

Kvalitativna fitokemijska karakterizacija nekih vrsta roda *Plantago* L.

Jurišić Grubešić, Renata; Vladimir-Knežević, Sanda

Source / Izvornik: *Farmaceutski glasnik*, 2004, 60, 297 - 309

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:242423>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



Kvalitativna fitokemijska karakterizacija nekih vrsta roda *Plantago* L.

RENATA JURIŠIĆ GRUBEŠIĆ¹, SANDA VLADIMIR-KNEŽEVIĆ²

¹Zavod za analitiku i kontrolu lijekova i ²Zavod za farmakognoziju
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Qualitative phytochemical characterization of some *Plantago* species

S u m m a r y – Qualitative phytochemical analysis of some *Plantago* species from the western part of Croatia (*P. altissima* L., *P. argentea* Chaix, *P. coronopus* L., *P. holosteam* Scop., *P. lagopus* L., and *P. maritima* L.) 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 thin-layer chromatography. Significant differences were observed in distribution of iridoids, flavonoids, and phenolic acids between investigated plant samples. The results of the present work show that examined *Plantago* species have considerable phytotherapeutic potential and they could be a good resource of biologically active compounds.

(Faculty of Pharmacy and Biochemistry, A. Kovačića 1, HR-10000 Zagreb, Croatia)

UVOD

Rod trputac (*Plantago*) iz porodice trpucovki (*Plantaginaceae*) sadrži u mnogim svojim taksonima još nedovoljno poznata i slabo iskorištena prirodna bogatstva biljnih resursa.

Dosadašnja fitokemijska istraživanja otkrila su prisutnost brojnih biološki aktivnih sastavnica i znatnu terapijsku vrijednost pojedinih predstavnica toga polimorfnog roda, primjerice vrste *P. lanceolata* L. (1, 2), *P. major* L. (3), *P. ovata* Forsk. (4) i *P. psyllium* L. (5–8), čiji se fitopreparati u terapiji primjenjuju kao ekspektoransi i laksansi. Listovi vrste *P. major* stoljećima su znano sredstvo za liječenje rana i nekih kožnih oboljenja. Znanstvena su istraživanja pokazala da pritom značajnu ulogu ima antibakterijska aktivnost iridoida plantamajozida i akteozida. U listovima te vrste sadržani su i spojevi snažnog protuupalnog djelovanja. Osim već spomenutoga plantamajozida, to su flavo-

noidi baikalein i hispidulin, potom iridoidni glikozid aukubin, te ursolna i oleanolna kiselina. Neki flavonoidi i derivati kavene kiseline imaju antioksidativna svojstva i sposobnost vezanja slobodnih radikala. Pektinski su polisaharidi pokazali učinkovitost u liječenju ulkusa u pokusnih životinja, te kao dobri imunostimulansi, dok dugolančani zasićeni primarni alkoholi iz lisnog voska pomažu zacjeljivanju površinskih rana (9). Potvrđeno je i da etanolni ekstrakt listova vrste *P. major* snažno inhibira otpuštanje histamina, te bi mogao biti vrijedna pomoć u liječenju astme i drugih respiratornih oboljenja (10). Posebice je značajno spomenuti da neki prirodni spojevi dobiveni iz vrsta roda *Plantago* posjeduju snažnu imunomodulacijsku aktivnost i povećavaju lučenje γ -interferona (IFN- γ), primjerice aukubin, klorogenska kiselina, ferula kiselina, flavonoidi baikalein, baikalin i dr. Triterpenski spojevi, kao što su oleanolna i ursolna kiselina, nisu značajni modulatori limfocitne proliferacije, ali pokazuju snažnu aktivnost u stimulaciji sekrecije IFN- γ (11). Istraživanjima tekućih etanolnih ekstrakata vrste *P. lanceolata* utvrđeno je da su oni vrlo djelotvorni u sprečavanju membranske iritacije, što potvrđuje njihovu snažnu protuupalnu aktivnost (3). Najnovije su studije također pokazale da metanolni ekstrakti različitih vrsta roda *Plantago* koče rast i djeluju citotoksično na stanice adenokarcinoma dojke i melanoma. Ti bi se preliminarni rezultati mogli objasniti citotoksičnom aktivnošću flavona, luteolin-7-O- β -glukozida, glavnog flavonoida većine vrsta roda *Plantago* (12).

Fitokemijska istraživanja u okviru ovoga rada obuhvatila su kvalitativnu analizu uzoraka zapadnohrvatskih srodnica terapijski dokazano vrijednih vrsta roda *Plantago* L.: *P. altissima* L., *P. argentea* Chaix, *P. coronopus* L., *P. holosteuum* Scop. (subsp. *depauperata* Pilger, subsp. *holosteuum* i subsp. *scopulorum* (Degen) Horvatić), *P. lagopus* L. i *P. maritima* L. Analiza biljnih uzoraka uključila je histokemijske reakcije, koje omogućavaju vrlo brzu i jednostavnu provjeru prisutnosti velikog broja kemijskih sastavnica u biljnom materijalu, potom je primijenjena metoda tankoslojne kromatografije za dokazivanje iridoida, flavonoida, fenolnih kiselina, triterpenskih kiselina, saponina i sterola, dok je reakcijama stvaranja obojenih produkata i taloga ispitana prisutnost trjeslovina u analiziranim biljnim uzorcima. Takva preliminarna istraživanja otkrivaju vrijednost i bogatstvo još neistraženih pripadnica hrvatske flore i preduvjet su za daljnja izučavanja spomenutih bioaktivnih tvari.

EKSPERIMENTALNI DIO

Biljni materijal

Kvalitativnoj fitokemijskoj analizi podvrgnuti su na zraku osušeni nadzemni dijelovi biljnih vrsta roda *Plantago* L. iz zapadnog dijela Hrvatske. Biljni je materijal skupljen u lipnju 2000. u dolini rijeke Mirne (*P. altissima* L.), na području Gornjeg Jelenja (*P. argentea* Chaix i *P. holosteuum* Scop. subsp. *holosteuum*), u Medulinu (*P. coronopus* L., *P. maritima* L. i *P. lagopus* L.), između Vodnjana i Bala (*P. holosteuum* Scop. subsp. *depauperata* Pilger), te na području lošinjske strane Osora (*P. holosteuum* Scop. subsp. *scopulorum* (Degen) Horvatić).

Identifikacija biljnog materijala navedenih biljnih vrsta provedena je usporedbom s dostupnim literaturnim podacima (13–16), a u suradnji sa Zavodom za farmaceutsku botaniku Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Reagensi i standardi

Reagensi: aceton (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska); bakar(II)-sulfat (Kemika); benzin (Merck, Darmstadt, Germany); dietileter (Kemika); etanol (Kemika); etilmetilketon (Merck); fenilhidrazin-klorid (Merck); formaldehid (Kemika); glicerol (Kemika); kalij-hidroksid (Kemika); kalij-natrij-tartarat (Kemika); kloridna kiselina (Kemika); klorsulfonska kiselina (Merck); metanol (Kemika); metilenplavilo (Merck); mravlja kiselina (Kemika); α -naftol (Ciba, Basel, Switzerland); natrij-acetat (Kemika); natrij-hidroksid (Kemika); Naturstoff-reagens (Fluka, Buchs, Switzerland); nitratna kiselina (Merck); octena kiselina (Kemika); olovo-acetat (Kemika); polietilenglikol 4000 (Fluka); n-propanol (Kemika); Sudan III (Fluka); sulfatna kiselina (Kemika); toluen (Kemika); trikloroctena kiselina (Merck); vanilin (Kemika); želatina (Merck); željezo(III)-amonij-sulfat (Kemika); željezo(III)-klorid (Kemika).

Standardi: aukubin (Phytoflan, 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).

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 reakcija promatrana pod svjetlosnim mikroskopom. Histokemijskom analizom (17, 18) 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 ispiru 50%-tnim 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%-tnim etanolom i doda kap glicerola).

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 dietiletera, 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 je otopljen u 1 mL metanola. 10 μ L metanolne otopine naneseo je kapilarom na staklenu ploču s adsorbensom Kieselgelom 60 F₂₅₄. Odjeljivanje supstancija postignuto je razvijanjem etilacetat – etilmetilketon – mravlja kiselina – voda (5:3:1:1, V/V/V/V). Dobiveni kromatogram promatran je pod UV-svjetlom, na 365 nm (19).

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 razvijanje etilacetat – etilmetilketon – mravlja kiselina – voda (5:3:1:1, V/V/V/V), etilacetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V/V/V), te etilacetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V/V). Detekcija je provedena prskanjem s 0,5%-tnom otopinom kloridne kiseline. Primijeten je i razvijatelj n-propanol – toluen – ledena octena kiselina – voda (25:20:10:10, V/V/V/V), a detekcija izvršena prskanjem benzidin reagensom (20).

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 razvijanje etilacetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V/V) i etilacetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V/V/V). Nakon prskanja Naturstoff-reagensom i 5%-tnom etanolnom otopinom polietilenglikola 4000 (NST/PEG), kromatogrami su promatrani pod UV-svjetlom na 365 nm (20). Naturstoff-reagens pripremljen je otapanjem 1 g β -etilaminoestera difenilboratne kiseline u 100 mL metanola.

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 tikvici 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 je profiltriran. Potom je filtar-papir ispran s 1 mL tople vode. Dokaz kondenziranih trjeslovina je talog na filtar-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 (21).

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 hlađenje, u trajanju od 30 minuta. Bistri filtrat uparen je do suha, a ostatak otopljen u malo metanola. Na tanki sloj adsorbensa Kieselgela 60 F₂₅₄ nanoseno je 20 µL metanolne otopine. Odjeljivanje supstancija postignuto je pomoću razvijачa kloroform – metanol – voda, 64:50:10 (V/V/V), a njihova je detekcija provedena prskanjem kromatograma klorsulfonskom kiselinom i zagrijavanjem na 105 °C. Reagens za detekciju pripremljen je miješanjem 5 mL klorsulfonske kiseline s 10 mL ledene octene kiseline, uz oprezno hlađenje (20).

Kvalitativna analiza sterola i triterpenskih kiselina

Metanolni ekstrakti listova, pripremljeni prethodno opisanim postupkom ekstrakcije saponina, podvrgnuti su kromatografskom odjeljivanju na tankom sloju. Primijenjen je adsorbens Kieselgel 60 F₂₅₄ i razvijач benzen – acetone u omjeru 9:1 (V/V). Detekcija sterola i triterpenskih kiselina provedena je prskanjem kromatograma klorsulfonskom kiselinom, uz zagrijavanje nekoliko minuta na 105 °C (22).

REZULTATI I RASPRAVA

Histokemijska analiza

Rezultati histokemijske analize izučavanih vrsta roda *Plantago* L. prikazani su tablicom 1.

Tablica 1. 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 tamnozeleno 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	konc. 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*.

Histokemijskom analizom biološki aktivnih tvari iz listova i stabljika vrsta roda *Plantago* L. utvrđeno je da su svi istraženi biljni uzorci sadržavali trjeslovine, sluzi, glikozide i alkaloidne, 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*.

Iridoidi

Primjenom metode tankoslojne kromatografije dokazane su iridoidne supstancije u listovima istraživanih vrsta roda *Plantago* L. Kvalitativna je analiza pritom najuspješnije provedena primjenom razvijaača koji je sadržavao smjesu otapala n-propanol – toluen – ledena octena kiselina – voda, u omjeru 25:20:10:10 (V/V/V/V), a potom detekcijom s benzidin reagensom (slika 1.).



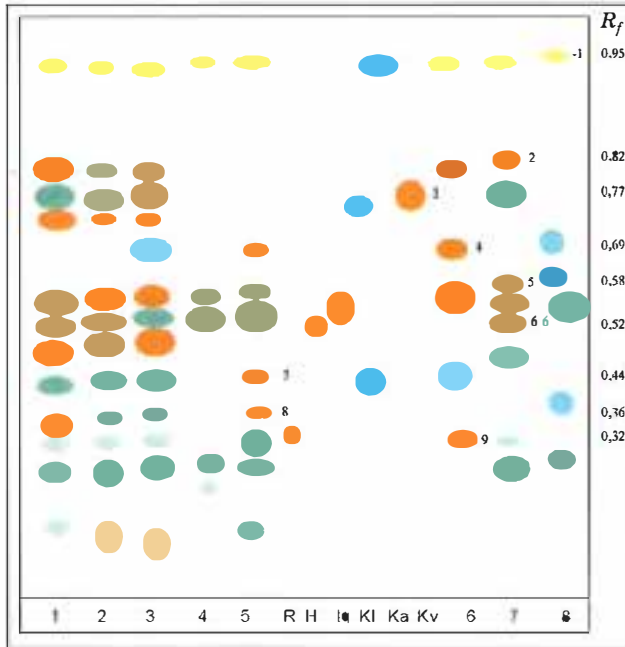
- | | | |
|--|------------------------|-------------------------|
| 1. <i>P. holosteum</i> subsp. <i>holosteum</i> | 5. <i>P. argentea</i> | 9. <i>P. lanceolata</i> |
| 2. <i>P. holosteum</i> subsp. <i>scopulorum</i> | 6. <i>P. lagopus</i> | A. <i>aukubin</i> |
| 3. <i>P. holosteum</i> subsp. <i>depauperata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

Slika 1. Kromatogram iridoida vrsta roda *Plantago* L.

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

Detekcija: benzidin reagens.

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.



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*

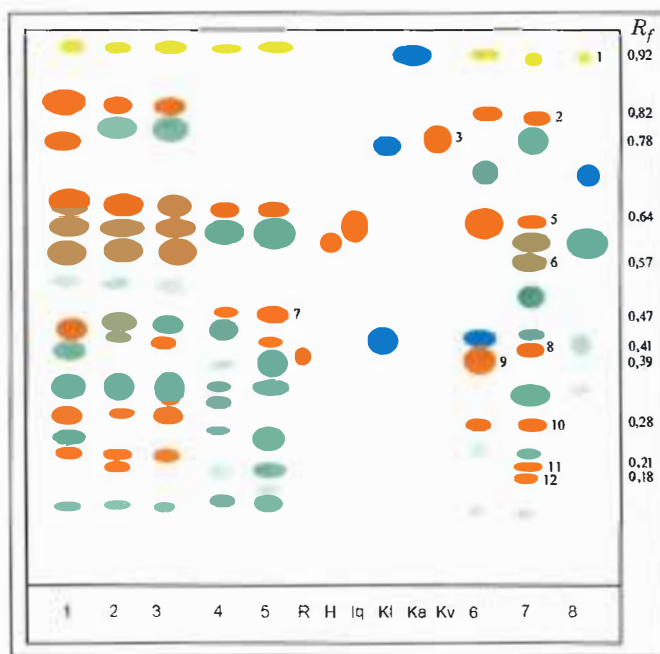
- R – rutin
H – hiperozid
Iq – izokvercitrin
Kl – klorogenska kiselina
Ka – kavena kiselina
Kv – kvercitrin

Slika 2. Kromatogram flavonoida vrsta roda *Plantago* L.
Razvijatelj: etilacetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V/V);
Detekcija: NST/PEG, UV-365 nm.

Flavonoidi

Flavonoidi i fenolne kiseline u metanolnim ekstraktima listova analiziranih biljnih vrsta dokazani su na tankom sloju Kieselgela 60 F₂₅₄, uz razvijanje etilacetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1, V/V/V) (slika 2.) i etilacetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V/V/V) (slika 3.). Nakon detekcije NST/PEG reagensom, kromatogrami su promatrani pod UV-svjetlom na 365 nm.

Na kromatogramima su uočene brojne narančasto fluorescirajuće zone flavonoida, plave zone fenolnih kiselina, te zelenoplavo fluorescirajuće iri-



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

Slika 3. Kromatogram flavonoida vrsta roda *Plantago* L.

Razvijaj: etilacetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V/V/V);

Detekcija: NST/PEG, UV-365 nm.

doidne supstancije. Po boji i fluorescenciji flavonoidnih sastavnica može se ustvrditi njihova pripadnost kvercetinском tipu.

Glikozid kvercitrin (označen brojem 3) uočen je u sve tri niže svojte vrste *P. holosteum*, 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 tankoslojne kromatografije nije dokazana prisutnost kavene kiseline u metanolnim ekstraktima listova istraživanih biljnih vrsta, dok je klorogenska kiselina zabilježena samo u listovima vrste *P. lagopus*.

Trjeslovine

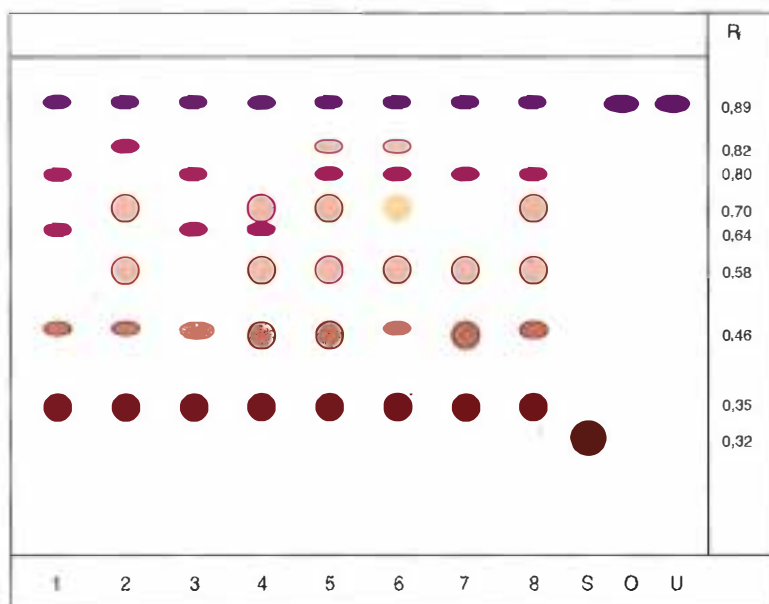
Prisutnost trjeslovina u nadzemnim dijelovima analiziranih biljaka roda *Plantago* L. dokazana je općim reakcijama s metalnim solima i želatinom. Dodatkom željezo(III)-klorida u vodene ekstrakte nastao je maslinastozeleni talog. U reakciji sa željezo(III)-amonij-sulfatom uočeno je maslinastozeleno obojenje. 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, dok je prisutnost kondenziranih trjeslovina potvrđena za *P. holosteum* subsp. *depauperata*, *P. holosteum* subsp. *scopulorum* i *P. maritima*.

Saponini i triterpeni

Metanolni ekstrakti listova analizirani su metodom tankoslojne kromatografije, a odjeljivanje saponinskih i triterpenskih supstancija postignuto je na tankom sloju adsorbensa Kieselgela 60 F₂₅₄, pomoću razvijaa kloroform – metanol – voda, 64:50:10 (V/V/V). Detekcija razvijenih kromatografskih zona provedena je prskanjem klorsulfonskom kiselinom i zagrijavanjem na 105 °C (slika 4.).

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*.



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

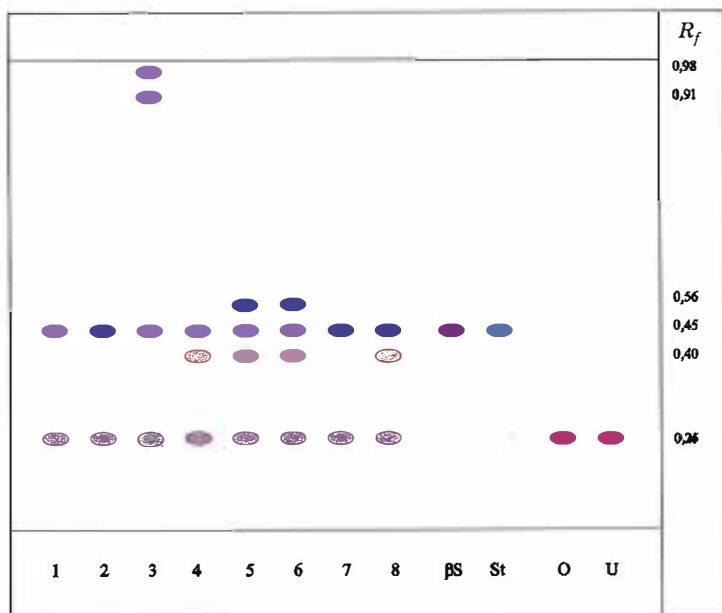
S – saponinski standard
 O – oleanolna kiselina
 U – ursolna kiselina

Slika 4. Kromatogram saponina i triterpena vrsta roda *Plantago* L.
 Razvijatelj: kloroform – metanol – voda (64:50:10, V/V/V);
 Detekcija: klorsulfonska kiselina, 105 °C.

Steroli i triterpenske kiseline

Metanolni ekstrakti listova podvrgnuti su kromatografskom odjeljivanju na tankom sloju, uz adsorbens Kieselgel 60 F₂₅₄ i razvijatelj benzen – aceton (9:1, V/V). Detekcija sterola i triterpenskih kiselina provedena je prskanjem kromatograma klorsulfonskom kiselinom i zagrijavanjem nekoliko minuta na 105 °C (slika 5.).

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 prisutni 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 triterpenske



- | | |
|--|---------------------------------|
| 1. <i>P. altissima</i> | β S – β -sitosterol |
| 2. <i>P. argentea</i> | St – stigmasterol |
| 3. <i>P. coronopus</i> | O – oleanolna kiselina |
| 4. <i>P. holosteum</i> subsp. <i>depauperata</i> | U – ursolna kiselina |
| 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 5. Kromatogram sterola i triterpenskih kiselina vrsta roda *Plantago* L.
Razvijatelj: benzen – aceton (9:1, V/V);
Detekcija: klorsulfonska kiselina, 105 °C.

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).

ZAKLJUČAK

U okviru fitokemijskih istraživanja roda *Plantago* L. provedena je kvalitativna analiza biološki aktivnih i pričuvnih tvari u nadzemnim dijelovima zapadnohrvatskih vrsta roda *Plantago* L.: *P. altissima* L., *P. argentea* Chaix, *P. coronopus* L., *P. holosteum* Scop. (subsp. *depauperata* Pilger, subsp. *holosteum* i subsp. *scopulorum* (Degen) Horvatić), *P. lagopus* L. i *P. maritima* L.). Rezultati

provedenih istraživanja pokazuju novo viđenje kakvoće i vrijednosti vrsta roda *Plantago* L. koje rastu u Hrvatskoj i pridonose kemotaksonomiji toga roda.

Histokemijskom analizom dokazane su trjeslovine, sluzi, glikozidi, alkaloidi i proteini. Primjenom taložnih reakcija i metode tankoslojne kromatografije utvrđena je prisutnost trjeslovina, iridoida, flavonoida, fenolnih kiselina, saponina, triterpenskih kiselina i sterola. Utvrđena je znatna varijabilnost u distribuciji analiziranih bioaktivnih tvari među istraživanim vrstama.

Rezultati provedenih fitokemijskih istraživanja vrsta roda *Plantago* L. iz zapadnog dijela Hrvatske s jedne strane pridonose rješavanju srodstvenih odnosa među vrstama i nižim svojstama toga roda, a s druge strane donose nova saznanja o njihovim djelatnim sastavnicama. Dobiveni rezultati ukazuju na potrebu daljnjih izučavanja dokazanih bioaktivnih sastavnica, kako bi se ispitala i utvrdile stvarne mogućnosti primjene analiziranih biljnih vrsta u suvremenoj fitoterapiji.

Literatura - References

1. M. Wichtl, N. G. Bisset (Ed.), *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*, Scientific Publishers, Stuttgart 1994, 378-380.
2. M. Marchesan, D. H. Paper, S. Hose, G. Franz, *Phytother. Res.* **12** (1998) S33-34.
3. T. Ringbom, L. Segura, Y. Norren, P. Perera, L. Bohlin, *J. Nat. Prod.* **61** (1998) 1212-1215.
4. A. U. H. Gilani, N. Aziz, M. A. Khan, S. Khan, V. Zaman, *Phytother. Res.* **12** (1998) 63-65.
5. J. G. Pastors, P. W. Blaisdell, T. K. Balm, C. M. Asplin, S. L. Pohl, *Am. J. Clin. Nutr.* **53** (1991) 1431-1435.
6. E. A. Trautwein, D. Rieckhoff, H. F. Erbersdobler, *Ernahrungs-Umschau.* **44** (1997) 214.
7. A. C. F. Munari, W. B. Pinto, C. R. A. Andraca, M. Casarrubias, *Arch. Med. Res.* **29** (1998) 137-141.
8. M. Moran-Rodriguez, F. Guerrero, G. Lazcano-Burciaga, *J. Diabetes. Complicat.* **12** (1998) 273-278.
9. A. B. Samuelsen, *J. Ethnopharmacol.* **71** (2000) 1-21.
10. Z. Ikawati, S. Wahyuono, K. Maeyama, *J. Ethnopharmacol.* **75** (2001) 249-256.
11. L.-C. Chiang, L. Teik Ng, W. Chiang, M.-Y. Chang, C.-C. Lin, *Planta Med.* **69** (2003) 600-604.
12. M. Gálvez, C. Martín-Cordero, M. López-Lázaro, F. Cortés, M. Jesús Ayuso, *J. Ethnopharmacol.* **88** (2003) 125-130.
13. G. Hegi, *Illustrierte Flora von Mittel-Europa*, Band VI/1, Carl Hanser Verlag, München 1954, 591-593.
14. R. Pülger, *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. C. R. Metcalfe, L. Chalk, *Anatomy of the Dicotyledons*, Vol. II, Clarendon Press, Oxford, 1972, 1053-1059.
17. B. Šrepel, *Vježbe iz Farmakognozije II (Mikroskopija droga)*, Zagreb 1999, 33-36.
18. V. Grdinić, R. Jurišić, I. Šugar, *Enciklopedijski englesko-hrvatski rječnik farmakopejskog nazivlja*, Hrvatski zavod za kontrolu lijekova, Zagreb 1999, 97-98.
19. Đ. Tarle, J. Petričić, M. Kupinić, *Farm. Glas.* **37** (1981) 351-354.
20. H. Wagner, S. Bladt, E. M. Zgainski, *Drogenanalyse*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg New York 1983, 136-137; 163-165; 226.
21. R. Jurišić, *Botanička i fitokemijska karakterizacija nekih vrsta roda Plantago L.*, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 2003, 43-44.
22. R. Jurišić, *Kemotaksonomska istraživanja vrsta roda Teucrium*, Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 1998, 43.

Primljeno 30.III.2004.

