

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA PORTIR

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA PORTIR

**RAZLIKOVANJE VRST JEGLIČEV (*PRIMULA ELATIOR* IN
PRIMULA VERIS) NA PODLAGI FITOKEMIJSKIH ANALIZ**

**THE DIFFERENTIATION OF PRIMROSE SPECIES (*PRIMULA
ELATIOR* AND *PRIMULA VERIS*) BASED ON PHYTO-CHEMICAL
ANALYSIS**

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala pod mentorstvom prof. dr. Samota Krefta, mag. farm. in pod delovnim mentorstvom Petre Kovač, mag. farm., tehnologinje iz obrata Bršljin, Krka, d. d., Novo mesto. Analize smo izvedli na oddelku za separacijske analize v tovarni zdravil, Krka, d. d., Novo mesto.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Samotu Kreftu mag. farm., za vse nasvete, razlage in vso pomoč pri nastajanju te diplomske naloge. Hvala tudi delovni mentorici Petri Kovač, mag. farm., za vso znanje, ki ga je delila z mano in za vso moralno podporo. Prav tako se zahvaljujem izvajalki Antoniji Mohar iz oddelka za separacijske analize v tovarni zdravil Krka, d. d., Novo mesto in samostojnemu raziskovalcu Vojku Zupančiču, ki sta mi stala ob strani in me usmerjala pri analizah. Iskrena hvala tovarni zdravil Krka, d. d., Novo mesto, ki mi je kot štipendistki omogočila, da sem se pri zaključnem dejanju študija, diplomski nalogi, lahko soočila s tako zanimivo in pomembno temo.

Na koncu bi se rada še zahvalila svoji družini, staršem, ki so me pri izbiri študija in mojih ciljih za prihodnost podpirali že od malih nog in mojemu dragemu Mateju, ki je ves čas verjel vame.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja prof. dr. Samota Krefta, mag. farm.

Barbara Portir

VSEBINA

POVZETEK.....	1
ABSTRACT	3
SEZNAM OKRAJŠAV	5
1 UVOD	6
1.1 VISOKI JEGLIČ (<i>PRIMULA ELATIOR</i>) IN POMLADANSKI JEGLIČ (<i>PRIMULA VERIS</i>)	6
1.2 KORENINA JEGLIČA (<i>PRIMULAE RADIX</i>)	9
1.3 GLIKOZIDI V KORENINI JEGLIČA.....	10
1.3.1 FENOLNI GLIKOZIDI.....	11
1.3.2 SAPONINI	11
1.4 METODA HPTLC	16
1.4.1 NAPREDEK NA TLC VODI K RAZVOJU HPTLC	17
1.4.2 POSEBNOSTI IN PREDNOSTI HPTLC	17
1.4.3 KROMATOGRAFSKI PRSTNI ODTIS IN ZDRAVILNE RASTLINE.....	17
1.4.4 PROTOKOL HPTLC	18
1.4.5 RETENCIJSKI FAKTOR (Rf).....	21
2 NAMEN DELA.....	22
3 MATERIALI IN APARATURE	23
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	23
3.2 TOPILA IN REAGENTI.....	29
3.3 PRIBOR IN APARATURE	30
4 POTEK DELA.....	31
4.1 MAKROSKOPSKI PREGLED RASTLINE ZA OCENO MORFOLOŠKIH LASTNOSTI.....	31
4.2 PRIPRAVA RAZTOPINE STANDARDA (RS)	31
4.3 PRIPRAVA RAZTOPINE VZORCA (RV).....	31
4.4 NANAŠANJE RAZTOPINE STANDARDA IN VZORCA NA HPTLC PLOŠČO	33
4.5 RAZVIJANJE KROMATOGRAMA	33
4.6 NAMAKANJE HPTLC PLOŠČE V REAGENT ZA DETEKCIJO - DERIVATIZACIJA	34
4.7 KVANTIFIKACIJA.....	34
4.8 ISTOVETNOST PRIMULA KISLIN	34
4.9 IZRAČUN VSEBNOSTI PRIMULA KISLIN V KORENINI JEGLIČA V MG/G SUHE DROGE.....	35
4.9.1 IZRAČUN VSEBNOSTI PK-I.....	35
4.9.2 IZRAČUN VSEBNOSTI PK-II	35
5 REZULTATI.....	37
5.1 MAKROSKOPSKI PREGLED RASTLINE	37
5.2 HPTLC ANALIZA.....	39
5.2.1 REZULTATI HPTLC ANALIZE VZORCA PE1	39
5.2.2 REZULTATI HPTLC ANALIZE VZORCA PE2	41
5.2.3 REZULTATI HPTLC ANALIZE VZORCA PE3	43
5.2.4 REZULTATI HPTLC ANALIZE VZORCA PV1	45
5.2.5 REZULTATI HPTLC ANALIZE VZORCA PV2	47
5.2.6 REZULTATI HPTLC ANALIZE VZORCA PV3	49
6 RAZPRAVA.....	52

7	SKLEP	56
8	LITERATURA	58

POVZETEK

Evropska farmakopeja določa, da dve vrsti jegliča, *Primula elatior* in *Primula veris*, predstavljata možen vir korenin za pridobitev droge *Primulae radix*. Droga deluje predvsem kot ekspektorans, za ta učinek pa so odgovorni prisotni saponini. Glavna saponina sta primula kislina I in primula kislina II.

V diplomski nalogi smo se lotili podrobnejše morfološko makroskopske primerjave obeh vrst jegliča. Ugotavljali smo tudi vsebnost primula kisline I in primula kisline II in morebitno pogojeno prisotnost posameznega saponina glede na vrsto in glede na različno rastišče. Za določanje istovetnosti in vsebnosti primula kislin smo uporabili tenkoplastno kromatografijo visoke ločljivosti (HPTLC).

Na podlagi makroskopskega pregleda svežih cvetočih rastlin in primerjave morfoloških lastnosti posamezne vrste lahko z gotovostjo trdimo, da vrsti lahko enostavno ločimo med seboj. Dobro so vidne razlike v morfologiji cvetov, tako v njihovi obarvanosti in obliki (cvetovi *Primula elatior* so blede rumeni in bolj odprti, cvetovi *Primula veris* so živo rumeni, s petimi oranžnimi lisami v goltu in bolj priprti, tvorijo lijak), kot tudi v napihnjnosti cvetne čaše in obliki njenih zobcev (cvetna čaša pri *Primula elatior* je ozka, se prilega venčni cevi, zobci so ostri in dolgi, cvetna čaša pri *Primula veris* pa je napihnjena in odmaknjena od venčne cevi z jajčastimi zobci).

Pri analizi HPTLC smo analizirali šest različnih vzorcev korenin (3-krat vzorec *Primula elatior* in 3-krat vzorec *Primula veris*). Kot mobilno fazo smo uporabili butanol : metanol : koncentriran amoniak v razmerju 50 : 10 : 25. Rastopina reagenta za detekcijo je vsebovala anizaldehid. Standard je bila primula kislina I. Denzitograme razvitih kromatogramov smo snemali na denzitometru. Rezultati so pokazali prisotnost primula kisline I v vseh šestih vzorcih, v obeh vrstah jegliča se je pojavila primula kislina II v sledovih, opazili pa smo tudi, da pojavnost primula kisline II ni pogojena niti z vrsto niti z rastiščem in da njena prisotnost v rastlinskem materialu ni nujna, saj je v dveh vzorcih od šestih sploh ni bilo zaznati. Vsebnost primula kisline I je bila med 3,3 – 10,1 %, rezultati pa so pokazali tudi to, da rastišče vpliva na vsebnost primula kisline I. Prav tako smo opazili, da je vsebnost

saponina primula kisline I večja v vrsti *Primula veris*, in sicer v povprečju za kar 43 % glede na vsebnost primula kisline I v vrsti *Primula elatior*.

Ključne besede: *Primula elatior*; *Primula veris*; HPTLC (high performance thin layer chromatography); primula kislina I; primula kislina II

ABSTRACT

European pharmacopoeia provides two species of primrose, *Primula elatior* and *Primula veris* that represent a source of roots for obtaining the drug *Primulae radix*. The drug acts primarily as an expectorant where that effect is caused by the present saponins. Two main saponins are primula acid I and primula acid II.

In this thesis, we undertook a detailed morphologically macroscopic comparison of both species of primrose. We have also determined the content and possible conditional presence of individual saponins considering the species and different growing sites. High performance thin layer chromatography (HPTLC) has been used for identification and content determination of primula acids.

Based on a macroscopic review of fresh flowering plants and the comparison of morphological characteristics of individual species, we can say with certainty that this two species can easily be distinguished. The differences in the morphology of the flowers are clearly seen in their coloration and shape (the flowers of *Primula elatior* are pale yellow and more opened, whereas the flowers of *Primula veris* are bright yellow with five orange patches and more detained, forming a funnel), as well as the bloating of the flower calyx and the shape of its tines (the flower calyx of *Primula elatior* is narrow, adjusted to the petal tube, the tines are sharp and long, while the flower calyx of the *Primula veris* is bloated, detached from the petal tube with egg-shaped tines).

Six different samples of roots have been analyzed through the HPTLC (3-times *Primula elatior* sample and 3-times *Primula veris* sample). As a mobile phase we used butanol : methanol : concentrated ammonia in the ratio 50 : 10 : 25. Reagent solution for detection contained p-Anisaldehyde. The standard was primula acid I. The densitograms of developed chromatograms have been recorded on a density-meter. Results have shown presence of primula acid I in all six samples, in both primrose species there were traces of primula acid II and we have noticed that the presence of primula acid II is not conditioned by the species nor is the presence in plant materials essential for there has been none in two

samples out of six. The content of primula acid I was between 3.3 – 10.1%, while the results have also shown that the growing site has an influence on the content of primula acid I. We have also noticed that the content of the saponin of primula acid I was higher in the *Primula veris* species on average for approximately 43% considering the content of primula acid I in the *Primula elatior* species.

Key words: *Primula elatior*; *Primula veris*; HPTLC (High performance thin layer chromatography); primula acid I; primula acid II

SEZNAM OKRAJŠAV

GC	- plinska kromatografija (gas chromatography)
HPLC	- tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (high performance liquid chromatography)
HPTLC	- tenkoplastna kromatografija visoke ločljivosti (high performance thin layer chromatography)
<i>P. elatior</i>	- <i>Primula elatior</i> (visoki jeglič)
<i>P. veris</i>	- <i>Primula veris</i> (pomladanski jeglič)
PE1	- vzorec korenin <i>Primula elatior</i> , nabranih na območju Žalca
PE2	- vzorec korenin <i>Primula elatior</i> , nabranih na območju Jezerskega
PE3	- vzorec korenin <i>Primula elatior</i> , nabranih na območju Čepovana
PK-I	- primula kislina I (primulasaponin I)
PK-II	- primula kislina II (primulasaponin II)
PV1	- vzorec korenin <i>Primula veris</i> , nabranih v Nemčiji
PV2	- vzorec korenin <i>Primula veris</i> , nabranih na območju Trnovega pri Novi Gorici
PV3	- vzorec korenin <i>Primula veris</i> , nabranih na poti na Srednji Vrh
r	- determinacijski koeficient
R _f	- retencijski faktor
RS	- raztopina standarda
RSD	- relativna standardna deviacija
RV	- raztopina vzorca
TLC	- tenkoplastna kromatografija (Thin layer chromatography)
UV	- ultravijolična svetloba

1 UVOD

1.1 VISOKI JEGLIČ (*Primula elatior*) IN POMLADANSKI JEGLIČ (*Primula veris*)

Visoki (*P. elatior*) in pomladanski (*P. veris*) jeglič sodita v družino jegličevke (*Primulaceae*). Jegličevke so enoletnice ali zelnate trajnice. Listi so deljeni ali celi, premenjalni, nanizani nasproti ali pa v vretencih, nimajo prilistov. Cvetovi so lahko posamični ali v socvetjih, 5-števni, zvezdasti in dvospolni. Čašni in venčni listi so bolj ali manj zrasli. Imajo le en obroč prašnikov, ki so prirasli na venčne liste (1, 2, 3, 4). Znanstvena klasifikacija (1, 5) za obe vrsti je prikazana v preglednici I.

Preglednica I: Znanstvena klasifikacija za *P. elatior* in *P. veris* (1, 5).

kraljestvo (Regnum)	<i>Plantae</i> (rastline)
deblo (Phylum)	<i>Spermatophyta</i> (semenke)
poddeblo (Subphylum)	<i>Magnoliophyta</i> (kritosemenke)
razred (Classis)	<i>Magnoliopsida</i> (dvokaličnice)
podrazred (Subclassis)	<i>Rosidae</i> (roževke)
red (Ordo)	<i>Primulales</i> (jegličevci)
družina (Familia)	<i>Primulaceae</i> (jegličevke)
rod (Genus)	<i>Primula</i> (jeglič)
vrsta (Species)	<i>Primula elatior</i> (visoki jeglič), <i>Primula veris</i> (pomladanski jeglič)

Obe vrsti jegliča imata liste cele, narobe jajčaste, združene v pritlični rozeti, nagubane in dlakave na obeh straneh. Cvetovi, rumene barve, so v kobilastem socvetju na vrhu stebela, ki je neolistano (1). Gre za zelnate trajnice, ki imata kratko navpično ali poševno koreniko, iz katere poganjajo svetlejše korenine. Steblo je visoko 15 do 30 centimetrov. Cvetov je od 5 do 13, ki se pri *P. elatior* pojavijo od marca do junija, *P. veris* pa cveti od aprila do maja (4). Semena obeh vrst so temno rjava, dolga približno 1 milimeter (6).

Obe vrsti se med seboj dobro ločita po svežih cvetočih rastlinah.

P. elatior (Slika 1) ima bledorumeni venec, rob je razprostrt, v goltu venca se opazi temnejši obroč. Zelena čaša je ozka, njeni zobci pa se prilegajo ob venčno cev (Slika 2). Raste na vlažnih travnikih, gozdnih robovih (1). Cvetovi so malo dišeči, imajo sladkoben okus, posušeni cvetovi nimajo vonja. Korenine so svetlo rjave do rdečkasto rjave barve, posušene imajo značilen vonj po metilnem estru salicilne kisline (7).



Slika 1: P. elatior.



Slika 2: Sveži cvetovi vrste P. elatior.

Venec pri *P. veris* (Slika 3) je živorumen, v goltu je moč opaziti 5 rdeče-rumenih lis. Cvetovi so manjši, lijakaste oblike. Zelena čaša je napihnjena in odmaknjena od venčne cevi (Slika 4).

Raste na sončnih travnikih (1). Sveži cvetovi imajo vonj po medu, sladkoben okus, posušeni dišijo komaj zaznavno. Korenine so svetlo rumene do belo rumene, posušene imajo značilen vonj po sladkem janežu (7, 8).



Slika 3: P. veris.



Slika 4: Sveži cvetovi vrste P. veris.

Zdravilni deli jegliča so korenine, cvetovi s čašo (8) in listi, ki so podobno zdravilni kot korenine, le da delujejo šibkeje (9). Pri nabiranju jegliča lahko ob stiku s kožo pride do pojava srbečice in izpuščajev (8). Alergijsko reakcijo povzročajo kinoni (10, 11), in sicer primin, ki je močan kontaktni alergen (11).

Kot zdravilne učinkovine so v vseh zdravilnih delih prisotni saponini, vendar jih je največ v korenini jegliča (8). Podatki kažejo, da je vsebnost saponinov v korenini 3-12 %, v cvetnih čašicah pa vsebnost ne preseže 2 % (7).

1.2 KORENINA JEGLIČA (*Primulae radix*)

Korenina jegliča kot droga predstavlja posušene korenike in korenine vrst *P. elatior* in *P. veris* (12, 13). Droga vsebuje 3-12 % triterpenskimi saponini oleananskega tipa z razvejano sladkorno verigo, ki so nosilci farmakološkega učinka ter fenolna glikozida primulaverin in primverin, ki dajeta drogi značilen vonj (7). Sveža droga nima vonja, ta nastane zaradi razpada primulaverina in primverina na aglikone med sušenjem. Največja vsebnost saponinov je pred ali med cvetenjem in v jeseni ali pred začetkom zime (14).

Na podlagi vsebnosti saponinov droga deluje kot sekretomotorični in sekretolitični ekspektorans. Največ se uporablja pri kašlju, katarju zgornjih dihalnih poti in kroničnem bronhitisu (15). Odbor za zdravila rastlinskega izvora pri Evropski agenciji za zdravila je izdal monografijo za jeglič in druge zdravilne rastline, ki se uporabljajo za bolezni ušes, nosu in grla. Korenina jegliča je opredeljena pod tradicionalno uporabo, kot indikacijo navajajo jeglič kot ekspektorans, ki se uporablja pri kašlju, povezanem s prehladom (16). Ekspektoransi so snovi, ki pospešijo izločanje sluzi v dihalnih poteh. Redčijo gost in lepljiv izloček v pljučih in posledično olajšajo izkašljevanje. Delimo jih na sekretolitične in sekretomotorične. Prvi utekočinijo in razredčijo izločke v dihalnih poteh in tako olajšajo izkašljevanje, drugi, sekretomotorični pa pospešujejo premikanje izločkov iz dihal. Sekretolitični učinek je posledica delovanja preko gastropulmonalnega refleksa katerega mehanizem je lokalno draženje sluznice želodca, zaradi česar se preko aferentnih vlaken vagusa vzburi center za bruhanje v centralnem živčnem sistemu. Dosežena je stopnja blage slabosti, ki ne izzove bruhanja, pač pa sproži kašljanje in povečano delovanje žlez slinavk. Aktivirajo se tudi žleze v dihalih, ki izločajo redko sluz, ki posledično razredči sluz gostejše teksture. Saponini delujejo tudi lokalno, tako da zmanjšujejo površinsko napetost sluzi, kar prav tako olajša njeno izkašljevanje (15, 17).

Neželeni učinki se pojavijo le pri predoziranju. Simptomi so slabost, bruhanje in driska (3, 7). Prah, ki nastane pri rezanju, drobljenju ali mletju, močno draži dihala in povzroča kihanje in kašljanje (3).

Pri mikroskopskem pregledu droge vidimo, da korenika *P. elatior* vsebuje rumeno zelene, močno pikčaste kamnite celice, medtem ko pri *P. veris* tega ne opazimo (7).

Identifikacija

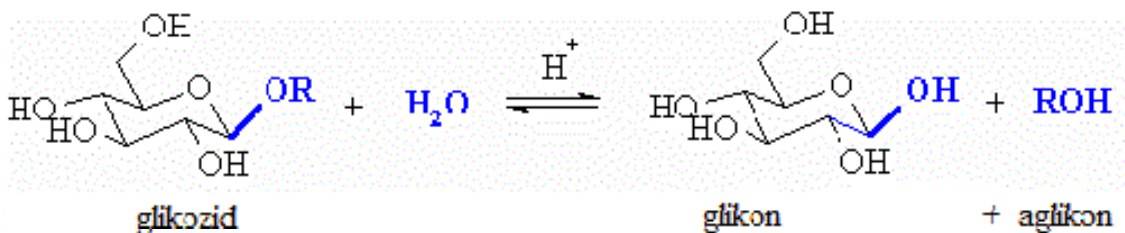
Identifikacijo korenine jegliča po Evropski farmakopeji izvajamo na tri različne načine:

- A. Makroskopsko: rjava korenika je ravna ali rahlo zavita, dolga približno 1-5 cm in debela približno 2-4 mm. Iz korenike rastejo številne krhke korenine, debele približno 1 mm in dolge 6-8 cm. Korenine od *P. elatior* so svetlo rjave ali rdečkasto rjave, od *P. veris* pa svetlo rumene ali belo rumene.
- B. Mikroskopsko: Korenine zmeljemo do finega praška. Prašek je sivo-rjave barve in kaže prisotnost rumeno-zelenih okroglih celic z zgoščeno in pikčasto steno, ki so značilno prisotne pri *P. elatior* in jih pri *P. veris* ni.
- C. Tenkoplastna kromatografija: glavna lisa v kromatogramu, razvitem z referenčno raztopino escina je modro-vijolična in se nahaja v bližini meje med spodnjo in srednjo tretjino. Kromatogram pridobljen z vzorčno raztopino kaže 1-2 močno temno vijolični lisi malo pod območjem, kjer se na kromatogramu z referenčno raztopino nahaja lisa za escin. Vidna so lahko še blede vijolična, rumenkasta ali rjavo-zelena območja (13).

1.3 GLIKOZIDI V KORENINI JEGLIČA

Glikozidi so spojine sestavljene iz sladkornega dela (glikon) in nesladkornega dela (aglikon). Poznamo več vrst glikozidov: antrakinonski glikozidi, kardiotionični glikozidi, saponini, flavoni in flavonoidi, glikozidi z žveplom, cianogeni glikozidi, iridoidi, kumarini ter fenolni glikozidi.

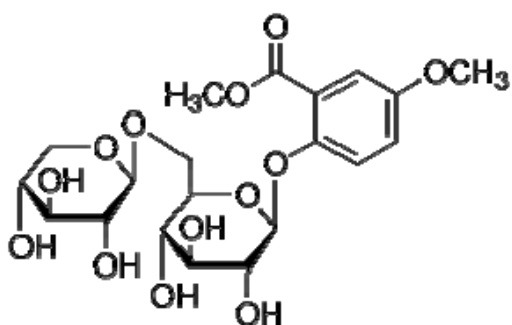
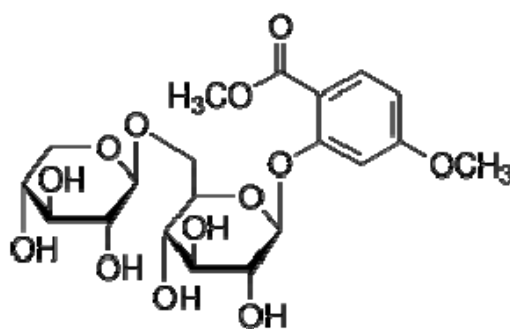
Glikon in aglikon sta med seboj najpogosteje povezana preko kisika, redkeje preko žvepla, dušika ali ogljika. Glikozidi razpadajo v kislem (Slika 5), hitreje ob prisotnosti encimov (2, 4). Korenina jegliča vsebuje saponine in fenolne glikozide (7).



Slika 5: Razpad glikozida v kislem (18).

1.3.1 FENOLNI GLIKOZIDI

Najpogostejša fenolna glikozida v *P. elatior* in *P. veris* sta primulaverin (Slika 6) in primverin (Slika 7) (19). S pomočjo encima primverozidaza se sladkorna komponenta odcepi, pri čemer se sprosti metilni ester metoksisalicilne kisline. Oba nastala aglikona sta nosilca tipičnega vonja. Droga *P. elatior* je brez vonja ali pa diši šibkeje kot *P. veris*, vonj spominja na vonj metilsalicilata, medtem ko *P. veris* diši po sladkem janežu. Fenolni glikozidi ne služijo le kot označevalci vsebnosti, ampak tudi kot indikatorji starosti droge, pri samem učinku droge pa nimajo vpliva (20).



Slika 6: Primulaverin (21).

Slika 7: Primverin (22).

1.3.2 SAPONINI

Saponini imajo lastnosti površinsko aktivnih snovi. Pri raztapljanju v vodi se raztopina močno peni. Večina saponinov ima hemolitične lastnosti in so toksični pri injiciranju v kri. Dražijo sluznice in se slabo absorbirajo iz gastro-intestinalnega trakta (2, 23). Hemolitično

delovanje je posledica povezave saponinov s proteini in lipidi eritrocitnih celičnih membran, zato pride do poškodb membrane in posledičnega izstopa hemoglobina (24).

Pri saponinskih vrstah najdemo saponine v vseh organih rastline ali pa so nakopičeni v posameznem delu, na primer v listih ali korenini. Saponini se praviloma nahajajo v parenhimskem temeljnem tkivu različnih organov (20).

Struktura saponinov

Razporedimo jih v dve skupini, glede na naravo njihovega aglikona:

- steroidni saponini (*Liliaceae*, *Agavaceae*, *Fabaceae*, *Solonaceae*),
- triterpenski saponini (*Araliaceae*, ***Primulaceae***, *Ranunculaceae*, *Rosaceae*) (23).

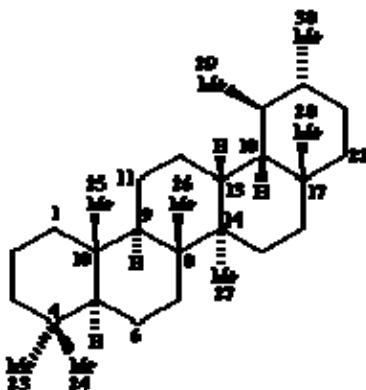
Najdemo jih v velikem številu rastlinskih vrst. Vzrok za njihovo splošno razširjenost je verjetno fungicidno delovanje, s katerim ščitijo rastline pred plesnimi (24).

Nas zanimajo saponini v družini jegličevk (*Primulaceae*), zato se bomo opredelili na triterpenske saponine. Večina saponinskih učinkovin spada k triterpenskemu tipu (20).

Struktura aglikona

TRITERPENSKI

Aglikoni te saponinske skupine imajo 21-22 C-atomov v petih stranskih verigah ter sodijo k triterpenskemu tipu. Saponini te skupine:

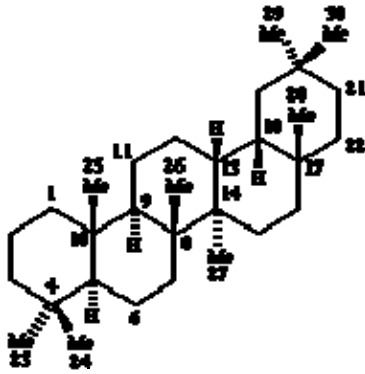


AGLIKONI:

skupine imajo razporejenih obročih in 8-9 C-atomov v pentacikličnem triterpenom. (aglikone) razvrstimo v 3

- aglikoni β -amirinskega tipa (oleanani) (Slika 8),
- aglikoni α -amirinskega tipa (ursani) (Slika 9),
- aglikoni lupeolnega tipa (lupani) (Slika 10).

Skoraj vsi pomembni saponini spadajo k prvi skupini (20).



Slika 8: Oleanan (25).

Slika 9: Ursan (26).

Slika 10: Lupan (27).

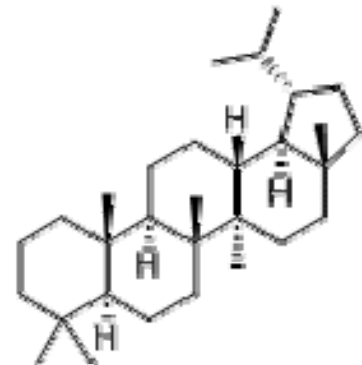
Strukturni elementi, ki so značilni za triterpenske aglikone:

- pogosto prisotna dvojna vez na mestu C-12 – C-13,
- pogosto oksidirana metilna skupina na mestih C-23, C-28 in C-30,
- oksidacija ogljikov v obročih na mestih 2, 7, 11, 15, 16, 21 ali 22,
- včasih je aglikon delno zaestren (z alifatskimi kislinami) (23).

Struktura glikona

Sladkorji, ki se pojavljajo v saponinih so običajno naslednji: D-glukoza, D-galaktoza, L-arabinoza, L-ramnoza, D-ksiloza, D-fukoza in D-glukuronska kislina.

Najbolj pogosto je glikon pri saponinih sestavljen iz enega ali dveh linearnih ali razvejanih oligosaharidov pa tudi iz enega monosaharida in enega oligosaharida. Molekulo lahko



sestavlja tudi do 11 monosaharidov, najpogosteje je prisotnih od 3 do 5. Glikon je lahko na aglikon vezan preko eterske ali esterske vezi. Spojina se, glede na to, ali struktura obsega enega ali dva sladkorna dela, imenuje monodezmosid (glikon vezan na aglikon preko eterske vezi na mestu C-3) oziroma bidezmosid (ena sladkorna komponenta vezana na aglikon preko eterske vezi na mestu C-3 in druga sladkorna komponenta vezana pri triterpenskimi saponinih preko esterske vezi na mestu 28, pri steroidnih saponinih pa preko eterske vezi na mestu C-26) (23).

Izolacija in identifikacija saponinov

EKSTRAKCIJA:

Saponini so topni v vodi, zato jih lahko v njej ekstrahiramo pri temperaturi vrelišča. Voda povzroča hidrolizo bidezmosidov, zato je boljše kot topilo uporabiti alkohole (etanol, metanol) ali vodne raztopine alkoholov. Za inaktivacijo esteraz, prisotnih v rastlinskem materialu, je priporočljiva predhodna obdelava, npr. z razredčeno HCl (23).

LOČBA:

Ločba saponinov najpogosteje temelji na kromatografskih tehnikah HPLC in TLC na klasičnih nosilcih (silikagel, aluminijev oksid, zamreženi dekstranski geli) (23).

OPREDELITEV Z BARVNO REAKCIJO:

Barvne reakcije uporabljamo za opredelitev saponinov v primeru preverjanja identitete droge in za spremljanje procesa ločbe. Na voljo imamo naslednje reakcije:

- z anhidridom očetne kisline ob prisotnosti žveplene kisline (nastala barva pri triterpenskem aglikonu je roza do rdeča pri steroidnem pa modro-zelena),
- z vanilinom ali anizaldehidom ob prisotnosti močne anorganske kisline (obarvanje je verjetno posledica reakcije med aldehidom in razgradnimi produkti aglikona),
- z antimonovim trikloridom ob prisotnosti anhidrida očetne kisline (23).

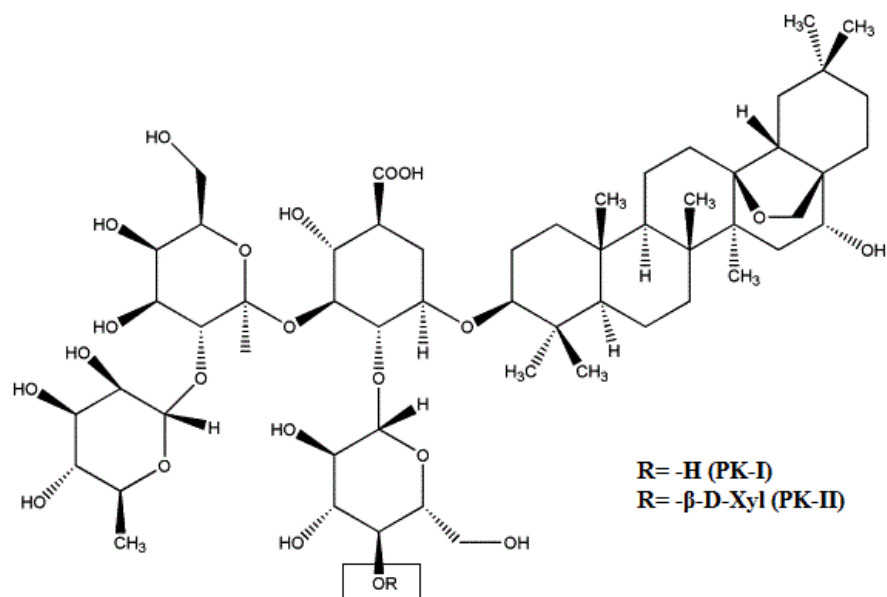
Saponini v korenini jegliča (*Primulae radix*)

Saponini v korenini jegliča so triterpenski, oleananskega tipa, z razvejano sladkorno verigo vezano na hidroksilno skupino na mestu C-3.

Glavna saponina sta primulasaponin I (primula kislina I = PK-I) in primulasaponin II (primula kislina II = PK-II). Izhajata iz aglikona protoprimulagenina A, ki se s pomočjo kisle hidrolize pretvori v primulagenin A. Glikon pri PK-I je sestavljen iz glukuronske kisline, glukoze, galaktoze in ramnoze, pri PK-II pa je poleg prej naštetih zraven pripeta še ksiloza.

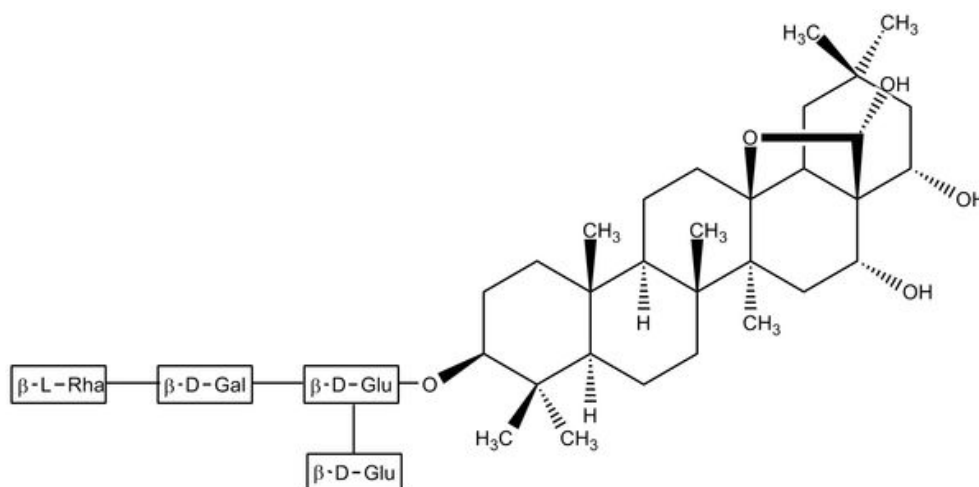
Poleg glavnih dveh saponinov PK-I in PK-II (Slika 11) so v drogi odkrili tudi naslednje saponine: primakrosaponin (Slika 12) (aglikon anagaligenin, glikon sestavljajo glukuronska kislina, glukoza, galaktoza in ramnoza), priverosaponin B (Slika 13) in priverosaponin B-22-acetat (Slika 14) (aglikon priverogenin in priverogenin B-22-acetat, glikon sestavljajo glukuronska kislina, glukoza, galaktoza in ramnoza) (28).

Aglikoni anagaligenin, priverogenin B in priverogenin B-22-acetat so sorodni protoprimulageninu A, glikon je pri teh saponinih identičen glikonu PK-I (7).

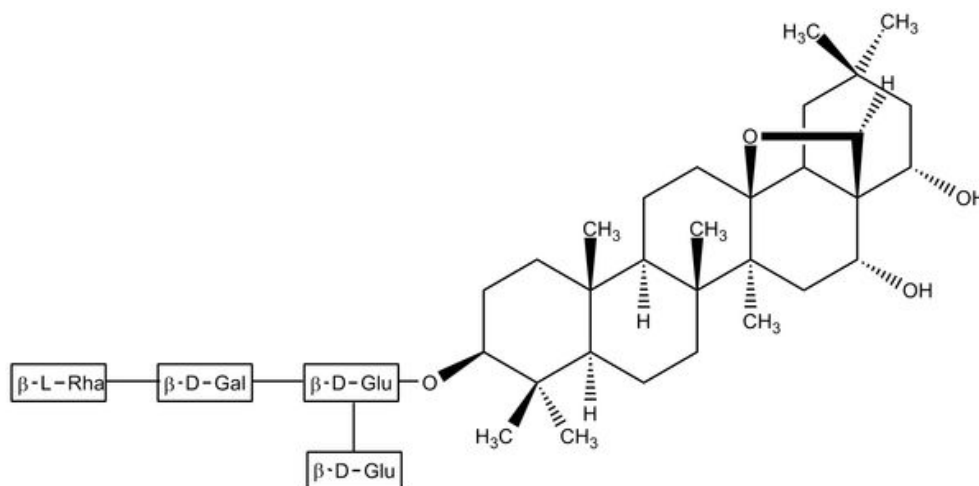


Slika 11: Kemijska struktura PK-I in PK-II (29). (Xyl = ksiloza)

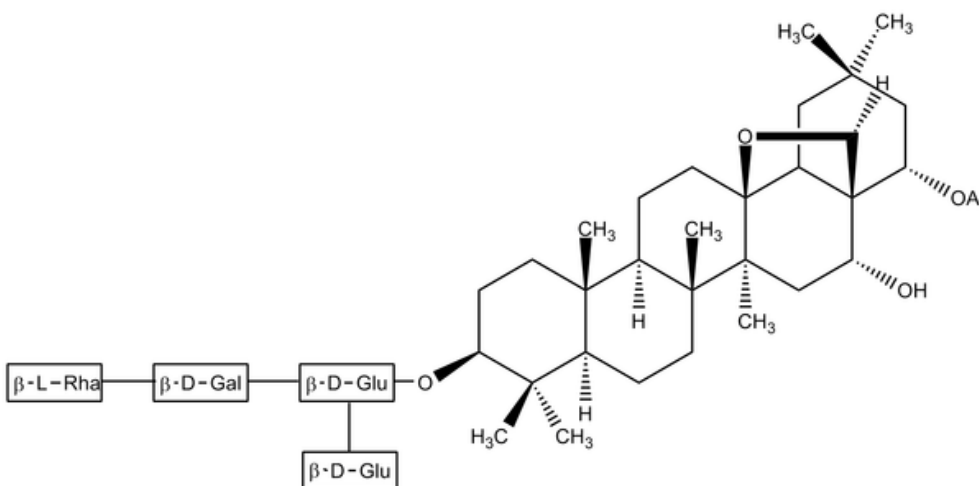
Še vedno pa ni natančno znano, ali so vsi omenjeni saponini prisotni v obeh vrstah, ali se kateri specifično pojavlja samo v eni vrsti. Nekateri viri navajajo, da se PK-I pojavlja v koreninah obeh vrst jegliča (20), za PK-II ni znano, saponini primakrosaponin, priverosaponin B in priverosaponin B-22-acetat pa naj bi bili prisotni le v *P. veris* (7). Drugi viri glede na raziskave, pri katerih so se opredelili le na dokazovanje PK-I, PK-II in priverosaponin B-22-acetat kažejo, da korenina *P. elatior* vsebuje le PK-I, medtem ko so vsi trije saponini prisotni v korenini *P. veris*. Analizirali so tri vzorce *P. elatior* in tri vzorce *P. veris* rastlin, ki so jih izkopali na različnih krajih oziroma rastiščih (19). Vsebnost saponinov je v korenini *P. veris* višja kot v *P. elatior* (19, 20), v povprečju približno za 30 % (19).



Slika 12: Primakrosaponin (30).



Slika 13: Priverosaponin B (31).



Slika 14: Priverosaponin B-22-acetat (32).

1.4 METODA HPTLC

High performance thin layer chromatography (HPTLC) – tenkoplastna kromatografija visoke ločljivosti

Kromatografija je opredeljena kot skupina tehnik, ki se uporabljajo za ločbo zmesi spojin na podlagi njihove porazdelitve med dve fazi, stacionarno in mobilno fazo. Ena najpogosteje uporabljenih metod je tenkoplastna kromatografija (thin layer chromatography - TLC). Vzorci so nanešeni na trdno stacionarno fazo in potujejo z mobilno fazo. Ta potuje na podlagi kapilarnih sil, pri tem pa se komponente vzorca postopoma ločijo na pasove oziroma lise. Danes je večina stopenj te tehnike avtomatiziranih. Tako se je razvila metoda HPTLC, ki omogoča rokovanje z velikim številom vzorcev. Sodobna HPTLC tehnika, kombinirana z avtomatskim nanosom vzorca

in denzitometričnim optičnim branjem, je občutljiva in popolnoma zanesljiva, primerna za uporabo v kvalitativnih in kvantitativnih analizah (33).

1.4.1 NAPREDEK NA TLC VODI K RAZVOJU HPTLC

Preglednica II: Primerjava TLC in HPTLC (33).

TLC		HPTLC
ročna	tehnika	instrumentalna
okrogla, elipsasta	oblika vzorca	pravokotna
ni skladna	dobra laboratorijska praksa	skladna
1-10 μ L	natančnost volumna	0,1-500 μ L
ne	povezava z računalnikom	da
kapilara	nosilec vzorca	brizga
ne	kvantitativna analiza	da
254 nm, 366 nm, vidna svetloba	valovna dolžina	od 190 nm do 800 nm, monokromatska svetloba
ne	analiza spektra	da
analitik	končni pregled rezultatov	naprava

1.4.2 POSEBNOSTI IN PREDNOSTI HPTLC

Pri HPTLC lahko izvajamo več analiz hkrati, za kar je potreben razmeroma kratki čas (hitra ločba, nizki stroški analize). Rokovanje s to metodo je enostavno, potrebne so majhne količine vzorca, njegova priprava je enostavna. Ni potrebna predhodna obdelava topila (filtracija, odpihovanje), poraba mobilne faze je majhna. Stacionarna faza se uporabi le enkrat. Visoka ločljivost, dobra ponovljivost ter visoka kakovost. Vse stopnje procesa lahko računalniško kontroliramo, prav tako pa je možna vizualna detekcija (off-line detekcija). Ločbo lahko shranimo za identifikacijo in kvantifikacijo v poznejšem času (33).

1.4.3 KROMATOGRAFSKI PRSTNI ODTIS IN ZDRAVILNE RASTLINE

Zdravila rastlinskega izvora imajo bogato terapevtsko zgodovino in se še vedno veliko uporabljajo v zdravstvene namene. Kontrola in zagotavljanje kakovosti pa v nekaterih primerih, zaradi visoke variabilnosti rastlinskih kemičnih sestavin, še vedno ostaja izziv. Zeliščne droge, posamezne ali v kombinaciji, vsebujejo ogromno spojin, od katerih pa je običajno le ena aktivna in odgovorna za celotno učinkovitost. Na podlagi tega pride v poštev veliko število kemijskih analiznih metod za nadzor kakovosti rastlinskih drog (poleg HPTLC tudi TLC, GC, HPLC in druge). Kromatografski prstni odtis rastlinskih drog predstavlja celovit, kakovosten in neposreden pristop za namene preverjanja pristnosti vrste, oceno kakovosti in za zagotavljanje doslednosti in stabilnosti rastlinskih drog (33).

1.4.4 PROTOKOL HPTLC

Izbira stacionarne faze/kromatografske plošče

Uporabljajo se manjše HPTLC plošče (10x10, 10x20 ali 20x20 cm) z majhnimi delci, ki imajo ozko porazdelitev velikosti, s krajšo potjo mobilne faze (običajno 6 cm) in krajšim časom analize (7-20 minut). HPTLC plošče zagotavljajo boljšo ločljivost, večjo občutljivost in boljšo *in situ* kvantifikacijo.

Podporni materiali plošč so steklo, aluminij ali plastika. Steklene plošče dosegajo najvišjo kakovost rezultatov. Prevljučene plasti, ki se uporabljajo, vključujejo silikagel, aluminijev oksid, magnezijev silikat, magnezijev oksid, poliamid, celulozo, diatomejsko zemljo, ionske izmenjevalce in polarno spremenjene silikagelske plasti, ki vsebujejo vezane amino, ciano, diolne in tiolne skupine.

Pred uporabo je treba plošče pregledati pod belo in UV svetlobo za odkrivanje poškodb in nečistoč v plasti. Priporočljivo je predpranje plošče za izboljšanje ponovljivosti in zanesljivosti rezultatov z metanolom, zmesmi metanola in etilacetata ali z mobilno fazo postopka. Po predpranju plošče sušimo 20 minut pri 120 °C.

Plošče iz sveže odprte škatle ne zahtevajo aktivacije, tiste, ki pa so izpostavljene visoki vlagi ali dlje časa stojijo na strani, zahtevajo aktivacijo, ki jo dosežemo s segrevanjem pri 110-120 °C (33).

Izbira mobilne faze

Izbor temelji na lastnostih stacionarne faze in na fizikalnih in kemijskih lastnostih snovi. Splošne mobilne faze, ki se uporabljajo so dietileter, diklorometan, kloroform sam ali s heksanom, metanol, acetonitril. Slaba izbira mobilne faze zmanjša ločljivost, opredelitev lis in ponovljivost retencijskega faktorja. Če je stacionarna faza polarna, mobilna faza pa nepolarna, se zaradi manjše afinitete do stacionarne faze najprej izločijo nepolarne spojine, polarne spojine pa se zadržujejo zaradi večje afinitete do stacionarne faze, in obratno (33).

Priprava vzorca in standarda

Topila, ki se običajno uporabljajo za pripravo, so metanol, kloroform : metanol (1 : 1), etilacetat : metanol (1 : 1), kloroform : metanol : amoniak (90 : 10 : 1), diklorometan : metanol (1 : 1) (33).

Aplikacija vzorca in standarda na ploščo HPTLC

Za aplikacijo so na voljo avtomatizirane naprave s tehniko razprševanja. Aparature, ki se za to uporabljajo, so Automatic TLC Sampler (ATS) IV ali Linomat V. Nanos v obliki ozkih pasov omogoča večjo ločljivost in občutljivost. Nanos poteka s pomočjo brizge. Hitrost in obseg nanosa sta nadzorovana elektronsko. Tok inertnega plina (dušik) okoli konice brizge razprši vzorec in ustvari pas na plošči HPTLC, pri tem pa se brizga ali plošča gibljeta linearno, levo in desno.

Položaj nanosa: oddaljenost od levega in desnega roba plošče je 15 mm, razdalja od spodnjega roba je 8 mm, dolžina pasov je 6 mm in razdalja med pasovi 4 mm (33).

Nasičenje kromatografske kadičke

Nenasičena kadička povzroča visoke vrednosti retencijskega faktorja in vpliva na ločevanje. Nasičenost izvajamo v kadički, obloženi s filter papirjem, 30 minut pred razvijanjem. To vodi v enakomerno porazdelitev par topila (33).

Razvijanje kromatograma in sušenje

Razvijamo s fiksnim položajem plošče s samo 8 ml mobilne faze. Komore ne odpiramo, dokler razvijanje ni končano. Ploščo po razvoju posušimo v toku hladnega ali toplega zraka. Vzorec z različnimi komponentami je izpostavljen interakcijam med komponentami, mobilno in stacionarno fazo, kar vodi do različnega potovanja komponent, ki temelji na različnih fizikalnih in kemijskih lastnostih komponent. Komponenta, ki ima manjšo

afiniteto do stacionarne faze, potuje hitreje in nasprotno. Kot rezultat vidimo nastanek različnih pasov oziroma lis na različnih razdaljah po potovanju.

Ločba in resolucija sta odvisni od naslednjih faktorjev: tip stacionarne faze, vrsta prevlečenih plošč, debelina sloja, mobilna faza, čistost topila, velikost kromatografske kadičke, nasičenost kromatografske kadičke, nanosen volumen vzorca, velikost začetnega mesta, nivo topila v kromatografski kadički, relativna vlažnost, temperatura, pretok topila in pot mobilne faze (33).

Derivatizacija

Derivatizacija je potrebna za vizualizacijo analitov. Izvede se lahko s potopitvijo plošče ali s škropljenjem z ustreznim reagentom. Potapljanje je prednostna derivatizacijska tehnika (boljša ponovljivost). Pri potapljanju vstavimo ploščo v potopno napravo, ta pa za ustrezen čas samodejno potopi ploščo v raztopino reagenta. Nato ploščo sušimo v toku hladnega ali toplega zraka. Pri škropljenju škropimo vodoravno na navpično postavljeno ploščo, dokler ni homogeno prekrita z reagentom. Za indukcijo ali optimizacijo derivatizacijske reakcije je lahko potrebno segrevanje plošč na ustrezni temperaturi za določen čas (33).

Kvantifikacija

Izvaja se z *in situ* merjenjem območij vzorcev in standardov z uporabo kromatografskega spektrofotometra (denzitometer TLC Scanner 3 z uporabo programske opreme WinCATS). Merimo odbojnost ali pa transmitanco z merjenjem absorbance ali fluorescence (33).

Detekcija

Lise fluorescentnih spojin zaznamo pri 254 nm ali pri 366 nm. Lise nefluorescentnih spojin pa je mogoče videti s pomočjo fluorescenčne stacionarne faze (silikagel GF) (33).

Dokumentiranje slik

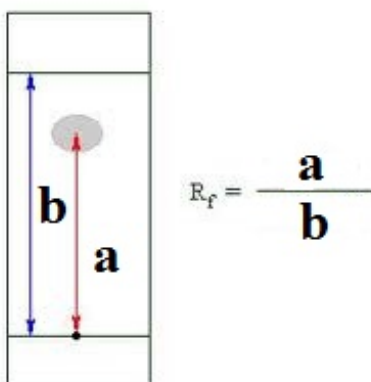
Razvita plošča je dokumentirana pod UV svetlobo pri 254 nm, 366 nm in pri beli svetlobi, s pomočjo kamere. To omogoča nadaljno uporabo slik in dostop do podatkov v kasnejšem času (33).

1.4.5 RETENCIJSKI FAKTOR (Rf)

Položaj lise na TLC/HPTLC kromatogramu je karakteriziran na podlagi njenega retencijskega faktorja, Rf (Slika 15):

$$R_f = \frac{\text{pot spojitne}}{\text{pot mobilne faze}}$$

Vrednosti Rf so med 0 (spojina je ostala na startu) in 1 (spojina je potovala z mobilno fazo). Ponovljivost vrednosti Rf je odvisna od dejavnikov, kot so: kakovost topila, vlažnost, atmosfera v kromatografski kadički, debelina plasti, razdalja razvijanja in temperatura okolice. Sistemske napake, ki lahko vplivajo na rezultate, so na primer, da ne najdemo natančnega položaja fronte topila ali pa da pride do izgube mobilne faze ali kopičenja v njej (33).



Slika 15: Potek izračuna retencijskega faktorja (34).

2 NAMEN DELA

Po Evropski farmakopeji sta obe vrsti jegliča, *P. elatior* in *P. veris*, izhodiščni material za pridobivanje droge *Primulae radix* (13), ki ima pomembno vlogo na industrijskem nivoju. S pomočjo tega diplomskega dela želimo ugotoviti ali je vsebnost primula kislin pogojena z vrsto in rastiščem ter potrditi vsebnost. Pri tem se bomo zaradi industrijske uporabe omejili le na študij korenine. Istovetnost in vsebnost primula kislin (PK-I in PK-II), bomo po njihovem postopku izvedli s pomočjo HPTLC (tenkoplastna kromatografija visoke ločljivosti) na oddelku za separacijske analize v tovarni zdravil Krka, d. d., Novo mesto. Z nabranimi svežimi rastlinami bomo na podlagi makroskopskega pregleda vrsti ločili med seboj in opredelili njune morfološke lastnosti in razlike. S pomočjo literaturnih virov pa bomo skušali opredeliti še ostale podobnosti in razlike med obema vrstama, ki smo jih med drugim omenili že v uvodu.

Na podlagi rezultatov bomo tako lahko do sedaj znane in postavljene hipoteze in domneve glede istovetnosti in vsebnosti primula kislin ter morfoloških lastnosti obeh vrst jegliča potrdili ali ovrgli.

3 MATERIALI IN APARATURE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Makroskopski pregled

Sveže, cvetoče rastline obeh vrst smo poiskali v naravi in jih izkopali s koreniki in koreninami vred ter očistili, da smo lahko opravili morfološki pregled od korenin do cvetov. Rastline *P. elatior* smo izkopali v maju 2013 na območju Jezerskega (občina Jezersko), rastline *P. veris* smo prav tako izkopali maja 2013 na dveh različnih krajih, in sicer v kraju Kranjska Gora (občina Kranjska Gora) in na poti na Srednji Vrh (občina Kranjska Gora).

HPTLC

Za HPTLC analize smo pridobili šest različnih vzorcev korenin jegliča, in sicer so bili trije vzorci korenine *P. elatior* označeni s PE1, PE2, PE3 in trije vzorci korenine *P. veris* s PV1, PV2 in PV3.

- PE1: Vzorec *P. elatior* (Slika 16), posušeno drogo (*Primulae radix*), nam je posređoval Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo, Žalec (občina Žalec, nadmorska višina 255 m, rastišče: gojene rastline, sončna lega (Slika 23)), iz svojega botaničnega vrta novembra 2012. Korenine so bile izkopane, očiščene in posušene ter ustrezno skladiščene na inštitutu jeseni 2012, po njihovem postopku.



- PE2: Vzorec **Slika 16: Posušena droga Primulae radix (P. elatior) iz Žalca.** ga (občina Jezersko, nadmorska višina približno 900 m, rastišče: sončni travnik (Slika 23)) smo maja 2013 izkopali cvetoče rastline *P. elatior*. Identifikacijo smo izvedli s pomočjo Male flore Slovenije (1). Korenine smo očistili, narezali na manjše delce in sušili do konstantne mase z umetnim dovodom toplega zraka (Slika 17).



Slika 17: Posušena droga Primulae radix (P. elatior) z Jezerskega.

- PE3: Vzorec smo pridobili s pomočjo študentov 3. letnika EMŠ Farmacija, študijskega leta 2012/2013 v sklopu predmeta Farmakognozija pri pripravi

herbarija. Rastline *P. elatior* so aprila 2013 študentje izkopal na območju Čepovana (občina Nova Gorica, nadmorska višina 604 m, rastišče: gozdni rob mešanega gozda (Slika 23)). Študentje so s pomočjo Male flore Slovenije (1) izvedli identifikacijo rastline in celo, očiščeno rastlino posušili med časopisnim papirjem in obteženo do konstantne mase. Posredovane herbarijske pole smo nato še enkrat pregledali in preverili identifikacijo, nato pa posušene korenine narezali na manjše delce (Slika 18).



Slika 18: Posušena droga *Primulae radix* (*P. elatior*) iz Čepovana.

- PV1: Vzorec *P. veris* (Slika 19) nam je decembra 2012 posredoval botanični vrt Alfred Galke iz Nemčije (Alfred Galke GmbH, Gittelde/Harz, Deutschland, nadmorska višina 190 m, rastišče: gojene rastline, sončna lega (Slika 20)). Korenine so bile izkopane, očiščene in posušene ter ustrezno skladiščene jeseni 2012 v botaničnem vrtu Alfred Galke, po njihovem postopku.





Slika 19: Posušena droga *Primulae radix* (*P. veris*) iz Nemčije.

Slika 20: Lokacija vzorca pridobljenega iz Nemčije.

- PV2: Vzorec smo pridobili s pomočjo študentov 3. letnika EMŠ Farmacija, študijskega leta 2012/2013 v sklopu predmeta Farmakognozija pri pripravi herbarija. Rastline *P. veris* so aprila 2013 študentje izkopalni na območju Trnovega (občina Nova Gorica, nadmorska višina 780 m, rastišče: vlažen travnik ob gozdnem robu mešanega gozda (Slika 23)). Študentje so s pomočjo Male flore Slovenije (1) izvedli identifikacijo rastline in celo, očiščeno rastlino posušili med časopisnim papirjem in obteženo do konstantne mase. Posredovane herbarijske pole smo nato še enkrat pregledali in preverili identifikacijo, nato pa posušene korenine narezali na manjše delce (Slika 21).



Slika 21: Posušena droga *Primulae radix* (*P. veris*) iz Trnovega.

- PV3: Vzorec smo pridobili sami. Na poti na Srednji Vrh (občina Kranjska Gora, nadmorska višina približno 960 m, rastišče: sončni travnik ob mešanem gozdu (Slika 23)) smo maja 2013 izkopali cvetoče rastline *P. veris*. Identifikacijo smo izvedli s pomočjo Male flore Slovenije (1). Korenine smo očistili, narezali na manjše delce in sušili do konstantne mase z umetnim dovodom toplega zraka (Slika 22).



Slika 22: Posušena droga *Primulae radix* (*P. veris*) s Srednjega Vrh.

Do analize smo vse vzorce hranili v suhem prostoru, zaščitene pred svetlobo, v skladišču droge Krke, d. d., Novo mesto.



Slika 23: Lokacija vzorcev nabranih v Sloveniji.

3.2 TOPILA IN REAGENTI

- metanol, CH_3OH : Methanol, Pro Analysis, (8402), J. T. Baker,
- absolutni etanol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$: Ethanol absolute, (32221), Sigma-Aldrich,
- prečiščena voda, H_2O : aqua purificata, sistem Krka d.d., Novo mesto,
- butanol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$: 1-butanol, (537993), Sigma-Aldrich,
- koncentrirani amoniak, NH_3 : Ammonia solution 25 %, (1.05432), Merck,
- koncentrirana očetna kislina, CH_3COOH : Acetic Acid, (6052), J.T.Baker,
- žveplova (VI) kislina, H_2SO_4 : Sulfuric Acid, (6902), Ultrex II,
- anizaldehid, $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4\text{CHO}$: p-Anisaldehyde, analytical standard, (97063), Fluka Analytical,
- primula kislina I, $\text{C}_{54}\text{H}_{88}\text{O}_{23}$, delovni standard, (7321), Phytolab,
- 70% etanol: absolutni etanol + prečiščena voda,
- raztopina reagenta za detekcijo: 255 mL metanola, 30 mL koncentrirane očetne kisline, 15 mL žveplove (VI) kisline, 1,5 mL anizaldehida,
- mobilna faza pri HPTLC: butanol : metanol : koncentrirani amoniak v razmerjih 50 : 10 : 25 (V/V/V).

3.3 PRIBOR IN APARATURE

- kavni mlinček: Siemens MC 23200, Typ KM13,
- tehtnica: analitska tehtnica Mettler Toledo,
- tehtnica: mikrotehtnica Mettler Toledo,
- vodna kopel: Marjan Krokter s.p., proizvajalec in serviser laboratorijske opreme,
- filter papir: črni trak, 41 Ashless, circles, 110 milimetrov premera, Whatman,
- HPTLC plošča: silikagelska (60), F₂₅₄ plošča, steklena, 20 x 10 cm, debelina plasti 0,2 mm, (1.05642), Merck,
- avtomatska nanašalna naprava: CAMAG TLC LINOMAT V, Camag,
- kromatografska kad, obložena s filter papirjem,
- sušilnik za lase: Remington,
- naprava za potapljanje plošč: CAMAG Chromatogram immersion device III, Camag,
- sušilnik: Kambič laboratorijska oprema,
- denzitometer: CAMAG TLC SCANNER 4, Camag,
- kamera: CAMAG TLC VISUALIZER, Camag.

4 POTEK DELA

4.1 MAKROSKOPSKI PREGLED RASTLINE ZA OCENO MORFOLOŠKIH LASTNOSTI

V naravi smo nabrali in izkopali sveže svetoče rastline obeh vrst jegličev, *P. elatior* in *P. veris*. Iz vsake vrste smo vzeli 10 rastlin in iz njih očistili zemljo in blato, plevel in ostale dele, ki ne sodijo zraven in rastline natančno pregledali. Pri tem smo opazovali morfološke lastnosti korenike in korenin, listov, stebela in cvetov s čašicami.

4.2 PRIPRAVA RAZTOPINE STANDARDA (RS)

Pri HPTLC analizi smo najprej pripravili raztopino standarda.

V 10 mL merilno bučko smo natančno natehtali približno 2,5 mg standarda primula kisline I (natehta: 3,354 mg, mikrotehnica), ga raztopili v približno 4 mL metanola in dopolnili z metanolom do oznake volumna. Tako smo dobili prvo raztopino, ki smo jo označili z RS1. Ta raztopina je po pripravi stabilna še tri mesece (opravljena bila validacija glede na padec vsebnosti primula kisline I, ki jo je opravila tovarna zdravil Krka, d. d., Novo mesto).

Nato smo v 10 mL merilno bučko odpipetirali 1,0 mL raztopine RS1 in dopolnili z metanolom do oznake volumna. Tako smo dobili raztopino standarda (RS).

Raztopino standarda smo pripravili enkrat in uporabili za razvijanje kromatograma pri vseh šestih vzorcih, ki smo jih analizirali.

Sledila je priprava raztopin vzorcev.

4.3 PRIPRAVA RAZTOPINE VZORCA (RV)

Posamezni vzorec, posušene in narezane korenine jegliča, smo stresli v kavni mlinček in zmleli. Zmleto vsebino smo prenesli v petrijevko in vzorec z mešanjem s spatulo

homogenizirali. Hkrati smo izvedli makroskopski pregled zmlete droge, pri čemer smo opazovali barvo in vonj vseh šestih vzorcev. Pozorni smo bili na pojavnost iste barve in vonja znotraj posamezne vrste jegliča. V 50 mL okroglo bučko smo na analitski tehcnici natehtali približno 1,0 g zmletega, homogeniziranega vzorca.

Natehte:

- PE1: 1,00067 g,
- PE2: 1,00068 g,
- PE3: 1,00277 g,
- PV1: 1,00026 g,
- PV2: 1,00545 g,
- PV3: 1,00570 g.

Nato smo k natehti v 50 mL okroglo bučko dodali 10 mL 70 % etanola in segrevali ob uporabi povratnega hladilnika 15 minut na vodni kopeli pri 95 °C, tako da je mešanica zmerno vrela. Vsebino smo ohladili in filtrirali preko filter papirja v 20 mL merilno bučko. Filter papir smo sprali s 70 % etanolom in dopolnili merilno bučko s 70 % etanolom do oznake volumna. Tako smo dobili raztopino, ki smo jo označili z RV2.

V nadaljevanju smo v 50 mL merilno bučko odpipetirali 2,0 mL raztopine RV2 in dopolnili z metanolom do oznake volumna. Tako smo dobili raztopino, ki smo jo označili z RV1.

Nato smo v 10 mL merilno bučko odpipetirali 5,0 mL raztopine RV1 in dopolnili z metanolom do oznake volumna. Tako smo dobili raztopino vzorca (RV). Po enakem postopku smo pripravili raztopine vzorcev za vseh 6 vzorcev korenin jegliča in jih označili sledeče:

- RV-PE1,
- RV-PE2,
- RV-PE3,
- RV-PV1,
- RV-PV2,
- RV-PV3.

Sledilo je nanašanje raztopine standarda in vzorcev na HPTLC plošče.

4.4 NANAŠANJE RAZTOPINE STANDARDA IN VZORCA NA HPTLC PLOŠČO

Nanašali smo s pomočjo avtomatske nanašalne naprave:

- nanos v črti,
- volumen nanosov in shema nanosa (raztopini standarda in vzorca se nanašata izmenoma, 14 nanosov, 8-krat standard, 6-krat vzorec):

RS	RV	RS	RV	RS	RV	RS	RS	RV	RS	RV	RS	RV	RS
7	5	9	5	11	5	13	7	5	9	5	11	5	13
μL	μL	μL	μL	μL	μL	μL	μL	μL	μL	μL	μL	μL	μL

- dolžina nanosa 8 mm,
- presledek 4 mm,
- hitrost nanašanja 150 nL/sekundo,
- linija nanašanja približno 1 cm od spodnjega roba plošče.

Po nanosu smo dali HPTLC plošče razvijati v kromatografsko kadičko z ustrezno mobilno fazo.

4.5 RAZVIJANJE KROMATOGRAMA

Preden smo v kromatografsko kadičko vstavili HPTLC ploščo z nanešeno raztopino vzorca in standarda, smo vanjo nalili mobilno fazo, butanol : metanol : koncentrirani amoniak v razmerju 50 : 10 : 25, manj kot 1cm visoko, da je bilo dno popolnoma pokrito in izvajali nasičenje približno eno uro. Po vstavljanju plošče HPTLC smo kromatogram razvijali približno 7 cm ascendentno, merili smo od linije nanosa. Po razvijanju smo ploščo posušili do suhega v toku toplega zraka s sušilnikom za lase, čemur je sledilo namakanje plošče v reagent za detekcijo.

4.6 NAMAKANJE HPTLC PLOŠČE V REAGENT ZA DETEKCIJO - DERIVATIZACIJA

V kadičko naprave za potapljanje TLC plošč smo nalili raztopino reagenta za detekcijo, ki je vseboval anizaldehid in vpeli razvito ploščo HPTLC v za to namenjeno mesto. Naprava je v raztopino potopila razvito ploščo za 1 sekundo.

Ploščo smo po izvedenem postopku namakanja dali v sušilnik in sušili 10 minut pri 105 °C. Sledilo je merjenje denzitogramov na denzitometru.

4.7 KVANTIFIKACIJA

Posušeno ploščo smo vstavili v denzitometer TLC Scanner 4, Camag. Pogoji merjenja:

- metoda merjenja: remisija, ekstinkcija,
- žarnica: D₂ + W,
- valovna dolžina: 610 nm,
- reža: višina 6,0 mm, širina 0,2 mm,
- kalibracijska funkcija: $y = A \times X + B$.

Posnete denzitograme na denzitometru smo obdelali s pomočjo računalniške programske opreme WinCATS.

4.8 ISTOVETNOST PRIMULA KISLIN

Na kromatogramu (denzitogramu) raztopine vzorca (RV) moramo zaznati odziv PK-I pri isti R_f vrednosti kot na kromatogramu (denzitogramu) raztopine standarda (RS).

Pod liso PK-I se lahko na kromatogramu raztopine vzorca (RV) nahaja tudi lisa PK-II.

Približna R_f vrednost za PK-I je 0,32 in za PK-II 0,28 (povzeto po postopku Krke d. d., Novo mesto).

Izračun:

$$R_f = \frac{\text{pot spojitne}}{\text{pot mobilne faze}}$$

4.9 IZRAČUN VSEBNOSTI PRIMULA KISLIN V KORENINI JEGLIČA V mg/g SUHE DROGE

4.9.1 IZRAČUN VSEBNOSTI PK-I

$$\frac{\text{mg PK-I}}{\text{g droge}} = \frac{\bar{x}}{V} \times \frac{f}{m}$$

\bar{x} ... masa PK-I na plošči, določena denzitometrično iz enačbe kalibracijske premice (μg)

f ... faktor redčitve = 1000 (20 mL x 50 mL x 10 mL / 2 mL x 5 mL) (mL)

V ... volumen raztopine vzorca, ki se nanaša na kromatografsko ploščo = 5 μL

m ... natehta droge za pripravo vzorca (g)

4.9.2 IZRAČUN VSEBNOSTI PK-II

Iz umeritvene krivulje za PK-I izračunamo maso PK-II na plošči:

$$y = \frac{\overline{AUC} - B}{A}$$

y ... masa PK-II na plošči (μg)

\overline{AUC} ... povprečna površina kromatografskih vrhov za PK-II

A ... naklon umeritvene krivulje za PK-I

B ... odsek umeritvene krivulje za PK-I

$$\frac{\text{mg PK-II}}{\text{g droge}} = \frac{y \times f \times 1,11}{V \times m}$$

y ... izračunana masa PK-II na plošči (μg)

f ... faktor redčitve = 1000 (20 mL x 50 mL x 10 mL / 2 mL x 5 mL) (mL)

1,11 ... korekcijski faktor

V ... volumen raztopine vzorca, ki se nanaša na kromatografsko ploščo = $5\mu\text{L}$

m ... natehta droge za pripravo vzorca (g)

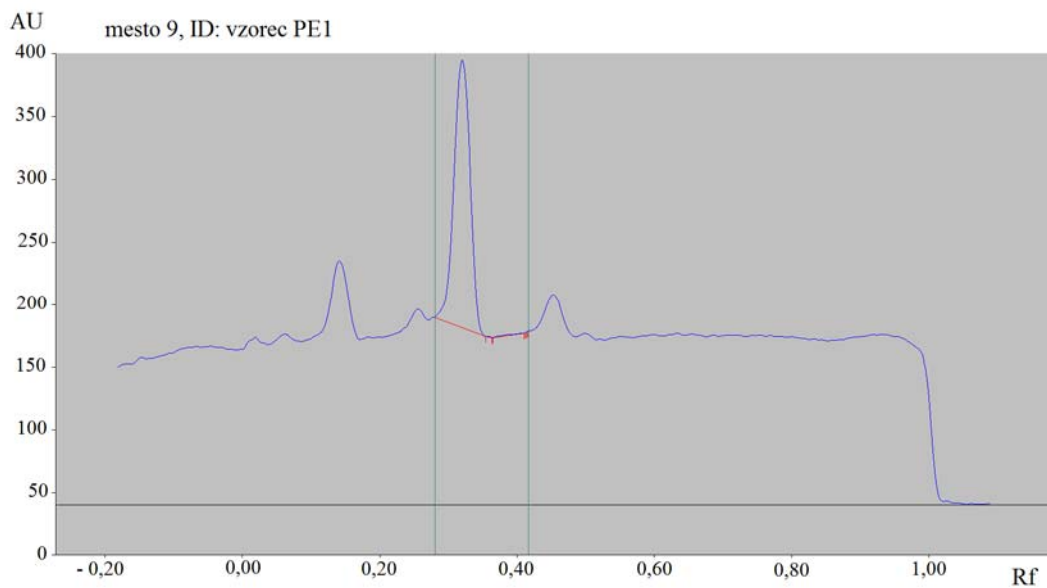
5 REZULTATI

5.1 MAKROSKOPSKI PREGLED RASTLINE

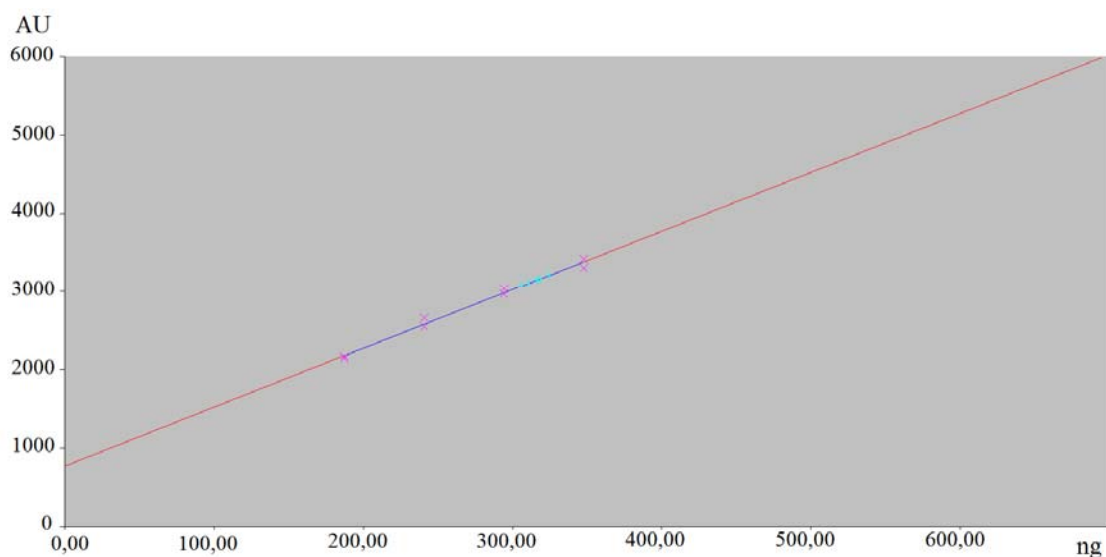
Preglednica III: Primerjava med P. elatior in P. veris po makroskopskem pregledu svežih cvetočih rastlin in zmlate droge.

<i>P. elatior</i>		<i>P. veris</i>
	SVEŽE KORENINE	
svetlo rjave	barva	svetlo rumene
brez	vonj	brez
poganjajo iz korenike	izhodišče	poganjajo iz korenike
	SVEŽA KORENIKA	
rjave barve	barva	rjave barve
brez	vonj	brez
rahlo zavita	zavitost	rahlo zavita
3-8 cm	dolžina korenike	2-5 cm
	SVEŽI LISTI	
pritlično, v obliki rozete	namestitev	pritlično, v obliki rozete
zelena	barva	zelena
narobe jajčasti	oblika listne ploskve	narobe jajčasti
naguban	listni rob	naguban
dlakavi na obeh straneh	dlakavost	dlakavi na obeh straneh
enostavni, celi	oblika	enostavni, celi
pernato, mrežasto žilnati	razporeditev žil	pernato, mrežasto žilnati
5-10	število listov	6-10
	SVEŽE STEBLO	
zelena	barva	zelena
kratkodlakavo	dlakavost	kratkodlakavo
ne	olistanost	ne
15-25 cm	dolžina	18-27 cm
1-2	število stebel	1-2

	SVEŽI CVETOVI	
kobulasto, na vrhu stebila	socvetje	kobulasto, na vrhu stebila
zelena	barva cvetnih pecljev	zelena
kratkodlakavi	dlakavost cvetnih pecljev	kratkodlakavi
zelena	barva čaše	zelena
kratkodlakava	dlakavost čaše	kratkodlakava
ozka, prilega se ob venčno cev	oblika čaše	napihnjena, odmaknjena od venčne cevi
ozki, ostri	oblika zobcev na čaši	jajčasti
zrasli	čašni listi zrasli/nezrasli	zrasli
živo rumena	barva venčne cevi	živo rumena
živo rumen obroč v goltu	barva goltu/posebnosti	v goltu 5 oranžnih lis
bledo rumen	barva cvetnega venca	živo rumen
razprostrt	rob cvetnega venca	tvori lijak
zrasli	venčni listi zrasli/nezrasli	zrasli
brez vonja	vonj cvetov	po medu
5-15	število cvetov	5-18
zvezdasti	oblika cvetov	zvezdasti
dvospolni	spol cvetov	dvospolni
5-števni	števnost cvetov	5-števni
nadrasla, ena	plodnica	nadrasla, ena
5	število prašnikov	5
1	število pestičev	1
večji od <i>P. veris</i>	velikost cvetov	manjši od <i>P. elatior</i>
	ZMLETA DROGA	
vsi trije vzorci (PE1, PE2, PE3) so imeli nekoliko močnejši vonj, ki je spominjal na vonj metilnega estra salicilne kisline	vonj	vsi trije vzorci (PV1, PV2, PV3) so imeli sladek začimbni vonj, ki je spominjal na vonj sladkega janeža
pri vseh treh vzorcih prisotna sivo-rjava barva	barva	pri vseh treh vzorcih prisotna sivo-rumena barva



Slika 25: Densitogram vzorca PE1. AU = signal pri merjenju absorbance.



Slika 26: Graf umeritvene premice za PE1. AU = površina kromatografskih vrhov.

Graf umeritvene premice (Slika 26):

- enačba premice: $y = 771,4 + 7,506 * x$,
- $r = 0,99400$,
- RSD = 2,103 %.

Povprečna masa PK-I na plošči je 315,40 ng.

mg PK-I/g droge = 63,04 mg/g = 6,3 %

PK-II prisotna v sledovih (na denzitogramu viden zelo majhen vrh pri Rf 0,28. Pri izračunu za vsebnost PK-II je bil rezultat negativen, kar kaže na to, da so vsebnosti tako majhne, da izračun ni možen).

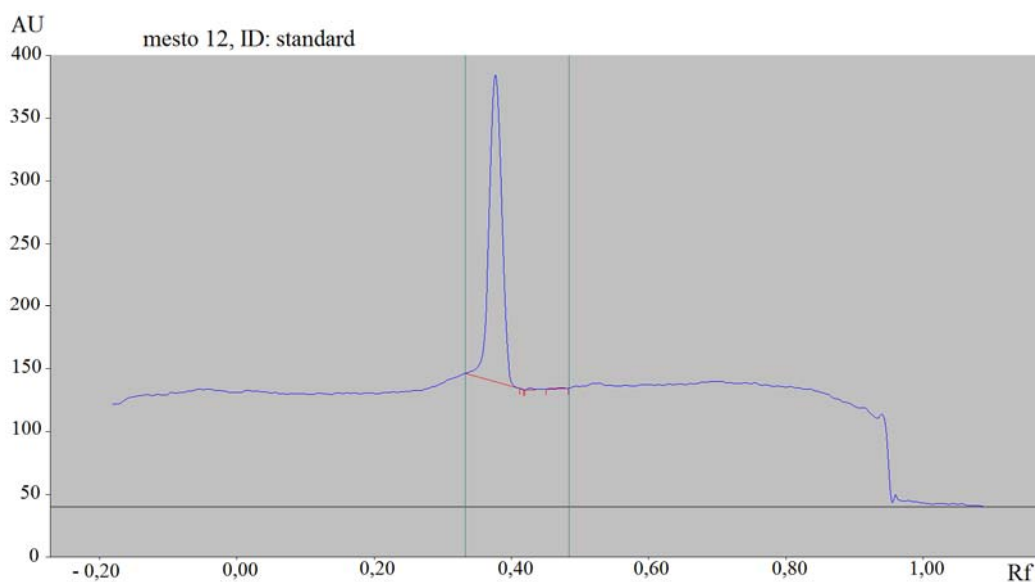
Na kromatogramu so vidne 4 lise (Slika 27):



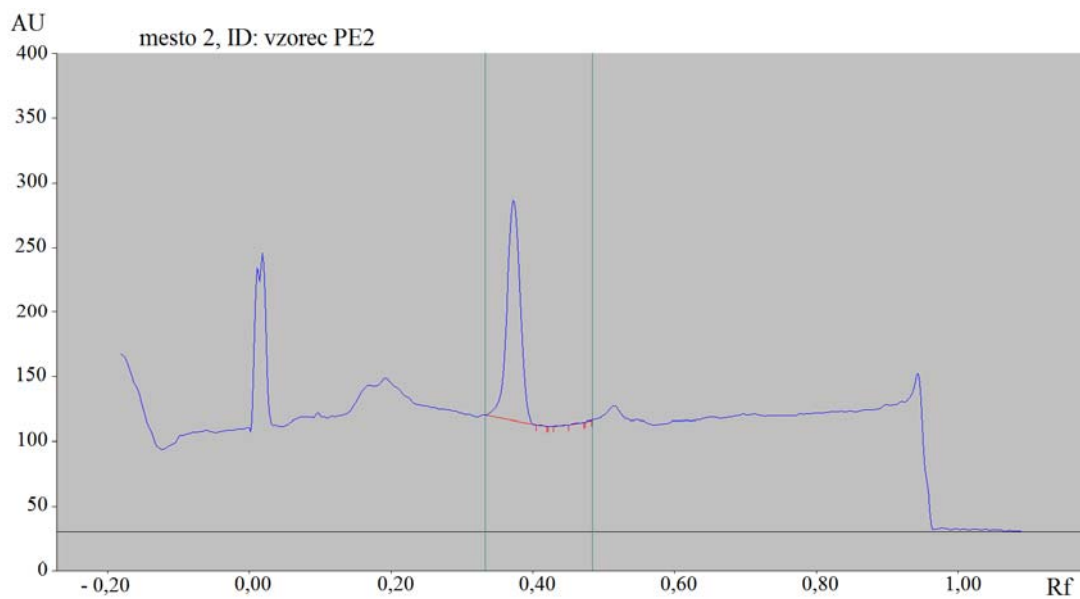
Slika 27: Kromatogram vzorca PE1.

Povprečni Rf za PK-I je 0,33. Povprečni Rf za PK-II je 0,28.

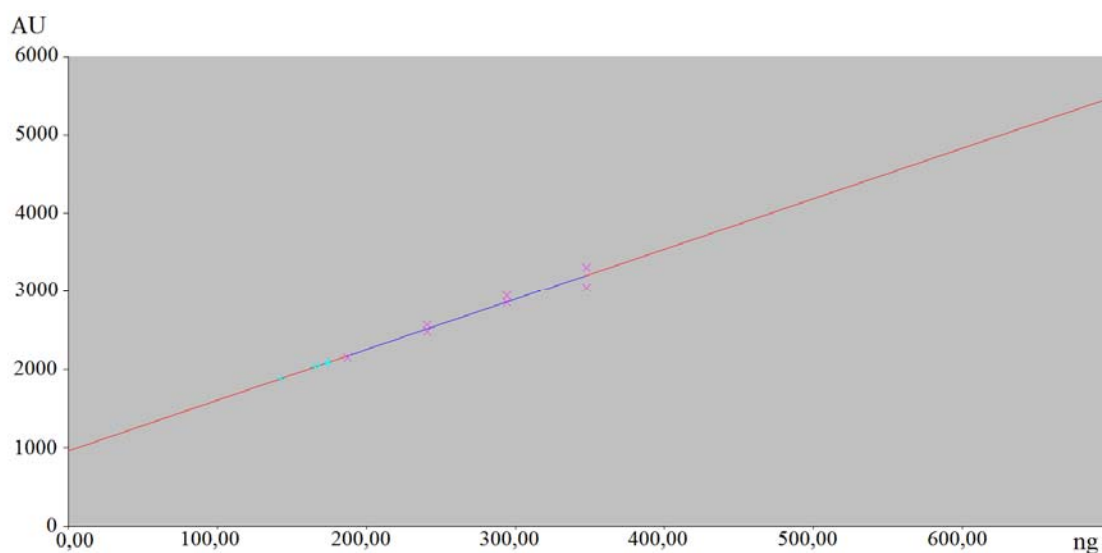
5.2.2 REZULTATI HPTLC ANALIZE VZORCA PE2



Slika 28: Denzitogram standarda. AU = signal pri merjenju absorbance.



Slika 29: Densitogram vzorca PE2. AU = signal pri merjenju absorbance.



Slika 30: Graf umeritvene premice za PE2. AU = površina kromatografskih vrhov.

Graf umeritvene premice (Slika 30):

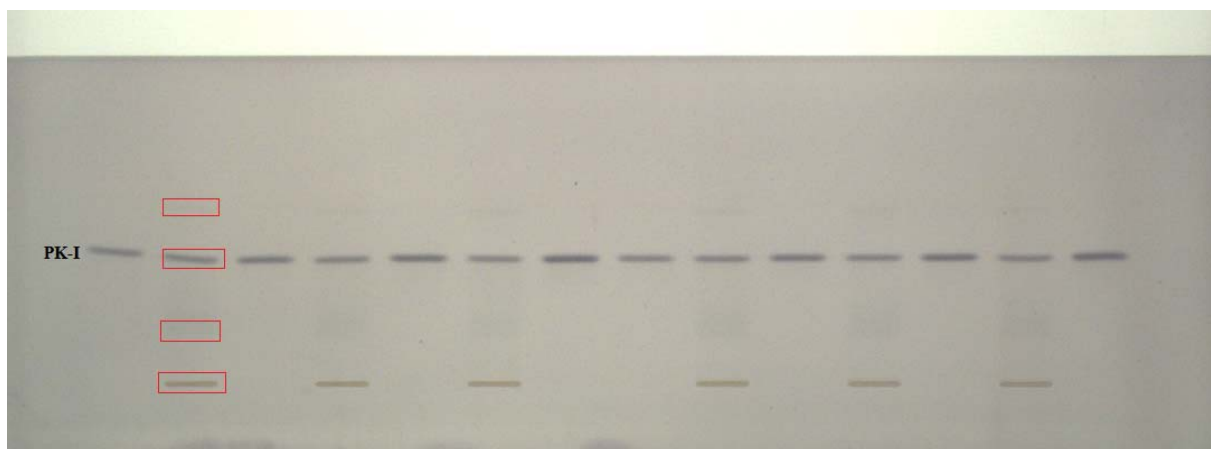
- enačba premice: $y = 958,7 + 6,457 * x$,
- $r = 0,98027$,
- RSD = 7,263 %.

Povprečna masa PK-I na plošči je 166,29 ng.

mg PK-I/g droge = 33,24 mg/g = 3,3 %

PK-II ni prisotna (ni vidnega vrha na denzitogramu).

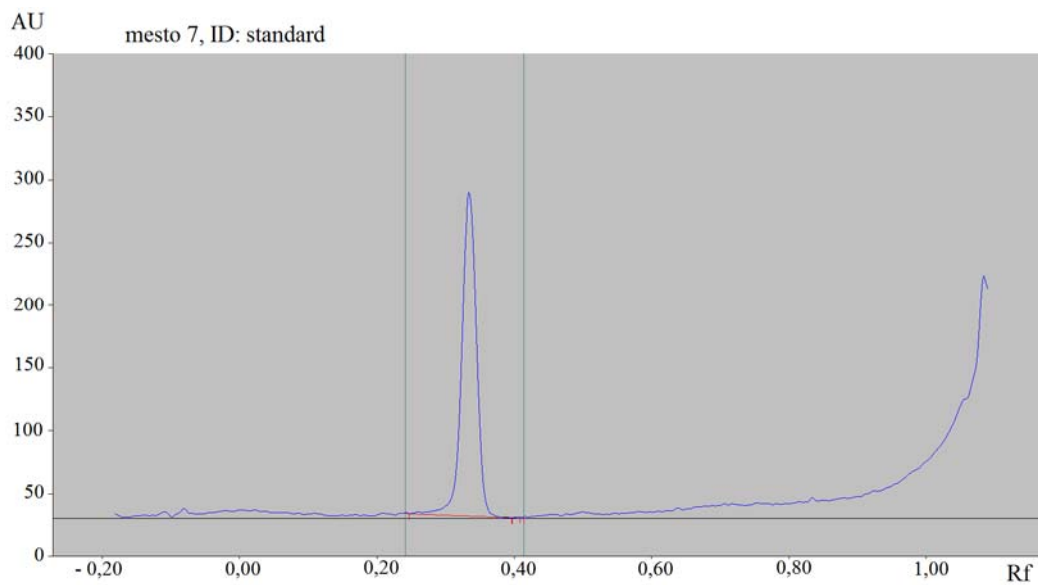
Na kromatogramu so vidne 4 lise (Slika 31):



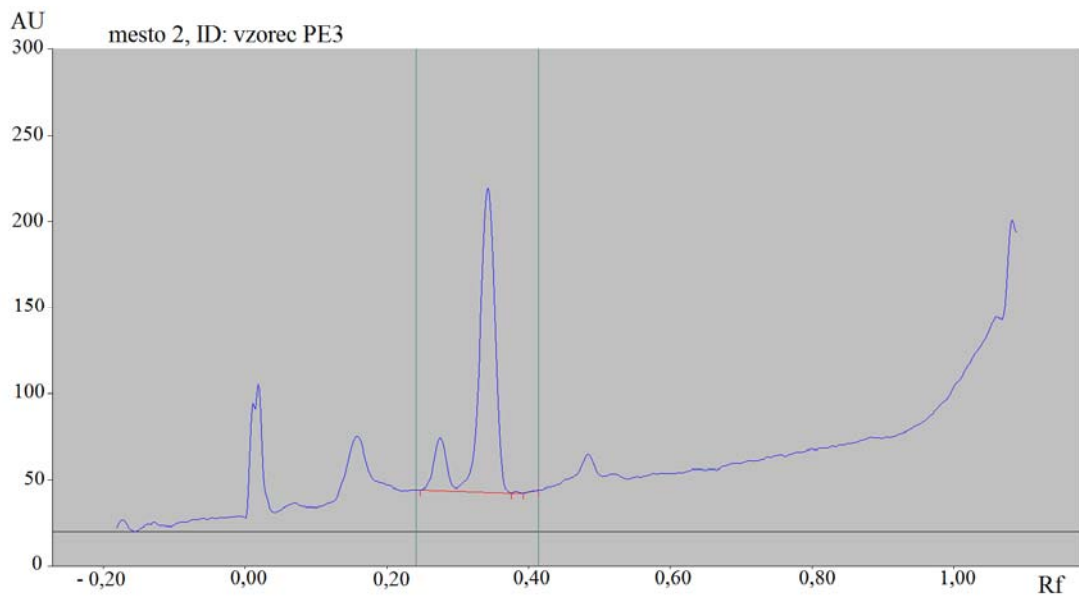
Slika 31: Kromatogram vzorca PE2.

Povprečna Rf vrednost za PK-I je 0,37.

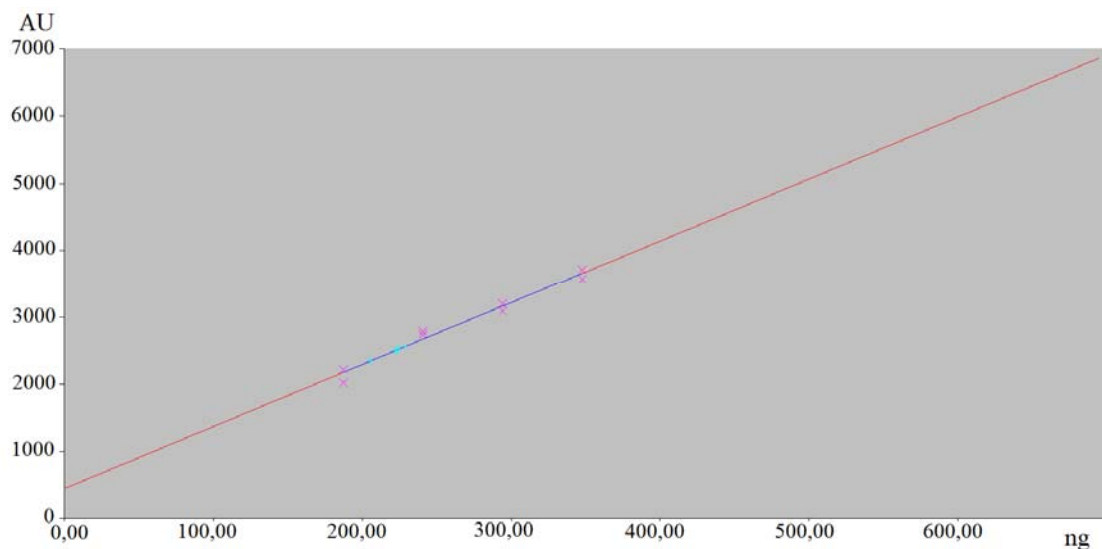
5.2.3 REZULTATI HPTLC ANALIZE VZORCA PE3



Slika 32: Denzitogram standarda. AU = signal pri merjenju absorbance.



Slika 33: Denzitogram vzorca PE3. AU = signal pri merjenju absorbance.



Slika 34: Graf umeritvene premice za PE3. AU = površina kromatografskih vrhov.

Graf umeritvene premice (Slika 34):

- enačba premice: $y = 440,7 + 9,239 * x$,
- $r = 0,98739$,
- $RSD = 3,657 \%$.

Povprečna masa PK-I na plošči je 221,31 ng.

mg PK-I/g droge = 44,14 mg/g = 4,4 %

PK-II prisotna v sledovih (na denzitogramu viden zelo majhen vrh pri Rf 0,24. Pri izračunu za vsebnost PK-II je bil rezultat negativen, kar kaže na to, da so vsebnosti tako majhne, da izračun ni možen).

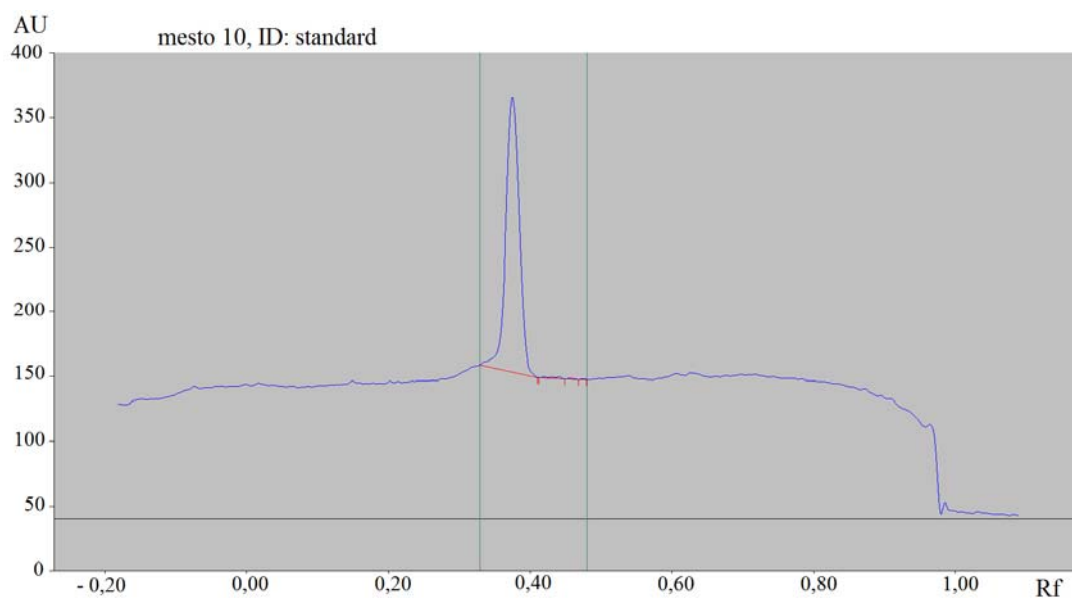
Na kromatogramu je vidnih 5 lis (Slika 35):



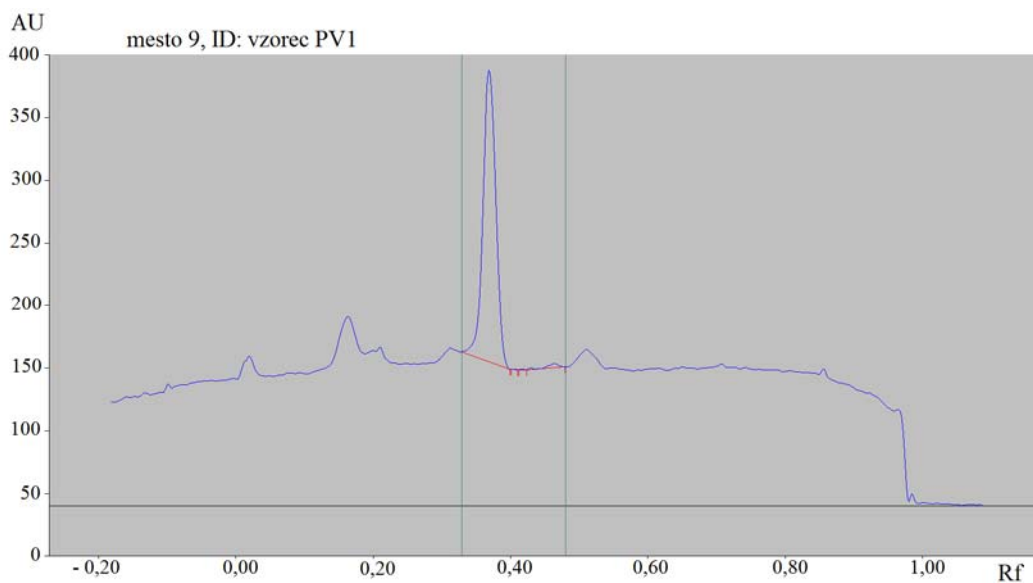
Slika 35: Kromatogram vzorca PE3.

Povprečna Rf vrednost za PK-I je 0,30. Povprečna Rf vrednost za PK-II je 0,24.

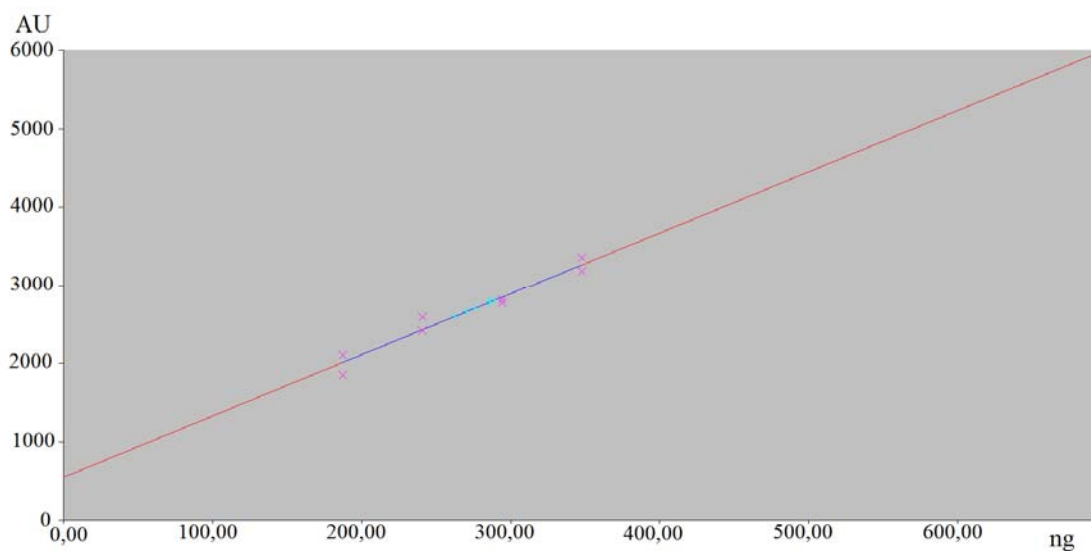
5.2.4 REZULTATI HPTLC ANALIZE VZORCA PV1



Slika 36: Denzitogram standarda. AU = signal pri merjenju absorbance.



Slika 37: Denzitogram vzorca PV1. AU = signal pri merjenju absorbance.



Slika 38: Graf umeritvene premice za PV1. AU = površina kromatografskih vrhov.

Graf umeritvene premice (Slika 38):

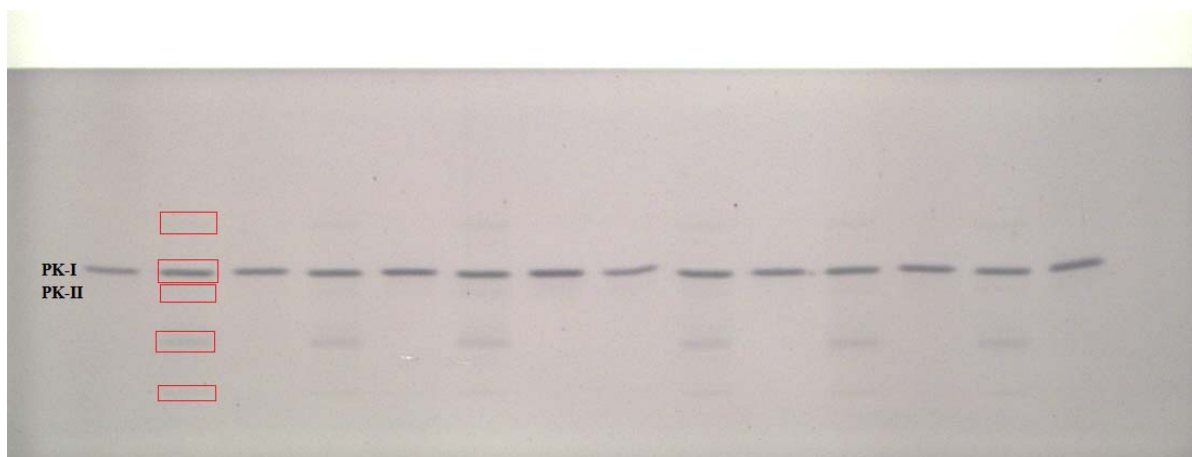
- enačba premice: $y = 550,2 + 7,807 * x$,
- $r = 0,97687$,
- RSD = 3,731 %.

Povprečna masa PK-I na plošči je 278,28 ng.

mg PK-I/g droge = 55,64 mg/g = 5,6 %

PK-II prisotna v sledovih (na denzitogramu viden zelo majhen vrh pri Rf 0,32. Pri izračunu za vsebnost PK-II je bil rezultat negativen, kar kaže na to, da so vsebnosti tako majhne, da izračun ni možen).

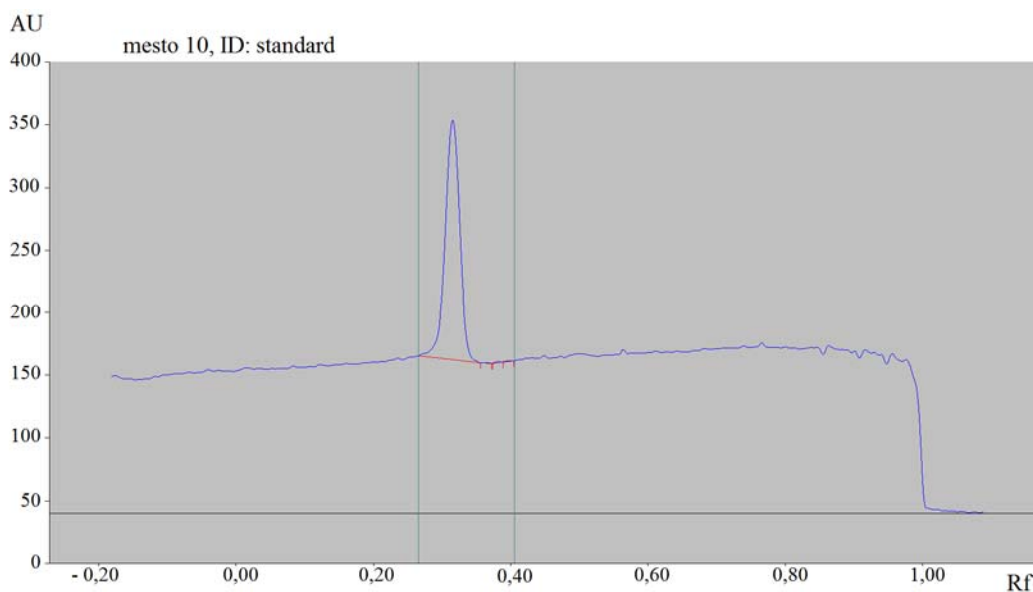
Na kromatogramu je vidnih 5 lis (Slika 39):



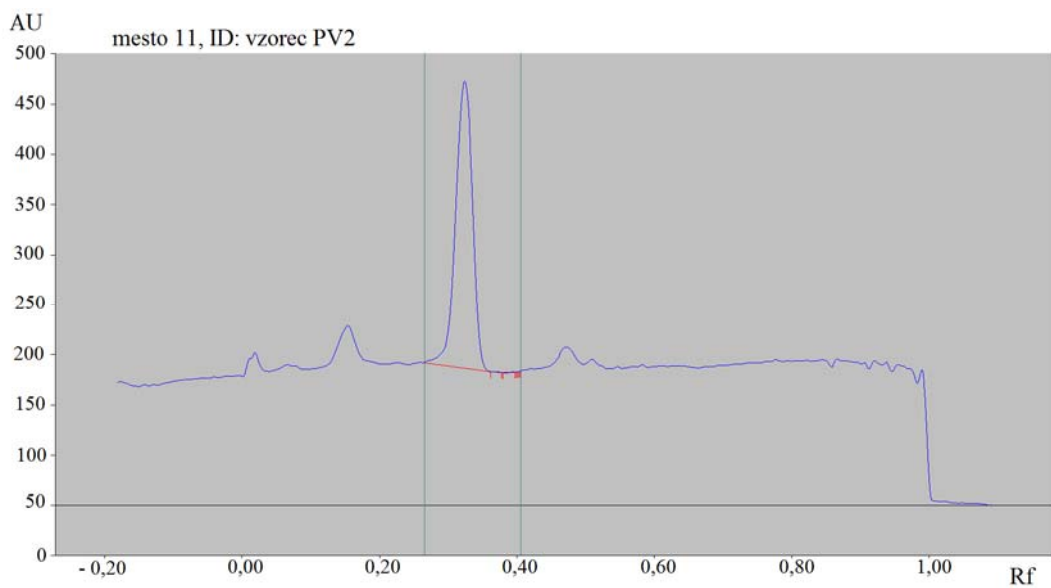
Slika 39: Kromatogram vzorca PV1.

Povprečna Rf vrednost za PK-I je 0,37. Povprečna Rf vrednost za PK-II je 0,32.

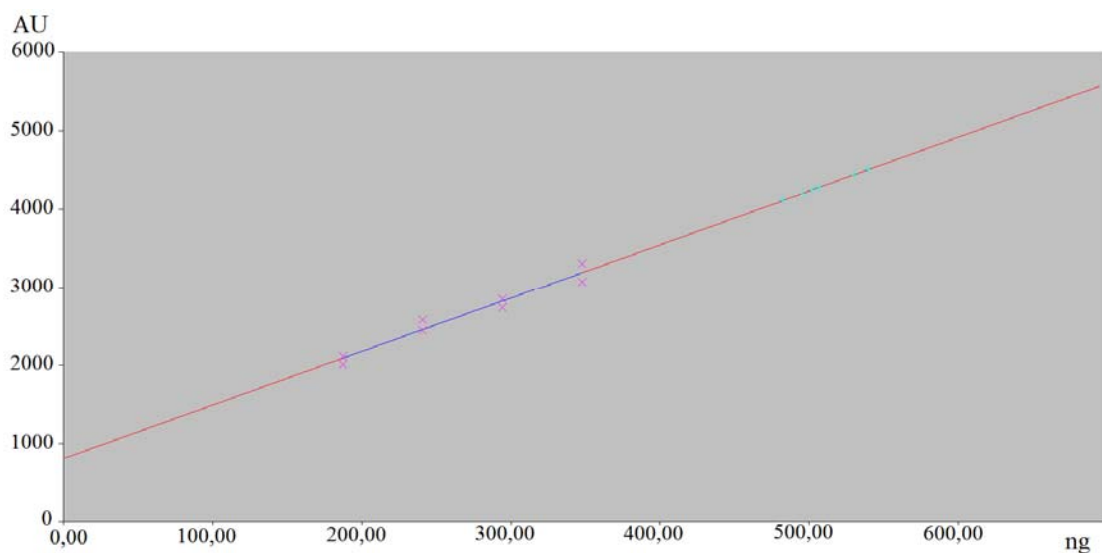
5.2.5 REZULTATI HPTLC ANALIZE VZORCA PV2



Slika 40: Denzitogram standarda. AU = signal pri merjenju absorbance.



Slika 41: Denzitogram vzorca PV2. AU = signal pri merjenju absorbance.



Slika 42: Graf umeritvene premice za PV2. AU = površina kromatografskih vrhov.

Graf umeritvene premice (Slika 42):

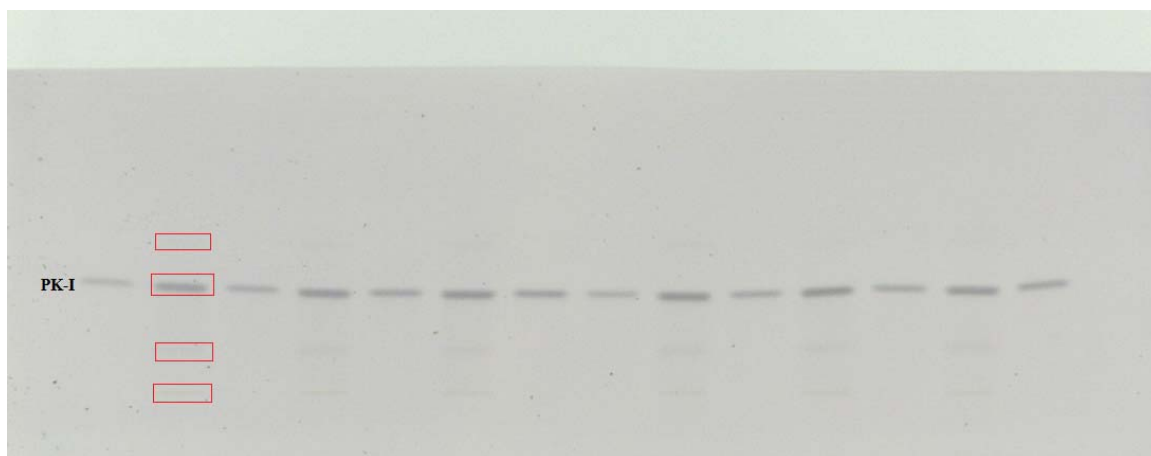
- enačba premice: $y = 807,6 + 6,849 * x$,
- $r = 0,97863$,
- RSD = 4,230 %.

Povprečna masa PK-I na plošči je 509,41 ng.

mg PK-I/g droge = 101,33 mg/g = 10,1 %

PK-II ni prisotna (ni vidnega vrha na denzitogramu).

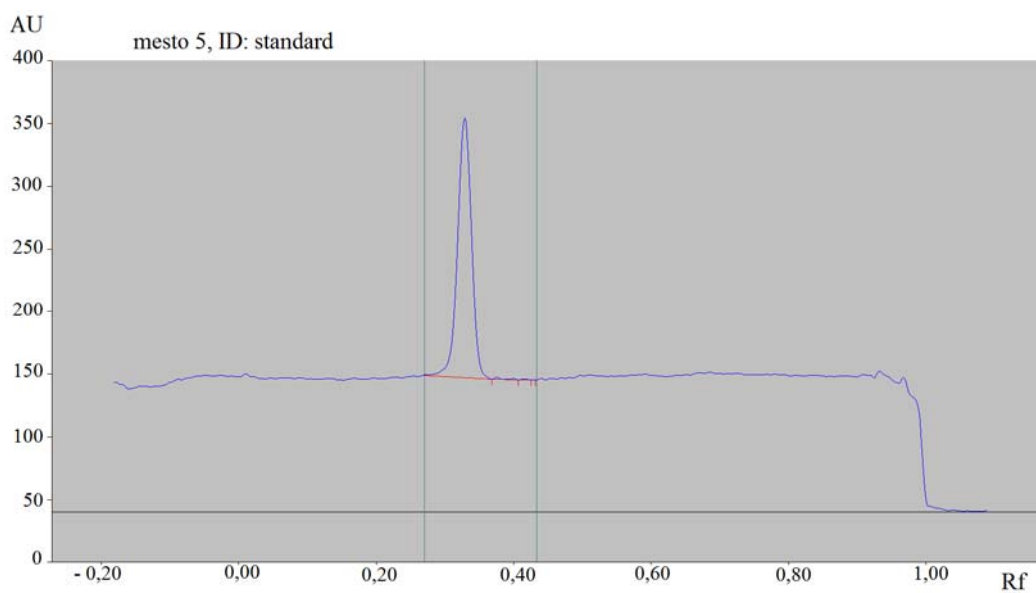
Na kromatogramu so vidne 4 lise (Slika 43):



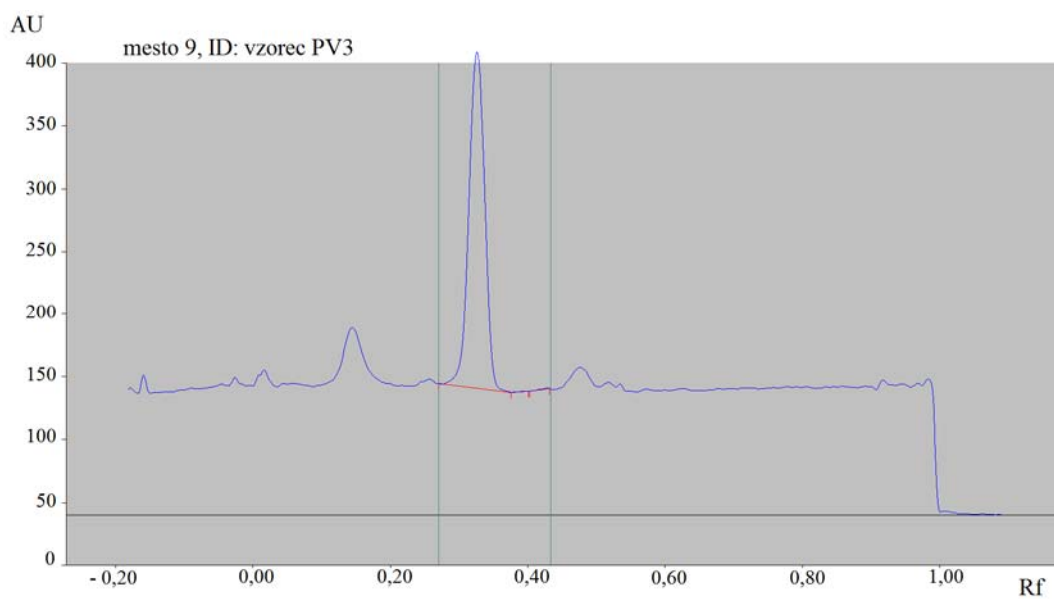
Slika 43: Kromatogram vzorca PV2.

Povprečna Rf vrednost za PK-I je 0,32.

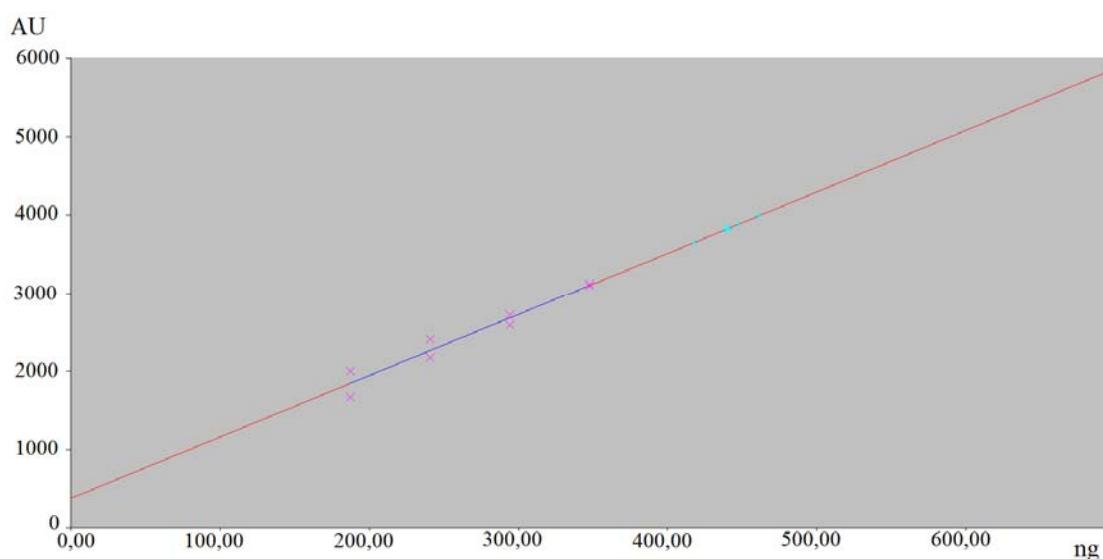
5.2.6 REZULTATI HPTLC ANALIZE VZORCA PV3



Slika 44: Denzitogram standarda. AU = signal pri merjenju absorbance.



Slika 45: Denzitogram vzorca PV3. AU = signal pri merjenju absorbance.



Slika 46: Graf umeritvene premice za PV3. AU = površina kromatografskih vrhov.

Graf umeritvene premice (Slika 46):

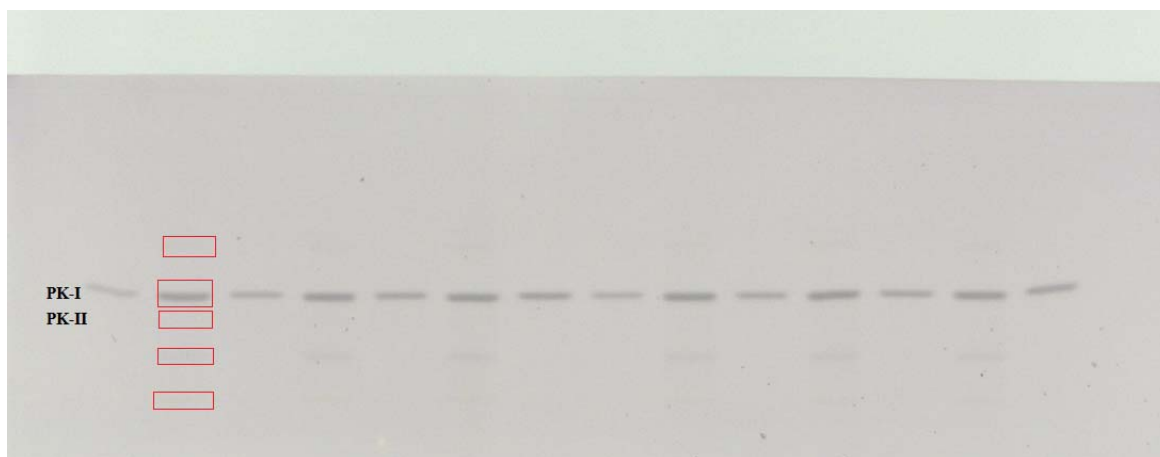
- enačba premice: $y = 376,6 + 7,842 * x$,
- $r = 0,97405$,
- $RSD = 3,154 \%$.

Povprečna masa PK-I na plošči je 440,98 ng.

mg PK-I/g droge = 87,70 mg/g = 8,8 %

PK-II prisotna v sledovih (na denzitogramu viden zelo majhen vrh pri Rf 0,24. Pri izračunu za vsebnost PK-II je bil rezultat negativen, kar kaže na to, da so vsebnosti tako majhne, da izračun ni možen).

Na kromatogramu je vidnih 5 lis (Slika 47):



Slika 47: Kromatogram vzorca PV3.

Povprečna Rf vrednost za PK-I je 0,33. Povprečna Rf vrednost za PK-II je 0,24.

6 RAZPRAVA

Glede na rezultate, ki smo jih dobili pri makroskopskem pregledu droge, vidimo, da lahko obe vrsti jegliča enostavno in zelo dobro ločimo na podlagi svežih cvetočih rastlin.

Razlika se opazi že na nivoju korenin, ki so pri *P. elatior* svetlo rjave pri *P. veris* pa svetlo rumene barve, hkrati pa samo na podlagi barve korenin, v primeru da je rastlina že odcvetela, ne moremo zagotovo ločiti vrsti, saj je opredelitev barve zelo relativna in je lahko za nekoga svetlo rumeno bolj podobno svetlo rjavemu. Če pogledamo s stališča korenike, je opaziti, da je pri *P. elatior* korenika nekoliko daljša (v povprečju približno za 2 cm), vendar je to v veliki meri odvisno od samih okoliščin, v katerih rastlina raste, in od starosti rastline.

Pri listih in stebelu med vrstama ni opaziti razlik, v obeh primerih imajo tako listi kot stebela enake karakteristike.

Velike razlike so opazne na nivoju cvetov. Kot prvo vidimo, da je razlika vidna v cvetni čaši, ki je pri *P. elatior* ozka, prirasla ob venčno cev, z ostrimi zobci, pri *P. veris* pa je čaša napihnjena, odmaknjena od venčne cevi, z jajčastimi zobci. Cvetovi *P. elatior* imajo živo rumeno venčno cev, ki tvori živo rumen obroč v goltu cveta, cvetni venec je blede rumen, rob cvetnega venca pa razprostrt, medtem ko so cvetovi *P. veris* v celoti živo rumeni, v goltu pa je vidnih 5 oranžnih lis, rob cvetnega venca pa tvori lijak. Razlike so opazne tudi pri vonju cvetov in velikosti, cvetovi *P. elatior* so brez vonja in večji, cvetovi *P. veris* dišijo po medu in so manjši od cvetov *P. elatior*.

Rezultati makroskopskega pregleda rastline potrjujejo do sedaj že znane morfološke opise rastlin, ki jih navajajo literaturni viri (1, 4, 7, 8, 13).

Kar se tiče razlik med obema vrstama, na podlagi mikroskopskega pregleda droge, torej korenine jegliča obeh vrst, smo v literaturi zasledili podatek, da so v drogi vrste *P. elatior*, prisotne rumeno-zelene, močno pikčaste kamnite celice (7, 13). Na podlagi tega podatka lahko sklepamo, da bi se dalo s pomočjo te karakteristike drogo, ki bi pripadala posamezni vrsti, ločiti, vendar bi morali zagotovo vedeti, da droga vsebuje korenine le ene vrste. Če pri mikroskopskem pregledu droge teh celic ne opazimo, lahko zagotovo trdimo, da droga

izhaja izključno iz vrste *P. veris*. Če pa so celice prisotne, ne moremo z gotovostjo trditi, da so v drogi prisotne le korenine *P. elatior*.

Pred pričetkom analize droge s pomočjo HPTLC smo morali pridobiti vzorce. Pri samem rokovanju z drogo, ki smo jo dobili iz botaničnih vrtov ali jo pridobili sami z nabiranjem in sušenjem, smo lahko zaznali vonj posamezne droge. Kot navajajo že viri, ima droga *P. elatior* vonj po metilnem estru salicilne kisline, droga *P. veris* pa po sladkem janežu (7). Z gotovostjo lahko trdimo, da sta bila ta dva vonja zaznana pri delu z drogo posameznih vrst. Prav tako smo pri rezanju in mletju droge v postopku priprave raztopine vzorca za analizo HPTLC zaznali dražeč občutek prahu, ki pri tem nastane in nas je sililo h kašlju. Draženje dihal in siljenje h kašlju sta navedena kot dva izmed stranskih učinkov pri rokovanju z drogo (3).

S pomočjo analize HPTLC smo želili potrditi istovetnost in vsebnost primula kislin v korenini jegliča. Celoten postopek izvedbe HPTLC je bil hiter, kar ima veliko prednosti v vsakodnevni rabi metode, saj lahko v kratkem času analiziramo veliko vzorcev in dobimo veliko število rezultatov. Lise na razvitih kromatogramih so se lepo ločile in so bile po obarvanju tudi lepo vidne.

Na kratko si pogledjmo zbrane rezultate HPTLC analize v preglednici IV in V:

Preglednica IV: Rezultati HPTLC analize za *P. elatior*.

vzorec	PE1- Žalec	PE2- Jezersko	PE3- Čepovan	povprečje
mg PK-I/g droge	63,04 mg/g	33,24 mg/g	44,14 mg/g	46,80 mg/g
%	6,3 %	3,3 %	4,4 %	4,7 %
PK-II	v sledovih	/	v sledovih	
Rf PK-I	0,33	0,37	0,30	0,33
Rf PK-II	0,28	/	0,24	0,26
lisa na startu	odsotna	močna	srednje močna	
lisa pri Rf 0,14	šibka	šibka	šibka	
lisa pri Rf 0,48	srednje močna	šibka	šibka	

Preglednica V: Rezultati HPTLC analize za *P. veris*.

vzorec	PV1- Nemčija	PV2- Trnovo	PV3 Srednji vrh	povprečje
mg PK-I/g droge	55,64 mg/g	101,33 mg/g	87,70 mg/g	81,56 mg/g
%	5,6 %	10,1 %	8,8 %	8,2 %
PK-II	v sledovih	/	v sledovih	
Rf PK-I	0,37	0,32	0,33	0,34
Rf PK-II	0,32	/	0,24	0,28
lisa na startu	šibka	šibka	šibka	
lisa pri Rf 0,14	srednje močna	šibka	šibka	
lisa pri Rf 0,48	šibka	šibka	šibka	

Potrdili smo prisotnost PK-I v obeh vrstah jegliča, kar je bil tudi pričakovan rezultat. Kar se tiče PK-II, smo pričakovali, glede na podatke, ki jih navajajo viri, da se PK-II pojavlja le v *P. veris* (19), vendar smo to hipotezo ovrgli. Rezultati namreč kažejo prisotnost PK-II v obeh vrstah, vidimo pa tudi, da ni nujno prisotna, na kar kažeta izpad prisotnosti PK-II pri vzorcih PE2 in PV2. Vsebnost PK-II torej ni pogojena z vrsto, niti ne moremo potrditi, da bi bila vsebnost pogojena z rastiščem. Vzorec PE2 je bil nabran na Gorenjskem in v njem PK-II ni prisotna. Na Gorenjskem je bil nabran tudi vzorec PV3, ki kaže na prisotnost PK-II. Če pogledamo še vzorca nabrana na Primorskem, PE3 kaže na prisotnost PK-II, v vzorcu PV2 pa je PK-II odsotna.

Pri določanju vsebnosti PK-I smo želeli potrditi literaturni podatek, da je vsebnost saponinov v korenini jegliča 3-12 % (7) in da je vsebnost saponinov v korenini *P. veris* za približno 30 % večja glede na vsebnost v korenini *P. elatior* (19). Naši rezultati so znotraj teh mej in sicer med 3,3-10,1 %, s čimer smo vsebnost potrdili. Prav tako lahko potrdimo, da je vsebnost PK-I večja v korenini *P. veris*, in sicer v našem primeru v povprečju za kar 43 % glede na vsebnost saponinov oziroma PK-I v korenini *P. elatior*.

Tukaj se pojavi vprašanje ali je vsebnost PK-I pogojena z rastiščem. Glede na pridobljene rezultate bi se lahko strinjali, da rastišče vpliva na vsebnost PK-I v korenini jegliča. Če natančneje pogledamo, vidimo, da vsebnost PK-I močno variira znotraj vrste, in sicer pri *P. elatior* so razlike vsebnosti PK-I med posameznimi vzorci med 25-47 %, pri *P. veris* pa

med 14-45 %. Tukaj je seveda treba upoštevati dejstvo, da sta bila vzorca PE1 in PV1 nabrana in skladiščena jeseni 2012, ostali vzorci (PE2, PE3, PV2, PV3) pa spomladi 2013. Kljub temu lahko potrdimo, da rastišče vpliva na vsebnost PK-I, saj so ponekod razlike skoraj za 50 %, za kar zagotovo ni vzrok pol leta dolgo skladiščenje droge. Prav tako je vidno tudi, da ima vzorec PE1 iz leta 2012 sicer največjo vsebnost znotraj svoje skupine vzorcev *P. elatior*, medtem ko vzorec PV1 znotraj svoje skupine vzorcev *P. veris* nosi najmanjšo vsebnost PK-I. Poleg tega ima droga v industriji precej daljši rok uporabe.

V postopku Krke, d. d., Novo mesto so za določanje istovetnosti in vsebnosti primula kislin navedene približne referenčne vrednosti retencijskih faktorjev primula kislin, in sicer za PK-I je $R_f = 0,32$ in za PK-II je $R_f = 0,28$. S pomočjo teh vrednosti in s pomočjo standarda je na kromatogramu (denzitogramu) opredeljeno, katera lisa v vzorcih pripada PK-I in katera PK-II. R_f PK-I iz naših vzorcev znaša v povprečju 0,34, R_f za PK-II pa 0,27.

7 SKLEP

Zdravilne rastline dobivajo vedno bolj pomembno mesto na področju zdravljenja, saj po izdelkih iz zdravilnih rastlin posega vedno več ljudi. S tem se povečuje tudi proizvodnja različnih rastlinskih pripravkov na industrijskem nivoju, to pa posledično vključuje povečano potrebo po kakovosti in istovetnosti vhodnih surovin za pripravo zdravil rastlinskega izvora. Na tem mestu pride v poštev uporaba kromatografskih tehnik, ki zagotavljajo ustrezne kromatografske prstne odtise analiziranih zdravilnih rastlin.

V ospredje smo postavili problematiko vsebnosti primula kislin v korenini jegliča. Ker sta obe vrsti jegliča (*P. elatior* in *P. veris*) vir za pridobivanje droge in ker so nosilci farmakološkega učinka saponini, ni bila nikoli posebej izpostavljena problematika glede razlik v vsebnosti primula kislin in morfoloških razlik med obema vrstama. Pri tem smo kot kromatografsko tehniko uporabili HPTLC, ki nam daje hitre, natančne in ponovljive rezultate in ima veliko prednosti pred ostalimi kromatografskimi tehnikami.

Analizo smo izvedli po postopku metode iz Krke d. d., Novo mesto. Metoda za določanje primula kislin v vhodni drogi, ekstraktu in sirupu je popolnoma identična (enaki kromatografski pogoji, priprava raztopine standarda idr.), razlika je le v pripravi raztopine vzorca oziroma v obdelavi vzorca. To pomeni, da se naši rezultati lahko primerjajo tako z rezultati vsebnosti primula kislin v korenini jegliča kot v končni farmacevtski obliki, na primer v sirupu, in lahko služijo kot uporabno orodje za nadaljnje raziskave in reševanje različnih problematik na industrijskem nivoju.

S pomočjo dobljenih rezultatov smo potrdili vsebnost in istovetnost primula kislin ter makroskopske lastnosti rastlin posamezne vrste.

Ugotovili smo, da vsebnost PK-II ni pogojena z vrsto in rastiščem. To lahko služi kot izhodišče novim raziskavam na področju jegliča tudi s pomočjo drugih kromatografskih tehnik.

Omeniti moramo še, da smo na razvitih kromatogramih zasledili še tri dodatne lise, ki pripadajo neznanim substancam. Lahko gre za druge prisotne saponine, ki se lahko

pojavi v jegliču, vendar smo ob spoznanju in zavedanju, da je rastlinski material zelo kompleksen, razmišljanje o tem, kaj bi lahko bilo, na tem mestu zaključili. To bi lahko bil eden izmed predmetov nadaljnih raziskav.

8 LITERATURA

1. Martinčič A, Wraber T, Jogan N, Ravnik V, Podobnik A, Turk B, Vreš B: *Mala flora Slovenije - ključ za določanje praprotnic in semenk*. Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 1999: 45-66, 406, 410-412.
2. Umek A: *Farmakognozija - osnove botanike, droge, 2. natis*. Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1987: 119, 192-198.
3. Prijatelj N: *Farmakognozija - rastlinske droge*. Državna založba Slovenije, Ljubljana, 2003: 94.
4. Bohinc P: *Slovenske zdravilne rastline - vodnik za nabiranje in pripravo zelišč*. Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 1979: 29, 38-39, 114.
5. <http://www2.arnes.si/~mborion4/fkg/seminar/primula.htm>, 04. 07. 2013
6. Bremness L: *Velika knjiga o zeliščih*. Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 1997: 117.
7. Wichtl M, Czygan F, Frohne D, Hiller K, Höltzel C, Nagell A, Pachaly P, Jürgen Pfänder H, Willuhn G, Buff W: *Teedrogen und Phytopharmaka - ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage, 4. Auflage*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2002: 469-470, 472-474.
8. Willfort R: *Zdravilne rastline in njih uporaba*. Založba Obzorja Maribor, Maribor, 1988: 125, 126.
9. Chevallier A: *Enciklopedija zdravilnih rastlin*. Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1998: 254.
10. Janeš D: *Samozdravljenje z zdravili naravnega izvora*. Farmaceutski vestnik, 2011; 62: 233-239.
11. Barnes J, Anderson A. L, Phillipson J D: *Herbal Medicines, Third edition*. Pharmaceutical Press, London, 2007: 195, 196.
12. ESCOP- *European Scientific Cooperative on Phytotherapy Monographs*, 1997.
13. *European Pharmacopoeia, Seventh Edition*, 2010
14. Karsten G, Weber U: *Lehrbuch der Pharmakognosie, Achte Auflage*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1956: 74.

15. Kreft S, Kočevar Glavač N, Stojilkovski K, Mlinarič A, Injac R, Novak A, Doljak B, Štrukelj B, Slanc Može P, Umek A, Lunder M, Kristl J, Janeš D, Berlec A, Sabotič J: *Sodobna fitoterapija - z dokazi podprta uporaba zdravilnih rastlin*. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2013: 127, 130.
16. Kreft S: *Izbrana zdravila naravnega izvora za zdravljenje bolezni ORL*. Farmacevtski vestnik, 2012; 63: 109-111.
17. Weiss R. F, Fintelmann V: *Herbal Medicine, Second edition*. Thieme, Stuttgart, 2000: 190-192.
18. <http://www.chem.ucalgary.ca/courses/350/Carey5th/Ch25/ch25-2-2.html>,
11. 07. 2013
19. Müller A, Ganzera M, Stuppner H: *Analysis of phenolic glycosides and saponins in Primula elatior and Primula veris (primula root) by liquid chromatography, evaporative light scattering detection and mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2006; 1112: 218-223.
20. Steinegger E, Hänsel R: *Lehrbuch der allgemeinen Pharmakognosie*. Springer-Verlag, Berlin, 1963: 147, 233-235.
21. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/30147?lang=en®ion=SI>,
22. 07. 2013
22. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/90657?lang=en®ion=SI>,
22. 07. 2013
23. Bruneton J: *Pharmacognosy, 2. izdaja*. Lavoisier publishing, Pariz, 1999: 672, 673, 675-677, 679, 680.
24. Toplak Galle K: *Zdravilne rastline na slovenskem*. Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 2002: 18, 19.
25. http://science.nasa.gov/science-news/science-at-nasa/2001/ast17apr_1/,
22. 07. 2013
26. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/sectionF/terpenoid/terp45.html>, 22. 07. 2013
27. http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8682811.htm,
23. 07. 2013
28. European Medicines Agency: *Assessment report on Primula veris L. and/or Primula elatior (L.) Hill, radix*. EMA/HMPC/113577/2012.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-HMPC_assessment_report/2013/03/WC500139589.pdf, 23. 07. 2013

29. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073170851200372X>, 23. 07. 2013
30. http://digitalerapothekergarten.uni-duesseldorf.de/zeigeBild?bild=i20100608123812_1;vorige_url=http://digitalerapothekergarten.uni-duesseldorf.de/zeigeInhaltstoffDetails?i_id=330;, 25. 07. 2013
31. http://digitalerapothekergarten.uni-duesseldorf.de/zeigeBild?bild=i20100608124838_1;vorige_url=http://digitalerapothekergarten.uni-duesseldorf.de/zeigeInhaltstoffDetails?i_id=333;, 25. 07. 2013
32. http://digitalerapothekergarten.uni-duesseldorf.de/zeigeBild?bild=i20100608125912_1;vorige_url=http://digitalerapothekergarten.uni-duesseldorf.de/zeigeInhaltstoffDetails?i_id=335;, 25. 07. 2013
33. Srivastava M: *High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)*. Springer verlag, Berlin, 2011: 3-6, 9-11, 20-21, 31-32, 42, 44-49, 57-58, 64, 107-108, 117-120, 153.
34. <http://www.kii.ntf.uni-lj.si/etolja/ekslim.htm>, 04. 08. 2013