

# 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:* **2024-07-28**



*Repository / Repozitorij:*

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



**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 Kalodere i  
doc. dr. sc. Sande Vladimir-Knežević.



*Prof. dr. sc. Zdenki Kaloderi 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. Vladimiru 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 Razvojnje 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 porediti 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.**

*Biblija (Izreke 13-18)*



# S A D R Ž A J

<b>UVOD</b> .....	1
<b>1. TEORIJSKI DIO</b>	
1.1. BOTANIČKI PODACI .....	3
1.1.1. Porodica <i>Plantaginaceae</i> (trpučovke) .....	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. (izbrazdani 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
<b>4. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>111</b>
<b>5. LITERATURA .....</b>	<b>117</b>
<b>6. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA</b>	
<b>7. ŽIVOTOPIS</b>	
<b>8. PRILOZI</b>	

## 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 unutarne 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. Unaprijeđena 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.

Provedena botanička i fitokemijska istraživanja navedenih biljnih taksona predstavljaju vrijedan doprinos rješavanju srodstvenih odnosa među vrstama i nižim svojstama 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* (trpućovke)

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

Trpućovke 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 nadržalom 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 cijeloga 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 pazušcima. 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 podrodova: *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 javljao 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 izrubljeni, 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 mladi, nose bjelkaste ili žućkaste, manje-više duge, priljubljene svilaste dlake koje kasnije potpuno izgube. Listovi su cjelovita ruba i imaju 3-5 odozdo jako ispupčenih 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 mladih 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 režnjevito, 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 tropregradni tobolac koji sadrži tri do šest eliptičnih smeđih 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. Koriijen 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 laticе, 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 ljuskastim 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. Cvatovi 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).

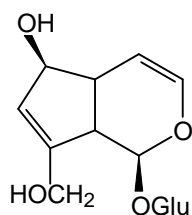
## 1.2. BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI VRSTA RODA *PLANTAGO* L.

### 1.2.1. Iridoidi

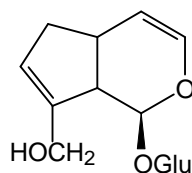
Iridoidi su prirodne monoterpenске biljne tvari koje se mogu podijeliti u četiri osnovne skupine: iridoidni glikozidi, aglikoni ili neglikozidni iridoidi, sekoiridoidi i bisiridoidi. Sintetiziraju se putem mevalonske kiseline i predstavljaju ciklopentanske derivate monoterpena. Aglikoni iridoidnih glikozida 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 njezina 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).

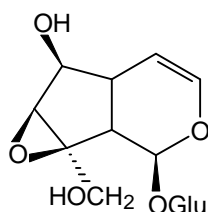
Osim kao bioaktivne tvari, iridoidne supstancije imaju važnu ulogu kemotaksonomskih markera, te tako pridonose rješavanju srodstvenih odnosa među nižim svojstama unutar biljnih rodova (20-30).



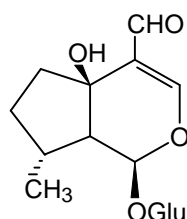
aukubin



bartsiozid



katalpol



plantarenalozid

### 1.2.1.1. Kvalitativna analiza iridoida

Odjeljivanje i detekciju iridoidnih supstancija moguće je provesti na tankom sloju adsorbensa Kieselgela 60 F<sub>254</sub>, s razvijanjem etilacetat-etilmetilketon-mravlja kiselina-voda (5:3:1:1, V/V). Kromatogram se promatra pod UV svjetlom (365 nm), pri čemu iridoidne supstancije modro fluoresciraju (31). Iridoidi se također mogu uspješno odijeliti pomoću razvijaa: 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 biljnom 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 svjetlom crvena.

Aukubin je također moguće detektirati u biljnoj iscrpini, nakon uklanjanja pigmenata na stupcu aluminij-oksida. Profiltriranom vodenom ekstraktu doda se isti volumen otopine reagensa: ledena octena kiselina-koncentrirana kloridna kiselina-0,2%-tna 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 Mikkers (38), a Jorgenson i Lukacs su usavršili tehniku s kapilarama unutarnjeg promjera manjeg od 100  $\mu\text{m}$  (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 micide kada se postigne kritična micelarna koncentracija u puferu. Micide u elektroforetskom sustavu putuju različitom brzinom od molekula vode. Brzina putovanja analita ovisi o njegovoj hidrofobnosti u prisutnosti micela, 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 micela, te o gibljivosti vode (EOF) i micela. Ta je tehnika pogodna za razdvajanje neutralnih i nepolarnih supstancija, primjerice iridoida (19, 42, 43).

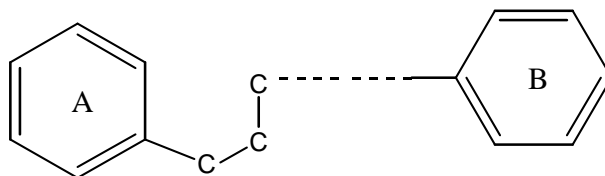
Osim kapilarnom elektroforezom, iridoidne supstancije moguće je identificirati, odijeliti i odrediti metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (*high performance liquid chromatography*, HPLC) (44), koja je još uvijek superiorna u odnosu na CE s obzirom na osjetljivost, selektivnost, reproducibilnost, 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 strukturna 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  $\beta$ -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 mokraćne kiseline (58). Laksativno djelovanje uočeno je u nekih iridoidnih glikozida, 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 nazofarinksa (62).

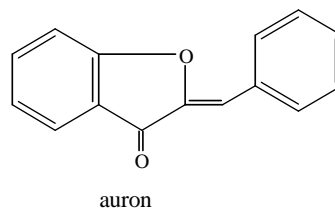
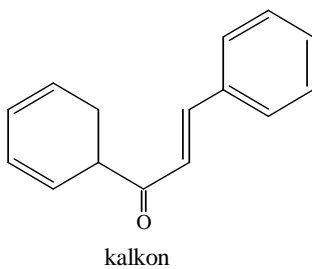
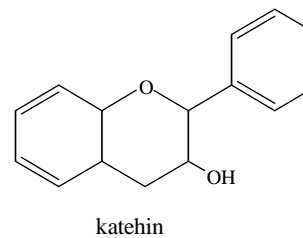
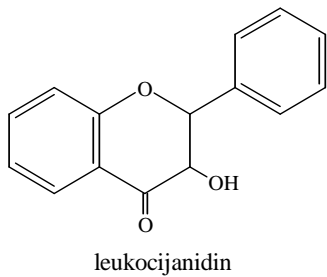
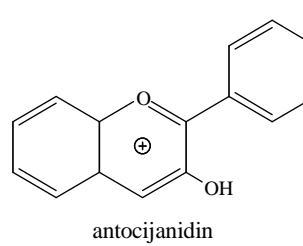
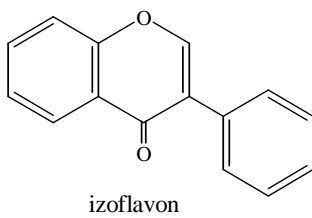
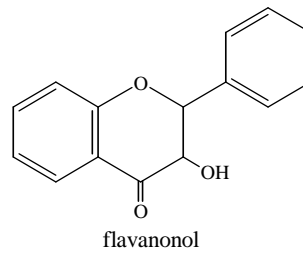
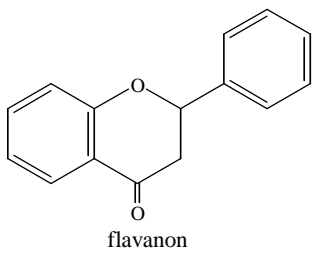
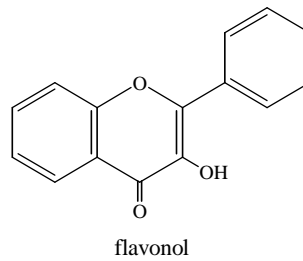
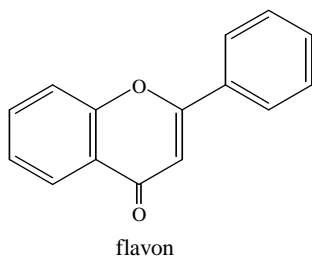
## 1.2.2. Flavonoidi

Flavonoidi pripadaju velikoj skupini prirodnih polifenolnih spojeva koji imaju strukturu tipa C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem). U većine flavonoida središnji fragment, C<sub>3</sub>, 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.



C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 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- $\gamma$ -pironi), antocijanidini (derivati 2-fenil-3,5,7-trihidrobenzopirilijeva hidroksida), leukoantocijanidini (flavan-3,4-dioli), katehini (flavan-3-oli), kalkoni (derivati benzalacetofenona) i auronii (derivati benzalkularan-3-ona) (63a, 64a, 65).



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 biljnom svijetu, od alga do kritosjemenjača. Nalaze se gotovo u svim dijelovima viših biljaka. Najviše ih ima u mladim listovima, cvjetnim popljcima 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).

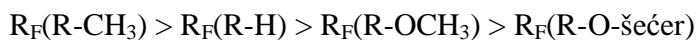
Flavonoidi stvaraju taloge s reagensima poput olovnog i kalijskog acetata, pikrinske kiseline, barij-hidroksida, piridina i dr. Osobito je pogodan neutralni ili bazični olovo-acetat. Flavonoidi se iz olovnog taloga mogu osloboditi dodatkom razrijeđene sulfatne kiseline ili hidrogen-sulfida, pri čemu olovo 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 auronni 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.

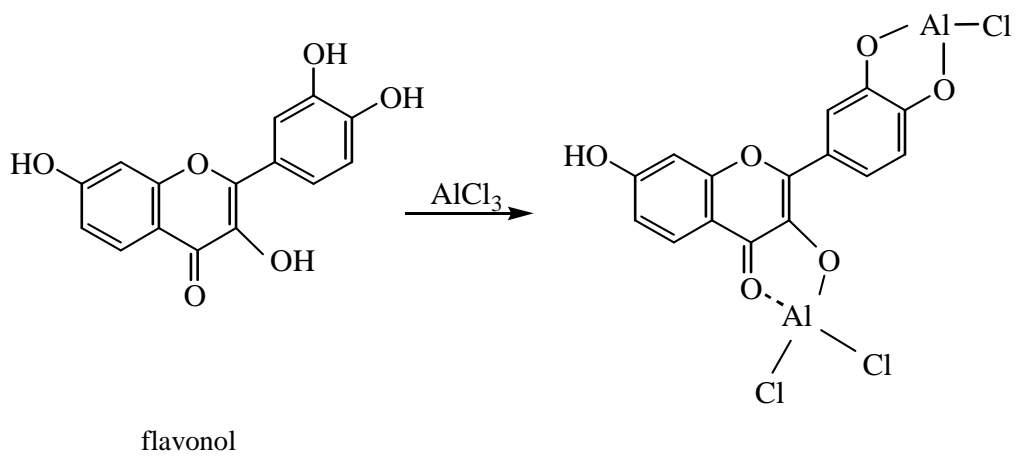
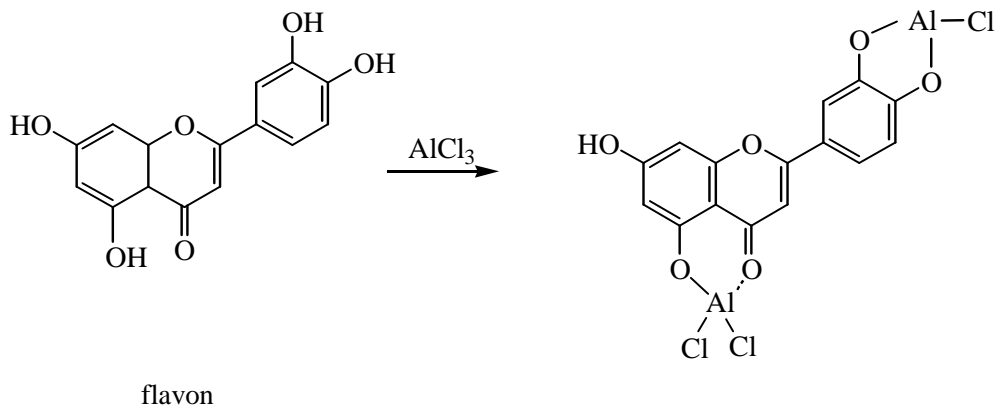
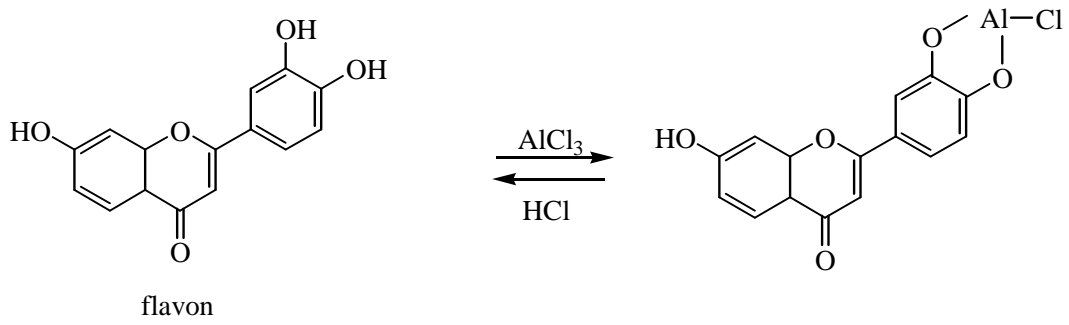
Detekcija flavonoida može se provesti primjenom različitih reagensa: aluminij-klorida, cirkonij-oksitetraklorida, bazičnog olovo-acetata, željezo(III)-klorida, difenilboril-oksietilamina, smjese boratne i oksalatne kiseline 3:1 (V/V), te Naturstoff reagensa (67).

#### **1.2.2.2. Kvantitativna analiza flavonoida**

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

Metodom prema Römischu 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) oficijalna 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  $\text{AlCl}_3$

Osim spektrodensitometrijskog 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.

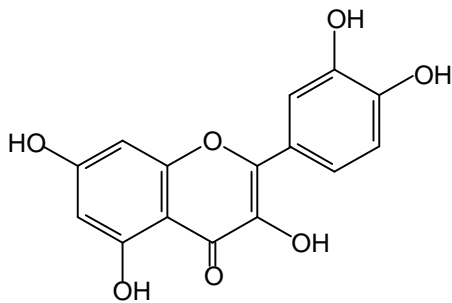
HPLC također dobiva sve veći značaj u analizi biljnih ekstrakata. Kvalitativna analiza koja rezultira "fingerprint" kromatogramom može biti vrlo korisna u fitokemijskoj kontroli kakvoće (73). HPLC se također može primijeniti u biljnoj kemotaxonomiji, karakterizacijom vrsta na osnovi sadržaja njihovih 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 uklanjaju štetni fenoli. Neki ih smatraju zaštitom od ultraljubičastog zračenja. Mnogi autori ipak prihvaćaju hipotezu o ulozi flavonoida u metaboličkim redoks-procesima (67).

Dokazana su različita biološka djelovanja flavonoida: antiinflamatorno, antimikrobno, antiviralno, antifungalno, diuretičko, dijaforetičko, antihepatotoksično, antihipertenzivno, antiaritmično, antikoagulirajuće, spazmolitičko, kardi toničko, antialergično, antiulkusno, analgetično, antimalarično, hipoglikemično i antioksidativno. Poznato je da flavonoidi mogu inhibirati neke enzime, primjerice hijaluronidazu, aldoza-reduktazu, 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 kvercetinске 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-oksidadazu te inhibira lipidnu peroksidaciju *in vitro* (84-87). Daljnji pokazatelji kvercetinске 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 glutaciona (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 oslobađanja 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 humanoј 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 makrocelularni karcinom pluća (102) i leukemiju (103, 104).

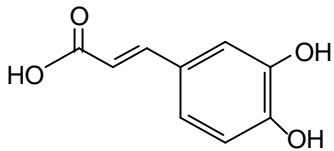
Klinička indikacija kvercetina su i alergije jer sprečava oslobađanje histamina iz mastocita. Također je dokazano znatno smanjivanje rizika smrtnosti od bolesti srca s povećanjem unosa flavonoida (105). Kvercetin je indiciran u svim upalnim stanjima, budući da inhibira nastanak medijatora upale prostaglandina i leukotriena, kao i oslobađanje histamina. To posebice može biti značajna pomoć astmatičarima jer je leukotrien B<sub>4</sub> snažan bronhokonstriktor. Kvercetinska inhibicija ksantin-oksidade 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 gastičkih 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).

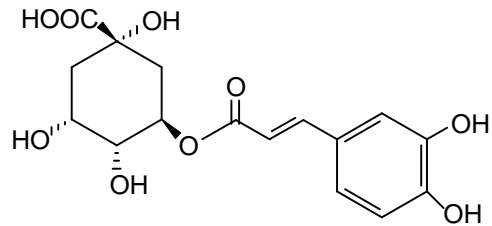
### *Fenolne kiseline*

Fenolne kiseline su široko rasprostranjene u biljnom 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 (protuupalni, 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

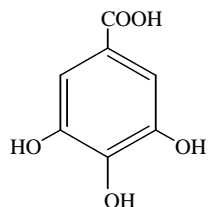
### 1.2.3. Trjeslovine

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

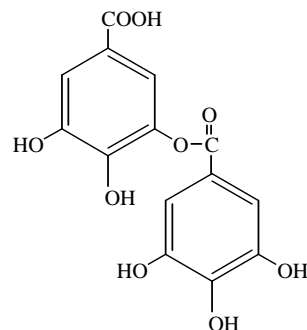
- 1) trjeslovine koje hidroliziraju (galotanini, elagnatanini);
- 2) kondezirane trjeslovine (katehinske trjeslovine).

#### Trjeslovine koje hidroliziraju

Ta skupina trjeslovina obuhvaća dvije 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.



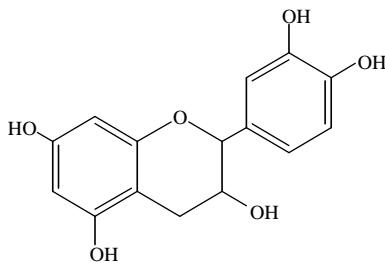
galna kiselina



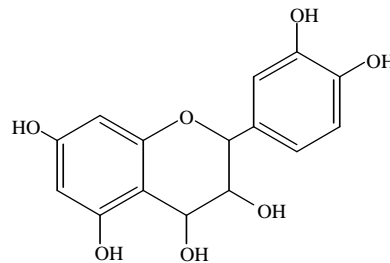
m-digalna kiselina

### 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 (katehinske 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 biljnom 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 talože 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). Pufferirana 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**

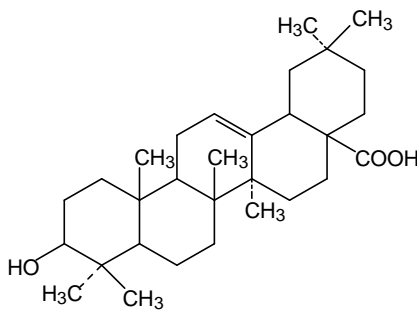
Fiziološko značenje trjeslovina prilično je nejasno. Smatralo se da njihov gorki i trpki okus štiti biljku od štetočina, što se kasnije pokazalo netočnim. Niti pretpostavka da su trjeslovine pričuvne tvari nije se pokazala ispravnom, jer se rijetko nalaze u biljnim dijelovima koji služe kao spremnici pričuvnih tvari. No, sa sigurnošću se može ustvrditi da u nekih biljaka trjeslovine sudjeluju u stvarnoj izmjeni stvaranjem redoks-sustava. Također je dokazano da te tvari mogu djelovati na neke heterozide kao konzervansi (npr. na arbutin), jer inhibiraju  $\beta$ -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 opekлина i ozeblina, crijevnog i želučanog katara te kao antidijaroići. Budući da s alkaloidima i solima teških metala stvaraju taloge, primjenjuju se i kao antidoti (113).

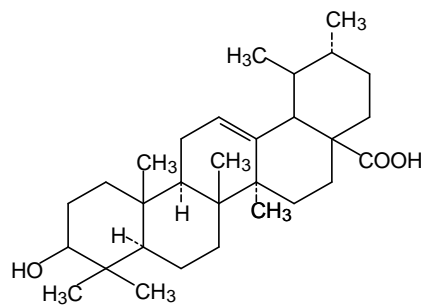
### 1.2.4. Triterpeni

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).



oleanolna kiselina



ursolna kiselina

#### **1.2.4.1. Kvalitativna analiza triterpena**

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

Primjenom razvijaača 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 antiviralnim 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), hepatoprotektivna, 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).

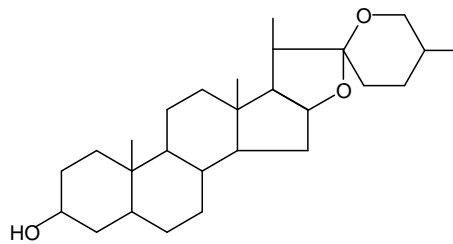
#### **1.2.5. Saponini**

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.

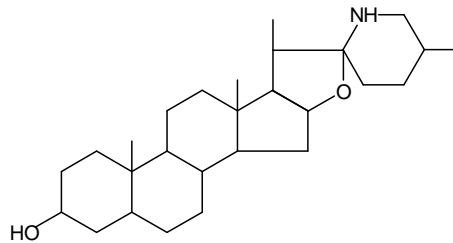
Saponini su građeni od aglikonskog dijela (sapogenina) i šećerne komponente. Aglikoni se mogu podijeliti u 3 skupine:

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

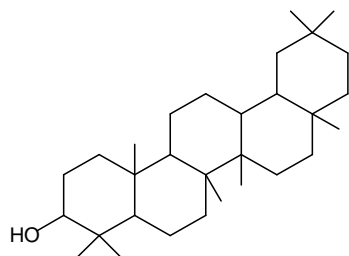
Svi tipovi aglikona u položaju C-3 imaju hidroksilnu skupinu na koju se veže šećerna komponenta. Ona može biti u obliku jednog šećernog lanca (monodezmozidi) ili dva lanca (bisdezmozidi; desmos<sub>grč.</sub>=lanac), koji mogu biti manje ili više razgranjeni. Kao šećerne komponente, na aglikon se mogu 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

Prašasta droga (oko 0,5 g) prelije 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 (pH = 7,4). Nakon hlađenja, iscrpina droge pomiješa se sa svježom, citriranom goveđom 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 razvijачa 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 anisaldehyd-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 očvrstne 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

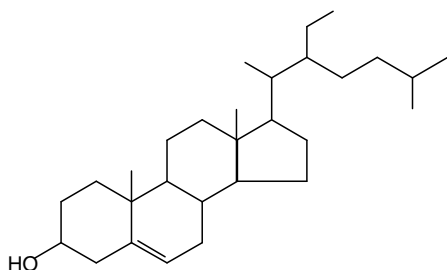
Saponini djeluju ekspektorirajuće. Pomažu izbacivanju sluzi iz bronhijalnog sustava, povećanjem površinske aktivnosti i istjecanjem žilave sluzi, te lokalnim podraživanjem sluznica, što refleksno dovodi do pojačanog lučenja žlijezda. Djelovanje saponina često je praćeno i osjećajem mučnine pa mogu izazvati 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

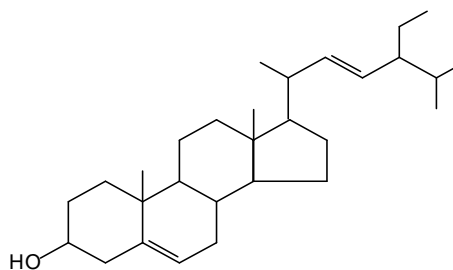
Steroli su organski spojevi koji obično prate masti ili su sastavni dio molekule voskova. Kao i druge steroidne tvari, odvođe se od ugljikovodika sterana (ciklopentanoperhidrofenantrena,  $C_{17}H_{22}$ ). Steroli mogu biti animalnog podrijetla (zoosteroli) ili biljni (fitosteroli).

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





$\beta$ -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 CH<sub>3</sub>-radikala u položaju 10 sterolne jezgre.

Prisutnost sterola u pojedinim biljnim dijelovima može se utvrditi primjenom tankoslojne kromatografije. Ekstrakt droge (petroleterški 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  $\beta$ -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-acetilgenipozidna kiselina i alpinozid (*P. alpina*), te deacethylhokeriozid (*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, triclin, 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).

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

U nekih je vrsta roda *Plantago* dokazana prisutnost polifenola (*P. lanceolata*, *P. hookeriana*, *P. myosuroides*), 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, antimikrobno 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);
- <sup>3D</sup>CE sustav za kapilarnu elektroforezu, opremljen UV/VIS DA-detektorom (*diode array detector*) (Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA);
- kvarcne kapilare (*fused silica capillary*) za kapilarnu 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-C<sub>18</sub> (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);
- aluminiij-klorid heksahidrat (Kemika);
- benzidin (Merck);
- dietil-eter (Kemika);
- etanol (Kemika);
- etilacetat (Kemika);
- etilmetilketon (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);.
- trifluorocena kiselina (Merck);.
- triklorocena 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 objektom staklu, zaštićeni pokrovnim stakalcem, te kratko zagrijani na plamenu. Anatomske elemente 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 objektom staklu ili je reagens dodavan drogi. Preparat je zaštićen pokrovnim stakalcem i reakcija 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 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  $\alpha$ -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).

### **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  $\mu$ L metanolne otopine naneseo je kapilarom na staklenu ploču s adsorbensom Kieselgel 60 F<sub>254</sub>. Odjeljivanje supstancija postignuto je razvijačem etilacetat-etilmetilketon-mravlja kiselina-voda 5:3:1:1, V/V. Dobiveni kromatogram promatran je pod UV svjetlom, 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 F<sub>254</sub>, uz razvijače etilacetat-etilmetilketon-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, vodeni je ekstrakt uparen do suha, a suhi ostatak otopljen u 3 mL vode. Otopina je prenesena u mali lijevak za odjeljivanje te izmučkana tri puta s po 3 mL dietil-etera. Vodeni sloj nadopunjen je vodom do 4 mL (19).

#### *MEKC analiza*

Kvantitativna analiza vodenih ekstrakata provedena je primjenom <sup>3D</sup>CE Hewlett-Packard kapilarnog elektroforetičkog sustava, opremljenog UV/VIS DA-detektorom. Uvjeti rada: U analizi su korištene kvarcne 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 F<sub>254</sub>, uz razvijaače 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 svjetlom 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 aluminijskim kloridom, u sloju debljine 1 cm, na 425 nm. Slijepi pokus bila je prethodno pripremljena otopina bez aluminijskog 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 kavenska kiselina) otopljene 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-detektorom, Reverzno-fazna separacija provedena je pri temperaturi od 30 °C, na koloni Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub>, 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  $365 \pm 8$  nm, a iridoidni glikozid aukubin na  $204 \pm 4$  nm. Referentna valna duljina iznosila je  $550 \pm 80$  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 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 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, iscrpina je profiltrirana u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopunjena do oznake 30%-tnim metanolom. 2 mL filtrata pomiješano je s 8 mL destilirane vode i 10 mL otopine natrij-acetata (1,92 g natrij-acetata trihidrata i 0,34 mL octene kiseline pomiješano je i nadopunjeno destiliranom vodom do 100 mL). Puffer-otopina održava stalnu pH-vrijednost medija (pH=5), koja je optimalna za taloženje trjeslovina. Otopina dobivena na opisani način označena je kao *otopina 1*. 10 mL *otopine 1* mućkano je s 50 mg kazeina na mućkalici 45 minuta. Potom je otopina profiltrirana, a dobiveni je filtrat predstavljao *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-volfamat, 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  $\mu$ L metanolne otopine nanoseno je na tanki sloj adsorbensa Kieselgela 60 F<sub>254</sub>. Odjeljivanje supstancija postignuto je pomoću razvijaa 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 F<sub>254</sub> i razvijaač 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 mjerenja. 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 slijepe prosudbe. Korigirana vrijednost apsorbancije analita dobije se iz razlike izmjerene apsorbancije analita i pripadajuće vrijednosti apsorbancije koja potječe od slijepog pokusa.

Tablica 2. Priprema uzoraka za mjerenje

<i>Postupak pripreme uzoraka</i>	
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 <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
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 mjerenja
kivete (d = 1 cm)	kvarcne
radna temperatura (°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 ( $\mu\text{g}$ )	$1,0 \cdot 50 = 50$ , 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 multivarijatne statistike

Eksperimentalno dobiveni rezultati kvantitativne karakterizacije iridoida, flavonoida i fenolnih kiselina vrsta roda *Plantago* L. obrađeni su metodom multivarijatne 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 hierarchic 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 daljnjih članova u već postojeću skupinu (146).

Primjenom UPGMA metode (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*), koja se najčešće koristi u hijerarhijskoj "cluster" analizi, obrađeni 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 literaturnim 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 ljuskastim 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 pratilice 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 protežu se slojevi mehaničkog staničja (slika 7).



Slika 4. Poprečni prerez lista



Slika 5. Dorziventralni list



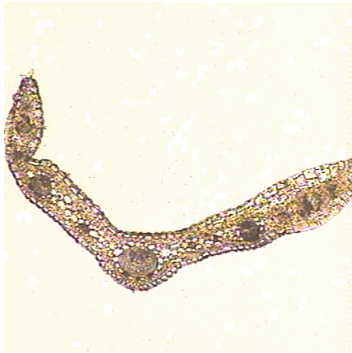
Slika 6. Puči



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. Trihomi nisu uočeni. Mezofil lista čine palisadni i spužvasti parenhim. Palisadni parenhim građen je od jednog sloja kratkih stanica. Ističe se jedna glavna i više manjih postranih kolateralnih žila, okruženih prstenom parenhimskih stanica. Ksilem i floem središnje žile okružuju mehanički elementi (slika 11).



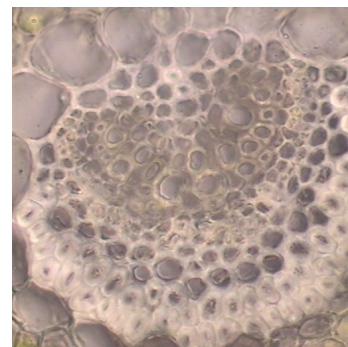
Slika 8. Poprečni prerez lista



Slika 9. Dorziventralni list



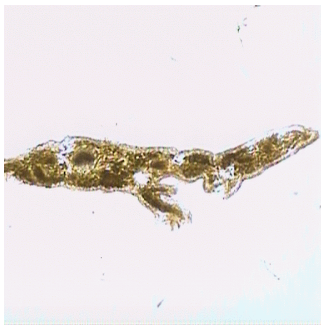
Slika 10. Mezofil lista



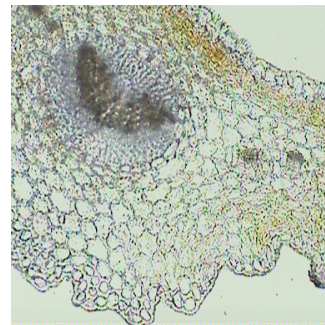
Slika 11. Glavna žila

### ***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

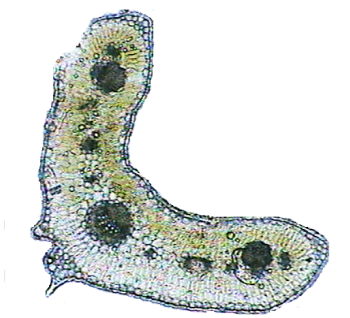


Slika 15. Trostanični trihom

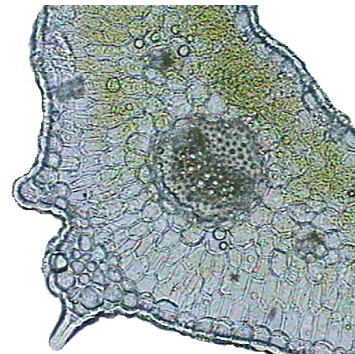


***Plantago holosteum* Scop. subsp. *depauperata***

Na slikama 16 i 17 prikazani su poprečni prerezi lista izolateralne građe. Izdužene epidermske stanice lica i naličja lista prekrivene su jakim 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).



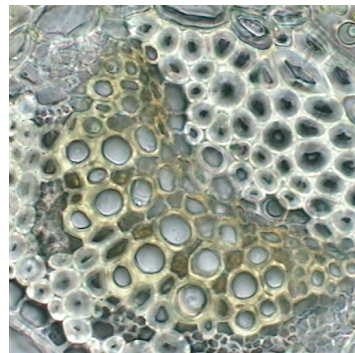
Slika 16. Poprečni prevez lista



Slika 17. Izolateralni list



Slika 18. Jednostanični trihom



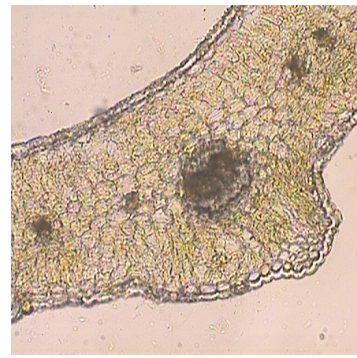
Slika 19. Središnja žila

***Plantago holosteum* Scop. subsp. *holosteum***

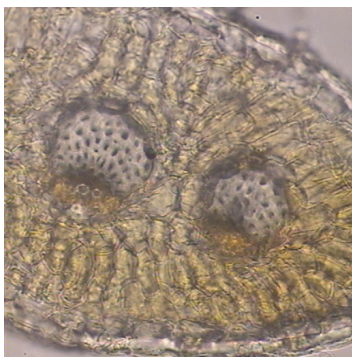
List je izolateralne građe (slike 20 i 21). Epiderma lica i naličja lista prekrivena je debelom i blago bradavičastom kutikulom. Dijacitične puči prisutne su na obje epiderme. Kolenhim u manjim nakupinama uočen je na rubovima lista ispod epiderme, kao i na naličju prema glavnoj žili. Nije zabilježena prisutnost trihoma. U mezofilu lista uočavaju se odijeljena područja palisadnog i spužvastog parenhima (slika 22). Kratke palisade smještene su u dva sloja. Mjestimice se teško razlikuju od stanica gustog spužvastog 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).



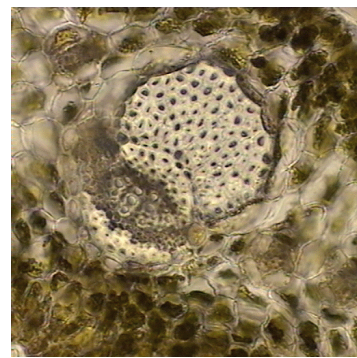
Slika 20. Poprečni prerez lista



Slika 21. Izolateralni list



Slika 22. Mezofil lista



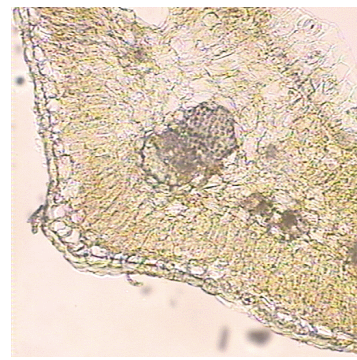
Slika 23. Žila

***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).



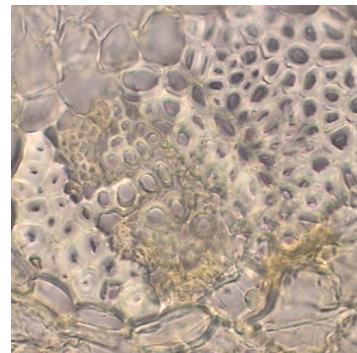
Slika 24. Poprečni prevez lista



Slika 25. Izolateralni list



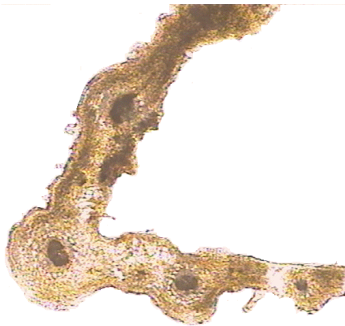
Slika 26. Dijacitične puči



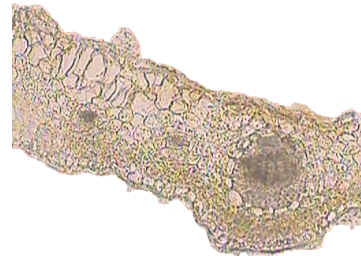
Slika 27. Središnja žila

***Plantago lagopus* L.**

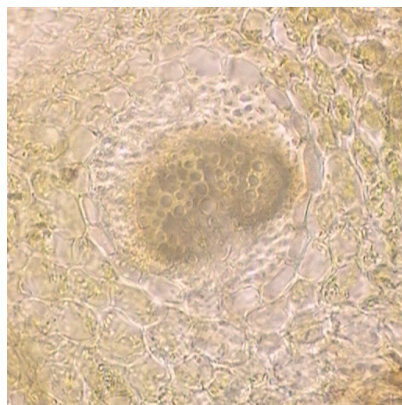
List izbrazdanog trpuca je dorziventralne građe (slike 28 i 29). Epiderme lica i naličja lista prekrivene su jakom, ispruganom kutikulom. Uočeni su ostaci višestaničnih trihoma. U mezofilu lista razlikuju se palisadni i spužvasti parenhim. Stanice jednoslojnog do dvoslojnog palisadnog parenhima nisu 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.**

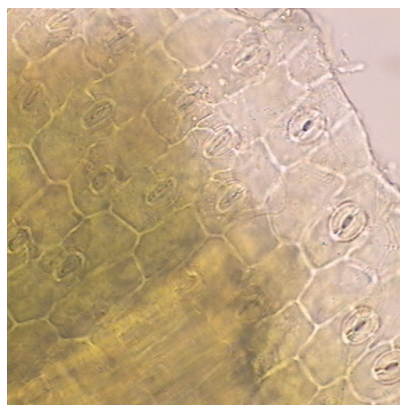
Slike 31 i 32 prikazuju poprečne prereze izolateralnog lista. Lice i naličje lista prekriveni su izrazito debelom i blago bradavičastom kutikulom. Dijacitične puči prisutne su na gornjoj i donjoj epidermi (slika 33). Nakupina mehaničkog staničja uočena je ispod epiderme naličja prema glavnoj žili. Nije zabilježena prisutnost trihoma. Mezofil je diferenciran na palisadni i spužvasti parenhim. Kratke palisade smještene su u dva sloja. Ponekad se teško razlikuju od stanica gustog spužvastog 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 prevez lista



Slika 32. Izolateralni list

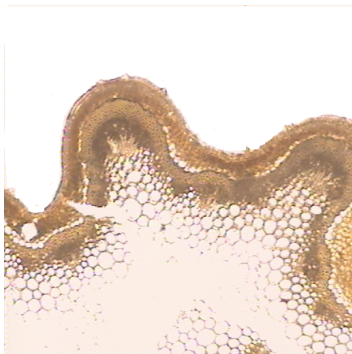


Slika 33. Puči

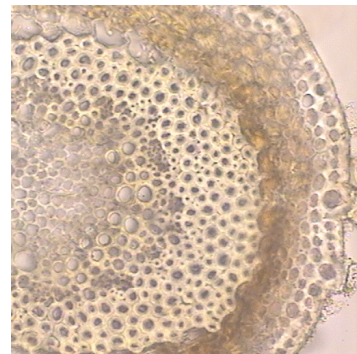
### 3.2.2. Anatomija stabljika

#### *Plantago altissima* L.

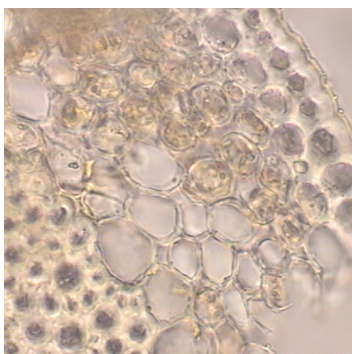
Poprečni presjeci stabljike prikazani su na slikama 34 i 35. Stabljiku s istaknutim rebrima oblažu sitne, zaobljene epidermske stanice odebljelih membrana i debele bradavičaste kutikule. Na epidermi se mogu uočiti papile i ostaci višestaničnih pokrovnih šiljastih dlaka s bradavičastom kutikulom. Njihova 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).



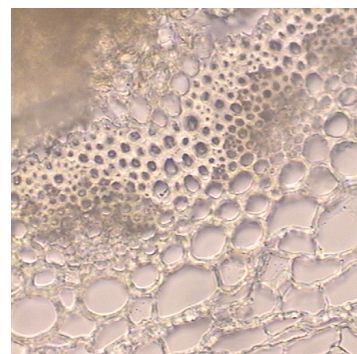
Slika 34. Poprečni presjek stabljike



Slika 35. Presjek rebra stabljike



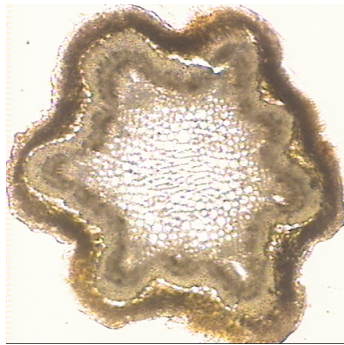
Slika 36. Primarna kora



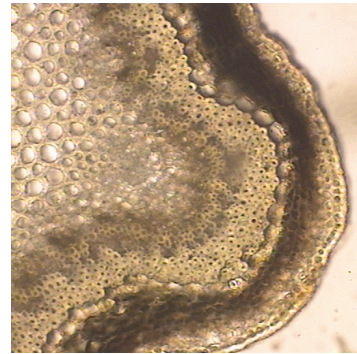
Slika 37. Pericikl

### ***Plantago argentea* Chaix**

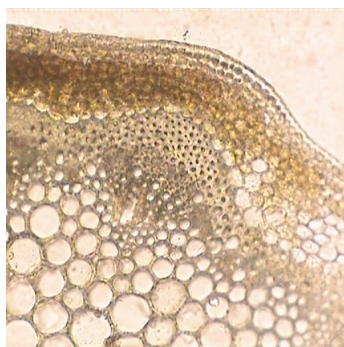
Na slikama 38-41 prikazani su poprečni prerezi stabljike srebrnolisnog trpuca. Istaknuta rebra obložena su sitnim, okruglastim epidermskim stanicama, odebljelih membrana i debele bradavičaste kutikule. Na epidermu se nastavlja sloj kolenhimske hipoderme i višeslojni parenhim primarne kore koji završava 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.



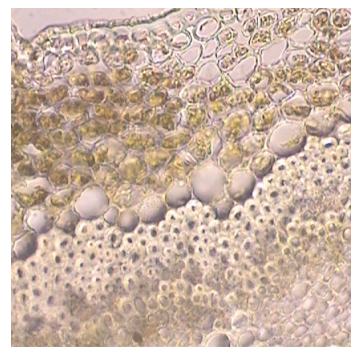
Slika 38. Poprečni prevez stabljike



Slika 39. Presjek rebra stabljike



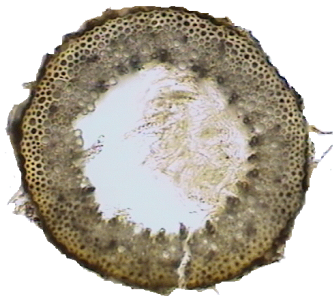
Slika 40. Primarna kora i pericikl



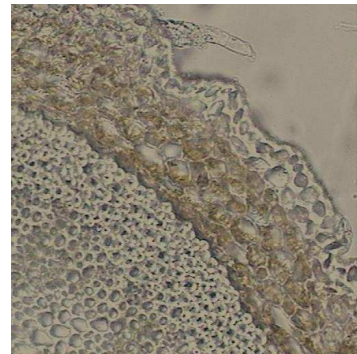
Slika 41. Endoderma

***Plantago coronopus* L.**

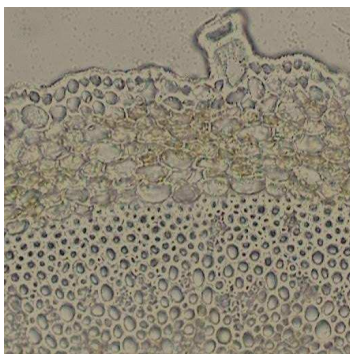
Poprečni prerez stabljike prikazan je na slikama 42, 43 i 44. Okruglastu stabljiku oblažu sitne, zaobljene epidermske stanice, s odebljalim membranama i snažno razvijenom bradavičastom kutikulom. Ponegdje se mogu uočiti papile i ostaci višestaničnih šiljastih dlaka (slika 45). Na epidermu se nastavlja 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

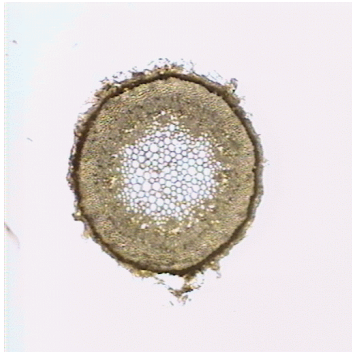


Slika 45. Ostaci trihoma

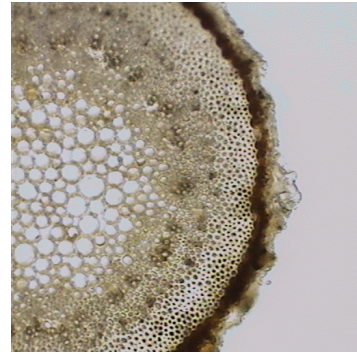
***Plantago holosteum* Scop. subsp. *depauperata***



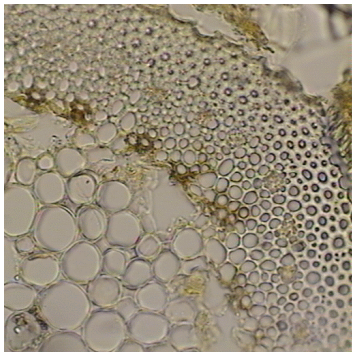
Poprečni prerezi stabljike navedenog biljnog taksona prikazani su na slikama 46-48. Okruglu stabljiku oblažu sitne, zaobljene epidermske stanice, odebljelih stijenki i jake kutikule. Zabilježena je prisutnost višestaničnih šiljastih trihoma (slika 49). Ispod epiderme proteže se višeslojni parenhim primarne 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.



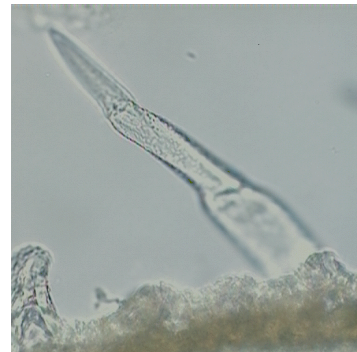
Slika 46. Okrugla stabljika



Slika 47. Poprečni prerez stabljike



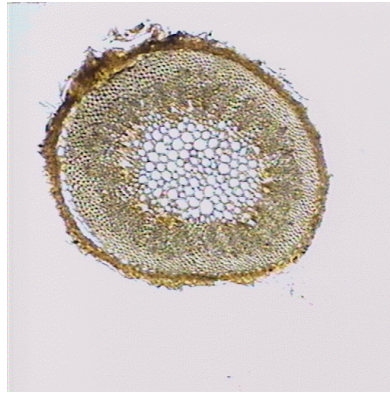
Slika 48. Primarna kora i pericikl



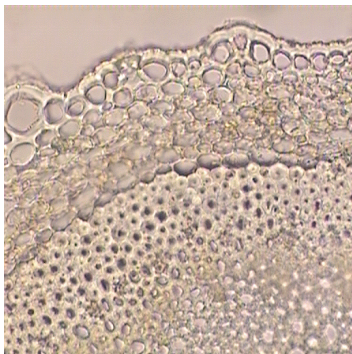
Slika 49. Višestanični šiljasti trihom

***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, odebljelih 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 prevez stabljike



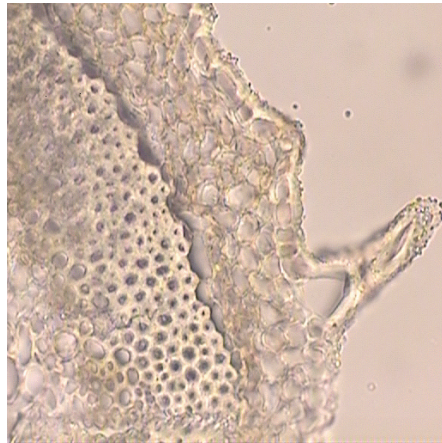
Slika 52. Ostaci pokrovnih trihoma

***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, odeblijalih 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.



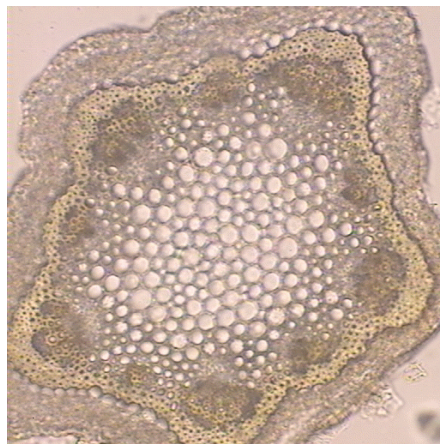
Slika 53. Okrugla stabljika



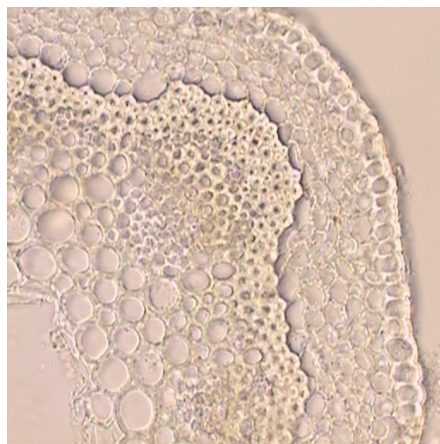
Slika 54. Poprečni prerez stabljike

***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, odebljelih 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 prerez stabljike

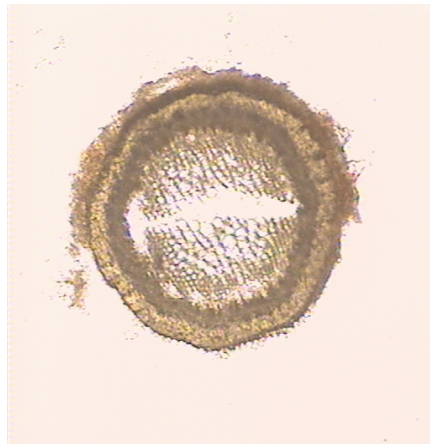


Slika 56. Presjek kroz rebro stabljike

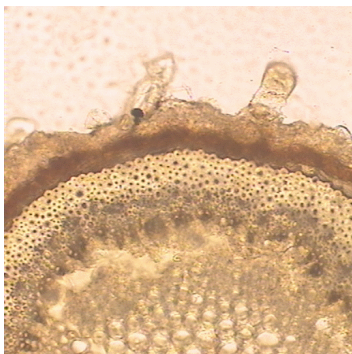
***Plantago maritima* L.**



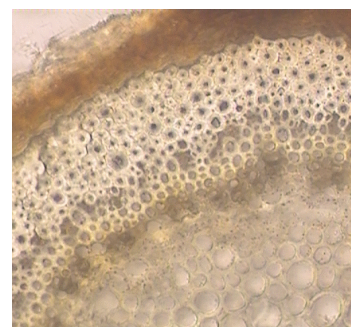
Okruglastu stabljiku primorskog trpuca (slika 57) oblažu male epidermske stanice s debelom bradavičastom kutikulom. Uočena je prisutnost papila i ostataka višestaničnih pokrovnih šiljastih dlaka s bradavičastom kutikulom (slika 58). Njihova je osnovica puno veća od ostalih epidermskih stanica u okruženju. 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	- <sup>1</sup>
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) - <sup>2</sup> b) - <sup>2</sup>
Škrob	jod	plavoljubičasta boja	- <sup>3</sup>
Inulin	a) $\alpha$ -naftol + konc. sulfatna kiselina b) apsolutni etanol	a) ljubičasta boja b) sferokristali	a) - <sup>4</sup> b) - <sup>4</sup>
Proteini	konc. nitratna kiselina	žuta boja	+
Masti	sudan III	narančastocrveno obojene kapljice masti	-

<sup>1</sup> osim vrsta *P. lagopus* i *P. maritima*;

<sup>2</sup> osim vrsta *P. coronopus*, *P. lagopus* i *P. maritima*;

<sup>3</sup> osim vrste *P. coronopus*;

<sup>4</sup> 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 F<sub>254</sub>, primjenom razvijaača etilacetat-etilmetilketon-mravljja kiselina-voda 5:3:1:1 (V/V). Razvijeni kromatogram promatran je pod UV svjetlom na 365 nm. Uočene su zone svijetloplave fluorescencije: *P. altissima* (R<sub>F</sub>-vrijednosti 0,55 i 0,69), *P. argentea* (R<sub>F</sub>-vrijednosti: 0,19; 0,30; 0,37; 0,53; 0,60; 0,69 i 0,76), *P. coronopus* (R<sub>F</sub>-vrijednosti 0,46 i 0,74), *P. holosteum* subsp. *depauperata* (R<sub>F</sub>-vrijednosti: 0,62; 0,69 i 0,86), *P. holosteum* subsp. *holosteum* (R<sub>F</sub>-vrijednosti: 0,60; 0,69 i 0,83), *P. holosteum* subsp. *scopulorum* (R<sub>F</sub>-vrijednosti: 0,61; 0,69 i 0,85), *P. lagopus* (R<sub>F</sub>-vrijednosti: 0,54; 0,69 i 0,92) i *P. maritima* (R<sub>F</sub>-vrijednosti 0,69 i 0,85). Usporedbom s literaturnim podacima (31), može se pretpostaviti da zona R<sub>F</sub>-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 F<sub>254</sub>, uz razvijaače (1) etilacetat-etilmetilketon-mravljja kiselina-voda (5:3:1:1, V/V), (2) etilacetat-mravljja kiselina-ledena octena kiselina-voda (100:11:11:27, V/V) te (3) etilacetat-mravljja 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<sub>F</sub>-vrijednosti (0,03 i 0,05) vjerojatno predstavljaju šećerne komponente. Iridoidne supstancije su narančastosmeđe boje (R<sub>F</sub>-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 F<sub>254</sub> 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*.

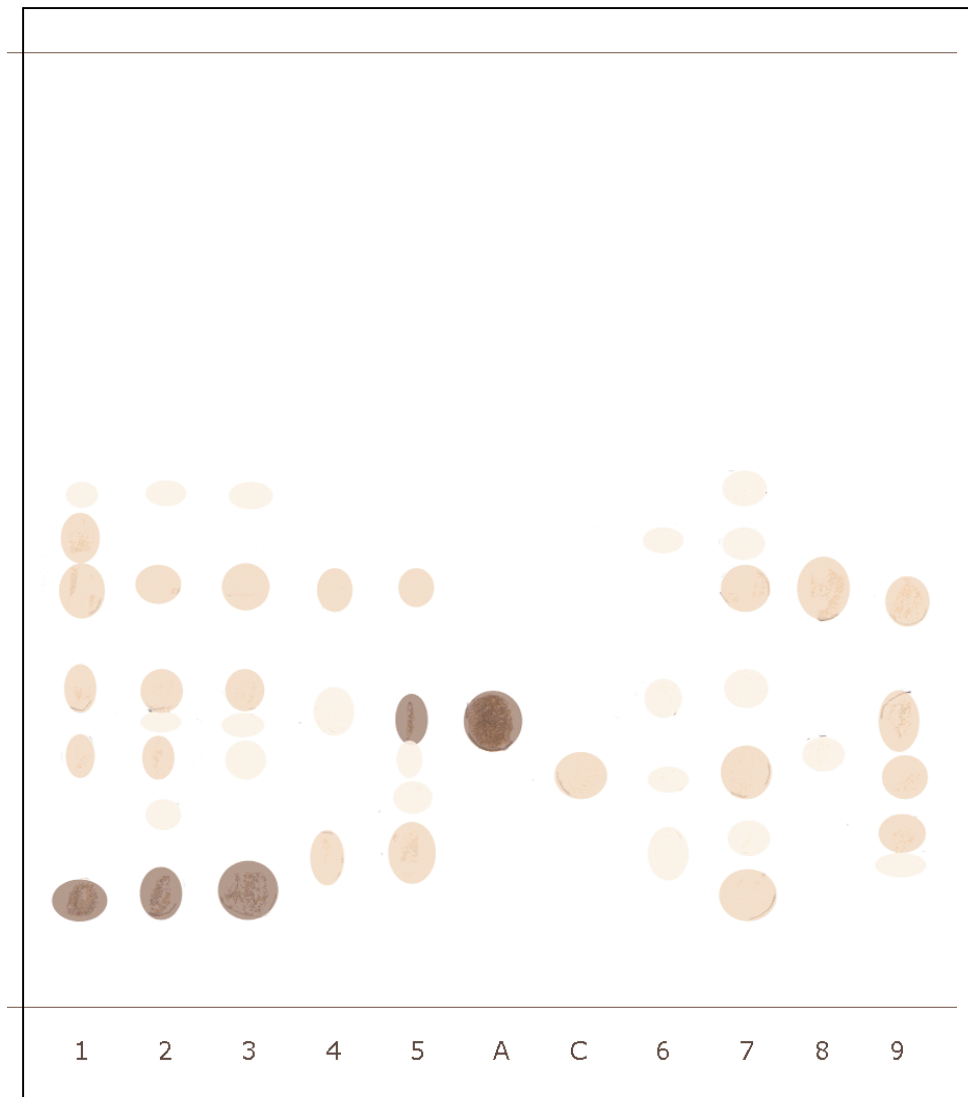
Kvalitativna analiza iridoida listova istraživanih vrsta roda *Plantago* L. metodom tankoslojne kromatografije uspješno je provedena primjenom razvijача koji je sadržavao

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.

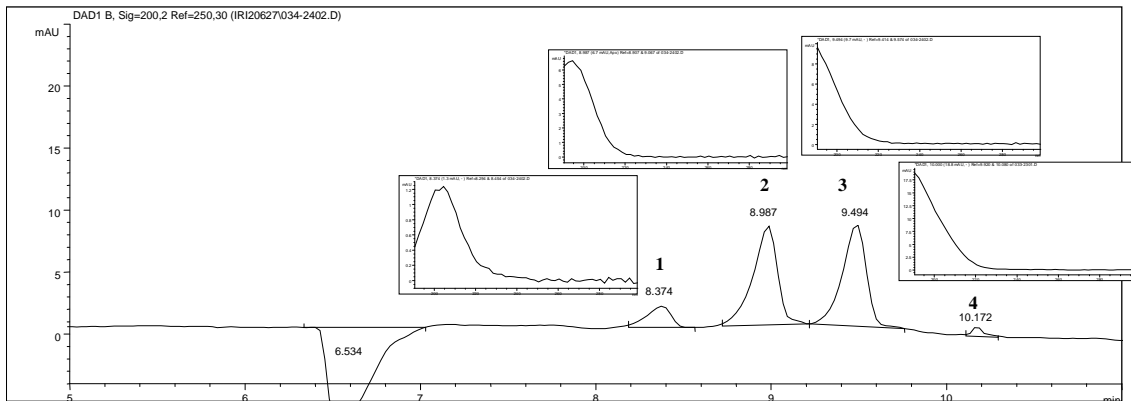
### 3.3.2.2. MEKC analiza iridoida

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  $\mu$ A. Injekcijski volumen (50 mbar  $\times$  5 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).

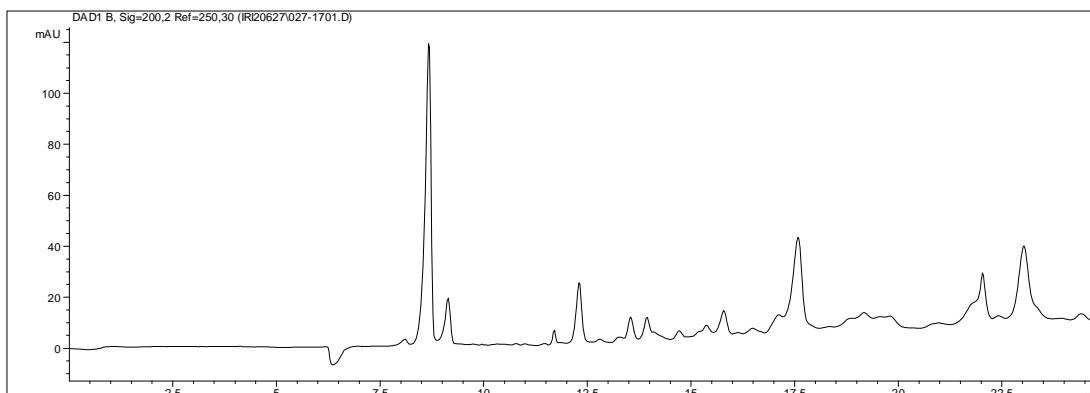


Slika 61. Elektroferogram iridoidnih supstancija **1-4** vrste *Plantago lanceolata* L. s pripadajućim UV spektrima. **1** – iridoidna supstancija **A**; **2** – katalpol; **3** – aukubin; **4** – iridoidna supstancija **B**. Uvjeti MEKC analize: kvarcna kapilara, 50  $\mu\text{m}$  i.d.  $\times$  35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

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 znatne 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. holosteam* subsp. *holosteam* 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. holosteam* 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 <sup>a</sup> (0,05%)	UCL <sup>b</sup> (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 <sup>c</sup>	–	–	<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 <sup>d</sup>	–	–	<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

<sup>a</sup> Donja granica pouzdanosti (*lower confidence limit*)

<sup>b</sup> Gornja granica pouzdanosti (*upper confidence limit*)

<sup>c</sup> Prag dokazivanja (*limit of detection*)

<sup>d</sup> 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

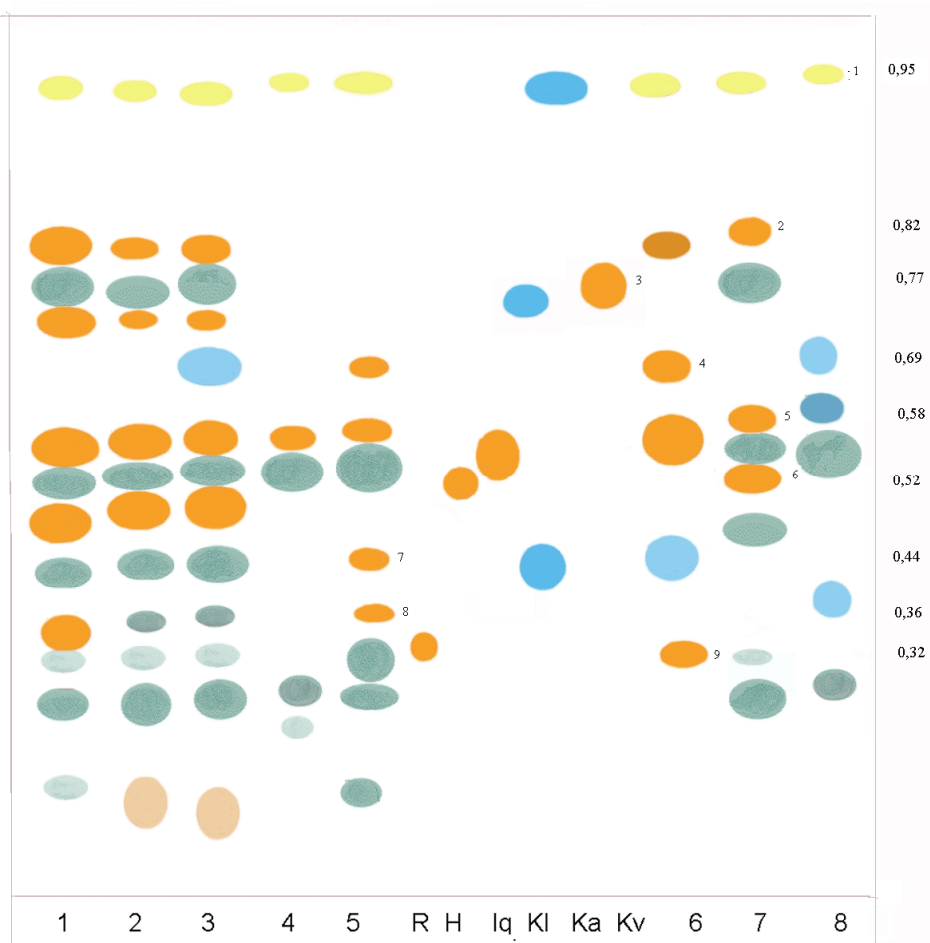
Prisutnost flavonoida i fenolnih kiselina u metanolnim ekstraktima listova vrsta roda *Plantago* L. dokazana je na tankom sloju Kieselgela 60 F<sub>254</sub>, uz razvijajuće etilacetat-mravlja kiselina-voda (8:1:1, V/V) (slika 63) i etilacetat-mravlja kiselina-ledena octena kiselina-voda (100:11:11:27, 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 kvercetinском tipu.

Glikozid kvercitrin (označen brojem 3) uočen je u sve tri niže svojte 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*.



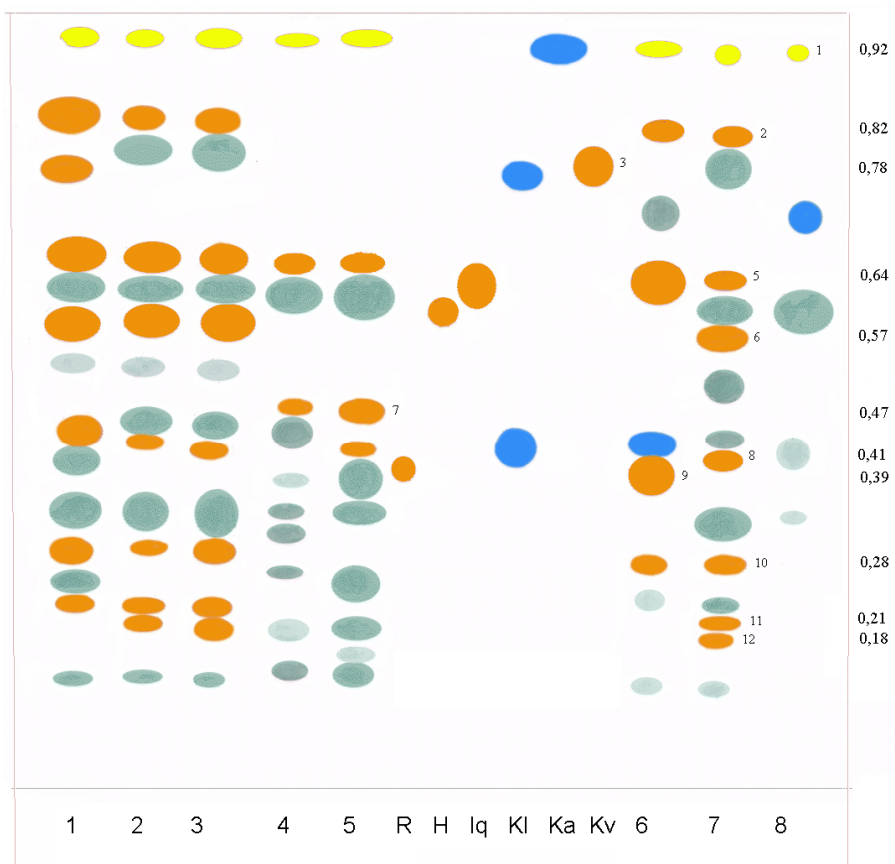


1. *P. holosteum* subsp. *holosteum*
2. *P. holosteum* subsp. *scopulorum*
3. *P. holosteum* subsp. *depauperata*
4. *P. altissima*
5. *P. argentea*
6. *P. lagopus*
7. *P. maritima*
8. *P. coronopus*

- R – rutin  
H – hiperozid  
Iq – izokvercitrin  
Kl – 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>                           | Kl – 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. Razvijatelj: 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 izmjerenih apsorbancija 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.

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

Vjerojatnost (p)			
<i>P. holosteum</i> Scop.	L – L	S – S	C – C
<i>depauperata</i> / <i>holosteum</i>	<0,300	<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

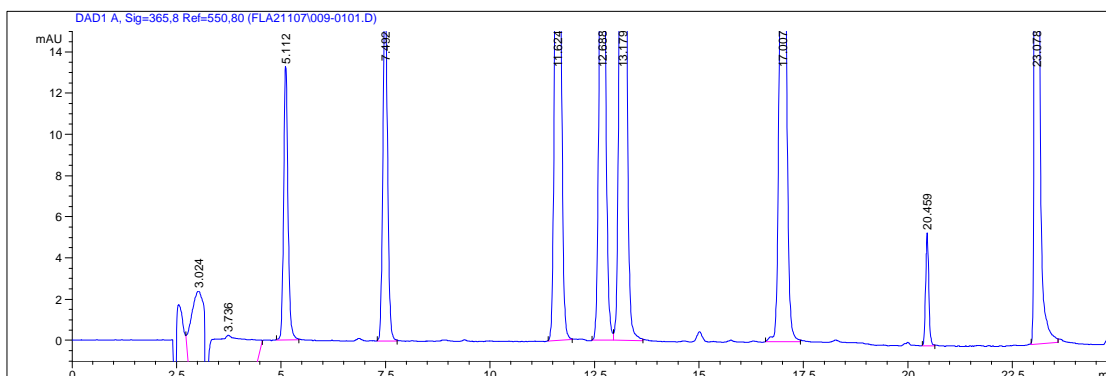
Statističkom prosudbom rezultata dobivenih za niže svojte vrste *P. holosteum*, utvrđeno je da se sadržajem flavonoida međusobno najviše razlikuju listovi podvrsta *depauperata* i *scopulorum*, stabljike podvrsta *depauperata* i *holosteum*, te cvatovi podvrste *scopulorum* u odnosu na ostala dva taksona (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-C<sub>18</sub> (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-C<sub>18</sub> (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

<b>Analit</b>	<b>Rt</b>	<b>PA</b>	<b>Udio (%)</b>	<b>S/N</b>	<b>LOQ/konc.</b>	<b>LOQ/%</b>
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  $\mu$ L pojedinih biljnih ekstrakata. U svakoj sljedećoj analizi, u originalni uzorak dodan je određeni volumen smjese standarda (3 i 15  $\mu$ 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 predstavljao je slučaj flavonoidnog glikozida izokvercitrina. Prethodno je dokazan pomoću TLC u svih analiziranih uzoraka, dok ga je HPLC potvrdila jedino u uzorku *P. argentea* (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-signalna na 204 i 365 nm, nije potvrđena njegova prisutnost u analiziranim uzorcima.

Maseni udjeli praćenih flavonoida kvercetinškog 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.

Takson	Klorogenska kiselina		
	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.

Takson	Kavena kiselina		
	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 izmjerenih 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.

<b>Udio ukupnih polifenola (%); <math>\bar{x} \pm SD</math>, n = 3</b>			
<b>Biljna vrsta</b>	<b>List</b>	<b>Stabljika</b>	<b>Cvat</b>
<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.

<b>Vjerojatnost (p)</b>			
<b>Biljna vrsta</b>	<b>list-stabljika</b>	<b>list-cvat</b>	<b>stabljika-cvat</b>
<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 svojutama vrste *Plantago holosteum* Scop.

<b>Vjerojatnost (p)</b>			
<b><i>P. holosteum</i> Scop.</b>	<b>L – L</b>	<b>S – S</b>	<b>C – C</b>
<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.

<b>Udio trjeslovina (%); <math>\bar{x} \pm SD</math>, n = 3</b>			
<b>Biljna vrsta</b>	<b>List</b>	<b>Stabljika</b>	<b>Cvat</b>
<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.

<b>Vjerojatnost (p)</b>			
<b>Biljna vrsta</b>	<b>list-stabljika</b>	<b>list-cvat</b>	<b>stabljika-cvat</b>
<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 svojtama vrste *Plantago holosteum* Scop.

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

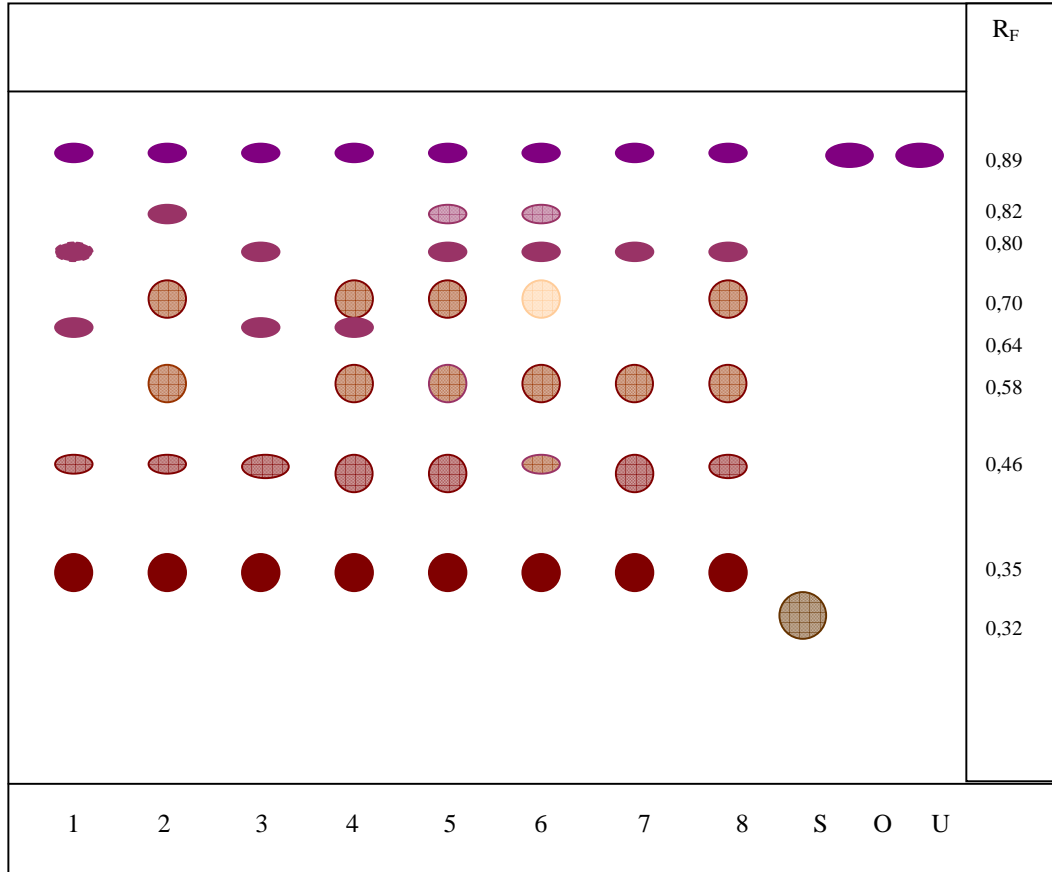
#### 3.3.5.1. Kvalitativna analiza saponina i triterpena

Metanolni ekstrakti listova (poglavlje 2.3.6.1.) analizirani su metodom tankoslojne kromatografije. Odjeljivanje supstancija postignuto je na tankom sloju adsorbensa Kieselgela 60 F<sub>254</sub>, pomoću razvijaa 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<sub>F</sub>-vrijednosti 0,35, koju su sadržavali svi biljni uzorci, kao i sastavnicu ljubičastosmeđe boje, R<sub>F</sub>-vrijednosti 0,46. Ljubičasta zona (R<sub>F</sub>=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*.

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

Detekcija: klorosulfonska kiselina, 105 °C



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

### 3.3.6. Steroli i triterpenske kiseline

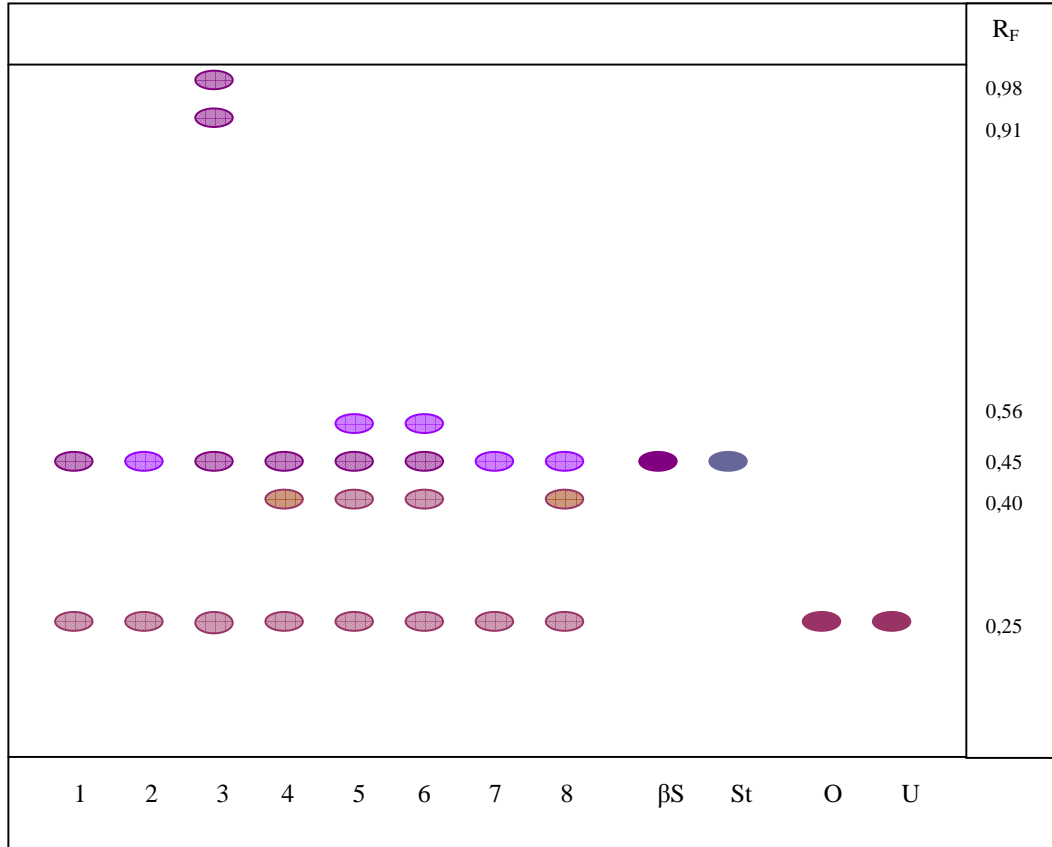
#### 3.3.6.1. Kvalitativna analiza sterola i triterpenskih kiseline

Metanolni ekstrakti listova (poglavlje 2.3.6.1.) podvrgnuti su kromatografskom odjeljivanju na tankom sloju. Primijenjen je adsorbens Kieselgel 60 F<sub>254</sub> i razvijač benzen-aceton, u omjeru 9:1 (V/V). Detekcija sterola i triterpenskih kiseline 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<sub>F</sub>-vrijednosti (0,25) odgovara oleanolnoj i/ili ursolnoj kiselini. Ljubičastoplava zona R<sub>F</sub>-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<sub>F</sub>-vrijednosti 0,91 i 0,98), *P. holosteum* subsp. *depauperata* (R<sub>F</sub> = 0,40) *P. holosteum* subsp. *holosteum* (R<sub>F</sub>-vrijednosti 0,40 i 0,56), *P. holosteum* subsp. *scopulorum* (R<sub>F</sub>-vrijednosti 0,40 i 0,56) i *P. maritima* (R<sub>F</sub> = 0,40).

Razvijatelj: benzen – aceton (9:1, V/V)

Detekcija: klorosulfonska 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 mjerenje radne mase analita, ispravan u smislu dobivanja vjerodostojnih rezultata analize i pouzdan, kako bi se osigurala ponovljivost i obnovljivost rezultata mjerenja. Da bi se neki postupak mogao proglasiti standardnim (ili poredbenim), potrebno je objektivno odlučiti o njegovoj radnoj podobnosti i pouzdanosti.

Za radno područje tanina od 5,0 do 50,0  $\mu\text{g}$  provedena su 24 mjerenja (N), svrstana u 6 grupa, čiju veličinu čine četiri istovjetna mjerenja jednog uzorka ( $L = 4$ ). Izloženi plan pokusa prilagođen je programskom paketu ESKULAP (poglavlje 2.3.8.). Svako mjerenje provedeno je pod stalnim radnim i tehničkim uvjetima i za svako je mjerenje 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 mjerenja ( $RSD_B$ ) 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, izmjerenu i korigiranu vrijednosti

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

Tablica 23. Skupine s početnim podacima

Skupine ( <i>J</i> )	Mjerenje ( <i>i</i> )	$n_a$ ( $\mu\text{g}$ )	$A_B$	$A_X$	$A$
<b>1</b>	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
<b>6</b>	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
<b>2</b>	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
<b>5</b>	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
<b>3</b>	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
<b>4</b>	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 µg) 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 mjerenjem otopine analita i slijepe prosudbe.

Rezultati jednostavne analize varijance za slijepe vrijednosti prikazani su tablicom 26. Ti podaci uključuju rasap unutar grupa, rasap između grupa i ukupno standardno odstupanje za slijepe 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,  $SD_I^2$ :

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

Ukupno standardno odstupanje za slijepe 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)

$j$	$\bar{A}_B$	$SD_B$ ( $RSD_{B_i}$ %)	$\bar{A}_X$	$SD_X$ ( $RSD_{X_i}$ %)	$\bar{A}$	$SD$ ( $RSD$ , %)	$\bar{K}^a$	$SD_K$ ( $RSD_K$ )
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	$\pm 0,00015$ ( $\pm 1,41$ )
<i>Bartlettovo ispitivanje, <math>PV_{SD}(PV_{RSD})^b</math></i>								
	$SD$	5,08 s.h.		6,80 s.h.		6,92 s.h.		
	$RSD$ (%)	(4,92 s.h.)		(10,77 s.h.)		(11,64 h.)		
<i>Srednje odstupanje šest grupa<sup>c</sup></i>								
	$SD$	$\pm 0,00144$		$\pm 0,00624$		$\pm 0,00592$		$\pm 0,00039$
	$RSD$ (%)	( $\pm 13,55$ )		( $\pm 2,91$ )		( $\pm 3,00$ )		( $\pm 3,00$ )

<sup>a</sup>  $K = A/n_a$

<sup>b</sup>  $PV < 11,07$  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.)

<sup>c</sup> 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 $\bar{A}_{x6} / \bar{A}_{B6} = \alpha \geq 2$	$\alpha = 8,24$	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 $RSD_{x6} \leq \pm 25\%$ $RSD_{x1} \leq \pm 2,5\%$	$RSD_{x6} = 4,88 \%$ $RSD_{x1} = 0,60\%$	Prag dokazivanja je niži od donje granice radnog područja analita, $(n_a)_d$ .
4 $PV = \frac{\bar{I}_1 - \bar{I}_6}{SD_{x6} + SD_{B6}}$  $PV < 3,182$ $3,182 \leq PV < 5,841$ $5,841 \leq PV < 12,941$ $12,941 \geq PV$	$PV = 9,33$	Odlična sposobnost razlučivanja signala.

Tablica 26. Analiza varijance

<i>Zahtjev</i>	<i>Rezultat</i>	<i>Iskaz</i>
5 $PV = SD_I^2 / SD_u^2$ $PV < F$ $F(P = 95, f_I = 5, f_u = 18) = 2,77$	$PV = 0,96$	Slijepi vrijednosti homogene.
6 $\bar{A}_B < 0,005 \bar{A}_{x1} < 0,0045$ $RSD_{Buk} < \pm 50\%$	$\bar{A}_B = 0,0496$ $RSD_{Buk} = 13,51\%$	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	$LD = 10 \times SD_{\text{Buk}} / V$	$LD = 0,3875 \mu\text{g tanina}$	
	$LI = 10 \times SD_{\text{Buk}} / V$	$LI = 0,77528 \mu\text{g tanina}$	
	$LQ = 10 \times SD_{\text{Buk}} / V$	$LQ = 1,2921 \mu\text{g tanina}$	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). Ulazna matrica podataka prikazana je tablicom 30. U svrhu izjednačavanja varijabilnosti obrađenih varijabli, provedena je standardizacija "z-score" metodom. Na standardiziranu matricu primijenjen je koeficijent srednje taksonomske udaljenosti (*average taxonomic distance*, D). Matrica udaljenosti podvrgnuta je UPGMA "cluster" tehnici. Krajnji rezultat statističke analize prikazan je dendrogramom (slika 68).

Tablica 30. Ulazna matrica podataka za "cluster" analizu

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

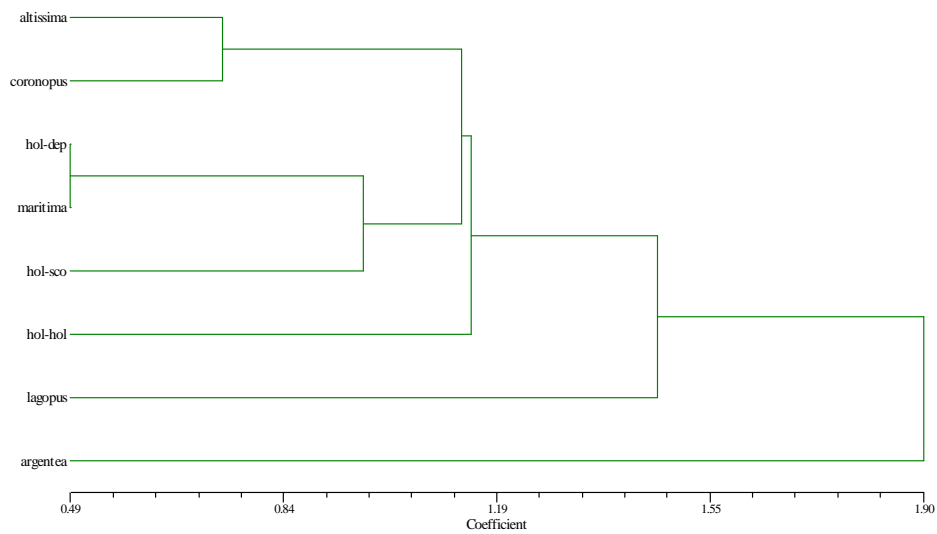
Scop. – *P. holosteum* subsp. *scopulorum*

Lag. – *P. lagopus*

Mar. – *P. maritima*

Tablica 31. Rezultati "cluster" analize eksperimentalnih fitokemijskih podataka

Sadržaj bioaktivnih tvari (%)				
n = 8	$\bar{x}$	SD	$x_{\min}$	$x_{\max}$
<b>Rutin</b>	0,0060	0,0079	0,0000	0,0240
<b>Hiperozid</b>	0,0084	0,0079	0,0000	0,0200
<b>Kvercitrin</b>	0,0049	0,0047	0,0000	0,0130
<b>Kvercetin</b>	0,0070	0,0099	0,0000	0,0280
<b>Klorog. kis.</b>	0,0214	0,0384	0,0020	0,1150
<b>Kavena kis.</b>	0,0171	0,0191	0,0000	0,0460
<b>Aukubin</b>	0,0675	0,0900	0,0000	0,2700
<b>Katalpol</b>	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 svojte 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 svojiti vrste *P. holosteum*. Okruglaste do poligonalne epidermske stanice lica i naličja lista prekrivene su jakim bradavičastom ili ispruganom kutikulom. Puči su većinom dijacitične i prisutne na obje epiderme. Samo su u listovima vrste *P. altissima* oko puči zabilježene po tri stanice pratile. Manje nakupine mehaničkog staničja (kolenhima) nalaze se u većine vrsta ispod epiderme na rubovima lista i na naličju prema glavnoj žili, dok se u taksona *P. holosteum* subsp. *scopulorum* tek rijetko mogu uočiti pojedinačne kolenhimske stanice ispod epiderme. Jednostanični trihomi nalaze se na listovima taksona *P. holosteum* subsp. *depauperata*, dok su šiljasti pokrovni trihomi s jednom ili više stanica zabilježeni na epidermama listova vrsta *P. coronopus* i *P. lagopus*. U vrste *P. altissima* trihomi 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 taksona *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, odebljelih 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 ( $\beta$ -sitosterol i stigmasterol) u ekstraktima nadzemnih dijelova istraživanih biljnih vrsta.

### ***Iridoidi***

TLC analiza iridoida najuspješnije je provedena primjenom razvijaača 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 svojte 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 kvercetinog 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 trjeslovinski sadržaj cvatova zabilježen je u vrste *P. holosteum* subsp. *scopulorum* (2,21%), dok je cvatni uzorak vrste *P. altissima* bio najsiromašniji 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 svojte 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 Rhisomen von verschiedenen *Valeriana*- und  
*Kenthrantus*-Arten,  
*Tetrahedron Lett.* (1966) 1155-1162.

49. P. W. Thies,  
Über die Wirkstoffe des Baldrians. Zur Konstitution der Isovaleriansäureester Valepotriat,  
Acetoxylvalepotriat und Dihydrovalepotriat,  
*Tetrahedron Lett.* (1966) 1163-1170.
50. P. W. Thies,  
Valerosidatum, ein Iridoidesterglycosid aus *Valeriana*-Arten,  
*Tetrahedron Lett.* (1970) 2471-2474.
51. H. Inouye, S. Ueda, S. Uesato, T. Shingu, P. W. Thies,  
Die absolute Konfiguration von valerosidatum 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 timijanolistnog 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. Cucchiarini, 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. Regeat, 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. Rigaud, 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 retinoid, Unites 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 myosuroides*,  
*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 Standardverfahren,  
*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 europskih 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-anatomska obilježja istraživanih biljnih taksona i detaljno opisana građa listova i stabljika, te oblik i raspored trihoma. 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. Unaprijeđena 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)

Ocjenjivači: 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 ( $\beta$ -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-Čižmek

Thesis accepted: January 29, 2003

## **7. ŽIVOTOPIS**

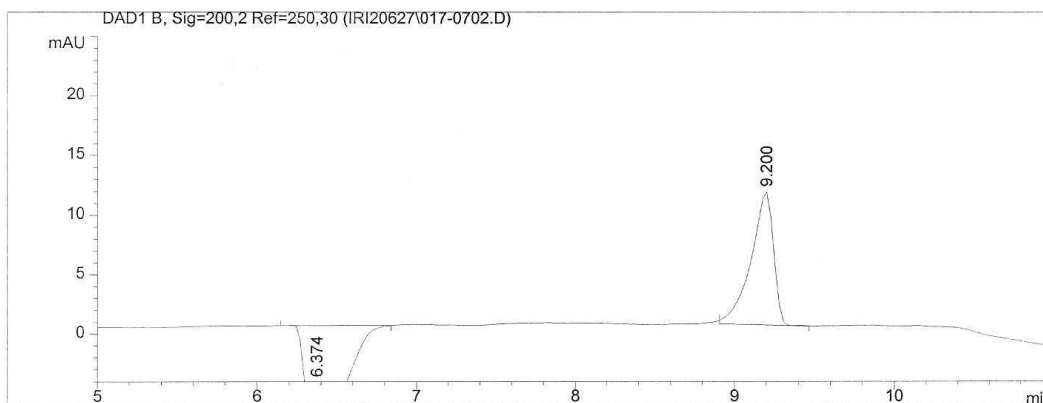
Rođena sam 30. svibnja 1970. u Osijeku. Osnovnu školu završila sam u Durđenovcu, a srednjoškolsko obrazovanje u Našicama. Godine 1989. upisala sam se na Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer Farmacija. Diplomski rad s naslovom "Ispitivanje diuretičkog učinka biljnih vrsta *Parietaria 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 *Teucrium*" 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 farmakognozijsku 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**

```
=====
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

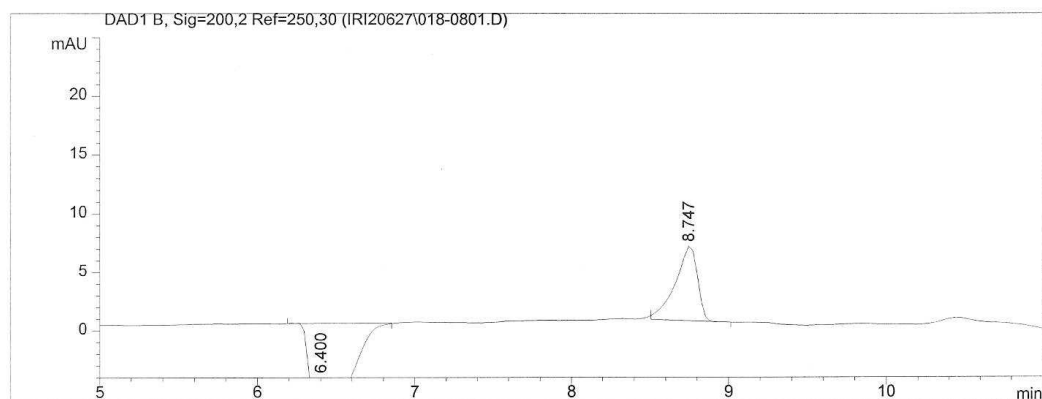
```
=====
                          Final Summed Peaks Report
=====
```

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**

```
=====
Injection Date   : 7/1/2002 2:27:54 PM      Seq. Line :    8
Sample Name     : Catalpol/0.07/1          Location  : Vial 18
Acq. Operator  : Jurisic;Debeljak         Inj       :    1
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	6.400	BP 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=200,2 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 ***
```

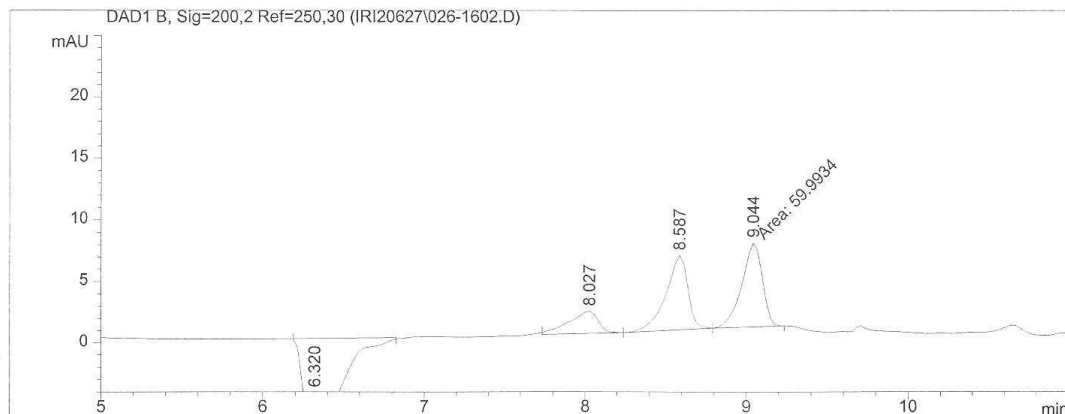
**Prilog 2. Elektroferogram katalpola**



```

=====
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 ***

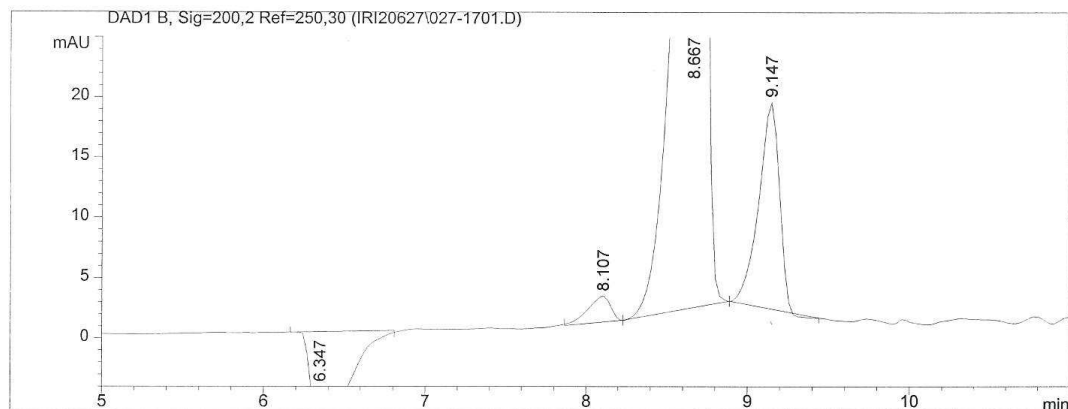
```

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

```

=====
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 #	RetTime [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

```

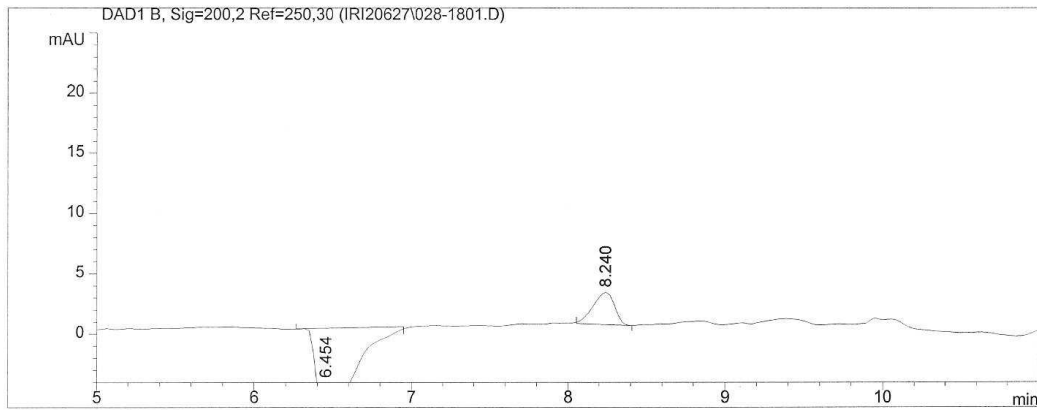
Indirect UV-Mode activated: range from -200 mAU to max. absorbance
*** End of Report ***

```

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

```

=====
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

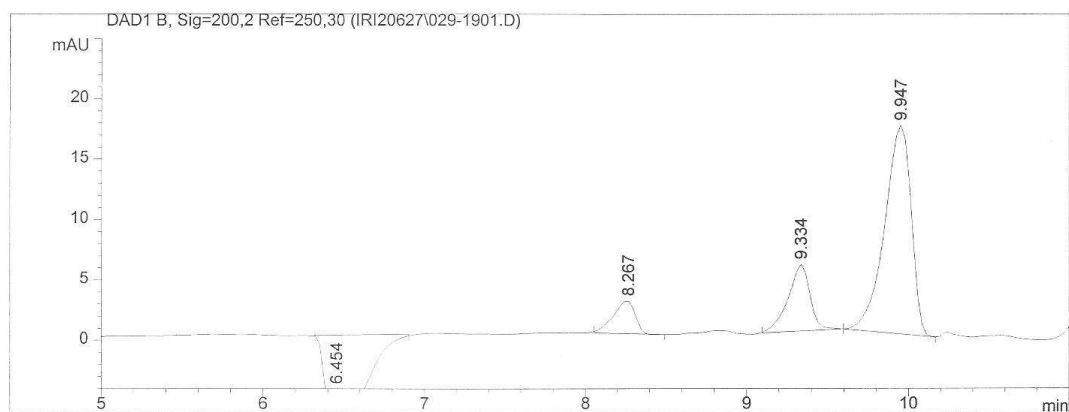
Indirect UV-Mode activated: range from -200 mAU to max. absorbance  
 \*\*\* End of Report \*\*\*

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

```

=====
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 ***

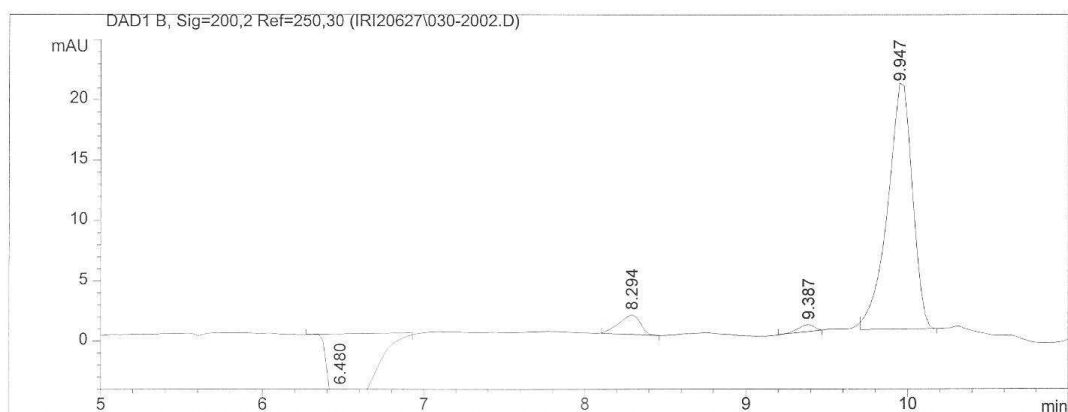
```

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

```

=====
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 \*\*\*

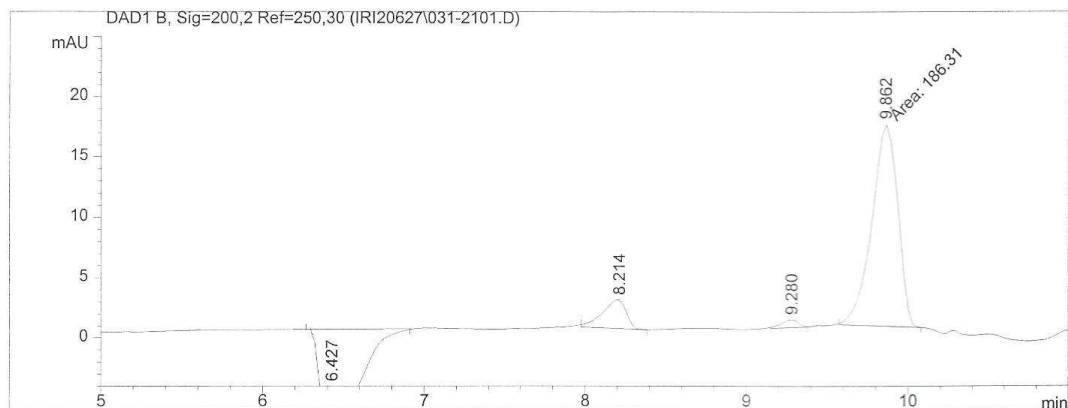
**Prilog 7. Elektroferogram vodenog ekstrakta vrste *Plantago holosteum* Scop. subsp. *holosteum***



```

=====
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 ***

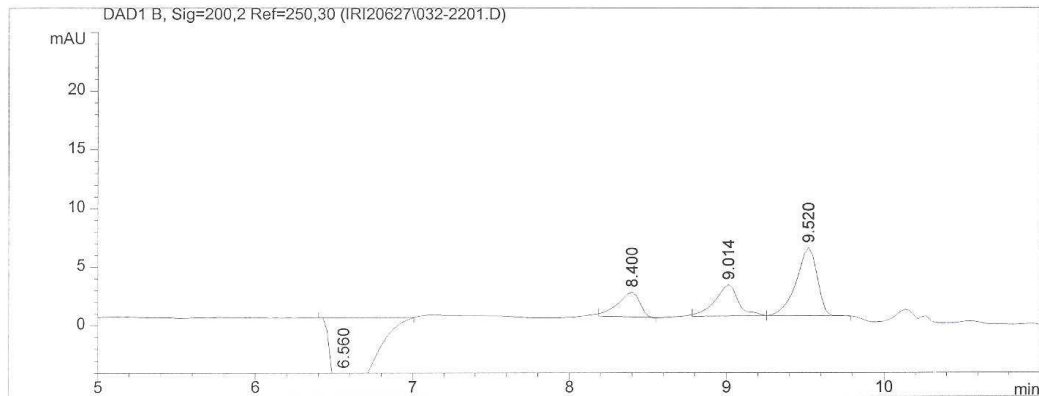
```

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

```

=====
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

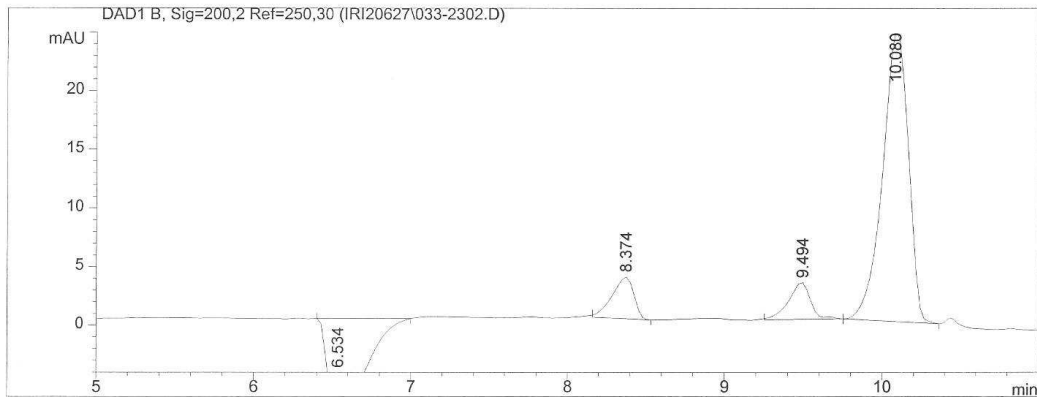
```
Indirect UV-Mode activated: range from -200 mAU to max. absorbance
*** End of Report ***
```

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

```

=====
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 ***

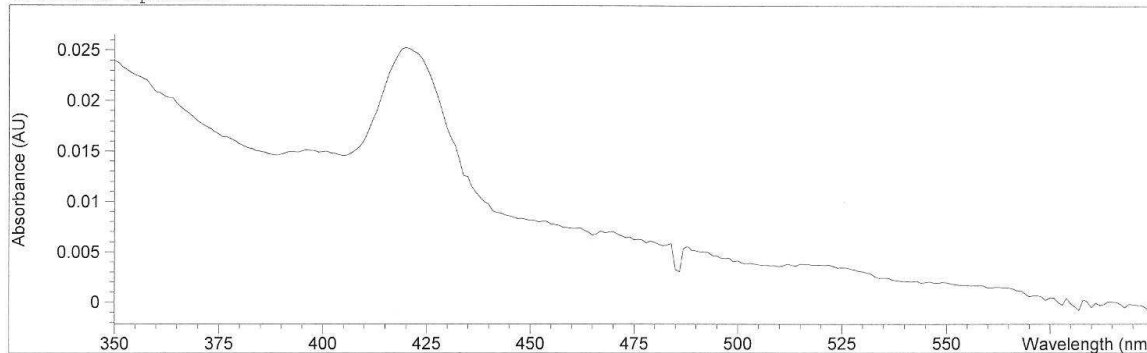
```

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



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

Overlaid Spectra:



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

Report generated by : bc

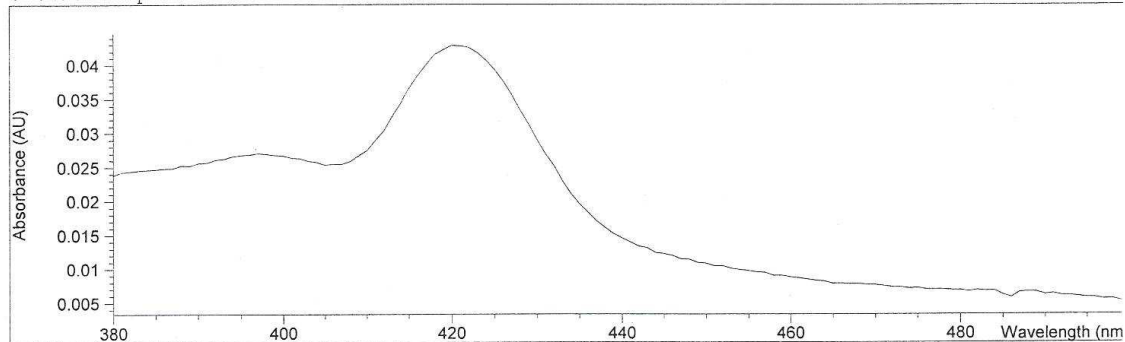
Signature: .....

\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*

**Prilog 11. UV/VIS spektar kompleksa flavonoida vrste *Plantago altissima* L. s Al<sup>3+</sup>**

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

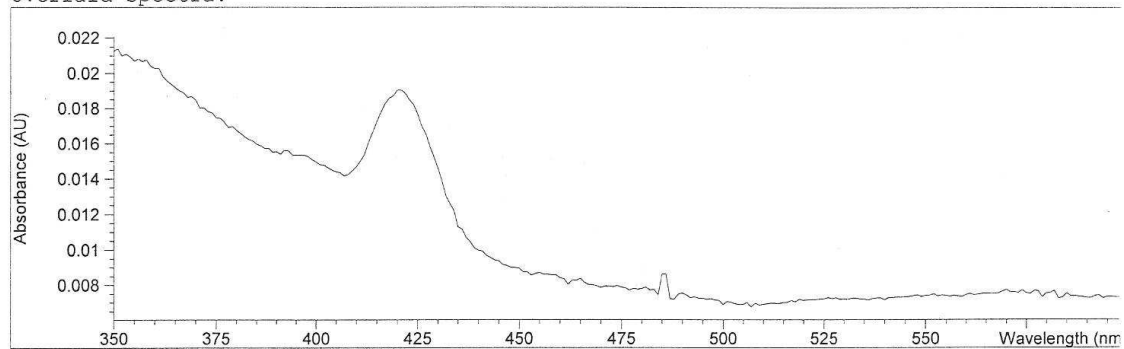
Signature: .....

\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*

**Prilog 12. UV/VIS spektar kompleksa flavonoida vrste *Plantago argentea* Chaix s Al<sup>3+</sup>**

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

Overlaid Spectra:



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

Report generated by : bc

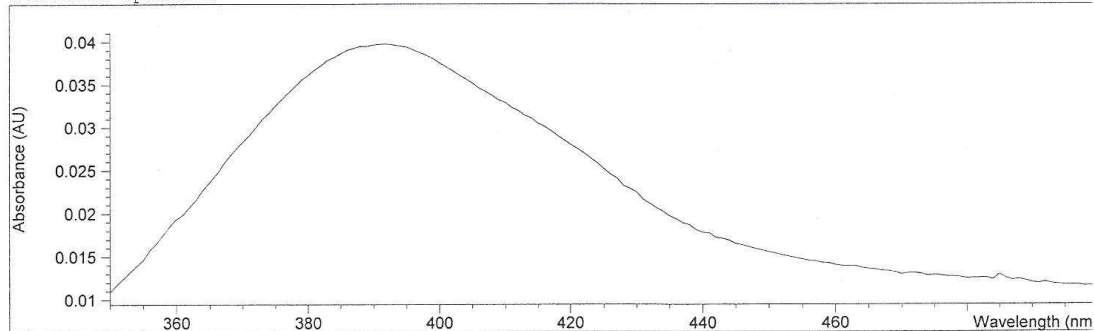
Signature: .....

\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*

**Prilog 13. UV/VIS spektar kompleksa flavonoida vrste *Plantago coronopus* L. s Al<sup>3+</sup>**

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

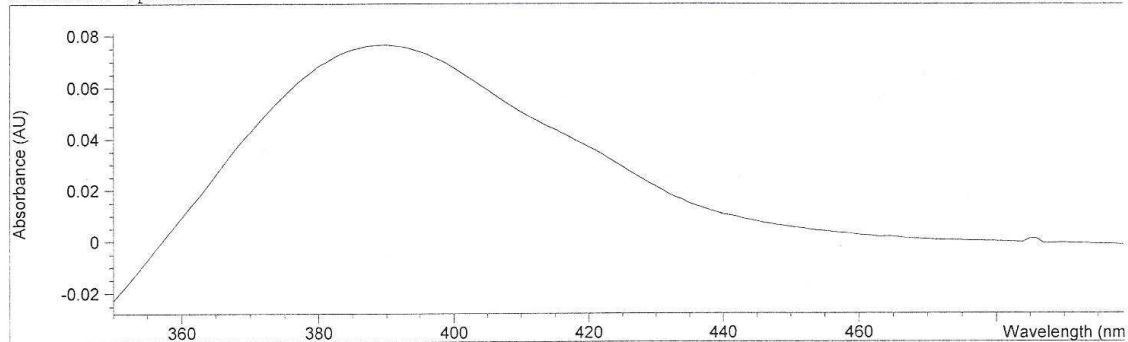
Signature: .....

\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*

**Prilog 14. UV/VIS spektar kompleksa flavonoida vrste *Plantago holosteum* Scop.  
subsp. *depauperata* s Al<sup>3+</sup>**

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

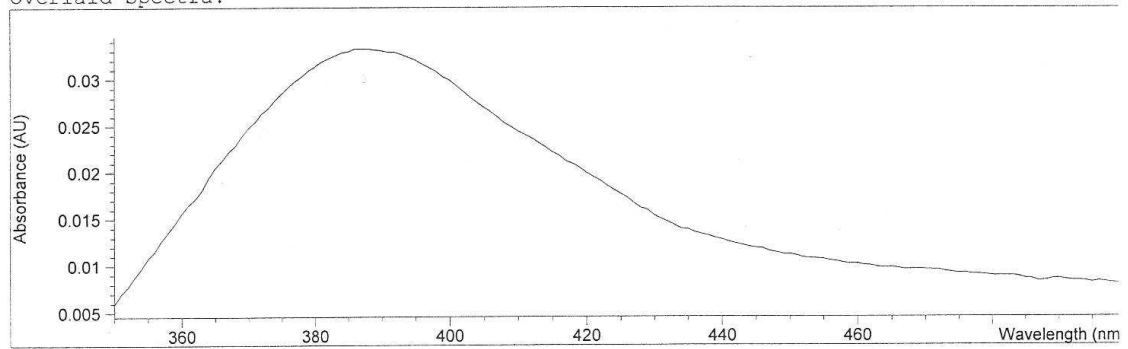
Signature: .....

\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*

**Prilog 15. UV/VIS spektar kompleksa flavonoida vrste *Plantago holosteum* Scop.  
subsp. *holosteum* s Al<sup>3+</sup>**

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

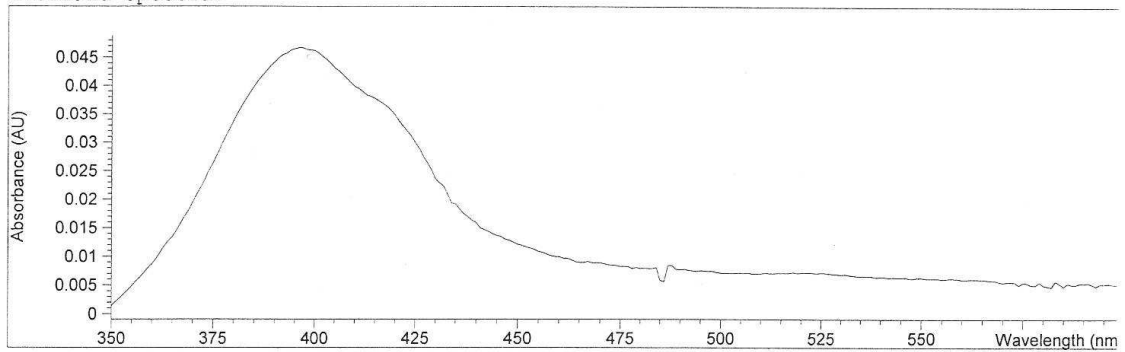
Report generated by : bc Signature: .....

\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*

**Prilog 16. UV/VIS spektar kompleksa flavonoida vrste *Plantago holosteum* Scop.  
subsp. *scopulorum* s Al<sup>3+</sup>**

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

Overlaid Spectra:



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

Report generated by : bc

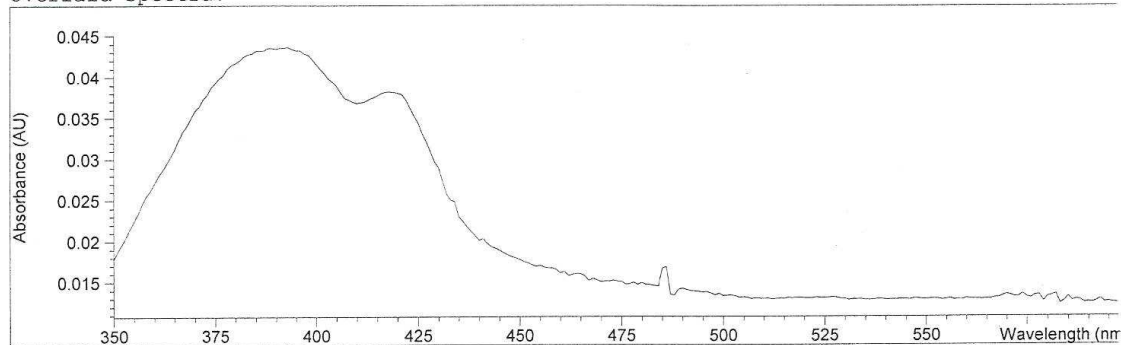
Signature: .....

\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*

**Prilog 17. UV/VIS spektar kompleksa flavonoida vrste *Plantago lagopus* L. s Al<sup>3+</sup>**

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 Al<sup>3+</sup>**

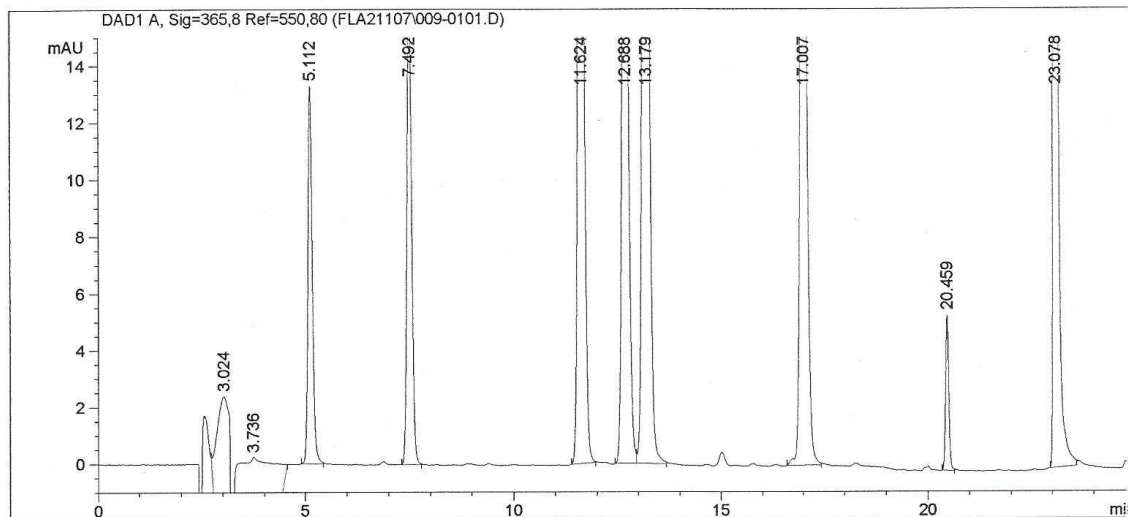


```

=====
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 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	3.024	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
=====

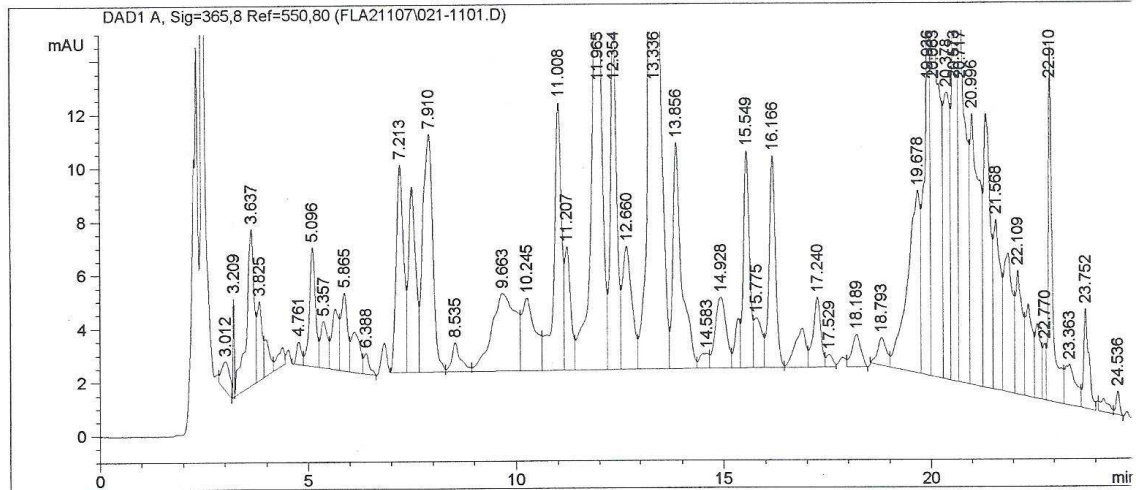
```

```

=====
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 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	3.012	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

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

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 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 Type Width Area Height Area
# [min] [min] [mAU*s] [mAU] %
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
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 \*\*\*

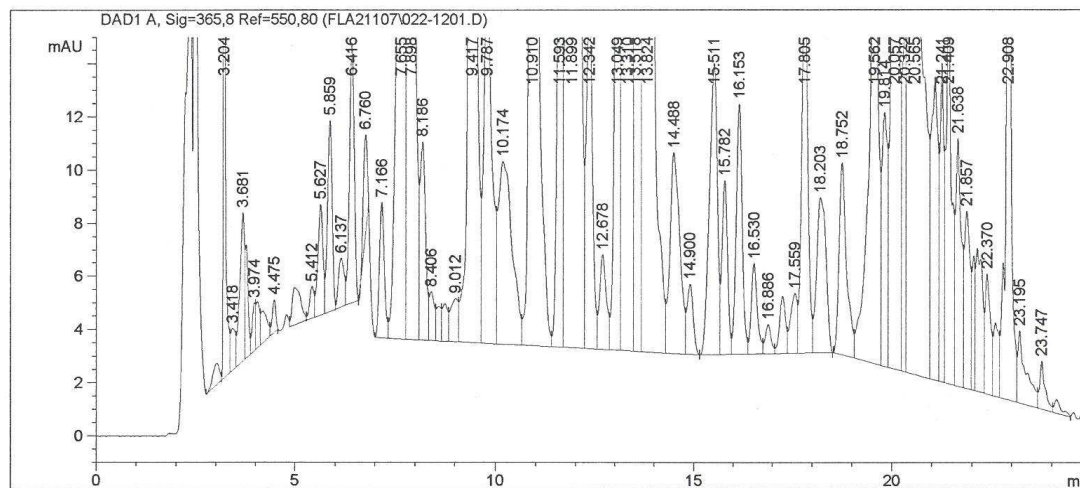
P. argentea, 500 mg/25 mL (MeOH:H2O = 1:1), Vinj. 25 uL

```

=====
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



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 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

```

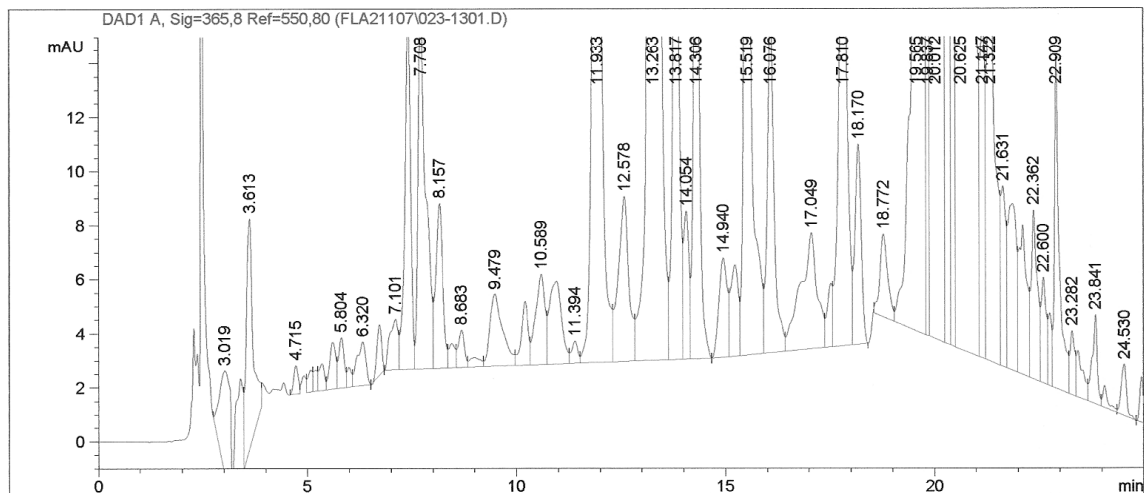
=====
Peak RetTime Type Width Area Height Area
# [min] [min] [mAU*s] [mAU] %
-----|-----|-----|-----|-----|-----
19 7.898 VV 0.1778 384.10437 32.06579 2.3672
20 8.186 VV 0.1495 75.39844 7.48581 0.4647
21 8.406 VV 0.1307 16.65414 1.85651 0.1026
22 8.592 VV 0.1240 10.97915 1.30713 0.0677
23 8.746 VV 0.1373 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 VV 0.0945 15.77129 2.61064 0.0972
68 25.223 VP 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

```

=====
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



=====  
 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

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

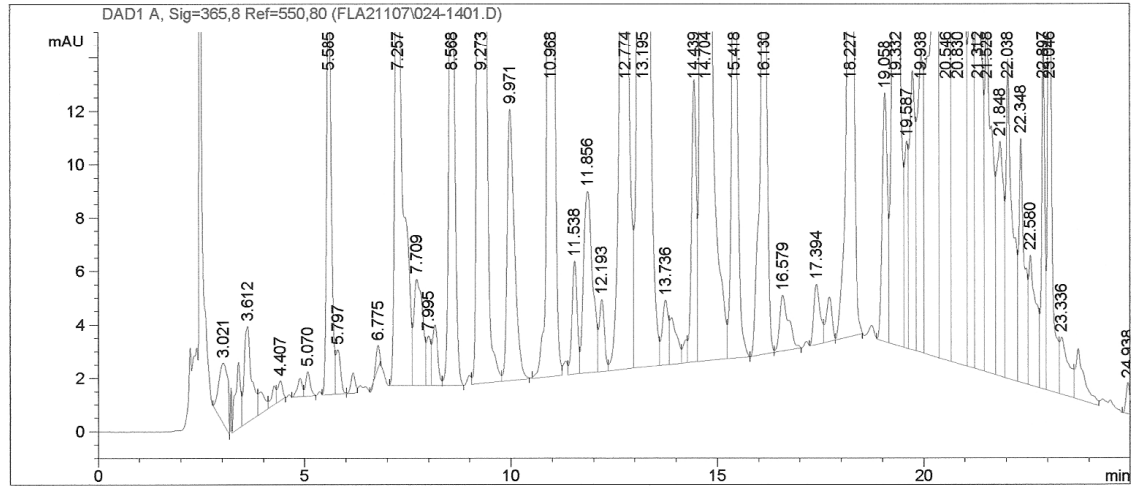
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\FLA21107\024-1401.D  
 P. depauperata, 500 mg/25 mL (MeOH:H2O = 1:1), Vinj. 25  
 uL

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 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	3.021	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	VB	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 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 Type Width Area Height Area
# [min] [min] [mAU*s] [mAU] %
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
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 \*\*\*

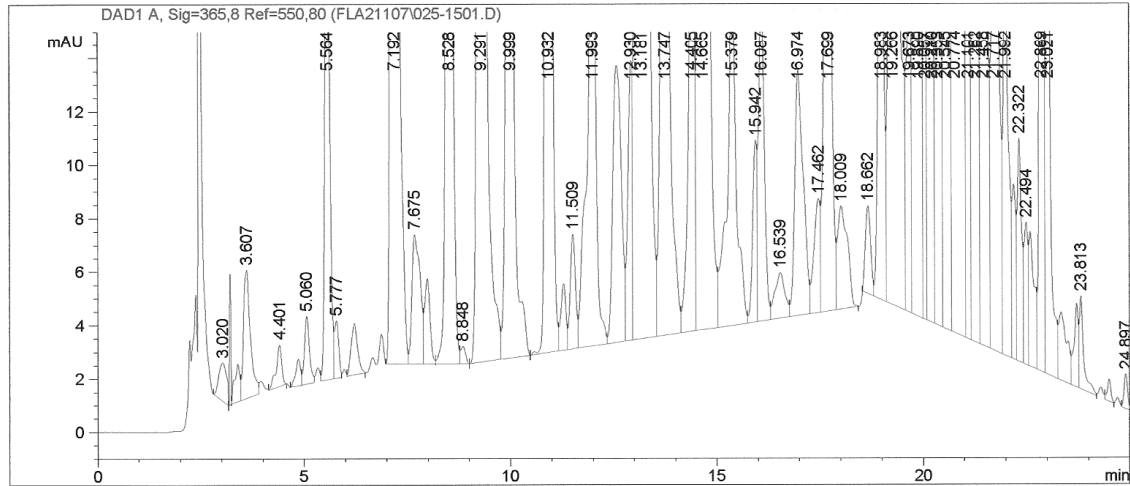
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\FLA21107\025-1501.D  
 P. holosteum, 500 mg/25 mL (MeOH:H2O = 1:1), Vinj. 25 u  
 L

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 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

P. holosteum, 500 mg/25 mL (MeOH:H2O = 1:1), Vinj. 25 u  
L

```

=====
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

```

=====
Peak RetTime Type Width Area Height Area
# [min] [min] [mAU*s] [mAU] %
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
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!

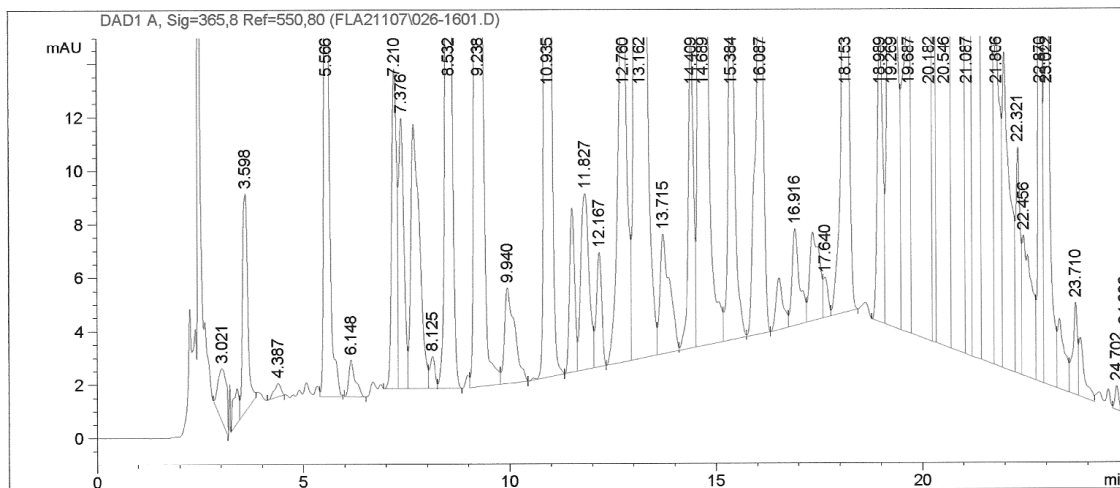
\*\*\* End of Report \*\*\*

```

=====
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 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	3.021	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

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\FLA21107\026-1601.D  
P. scopulorum, 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 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 Type Width Area Height Area
# [min] [min] [mAU*s] [mAU] %
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
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!

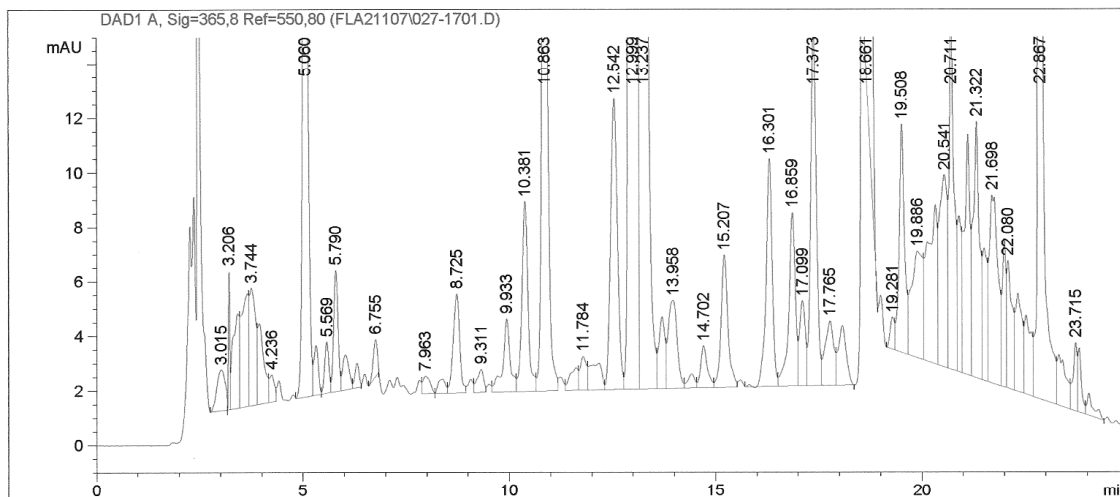
\*\*\* End of Report \*\*\*

```

=====
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 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	3.015	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



P. lagopus, 500 mg/25 mL (MeOH:H2O = 1:1), Vinj. 25 uL

```

=====
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 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 Type Width Area Height Area
# [min] [min] [mAU*s] [mAU] %
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
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!

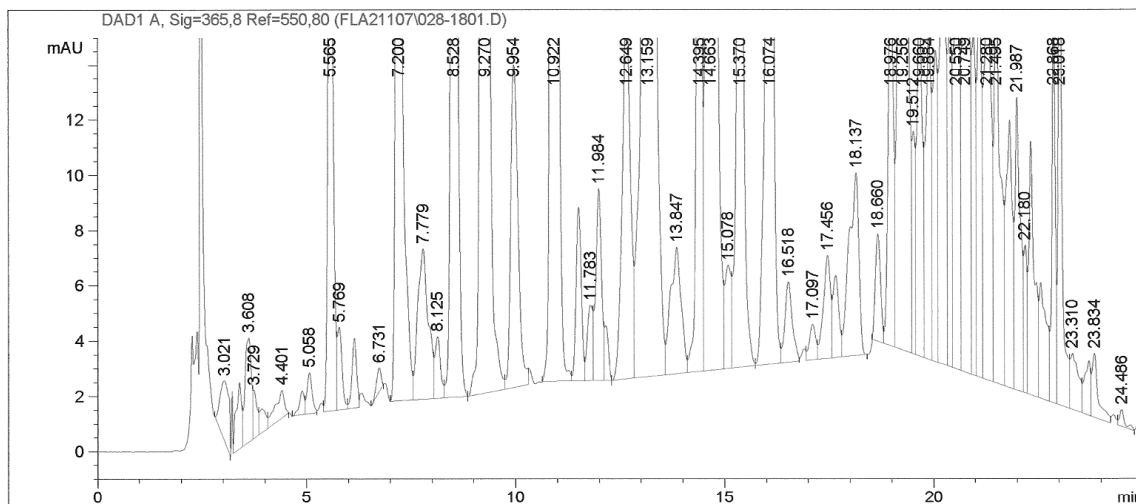
\*\*\* End of Report \*\*\*

```

=====
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 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	3.021	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





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 1\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

