



REPUBLIKA SLOVENIJA  
MINISTRSTVO ZA IZOBRAŽEVANJE,  
ZNANOST IN ŠPORT



EVROPSKA UNIJA  
EVROPSKI  
SOCIALNI SKLAD  
NALOŽBA V VAŠO PRIHODNOST



Projekt RaST  
II. gimnazija Maribor



Gimnazija Novo mesto

## **Vsebnost avkubina, akteozida in katalpola v listih in pripravkih ozkolistnega trpotca**

(raziskovalna naloga s področja kemije)

Avtor:

Nik Vidmar

Mentorica:

mag. Branka Klemenčič

Novo mesto, december 2019

## IZJAVA

Spodaj podpisan Nik Vidmar, dijak Gimnazije Novo mesto, potrjujem, da je raziskovalna naloga s področja kemije z naslovom

### **Vsebnost avkubina, akteozida in katalpola v listih in pripravkih ozkolistnega trpotca**

nastala kot rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so vsi izsledki in rezultati korektno navedeni in da pri pisanju niso bile kršene avtorske in intelektualne pravice drugih.

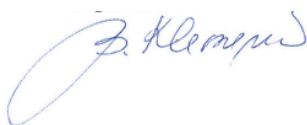
Raziskovalno delo je nastalo v sklopu aktivnosti za nadarjene dijake Gimnazije Novo mesto, Razmišljam, iščem, (se) razvijam, ki je podprta tudi z EU sredstvi v okviru projekta RaST – Razvojno središče talentov, ki ga za vzhodno kohezijsko regijo vodi II. gimnazija Maribor.

Nik Vidmar



Mentorica:

mag. Branka Klemenčič



## POVZETEK

V raziskovalni nalogi smo proučevali ozkolistni trpotec (*Plantago lanceolata*). S pomočjo metode HPLC smo določali in primerjali vsebnost katalpola, avkubina in akteozida v vzorcih čaja ozkolistnega trpotca, nabranega v različnem časovnem obdobju z vsebnostjo omenjenih zdravilnih učinkovin v kupljenih čajih in v različnih pripravkih, ki vsebujejo ozkolistni trpotec.

Proučevali smo tudi vplive temperature in svetlobe na vsebnost katalpola, avkubina in akteozida ter določili najustreznejše pogoje za shranjevanje vzorcev. Pripravili smo predloge za nadaljnje raziskovalno delo, predvsem kot možnost določanja antimikrobnega delovanja pripravkov iz ozkolistnega trpotca.

Ključne besede: ozkolistni trpotec (*Plantago lanceolata*), avkubin, akteozid, katalpol, HPLC.

## ABSTRACT

In the research project, we studied *Plantago lanceolata*. Using the HPLC method, we specified and compared the content of catalpol, aucubin and acteoside in the samples of tea of the *Plantago lanceolata* collected over different periods of time with the content of the mentioned active substances in purchased teas and in various preparations containing *Plantago lanceolata*.

We also studied the effects of temperature and light on the content of catalpol, aucubin, and acteoside, and determined the most appropriate conditions for the storage of samples. We prepared proposals for further research work, especially the possibility of determining the antimicrobial activity of the preparations from the *Plantago lanceolata*.

Key words: *Plantago lanceolata*, aucubin, acteoside, catalpol, HPLC.

## ZAHVALA

Pri oblikovanju raziskovalne naloge sem bil deležen številne dobrosrčne pomoči, ki je preprosto ne smem spregledati. Prisrčno zahvalo zato dolgujem:

- Mentorici Branki Klemenčič za povabilo k ustvarjanju raziskovalnega dela, pomoč pri iskanju ustrezne literature, vztrajnost in požrtvovalnost pri opravljanju eksperimentalnega dela naloge, sprotno razlago, pomoč pri pisanju naloge in skrb za vedno prijazno, vzpodbudno in urejeno delovno okolje;
- profesorici Janji Pust za strokovno pomoč pri izvajanju metode HPLC;
- Katarini Sluga za pomoč pri nabavi potrebnih kemikalij;
- vodstvu Gimnazije Novo mesto za spodbudno okolje in uporabo gimnazijskega kemijskega laboratorija pri eksperimentalnem delu.
- profesorju Janezu Gorencu za lektoriranje povzetka v angleškem jeziku.

## KAZALO VSEBINE

IZJAVA .....	1
POVZETEK.....	2
ABSTRACT .....	2
ZAHVALA .....	3
KAZALO SLIK.....	6
KAZALO TABEL .....	6
KAZALO GRAFOV.....	7
KAZALO ENAČB.....	7
KAZALO SHEM.....	7
UVOD .....	8
1.1 Plantago lanceolata .....	8
1.1.1 Splošni podatki o rastlini.....	9
1.1.2 Rastišče.....	9
1.1.3 Nabiranje <i>Plantago lanceolate</i> .....	9
1.1.4 Uporabnost .....	9
1.1.4.1 Uporabnost trpotca kot krmne rastline .....	9
1.1.4.2 Uporabnost zelišča kot sestavine v domači kuhinji .....	10
1.1.4.3 Uporabnost trpotca v zdravilne namene.....	10
1.1.5 Zdravilne učinkovine v ozkolistnem trpotcu.....	10
1.2 Kromatografija .....	12
1.2.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC).....	12
1.2.1.1 Sestava HPLC aparature.....	13
1.2.1.2 Razdelitev metod HPLC glede na stacionarno fazo .....	14
2 NAMEN DELA .....	16
2.1 Cilji .....	16
2.2 Hipoteze.....	17
3 MATERIALI.....	18
3.1 Kemikalije .....	18
3.2 Raztopine in topila.....	18
3.3 Laboratorijska oprema .....	19
4 METODE DELA.....	20

4.1	Analiza vzorcev in standardov z metodo HPLC.....	20
4.1.1	Kromatografski pogoji.....	20
4.1.2	Priprava standardov za HPLC analizo.....	21
4.1.2.1	Priprava standarda avkubina .....	21
4.1.2.2	Priprava standarda akteozida .....	21
4.1.2.3	Priprava standarda katalpola .....	21
4.1.3	Določanje retencijskega časa standardov .....	22
4.1.4	Določanje umeritvene krivulje.....	22
4.1.5	Priprava vzorcev za HPLC analizo .....	23
4.1.6	Pridobivanje, označevanje in analiziranje vzorcev domačih čajev .....	24
4.1.7	Priprava in analiza vzorcev kupljenih čajev .....	25
4.1.8	Priprava in analiza vzorcev sirupov.....	25
4.1.9	Pridobivanje, označevanje in analiziranje vzorcev domačih svežih vzorcev	26
4.1.10	Proučevanje vpliva pogojev na vsebnost učinkovin v izvlečku iz svežih listov trpotca.....	27
4.1.11	HPLC analiza vzorcev.....	27
5	REZULTATI.....	28
5.1	Kromatogram topila etanol : voda = 50 : 50 vol % .....	28
5.2	Kromatogram topila metanol.....	28
5.3	Avkubin – umeritvena krivulja .....	29
5.4	Akteozid – umeritvena krivulja .....	30
5.5	Rezultati identifikacije standarda katalpola.....	31
5.6	Rezultati identifikacije domačih čajev .....	32
5.7	Rezultati identifikacije kupljenih čajev .....	34
5.8	Rezultati identifikacije sirupov.....	35
5.9	Rezultati identifikacije svežih vzorcev .....	37
6	RAZPRAVA.....	39
7	ZAKLJUČEK.....	41
8	VIRI.....	42
	VIRI SLIK IN SHEM.....	43

## KAZALO SLIK

Slika 1: Ozkolistni trpotec ( <i>Plantago lanceolata</i> ).....	8
Slika 2: Značilen kromatogram večkomponentne mešanice.....	12
Slika 3: Najenostavnejši HPLC sistem.....	14
Slika 4: HPLC sistem (Agilant Technologies, CA, ZDA, serija 1100).....	20
Slika 5: Mletje domačih vzorcev .....	23
Slika 6: Ultrazvočna kopel.....	24
Slika 7: Filtriranje vzorcev skozi filter z velikostjo por 0,2 µm v 2 mL vialo.....	24
Slika 8: Posušeni listi ozkolistnega trpotca .....	25
Slika 9: Embalaže kupljenih čajev, uporabljenih za HPLC analizo .....	25
Slika 10: embalaže sirupov uporabljenih za HPLC analizo .....	26
Slika 11: sveže nabrani lisi ozkolistnega trpotca .....	26
Slika 12: HPLC kromatogram topila etanol : voda 50 : 50 vol % .....	28
Slika 13: HPLC kromatogram topila metanol .....	28
Slika 14: HPLC kromatogram standarda avkubina .....	29
Slika 15: HPLC kromatogram standarda akteozida .....	30
Slika 16: HPLC kromatogram standarda katalpola .....	31
Slika 17: HPLC kromatogram vzorca domačega čaja, na katerem so označene učinkovine katalpol, avkubin, akteozid.....	33
Slika 18: HPLC kromatogram vzorca kupljenega čaja na katerem so označene učinkovine katalpol, avkubin, akteozid.....	35
Slika 19: HPLC kromatogram vzorca sirupa na katerem so označene učinkovine katalpol, avkubin, akteozid.....	36
Slika 20: HPLC kromatogram svežega vzorca na katerem so označene učinkovine katalpol, avkubin in akteozid.....	38

## KAZALO TABEL

Tabela 1: Rezultati HPLC analize standarda avkubina pri različnih koncentracijah: prikazane so površine in retenzijski časi.....	29
Tabela 2: Rezultati analize standarda akteozida pri različnih koncentracijah: prikazane so površine in retenzijski časi.....	30
Tabela 3: Rezultati analize standarda katalpola pri različnih koncentracijah: prikazane so površine in retenzijski časi.....	31
Tabela 4: Rezultati HPLC analize domačih vzorcev: prikazani so datumi nabiranja vzorcev in površine, ter koncentracije avkubina v vzorcih.....	32
Tabela 5: Rezultati HPLC analize domačih vzorcev: prikazani so datumi nabiranja vzorcev in površine, ter koncentracije akteozida v vzorcih.....	32
Tabela 6: Rezultati HPLC analize domačih vzorcev: prikazani so datumi nabiranja vzorcev in površine, ter koncentracije katalpola v vzorcih.....	33
Tabela 7: Rezultati HPLC analize domačih vzorcev: prikazane so površine, ter koncentracije avkubina v vzorcih.....	34

Tabela 8: Rezultati HPLC analize domačih vzorcev: prikazane so površine, ter koncentracije akteozida v vzorcih. ....	34
Tabela 9: Rezultati HPLC analize domačih vzorcev: prikazane so površine, ter koncentracije katalpola v vzorcih. ....	34
Tabela 10: Rezultati HPLC analize sirupov: prikazane so površine, ter koncentracije avkubina v vzorcih. ....	35
Tabela 11: Rezultati HPLC analize sirupov: prikazane so površine, ter koncentracije akteozida v vzorcih. ....	35
Tabela 12: Rezultati HPLC analize sirupov: prikazane so površine, ter koncentracije katalpola v vzorcih. ....	36
Tabela 13: Rezultati HPLC analize svežega vzorca št. 01, izpostavljenega različnim pogojem ob času 0 h, 8 h in 1 teden: podane so površine in koncentracije učinkovin.(površine in koncentracije avkubina po osmih urah smo izločili zaradi nenavadnosti rezultatov) .....	37
Tabela 14: Rezultati HPLC analize svežega vzorca št. 02, izpostavljenega različnim pogojem ob času 0 h, 8 h in 1 teden: podane so površine in koncentracije učinkovin.(površine in koncentracije avkubina po osmih urah smo izločili zaradi nenavadnosti rezultatov) .....	37

## **KAZALO GRAFOV**

Graf 1: Umeritvena krivulja za določanje avkubina v vzorcih .....	29
Graf 2: Umeritvena krivulja za določanje akteozida v vzorcih .....	30
Graf 3: Umeritvena krivulja za določanje katalpola v vzorcih .....	31

## **KAZALO ENAČB**

Enačba 1: Enačba za izračun povprečnega retenzijskega časa avkubina .....	22
Enačba 2: Enačba za izračun povprečnega retenzijskega časa akteozida .....	22
Enačba 3: Enačba za izračun povprečnega retenzijskega časa katalpola .....	22
Enačba 4: Enačba za izračun povprečne površine standarda .....	22

## **KAZALO SHEM**

Shema 1: Skeletna formula avkubina, z molekulske formulo $C_{15}H_{22}O_9$ .....	10
Shema 2: Skeletna formula katalpola, z molekulske formulo $C_{15}H_{22}O_{10}$ .....	11
Shema 3: Skeletna formula akteozida z molekulske formulo $C_{20}H_{30}O_{15}$ .....	11



## UVOD

### 1.1 *Plantago lanceolata*

Ozkolistni trpotec, ki ga poznamo tudi pod imenom suličasti trpotec, *Plantago lanceolata*, ki prihaja iz družine trpotčevk, prvotno izhaja iz severne poloble, a je danes razširjen po celem svetu (S. Trojar, 2017).

V družino trpotčevk spada več kot 200 vrst trpotcev, med katerimi so najbolj poznani veliki trpotec (*Plantago major*), srednji trpotec (*Plantago media*) in ozkolistni trpotec (*Plantago lanceolata*). Večina izmed njih sodi med zdravilna zelišča, ki jih, zaradi razširjenosti uporabljajo ljudski zdravilci po vsej Zemlji (Bodi, 2010).



Slika 1: Ozkolistni trpotec (*Plantago lanceolata*)

### 1.1.1 Splošni podatki o rastlini

Ozkolistni trpotec je zdravilna trajnica, visoka od 10 do 50 cm. Ima kratko koreniko, iz katere izhajajo manj kot milimeter debele korenine. Steblo je brazdasto s petimi vzdolžnimi žlebovi. (Vreš, et al., 2014) Listi so na steblo pripeti v pritlični rozeti, so rjavkasti in so suličaste oblike in rahlo nazobčani, celorobi in imajo od 5 do 7 vzporednih žil. Dolgi so do 30 cm in široki od 7 do 30 mm. Cvetovi so štiri števnici in se nahajajo na razmeroma dolgih pet robnih pecljih. Cvet obdajajo štirje različno veliki čašasti listi. Venec je 2 do 4 cm širok in je gol iz njega pa izraščajo rjavi venčni roglji, ki se nadaljujejo v rumenkaste prašnične niti, ki so zelo dolge (Schauer & Caspari, 2008). Po opraitvi nastane plod, imenovan glavica, ki se odpira s pokrovčki in vsak vsebuje dve rjavkasti semeni. Trpotec cveti od začetka maja do konca septembra in je žužkocvetka ter vetrocvetka, kar pomeni, da opraitvanje poteka s pomočjo vetra ter muh in hroščev. Po opraitvi se razvijejo semena, s katerimi se razmnožuje spomladi. V prehranski verigi predstavlja pomemben vir hrane za gosenice številnih metuljev (Seliškar & Wraber, 1986).

### 1.1.2 Rastišče

Zelišče raste na gojenih travnikih, njivah, ob poteh, pašnikih, zanj pa je značilno, da je kozmopolitska vrsta (Vreš, et al., 2014). Najdemo ga tudi na parkovnih zelenicah, ruderalnih mestih, obpotjih in poljih. Pogosto se nahaja na globokih tleh in raste skoraj po vsej Evropi (Spohn & Spohn, 2008). Naseli se na vlažnih, svežih ali spremenljivo svežih tleh, ki so srednje rodovitna do zelo dobro preskrbljena s hranili in dobro prenaša gnojenje. Tla, na katerih raste, so rjava, glinena s precejšno plastjo humusa v zgornjih plasteh. Na ugodnem rastišču požene trpotec korenine okrog 60 cm globoko (Seliškar & Wraber, 1986).

### 1.1.3 Nabiranje *Plantaga lanceolate*

Od aprila do oktobra nabiramo liste. Nabrane liste moramo hitro posušiti, sicer počrnijo, previdni pa moramo biti tudi pri shranjevanju, da izberemo dovolj suh prostor, da listov ne napadejo plesni. Najbolj je priporočljivo shranjevanje v papirnih vrečkah. (Bodi, 2010)

### 1.1.4 Uporabnost

Trpotec ima širok spekter uporabnosti od pomembne rastline v prehranskih verigah mnogih rastlinojedcev do sestavine v domači kuhinji in zelišča, uporabnega v zdravilne namene.

#### 1.1.4.1 Uporabnost trpotca kot krmne rastline

Je zelo kakovostno krmno zelišče, predvsem na travnikih z gosto rušo, ki pospeši rast listov proti svetlobi, zato so listne rozete pokončne in podaljšane. Odličen je trpotec tudi kot krma na pašnikih, ni pa najbolj primeren za sušenje, saj se velik del listov zdrobi (Seliškar & Wraber, 1986).

#### 1.1.4.2 Uporabnost zelišča kot sestavine v domači kuhinji

Iz listov, nabranih v pomladnih mesecih, lahko pripravimo solato, ki ima nekoliko grenak okus, pripravimo pa ga lahko tudi v juhah ali v špinaci podobni jedi. Stebla se uporabljajo tudi kot dodatek rižotam, saj s kuhanjem pridobijo okus po gobah in so odličen nadomestek gob (Červenka, et al., 1988).

#### 1.1.4.3 Uporabnost trpotca v zdravilne namene

*Plantago lanceolata* je bil že v obdobju antike cenjeno sredstvo za pomoč proti kašlju. Tudi danes obstajajo čaji in sirupi, narejeni iz te rastline, ki blažijo suh kašelj in druge bolezni dihal, saj imajo blag protibakterijski učinek. (Spohn & Spohn, 2008) Proti boleznim dihal je učinkovit, saj vsebuje sluzi, ki v grlu ustvarijo tanko plast, ki ščiti in blagodejno deluje na sluznico žrela in požiralnika. Vsebuje pa tudi glikozide in kremenčevo kislino. Za pripravo čaja je svetovan odmerek 1,5 g mlete suhe droge (Červenka, et al., 1988).

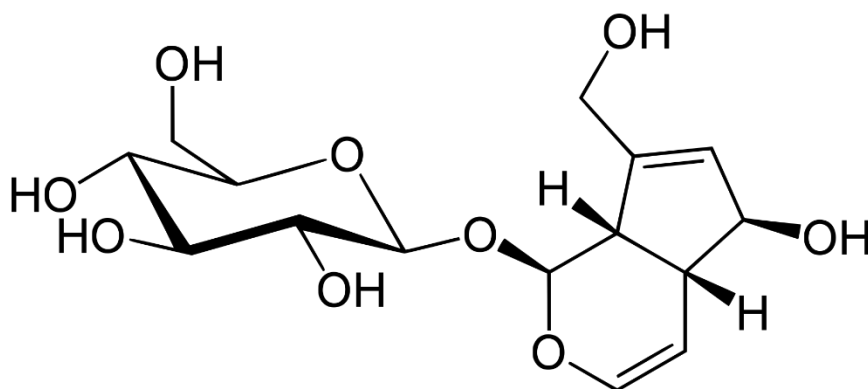
Pripravki iz trpotca pomagajo tudi pri čiščenju krvi, zdravijo mehur, pomagajo pri očiščevanju ledvic, zdravijo pljuča ter želodec.

Sok, iztisnjen iz svežih listov, se uporablja za zdravljenje pri zunanjih poškodbah, ranah, vnetjih in pikih žuželk, tako da sveže liste ozkolistnega trpotca pomečkamo in si z njimi prekrijemo poškodovano mesto (Poler, 2015).

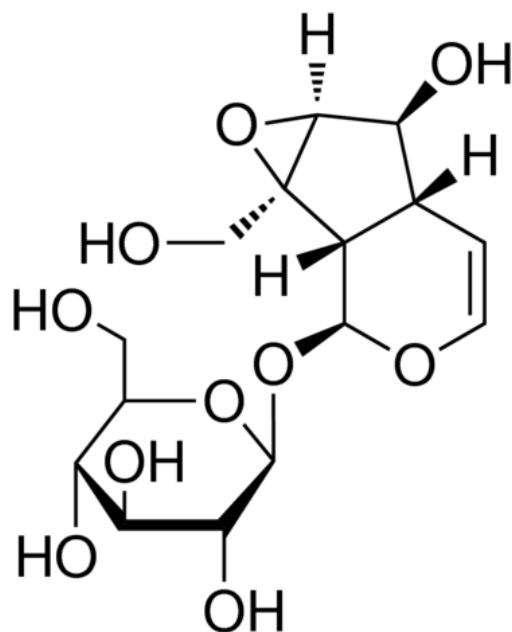
#### 1.1.5 Zdravilne učinkovine v ozkolistnem trpotcu

V drogi najdemo različne kemične skupine spojin. Glavne učinkovine so iridoidni in fenilpropanoidni glikozidi. Trpotec vsebuje tudi 2 – 6,5 % sluzi, Flavonoide, ki so prisotni v majhnih količinah predvsem v svežih listih, fenilkarboksilne kisline.

Iridoidni glikozidi so grenkega okusa, in razen avkubina (Shema 1) ter katalpola (Shema 2) še nimajo preverjenih zdravilnih učinkov. Številne rastline in njihove droge vsebujejo iridoide, ampak za mnoge še ni znan njihov prispevek k zdravilni vrednosti. Najpomembnejša pri trpotcu je vsebnost avkubina in njegovega sorodnika katalpola v njegovih listih (Štol, 2011).

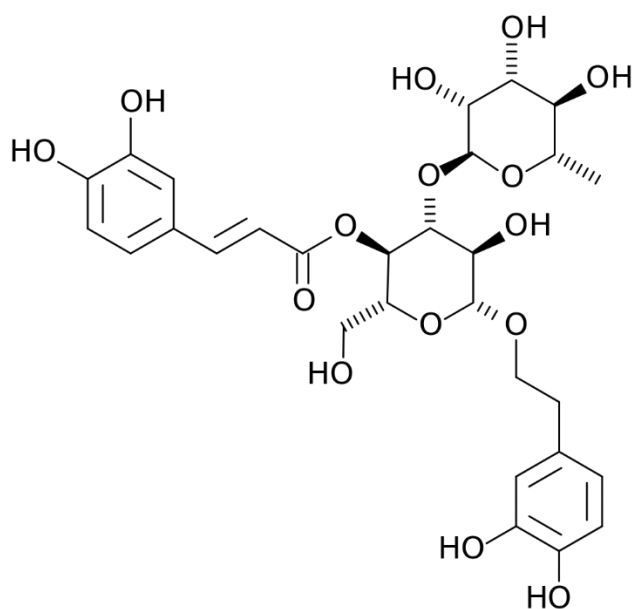


Shema 1: Skeletna formula avkubina, z molekulsko formulo  $C_{15}H_{22}O_9$



Shema 2: Skeletna formula katalpola, z molekulsko formulo  $C_{15}H_{22}O_{10}$

Zraven iridoidnih glikozidov droga vsebuje še fenilpropanoidne glikozide. Do sedaj so identificirali akteozid ali verbaskozid (Shema 3), ki ga je v drogi največ (do 3,5 %), plantamajozid (do 1 %) ter izoakteozid. Dokazanih jim je mnogo zdravilnih učinkov od protivnetnih, protibakterijskih, protivirusnih do imunosupresivnih, protitumornih, protiglivičnih učinkov. Vanje pa se ujamejo tudi prosti radikali.



Shema 3: Skeletna formula akteozida z molekulsko formulo  $C_{20}H_{30}O_{15}$

## 1.2 Kromatografija

### 1.2.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

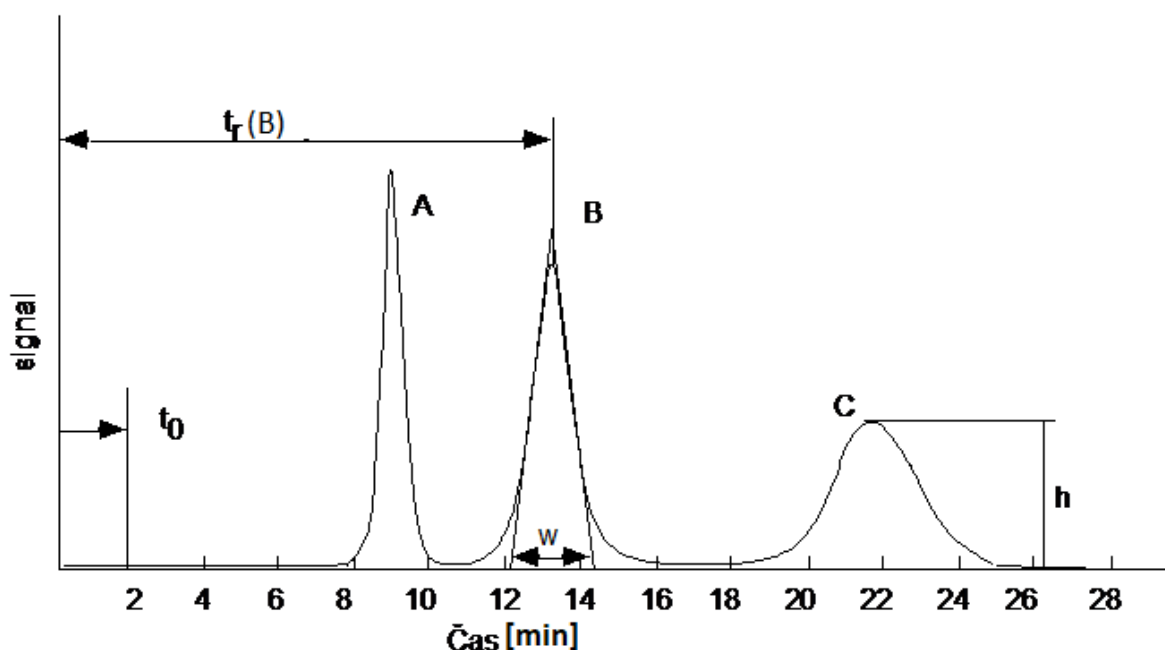
Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je zelo uporabna kromatografska tehnika, namenjena ugotavljanju sestavin različnih snovi. Uporablja se v najrazličnejših vedah, kot so na primer forenzika, okoljevarstvo, živilstvo, najdemo pa jo tudi v biokemiji, farmaciji in toksikologiji (Skoog, et al., 2004). S to metodo lahko določimo retenzijske čase in koncentracije enostavnejših in kompleksnejših organskih spojin.

Retenzijski čas ( $t_r$ ) je čas, med začetkom injiciranja vzorca in časom, ko detektor odčita pik. Pri enakih komponentah in konstantnem pretoku je retenzijski čas za določeno snov enak in zato ga lahko uporabimo za določitev iskane snovi (Žorž, 1991).

Za določanje koncentracij, se uporablja različne metode: z internim standardom, z eksternim standardom, z umeritveno krivuljo in s standardnim dodatkom (Žorž, 1991).

Pri HPLC analizi večkomponentne mešanice dobimo značilen kromatogram.

**vbrizg**



Slika 2: Značilen kromatogram večkomponentne mešanice

$t_r(B)$  ..... retenzijski čas komponente B, je čas, ki ga le-ta potrebuje za potovanje od injektorja do detektorja skozi kromatografsko kolono in je ob danih kromatografskih pogojih specifičen za posamezno substanco.

$t_0$  ..... čas, ki je potreben za prehod mobilne faze po enaki poti.

$h$  ..... višina kromatografskega vrha komponente C.

$w$  ..... širina vrha na osnovi, t.j. na bazni črti.

Če hočemo izvesti analiziranje potrebujemo napravo, pri kateri je omogočeno delovanje pri tlaku 500 barov (Štrancar, 1998) (Žorž, 1991).

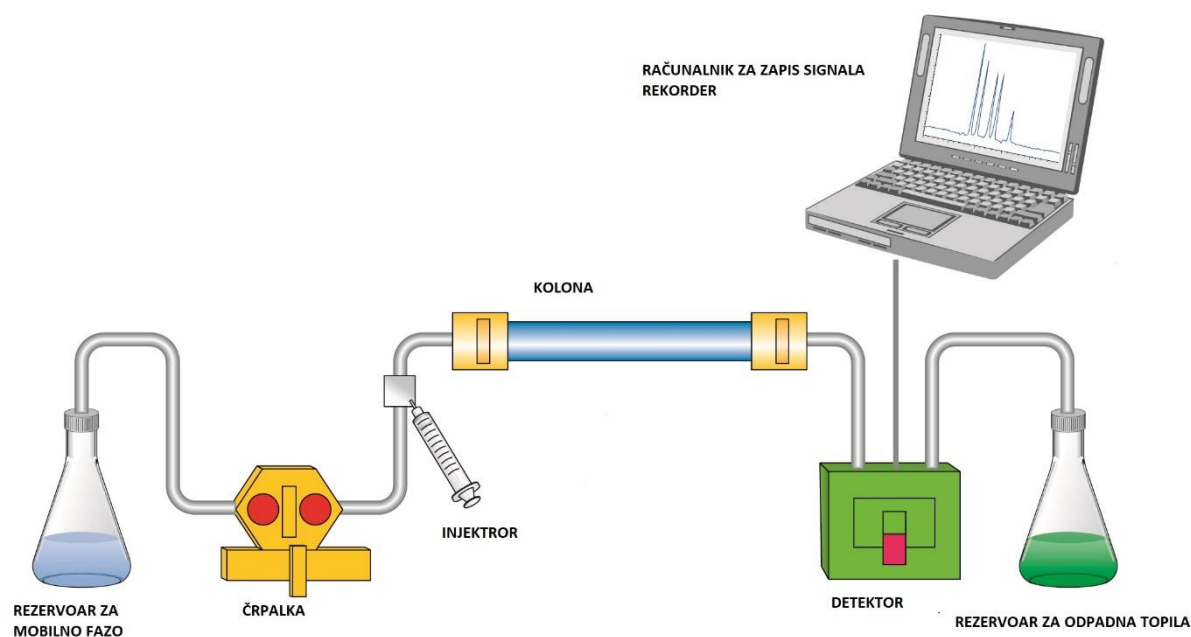
#### 1.2.1.1 Sestava HPLC aparature

HPLC naprava sestavljena iz najrazličnejših delov kot so rezervoar za mobilno fazo, injektor, črpalka, detektor, kromatografska kolona in instrument za zapis signala (Žorž, 1991).

Mobilna faza je ponavadi shranjena v posebnem rezervoarju ali steklenici in zelo pomembno je, da ustreza vrsti detektorja in pozorni moramo biti, da ne reagira s stacionarno fazo, zato so najbolj pogosto uporabljene mešanice različnih organskih topil, ki so ponavadi v različnih razmerjih. Velikokrat je potrebno mobilne faze razpliniti, kar naredimo v degazerju. S črpalko je nato omogočena enakomernost pretoka skozi kolono in potisk mobilne faze pri tlaku 40-50 MPa, zaradi česar pride do konstantnega premikanja mobilne faze. Na delovni tlak pa vplivajo tudi različne značilnosti kolone in pretok, ter mobilne faze (Tramšek, 2016).

Kolona je zelo pomemben del HPLC sistema in je ponavadi izdelana iz inertnega materiala, kot sta steklo in jeklo, ter zatesnjena in napolnjena s stacionarno fazo. V aparaturi se nahajajo injektorji z injicirnimi zankami in tu je nameščen tudi termostat, ki vzdržuje stalno temperaturo sistema in skrbi za ustrezno ponovljivost retenzijskih časov.

Za pridobitev kromatografskih rezultatov je pomemben detektor, ki deluje na principu merjenja spremembe določene fizikalne količine, povzročene zaradi prehajanja komponent skozi merilno bučko pretočnega, in zato postanejo na koloni ločene substance vidne. Poznamo detektorje za merjenje električne prevodnosti, dielektrične konstante, lomnega količnika. Električni signali se prenašajo s pomočjo rekorderja, računalnika ali integratorja na instrument za zapis signala (Tramšek, 2016).



Slika 3: Najenostavnejši HPLC sistem

#### 1.2.1.2 Razdelitev metod HPLC glede na stacionarno fazo

Glede na stacionarno fazo poznamo več vrst HPLC, in sicer na osnovi normalne faze, reverzne faze, ionskih izmenjalcev in molekularnih sit (Štrancar, 1998). Tako imenovana gelska kromatografija je najbolj izvedljiva in razumljiva, ki ločuje molekule glede na molekulski volumen. Pri izbiranju prave kolone in stacionarne faze si pomagamo s poznavanjem faktorjev, ki pomembno vplivajo na ločevanje (separacijo). Da bo kromatografska separacija najbolj učinkovita, je treba poskrbeti za ustrezno razmerje med ločljivostjo posameznih vrhov, kapaciteto kolone in hitrostjo ločevanja. Ločljivost lahko izboljšamo z povečevanjem selektivnosti ali učinkovitosti kolone in tako v krajšem času dosežemo separacijo zmesi komponent na posamezne vrhove (Štrancar, 1998).

Efektivnost kolone je odvisna od načina in uspešnosti polnjenja, velikosti delcev ter pretoka in viskoznosti mobilne faze, enačba za efektivnost je izpeljana iz Gaussove krivulje, torej ustreza le vrhovom podobnim le-tej. Na širjenje vrhov vplivajo različne poti molekul komponente vzorca skozi kolono zaradi nehomogenosti polnjenja ali prevelikih delcev, difuzija vzorca in masnega prenosa med fazami, saj center vrha vzorca vedno zaostaja za mobilno fazo, ki se giblje hitreje. Do širjenja vrha lahko pride tudi v injektorju in povezovalnih kapilarah.

Selektivnost kolone je funkcija termodinamike izmenjevalnega procesa med mobilno in stacionarno fazo ter komponentami vzorca in jo definiramo kot količnik relativnih retenzijskih časov glede na mobilno fazo ali adsorpcijskih/porazdelitvenih koeficientov komponent. Velik  $k$  nam pove, da je afiniteta do stacionarne faze velika, zato bo njen retenzijski čas dolg. Uporabimo lahko tudi retenzijski volumen, ki nadomesti retenzijski čas, tako čas pomnožimo s pretokom. Tudi temperatura in narava komponente vzorca vplivata na selektivnost kolone in ne le lastnosti mobilne ter stacionarne faze (Štrancar, 1998).

Pomembno vlogo pri izbiri kolone predstavlja tudi njena kapaciteta, iz katere razberemo število aktivnih mest. Komponente bodo imele krajši retenzijski čas in posledično slabšo separacijo, če bo kapaciteta majhna in daljši retenzijski čas ter boljšo separacijo, če bo kapaciteta velika (Evans E. & Kasprzyk-Hordern, 2014).



## 2 NAMEN DELA

Namen našega dela je:

1. Določiti in primerjati vsebnost katalpola, avkubina in akteozida v vzorcih ozkolistnega trpotca, nabranega v različnem časovnem obdobju (*Plantago lanceolata*).
2. Primerjati vsebnost katalpola, avkubina in akteozida v pripravkih, ki vsebujejo ozkolistni trpotec (*Plantago lanceolata*).
3. Spremljati vsebnost katalpola, avkubina in akteozida v ekstraktu svežega vzorca ozkolistnega trpotca (*Plantago lanceolata*) po različnih pogojih shranjevanja (-20 °C, 50 °C, svetloba, tema).
4. Določiti ustrezne pogoje shranjevanja pripravkov, ki vsebujejo ozkolistni trpotec.

Za analiziranje vzorcev smo uporabili tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).

### 2.1 Cilji

Pred začetkom raziskovalnega dela smo si postavili naslednje cilje:

- S pomočjo HPLC izdelati umeritvene krivulje standardov ter jih uporabiti za določanje vsebnosti avkubina, katalpola in akteozida v sušenih vzorcih ozkolistnega trpotca in različnih pripravkov.
- Določiti najustreznejši čas nabiranja listov ozkolistnega trpotca.
- Določiti ustrezne pogoje shranjevanja pripravkov, ki vsebujejo ozkolistni trpotec.
- Na osnovi rezultatov pripraviti predlog za nadgraditev naloge:
  - spremljanje hitrosti razgradnje akteozida pri določenih pogojih,
  - protibakterijsko delovanje pripravkov iz listov trpotca.

## 2.2 Hipoteze

Iz teoretičnih osnov in zastavljenih ciljev smo si postavili naslednje hipoteze:

- Vsebnost zdravilnih učinkovin (avkubina, akteozida, katalpola) pri posušeni listih ozkolistnega trpotca bo v jesenskih in zimskih mesecih manjša, kot v poletnih mesecih.
- Vsebnost učinkovin (avkubina, akteozida, katalpola) bo v pripravkih kupljenih v trgovini in lekarni manjša od vsebnosti učinkovin iz domačega trpotčevega čaja, listov trpotcev, nabranih na travniku.
- Najmanjši vpliv na vsebnost učinkovin vzorca iz svežih listov bosta imela tema in mraz, največji vpliv pa visoka temperatura (50 °C).

### 3 MATERIALI

#### 3.1 Kemikalije

Pri delu smo uporabili naslednje kemikalije:

- ortofosforjeva kislina  $H_3PO_4$ ,
- acetonitril  $C_2H_3N$ ,
- metanol  $CH_4O$ ,
- etanol  $C_2H_6O$ ,
- katalpol  $C_{15}H_{22}O_{10}$ ,
- avkubin  $C_{15}H_{22}O_{10}$ ,
- akteozid  $C_{29}H_{36}O_{15}$ ,
- čajne mešanice, ki vsebujejo liste trpotca,
- trpotčevi sirupi,
- listi trpotca.

Standard akteozid je proizvajalca HWI group, Nemčija. Ostale kemikalije so proizvajalca Sigma Aldrich, ZDA. Sirupi so proizvajalcev Krka Slovenija, Dolenjske lekarne Slovenija, Gorenjske lekarne Slovenija in Pharmalife research. Kupljeni čaji so proizvajalcev Iz narave, 1001 cvet, Gorenjske lekarne.

#### 3.2 Raztopine in topila

Za HPLC analizo vzorcev smo pripravili naslednje mobilne faze:

- 1 vol % ortofosforjeva kislina ( $H_3PO_4 : H_2O = 99 : 1$  (V/V)),
- acetonitril,
- etanol : voda ( $C_2H_5OH : H_2O = 50 : 50$  (V/V)).

### 3.3 Laboratorijska oprema

- aparatura za HPLC analizo: črpalka, injektor, DAD detektor (Agilent Technologies, CA, ZDA, serija 1100),
- kolona Hypersil ODS C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 150  $\times$  4,6 mm (Daicel Corporation, Japonska),
- ultratrazvočna kopel Sonis 2 (Iskra Pio, Slovenija),
- mlinček za kavo (Gorenje),
- viala [2 mL] (Agilent Technologies, CA, ZDA),
- filtri 25/0,2  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies, CA, ZDA),
- brizgalka luer (Chirana, Slovaška),
- hladilnik,
- sušilnik,
- tehtnica (KERN),
- tehtalna ladjica,
- čaše,
- pipete [5mL, 10 mL],
- pipetor,
- mikropipeta [100  $\mu\text{L}$ ] (Biohit),
- pipetirni nastavki,
- elenmajerice,
- spatule,
- merilni valj,
- brizgalke
- steklenice za mobilne faze [1 L].

## 4 METODE DELA

### 4.1 Analiza vzorcev in standardov z metodo HPLC

Za identifikacijo akteozida, avkubina in katalpola smo uporabili HPLC sistem (Agilent Technologies, CA, ZDA, serija 1100) z DAD detektorjem.



Slika 4: HPLC sistem (Agilent Technologies, CA, ZDA, serija 1100)

V literaturi (Janković, et al., 2010) smo poiskali optimalne pogoje za identifikacijo komponent v reakcijski zmesi vzorcev.

#### 4.1.1 Kromatografski pogoji

- Kolona Hypersil ODS C18, 5  $\mu$ m; 150  $\times$  4,6 mm
- Mobilna faza:
  - A: 1 vol % ortofosforjeva kislina ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  :  $\text{H}_2\text{O}$  = 99 : 1 (V/V)),
  - B: acetonitril
- gradientna elucija:
  - 0 min: A : B = 98 : 2 (V/V),
  - 0 – 5 min, 98 – 90 % A;
  - 5 – 10 min, 90 % A;
  - 10 – 13 min, 90 – 85 % A;
  - 13 – 20 min, 85 – 75 % A;
  - 20 – 24 min, 75 – 60 % A;
  - 24 – 27 min, 60 – 40 % A;
  - 27 – 31 min, 40 – 0 % A.

- prostornina injiciranega vzorca = 10  $\mu$ L,
- temperatura kolone = 25  $^{\circ}$ C,
- temperatura v avtosemplerju = 10  $^{\circ}$ C,
- pretok = 1 mL/min,
- detekcija pri  $\lambda = 210,4$  nm
- čas analize = 30 min.
- programska oprema: Chemstation, verzija 9.01

#### 4.1.2 Priprava standardov za HPLC analizo

Pripravili smo raztopine treh standardov učinkovin, ki se nahajajo v listih ozkolistnega trpotca. Raztopine smo nato redčili do zelenih koncentracij, ki so nam v nadaljevanju služile za HPLC analizo in izris umeritvenih krivulj za posamezno učinkovino.

##### 4.1.2.1 Priprava standarda avkubina

Za pripravo raztopine smo 3,9 mg standarda avkubina raztopili v 2 mL metanola. Pripravljeno raztopino smo prefiltrirali v 2 mL vialo skozi filter z velikostjo por 0,2  $\mu$ m. Standard smo nato redčili, da smo pridobili različne masne koncentracije standarda. Standard avkubin smo redčili z metanolom (do enega mL) na koncentracije 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL in 1,5 mg/mL. Pri redčenju smo uporabili mikropipeto za odmerjanje raztopine standarda in metanola, ter 2 mL vialo. Tako pripravljene raztopine smo uporabili za HPLC analizo.

##### 4.1.2.2 Priprava standarda akteozida

Za pripravo raztopine smo 3,9 mg standarda akteozida raztopili v 2 mL metanola. Pripravljeno raztopino smo prefiltrirali v 2 mL vialo skozi filter z velikostjo por 0,2  $\mu$ m. Standard smo nato redčili, da smo pridobili različne masne koncentracije standarda. Standard akteozid smo redčili z metanolom (do 1 mL) na koncentracije 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 1,5 mg/mL in 1,95 mg/mL. Pri redčenju smo uporabili mikropipeto za odmerjanje raztopine standarda in metanola, ter 2 mL vialo. Tako pripravljene raztopine smo uporabili za HPLC analizo.

##### 4.1.2.3 Priprava standarda katalpola

Za pripravo raztopine smo 10 mg standarda katalpola raztopili v 2 mL metanola. Pripravljeno raztopino smo prefiltrirali v 2 mL vialo skozi filter z velikostjo por 0,2  $\mu$ m. Standard smo nato redčili tako, da smo pripravili različne masne koncentracije standarda. Standard katalpol smo redčili z metanolom (do 1 mL) na koncentracije 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL. Pri redčenju smo uporabili mikropipeto za odmerjanje raztopine standarda in metanola, ter 2 mL vialo. Tako pripravljene raztopine smo uporabili za HPLC analizo.

### 4.1.3 Določanje retenzijskega časa standardov

Retenzijski čas standardov smo določili iz kromatogramov raztopin standardov, tako da smo za vsako koncentracijo standarda naredili po dva kromatograma. Nato smo iz vseh retenzijskih časov izračunali za vsak posamezni standard povprečni retenzijski čas.

$$t_{r-pov(Av)} = \frac{\sum_{N=1}^N t_{r(Av)}}{N}$$

*Enačba 1: Enačba za izračun povprečnega retenzijskega časa avkubina*

$$t_{r-pov(Ak)} = \frac{\sum_{N=1}^N t_{r(Ak)}}{N}$$

*Enačba 2: Enačba za izračun povprečnega retenzijskega časa akteozida*

$$t_{r-pov(K)} = \frac{\sum_{N=1}^N t_{r(K)}}{N}$$

*Enačba 3: Enačba za izračun povprečnega retenzijskega časa katalpola*

$t_{r-pov(Av)}$  ..... povprečni retenzijski čas avkubin [min]

$t_{r-pov(Ak)}$  ..... povprečni retenzijski čas akteozid [min]

$t_{r-pov(K)}$  ..... povprečni retenzijski čas katalpol [min]

N ..... število vzorcev

$t_{r(Av)}$  ..... retenzijski čas avkubin [min]

$t_{r(Ak)}$  ..... retenzijski čas akteozid [min]

$t_{r(K)}$  ..... retenzijski čas katalpol [min]

### 4.1.4 Določanje umeritvene krivulje

Umeritvene krivulje za posamezni standard smo določili tako, da smo izvedli dve ponovitvi HPLC analize pripravljenih raztopin standardov. S pomočjo programske opreme smo odčitali površine pod piki pri retenzijskem času, značilnem za posamezno učinkovino. Nato smo izračunali iz vseh površin za vsak posamezni standard povprečne površine in izrisali umeritvene krivulje odvisnosti površine od koncentracije.

$$area - povp(S) = \frac{(area\ x) + (area\ x + 1) + (area\ x + 2) \dots}{N}$$

*Enačba 4: Enačba za izračun povprečne površine standarda*

$area - povp$  ..... povprečna površina standarda

$area$  ..... površina standarda

N ..... število vzorcev

#### 4.1.5 Priprava vzorcev za HPLC analizo

Vzorci so bili pripravljene iz posušenih, mletih listov ozkolistnega trpotca, ozkolistnih trpotčevih sirupov, posušenih in mletih mešanic ozkolistnih trpotčevih čajev in svežih mletih listov ozkolistnega trpotca.



*Slika 5: Mletje domačih vzorcev*

Za pripravo vzorca smo odtehtali 0,5 g mlete droge in jo zmešali s 5 mL topila etanol : voda ( $C_2H_5OH$  :  $H_2O$ ) 50 : 50 vol %. Pri pripravi raztopin iz sirupov smo uporabili 10 mL sirupa, saj 10 mL sirupa vsebuje ekstrakt trpotca, ki je enak 0,5 g mlete posušene droge listov trpotca. Tudi vzorce iz sirupov smo zmešali s 5 mL topila etanol : voda ( $C_2H_5OH$  :  $H_2O$ ) 50 : 50 vol %. Nato je sledila ekstrakcija vzorcev v ultrazvočni kopeli za 30 minut.





Slika 6: Ultrazvočna kopel

Po končani ekstrakciji smo raztopine prefiltrirali skozi filter z velikostjo por  $0,2 \mu\text{m}$  v 2 mL viale, ki smo jih ustrezno označili (Tabele 4, 7, 10 in 13). Dobljene raztopine smo uporabili za HPLC analizo.



Slika 7: Filtriranje vzorcev skozi filter z velikostjo por  $0,2 \mu\text{m}$  v 2 mL viale.

#### 4.1.6 Pridobivanje, označevanje in analiziranje vzorcev domačih čajev

Vsi domači čaji so bili nabrani na travniku v vasi Češnjevke in nato sušeni do konstantne mase na  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  v polmračnem prostoru in shranjeni v papirnatih vrečkah, ter označeni. Nabiranje listov ozkolistnega trpotca je potekalo od julija do februarja. Vzorce smo označili s črkami DV, kar pomeni domači vzorec in nato sledi zaporedna številka od 01 do 06. Vsak vzorec se je s HPLC metodo analiziral dvakrat. V dobljenih kromatogramih smo s pomočjo izračunanega povprečnega retenzijskega časa za določene standarde identificirali pike iskanih učinkovin in razbrali površino. Nato smo iz dveh površin za vsak vzorec izračunali povprečno površino in tako s pomočjo umeritvene krivulje za posamezni standard izračunali koncentracijo učinkovine v vzorcu.



Slika 8: Posušeni listi ozkolistnega trpotca

#### 4.1.7 Priprava in analiza vzorcev kupljenih čajev

Čaje smo kupili 19. 2. 2019 in jih še tisti dan analizirali z metodo HPLC. Vzorce smo označili s črko C, kar pomeni čaj in nato sledi zaporedna številka od 01 do 04. Čaje 01, 03 in 04 smo kupili v lekarni in zato številki sledi oznaka L. Ti čaji so namenjeni zdravljenju prehladov in so na voljo brez receptov. Čaj 02 je bil kupljen v trgovini, zato številki sledi oznaka T. Čaj je namenjen vsakodnevnomu uživanju. Vsak vzorec smo dvakrat injicirali. V dobljenih kromatogramih smo s pomočjo izračunanega povprečnega retenzijskega časa za določene standarde identificirali pike iskanih učinkovin in razbrali površino. Nato smo iz dveh površin za vsak vzorec izračunali povprečno površino in s pomočjo umeritvenih krivulj za posamezne standarde izračunali koncentracijo posamezne učinkovine v vzorcu.



Slika 9: Embalaže kupljenih čajev, uporabljenih za HPLC analizo

#### 4.1.8 Priprava in analiza vzorcev sirupov

Sirupe smo kupili 19. 2. 2019 in jih še isti dan analizirali. Vzorce smo označili s črkama SI, kar pomeni sirup in nato sledi zaporedna številka od 01 do 04. Vsi sirupi so bili kupljeni v lekarni in SI01 je namenjen otrokom za izkašljevanje, SI02 je namenjen odraslim in otrokom, SI03 je prehransko dopolnilo v obliki sirupa in je namenjeno otrokom, SI04 je namenjen otrokom in odraslim ta blažitev kašlja. Vsi sirupi so na voljo brez receptov.



Slika 10: embalaže sirupov uporabljenih za HPLC analizo

Vsak vzorec se je s HPLC metodo analiziral dvakrat. V dobljenih kromatogramih smo s pomočjo izračunanega povprečnega retenzijskega časa za določene standarde identificirali pike iskanih učinkovin in razbrali površino. Nato smo iz dveh površin za vsak vzorec izračunali povprečno površino in tako s pomočjo umeritvenih krivulj za posamične standarde izračunali koncentracijo posamezne učinkovine v vzorcu.

#### 4.1.9 Pridobivanje, označevanje in analiziranje domačih svežih vzorcev

Svežo zel smo nabrali 19. 2. 2019 zjutraj in smo jo še isti dan analizirali. Vsi sveži vzorci so bili nabrani na travniku v vasi Češnjevek. Tudi pri pripravi teh vzorcev smo odtehtali 0,5 g mlete droge in jo zmešali s 5 mL topila etanol : voda ( $C_2H_5OH$  :  $H_2O$ ) 50 : 50 vol %. Pri tehtanju nismo upoštevali delež vlage v listih. Vzorce smo označili s črkami DV, kar pomeni domači vzorec in nato sledi zaporedna številka od 01 do 02. Nato sledi oznaka SV, kar pomeni svež in nam pove, da vzorec ni bil sušen. Vzorca smo nato prefiltrirali v vialo in jih ustrezno označili.



Slika 11: sveže nabrani lisi ozkolistnega trpotca

Vsak vzorec se je s HPLC metodo analiziral enkrat. V dobljenih kromatogramih smo s pomočjo izračunanega povprečnega retenzijskega časa za določene standarde identificirali pike iskanih učinkovin in razbrali površino. Nato smo iz površine za vsak vzorec s pomočjo linearnih premic grafov za posamične standarde izračunali koncentracijo posamezne učinkovine v vzorcu.

#### **4.1.10 Proučevanje vpliva pogojev na vsebnost učinkovin v izvlečku iz svežih listov trpotca**

Po eno vialo vsakega svežega vzorca (smo takoj analizirali, druge pa smo izpostavili različnim okoljem (toplota (50 °C), izpostavljenost mrazu (-20 °C), izpostavljenost dnevni svetlobi, izpostavljenost popolni temi) in analizirali morebitne spremembe v koncentracijah testiranih učinkovin. Analize smo opravili po 8 urah in po 1 tednu.

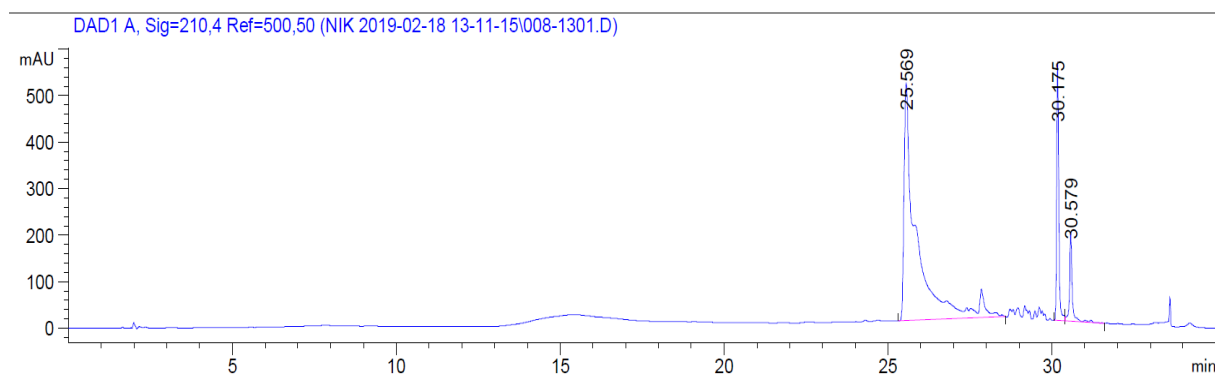
#### **4.1.11 HPLC analiza vzorcev**

Vse vzorce, ki smo jih predhodno pripravili za HPLC analizo, smo analizirali pri enakih kromatografskih pogojih kot standarde. Naredili smo po dve HPLC analizi istega vzorca in izračunali povprečno površino pod pikom, značilnim za posamezno učinkovino. S pomočjo umeritvenih krivulj smo določili vsebnost avkubina, akteozida in katalpola.

Posneli smo tudi kromatograme topil, ki smo jih uporabili pri pripravi raztopin standardov in vzorcev.

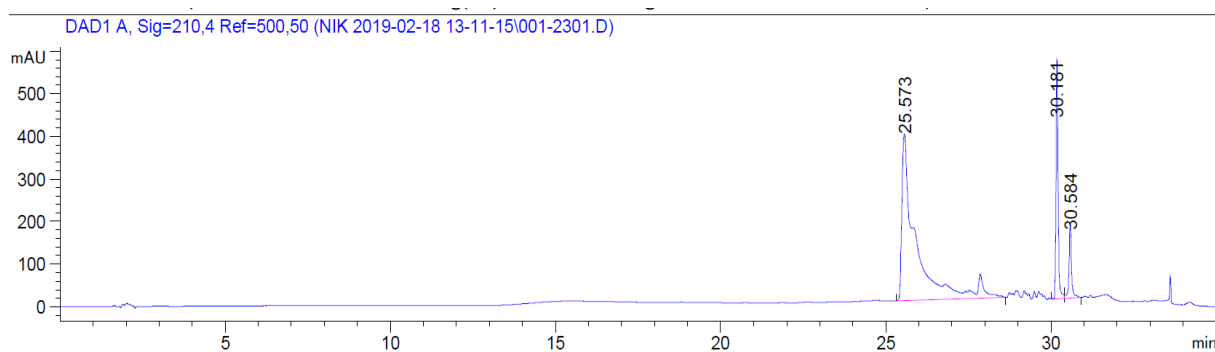
## 5 REZULTATI

### 5.1 Kromatogram topila etanol : voda = 50 : 50 vol %



Slika 12: HPLC kromatogram topila etanol : voda 50 : 50 vol %

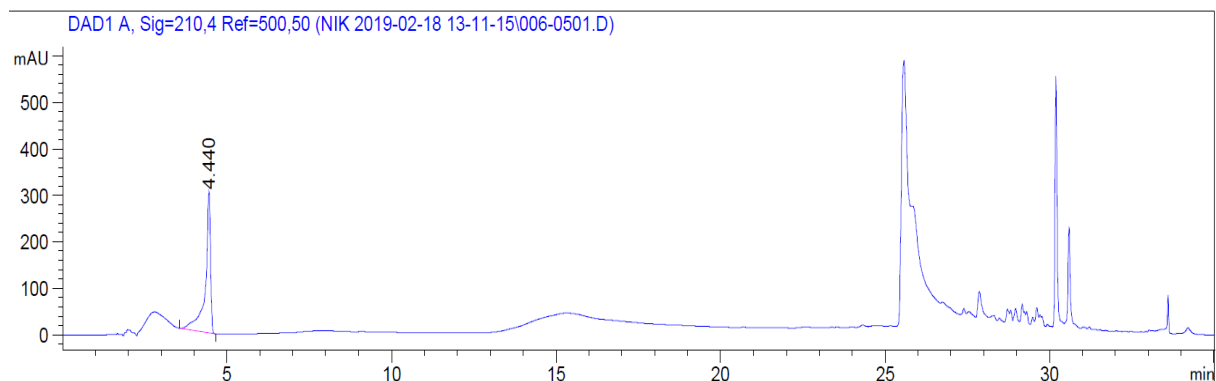
### 5.2 Kromatogram topila metanol



Slika 13: HPLC kromatogram topila metanol

### 5.3 Avkubin – umeritvena krivulja

Na sliki (Slika 14) je prikazan značilen kromatogram standarda avkubina.



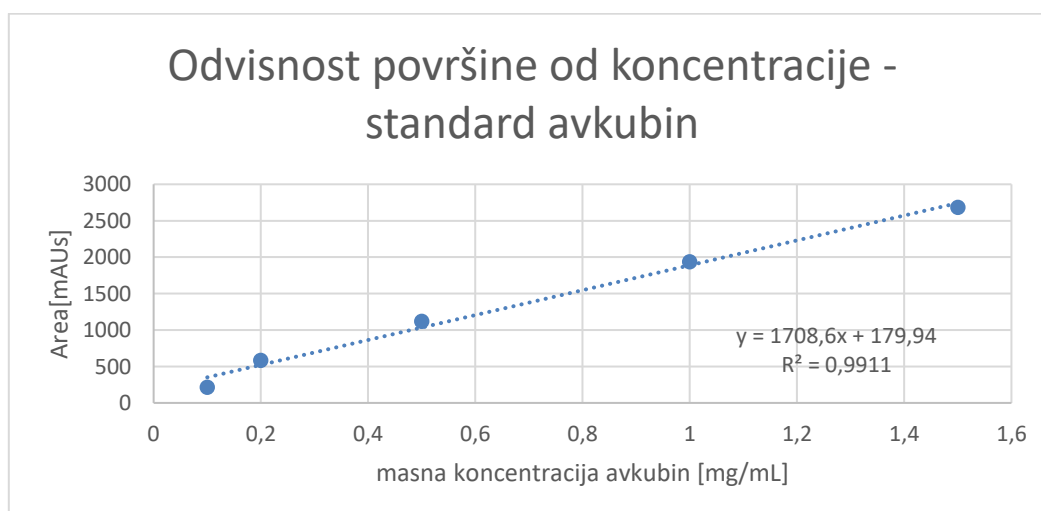
Slika 14: HPLC kromatogram standarda avkubina

Iz vseh meritev (Tabela 1) smo izračunali povprečen retenzijski čas, ki je znašal 4,475 min. Izrisali smo graf odvisnosti površine od koncentracije (Graf 1) in ugotovili linearno odvisnost, kar nam omogoča določanje koncentracije avkubina v realnih vzorcih.

Tabela 1: Rezultati HPLC analize standarda avkubina pri različnih koncentracijah: prikazane so površine in retenzijski časi.

Oznaka	Konc. (mg/mL)	Area-povp [mAU]	tr1 [min]	Area1 [mAU]	tr2 [min]	Area2 [mAU]
S1-A	0,10	213,9265	4,449	214,096	4,514	213,757
S2-A	0,20	584,856	4,446	539,154	4,551	630,558
S3-A	0,50	1119,65	4,444	1114,93	4,458	1124,37
S4-A	1,0	1936,55	4,494	1936,55	4,494	1936,55
S5-A	1,5	2682,98	4,450	2682,98	4,450	2682,98

$A = 1708,6 \cdot \text{konc}(\text{avkubin}) + 179,94$  ... enačba umeritvene premice



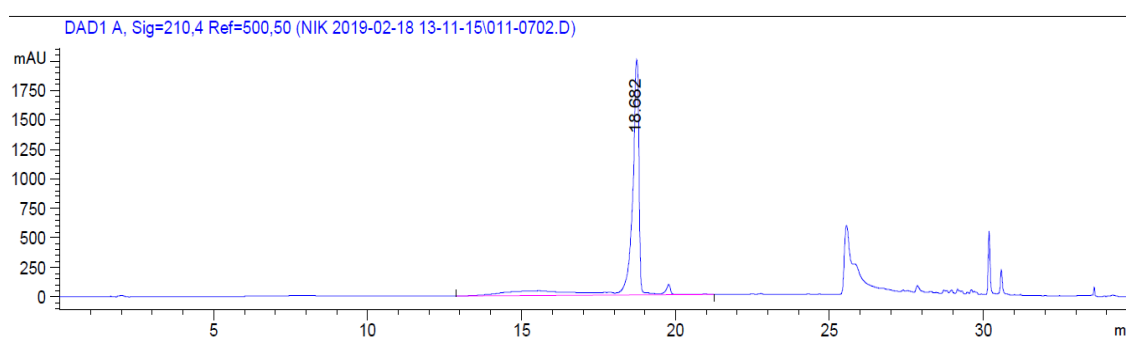
Graf 1: Umeritvena krivulja za določanje avkubina v vzorcih

## 5.4 Akteozid – umeritvena krivulja

Tabela 2: Rezultati analize standarda akteozida pri različnih koncentracijah: prikazane so površine in retenzijski časi.

Oznaka	Konc. (mg/mL)	Area-povp [mAU]	tr1 [min]	Area1 [mAU]	tr2 [min]	Area2 [mAU]
S1-B	0,1	1299,382	18,786	1287,584	18,802	1311,18
S2-B	0,2	3252,69	18,801	3245,52	18,793	3259,86
S3-B	0,5	9331,93	18,795	9232,39	18,778	9431,47
S4-B	1	13389,7	18,79	13517,3	18,774	13262,1
S5-B	1,5	22093,9	18,77	22027,4	18,774	22160,4
S0-B	1,95	26809,05	18,757	27184,7	18,743	26433,4

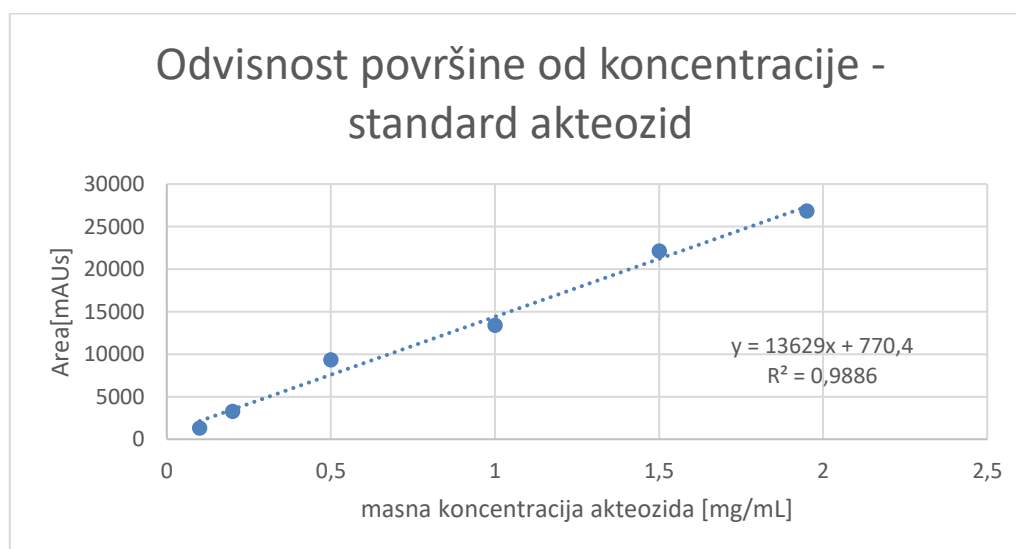
Na sliki (Slika 15) je prikazan značilen kromatogram standarda akteozida.



Slika 15: HPLC kromatogram standarda akteozida

Iz vseh meritev (Tabela 2) smo izračunali povprečni retenzijski čas, ki je znašal 18,786 min. Izrisali smo graf odvisnosti površine od koncentracije (Graf 2) in ugotovili linearno odvisnost, kar nam omogoča določanje koncentracije akteozida v realnih vzorcih.

$A = 1708,6 \cdot \text{konc}(\text{akteozid}) + 179,94$  .... enačba umeritvene premice



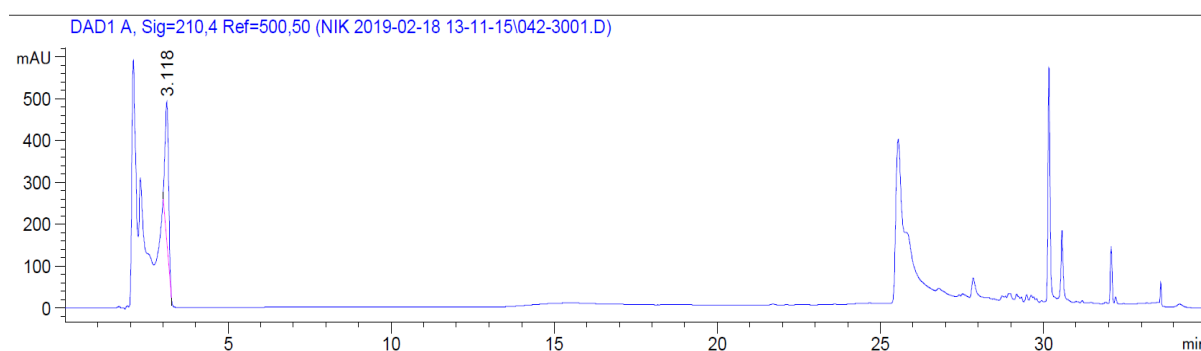
Graf 2: Umeritvena krivulja za določanje akteozida v vzorcih

## 5.5 Rezultati identifikacije standarda katalpola

Tabela 3: Rezultati analize standarda katalpola pri različnih koncentracijah: prikazane so površine in retenzijski časi.

Oznaka	Konc. (mg/mL)	Area-povp [mAU]	tr1 [min]	Area1 [mAU]	tr2 [min]	Area2 [mAU]
S1-C	1	1571,97	2,88	1535,52	2,795	1608,42
S2-C	2	3102,12	2,81	3102,68	3,039	3101,56
S3-C	3	4765,645	2,809	4764,47	2,814	4766,82
S4-C	4	5890,265	2,774	5998,5	2,787	5782,03
S0-C	5	7279,031	2,971	7227,48	3,119	7330,582

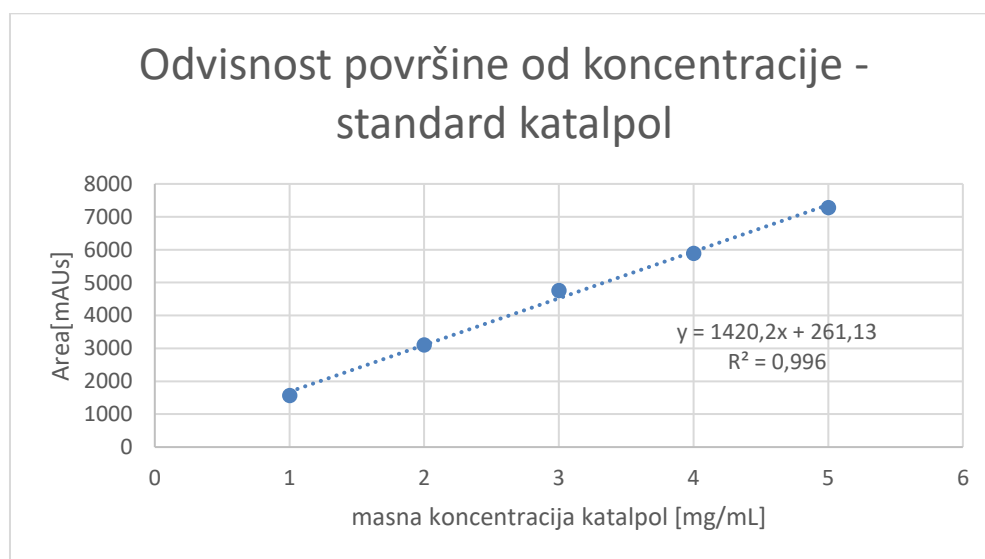
Na sliki (Slika 16) je prikazan značilen kromatogram standarda katalpola.



Slika 16: HPLC kromatogram standarda katalpola

Iz vseh meritev (Tabela 3) smo izračunali povprečni retenzijski čas, ki je znašal 2,878 min. Izrisali smo graf odvisnosti površine od koncentracije (Graf 3) in ugotovili linearno odvisnost, kar nam omogoča določanje koncentracije katalpola v realnih vzorcih.

$A = 1708,6 \cdot \text{konc}(\text{katalpol}) + 179,94$  ... enačba umeritvene premice



Graf 3: Umeritvena krivulja za določanje katalpola v vzorcih



## 5.6 Rezultati identifikacije domačih čajev

Tabela 4: Rezultati HPLC analize domačih vzorcev: prikazani so datumi nabiranja vzorcev in površine, ter koncentracije avkubina v vzorcih.

Oznaka	Datum nabiranja	Area1 Avkubin [mAU]	Area2 Avkubin [mAU]	Area-povp Avkubin [mAU]	Konc. Avkubin (mg/mL)
DV01	10. 1. 2019	2340,93	2430,62	2385,775	<b>1,291019</b>
DV02	13. 1. 2019	3064,01	1906,50	2485,255	<b>1,349242</b>
DV03	13. 8. 2018	2899,13	2906,58	2902,855	<b>1,593653</b>
DV04	19. 9. 2018	2348,04	2353,96	2351,000	<b>1,270666</b>
DV05	26. 7. 2018	3987,81	2502,59	3245,200	<b>1,794018</b>
DV06	21. 8. 2018	2466,61	2398,30	2432,455	<b>1,318340</b>

Ugotovili smo, da se pri vzorcih koncentracija avkubina giblje med 1,27 mg/mL in 1,79 mg/mL. Vzorci, nabrani v januarju, so imeli primerljivo koncentracijo z vzorci nabranimi v poletnih mesecih.

Tabela 5: Rezultati HPLC analize domačih vzorcev: prikazani so datumi nabiranja vzorcev in površine, ter koncentracije akteozida v vzorcih.

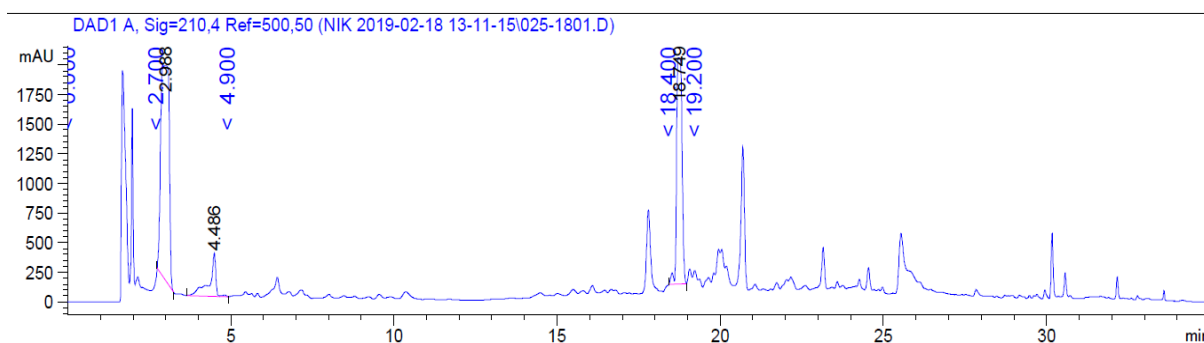
Oznaka	Datum nabiranja	Area1 Akteozid [mAU]	Area2 Akteozid [mAU]	Area-povp Akteozid [mAU]	Konc. Akteozid (mg/mL)
DV01	10. 1. 2019	21909,8	21973,1	21941,45	<b>1,575589</b>
DV02	13. 1. 2019	12566,9	23228,5	17897,70	<b>1,272800</b>
DV03	13. 8. 2018	21721,2	21781,4	21751,30	<b>1,561351</b>
DV04	19. 9. 2018	1850,96	1843,69	1847,325	<b>0,070975</b>
DV05	26. 7. 2018	6511,39	6547,69	6529,540	<b>0,421571</b>
DV06	21. 8. 2018	6557,33	6541,40	6549,365	<b>0,423055</b>

Ugotovili smo, da se pri vzorcih koncentracija akteozida giblje med 0,07 mg/mL in 1,58 mg/mL. Opazili smo tudi nenavadno velike razlike v koncentracijah akteozida pri nekaterih vzorcih. Nepričakovano je predvsem izstopanje koncentracije akteozida v vzorcu nabranem 13. 8. 2018. Analiza je pokazala, da je koncentracija akteozida v zimskih mesecih višja kot v poletnih mesecih.

Tabela 6: Rezultati HPLC analize domačih vzorcev: prikazani so datumi nabiranja vzorcev in površine, ter koncentracije katalpola v vzorcih.

Oznaka	Datum nabiranja	Area1 Katalpol [mAU]	Area2 Katalpol [mAU]	Area-povp Katalpol [mAU]	Konc. Katalpol (mg/mL)
DV01	10. 1. 2019	13053,8	13555,5	13304,65	<b>9,184284</b>
DV02	13. 1. 2019	11740,9	12986,1	12363,50	<b>8,521596</b>
DV03	13. 8. 2018	36115,7	35757,8	35936,75	<b>25,12014</b>
DV04	19. 9. 2018	21633,4	35437,4	28535,40	<b>19,90865</b>
DV05	26. 7. 2018	32783,7	34533,4	33658,55	<b>23,51600</b>
DV06	21. 8. 2018	34117,1	34438,1	34277,60	<b>23,95189</b>

Ugotovili smo, da se pri vzorcih koncentracija katalpola giblje med 8,52 mg/mL in 25,12 mg/mL. Zopet so bile zaznavne večje razlike v koncentracijah katalpola med vzorci, kjer sta vidno izstopala vzorca, ki sta bila nabrana v januarju in sta imela več kot dvakrat nižjo koncentracijo katalpola kot vzorci nabrani v poletnih mesecih.



Slika 17: HPLC kromatogram vzorca domačega čaja, na katerem so označene učinkovine katalpol, avkubin, akteozid.

## 5.7 Rezultati identifikacije kupljenih čajev

Tabela 7: Rezultati HPLC analize domačih vzorcev: prikazane so površine, ter koncentracije avkubina v vzorcih.

Oznaka	Area1 Avkubin [mAU]	Area2 Avkubin [mAU]	Area-povp Avkubin [mAU]	Konc. Avkubin (mg/mL)
C01L	1060,57	1096,43	1078,50	<b>0,525904</b>
C02T	294,880	483,770	389,325	<b>0,122548</b>
C03L	482,990	498,180	490,585	<b>0,181813</b>
C04L	1929,39	2065,29	1997,34	<b>1,063678</b>

Koncentracija avkubina v analiziranih čajih se gibljejo med 0,12 mg/mL do 1,06 mg/mL. Opazna so večja odstopanja in razlike v koncentracijah avkubina med različnimi čaji.

Tabela 8: Rezultati HPLC analize domačih vzorcev: prikazane so površine, ter koncentracije akteozida v vzorcih.

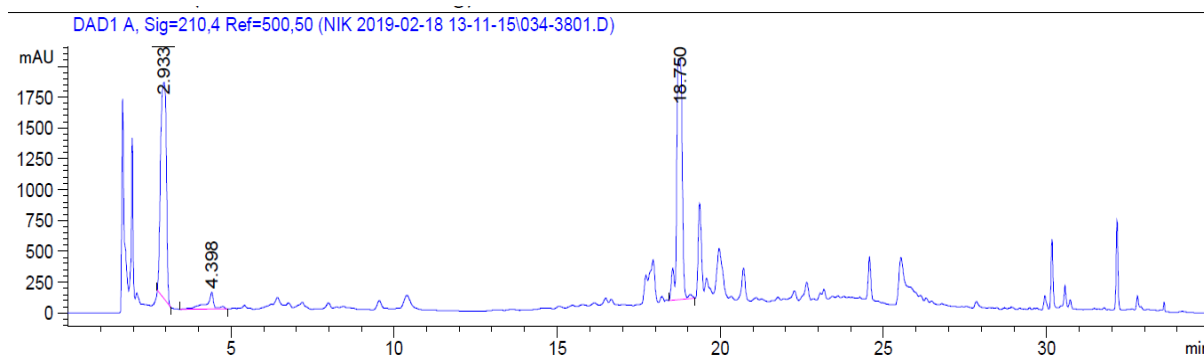
Oznaka	Area1 Akteozid [mAU]	Area2 Akteozid [mAU]	Area-povp Akteozid [mAU]	Konc. Akteozid (mg/mL)
C01L	20952,7	20898,9	20925,80	<b>1,499539</b>
C02T	7648,30	7640,99	7644,645	<b>0,505068</b>
C03L	11546,4	11558,3	11552,35	<b>0,797671</b>
C04L	21345,5	21373,7	21359,60	<b>1,532021</b>

Koncentracija akteozida v analiziranih čajih se gibljejo med 0,50 mg/mL in 1,53 mg/mL. Opazno je večje odstopanje pri čajih C02T in C03L, katerih koncentracija je več kot dvakrat manjša kot pri čajih C01L in C04L.

Tabela 9: Rezultati HPLC analize domačih vzorcev: prikazane so površine, ter koncentracije katalpola v vzorcih.

Oznaka	Area1 Katalpol [mAU]	Area2 Katalpol [mAU]	Area-povp Katalpol [mAU]	Konc. Katalpol (mg/mL)
C01L	26317,4	25502,4	25909,90	<b>18,05997</b>
C02T	11673,5	11675,8	11674,65	<b>8,036558</b>
C03L	22100,5	21955,7	22028,10	<b>15,32669</b>
C04L	23436,2	23743,0	23589,60	<b>16,42619</b>

Koncentracija katalpola v analiziranih čajih se gibljejo med 8,04 mg/mL in 18,06 mg/mL. Opazno je večje odstopanje pri čaju C02T. Koncentracije katalpola so pri čajih C01L, C03L in C04L primerljive.



Slika 18: HPLC kromatogram vzorca kupljenega čaja na katerem so označene učinkovine katalpol, avkubin, akteozid.

## 5.8 Rezultati identifikacije sirupov

Tabela 10: Rezultati HPLC analize sirupov: prikazane so površine, ter koncentracije avkubina v vzorcih.

Oznaka	Area1 Avkubin [mAU]	Area2 Avkubin [mAU]	Area-povp Avkubin [mAU]	Konc. Avkubin (mg/mL)
SI01	686,03	659,24	672,635	<b>0,288362</b>
SI02	894,39	956,49	925,440	<b>0,436322</b>
SI03	0	0	0	/
SI04	1248,51	1270,91	1259,71	<b>0,631962</b>

Koncentracije avkubina se v sirupih razlikujejo. Gibljejo se med 0 mg/mL in 0,63 mg/mL. Iz rezultatov smo ugotovili, da se avkubin v vzorcu SI03 sploh ne nahaja, zasledili pa smo tudi trend naraščanja avkubina s razliko v namenu uporabe sirupa. Vzorec SI04 namenjen otrokom in odraslim za blaženje kašlja je na primer vseboval več kot dvakrat več avkubina, kot vzorec SI01 namenjen otrokom za izkašljevanje.

Tabela 11: Rezultati HPLC analize sirupov: prikazane so površine, ter koncentracije akteozida v vzorcih.

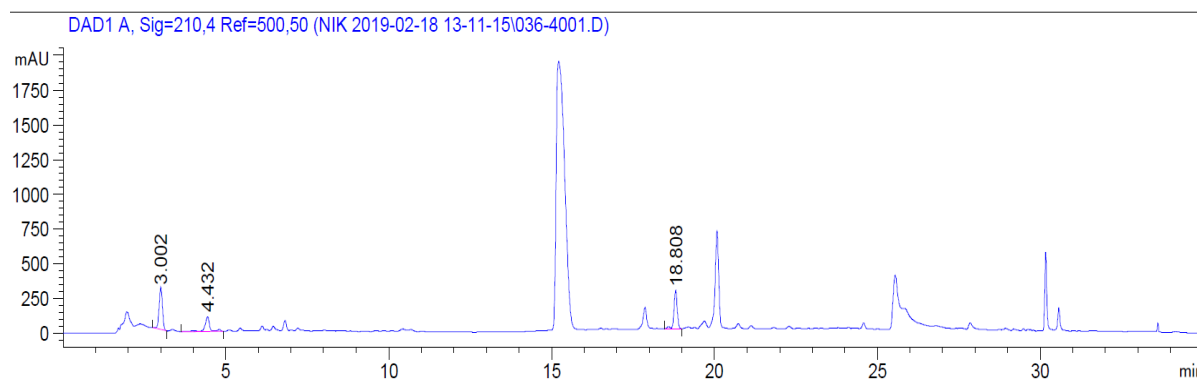
Oznaka	Area1 Akteozid [mAU]	Area2 Akteozid [mAU]	Area-povp Akteozid [mAU]	Konc. Akteozid (mg/mL)
SI01	2240,54	2236,82	2238,68	<b>0,100279</b>
SI02	1844,05	1842,19	1843,12	<b>0,07066</b>
SI03	181,74	181,36	181,55	<b>-0,05376</b>
SI04	4226,05	4216,67	4221,36	<b>0,248738</b>

Koncentracija akteozida se v sirupih razlikujejo. Gibljejo se med 0 mg/mL in 0,25 mg/mL.

Tabela 12: Rezultati HPLC analize sirupov: prikazane so površine, ter koncentracije katalpola v vzorcih.

Oznaka	Area1 Katalpol [mAUs]	Area2 Katalpol [mAUs]	Area-povp Katalpol [mAUs]	Konc. Katalpol (mg/mL)
SI01	9609,69	9718,09	9663,89	<b>6,620729</b>
SI02	2407,57	2326,18	2366,875	<b>1,48271</b>
SI03	324,04	324,3	324,17	<b>0,044388</b>
SI04	10570,7	10042,2	10306,45	<b>7,073173</b>

Koncentracija katalpola se v sirupih razlikujejo. Gibljejo se med 0,04 mg/mL in 7,07 mg/mL. Najbolj izstopajoč vzorec je SI03, katerega koncentracija je več kot 167-krat manjša od koncentracije vzorca SI04. Iz pridobljenih podatkov smo razbrali, da vzorec sirupa SI04, vsebuje najvišje koncentracije vseh iskanih učinkovin. Najbolj je primerljiv z vzorcem SI01.



Slika 19: HPLC kromatogram vzorca sirupa na katerem so označene učinkovine katalpol, avkubin, akteozid.

## 5.9 Rezultati identifikacije svežih vzorcev

Tabela 13: Rezultati HPLC analize svežega vzorca št. 01, izpostavljenega različnim pogojem ob času 0 h, 8 h in 1 teden: podane so površine in koncentracije učinkovin.(površine in koncentracije avkubina po osmih urah smo izločili zaradi nenavadnosti rezultatov)

Oznaka	Area1 Avkubin [mAU]	Konc. Avkubin (mg/mL)	Area1 Akteozid [mAU]	Konc. Akteozid (mg/mL)	Area1 Katalpol [mAU]	Konc. Katalpol (mg/mL)
DV01 SV	433,03	<b>0,148127</b>	5712,78	<b>0,360413</b>	1655,94	<b>0,982122</b>
DV01 SV - 8h (50°C)			5243,35	<b>0,325263</b>	1751,43	<b>1,049359</b>
DV01 SV - 8 h (-20°C)			5480,31	<b>0,343006</b>	1638,18	<b>0,969617</b>
DV01 SV - 8 h (svetloba)			5517,90	<b>0,345821</b>	1693,04	<b>1,008245</b>
DV01 SV - 8 h (tema)			5481,99	<b>0,343132</b>	1648,63	<b>0,976975</b>
DV01 SV - 1 teden (50°C)	301,34	<b>0,071052</b>	2704,12	<b>0,135130</b>	2998,89	<b>1,927728</b>
DV01 SV - 1 teden (-20°C)	306,95	<b>0,074336</b>	5500,03	<b>0,344483</b>	1616,33	<b>0,954232</b>
DV01 SV - 1 teden (svetloba)	298,69	<b>0,069505</b>	5206,59	<b>0,322511</b>	1683,20	<b>1,001317</b>
DV01 SV - 1 teden (tema)	450,97	<b>0,158627</b>	5409,78	<b>0,337725</b>	1654,15	<b>0,980862</b>

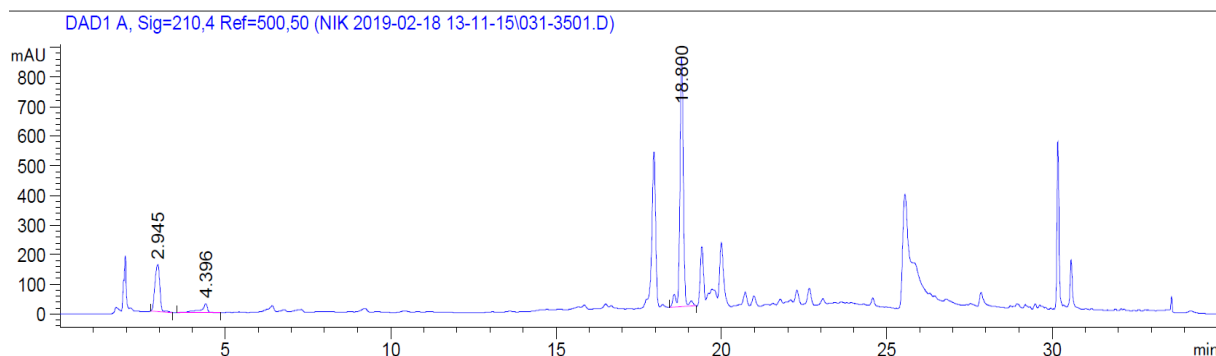
Tabela 14: Rezultati HPLC analize svežega vzorca št. 02, izpostavljenega različnim pogojem ob času 0 h, 8 h in 1 teden: podane so površine in koncentracije učinkovin.(površine in koncentracije avkubina po osmih urah smo izločili zaradi nenavadnosti rezultatov)

Oznaka	Area1 Avkubin [mAU]	Konc. Avkubin (mg/mL)	Area1 Akteozid [mAU]	Konc. Akteozid (mg/mL)	Area1 Katalpol [mAU]	Konc. Katalpol (mg/mL)
DV02 SV	477,92	<b>0,174400</b>	5074,97	<b>0,312655</b>	1559,54	<b>0,914244</b>
DV02 SV - 8h (50°C)			4098,98	<b>0,239575</b>	1563,89	<b>0,917307</b>
DV02 SV - 8 h (-20°C)			4492,01	<b>0,269004</b>	1525,59	<b>0,890339</b>
DV02 SV - 8 h (svetloba)			4429,17	<b>0,264299</b>	1553,57	<b>0,910041</b>
DV02 SV - 8 h (tema)			4577,78	<b>0,275426</b>	1523,64	<b>0,888966</b>
DV02 SV - 1 teden (50°C)	303,62	<b>0,072387</b>	1482,18	<b>0,043633</b>	1707,76	<b>1,018610</b>
DV02 SV - 1 teden (-20°C)	327,85	<b>0,086568</b>	4491,89	<b>0,268995</b>	1510,39	<b>0,879637</b>
DV02 SV - 1 teden (svetloba)	327,91	<b>0,086603</b>	4110,13	<b>0,240410</b>	1545,39	<b>0,904281</b>
DV02 SV - 1 teden (tema)	334,85	<b>0,090665</b>	4524,49	<b>0,271436</b>	1534,66	<b>0,896726</b>

Koncentracije vseh zdravilnih učinkovin pri analizi svežih vzorcev so manjše kot koncentracije pri analizi vzorcev iz posušenih listov, saj nismo upoštevali deleža vlage v listih. Rezultati so pokazali, da na koncentracijo avkubina močno vpliva izpostavljenost vzorca svetlobi, toploti in mrazu, saj se je pri vseh spremembah pogojev koncentracija zmanjšala za več kot dvakrat. Najbolj se je koncentracija zmanjšala pri izpostavljenosti toploti in svetlobi. Najmanjšo spremembo smo zabeležili pri vzorcema, ki sta bila izpostavljena temi.

Ugotovili smo, da na koncentracijo akteozida vpliva toplota, saj se je pri 50 °C koncentracija analizirane učinkovine zmanjšala že po osmih urah, še bolj pa se je razlika koncentracij pokazala po enem tednu, ko je bila pri obeh vzorcih več kot dvakrat manjša kot pri svežih vzorcih, ki nista bila izpostavljena spremembi zunanjih pogojev. Upadanje koncentracije je bilo zaznano tudi pri izpostavljenosti svežih vzorcev dnevni svetlobi in tu je po enem tednu koncentracija upadla za 0,0379 mg/mL pri vzorcu DV01 SV in za 0,0722 mg/mL pri vzorcu DV02 SV. Pri vzorcih, ki sta bila testirana v temnem prostoru smo zabeležili manjši vpad koncentracije akteozida. Najmanjši pa je bil vpliv nizke temperature na spremembo koncentracije učinkovine, saj se ta v enem tednu skoraj ni spremenila.

Tudi koncentracija katalpola se je ob spreminjanju pogojev hranjenja spreminjala. Ob izpostavljenosti toploti se je koncentracija katalpola povečala že po osmih urah, po enem tednu pa se je razlika v koncentracijah še bolj stopnjevala. Vzorca, ki sta bila hranjena pri -20 °C, sta pri analizi pokazala na vpad koncentracije učinkovine, pri vzorcih, ki so bili izpostavljeni dnevni svetlobi in temi pa so se koncentracije le malo spreminjale (trend upadanja koncentracij).



Slika 20: HPLC kromatogram svežega vzorca na katerem so označene učinkovine katalpol, avkubin in akteozid.

## 6 RAZPRAVA

Cilj naše raziskovalne naloge je bil analizirati različne trpotčeve pripravke od domačih in kupljenih čajev do različnih trpotčevih sirupov ter svežih listov in primerjati rezultate glede na spreminjanje koncentracij analiziranih zdravilnih učinkovin avkubina, akteozida in katalpola.

Vzorci smo analizirali s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) pri podobnih pogojih, ki smo jih razbrali iz literature. Pri določanju snovi smo si pomagali s standardi avkubina, akteozida in katalpola.

Analizirali smo vzorce domačih čajev, ki so bili nabrani v različnih letnih časih in rezultati so pokazali, da se v ozkolistnem trpotcu nahaja največ katalpola, ki koncentracije avkubina in akteozida preseže za več kot sedemkrat. Deleži avkubina in akteozida so si primerljivi. Opazili smo tudi razlike v koncentracijah pri avkubinu, kjer so imeli vzorci, nabrani v poletnih in zimskih mesecih, primerljive koncentracije, izstopala sta le dva vzorca, nabrana 13. avgusta in 26. julija, ki sta imela nekoliko višjo koncentracijo. Razlike so se pokazale tudi pri koncentracijah akteozida, kjer pa je bila koncentracija vzorcev, nabranih v zimskem času, za več kot dvakrat večja, kot koncentracija vzorcev, nabranih v poletnem času. Pri tej meritvi sta izstopala vzorec nabran 13. avgusta, ki je imel koncentracijo akteozida primerljivo koncentracijama vzorcev nabranih v zimskih mesecih in vzorec nabran 19. septembra, katerega koncentracija je bila šestkrat manjša. Pri analizi rezultatov pa smo ugotovili, da se je koncentracija učinkovine katalpola v zimskih mesecih zmanjšala za več kot polovico v primerjavi s poletnimi meseci. Koncentracije avkubina in akteozida se niso spremenile prek letnih časov, kot smo pričakovali, koncentracije katalpola pa so se skozi čas spremenile v skladu z našimi predvidevanji, zato lahko le **delno potrdimo svojo prvo hipotezo**.

S pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) smo preverili vsebnost učinkovin tudi kupljenim čajem in sirupom. Ugotovili smo, da se koncentracije učinkovin pri posameznih čajih zelo razlikujejo. Najmanj učinkovin je analiza pokazala pri čaju, kupljenem v trgovini, ampak tudi čaj št. 03, ki je bil kupljen v lekarni, ni vseboval veliko zdravilnih učinkovin, tako da sta ta dva čaja vsebovala več kot dvakrat manj analiziranih učinkovin kot čaja št. 01 in 04, čaj št. 03 je bil z ostalima primerljiv le v količini katalpola.

Iz kromatogramov HPLC analiz različnih trpotčevih sirupov smo ugotovili, da sirup št. 03, ki je prehransko dopolnilo za otroke s trpotcem sploh ne vsebuje avkubina, in da so koncentracije akteozida in katalpola v njem več kot tridesetkrat manjše od koncentracij preostalih sirupov. Sirup št. 04 vsebuje največje koncentracije vseh učinkovin, akteozida kar več kot dvakrat toliko kot ostali sirupi. Najbolj mu je po vsebnosti učinkovin primerljiv sirup št. 01, ki pa vsebuje majhno koncentracijo avkubina. Vzorec sirupa št. 02 vsebuje petkrat manj akteozida in katalpola, v primerjavi s sirupom št. 04, vendar pa je v količini avkubina z njim primerljiv.



Ugotovili smo, da je vsebnost avkubina v vzorcih domačih čajev višja kot v vzorcih kupljenih čajev in sirupov. Koncentracije akteozida so v domačih čajih nabranih pozimi višje kot koncentracije aktezoida v sirupih in v vzorcih kupljenih čajev št. 02 in 03, iz česar sklepamo, da so bili listi nabrani poleti. Vsebnost akteozida v domačih čajih nabranih poleti (z izjemo čaja št. 03) pa so nižje kot koncentracije kupljenih čajev in primerljive s koncentracijami sirupov (z izjemo sirupa št. 03). Koncentracije katalpola v domačih čajih nabranih v poletnih mesecih so višje kot koncentracije katalpola pri kupljenih čajih in sirupih, ampak vsebnosti katalpola pri domačih čajih nabranih v zimskem času, so manjše kot vsebnosti katalpola pri kupljenih čajih in večje kot pri sirupih. Naše predvidevanje, da bo koncentracija avkubina v vzorcih domačih čajev večja kot pri kupljenih čajih in sirupih smo dokazali, ampak koncentracije akteozida in katalpola niso v vseh primerih večje pri domačih čajih, zato je **naša druga hipoteza le delno potrjena**.

Analize sveže nabranih vzorcev, ki smo jih izpostavili različnim okoljem (50 °C, -20 °C, dnevna svetloba, tema) po osmih urah in enem tednu so pokazale, da se koncentracije avkubina najmanj spremenijo pri vzorcih izpostavljenih temi in mrazu, najbolj pa se spremenijo pri izpostavljenosti toploti in svetlobi (rezultati ob osmih urah so zaradi popolne nenavadnosti in nelogičnosti izpuščeni). Vsebnosti akteozida v svežih vzorcih se močno spremenijo. Pri vzorcu, izpostavljenem toploti, se koncentracija v primerjavi z drugimi vzorci razpolovi. Tudi pri vzorcih, izpostavljenih svetlemu okolju, je analiza pokazala večji upad v vsebnosti akteozida. Najbolj se je učinkovina ohranila pri vzorcu, izpostavljenem mrazu, pa tudi pri vzorcih v temnem okolju so bile spremembe koncentracije majhne. Na spremembe koncentracij katalpola pa je najbolj vplivala izpostavljenost vzorcev toploti, saj se je koncentracija katalpola povečala. Najmanj so na vsebnost katalpola vplivali vzorci izpostavljeni svetlobi in temi, pa tudi vzorci, izpostavljeni mrazu, so bili primerljivi s spremembo koncentracije temnemu in svetlemu okolju. Temno okolje in hladno okolje sta najprimernejši za hranjenje pripravkov iz svežih listov trpotca (izjema je le svetlo okolje pri koncentraciji katalpola) zato lahko **prvi del naše tretje hipoteze potrdimo**.

Največji vpliv na spremembo koncentracije učinkovin, ima visoka temperatura, ampak pri učinkovini katalpol se je koncentracija povečala, kar ni v skladu s našimi predvidevanji zato je **drugi del naše tretje hipoteze delno potrjen**.

Ugotovili smo, da koncentracija akteozida ob izpostavljenosti vzorca iz svežih listov trpotca vročini, močno upade že po osmih urah še bolj pa po enem tednu, obenem pa se je ob izpostavljenosti istim pogojem povečala koncentracija katalpola, zato svetujemo nadgraditev raziskovalne naloge s kemijsko kinetiko razgradnje akteozida ob izpostavljenosti povišani T in raziskovanju o možnosti pretvarjanja akteozida v katalpol.

Za drugo možnost nadgraditve naloge svetujemo raziskovanje protibakterijskih učinkov in učinkov strjevanja krvi, ter celjenja ran soka iz svežih listov ozkolistnega trpotca, ki je poznano zdravilno sredstvo proti prehladam in za celjenje ran v ljudski medicini.

## 7 ZAKLJUČEK

Z nalogo smo raziskali ozkolistni trpotec (*Plantago lanceolata*) in tri pomembnejše zdravilne učinkovine avkubin, akteozid in katalpol, ki imajo pomembne protibakterijske učinke in blažilno vplivajo na grlo in žrelo, zato so odlična pomoč ob prehladu. Z metodo HPLC smo analizirali različne vzorce, pripravljene iz doma nabranih in sušenih listov ozkolistnega trpotca, kupljenih trpotčevih čajev, kupljenih trpotčevih sirupov in doma nabranih svežih listov trpotca.

Iz analiz je razvidno, da so koncentracije učinkovin v vzorcih lahko odvisno od letnega časa, v katerem so nabrani. Predvidevali smo, da bo razlika v vsebnosti učinkovin med vzorci, nabranimi v poletnih mesecih, in vzorci, nabrani v zimskih mesecih velika, kar se je izkazalo za delno pravilno. V zimskem času se je koncentracija katalpola res zmanjšala, niso pa se pomembno spremenile koncentracije avkubina in akteozida. Seveda je vsebnost učinkovin odvisna tudi od vremena in od lege oziroma nahajališča. Da bi z gotovostjo lahko trdili, da letni čas nabiranja vzorcev vpliva na vsebnost učinkovin, bi morali zagotoviti nadzorovane pogoje gojenja trpotca. Za shranjevanje vzorcev pa najbolj priporočamo shranjevanje v temnem in hladnem prostoru.

## 8 VIRI

Bodi, E., 2010. *Bodi eko*. [Elektronski]

Available at: <https://www.bodieko.si/ozkolistni-trpotec>

[Poskus dostopa 24 junij 2018].

Červenka, M. in drugi, 1988. *Rastlinski svet Evrope*. Ljubljana: Mladnska knjiga.

Evans E., S. & Kasprzyk-Hordern, B., 2014. *Applications of chiral chromatography coupled with mass spectrometry in the analysis of chiral pharmaceuticals in the environment*. Bath: s.n.

Janković, T. in drugi, 2010. QUANTITATIVE DETERMINATION OF AUCUBIN IN SEVEN PLANTAGO SPECIES USING HPLC, HPTLC, AND LC-ESI-MS METHODS. *Analytical Letters*, oktober, Issue 43, pp. 2487-2495.

Poler, A., 2015. *Spoznajmo zdravilne rastline*. Ljubljana: Kmečki glas.

S. Trojar, I., 2017. *Moj pogled : Ozkolistni ali suličasti trpotec*. [Elektronski]

Available at: <https://mojpogled.com/ozkolistni-ali-sulicasti-trpotec/>

[Poskus dostopa 24 junij 2018].

Schauer, T. & Caspari, C., 2008. *Rastlinski vodnik*. Ljubljana: Modrijan.

Seliškar, A. & Wraber, T., 1986. *Travniške rastline na Slovenskem*. Ljubljana: Prešernova družba.

Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. & Crouch, S. R., 2004. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Belmont: Brooks/Cole - Thomson Learning.

Spohn, M. & Spohn, R., 2008. *Novi vodnik - Katera cvetlica je to?*. Kranj: Narava.

Štotl, J., 2011. *Spreminjanje vsebnosti akteozida v listih gojenega ozkolistnega trpotca (Plantago lanceolata L.) med vegetacijsko dobo*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani: Fakulteta za farmacijo.

Štrancar, A., 1998. *Osnove visokotlačne tekočinske kromatografije (HPLC)*. Ljubljana: s.n.

Tramšek, S., 2016. *Primerjava analiznih metod za določanje policikličnih aromatskih ogljikovodikov v vodah*. Velenje: s.n.

Vreš, B., Gilčavert Berdnik, D. & Seliškar, A., 2014. *Rastlinstvo življenskih okolij v Sloveniji*. Podsmreka: Pipinova knjiga.

Žorž, M., 1991. *HPLC*. Ljubljana: s.n.

## **VIRI SLIK IN SHEMA**

Shema 1: prirejeno po:

[https://en.wikipedia.org/wiki/Aucubin#/media/File:Aucubin\\_skeletal.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Aucubin#/media/File:Aucubin_skeletal.svg)

[citirano 9. 3. 2019]

Shema 2: prirejeno po:

[https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure4/014/mfcd11111524.eps/jcr\\_content/renditions/mfcd11111524-large.png](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure4/014/mfcd11111524.eps/jcr_content/renditions/mfcd11111524-large.png) [citirano 9. 3. 2019]

Shema 3: prirejeno po:

<https://en.wikipedia.org/wiki/Verbascoside#/media/File:Acteoside.svg>

[citirano 9. 3. 2019]

Slika 2: prirejeno po: Žorž, M. (1991). *HPLC*. Ljubljana.

Slika 3: prirejeno po :

<http://www.laboratory-journal.com/applications/analytics/hplc-analysis>

[citirano 9. 3. 2019]