\CE\IRIDOIDI.M
Last changed   : 6/27/2002 4:22:51 PM by Jurisic;Debeljak
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\CE\IRIDOIDI.M
Last changed   : 7/10/2002 10:43:47 AM by Debeljak
MEKC za iridoide
```



Area Percent Report

```
Sorted By       : Signal
Area Calculation Mode : Measured Area
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
```

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

Peak #	MigTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.454	BP N	0.2766	115.35950	6.84498	82.0222
2	8.240	BBA	0.1498	25.28471	2.68673	17.9778

Totals : 140.64421 9.53171

Results obtained with enhanced integrator! (highest datapoint)

Summed Peaks Report

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

Final Summed Peaks Report

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

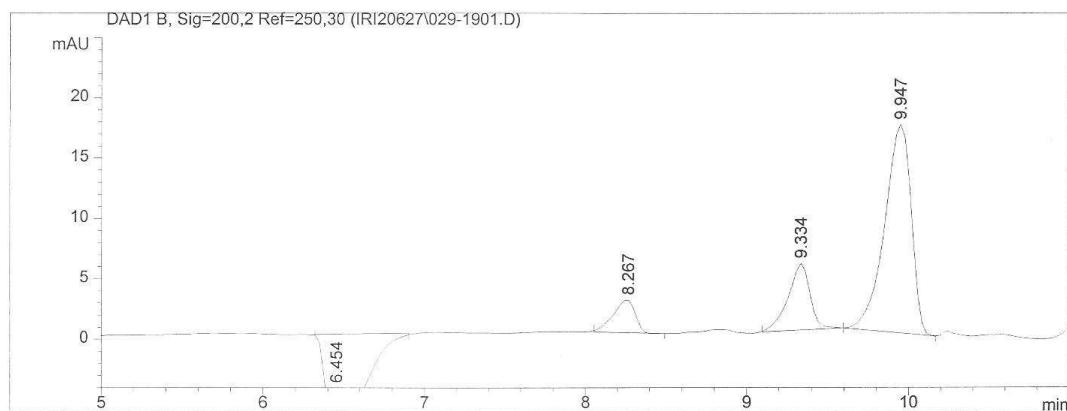
Indirect UV-Mode activated: range from -200 mAU to max. absorbance
*** End of Report ***

Prilog 5. Elektroferogram vodenog ekstrakta vrste *Plantago coronopus L.*

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\IRI20627\029-1901.D

Sample Name: 4N/1

=====
Injection Date : 7/2/2002 4:34:35 PM Seq. Line : 19
Sample Name : 4N/1 Location : Vial 29
Acq. Operator : Jurisic;Debeljak Inj : 1
Sequence File : C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\IRI20627.S
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CE\IRIDOIDI.M
Last changed : 6/27/2002 4:22:51 PM by Jurisic;Debeljak
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CE\IRIDOIDI.M
Last changed : 7/10/2002 10:43:47 AM by Debeljak
MEKC za iridoide
=====



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Area Calculation Mode : Measured Area
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

Peak #	MigTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.454	BP N	0.2780	123.23177	7.26090	30.9786
2	8.267	BBA	0.1422	25.70461	2.72087	6.4618
3	9.334	BB	0.1327	51.65736	5.54412	12.9859
4	9.947	BBA	0.1728	197.20259	17.32373	49.5738

Totals : 397.79632 32.84962

Results obtained with enhanced integrator! (highest datapoint)

=====
Summed Peaks Report
=====

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

=====
Final Summed Peaks Report
=====

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

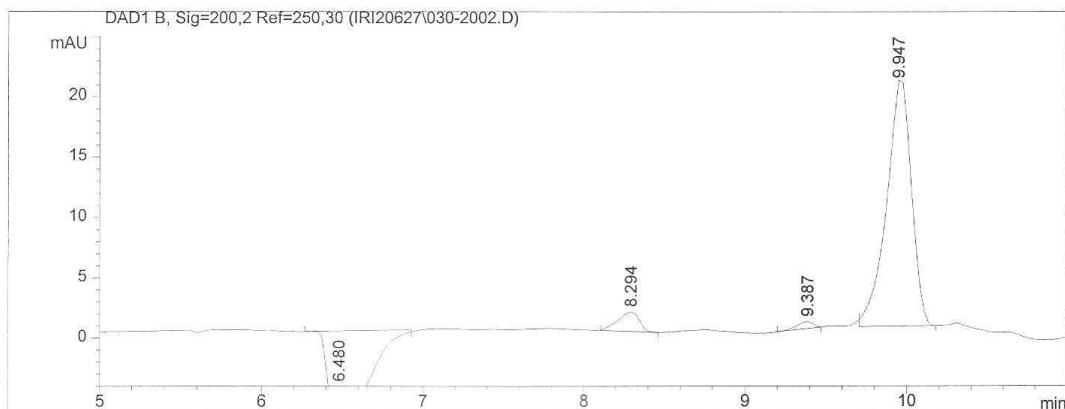
Indirect UV-Mode activated: range from -200 mAU to max. absorbance
*** End of Report ***

Prilog 6. Elektroferogram vodenog ekstrakta vrste *Plantago holosteum* Scop. subsp. *depauperata*

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\IRI20627\030-2002.D

Sample Name: 5N/1

```
=====
Injection Date : 7/2/2002 6:14:17 PM          Seq. Line : 20
Sample Name   : 5N/1                      Location : Vial 30
Acq. Operator  : Jurisic;Debeljak        Inj : 2
Sequence File : C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\IRI20627.S
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\CE\IRIDOIDI.M
Last changed   : 6/27/2002 4:22:51 PM by Jurisic;Debeljak
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\CE\IRIDOIDI.M
Last changed   : 7/10/2002 10:43:47 AM by Debeljak
MEKC za iridoide
```



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Area Calculation Mode : Measured Area
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

Peak #	MigTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.480	BP N	0.2784	124.41594	7.31604	34.3898
2	8.294	BBA	0.1477	15.19510	1.64626	4.2001
3	9.387	PB	0.1157	4.22910	5.89717e-1	1.1690
4	9.947	BBA	0.1566	217.94104	20.39992	60.2411

Totals : 361.78118 29.95193

Results obtained with enhanced integrator! (highest datapoint)

Summed Peaks Report

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

Final Summed Peaks Report

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

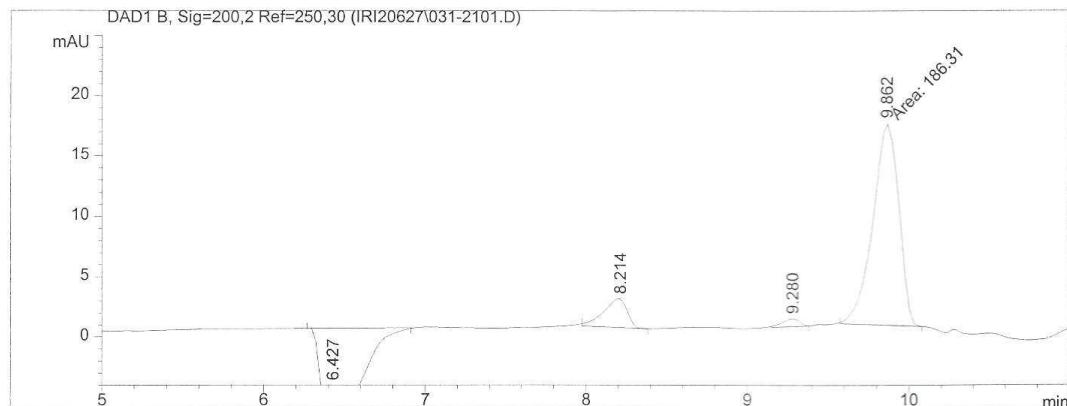
Indirect UV-Mode activated: range from -200 mAU to max. absorbance
*** End of Report ***

Prilog 7. Elektroferogram vodenog ekstrakta vrste *Plantago holosteum* Scop. subsp. *holosteum*

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\IRI20627\031-2101.D

Sample Name: 6N/1

=====
Injection Date : 7/1/2002 11:42:59 PM Seq. Line : 21
Sample Name : 6N/1 Location : Vial 31
Acq. Operator : Jurisic;Debeljak Inj : 1
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CE\IRIDOIDI.M
Last changed : 6/27/2002 4:22:51 PM by Jurisic;Debeljak
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CE\IRIDOIDI.M
Last changed : 7/10/2002 11:26:25 AM by Debeljak
(modified after loading)
MEKC za iridoide
=====



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Area Calculation Mode : Measured Area
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

Peak #	MigTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.427	BP N	0.2866	128.59155	7.55300	37.3340
2	8.214	BBA	0.1516	24.62328	2.40189	7.1489
3	9.280	BBA	0.1101	4.91119	6.65381e-1	1.4259
4	9.862	MM	0.1849	186.30954	16.79243	54.0913

Totals : 344.43556 27.41269

Results obtained with enhanced integrator! (highest datapoint)

=====
Summed Peaks Report
=====

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

=====
Final Summed Peaks Report
=====

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

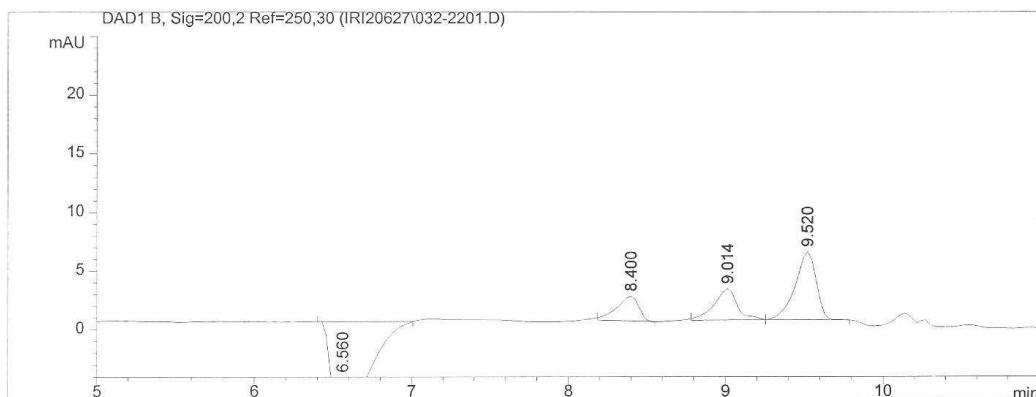
Indirect UV-Mode activated: range from -200 mAU to max. absorbance
*** End of Report ***

Prilog 8. Elektroferogram vodenog ekstrakta vrste *Plantago holosteum* Scop. subsp. *scopulorum*

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\IRI20627\032-2201.D

Sample Name: 7N/1

```
=====
Injection Date : 7/2/2002 12:48:55 AM      Seq. Line : 22
Sample Name   : 7N/1                      Location : Vial 32
Acq. Operator  : Jurisic;Debeljak        Inj : 1
Sequence File : C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\IRI20627.S
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\CE\IRIDOIDI.M
Last changed   : 6/27/2002 4:22:51 PM by Jurisic;Debeljak
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\CE\IRIDOIDI.M
Last changed   : 7/10/2002 10:43:47 AM by Debeljak
MEKC za iridoide
```



Area Percent Report

```
Sorted By          : Signal
Area Calculation Mode : Measured Area
Multiplier        : 1.0000
Dilution          : 1.0000
```

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

Peak #	Migtime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.560	BP N	0.2775	122.92017	7.25949	54.8742
2	8.400	BBA	0.1454	20.62634	2.12125	9.2080
3	9.014	BB	0.1411	27.00953	2.69141	12.0576
4	9.520	BBA	0.1387	53.44774	5.84412	23.8602

Totals : 224.00378 17.91627

Results obtained with enhanced integrator! (highest datapoint)

Summed Peaks Report

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

Final Summed Peaks Report

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

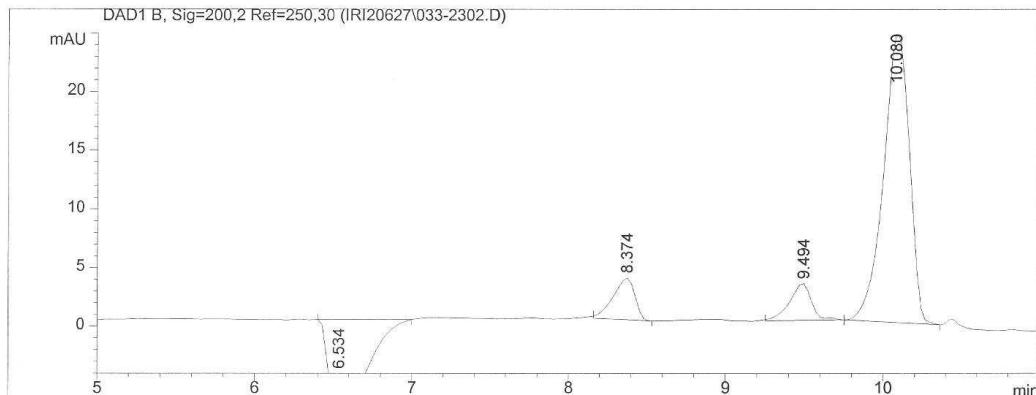
Indirect UV-Mode activated: range from -200 mAU to max. absorbance
*** End of Report ***

Prilog 9. Elektroferogram vodenog ekstrakta vrste *Plantago lagopus* L.

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\IRI20627\033-2302.D

Sample Name: 8N/1

=====
Injection Date : 7/2/2002 2:28:28 AM Seq. Line : 23
Sample Name : 8N/1 Location : Vial 33
Acq. Operator : Jurisic;Debeljak Inj : 2
Sequence File : C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\IRI20627.S
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CE\IRIDOIDI.M
Last changed : 6/27/2002 4:22:51 PM by Jurisic;Debeljak
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CE\IRIDOIDI.M
Last changed : 7/10/2002 10:43:47 AM by Debeljak
MEKC za iridoide
=====



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Area Calculation Mode : Measured Area
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

Peak #	MigTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.534	BP N	0.2755	124.45564	7.42698	26.3343
2	8.374	BBA	0.1440	34.38295	3.58120	7.2753
3	9.494	BB	0.1455	30.68312	3.15332	6.4924
4	10.080	BB	0.1802	283.07785	24.98854	59.8980

Totals : 472.59957 39.15004

Results obtained with enhanced integrator! (highest datapoint)

=====
Summed Peaks Report
=====

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

=====
Final Summed Peaks Report
=====

Signal 1: DAD1 B, Sig=200,2 Ref=250,30

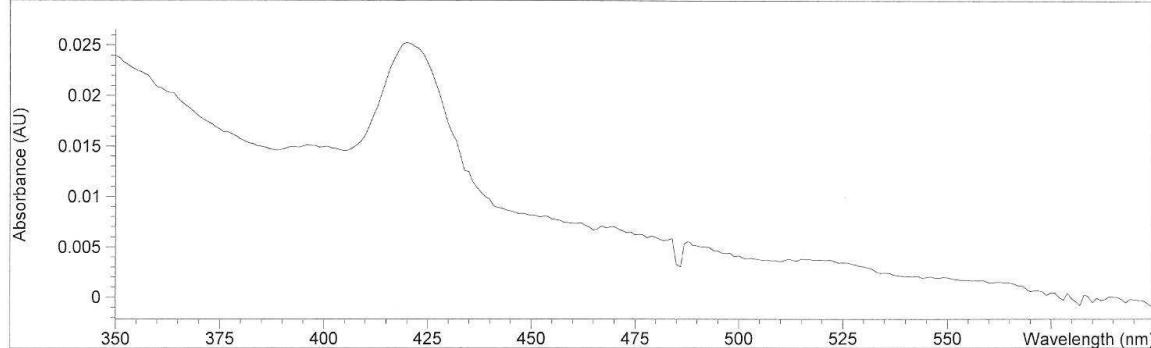
Indirect UV-Mode activated: range from -200 mAU to max. absorbance
*** End of Report ***

Prilog 10. Elektroferogram vodenog ekstrakta vrste *Plantago maritima* L.

Fixed Wavelength Report Date 3/12/02 Time 11:13:27 Page 1 of 1

Method file : <untitled>
Information : Default Method
Data File : <untitled>

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<425nm>
1		2.3326E-2

Report generated by : bc Signature:

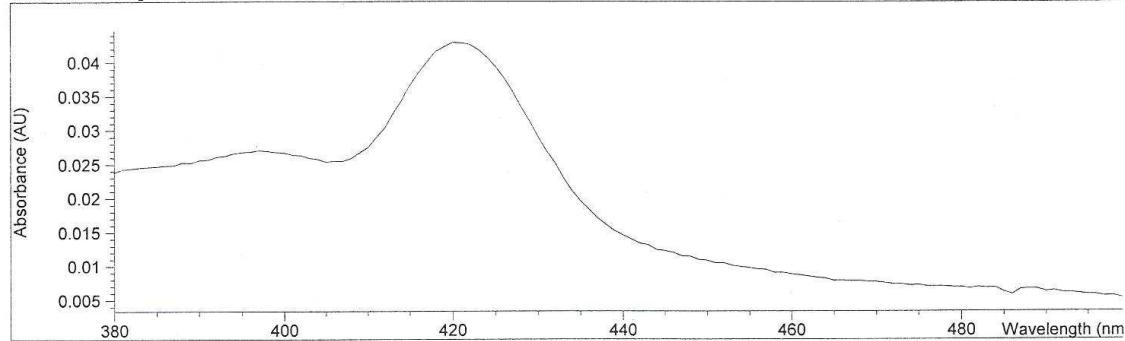
*** End Fixed Wavelength Report ***

Prilog 11. UV/VIS spektar kompleksa flavonoida vrste *Plantago altissima* L. s Al^{3+}

=====
Fixed Wavelength Report Date 3/14/02 Time 13:22:05 Page 1 of 1
=====

Method file : KONST.M (modified) Last update: Date 3/14/02 Time 1:21:03
PM
Information : Default Method
Data File : <untitled>

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<425nm>
1		3.9362E-2

Report generated by : bc Signature:

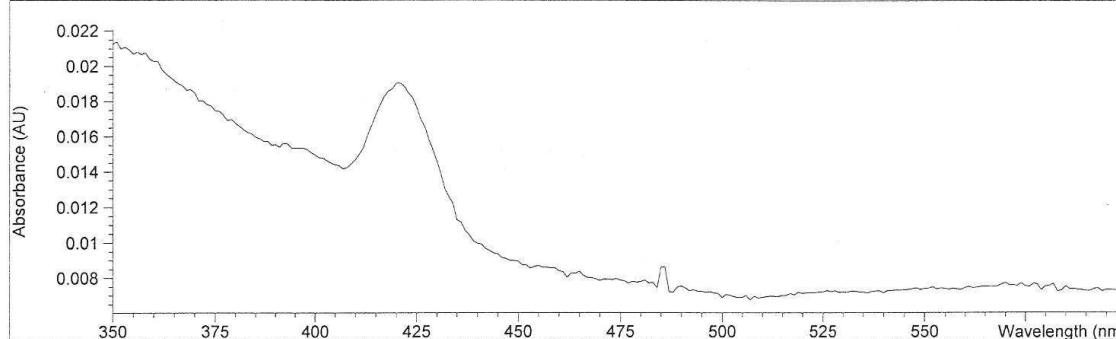
*** End Fixed Wavelength Report ***

Prilog 12. UV/VIS spektar kompleksa flavonoida vrste *Plantago argentea* Chaix s Al³⁺

=====
Fixed Wavelength Report Date 3/12/02 Time 11:23:01 Page 1 of 1

Method file : <untitled>
Information : Default Method
Data File : <untitled>

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<425nm>
1		1.7680E-2

Report generated by : bc Signature:

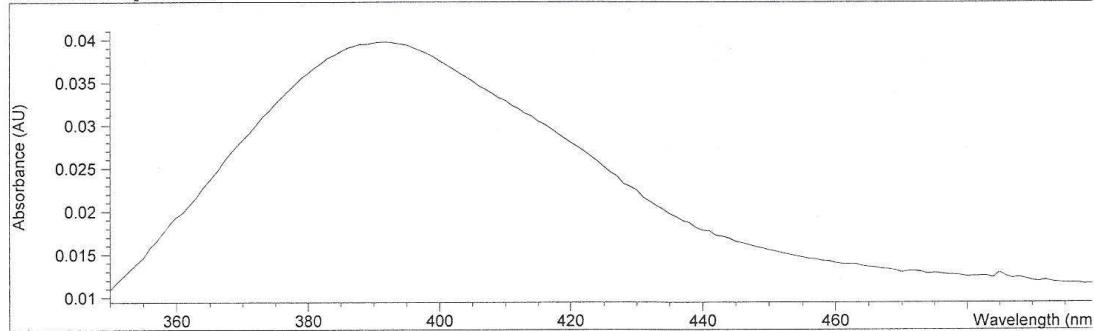
*** End Fixed Wavelength Report ***

Prilog 13. UV/VIS spektar kompleksa flavonoida vrste *Plantago coronopus* L. s Al³⁺

=====
Fixed Wavelength Report Date 3/23/02 Time 15:19:30 Page 1 of 1
=====

Method file : FLAVON1.M (modified) Last update: Date 3/23/02 Time
3:12:42 PM
Information : Default Method
Data File : <untitled>

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<425nm>
1		2.5198E-2

Report generated by : bc Signature:

*** End Fixed Wavelength Report ***

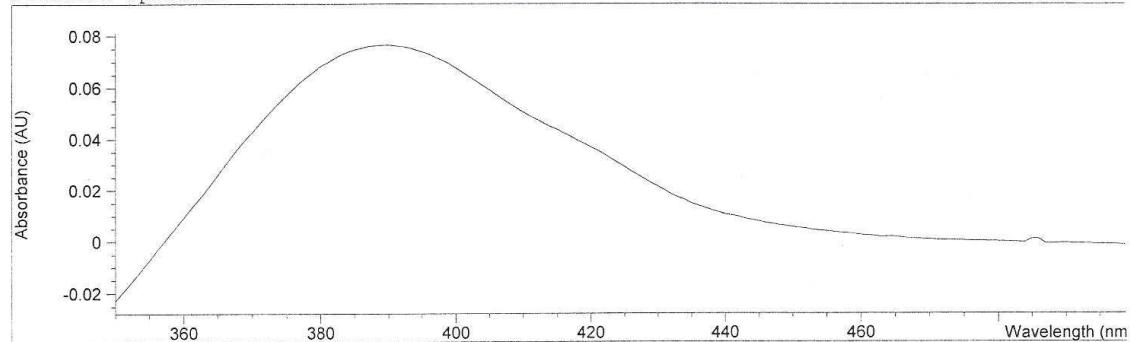
Prilog 14. UV/VIS spektar kompleksa flavonoida vrste *Plantago holosteum* Scop.

subsp. *depauperata* s Al³⁺

Fixed Wavelength Report Date 3/26/02 Time 17:16:19 Page 1 of 1

Method file : FLAVON1.M Last update: Date 3/23/02 Time 3:12:42 PM
Information : Default Method
Data File : <untitled>

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<425nm>
1		2.9189E-2

Report generated by : bc Signature:

*** End Fixed Wavelength Report ***

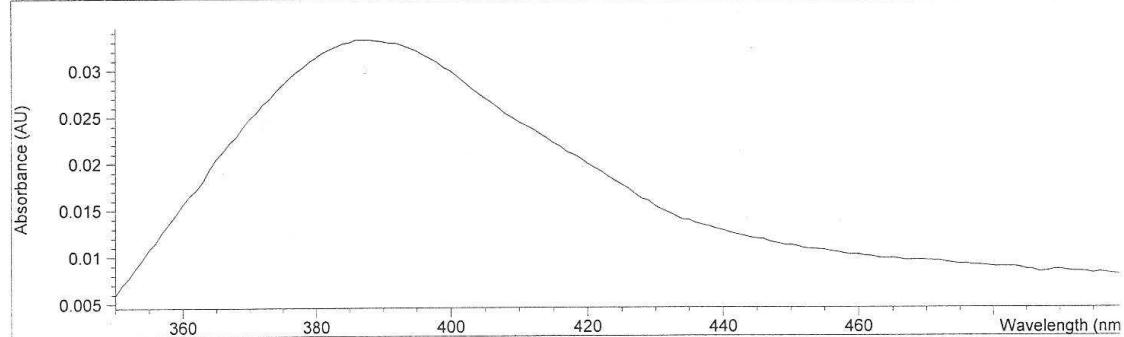
Prilog 15. UV/VIS spektar kompleksa flavonoida vrste *Plantago holosteum* Scop.

subsp. *holosteum* s Al³⁺

=====
Fixed Wavelength Report Date 3/23/02 Time 15:26:37 Page 1 of 1

Method file : FLAVON1.M (modified) Last update: Date 3/23/02 Time
3:12:42 PM
Information : Default Method
Data File : <untitled>

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<425nm>
1		1.7720E-2

Report generated by : bc Signature:

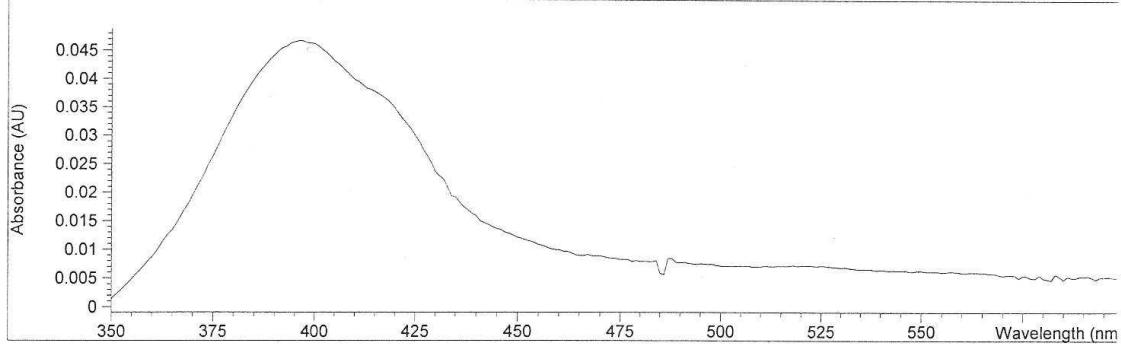
*** End Fixed Wavelength Report ***

**Prilog 16. UV/VIS spektar kompleksa flavonoida vrste *Plantago holosteum* Scop.
subsp. *scopulorum* s Al³⁺**

Fixed Wavelength Report Date 3/12/02 Time 11:38:08 Page 1 of 1

Method file : <untitled>
Information : Default Method
Data File : <untitled>

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<425nm>
1		2.9950E-2

Report generated by : bc Signature:

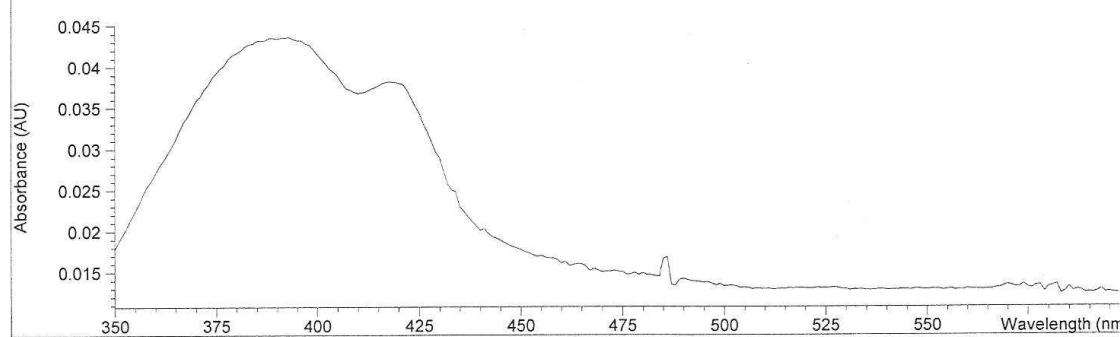
*** End Fixed Wavelength Report ***

Prilog 17. UV/VIS spektar kompleksa flavonoida vrste *Plantago lagopus* L. s Al³⁺

Fixed Wavelength Report Date 3/12/02 Time 11:40:50 Page 1 of 1

Method file : <untitled>
Information : Default Method
Data File : <untitled>

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<425nm>
1		3.4410E-2

Report generated by : bc Signature:

*** End Fixed Wavelength Report ***

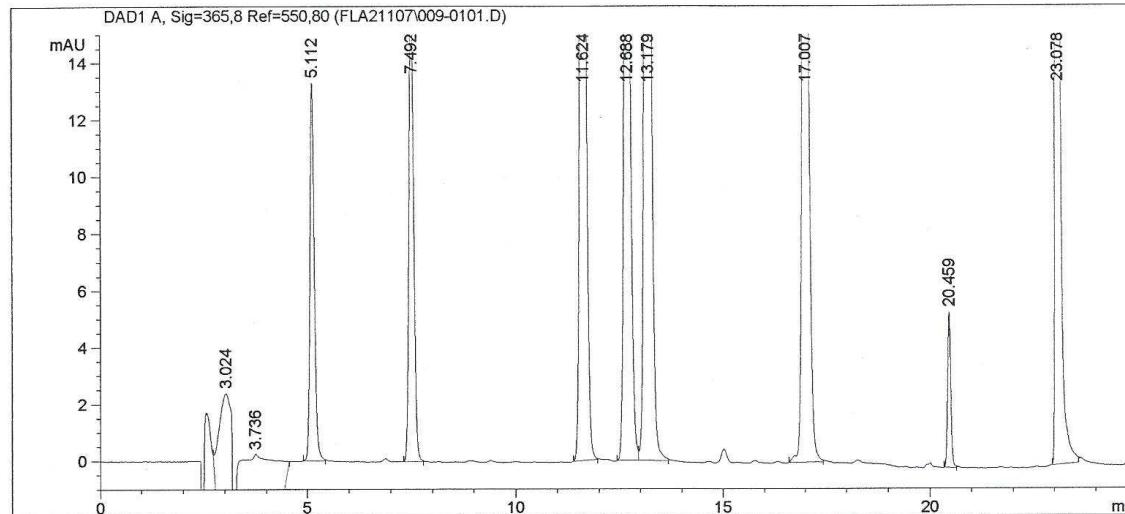
Prilog 18. UV/VIS spektar kompleksa flavonoida vrste *Plantago maritima* L. s Al³⁺

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\FLA21107\009-0101.D

Sample Name: STDMIX

=====
Injection Date : 7.11.2002 23:23:57 Seq. Line : 1
Sample Name : STDMIX Location : Vial 9
Acq. Operator : Goran & Renata Inj : 1
Acq. Instrument : Instrument 18 Inj Volume : 25 μ l
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA.M
Last changed : 7.11.2002 23:21:47 by Goran & Renata
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA1.M
Last changed : 14.11.2002 11:24:47
(modified after loading)

FLAVONOIDI



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=365,8 Ref=550,80

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.024	BP	0.3024	188.86263	9.32202	5.8660
2	3.736	VBA	0.7381	443.47403	7.18517	13.7741
3	5.112	BB	0.1112	97.10419	13.29287	3.0160
4	7.492	BB	0.1210	130.72008	16.76593	4.0601
5	11.624	BB	0.1372	364.50632	41.21746	11.3214
6	12.688	PV	0.1450	299.16104	32.02528	9.2918
7	13.179	VB	0.1456	490.38950	52.21168	15.2313
8	17.007	BB	0.1551	353.21790	35.17965	10.9708
9	20.459	BB	0.0787	28.56418	5.49450	0.8872
10	23.078	BB	0.0764	795.09686	158.89059	24.6954
11	25.600	BB	0.1117	17.63681	2.40162	0.5478
12	26.115	BB	0.1209	10.88086	1.36600	0.3380

Totals : 3219.61438 375.35277

Results obtained with enhanced integrator!

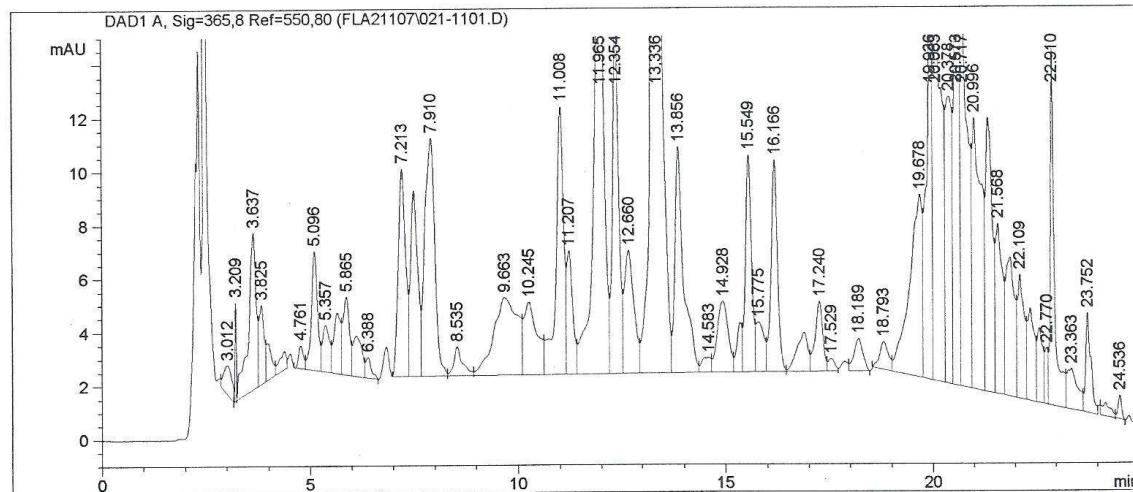
=====
Prilog 19. HPLC kromatogram smjese standarda flavonoida i fenolnih kiselina

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\FLA21107\021-1101.D
P. altissima, 500 mg/25 mL (MeOH:H₂O = 1:1), Vinj. 25 uL

Sample Name: P. ALTISSIMA -

=====
Injection Date : 8.11.2002 5:26:53 Seq. Line : 11
Sample Name : P. ALTISSIMA Location : Vial 21
Acq. Operator : Goran & Renata Inj : 1
Acq. Instrument : Instrument 18 Inj Volume : 25 μ L
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA.M
Last changed : 7.11.2002 23:21:47 by Goran & Renata
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA1.M
Last changed : 14.11.2002 11:24:47
(modified after loading)

FLAVONOIDI



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=365,8 Ref=550,80

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.012	VP	0.2122	14.39586	1.07536	0.2820
2	3.209	VV	0.0380	8.25266	3.70028	0.1617
3	3.637	VV	0.1696	76.13353	5.85910	1.4913
4	3.825	VV	0.1203	25.01022	2.96964	0.4899
5	3.970	VV	0.1320	12.79564	1.40875	0.2506
6	4.371	VV	0.1645	8.77658	7.08615e-1	0.1719
7	4.761	PV	0.1271	7.01678	8.61036e-1	0.1374
8	5.096	VV	0.1503	45.23635	4.45987	0.8861
9	5.357	VV	0.1733	20.58490	1.74936	0.4032
10	5.643	VV	0.1644	27.07324	2.28172	0.5303
11	5.865	VV	0.1584	31.66889	2.92344	0.6203
12	6.105	VV	0.2064	22.62405	1.51386	0.4432
13	6.388	VP	0.1347	7.21979	7.89083e-1	0.1414
14	7.213	BV	0.1802	97.34323	7.76950	1.9068
15	7.497	VV	0.1727	83.79140	6.94656	1.6413
16	7.910	VV	0.2338	147.66003	8.88890	2.8924
17	8.535	VB	0.2050	16.24140	1.09527	0.3181

Instrument 1 14.11.2002 11:33:24

Page 1 of 2

Prilog 20. HPLC kromatogram metanolno-vodenog ekstrakta vrste *Plantago altissima* L.

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\FLA21107\021-1101.D
P. altissima, 500 mg/25 mL (MeOH:H2O = 1:1), Vinj. 25 uL

Sample Name: P. ALTISSIMA

=====
Injection Date : 8.11.2002 5:26:53 Seq. Line : 11
Sample Name : P. ALTISSIMA Location : Vial 21
Acq. Operator : Goran Renata Inj : 1
Acq. Instrument : Instrument 18 Inj Volume : 25 μ L
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA.M
Last changed : 7.11.2002 23:21:47 by Goran & Renata
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA1.M
Last changed : 14.11.2002 11:24:47
(modified after loading)

FLAVONOIDI

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
18	9.663	BV	0.5165	116.64553	2.90503	2.2849
19	10.245	VV	0.2972	59.82608	2.71354	1.1719
20	11.008	VV	0.1830	127.56851	9.98934	2.4988
21	11.207	VV	0.1496	47.31002	4.61371	0.9267
22	11.965	VV	0.2477	307.80728	18.35214	6.0293
23	12.354	VV	0.1603	145.06239	13.61335	2.8415
24	12.660	VV	0.2298	74.13718	4.60455	1.4522
25	13.336	VV	0.1528	1369.44287	136.76828	26.8246
26	13.856	VV	0.2080	122.85999	8.43102	2.4066
27	14.583	VV	0.2059	8.96093	5.68513e-1	0.1755
28	14.928	VV	0.2817	48.90728	2.64476	0.9580
29	15.344	VV	0.1279	15.93094	1.85983	0.3121
30	15.549	VV	0.1556	82.99950	8.09696	1.6258
31	15.775	VV	0.1974	24.25596	1.86944	0.4751
32	16.166	VV	0.1581	84.06301	7.90292	1.6466
33	16.874	VV	0.2542	26.91116	1.46577	0.5271
34	17.240	VV	0.1903	33.59048	2.60758	0.6580
35	17.529	VV	0.1669	5.33655	4.75716e-1	0.1045
36	18.189	VP	0.2142	17.88930	1.21194	0.3504
37	18.793	BV	0.2180	15.44444	1.03581	0.3025
38	19.678	VV	0.2741	147.38091	6.81937	2.8869
39	19.936	VV	0.1180	139.78922	16.31141	2.7382
40	20.063	VV	0.1637	231.35579	19.04399	4.5318
41	20.378	VV	0.1609	119.98405	10.69145	2.3502
42	20.573	VV	0.1132	168.57417	20.22606	3.3020
43	20.717	VV	0.1583	176.64937	14.68599	3.4602
44	20.996	VV	0.1999	159.25143	10.10506	3.1194
45	21.336	VV	0.1724	119.01475	10.18121	2.3313
46	21.568	VV	0.1562	75.29182	6.35472	1.4748
47	21.865	VV	0.1991	79.69059	5.19048	1.5610
48	22.109	VV	0.1541	54.71921	4.62339	1.0718
49	22.363	VV	0.1582	41.43167	3.44768	0.8116
50	22.588	VV	0.1332	27.60716	2.79639	0.5408
51	22.770	VV	0.0755	11.12973	2.10976	0.2180
52	22.910	VV	0.1014	92.83714	13.31339	1.8185
53	23.363	VV	0.2304	27.79680	1.52687	0.5445
54	23.752	VB	0.1223	32.75932	3.73427	0.6417
55	24.182	BV	0.1835	7.50450	5.28926e-1	0.1470
56	24.536	VV	0.0943	5.62777	9.07960e-1	0.1102

Totals : 5105.16933 439.32893

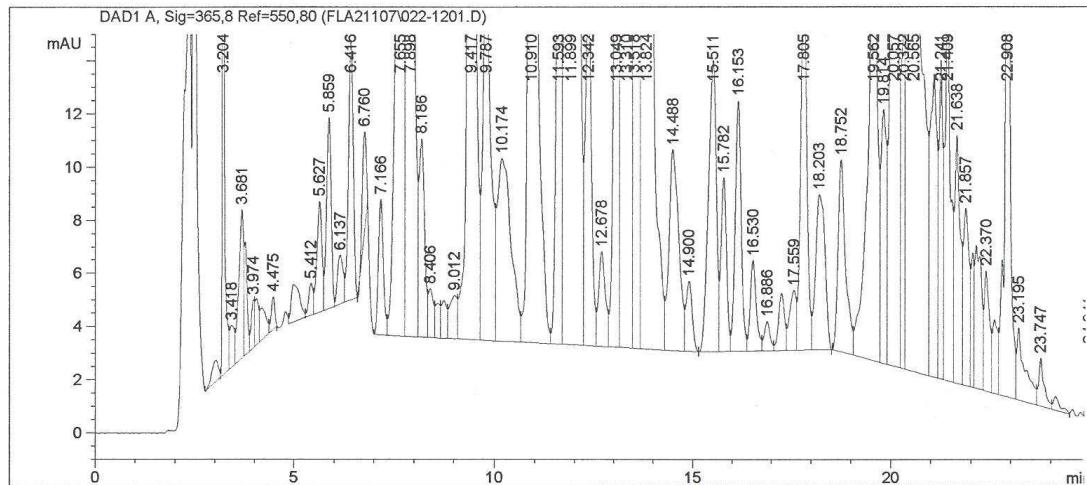
Results obtained with enhanced integrator!

=====
*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\FLA21107\022-1201.D
P. argentea, 500 mg/25 mL (MeOH:H₂O = 1:1), Vinj. 25 μL

Sample Name: P. ARGENTEA

=====
Injection Date : 8.11.2002 6:03:11 Seq. Line : 12
Sample Name : P. ARGENTEA Location : Vial 22
Acq. Operator : Goran & Renata Inj : 1
Acq. Instrument : Instrument 18 Inj Volume : 25 μL
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA.M
Last changed : 7.11.2002 23:21:47 by Goran & Renata
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA1.M
Last changed : 14.11.2002 11:24:47
(modified after loading)
FLAVONOIDI
=====



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=365,8 Ref=550,80

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.022	BV	0.1944	9.79764	8.14132e-1	0.0604
2	3.204	VV	0.0514	116.83855	36.45342	0.7201
3	3.418	VV	0.1262	13.18819	1.60019	0.0813
4	3.681	VV	0.1221	48.19838	5.61590	0.2970
5	3.764	VV	0.0737	21.28953	4.30415	0.1312
6	3.974	VV	0.0866	10.74626	1.82680	0.0662
7	4.050	VV	0.0903	11.29142	1.77348	0.0696
8	4.177	VV	0.1440	13.53981	1.23373	0.0834
9	4.475	VBA	0.0990	8.12613	1.26360	0.0501
10	4.986	VV	0.1945	20.66943	1.43128	0.1274
11	5.412	VV	0.1127	9.10632	1.22569	0.0561
12	5.627	VV	0.1300	36.78975	4.20985	0.2267
13	5.859	VV	0.1278	59.27259	7.21705	0.3653
14	6.137	VV	0.1667	19.44425	1.87945	0.1198
15	6.416	VP	0.1325	82.16892	9.73509	0.5064
16	6.760	VBA	0.1158	26.22251	3.77555	0.1616
17	7.166	BV	0.1347	44.31041	5.13217	0.2731
18	7.655	VV	0.1780	306.13580	24.13817	1.8867

Instrument 1 14.11.2002 11:37:06

Page 1 of 3

Prilog 21. HPLC kromatogram metanolno-vodenog ekstrakta vrste *Plantago argentea* Chaix

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\FLA21107\022-1201.D
P. argentea, 500 mg/25 mL (MeOH:H₂O = 1:1), Vinj. 25 uL

Sample Name: P. ARGENTEA

=====

Injection Date : 8.11.2002 6:03:11 Seq. Line : 12
Sample Name : P. ARGENTEA Location : Vial 22
Acq. Operator : Goran & Renata Inj : 1
Acq. Instrument : Instrument 18 Inj Volume : 25 μ L
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA.M
Last changed : 7.11.2002 23:21:47 by Goran & Renata
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA1.M
Last changed : 14.11.2002 11:24:47
(modified after loading)

=====

FLAVONOIDI

=====

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
19	7.898	VV	0.1778	384.10437	32.06579	2.3672
20	8.186	VV	0.1495	75.39844	7.48581	0.4647
21	8.406	VV	0.1307	16.65414	1.85651	0.1026
22	8.592	VV	0.1240	10.97915	1.30713	0.0677
23	8.746	VV	0.1373	13.54185	1.41894	0.0835
24	9.012	VV	0.1830	21.23237	1.64068	0.1309
25	9.417	VV	0.1459	787.44427	82.12008	4.8530
26	9.787	VV	0.1853	203.93590	15.51630	1.2568
27	10.174	VV	0.3091	165.15915	6.90476	1.0179
28	10.910	VV	0.1445	989.79449	102.63219	6.1001
29	11.593	VV	0.1367	178.61047	19.91065	1.1008
30	11.899	VV	0.2055	2274.09180	170.64528	14.0151
31	12.342	VV	0.1592	146.56586	13.66121	0.9033
32	12.678	VV	0.1730	42.73795	3.58790	0.2634
33	13.049	VV	0.1351	201.99602	22.86707	1.2449
34	13.310	VV	0.1479	2927.53857	305.14346	18.0423
35	13.518	VV	0.1207	591.96625	74.51698	3.6483
36	13.824	VV	0.1649	1609.65601	150.33678	9.9202
37	14.488	VV	0.2363	129.99384	7.56999	0.8011
38	14.900	VP	0.1621	28.17280	2.64928	0.1736
39	15.511	VV	0.2209	155.11557	10.97745	0.9560
40	15.782	VV	0.1527	65.56126	6.55705	0.4041
41	16.153	VV	0.1638	101.77415	9.44134	0.6272
42	16.530	VV	0.1596	36.15644	3.41205	0.2228
43	16.886	VV	0.1522	11.42734	1.10924	0.0704
44	17.247	VV	0.1615	22.76596	2.15126	0.1403
45	17.559	VV	0.1795	25.89861	2.26314	0.1596
46	17.805	VV	0.1653	156.91374	14.61319	0.9671
47	18.203	VBA	0.2302	97.43027	5.85401	0.6005
48	18.752	BV	0.1931	94.98478	7.23868	0.5854
49	19.562	VV	0.2006	315.75018	22.11574	1.9460
50	19.814	VV	0.1360	93.54264	9.57244	0.5765
51	20.057	VV	0.1095	721.90289	98.46006	4.4491
52	20.322	VV	0.0991	93.48838	13.12157	0.5762
53	20.565	VV	0.0800	1383.07751	252.12694	8.5238
54	21.070	VV	0.1570	137.90123	11.41415	0.8499
55	21.241	VV	0.0956	81.95671	12.00756	0.5051
56	21.409	VV	0.1192	146.26251	16.85635	0.9014
57	21.638	VV	0.1345	91.59758	9.33378	0.5645
58	21.857	VV	0.1424	66.67806	6.68384	0.4109
59	22.032	VV	0.0763	27.07905	5.07422	0.1669
60	22.120	VV	0.1468	62.33210	5.39599	0.3841
61	22.370	VV	0.1327	44.58740	4.53368	0.2748
62	22.585	VV	0.1267	25.77782	2.76602	0.1589
63	22.908	VV	0.0842	370.82556	65.32875	2.2854
64	23.195	VV	0.1899	40.04831	2.71820	0.2468
65	23.747	VV	0.1294	17.02615	1.81535	0.1049
66	24.113	VV	0.1747	6.24397	5.25203e-1	0.0385
67	24.941	VP	0.0945	15.77129	2.61064	0.0972
68	25.223	VV	0.1016	38.03313	5.87241	0.2344
69	25.520	VP	0.1244	21.36053	2.58413	0.1316

Totals : 1.62260e4 1752.00094

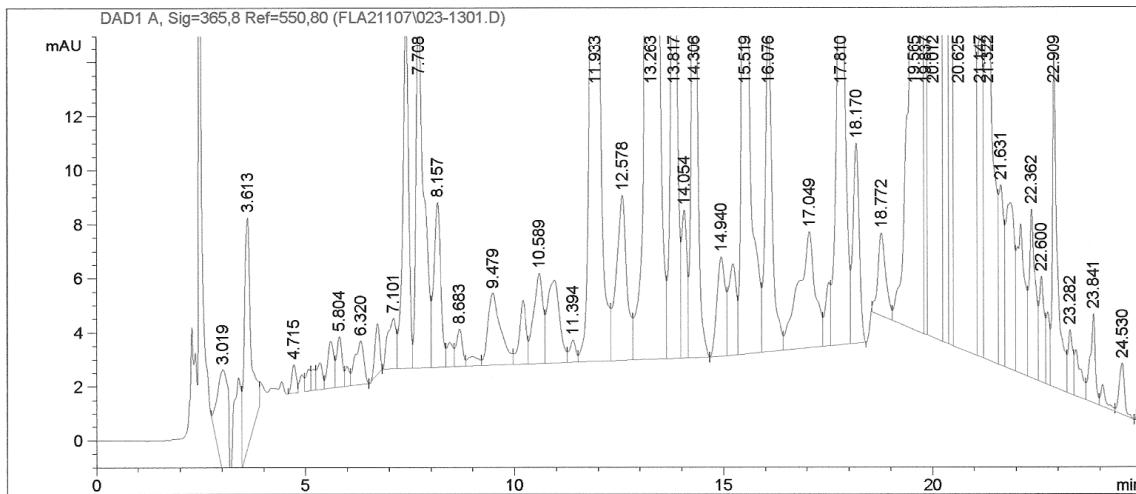
Instrument 1 14.11.2002 11:37:06

Page 2 of 3

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\FLA21107\023-1301.D
P. coronopus, 500 mg/25 mL (MeOH:H₂O = 1:1), Vinj. 25 μ
L

Sample Name: P. CORONOPUS

=====
Injection Date : 8.11.2002 6:39:28 Seq. Line : 13
Sample Name : P. CORONOPUS Location : Vial 23
Acq. Operator : Goran & Renata Inj : 1
Acq. Instrument : Instrument 18 Inj Volume : 25 μ L
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA.M
Last changed : 7.11.2002 23:21:47 by Goran & Renata
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA1.M
Last changed : 14.11.2002 11:24:47
(modified after loading)
FLAVONOIDI
=====



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=365,8 Ref=550,80

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.019	BP	0.2587	67.35683	3.83915	0.5777
2	3.396	VV	0.1711	50.17713	3.82393	0.4304
3	3.613	VB	0.1682	98.17415	8.53418	0.8420
4	4.715	BV	0.1193	8.04166	1.05102	0.0690
5	5.073	VV	0.1136	6.41000	8.16403e-1	0.0550
6	5.193	VV	0.0979	5.43224	7.93417e-1	0.0466
7	5.341	VV	0.1360	9.16104	1.00836	0.0786
8	5.597	VV	0.1625	18.32692	1.74603	0.1572
9	5.804	VV	0.1360	17.09009	1.88064	0.1466
10	5.986	VV	0.1087	5.52818	7.43548e-1	0.0474
11	6.320	VP	0.2100	24.07949	1.61465	0.2065
12	6.718	VBA	0.1286	14.83265	1.86781	0.1272
13	7.101	BV	0.1905	26.43319	1.87524	0.2267
14	7.408	VV	0.1444	127.07817	13.19136	1.0899
15	7.708	VV	0.1788	174.96953	13.71844	1.5007
16	8.157	VV	0.1757	72.09746	6.10819	0.6184
17	8.451	VV	0.1462	9.50826	9.07455e-1	0.0815

Instrument 1 14.11.2002 11:41:19

Page 1 of 2

Prilog 22. HPLC kromatogram metanolno-vodenog ekstrakta vrste *Plantago coronopus* L.

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\FLA21107\023-1301.D
P. coronopus, 500 mg/25 mL (MeOH:H2O = 1:1), Vinj. 25 uL

Sample Name: P. CORONOPUS

=====

Injection Date : 8.11.2002 6:39:28 Seq. Line : 13
Sample Name : P. CORONOPUS Location : Vial 23
Acq. Operator : Goran & Renata Inj : 1
Acq. Instrument : Instrument 18 Inj Volume : 25 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA.M
Last changed : 7.11.2002 23:21:47 by Goran & Renata
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA1.M
Last changed : 14.11.2002 11:24:47
(modified after loading)

FLAVONOIDI

=====

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
18	8.683	VV	0.1538	14.29197	1.39198	0.1226
19	8.987	VV	0.2359	6.48587	3.50399e-1	0.0556
20	9.479	VV	0.3082	57.10200	2.66258	0.4897
21	10.199	VV	0.1718	27.37144	2.35161	0.2348
22	10.589	VV	0.2177	52.12817	3.34617	0.4471
23	10.951	VV	0.2738	61.88987	3.06209	0.5308
24	11.394	VV	0.1523	8.51778	8.25912e-1	0.0731
25	11.933	VV	0.2172	460.19897	32.50925	3.9470
26	12.578	VV	0.2416	106.78670	6.11773	0.9159
27	13.263	VV	0.1515	5746.21680	590.63293	49.2835
28	13.817	VV	0.1588	220.06500	20.90605	1.8874
29	14.054	VV	0.1340	48.92561	5.48631	0.4196
30	14.306	VP	0.1427	218.81174	23.06627	1.8767
31	14.940	VV	0.2043	50.47272	3.67421	0.4329
32	15.220	VV	0.1903	43.48246	3.37536	0.3729
33	15.519	VV	0.1670	361.36395	32.17533	3.0993
34	16.076	VV	0.1684	142.12852	12.52137	1.2190
35	17.049	VV	0.3685	120.87476	4.29276	1.0367
36	17.518	VV	0.1295	20.92896	2.35818	0.1795
37	17.810	VV	0.2132	242.23376	17.11058	2.0776
38	18.170	VP	0.1578	77.50192	7.42463	0.6647
39	18.772	BV	0.1944	40.86900	3.08756	0.3505
40	19.565	VV	0.1906	594.10132	43.14511	5.0954
41	19.837	VV	0.0615	53.50171	12.12284	0.4589
42	20.012	VV	0.1856	473.09036	34.15889	4.0575
43	20.324	VV	0.1096	142.88660	17.81404	1.2255
44	20.424	VV	0.0940	115.54237	16.84058	0.9910
45	20.625	VV	0.3585	535.11188	18.44096	4.5895
46	21.147	VV	0.1150	106.03081	12.75792	0.9094
47	21.322	VV	0.1470	239.24716	21.63770	2.0519
48	21.631	VV	0.1168	56.50198	6.67296	0.4846
49	21.854	VV	0.1999	88.77744	6.16712	0.7614
50	22.104	VV	0.1663	70.27920	5.52986	0.6028
51	22.362	VV	0.1390	64.87405	6.25510	0.5564
52	22.600	VV	0.1154	32.57534	3.90391	0.2794
53	22.748	VV	0.0892	16.25279	2.66472	0.1394
54	22.909	VV	0.1134	100.79202	12.32390	0.8645
55	23.282	VV	0.1122	19.08171	2.36353	0.1637
56	23.424	VV	0.1394	18.32277	1.70417	0.1571
57	23.841	VV	0.1185	27.79240	3.29085	0.2384
58	24.057	VV	0.1220	7.23362	8.27778e-1	0.0620
59	24.530	VP	0.1449	17.21169	1.91386	0.1476
60	24.941	VP	0.0954	10.07992	1.69419	0.0865
61	25.222	VV	0.1017	6.88184	1.06037	0.0590

Totals : 1.16595e4 1075.53943

Results obtained with enhanced integrator!

=====

*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\FLA21107\024-1401.D
P. depauperata, 500 mg/25 mL (MeOH:H₂O = 1:1), Vinj. 25
uL

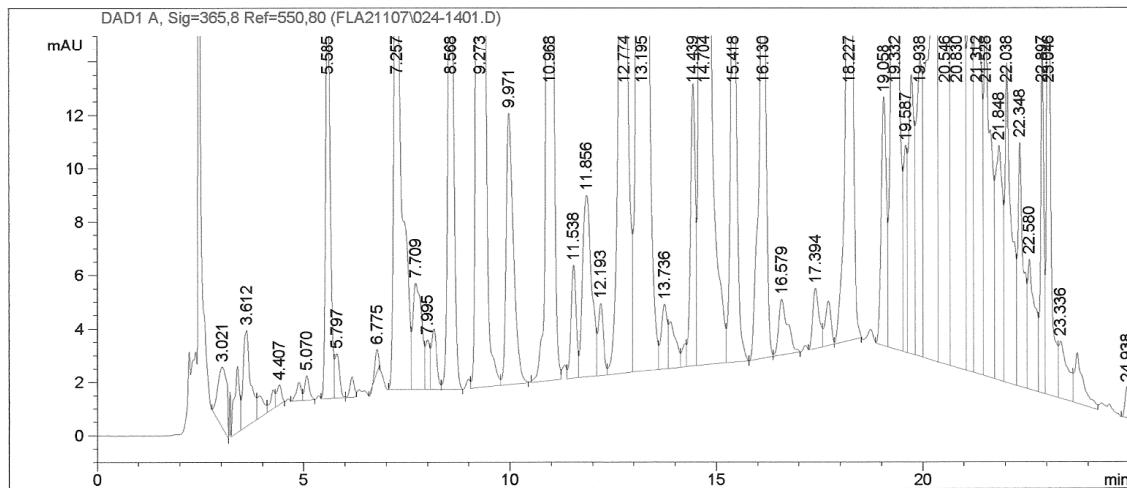
Sample Name: P. DEPAUPERATA

=====

Injection Date : 8.11.2002 7:15:44 Seq. Line : 14
Sample Name : P. DEPAUPERATA Location : Vial 24
Acq. Operator : Goran & Renata Inj : 1
Acq. Instrument : Instrument 18 Inj Volume : 25 μ L
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA.M
Last changed : 7.11.2002 23:21:47 by Goran & Renata
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA1.M
Last changed : 14.11.2002 11:24:47
(modified after loading)

FLAVONOIDI

=====



=====

Area Percent Report

=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=365,8 Ref=550,80

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.021	BP	0.2272	34.16249	2.27538	0.2940
2	3.392	VV	0.1189	22.12134	2.50720	0.1904
3	3.612	VV	0.1645	45.53227	3.62519	0.3919
4	3.927	VV	0.1601	9.37861	8.41231e-1	0.0807
5	4.260	VV	0.1097	5.75924	7.32776e-1	0.0496
6	4.407	VP	0.1239	6.21000	7.55804e-1	0.0534
7	4.882	VV	0.1259	5.85709	6.98145e-1	0.0504
8	5.070	VV	0.1199	7.26584	9.22378e-1	0.0625
9	5.585	VV	0.1177	121.96920	15.86906	1.0497
10	5.797	BV	0.1174	12.82142	1.67266	0.1103
11	6.168	BV	0.1202	5.94234	7.68792e-1	0.0511
12	6.775	VBA	0.0984	5.36445	8.88708e-1	0.0462
13	7.257	BV	0.1764	259.61234	21.27216	2.2342
14	7.709	VV	0.1972	59.03911	3.97570	0.5081
15	7.995	VV	0.1053	13.59302	1.85846	0.1170
16	8.151	VV	0.1369	20.80809	2.27186	0.1791
17	8.568	VP	0.1344	194.45483	22.15641	1.6735

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\FLA21107\024-1401.D
P. depauperata, 500 mg/25 mL (MeOH:H₂O = 1:1), Vinj. 25
uL

Sample Name: P. DEPAUPERATA

=====

Injection Date : 8.11.2002 7:15:44 Seq. Line : 14
Sample Name : P. DEPAUPERATA Location : Vial 24
Acq. Operator : Goran & Renata Inj : 1
Acq. Instrument : Instrument 18 Inj Volume : 25 μ L
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA.M
Last changed : 7.11.2002 23:21:47 by Goran & Renata
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA1.M
Last changed : 14.11.2002 11:24:47
(modified after loading)

FLAVONOIDI

=====

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
18	9.273	VV	0.1724	751.52240	69.38634	6.4676
19	9.971	VB	0.1769	124.72122	10.18457	1.0733
20	10.968	BV	0.1325	569.18762	66.04295	4.8984
21	11.538	VV	0.1358	36.93663	4.23404	0.3179
22	11.856	VV	0.2341	103.93289	6.80852	0.8944
23	12.193	VV	0.1342	23.70143	2.70498	0.2040
24	12.774	VV	0.2142	345.29346	22.11067	2.9716
25	13.195	VV	0.1519	2590.74414	260.77975	22.2959
26	13.736	VV	0.1528	25.19450	2.43362	0.2168
27	13.883	VV	0.1614	20.91052	1.74957	0.1800
28	14.231	VV	0.1093	6.45900	8.83153e-1	0.0556
29	14.439	VV	0.1266	87.63636	10.58375	0.7542
30	14.704	VV	0.1485	2417.04858	250.59486	20.8011
31	15.418	VP	0.1503	181.34175	18.51364	1.5606
32	16.130	VV	0.1569	211.00359	20.03201	1.8159
33	16.579	VP	0.2141	31.69677	2.09966	0.2728
34	17.394	VV	0.1625	24.56897	2.26669	0.2114
35	17.707	VV	0.1517	16.33476	1.67600	0.1406
36	18.227	VBA	0.1553	310.49771	30.37083	2.6721
37	19.058	VV	0.1385	83.47798	9.31554	0.7184
38	19.332	VV	0.1356	476.52151	52.65572	4.1009
39	19.587	VV	0.0923	49.43861	7.76183	0.4255
40	19.727	VV	0.1305	99.06515	10.46126	0.8526
41	19.938	VV	0.1450	117.07927	11.10662	1.0076
42	20.226	VV	0.2579	267.65582	13.23918	2.3034
43	20.546	VV	0.2076	238.01930	14.64475	2.0484
44	20.830	VV	0.2664	346.53516	16.81687	2.9823
45	21.133	VV	0.1264	133.59108	14.93072	1.1497
46	21.312	VV	0.1247	219.43851	24.00059	1.8885
47	21.528	VV	0.1505	166.03703	14.40243	1.4289
48	21.848	VV	0.1584	105.98518	8.80503	0.9121
49	22.038	VV	0.1449	132.41505	11.98813	1.1396
50	22.348	VV	0.1295	87.47919	9.15119	0.7528
51	22.580	VV	0.1604	60.21109	4.86487	0.5182
52	22.897	VV	0.0855	72.77979	12.96621	0.6263
53	23.046	VV	0.0844	170.26990	29.91675	1.4653
54	23.336	VV	0.1939	32.01046	2.14791	0.2755
55	23.732	VV	0.1900	28.15954	1.90965	0.2423
56	24.938	VP	0.1035	7.56502	1.16964	0.0651
57	25.227	VV	0.1443	11.17104	1.24929	0.0961
58	25.744	VP	0.1189	6.28450	7.89621e-1	0.0541

Totals : 1.16198e4 1140.84130

Results obtained with enhanced integrator!

=====

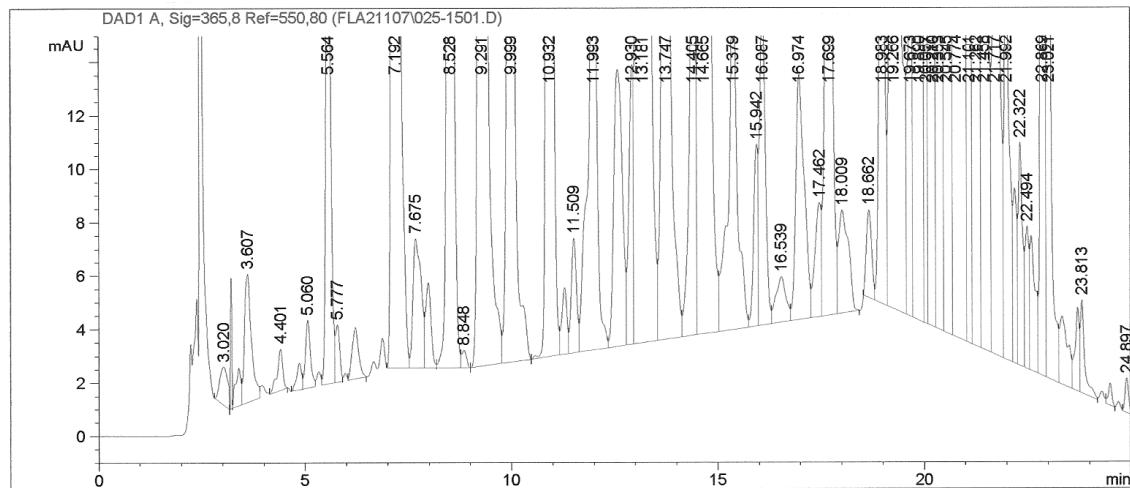
*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\FLA21107\025-1501.D
P. holosteum, 500 mg/25 mL (MeOH:H₂O = 1:1), Vinj. 25 uL

Sample Name: P. HOLOSTEUM

Injection Date : 8.11.2002 7:52:01 Seq. Line : 15
Sample Name : P. HOLOSTEUM Location : Vial 25
Acq. Operator : Goran & Renata Inj : 1
Acq. Instrument : Instrument 18 Inj Volume : 25 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA.M
Last changed : 7.11.2002 23:21:47 by Goran & Renata
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA1.M
Last changed : 14.11.2002 11:24:47
 (modified after loading)

FLAVONOIDI



Area Percent Report

Sorted By	:	Signal
Multiplier	:	1.0000
Dilution	:	1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=365, 8 Ref=550, 80

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.020	BP	0.2102	18.90122	1.43038	0.0904
2	3.206	VV	0.0382	11.14691	4.95809	0.0533
3	3.390	VV	0.1236	12.96088	1.43235	0.0620
4	3.607	VV	0.1527	56.42720	4.81463	0.2698
5	4.401	VBA	0.1381	14.63352	1.55123	0.0700
6	4.856	BV	0.1238	8.34530	9.95542e-1	0.0399
7	5.060	VV	0.1257	21.27349	2.54123	0.1017
8	5.564	VV	0.1165	171.48180	22.60388	0.8201
9	5.777	VV	0.1072	14.96958	2.15068	0.0716
10	6.215	VP	0.1817	21.78795	1.93071	0.1042
11	7.192	VV	0.1318	1334.61292	155.94026	6.3824
12	7.675	VV	0.1905	67.29970	4.83268	0.3218
13	7.981	VV	0.1358	28.92707	3.18850	0.1383
14	8.528	VV	0.1340	531.37262	60.78596	2.5411
15	8.848	VP	0.1292	5.23356	6.55225e-1	0.0250
16	9.291	VV	0.1350	1733.59180	196.42067	8.2904
17	9.999	VP	0.1761	391.21347	34.02468	1.8709

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\FLA21107\025-1501.D
P. holosteum, 500 mg/25 mL (MeOH:H2O = 1:1), Vinj. 25 u
L

Sample Name: P. HOLOSTEUM

=====

Injection Date : 8.11.2002 7:52:01 Seq. Line : 15
Sample Name : P. HOLOSTEUM Location : Vial 25
Acq. Operator : Goran & Renata Inj : 1
Acq. Instrument : Instrument 18 Inj Volume : 25 μ l
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA.M
Last changed : 7.11.2002 23:21:47 by Goran & Renata
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA1.M
Last changed : 14.11.2002 11:24:47
(modified after loading)

FLAVONOIDI

=====

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
18	10.932	VV	0.1288	766.20697	92.31871	3.6642
19	11.286	VV	0.1290	21.68943	2.50421	0.1037
20	11.509	VV	0.1378	38.19181	4.29238	0.1826
21	11.993	VV	0.1634	306.62155	27.22370	1.4663
22	12.575	VV	0.2305	149.75516	10.37090	0.7162
23	12.930	VV	0.1116	76.78386	10.47009	0.3672
24	13.181	VV	0.1786	4865.27881	428.12079	23.2669
25	13.747	VV	0.2018	416.20999	31.57467	1.9904
26	14.405	VV	0.1404	191.90091	20.28237	0.9177
27	14.665	VV	0.1467	3369.49829	355.22025	16.1137
28	15.379	VV	0.2022	203.47906	14.11679	0.9731
29	15.942	VV	0.1093	48.58507	6.80182	0.2323
30	16.087	VV	0.1452	120.75393	12.44049	0.5775
31	16.539	VV	0.2342	28.98887	1.70608	0.1386
32	16.974	VV	0.2063	132.42172	9.17684	0.6333
33	17.462	VV	0.1529	44.35839	4.27959	0.2121
34	17.699	VV	0.1556	337.58206	32.91762	1.6144
35	18.009	VP	0.2250	63.41474	3.87413	0.3033
36	18.662	BV	0.1451	29.68999	3.29481	0.1420
37	18.983	VV	0.1429	174.26398	19.01964	0.8334
38	19.266	VV	0.1636	597.54803	52.18248	2.8576
39	19.673	VV	0.1110	97.08068	12.17313	0.4643
40	19.890	VV	0.1864	269.39691	19.11480	1.2883
41	20.057	VV	0.0767	85.05179	15.82499	0.4067
42	20.210	VV	0.1143	287.46796	35.57479	1.3747
43	20.353	VV	0.1091	419.36578	54.88175	2.0055
44	20.545	VV	0.1544	247.37155	20.84791	1.1830
45	20.774	VV	0.2271	404.49963	23.93723	1.9344
46	21.101	VV	0.1134	134.35735	17.14316	0.6425
47	21.262	VV	0.0851	589.63605	102.59389	2.8198
48	21.458	VV	0.0907	481.43216	77.28692	2.3023
49	21.717	VV	0.1332	248.26285	25.13436	1.1872
50	21.992	VV	0.1008	157.25005	21.63363	0.7520
51	22.190	VV	0.0879	40.38541	6.55132	0.1931
52	22.322	VV	0.1060	63.01447	8.35393	0.3013
53	22.494	VV	0.0949	36.02684	5.32550	0.1723
54	22.592	VV	0.1252	46.31459	5.03827	0.2215
55	22.869	VV	0.0745	482.58304	99.65943	2.3078
56	23.021	VV	0.0811	277.47217	51.32468	1.3269
57	23.332	VV	0.1986	35.48970	2.54691	0.1697
58	23.713	VV	0.1010	22.27311	3.13204	0.1065
59	23.813	VV	0.1042	25.60236	3.46442	0.1224
60	24.497	VV	0.0925	5.25901	8.45912e-1	0.0251
61	24.897	VP	0.0948	7.90406	1.30231	0.0378
62	25.233	VV	0.1183	19.85373	2.56530	0.0949

Totals : 2.09108e4 2258.70164

Results obtained with enhanced integrator!

=====

*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\FLA21107\026-1601.D
P. scopolorum, 500 mg/25 mL (MeOH:H₂O = 1:1), Vinj. 25
uL

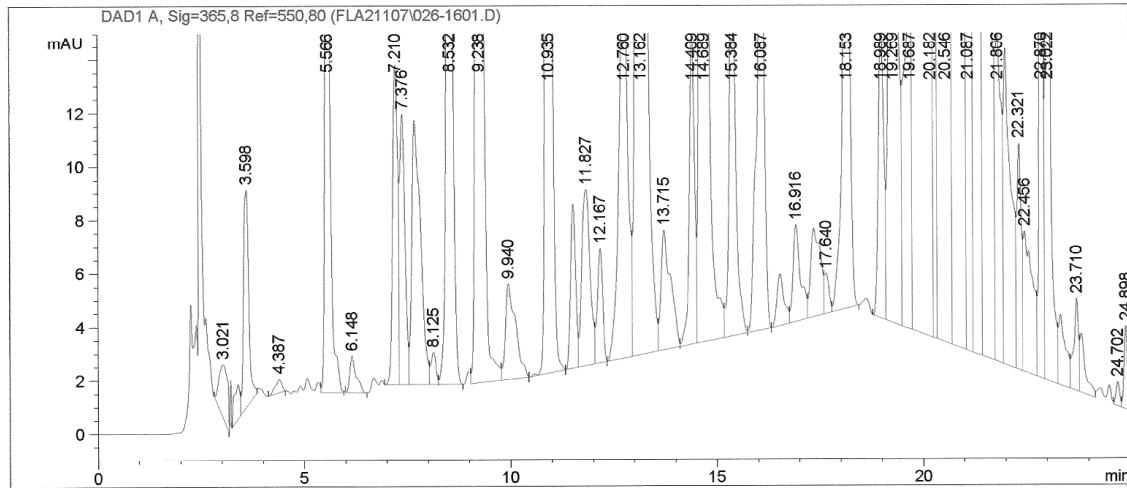
Sample Name: P. SCOPULORUM

=====

Injection Date : 8.11.2002 8:28:18 Seq. Line : 16
Sample Name : P. SCOPULORUM Location : Vial 26
Acq. Operator : Goran & Renata Inj : 1
Acq. Instrument : Instrument 18 Inj Volume : 25 μ L
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA.M
Last changed : 7.11.2002 23:21:47 by Goran & Renata
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA1.M
Last changed : 14.11.2002 11:24:47
(modified after loading)

FLAVONOIDI

=====



=====

Area Percent Report

=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=365,8 Ref=550,80

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.021	VP	0.2227	28.02268	1.96087	0.2157
2	3.387	VV	0.1339	13.47301	1.33320	0.1037
3	3.598	VB	0.1217	72.46928	8.15402	0.5579
4	4.387	PBA	0.1612	5.71155	5.00374e-1	0.0440
5	5.566	VB	0.1199	205.30643	26.06809	1.5805
6	6.148	BP	0.1619	15.64462	1.38430	0.1204
7	7.210	VV	0.1353	105.99768	11.96836	0.8160
8	7.376	VV	0.1292	87.88718	10.12742	0.6766
9	7.673	VV	0.2025	146.43846	9.90200	1.1273
10	8.125	VV	0.1319	10.38225	1.21307	0.0799
11	8.532	VP	0.1338	368.39557	42.20435	2.8361
12	9.238	VV	0.1870	481.96262	41.65698	3.7104
13	9.940	VP	0.2316	61.43283	3.59123	0.4729
14	10.935	VP	0.1299	587.03979	69.96806	4.5193
15	11.514	VV	0.1353	53.54852	6.16625	0.4122
16	11.827	VV	0.2199	92.91190	6.61177	0.7153
17	12.167	VV	0.1368	38.61430	4.29805	0.2973

Prilog 25. HPLC kromatogram metanolno-vodenog ekstrakta vrste *Plantago holosteum* Scop. Page 1 of 2

subsp. *scopolorum*

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\FLA21107\026-1601.D
P. scopolorum, 500 mg/25 mL (MeOH:H₂O = 1:1), Vinj. 25
uL

Sample Name: P. SCOPULORUM

=====

Injection Date : 8.11.2002 8:28:18 Seq. Line : 16
Sample Name : P. SCOPULORUM Location : Vial 26
Acq. Operator : Goran & Renata Inj : 1
Acq. Instrument : Instrument 18 Inj Volume : 25 μ L
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA.M
Last changed : 7.11.2002 23:21:47 by Goran & Renata
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA1.M
Last changed : 14.11.2002 11:24:47
(modified after loading)

FLAVONOIDI

=====

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
18	12.760	VV	0.1886	235.80881	17.57112	1.8154
19	13.162	VV	0.1474	3310.21899	346.82416	25.4835
20	13.715	VV	0.2240	72.93222	4.47918	0.5615
21	14.409	VV	0.1368	104.53844	11.63900	0.8048
22	14.689	VV	0.1477	1102.99084	115.15976	8.4913
23	15.384	VV	0.1551	165.34444	16.20030	1.2729
24	16.087	VP	0.1589	228.08896	20.97487	1.7559
25	16.526	VV	0.1776	23.18376	1.93687	0.1785
26	16.916	VV	0.1862	46.21658	3.63869	0.3558
27	17.345	VV	0.2245	54.85231	3.32372	0.4223
28	17.640	VV	0.1179	11.65043	1.51253	0.0897
29	18.153	VP	0.1529	279.55893	27.42579	2.1522
30	18.989	VV	0.1428	102.86718	11.02905	0.7919
31	19.269	VV	0.1433	538.26575	55.44162	4.1438
32	19.687	VV	0.1609	165.12312	13.67027	1.2712
33	20.182	VV	0.2813	591.09613	26.59278	4.5505
34	20.283	VV	0.0755	143.82687	26.41300	1.1072
35	20.546	VV	0.2522	674.97876	34.80708	5.1963
36	20.812	VV	0.2337	604.06586	34.25510	4.6504
37	21.087	VV	0.1310	237.23244	24.92790	1.8263
38	21.281	VV	0.1640	269.96643	23.86562	2.0783
39	21.495	VV	0.1625	292.92828	23.65259	2.2551
40	21.806	VV	0.1433	132.55626	12.34576	1.0205
41	21.994	VV	0.1673	153.84009	11.86279	1.1843
42	22.321	VV	0.1060	65.53396	8.49939	0.5045
43	22.456	VV	0.2004	83.26391	5.26767	0.6410
44	22.870	VV	0.0775	252.92419	51.29807	1.9471
45	23.022	VV	0.0793	514.14307	101.13778	3.9581
46	23.318	VV	0.1582	31.67910	2.63644	0.2439
47	23.710	VV	0.1150	28.19178	3.46292	0.2170
48	23.818	VV	0.1335	20.79903	2.21677	0.1601
49	24.702	VV	0.0963	5.62599	9.07483e-1	0.0433
50	24.898	VP	0.0946	18.92948	3.12645	0.1457
51	25.243	VV	0.1035	51.17285	7.70718	0.3940

Totals : 1.29896e4 1302.91813

Results obtained with enhanced integrator!

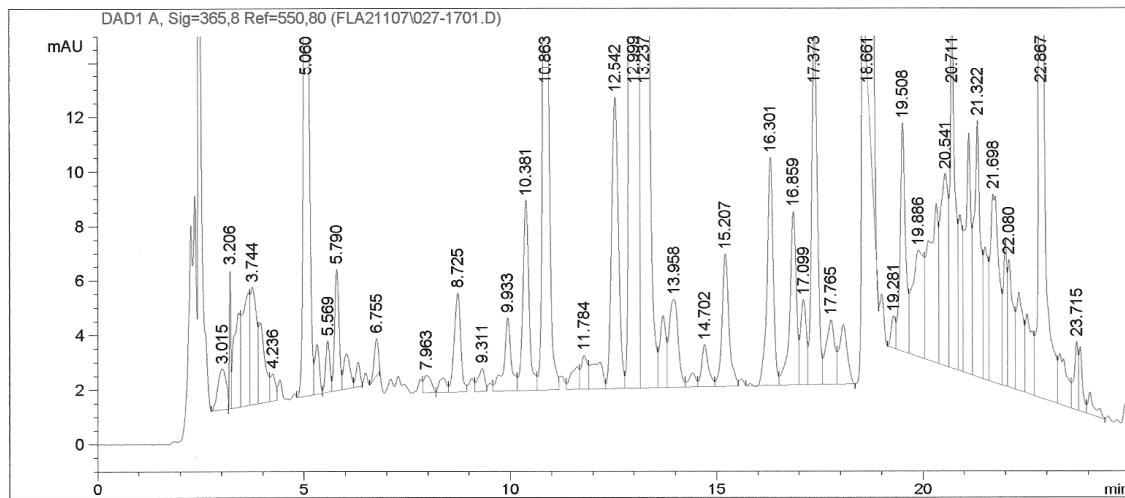
=====

*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\FLA21107\027-1701.D
P. lagopus, 500 mg/25 mL (MeOH:H₂O = 1:1), Vinj. 25 μ L

Sample Name: P. LAGOPUS

=====
Injection Date : 8.11.2002 9:04:37 Seq. Line : 17
Sample Name : P. LAGOPUS Location : Vial 27
Acq. Operator : Goran & Renata Inj : 1
Acq. Instrument : Instrument 18 Inj Volume : 25 μ L
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA.M
Last changed : 7.11.2002 23:21:47 by Goran & Renata
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA1.M
Last changed : 14.11.2002 11:24:47
(modified after loading)
FLAVONOIDI
=====



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=365,8 Ref=550,80

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.015	BP	0.2202	21.42044	1.52186	0.2343
2	3.206	VV	0.0410	12.71706	5.11985	0.1391
3	3.413	VV	0.1463	38.14096	3.46778	0.4172
4	3.654	VV	0.1753	51.57961	4.14092	0.5642
5	3.744	VV	0.1543	44.50213	4.31480	0.4868
6	3.937	VV	0.1508	32.25343	2.96678	0.3528
7	4.236	VV	0.1149	8.23174	1.01172	0.0900
8	5.060	VV	0.1284	224.72745	27.19481	2.4584
9	5.310	VV	0.1167	13.93797	1.83354	0.1525
10	5.569	VV	0.1114	13.56316	1.89685	0.1484
11	5.790	VV	0.1168	33.20945	4.46339	0.3633
12	6.018	VV	0.1693	14.25486	1.30683	0.1559
13	6.307	VV	0.1115	6.56123	9.17179e-1	0.0718
14	6.755	VBA	0.1114	9.56010	1.36951	0.1046
15	7.963	VV	0.1677	8.02655	6.51865e-1	0.0878
16	8.381	VV	0.1649	6.45694	5.27101e-1	0.0706
17	8.725	VV	0.1729	40.15071	3.63434	0.4392
18	9.311	VV	0.1620	9.57972	8.59597e-1	0.1048

Instrument 1 14.11.2002 11:54:38

Page 1 of 2

Prilog 26. HPLC kromatogram metanolno-vodenog ekstrakta vrste *Plantago lagopus* L.

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\FLA21107\027-1701.D
P. lagopus, 500 mg/25 mL (MeOH:H₂O = 1:1), Vinj. 25 uL

Sample Name: P. LAGOPUS

=====

Injection Date : 8.11.2002 9:04:37 Seq. Line : 17
Sample Name : P. LAGOPUS Location : Vial 27
Acq. Operator : Goran & Renata Inj : 1
Acq. Instrument : Instrument 18 Inj Volume : 25 μ L
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA.M
Last changed : 7.11.2002 23:21:47 by Goran & Renata
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA1.M
Last changed : 14.11.2002 11:24:47
(modified after loading)

FLAVONOIDI

=====

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
19	9.933	VV	0.1797	34.43368	2.68303	0.3767
20	10.381	VV	0.1549	72.26071	6.97588	0.7905
21	10.863	VV	0.1425	237.16069	25.51164	2.5944
22	11.612	VV	0.1857	11.87940	8.46576e-1	0.1300
23	11.784	VV	0.1569	13.60082	1.25009	0.1488
24	12.164	VV	0.2687	19.77006	9.82891e-1	0.2163
25	12.542	VV	0.1805	123.27921	10.69157	1.3486
26	12.999	VV	0.1392	2718.18164	301.37863	29.7350
27	13.237	VV	0.1410	1185.62817	126.93235	12.9699
28	13.696	VV	0.1550	27.74407	2.63230	0.3035
29	13.958	VV	0.2358	48.75831	3.23604	0.5334
30	14.415	VV	0.1748	6.30355	5.29904e-1	0.0690
31	14.702	VV	0.1672	17.67699	1.54827	0.1934
32	15.207	VV	0.1763	56.76407	4.85900	0.6210
33	16.301	VV	0.1602	89.10491	8.36725	0.9747
34	16.859	VV	0.1659	71.00682	6.37910	0.7768
35	17.099	VV	0.1491	30.77933	3.12069	0.3367
36	17.373	VV	0.1501	126.92219	12.97330	1.3884
37	17.765	VV	0.2059	34.67166	2.35321	0.3793
38	18.063	VP	0.1918	28.84820	2.18779	0.3156
39	18.661	BP	0.1367	1840.46704	213.15126	20.1334
40	19.281	VV	0.1133	8.60139	1.17708	0.0941
41	19.508	VV	0.1324	76.36730	8.37607	0.8354
42	19.886	VV	0.2496	74.35102	3.91489	0.8133
43	20.320	VV	0.2083	95.33170	5.84307	1.0429
44	20.541	VV	0.1787	92.27728	7.04794	1.0094
45	20.711	VV	0.1088	111.98611	14.08519	1.2250
46	20.896	VV	0.0981	40.34408	5.73565	0.4413
47	21.112	VV	0.1298	83.19878	8.83971	0.9101
48	21.322	VV	0.1420	99.93528	9.39945	1.0932
49	21.503	VV	0.1079	38.15646	4.84295	0.4174
50	21.698	VV	0.1883	101.98887	6.90624	1.1157
51	21.990	VV	0.0902	34.65623	5.44829	0.3791
52	22.080	VV	0.1164	41.14801	4.68653	0.4501
53	22.315	VV	0.1544	42.03963	3.59625	0.4599
54	22.518	VV	0.1526	33.56628	2.91024	0.3672
55	22.867	VV	0.0813	657.63904	125.20611	7.1941
56	23.310	VV	0.1889	27.58819	1.86179	0.3018
57	23.715	VV	0.0999	17.62713	2.51094	0.1928
58	23.798	VV	0.0872	13.90852	2.34657	0.1521
59	24.035	VV	0.1477	9.00636	8.22945e-1	0.0985
60	25.172	VV	0.1003	50.59918	7.73269	0.5535
61	25.480	VP	0.1421	6.91944	7.19888e-1	0.0757

Totals : 9141.35132 1039.79995

Results obtained with enhanced integrator!

=====

*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\FLA21107\028-1801.D
P. maritima, 500 mg/25 mL (MeOH:H₂O = 1:1), Vinj. 25 μ L

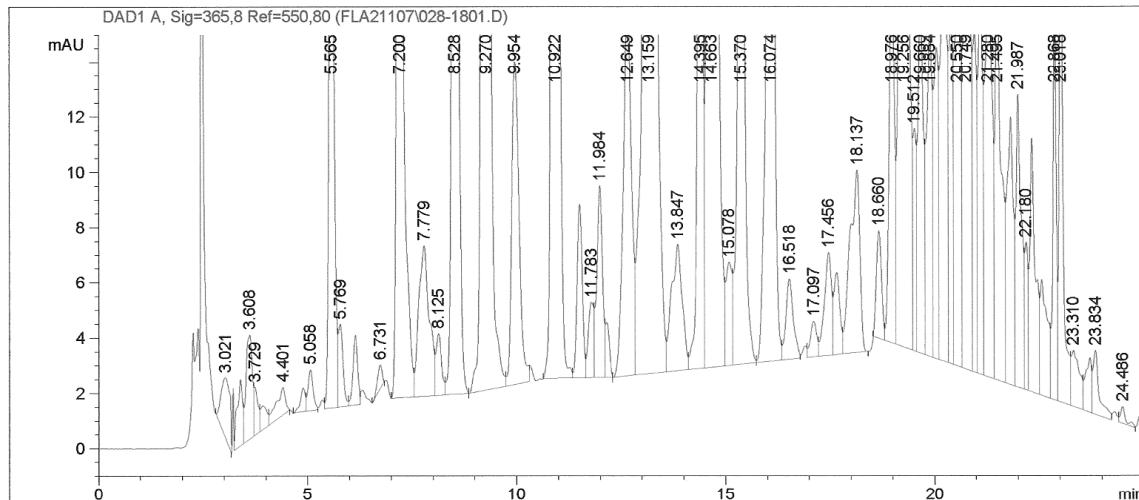
Sample Name: P. MARITIMA

=====

Injection Date : 8.11.2002 9:40:54 Seq. Line : 18
Sample Name : P. MARITIMA Location : Vial 28
Acq. Operator : Goran & Renata Inj : 1
Acq. Instrument : Instrument 18 Inj Volume : 25 μ L
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA.M
Last changed : 7.11.2002 23:21:47 by Goran & Renata
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA1.M
Last changed : 14.11.2002 11:24:47
(modified after loading)

FLAVONOIDI

=====



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=365,8 Ref=550,80

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.021	BP	0.2287	31.47531	2.15119	0.2104
2	3.387	VV	0.1247	22.61291	2.42669	0.1511
3	3.608	VV	0.1414	40.81460	3.79642	0.2728
4	3.729	VV	0.1021	10.82053	1.76647	0.0723
5	3.922	VV	0.1398	9.11060	8.72645e-1	0.0609
6	4.401	VBA	0.2124	16.32466	1.01075	0.1091
7	4.885	PV	0.1230	7.23092	8.69681e-1	0.0483
8	5.058	VV	0.1273	12.73284	1.49583	0.0851
9	5.565	VV	0.1166	214.76480	28.26558	1.4354
10	5.769	VV	0.1143	22.66841	2.99592	0.1515
11	6.133	VV	0.1267	20.88122	2.52057	0.1396
12	6.731	VBA	0.1203	6.53917	8.64382e-1	0.0437
13	7.200	BV	0.1464	387.41208	40.21659	2.5893
14	7.779	VV	0.2363	96.56490	5.46054	0.6454
15	8.125	VV	0.1362	20.83142	2.24624	0.1392
16	8.528	VP	0.1323	506.75104	58.94543	3.3869
17	9.270	VV	0.1998	778.72284	62.30884	5.2046
18	9.954	VB	0.1935	144.01649	11.71190	0.9625

Instrument 1 14.11.2002 11:57:38

Page 1 of 2

Prilog 27. HPLC kromatogram metanolno-vodenog ekstrakta vrste *Plantago maritima* L.

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\FLA21107\028-1801.D
P. maritima, 500 mg/25 mL (MeOH:H₂O = 1:1), Vinj. 25 uL

Sample Name: P. MARITIMA

=====

Injection Date : 8.11.2002 9:40:54 Seq. Line : 18
Sample Name : P. MARITIMA Location : Vial 28
Acq. Operator : Goran & Renata Inj : 1
Acq. Instrument : Instrument 18 Inj Volume : 25 μ L
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA.M
Last changed : 7.11.2002 23:21:47 by Goran & Renata
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FLA1.M
Last changed : 14.11.2002 11:24:47
(modified after loading)

FLAVONOIDI

=====

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
19	10.922	PV	0.1298	1345.14807	160.49969	8.9903
20	11.501	VV	0.1357	54.88704	6.29603	0.3668
21	11.783	VV	0.1461	25.72508	2.72535	0.1719
22	11.984	VV	0.1409	65.99708	6.94033	0.4411
23	12.144	VP	0.0996	12.59217	1.99469	0.0842
24	12.649	VV	0.1911	186.86700	14.05693	1.2489
25	13.159	VV	0.1610	3396.77588	322.23334	22.7024
26	13.847	VV	0.2359	81.90757	4.59748	0.5474
27	14.395	VV	0.1315	229.52063	26.92205	1.5340
28	14.663	VV	0.1462	3033.20996	321.14230	20.2725
29	15.078	VV	0.1443	37.96025	3.74212	0.2537
30	15.370	VV	0.1542	314.92041	31.09535	2.1048
31	16.074	VV	0.1458	547.20508	57.09672	3.6573
32	16.518	VV	0.1833	35.92096	2.92428	0.2401
33	17.097	VV	0.1604	13.60915	1.29679	0.0910
34	17.456	VV	0.1708	44.40693	3.73357	0.2968
35	17.647	VV	0.1476	29.49409	2.97742	0.1971
36	18.137	VP	0.2209	107.13665	6.61847	0.7161
37	18.660	BV	0.1388	33.67404	3.89599	0.2251
38	18.976	VV	0.1362	120.14581	13.45438	0.8030
39	19.256	VV	0.1442	714.48724	72.99145	4.7753
40	19.512	VV	0.0698	41.18705	8.03786	0.2753
41	19.660	VV	0.1238	120.68133	13.83048	0.8066
42	19.884	VV	0.1321	115.56391	11.81568	0.7724
43	20.043	VV	0.1090	88.03043	11.29193	0.5884
44	20.201	VV	0.1667	165.68176	13.36127	1.1073
45	20.389	VV	0.1058	89.78074	12.20583	0.6001
46	20.550	VV	0.1436	144.34660	13.62990	0.9647
47	20.749	VV	0.1718	202.78532	15.79546	1.3553
48	20.950	VV	0.0953	81.34953	12.28435	0.5437
49	21.091	VV	0.1131	112.00508	14.03315	0.7486
50	21.280	VV	0.1497	183.99945	16.55120	1.2298
51	21.495	VV	0.1145	166.61586	19.73098	1.1136
52	21.813	VV	0.1420	104.42420	9.66936	0.6979
53	21.987	VV	0.1250	97.15695	10.59113	0.6494
54	22.180	VV	0.0783	29.46981	5.34710	0.1970
55	22.317	VV	0.1307	87.18540	9.18755	0.5827
56	22.555	VV	0.1580	51.16279	4.20343	0.3419
57	22.868	VV	0.0829	80.77618	14.51286	0.5399
58	23.018	VV	0.0871	131.18019	22.15130	0.8767
59	23.310	VV	0.1804	28.62088	2.03134	0.1913
60	23.704	VV	0.1342	20.05457	1.97974	0.1340
61	23.834	VV	0.1453	23.68635	2.31569	0.1583
62	24.486	VV	0.1282	5.67799	6.35877e-1	0.0379
63	25.216	VV	0.1445	8.87678	9.90809e-1	0.0593

Totals : 1.49622e4 1543.34470

Results obtained with enhanced integrator!

=====

*** End of Report ***

Plantago analiza

Ulazna matrica podataka

Plantago

Input Data

Output: NTSYSpc 2.10s, (C) 2000-2001, Applied Biostatistics Inc.
Date & time: 12.11.2002 13:59:52

Input parameters

Read input from file: D:\TONI\RADOVI\Rad 32 - Plantago I\Plantago.xls
Format: width=9 decimals=4
Page width: 80
Field width: 9
Decimal places: 4
Page width: 80
Matrix type = 1, size = 8 by 8, missing value code = "none" (rectangular)

altissima argentea coronopus hol-dep hol-hol hol-sco lagopus maritima

rutin	0.0000	0.0240	0.0000	0.0050	0.0050	0.0070	0.0000	0.0070
hiperozid	0.0120	0.0070	0.0170	0.0000	0.0110	0.0000	0.0200	0.0000
kvercitrin	0.0020	0.0010	0.0090	0.0010	0.0130	0.0050	0.0080	0.0000
kvercetin	0.0000	0.0000	0.0000	0.0080	0.0140	0.0280	0.0000	0.0060
klorog. k.	0.0230	0.0070	0.0030	0.0040	0.0110	0.0020	0.1150	0.0060
kavena k.	0.0330	0.0000	0.0460	0.0230	0.0000	0.0340	0.0010	0.0000
aukubin	0.0900	0.2700	0.0000	0.0800	0.0000	0.0000	0.0700	0.0300
katalpol	0.1300	1.8100	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0800	0.0000

Ending date & time: 12.11.2002 13:59:52

Standardizacija

Subtract: YBAR
Divide by: STD

Matrix type = 1, size = 8 by 8, missing value code = "none" (rectangular)

Var.	Mean	Std.Dev	n	Min	Max
rutin	0.0060	0.0079	8	0.0000	0.0240
hiperozid	0.0084	0.0079	8	0.0000	0.0200
kvercitrin	0.0049	0.0047	8	0.0000	0.0130
kvercetin	0.0070	0.0099	8	0.0000	0.0280
klorog. k.	0.0214	0.0384	8	0.0020	0.1150
kavena k.	0.0171	0.0191	8	0.0000	0.0460
aukubin	0.0675	0.0900	8	0.0000	0.2700
katalpol	0.2525	0.6313	8	0.0000	1.8100

Standardized matrix (8 by 8) saved in file: plantago-sdt.NTS

Ending date & time: 12.11.2002 14:07:40

Prilog 28. "Cluster" analiza fitokemijskih rezultata

Koeficijent udaljenosti

Simint: NTSYSpc 2.10s, (C) 2000-2001, Applied Biostatistics Inc.
Date & time: 12.11.2002 14:09:15

Input parameters

Read input from file: D:\TONI\RADOVI\Rad 32 - Plantago I\plantago-sdt.NTS
Compute by: cols
Save results in output file: plan-sdt-dis.NTS
Coefficient: DIST

Comments:

STAND: input=D:\TONI\RADOVI\Rad 32 - Plantago I\Plantago-01.NTS, divide=STD,
subts=YBAR, direction=Row
Matrix type = 1, size = 8 by 8, missing value code = "none" (rectangular)

Dis/Similarity matrix (8 by 8) saved in file: plan-sdt-dis.NTS

Ending date & time: 12.11.2002 14:09:15

Dendrogram

SAHN: NTSYSpc 2.10s, (C) 2000-2001, Applied Biostatistics Inc.
Date & time: 12.11.2002 14:16:51

Input parameters

Read input from file: D:\TONI\RADOVI\Rad 32 - Plantago I\plan-sdt-dis.NTS
Save result tree in output file: plan-dis-upg.NTS
Clustering method: UPGMA
In case of ties: WARN

Comments:

STAND: input=D:\TONI\RADOVI\Rad 32 - Plantago I\Plantago-01.NTS, divide=STD,
subts=YBAR, direction=Row
SIMINT: input=D:\TONI\RADOVI\Rad 32 - Plantago I\plantago-sdt.NTS, coeff=DIST,
direction=Cols
Matrix type = 2, size = 8 by 8, missing value code = "none" (dissimilarity)
Results will be stored in file: plan-dis-upg.NTS

Ending date & time: 12.11.2002 14:16:51

Tree

