

Usporedba morfoloških karakteristika i kemijskog sastava između vrsta *Pilosella officinarum* Vaill. i *Pilosella hoppeana* (Schult.) F.W.Schultz & Sch.Bip

Forgić, Marin

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:549222>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA

Diplomski sveučilišni studij

(Istraživanje i razvoj lijekova)

Marin Forgić

Usporedba morfoloških karakteristika i kemijskog sastava između vrsta
Pilosella officinarum Vaill. i *Pilosella hoppeana* (Schult.) F.W.Schultz &
Sch.Bip.

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA

Diplomski sveučilišni studij

(Istraživanje i razvoj lijekova)

Marin Forgić

Usporedba morfoloških karakteristika i kemijskog sastava između vrsta
Pilosella officinarum Vaill. i *Pilosella hoppeana* (Schult.) F.W.Schultz &
Sch.Bip.

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

Mentor rada: dr. sc. Stribor Marković

Diplomski rad obranjen je dana

pred povjerenstvom:

- 1.
- 2.
- 3.

Rad ima 65 stranica, 18 slika, 10 tablica i 44 literaturna navoda.

Sažetak:

Pilosella hoppeana biljka je koja se kroz prošlost koristila radi svojih ljekovitih svojstava, ponajviše radi svoje diuretičke funkcije. Uslijed manjka čvrstih dokaza o njenoj djelotvornosti, znanstvena zajednica ne uvrštava ju u ljekovito bilje. Iako su druge filogenetske vrste slične *P. hoppeana* već pomno istražene, za proučavanje *P. hoppeana* nema prevelikog interesa zbog geografskih ograničenja u kojima biljku nalazimo, te nedostatka eksperimentalnih podataka temelju kojih se mogu donijeti zaključci. U ovom istraživanju ispitivan je sastav fenolnih kiselina (klorogenske i kaveoilkinske kiseline) u *P. hoppeana* za koje se smatra da su zaslužne za ljekovita svojstva i uspoređen je s drugom vrstom, *Pilosella officinarum*, koju je Europska medicinska agencija već odobrila za liječenje bolesti mokraćnog sustava. Velika selektivnost i preciznost istraživanja postignuta je odabirom HPLC-MS kao metode za analizu spojeva. Dokazano je da *P. hoppeana* sadrži više derivata kaveoilkinjskih kiselina nego *P. officinarum* što ukazuje na jače diuretsko djelovanje. Iako je potrebno provesti još kliničkih istraživanja kako bi se dodatno potvrdila diuretička aktivnost biljke, ovo je jedan od prvih koraka ka odobravanju korištenja *P. hoppeana* u medicinske svrhe.

Ključne riječi: *Pilosella hoppeana*, *Pilosella officinarum*, klorogenska kiselina, kaveoilkininska kiselina, HPLC, MS

Summary:

Pilosella hoppeana is a plant used as a remedy throughout history due to its medicinal properties, namely diuretic effect. But, due to the lack of concrete evidence of its effectiveness, the scientific community doesn't register it a medicinal herb. Although the other phylogenetically similar species to *P. hoppeana* have already been thoroughly researched, due to geographic limitations of *P. hoppeana*, the scientific interest is lacking and there is a shortage of experimental data on the basis of which conclusions can be drawn. In this study, the composition of phenolic acids (mainly chlorogenic and caffeoylquinic acids) in *P. hoppeana*, which are believed to be responsible for its medicinal properties, was investigated and compared with another species, *Pilosella officinarum*, which has already been approved by the European Medicines Agency for the treatment of urinary tract indications. High selectivity and precision was achieved by selection of HPLC-MS as a method for the analysis of compounds of interest. It has been proven that *P. hoppeana* contains more caffeoylquinic acid derivatives than *P. officinarum*, which indicates a stronger diuretic effect. Although more clinical research is needed to further confirm the diuretic activity of the plant, this is one of the first steps towards approving the use of *P. hoppeana* for medicinal purposes.

Keywords: *Pilosella hoppeana*, *Pilosella officinarum*, chlorogenic acid, caffeoylquinic acid, HPLC, MS

Sadržaj

1.	Uvod	8
1.1.	<i>Pilosella hoppeana</i>	9
1.2.	<i>Pilosella officinarum</i>	10
1.3.	Etnofarmakologija <i>P. officinarum</i>	11
1.4.	Kemijski sastav vrste <i>Pilosella officinarum</i> i <i>P. hoppeana</i>	13
1.4.1.	Fenolske kiseline	13
1.4.2.	Ostali spojevi	17
1.5.	Eksperimentalne studije bioaktivnosti <i>P. officinarum</i>	18
1.5.1.	Diuretični učinak.....	18
1.5.2.	Antibakterijski učinak.....	19
1.5.3.	Antioksidativni učinak	20
1.5.4.	Protuupalni učinak	20
1.6.	Primjena <i>P. officinarum</i> u modernoj farmakologiji	21
1.7.	Korištene metode	21
2.	Cilj rada	23
3.	Materijali i metode	24
3.1.	Uzorkovanje	24
3.2.	Kemikalije	24
3.3.	Instrumenti i oprema	24
3.4.	Mikroskopska identifikacija	25
3.5.	Priprema uzoraka za LC/MS	26
3.6.	Priprema ekstrakata	26

3.7.	Priprema standarada za izradu kalibracijskog pravca	26
3.8.	Priprema otopina za validaciju metode	27
3.9.	Tankoslojna kromatografija (TLC)	27
3.10.	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti uparena s masenom spektrometrijom (HPLC-MS)	28
3.11.	Obrada podataka	29
4.	Rezultati	30
4.1.	Makroskopska identifikacija	30
4.2.	Mikroskopska identifikacija	30
4.3.	TLC.....	31
4.4.	HPLC/MS	32
4.4.1.	Kalibracijski pravac	32
4.4.2.	LC-UV analiza.....	35
4.4.3.	LC-UV analiza uzoraka ekstrahiranih u metanolu.....	36
4.4.4.	LC-UV analiza uzoraka ekstrahiranih u etanolu	40
4.4.5.	LC-MS	43
4.4.6.	Validacija	47
5.	Rasprava	49
6.	Zaključak	56
7.	Literatura	58
8.	Životopis	65

1. Uvod

Prema Svjetskoj organizaciji za zdravlje (WHO) tradicionalnom medicinom se smatra "znanje, vještine i praksa temeljena na teorijama, vjerovanjima i iskustvima autohtonim u različitim kulturama, koja se koristi u održavanju zdravlja i u prevenciji, dijagnozi, poboljšanju ili liječenju fizičkih i duševnih bolesti" [1]. Tradicionalna medicina bila je jedina opcija za liječenje raznih indikacija tokom ljudske povijesti. Sistemom pokušaja i pogreške čovječanstvo je kroz svoje postojanje uspjelo sakupiti veliku količinu znanja o prirodnim načinima liječenja širokog aspekta bolesti i stanja. Krajem 19. stoljeća, početkom primjene sistematizirane moderne farmakologije, ljekovito bilje postaje od sve većeg interesa.

Laka dostupnost i pristupačnost cijene u odnosu na konvencionalne lijekove herbalnu medicinu čini vrlo primamljivom široj populaciji kako u razvijenim zemljama pa tako i u zemljama u razvoju. Glavna upotreba biljnih lijekova je promicanje zdravlja i terapija kroničnih stanja, ali ne i za stanja opasna po život. Bez obzira na to zašto je pojedinac koristi, tradicionalna medicina pruža važnu zdravstvenu uslugu bilo da ljudi imaju fizički ili financijski pristup alopatskoj medicini.

Jedan od glavnih nedostataka tradicionalne biljne medicine je nedostatak sistematiziranosti i u velikom broju slučajeva, jednostavno nepoznavanje mehanizma djelovanja. Nije rijetkost da se u tradicionalnoj medicini, u prošlosti i sadašnjosti, koristi biljni lijek za neku indikaciju na koju taj specifični lijek nema učinka. U takvim slučajevima biljni lijek je patvorina. Kako bi se izbjeglo korištenje patvorina u populaciji potrebni su čvrsti znanstveni dokazi koji eksperimentima potkrjepljuju tradicionalnu uporabu biljnih lijekova za određenu indikaciju.

Jedna od biljaka koja ima vrlo dobru dokumentiranu tradicionalnu upotrebu, na temelju kojih je proveden manji broj eksperimentalnih istraživanja kako bi se potvrdila njena djelotvornost je mala runjika (*P. officinarum*). Iako je broj istraživanja malen, Europska medicinska agencija je odobrila njeno korištenje [2].

Nadalje, zbog svoje filogenetske sličnosti s malom runjikom, za hopeovu runjiku (*P. hoppeana*) također se smatra da se može koristiti za iste indikacije te postoje zapisi u kojima se navodi da se i koristila kao ljekovita biljka. Hopeova runjika je vrlo slabo istražena vrsta te postoji problem manjka literature i eksperimentalnih podataka.. Uslijed navedenog, za hopeovu runjiku ne može se reći je li ona ljekovita biljka ili zapravo patvorina. Eksperimenti u ovom radu istražuju i uspoređuju kemijski sastav obje biljke na temelju kojih se može opravdati korištenje hopeove runjike u ljekovite svrhe.

1.1. *Pilosella hoppeana*

Pilosella hoppeana (Schult.) F.W.Schultz & Sch.Bip., Hopeova runjika, vrsta je koja je izdvojena zajedno s morfološki sličnom vrstom *Pilosella officinarum* Vaill., mala runjika u zaseban rod iz roda *Hieracium* [3]. Biljna vrsta je samonikla od Turske, Bugarske, Hrvatske, Italije, Austrije, Švicarske do Njemačke. Morfološki je vrlo slična maloj runjici. Na bezlisnom stolonu razvija se jedna cvjetna glavica žute boje s crvenkastim rubom jezičastih cvjetova. Listovi se razvijaju u rozeti, gusto dlakavi na naličju bjelkaste boje, rijetko dlakavi s vrlo dugim dlakama na licu lista. Biljka je brdsko-planinska i obično je prisutna na vapnenačkim livadama te cvjeta tipično u lipnju i srpnju. Ne navodi se kao ljekovita vrsta tradicionalne primjene, za razliku od male runjike [2].

1.2. *Pilosella officinarum*

Pilosella officinarum (u literaturi također pod nazivom *Hieracium pilosella* L. *Cichoriaceae*, hrvatski mala runjika) pripada porodici *Cichorieae* (*Asteraceae*), koja sadrži više od 850 divljih vrsti i podvrsti te pripada jednom od najraznolikijih rodova u biljnom carstvu [4]. Stabljika biljke je bezlisna i uspravna uz prisutnost dlačica, visine do 30 cm. Listovi su cjelovitih rubova te rastu u prizemnoj rozeti. Na naličju listova prisutne su pahuljaste dlačice. Cvjetovi biljke su dvospolni i zigomorfni, žutog obojenja uz crvenkaste pruge na naličju vanjskih latica. Cvat je zabilježen između svibnja i kolovoza. Plod se manifestira kao ahenij s papusom te dozrijeva od srpnja do rujna [5]. *P. officinarum* postoji kao barem 5 različitih citotipa, u raspodnu od diploida i heptaploida, od kojih su neki spolni dok su drugi agamospermični (način aseksualnog razmnožavanja u kojem do rasta biljaka dolazi putem aseksualnih sjemenki). Postoji prisutnost u fenotipu s obzirom na razinu poliploidnosti te fenotipovi postaju dominantni na lokalnoj razini stabilizirani ekstenzivnim klonskim rastom [6].

Biljka je rasprostranjena na suhim livadama, vapnenačkim pašnjacima te izdancima stijena. Također, zabilježena je lokalna prisutnost na liticama i rubovima cesta [6]. Pojavljuje se u cijeloj subarktičkoj Europi, gdje je zabilježena najveća nadmorska visina 2500 m, Mont Cenis u Francuskim Alpama [7].

Rasprostranjenost u umjerenim klimama i planinskom staništu sugerira nemogućnost podnošenja visokih temperatura. Uspijeva u staništima s relativno niskom količinom padalina uz izloženost suhim vjetrovima i širokim dnevnim fluktuacijama u temperaturi. Pronalazi se na različitim tipovima tla, uglavnom niskog nutritivnog sastava. Ograničena je na tla s niskim razinama vode [6].

1.3. Etnofarmakologija *P. officinarum*

Prvo spominjanje *P. officinarum* datira u 12. stoljeće od strane njemačke benediktinske opatice svete Hildegarde od Rajne. *P. officinarum* se koristila za pripremu pića u kombinaciji s više ostalih biljaka [4]. Prva ljekovita svojstva vrste *Hieracium* opisana su 1551. godine te su joj dodijeljena adstringentna svojstva. Prema Lonitzeru, destilat Hieracuma može se koristiti za liječenje rana i groznica, smanjuje tjelesnu bol i kašalj [4]. Nadalje, opisana je djelotvornost protiv žgaravice. Prema autoru, smrvljeno lišće moglo se koristiti za liječenje crnih i upaljenih pustula kože na svim dijelovima tijela.

U Kataloniji krajem 20. stoljeća opisana su potentna diuretička svojstva – količina urina se udvostručava ili utrostručava, uz povećanu ekskreciju urina i klorida. Tinktura se koristi za liječenje hidropatije, nefritisa, ascitesa, edema i sličnih poteškoća koje zahtijevaju ekskreciju otpadnih spojeva izbjegavajući iritaciju renalnog epitela [8]. Diuretička svojstva vrste opisana su u medicini na različitim lokacijama u Europi; u Španjolskoj regiji Extremadura, uzima se kao infuzija nadzemnih dijelova; u aragonskim Pirinejima uzimala se kao hladna infuzija; i u regiji Valencije Forcall uzimala se kao dekocija nadzemnih dijelova [4]. U južnoj Bosni i Hercegovini korijenje i nadzemni dijelovi *P. officinarum* koriste se u liječenju problema s bubrežima (za otapanje bubrežnih kamenaca) i bolesti mokraćnog sustava (uglavnom infekcija i upalnih procesa poput upale prostate) ili općenito za poboljšanje mokrenja [9]. Uzimanje različitih tinktura ili otopina radi njihovih diuretičkih svojstava i u liječenju bubrežnih kamenaca također je zabilježeno u bugarskoj, njemačkoj te turskoj narodnoj medicini [10].

Krajem 20. stoljeća kao najvažnije svojstvo *P. officinarum* navedeno je njeno antimikrobno djelovanje. Koristila se protiv Malteške groznice (bruceloza) te protiv njenih patogena. Zabilježeno je da antibiotska tvar ima snažnu

difuzijsku moć i brzo prelazi u serum i urin, gdje djeluje vrlo učinkovito, posebno kod septikemije [8].

P. officinarum također nalazi korist u narodnoj medicini kao lijek protiv dijareje i intestinalnih crva. Spominje se njena korist za liječenje dizenterije, izlivanje želuca, kolere, krvavog ispljuvka te puknuća crijeva [8]. Infuzija nadzemnog dijela se u Bugarskoj koristi kao adstringent [11].

Antihemoragijska i mukolitička svojstva infuzije cijele biljke zabilježena su u Srbiji (specifično se koristila za liječenje bronhijalnih katara i jakih krvarenja) [12]. Čaj pripremljen od nadzemnih dijelova biljke koristio se za liječenje plućnih bolesti u Bosni i Hercegovini [9]. U Španjolskoj, spominje se uzimanje biljke za tretiranje bronhitisa te uporaba kao spazmolitik i ekspektorant, ali nije spomenuto koji se dijelovi biljke koriste niti način pripreme i primjene [13].

Zabilježena je antivirusna primjena vrste, tisan je uzet interno za liječenje ospica u katalonskim Pirenejima. Nadalje, tisan je također uziman za interno liječenje vodenih kozica u Alt Empordi (Katalonija, Španjolska) [14].

U regiji Arkhangelsk u Rusiji navedena je njezina upotreba protiv bolesti jetre (žutica ili tumori), hipersekrecije želuca, protiv anemije, ascitesa pa čak i ginekoloških bolesti te općih metaboličkih poremećaja [15]. Antipiretska i anti upalna djelovanja su zabilježena u Ukrajini [16], Italiji [17] te Srbiji [12].

Navedeni načini pripreme i doziranja pokazuju veliku raznolikost u izvorima: prisutni su sviježi pripravci lišća i nadzemnih dijelova te korijenje. Zabilježene su pripreme vrste u obliku tinktura, dekocija ili čajeva s velikim varijacijama u složenosti priprema, no većina se bazira na maceraciji tkiva lista ili korijena u kipućoj vodi [4][12].

Upotreba vrste za različite medicinske svrhe zabilježena je u različitim dijelovima Europe kroz Srednji vijek i Renesansu te se primjena nastavlja u Suvremeno doba [18].

Prema Europskoj agenciji za lijekove, zelen s korijenom male runjike može koristiti kao blagi diuretik (lijek za povećanje stvaranja mokraće) za ublažavanje manjih tegoba s mokraćnim sustavom (organima koji prenose mokraću). Indikacija se temelji na tradicionalnoj uporabi [2].

1.4. Kemijski sastav vrste *Pilosella officinarum* i *P. hoppeana*

P. officinarum i *P. hoppeana* pripadaju plemenu *Cichorieae* iz porodice *Asteraceae* te stoga dijeli njihove glavne fitokemijske značajke: pojavu različitih tipova fenolnih kiselina, flavonoida aglika i glikozida, jednostavnih kumarina, seskviterpen laktona te triterpena [19].

1.4.1. Fenolske kiseline

Fenoli su prijavljeni iz više od 80 svojti Središnje i Istočne Europe, pa čak i drugih geografskih lokacija poput Pirinejskog poluotoka te Novog Zelanda [20]. Najzastupljenije fenolske kiseline su klorogenska kiselina (CGA) i njeni derivati koji uključuju dikaveoilkininske kiseline (CQA) - esteri kavene kiseline s kininskom kiselinom. CQA su specijalizirani bioaktivni metaboliti koji nastaju biosintezom fenilpropanoide. U biljkama CQA igraju obrambenu ulogu protiv biotičkog ili abiotičkog stresa [21]. Praktični dio rada fokusira se na kvalitativnu i kvantitativnu analizu fenolnih kiselina u vrstama *P. officinarum* i *P. hoppeana*. Unatoč raznolikosti prijavljenih kvalitativnih i kvantitativnih metoda za proučavanje CQA, sveobuhvatne metode potpune analize CQA još uvijek su u ranoj fazi razvoja.

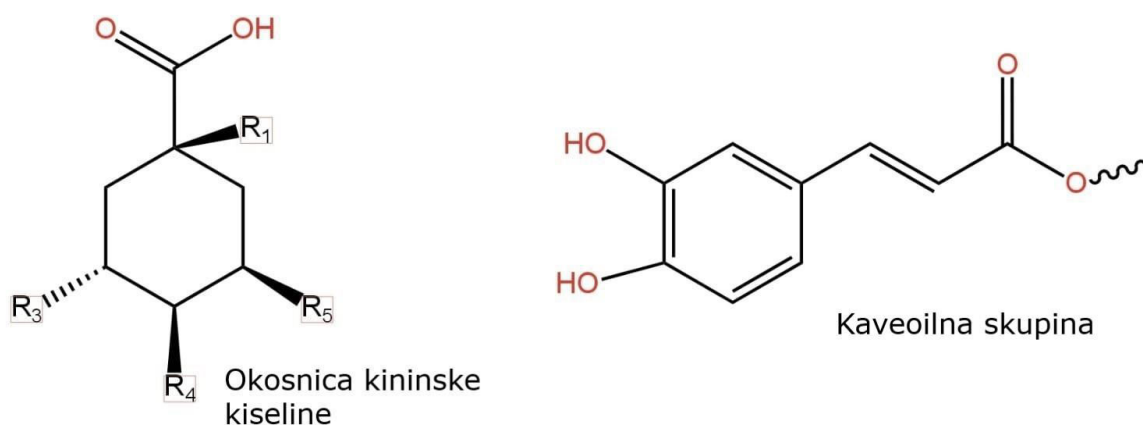
Treba napomenuti da je 1976. Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC) promijenila redoslijed numeriranja atoma na prstenu

kininske kiseline i predložila klorogensku kiselinu (3-CQA) kao 5-CQA, međutim, većina tvrtki dobavljača kemikalija i mnogi istraživači još uvijek koriste nomenklaturu prije IUPAC-a i prodaju CGA kao 3-CQA. To je vjerojatno zbog činjenice da je 1976. godine, kada je IUPAC objavio nove smjernice za sustav numeriranja ciklitolu, naziv za CGA zapravo bio 3-kaveoilkininska kiselina, a čisti oblik neoklorogenske kiseline (5-CQA) još nije bio dostupan [22]. Kako ne bi došlo do zabune, u radu se poštuju smjernice IUPAC-a donesene 1976. prema Tablici 1.

Prije 1976.	Nakon 1976.
3-kaveoilkininska kiselina	Klorogenska kiselina, 5-kaveoilkininska kiselina
5-kaveoilkininska kiselina	Neoklorogenska kiselina, 3-kaveoilkininska kiselina

Tablica 1. Nomenklatura klorogenskih kiselina prema IUPAC-u.

Nadalje, za nomenklaturu dikaveoilkininskih kiselina u radu također se poštuju IUPAC-ove smjernice donesene 1976. prema Slici 1 i Tablici 2.



	R1	R3	R4	R5
CGA/ 5-CQA	OH	OH	OH	kaveoilna skupina
1,3-CQA	kaveoilna skupina	kaveoilna skupina	OH	OH
3,4-CQA	OH	kaveoilna skupina	kaveoilna skupina	OH
3,5-CQA	OH	kaveoilna skupina	OH	kaveoilna skupina
1,5-CQA	kaveoilna skupina	OH	OH	kaveoilna skupina
4,5-CQA	OH	OH	kaveoilna skupina	kaveoilna skupina

Slika 1. Kemijske strukture CGA i derivata CQA.

Odnos između bioaktivnosti i biorasploživosti CQA je složen i uvelike ovisi o crijevnoj mikroflori za pretvorbu u metabolite s različitim farmakološkim profilima. U istraživanju provedenom nad CGA, samo je 0,8% oralno primijenjene doze u štakora pronađeno je u 24-satnom urinu [23].

CQA su bogati elektronima koji sadrže fenolne hidroksilne skupine u konjugiranom sustavu s parnim brojem ugljika. Stoga se CQA mogu *in vivo* oksidirati u kinoide (aktivne Michael akceptore). Posljedično, CQA su izravni antioksidansi (hvataju slobodne radikale) ili mogu djelovati kao Michael akceptori i ciljati put Keap1-Nrf2 (Nrf2 je središnji regulator stanične otpornosti na oksidativni stres i terapijska meta u bolestima povezanim sa starenjem) [24]. Dokazano je da diCQA imaju veliki kapacitet hvatanja radikala u *in vitro* testovima te da je kapacitet aktivacije Nrf2 puta specifičan za različite CQA derivate [25]. Kovalentna modifikacija Keap1 dovodi do inhibicije ubikvitinacije Nrf2 u citoplazmi, povećanja razine Nrf2 u jezgri, te

povećanja transkripcijske aktivacije gena elementa antioksidativnog odgovora. Taj put dovodi do ekspresije antioksidativnih molekula, ponajviše glutationa [26].

Štoviše, nekim metabolitima CQA dodjeljuje se anti - upalno djelovanje. U Caco-2 stanicama aktiviranim TNF- α (koje predstavljaju model upaljenog crijeva) liječenje benzojevom kiselinom ili 3-fenilpropionskom kiselinom dovodi do smanjene proizvodnje pro upalnog citokina interleukina-8 (IL-8). Naknadno, anti - upalni učinak metabolita CGA je sinergistički kada se koriste u kombinaciji [27]. Budući da upala crijeva može dovesti do sistemske upale zbog gubitka funkcije epitelne barijere povezanog sa upalom crijeva, lokalni učinak metabolita CQA može izazvati sustavni protuupalni učinak bez apsorpcije. Veća apsorpcija metabolita CQA, u usporedbi s samom CQA, može objasniti protuupalne učinke u tkivima, istom inhibicijom proupalnog NF- κ B puta koji oslobađa IL-8 iz makrofaga [28]. Osim toga, 3-fenilpropionska kiselina, koja je metabolit CGA, je poznati inhibitor ciklooksigenaze 2 (COX-2), enzima koji stvara proupalne eikosanoide i koji se široko eksprimira perifernim tkivima [21].

CGA ima antimikrobne učinke što ju čini idealnom za korištenje kao konzervans i dodatak hrani. Studije su pokazale da CGA ima baktericidne učinke protiv *Stenotrophomonas maltophilia* otporne na trimetoprim/sulfametoksazol, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus aureus* [21]. Također je dokazano da CGA ima inhibicijski učinak na sustave efluksa bakterija otpornih na antibiotike i njihovo stvaranje biofilma [29]. S druge strane, fenolni spojevi poput CGA nisu osjetljivi na probiotičke bakterije što ih čini još prikladnijima za upotrebu u prehrambenoj industriji.

1.4.2. Ostali spojevi

Kumarini koji su pronađeni u 30 taksona *Hieraciuma* [30]. Umbeliferon je pronađen u malim količinama u različitim biljnim ekstraktima napravljenim od cijele biljke *P. officinarum* i *P. hoppeana* [20]. Nedavno su umbeliferon 7-O- β -glukopiranozid (*skimming*) i eskuletin 7-O- β -glukopiranozid (*cichorium*) dobiveni iz *P. officinarum* [30].

Najčešći flavonoidi prisutni u ekstraktima vrste su luteolin, apigenin te njihovi derivati [19]. U istraživanju o diuretičkoj aktivnosti dodatka prehrani (XANADREN MD[®], Promopharma SPA) spominje se da *P. officinarum* sadrži viteksin, koji je derivat apigenina [31]. Vrsta *P. hoppeana* sadrži apigenin i luteolin.

Seskviterpenski laktoni su pronađeni u rodu *Hieracium*, uključujući eudesmanolid irazunolid, germakranolid [32] te desacil cinaropikrin i jacqueline iz nadzemnih dijelova vrste [33]. Nadalje, u istraživanju provedenom nad 28 biljaka roda *Hieracium* na području balkanskog poluotoka (uključujući *P. officinarum* i *P. hoppeana*) zabilježeno je da je guaianolid krepizid E najzastupljeniji seskviterpenski lakton u svim ispitivanim vrstama [34].

Od terpenoida najzastupljeniji je lupeol [lup-20(29)-en-3 β -ol], pentaciklički triterpen tipa lupana, pronađen u *P. officinarum* [35]. U istoj sudiji koja je proučavala sastav triterpenoida u biljci zabilježen je taraxasterol koji je dominantan u cvjetovima vrste dok je β -amirin pronađen i većim količinama u korijenju.

Analizom fitosterola u biljci *P. officinarum* utvrđena je dominacija kolesterola, fukosterola i β -sitosterola. Kolest-8(14)-en-3 β -ol, kolesta-5,7-dien-3 β -ol, kolest-7-en-3 β -ol, ergosta-5,24-dien-3 β -ol, kampesterol, stigmasterol, te 5 α -stigmast-7-en 3 α -ol su također identificirani u petroleternom ekstraktu vrste, ali u znatno manjim količinama [36].

1.5. Eksperimantalne studije bioaktivnosti *P. officinarum*

1.5.1. Diuretični učinak

Prvi *in vitro* i *in vivo* eksperimentalni podatci koji podupiru tradicionalnu upotrebu su diuretička svojstva vrste za koju su odgovorni sastojci prilično jasno identificirani. Međutim, broj studija je još uvijek nizak, a postojeće imaju nedostatke radi kojih se ne može garantirati da je diuretička aktivnost neosporivo dokazana. Studija provedena 1999. godine povezala je *P. officinarum* sa sposobnošću povećanja protoka urina. Davana doza je bila 7 puta veća od preporučene za ljude, davana intraperitonealno štakorima te stoga ima ograničenu važnost [37].

Druga *in vivo* studija provela je kliničku procjenu učinka nutritivne dijeta obogaćene biljkama (u kojoj je *P. officinarum* bila najzastupljenija, ali ne i jedina biljka) primijenjenu na mačkama koje su болоvale od cistitisa sa evidentnom hematurijom te disurijom i/ili strangurijom. Dijeta je rezultirala značajno smanjenom količinom proteina u mokraći te značajno smanjenjem struvitnim urolita kod svih tretiranih mačaka na kraju tretmana [38]. No, nedostatak podataka o načinu ekstrakcije i koji biljni organi su bili ekstrahirani te nedostatak pozitivnih i negativnih kontrola u samom eksperimentu ograničava primjenu podataka.

Diuretičko djelovanje *P. officinarum* povezano je s njenim sadržajem polifenolnih kiselina (osobito kavene i klorogenske kiseline), tanina i flavonoida. Uključujući *P. officinarum*, praktički svi članovi rodova *Hieracium* i *Pilosella* proizvode te spojeve što može objasniti zašto i te vrste imaju diuretička svojstva ili se navodi da su korisne u liječenju bolesti mokraćnog sustava u narodnoj medicini [4]. Neke od njih su *H. fendleri*, *H. murorum*, *H. umbellatum* i *H. venosum*, te stoga nije pogrešno za pretpostaviti da i *P. hoppeana* pripada toj skupini. Međutim, nijedna od navedenih vrsti nije

testirana kako bi se potvrdila njihova navodna diuretička aktivnost. Potrebne su studije koje provjeravaju pokazuju li te svojte jaču diuretičku aktivnost od *P. officinarum*. U svakom slučaju, iako se eksperimentalno ukazuje na diuretička svojstva *P. officinarum*, bilo bi korisno provesti posebne studije i klinička ispitivanja kako bi se u potpunosti podržala ova tradicionalna uporaba i razumjelo specifično djelovanje na druge bolesti mokraćnog sustava.

1.5.2. Antibakterijski učinak

Rezistencija bakterija se povećala zbog neselektivne uporabe antibiotika za liječenje zaraznih bolesti. Uslijed navedenog, dolazi do povećanog interesa za potragom za novim antimikrobnim spojevima iz različitih izvora, što uključuje ljekovito bilje. Zabilježene su različite metode za određivanje antimikrobne aktivnosti biljnih materijala. Najčešće *in vitro* korištene metode uključuju metodu difuzije u jažici u agaru te metodu razrjeđivanja koja se temelji na uključivanju biljnih uzoraka u medij prije inokulacije. Antimikrobno djelovanje *P. officinarum* dokazano je podvrgavajući ekstrakte u različitim medijima pripremljene iz cijele biljke *P. officinarum* pomoću disk difuzijskog testa [39]. Glavni nedostatak ove studije je izostanak negativne kontrolne skupine. Visoko aktivni ekstrakt *P. officinarum* u etanolu je testiran za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) osjetljivih sojeva (ovu studiju uključeno je pet sojeva *Lactobacillus sakei*). Ekstrakt *P. officinarum* bio je učinkovit protiv svih gram-negativnih vrsta u početnom testiranju [40]. No, autori nisu dali podatke o korištenom biljnom organu.

Antibakterijsko djelovanje povezuje se s visokim sadržajem kavene kiseline i p-kumarinske kiseline. *P. officinarum* se koristila za liječenje bruceloze, bolest koju izaziva vrsta *Brucella* [13]. Promatrane aktivnosti ekstrakata *P. officinarum* nisu bile ograničene na određene biljne organe ili raspone polariteta otapala, stoga se može pretpostaviti da više spojeva igra ulogu u

antimikrobnom učinku [30]. Ove činjenice pokrjepljuju tradicionalnu upotrebu *P. officinarum* za previjanje rana i za liječenje različitih vrsta bakterijskih i gljivičnih infekcija, uključujući unutarnje i vanjske. Međutim, specifična ispitivanja antibakterijskog djelovanja ove vrste treba izvesti kako bi se potvrdila korisnost njena upotreba.

1.5.3. Antioksidativni učinak

Zbog svojeg sastava bogatog fenolnim kiselinama, *P. officinarum* postaje sve više popularnije antioksidativno sredstvo [41]. U literaturi spominje se antioksidativno djelovanje vrsta *Hieracium* i *Pilosella*. Ekstrakti ovih vrsta povezani su s antioksidativnim svojstvima, posebno *P. officinarum* [30]. U većini slučajeva, antioksidacijska moć se pripisuje visokom sadržaju fenola, uglavnom klorogenske kiseline i flavonoida [20]. U jednom radu izoetin 4'-O- β -D-glukopiranozid se opisuje kao flavonoid s vrlo velikom antioksidativnom aktivnošću [30].

Obuhvaćeni su različiti *in vitro* testovi koji se temelje na aktivnosti hvatanja slobodnih radikala (DPPH, ABTS testovi), redukciji feri iona kao te drugim markerima oksidativnog stresa ispitivanim u testovima kao što su test β -karoten-linolne kiseline. Glavni nedostaci svih studija je njihova ovisnost o kemijskim testovima, temeljenim na redoks reakcijama izvedenim *in vitro* (DPPH, ABTS, itd.). Da bi se rezultati mogli uzeti kao istiniti potrebno je provesti dodatne enzimatske eksperimente, po mogućnosti u *in vivo* modelima.

1.5.4. Protuupalni učinak

Upotreba *P. officinarum* u kombinaciji sa salicilniom kiselinom se povezuje s liječenjem upala gornjih dijelova dišnog trakta [4]. Dokazana su protuupalna svojstva drugih vrsta porodica *Hieracium* i *Pilosella* (*H. gymnocephalum* i *H. albiflorum*) [42], radi čega se može pretpostaviti da vrste dijele tu značajku.

Kemijske razlike u prirodnim spojevima odgovornim za protuupalnu aktivnost (vjerojatno salicilna kiselina i triterpenski alkoholi) trebale bi se dodatno utvrditi.

1.6. Primjena *P. officinarum* u modernoj farmakologiji

Prema Europskoj medicinskoj agenciji ne može se prihvatiti dobro uhodana uporaba (*well established use*) za *P. officinarum*, zbog nepostojanja odobrenih proizvoda u Europskoj uniji te zbog nedostatka podataka za prepoznavanje učinkovitosti [2]. Tradicionalna medicinska uporaba *P. officinarum* dobro je dokumentirana u nekoliko priručnika, a potkrijepljena je prisutnošću lijekova na europskom tržištu tijekom razdoblja od najmanje 30 godina (od kojih 15 godina u Europskoj uniji).

P. officinarum je stavljena na tržište lijekovima Europske Unije 1986. godine. Priprema se kao usitnjena biljna tvar u biljnom čaju ili biljna tvar u prahu u krutom farmaceutskom obliku za oralnu upotrebu kao tradicionalni biljni medicinski proizvod. Indikacija za koju se koristi je povećanje količine urina za postizanje ispiranja urinarnog trakta kao adjuvans kod manjih tegoba urinarnog trakta [2].

1.7. Korištene metode

Jedna od korištenih metoda u radu je tankoslojna kromatografija (eng. *thin layer chromatography*, TLC) koja se može koristiti za kvalitativnu ili kvantitativnu analizu. Izvodi se na TLC pločici koja je premazana inertnim materijalom, uglavnom polarnim *silica* gelom. Naneseni uzorak se pomoću uglavnom nepolarne mobilne faze kapilarnim silama penje po gelu. Temeljem kemijskih svojstava pojedinih spojeva u uzorku spojevi se kreću po pločici različitim brzinama. TLC je relativno brza i jeftina metoda za analizu uzoraka, ali za povećanu preciznost analize potrebne su sofisticiranije metode.

Nadalje, druga korištena metoda je tekućinska kromatografija pod visokim tlakom (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC) uparena s masenom spektrometrijom (eng. *mass spectrometry*, MS). LC-MS je analitička metoda koja koristi vrlo osjetljive separacijske mogućnosti LC u kombinaciji s preciznom analizom MS koja može identificirati svaki separirani spoj. Takva kombinacija metoda se koristi u analitičkoj kemiji za analizu biokemijskih, organskih te anorganskih spojeva.

Kao i kod TLC, LC je kromatografska metoda, prema kojoj se separacija temelji na polarnosti spojeva. Najčešće se koristi reverzna faza, točnije nepolarna (hidrofobna) stacionarna faza i polarna mobilna faza. Stacionarna faza je uglavnom dugolančana alkilna skupina (n-oktadecil ili C₁₈). Mobilna faza je uglavnom gradijent vode i drugih polarnih spojeva (metanol, isopropanol, acetonitril). Uzorak se injektira pumpom te mobilna faza pod pritiskom putuje kroz stacionarnu fazu. Na temelju polarnosti spojeva i njihovim afinitetima prema fazama, duljina putovanja spojeva je različita. Na izlasku iz stacionarne faze, UV detektor bilježi vrijeme i količinu spoja (izražena kao intenzitet odaziva detektora).

MS je analitička metoda koja mjeri omjer mase i naboja (m/z) iona. Osnovni dijelovi MS sustava su izvor iona, analizator mase i detektor. Izvor iona je mjesto gdje se komponente uzorka uvedenog u MS sustav ioniziraju, često pomoću *electrospray* metode (premještanje već postojećih iona otopljenih u tekućoj u plinovitu fazu). Konvertirani i fragmentirani ioni u plinovitoj fazi putuju do detektora u vakuumu. Dok analizator mase primjenjuje električna i magnetska polja za razvrstavanje iona prema njihovoj masi, detektor mjeri i pojačava ionsku struju kako bi izračunao količinu svakog iona razdvojenog po masi. Uspoređivanjem dobivenih omjera s onima zabilježenim u literaturi može se potvrditi radi li se o očekivanom spoju, ili o nekom drugom nepoznatom spoju.

2. Cilj rada

P. officinarum je radi svojeg sastava bogatog fenolnim kiselinama (ponajviše CGA i CQA) dobro diuretičko sredstvo, prepoznato od strane Europske medicinske agencije. U ovome radu analizira se njoj filogenetski srodna vrsta *P. hoppeana*, na temelju sumnji da *P. hoppeana* ima vrlo sličan sastav fenolnih kiselina te posljedično i diuretička svojstva. *P. hoppeana* se koristila u prošlosti te koristi se i danas kao diuretsko svojstvo, ali količina literature i eksperimentalnih podataka za tu vrstu je ograničena. Analizom metodama HPLC i MS utvrđuje se kvalitativni i kvantitativni sastav obje vrste. Usporedbom njihovih sastava može se utvrditi je li *P. hoppeana* ljekovita biljka ili patvorina, može li se koristiti kao zamjena za pripravke *P. officinarum* te ima li snažnija ljekovita svojstva od *P. officinarum*. U radu se također uspoređuje faktor ekstrakcije obje vrste s obzirom na otapalo kako bi se pronašlo najefikasnije, uzimajući u obzir njihovu ekološku prihvatljivost.

Glavna svrha rada je izvijestiti o jednim od prvih eksperimentalnih podataka analize fenolnih kiselina vrste *P. hoppeana* kako bi se inicirao znanstveni interes za tu vrstu te potaknula dodatna istraživanja i studije s krajnjim ciljem prepoznavanja *P. hoppeana* kao ljekovite biljke od strane vodećih medicinskih i farmakoloških agencija.

3. Materijali i metode

3.1. Uzorkovanje

Uzorci *P. officinarum* nabavljeni su od Galeno Srl (Comeana, Italija).

Uzorci vrste *P. hoppeana* sakupljani su u šestom, sedmom i osmom mjesecu na području Velebita, Livada lom. Nakon branja uzorci su sušeni 3 tjedna na prozračnom i toplom mjestu zaštićeni od direktnog utjecaja sunčeve svjetlosti.

3.2. Kemikalije

U radu su korištene kemikalije:

Metanol i etanol (*HPLC grade*) korišteni kao otapala za ekstrakciju biljnog materijala nabavljeni od VWR International (Radnor, PA, SAD).

Klorogenska kiselina (C0181) (*HPLC grade*), standard nabavljen od Tokyo Chemical Industry (Tokio, Japan).

1,3-dikaveoikininska kiselina (BP0006), 1,5-dikaveoilkininska kiselina (BP0056), 3,4-dikaveoilkininska kiselina (BP0055), 3,5-dikaveoilkininska kiselina (BP0005) te 4,5-dikaveoilkininska kiselina (BP0074), standardi nabavljeni od Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd. (Chengdu, Sichuan, Kina).

Acetonitril (*HPLC grade*) nabavljen od Fisher Scientific (Loughborough, UK).

Tokom mikroskopiranja, kao kontrastno sredstvo za bolju vizualizaciju koristila se otopina za bistrenje stanica Visikol clearing solution (Hampton, NJ, SAD).

3.3. Instrumenti i oprema

Svjetlosni mikroskop za promatranje biljnog materijala i njegovo fotografiranje je Olympus IX73 invertni mikroskop priključen s Olympus TH4-200 halogenskom lampom (Olympus Corporation, Shinjuku City, Tokyo, Japan).

Vaga korištena za vaganje biljnih uzoraka i standarada je AS 220.R2 PLUS analitička vaga (RADWAG, Radom, Poljska). Ultrazvučna kupelj korištena tokom ekstrakcije je Sonorex Digitec DT 100 (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany). Centrifuga korištena tokom ekstrakcije je Centrifuge 5424 (Eppendorf, Hamburg, Germany). Filtracija nakon ekstrakcije izvršila se pomoću Puradisc filtera [4mm, 0,2 µm (Whatman plc, Maidstone, UK)].

Za tankoslojnu kromatografiju korištene su aluminijske TLC Silica gel 60 pločice (Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, SAD). UV lampa korištena za vizualizaciju rezultata TLC je CM-26 UV-viewing cabinet (Spectroline, NY, SAD).

LC/MS analiza se provela na Agilent 1260 Infinity II LC sustavu s ugrađenim degaserom, binarnom pumpom, automatskim uzorkivačem, termostatom, termostatiranim odjeljcima te DAD detektorom koji sadrži dvostruku lampu, uparen s 6460 Triple Quad LC/MS masenim spektrometrom (Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, CA, USA). Za analizu koristila se kolona XBridge C18 [150 mm x 4.6 mm, 3.5 µm (Waters Sweden AB, Sollentuna, Švedska)].

3.4. Mikroskopska identifikacija

Manje količine zelenog lišća *P. hoppeana* i *P. officinarum* usitnile su se u mlincu za kavu i odvojile u menzure. Mlinac, oštrica i poklopac mlinca se temeljito ispirao etanolom i destiliranom vodom između usitnjavanja uzoraka

kako bi se izbjegla kontaminacija uzoraka. Pulverizirani biljni materijal spatulom prenio se na mikroskopsko stakalce, dodalo se sredstvo za bistrenje stanica (Vizikol) te se pokrilo pokrovnim stakalcem. Uzorci su se promatrali svjetlosnim mikroskopom pod povećanjem od 40x, 60x te 80x.

3.5. Priprema uzoraka za LC/MS

Rukama su se odstranili zeleni listovi biljke sa stabljika, izbjegavajući sasušene, uvenule listove te listove s promijenjenom bojom. Listovi su se usitnili u mlincu za kavu. Mlinac, oštrica i poklopac mlinca se temeljito ispirao etanolom i destiliranom vodom između korištenja kako bi se izbjegla kontaminacija uzoraka. Usitnjeno lišće se prenijelo u 4 menzure (*P. hoppeana* ubrana u svibnju, srpnju i kolovozu te komercijalno dostupna *P. officinarum*). 30 mg svakog uzorka se izvagalo 2 puta na analitičkoj vagi te prenijelo u tube.

3.6. Priprema ekstrakata

U 4 tube s biljnim materijalom dodalo se 1.5 *UPLC grade* metanola. Isti postupak se ponovio u druge 4 tube s *UPLC grade* etanolom. Tube su se odložile u ultrazvučnu kupelj na 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon ekstrakcije sadržaj tuba se centrifugirao 7 minuta pri 15 000 rpm. Supernatant se potom filtrirao pomoću filtera s veličinom pora 0,2 µm spojenim na špricu direktno u vialicu za HPLC. Između pripreme ekstrakata i same HPLC analize uzorci su se skladištili na -80°C.

3.7. Priprema standarada za izradu kalibracijskog pravca

Izvagano je 12 mg svakog pojedinog standarda i preneseno u jednu epruvetu te je dodano 24 mL metanola (koncentracija pojedinog standarda u otopini iznosila je 1 mg/mL). Serijskim razrjeđenjima otopina je razrijeđena na slijedeća razrjeđenja: 1 mg/mL, 0.75 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL,

0.05 mg/mL te 0.001 mg/mL. Naknadno, pripremljeno je 6 otopina pojedinačnih standarada u koncentraciji od 1 mg/mL za pojedinačnu analizu. Otopina svih standarada i otopine pojedinačnih standarada prenesene su u viala za HPLC.

3.8. Priprema otopina za validaciju metode

Za validaciju metode pripremljene su 3 različite otopine. Prva je sadržavala prethodno pripremljenu otopinu svih standarada (koncentracija pojedinačnog standarda u otopini iznosila je 1 mg/mL) i već pripremljeni *ekstrakt P.hoppeana* u metanolu u omjeru 1:1. Druga je sadržavala spomenutu otopinu svih standarada i metanol u omjeru 1:1. Treća je sadržavala ekstrakt *P.hoppeana* u metanolu i metanol u omjeru 1:1. Sve tri otopine prenesene u viala za HPLC.

3.9. Tankoslojna kromatografija (TLC)

Silica gel pločice za TLC škarama su odrezane na odgovarajuće dimenzije. Kao mobilna faza korištena je otopina 10% metanola, 90% etil acetata, uz par kapi kiseline i petroletera. Na početnu liniju kapilarom su nanosene 4 skupine (uzorak *P. hoppeana*, komercijalno dostupan standard 3,5 – CQA, komercijalno dostupan standard CGA te kombinacija uzorka i oba standarada). Radi visokih koncentracija ekstrakta i otopina standarada izbjegavalo se njihovo nanošenje u više navrata (nanosilo se pola volumena usisanog kapilarom). Između nanošenja kapilara je ispirana metanolom i sušena kako bi se izbjegla kontaminacija. Pločica za tankoslojnu kromatografiju je zatim odložena u staklenku tako da je dno umočeno u mobilnu fazu, a pločica naslonjena na stijenku te se staklenka poklopila. Nakon što je mobilna faza dosegla završnu liniju pločica je izvađena iz staklenke i osušena laboratorijskim fenom. Rezultati su promatrani i slikani

pod UV lampom pri valnim duljinama od 365 nm i 254 nm. Naknadno, rezultati su vizualizirani umakanjem cijele pločice u kalijev permanganat.

3.10. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti uparena s masenom spektrometrijom (HPLC-MS)

Korištena metoda za HPLC preuzeta iz prethodno objavljenog članka [41], uz pojedine modifikacije s obzirom na dostupne uređaje i opremu. Za analizu koristila se C18 kolona (150 mm x 4.6 mm, 3.5 μ m). Kao mobilna faza korištena su 2 otapala: *HPLC grade* voda s par kapi mravlje kiseline kao otapalo A te *HPLC grade* acitornitril s par kapi mravlje kiseline kao otapalo B. Gradijent je iznosio 7% faze B 1 min, zatim od 7% do 10% B 10 min, 10% do 15% B 3 min te zadržavanje na tom omjeru 3 min, od 15% do 18% 11 min te ponovno zadržavanje omjera 18% B 24 min, 18% do 20% B 10 min, 20% do 50% B od 5 min, završavajući s 50% B 5 min. Elucija se vršila protokom 0.25 mL/min. Vrijeme analize jednog uzorka iznosilo je 55 minuta. Analiza se provodila na sobnoj temperaturi. Detekcijska valna duljina DAD detektora je 330 nm za klorogensku kiselinu i za sve derivate dikaveoilkininske kiseline, uključujući uzorke ekstrakata i standarde. Injekcijski volumen uzoraka i standarada iznosio je 2.5 μ L. Pročišćavanje kolone injektiranjem vode i acetonitrila u omjeru 1:1 (*blank*) provedeno je dva puta prije početka analize te jednom nakon same analize. Identifikacija pojedinih derivata klorogenske kiseline provedena je usporedbom retencijskih vremena spojeva iz pojedinih uzoraka s retencijskim vremenima komercijalno dostupnih standarada. Analizom pojedinih pročišćenih standarada ustanovljeno je koji od pikova pripada kojem spoju. Kvantifikacija je provedena metodom eksternalnih standarada. Kalibracijski pravci izrađeni su za svaki od analiziranih spojeva koristeći 6 kalibracijskih razina dobivene odgovarajućim razrjeđenjima (1 mg/mL, 0.75 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.05 mg/mL te 0.001 mg/mL) pročišćenog standarda.

Jednadžbe kalibracijskih pravaca za svaki standard prihvaćene su kao odgovarajuće za izračun koncentracija spojeva u uzorcima temeljem $R^2 \geq 0.999$, koji vrijedi za svaki kalibracijski pravac.

Metoda korištena za MS analizu identična je kao i za HPLC analizu. Analiziran je jedan uzorak *P.hoppeana* ekstrahiran u metanolu i jedan uzorak *P.officinarum* ekstrahiran u metanolu. Radi specifičnosti rezultata naknadno je analiziran komercijalno dostupan standard 3,4-dikaveoilkininske kiseline. Ionizacija je provedena koristeći *electrospray* izvor iona na način da se analit u isto vrijeme ionizira i desolvatira iz tekućeg matriksa. Uparivanjem ranije poznatih retencijskih vremena s HPLC spektrom, precizno su određivani odgovarajući MS spektri za ispitivane spojeve. Tokom analize MS spektara, u obzir su se uzimali česti MS kontaminanti. Rezultati MS analize zabilježeni su u pozitivnom modu.

3.11. Obrada podataka

Za vizualizaciju, fotografiranje i analizu mikroskopskih slika koristio se softver Olympus cellSens imaging softver (Olympus Corporation, Shinjuku City, Tokio, Japan).

Softver Agilent MassHunter (Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, CA, SAD) koristio se vizualizaciju i integraciju pikova dobivenih HPLC analizom te za obradu spektara dobivenih masenom spektrometrijom. Figure HPLC i MS spektara u radu preuzete su iz istog softvera.

Za izračun jednadžbi kalibracijskih pravaca te izradu grafičkih figura u radu koristio se GraphPad Prism 10.2.3. (GraphPad Software, Inc, MA, SAD). Za numeričku obradu podataka te za izradu tabličnih figura u radu koristio se Microsoft Excel (Microsoft Corporation, WA, SAD).

Za crtanje kemijskih struktura spojeva i molekula koristio se MarvinSketch (Chemaxon, Budimpešta, Mađarska).

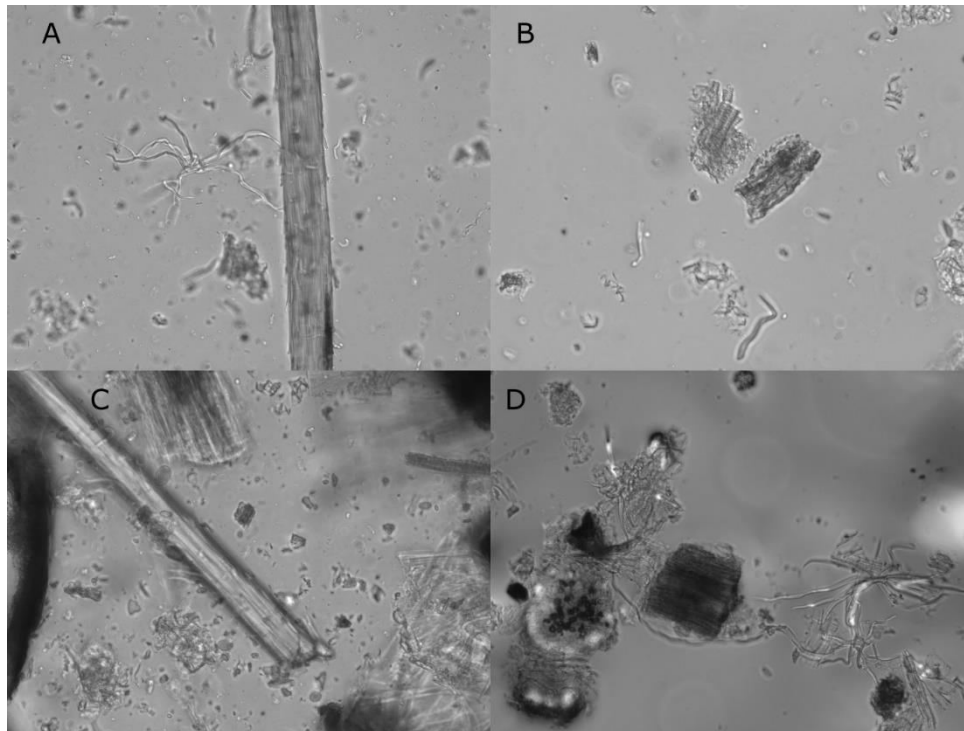
4. Rezultati

4.1. Makroskopska identifikacija

Vrsta *Hieracium hoppeana* identificirana je prema ključu Flora Croatica database. Biljka ima rozetu listova s batvom koje nosi jednu cvjetnu glavicu, a gornja strana listova sadrži gušće zvjezdaste dlake. To je karakteristika bivše sekcije, sada roda *Pilosella*. Identificirana vrsta gradi kraće i deblje vriježe, te su ovojni listovi cvijeta deblji i jajasti, što su dijagnostički markeri diferencijacije u odnosu na vrstu *P. officinarum*.

4.2. Mikroskopska identifikacija

Mikroskopom su promatrani usitnjeni biljni materijali *P.hoppeana* i *P.officinarum*.



Slika 2. **A)** *P.hoppeana* (zvjezdaste i makroskopske dlačice). **B)** *P.hoppeana* (epitel). **C)** *P.officinarum* (makroskopske dlake s stanicama parenhima). **D)** *P.officinarum* (zvjezdaste dlačice i parenhim lista).

Obje biljke su vrlo slične pod mikroskopom. Mogu se uočiti makroskopske dlačice koje sadrže stanice parenhima lista pri bazi te zvjezdaste dlačice. Količina dlačica prevladava u *P. officinarum*. U oba uzorka može se vizualizirati provodno tkivo (spiralne žilice koje se „gibaju“ mijenjanjem fokusa). Sitne mrljice na svim slikama je pelud. Velike tamne mrlje na slikama je asimilacijsko tkivo parenhima lista.

4.3. TLC

Tankoslojnom kromatografijom analiziran je uzorak *P. hoppeana* te uspoređivan sa standardom CQA (izabran je standard 3,5-CQA) i CGA.



Slika 3. Razvijena TLC pločica vizualizirana pod UV svjetlom. S lijeva na desno testirane supstance su uzorak *P. hoppeana* (U), standard 3,5-CQA (3), standard CGA (6), kombinacija uzorka i oba standarda (U36).

U uzorku biljke može se uočiti više bendova te oblik samih bendova koji je deformiran. U standardu 3,5-CQA i mješavini dvaju standarda i uzorka dolazi

do razlijevanja bendova. Rf vrijednosti uzoraka i standarada prikazani su u Tablici 3.

	Rf
P.hoppeana	0.43
3,5-CQA	0.51
CGA	0.47
P.hoppeana/3,5-CQA/CGA	0.48

Tablica 2. Rf vrijednosti uzorka i standarada dobivene TLC.

4.4. HPLC/MS

4.4.1. Kalibracijski pravac

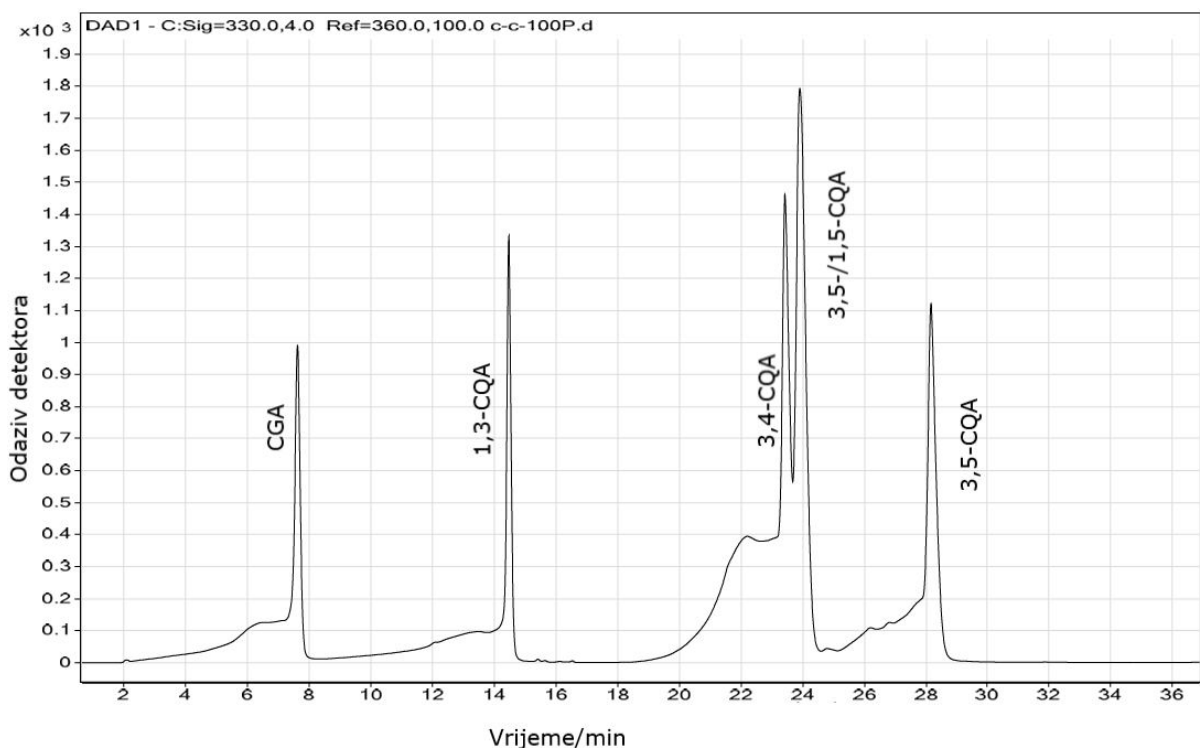
Za izradu kalibracijskog pravca, kako bi se uštedjelo vrijeme i količina mobilne faze za tekućinsku kromatografiju, analizirana je otopina koja je sadržavala svih šest ispitivanih derivata u šest koncentracijskih razina. Kako bi se mogli precizno identificirati pojedini derivati na dobivenim spektrima, za početak analiziran je svaki pojedini derivat, točnije određivana su njihova retencijska vremena u prethodno opisanoj metodi. Njihova retencijska vremena zabilježena su u Tablici 4.

Derivat	Retencijsko vrijeme/min
CGA	7.5
1,3-CQA	14.5
3,4-CQA	23.5
3,5-CQA	23.9
1,5-CQA	23.9
4,5-CQA	28.25

Tablica 3. Retencijska vremena derivata CGA.

1,5-CQA i 3,5-CQA imaju vrlo slična retencijska vremena, koja se koristeći opisanu metodu nisu mogla precizno razlikovati u analizi mješavine standarada niti u analizi uzoraka, točnije dolazi do preklapanja pikova. Stoga, u ostatku rada tretira ih se kao jednu cjelinu.

Nakon što su identificirana retencijska vremena svih ispitivanih analita iz analize spektara samostalnih standarada, uspoređivan je profil pikova te njihova retencijska vremena s pikovima spektra dobivenog od mješavine svih standarada. Iako je vrijeme analize jednog uzorka trajalo 55 min, zadnji ispitivani derivat ima retencijsko vrijeme 28.25 min te radi jednostavnijeg prikaza u nastavku rada spektri se prikazuju od 0. do otprilike 30. minute.



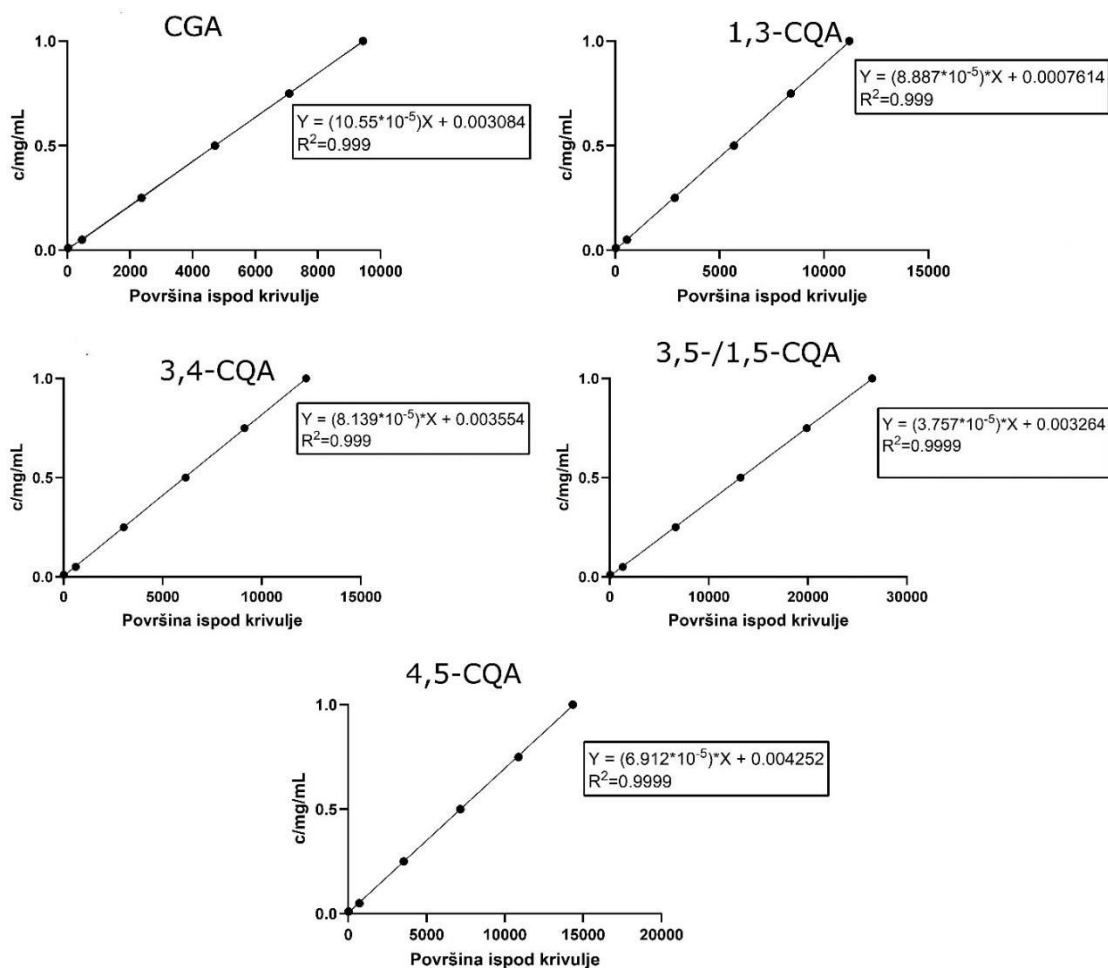
Slika 4. LC-UV kromatogram otopine standarada.

Otopine standarada u 6 razreda razrijeđena analizirane su tekućinskom kromatografijom. Dobiveni pikovi su integrirani kako bi se dobila površina ispod krivulje za svaki derivat. Integrirane površine su prikazane u tablici 5.

C/ mg/mL	CGA	1,3-CQA	3,4-CQA	1,5-/3,5-CQA	4,5-CQA
0.001	22.25	30.56	13.40	39.42	20.44
0.05	467.57	564.57	614.04	1321.52	716.95
0.25	2367.82	2850.00	3033.59	6660.97	3548.02
0.50	4711.96	5688.45	6163.76	13206.84	7161.71
0.75	7087.20	8409.45	9126.73	19894.75	10875.00
1.00	9440.16	11212.74	12240.87	26499.98	14344.42

Tablica 4. Površine ispod krivulja derivata klorogenske kiseline kroz 6 razreda razrijeđenja.

Iz dobivenih površina, jednostavnom linearnom regresijom, izračunate su jednadžbe kalibracijskih pravaca za svaki derivat.



Slika 5. Grafički prikazi kalibracijskih pravaca s jednadžbama pravaca i R^2 vrijednostima za svaki derivat.

Linearnost u ispitivanom rasponu je vrlo dobra ($R^2 > 0.999$ za svaki standard).

Kako bi se potvrdila točnost same linearne regresije i omogućila njena primjena za izračun koncentracija ispitivanih uzoraka, računata je vrijednost odgovora za jednadžbe pravaca dobivene linearnom regresijom (Tablica 6).

C/ mg/mL	CGA	1,3-CQA	3,4-CQA	1,5/3,5-CQA	4,5-CQA
0.001	0.543%	0.348%	0.464%	0.47%	0.566%
0.05	5.241%	5.093%	5.353%	5.29%	5.381%
0.25	25.289%	25.404%	25.046%	25.35%	24.949%
0.50	50.020%	50.629%	50.522%	49.94%	49.927%
0.75	75.078%	74.811%	74.638%	75.07%	75.593%
1.00	99.902%	99.724%	99.984%	99.89%	99.574%

Tablica 5. Vrijednost odgovora za jednadžbe pravaca dobivene linearnom regresijom.

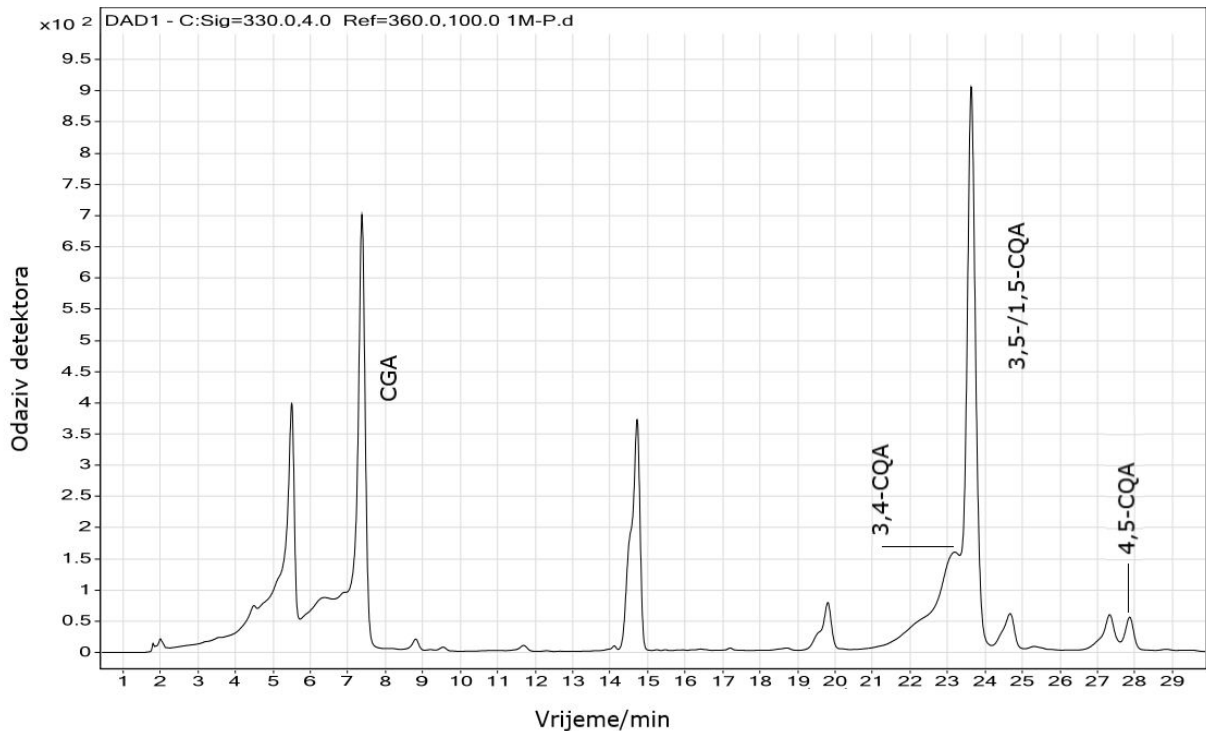
S obzirom da se vrijednosti odgovora za koncentraciju od 0.001 mg/mL ne podudaraju s poznatim koncentracijama standarada, oni se ne mogu uzimati kao vjerodostojni za izračun nepoznatih koncentracija analita u uzorcima. Kako niti jedna od izračunatih vrijednosti u uzorcima nije u rasponu od 0.001 do 0.05 mg/mL, za izračun nepoznatih koncentracija koristile su se ostalih 5 koncentracijskih razina (0.05 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.50 mg/mL, 0.75 mg/mL te 1.00 mg/mL).

4.4.2. LC-UV analiza

Nakon završene analize podataka vezanih uz kalibracijski pravac, slijedeći korak je primjena dobivenih jednadžbi pravaca za izračun koncentracija derivata u uzorcima. Nisu prikupljeni podatci za standarde otopljene u etanolu već za izračun koncentracija uzoraka ekstrahiranih u etanolu korištene su jednadžbe pravaca dobivene linearnom regresijom površina ispod krivulja iz analize standarada otopljenih u metanolu.

4.4.3. LC-UV analiza uzoraka ekstrahiranih u metanolu

Analizirana su 4 uzorka nepoznatih koncentracija (3 uzorka *P.hoppeana* iz 6., 7., i 8. mjeseca, te komercijalno nabavljen uzorak *P.officinatum*).



Slika 6. LC-UV kromatogram ekstrakta *P.hoppeana* iz lipnja 2023. godine u metanolu s označenim derivatima. $\lambda=330$ nm.

Usporedbom retencijskih vremena pikova dobivenih LC analizom otopine standarada i ekstrakta *P.hoppeana* može se odrediti koji pik pripada kojem derivatu. U sve tri analize dolazi do gotovo potpunog preklapanja pikova za 3,5- i 1,5- DCA, nije ih moguće razlikovati opisanom metodom. Također, dolazi do blagog pomaka pikova (*peak shift*) kod 3,4-DCA prema unaprijed (blago povećano retencijsko vrijeme) i 3,5-/1,5-DCA unatrag (blago smanjeno retencijsko vrijeme). U uzorku je prisutno još nekoliko neidentificiranih spojeva za koje se nije analizirao odgovarajući standard. Integracijom pikova dobivena je površina ispod krivulja (Tablica 7).

	CGA	3,4-CQA	1,5/3,5-CQA	4,5-CQA
P.hoppeana (06/2023)	6,897.15	NA	9946.51	480.36
P.hoppeana (07/2023)	5341.93	123.95	7362.51	488.23
P.hoppeana (08/2023)	6030.69	84.60	7250.68	362.66

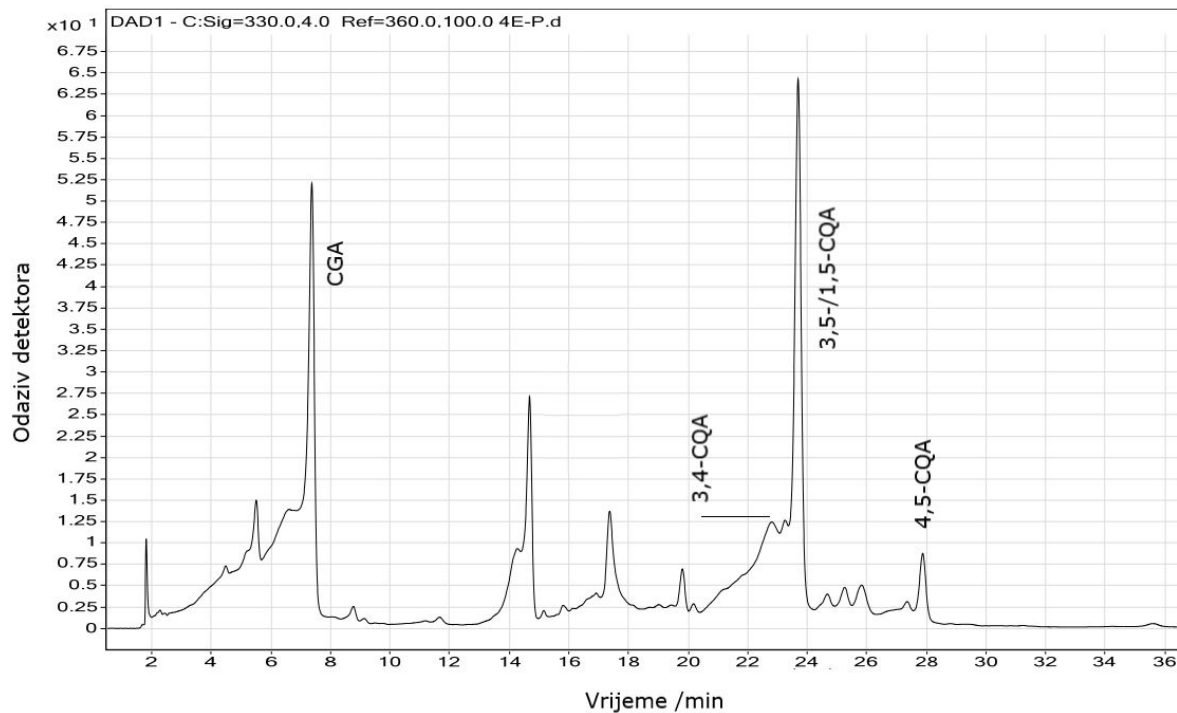
Tablica 6. Površine ispod krivulja LC analiza derivata CGA u uzorcima *P. hoppeana*.

Uvrštavanjem dobivenih vrijednosti površina ispod krivulja u jednadžbe pravaca dobivenih jednostavnom linearnom regresijom mogu se odrediti koncentracije i maseni udjeli derivata. Rezultati su prikazani u tablici 6. Vrijednost 3,4-CQA iz svibnja 2023. godine je ispod granica detekcije, te se ne uzima u obzir.

		CGA	3,4-CQA	1,5/3,5-CQA	4,5-CQA	Ukupno
mg/g	P.hoppeana (06/2023)	36.54	NA	18.85	1.87	57.26
	P.hoppeana (07/2023)	28.33	0.68	13.99	1.90	44.91
	P.hoppeana (08/2023)	31.97	0.52	13.78	1.47	47.74
(%w/w)	P.hoppeana (06/2023)	1.22%	NA	0.63%	0.06%	1.91%
	P.hoppeana (07/2023)	0.94%	0.02%	0.47%	0.06%	1.50%
	P.hoppeana (08/2023)	1.07%	0.02%	0.46%	0.05%	1.59%

Tablica 7. Sadržaj derivata kaveoilkininskih kiselina izražen u mg/g i (%w/w) u uzorcima *P. hoppeana* ekstrahiranim u metanolu.

Nadalje, analiziran je uzorak *P. officinarum* istom metodom kako bi se usporedio s *P. hoppeana*.

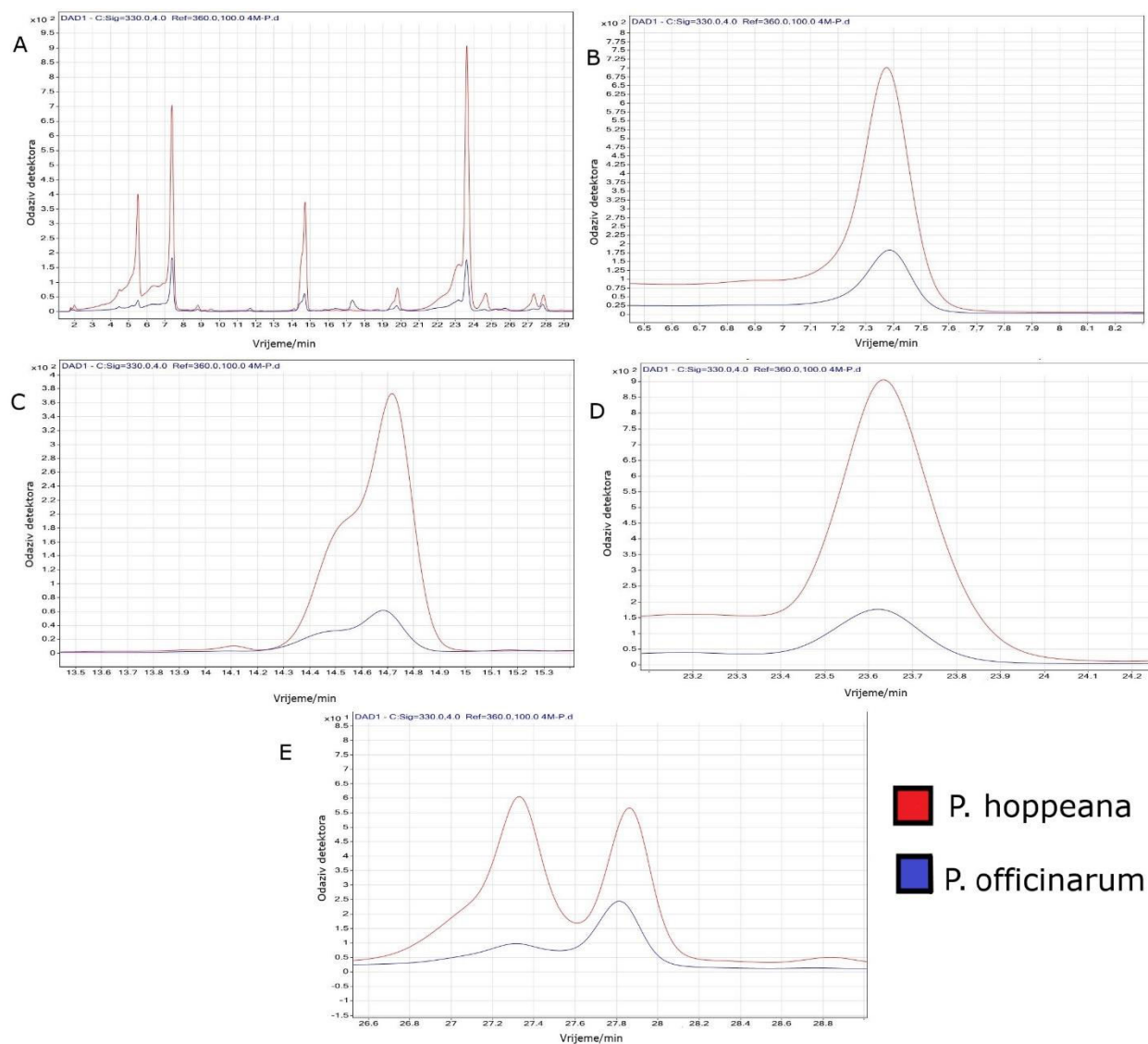


Slika 7. LC-UV kromatogram ekstrakta komercijalno dostupnog uzorka *P. officinarum* u metanolu s označenim derivatima. $\lambda=330$ nm.

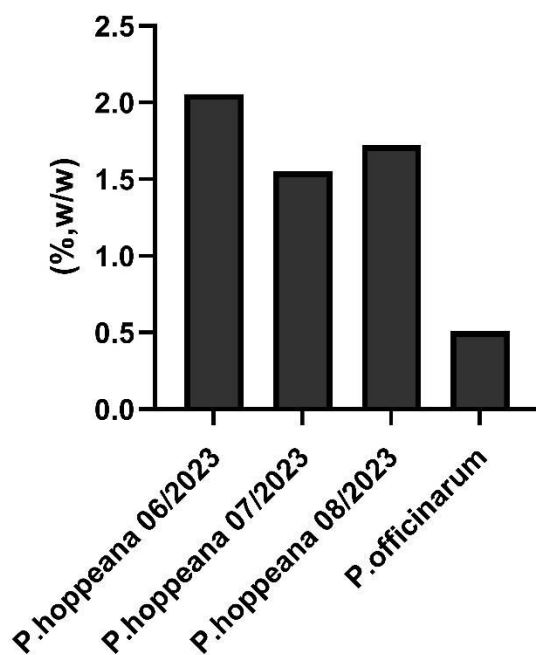
Identično kao i kod analize uzroka *P. hoppeana*, usporedbom retencijskih vremena odredili su se derivati CGA koji pripadaju pojedinom piknu. Dolazi do malih pomaka u retencijskim vremenima 3,4-CQA i 3,5-/1,5-CQA. Profil samog spektra se slaže s spektrom *P. hoppeana*. Također, zabilježena je prisutnost neidentificiranih spojeva. Integracijom pikova dobivena je površina ispod krivulja iz kojih su se izračunali maseni udjeli derivata.

<i>Pilosella officinarum</i>	CGA	3,4-CQA	1,5/3,5-CQA	4,5-CQA	Ukupno
Površina ispod krivulje	1767.81	41.46	1805.54	211.98	
mg/g	9.48	0.35	3.55	0.95	14.33
(%,w/w)	0.32%	0.01%	0.12%	0.03%	0.48%

Tablica 8. Površine ispod krivulja LC analiza derivata CGA i (%,w/w) udjeli pojedinih derivata u uzorcima *P. officinarum*



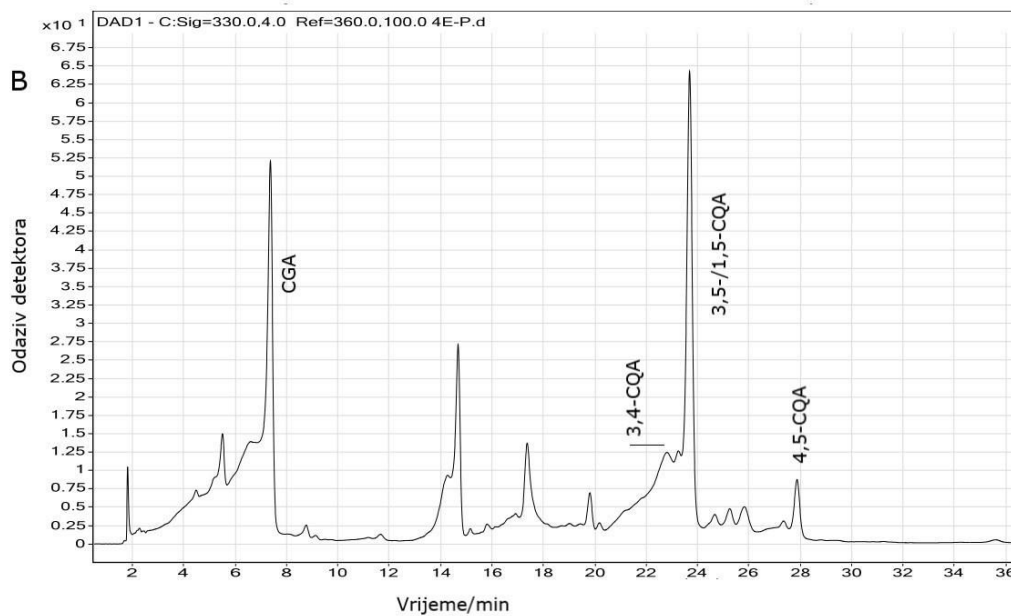
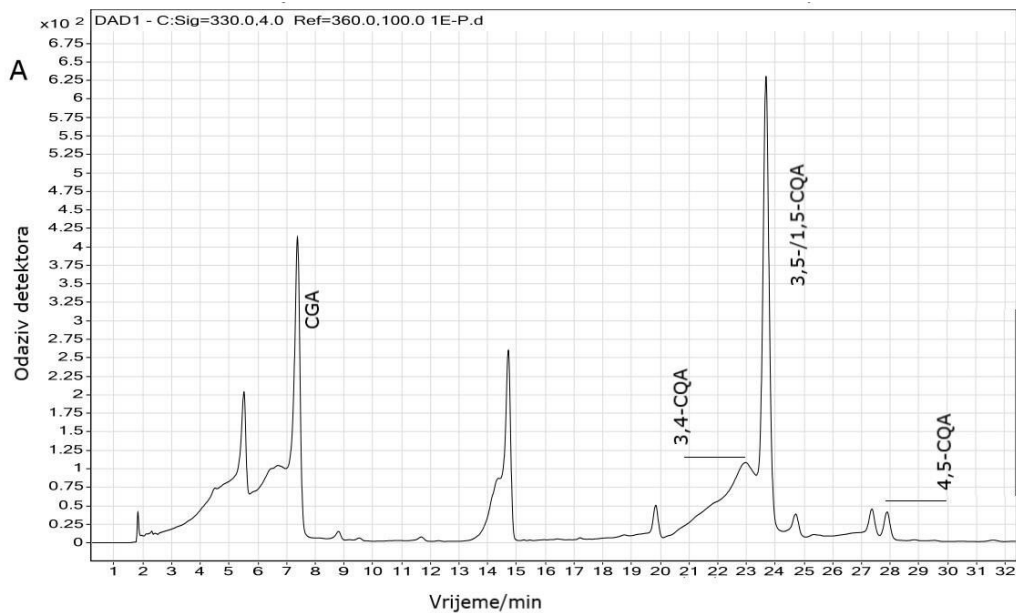
Slika 8. Preklopljeni spektri *P. hoppeana* i *P. officinarum*. A) Cijeli LC spektar. B) Preklop CGA. C) Preklop spojeva s rentencijskim vremenom 14.5 min. D) Preklop 3,4-CQA i 3,5-/1,5-CQA. E) Preklop 4,5-CQA.



Slika 9. Uzorci *P. hoppeana* ekstrahirani u metanolu sadrže više derivata CQA.

4.4.4. LC-UV analiza uzoraka ekstrahiranih u etanolu

Obzirom da metanol nije ekološki prihvatljivo otapalo, ispitivana je uspješnost ekstrakcije uzoraka obiju biljki u etanolu.

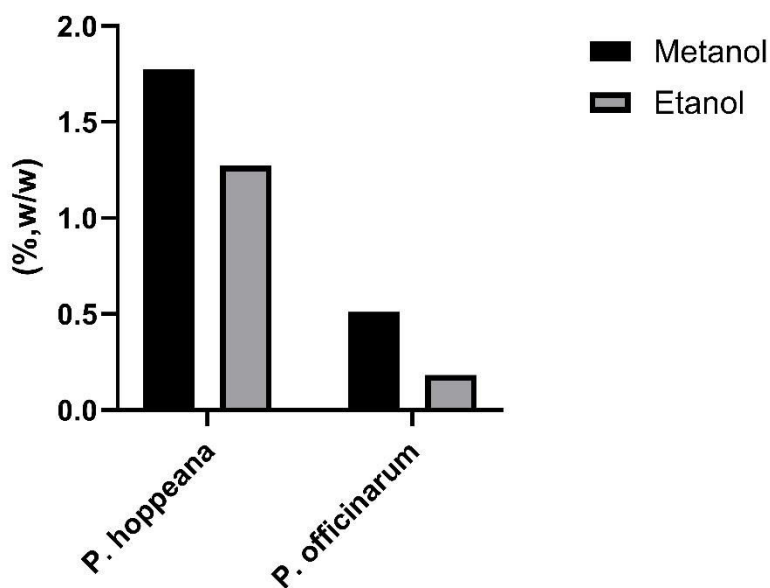


Slika 10. A) LC-UV kromatogram ekstrakta *P. hoppeana* iz lipnja 2023. godine u etanolu s označenim derivatima. $\lambda=330$ nm. **B)** LC-UV kromatogram ekstrakta komercijalno dostupnog uzorka *P. officinarum* u etanolu s označenim derivatima. $\lambda=330$ nm.

Profil samih pikova je sličan između uzoraka *P. hoppeana* i *P. officinarum* ekstrahiranih u etanolu te su oba slična uzorcima ekstrahiranih u metanolu. Svi derivati kaveoilkininske kiseline mogu se uspješno vizualizirati na dobivenom spektru te se mogu integrirati njihovi pikovi. Pikovi za 3,5- i 1,5-CQA se preklapaju i nije ih moguće razlikovati opisanom metodom. U oba uzorka prisutno je nekoliko pikova za koje se nije ispitivao standard. Više je nepoznatih supstanci u uzorku *P. officinarum*. Integracijom pikova dobivene su površine ispod krivulja koje su se uvrstile u jednadžbe pravaca dobivene linearnom regresijom kako bi se izračunali maseni udjeli ispitivanih derivata.

		CGA	3,4-CQA	1,5/3,5-CQA	4,5-CQA	Ukupno
mg/g	<i>P. hoppeana</i> (06/2023)	18.97	1.76	13.80	1.63	36.16
	<i>P. hoppeana</i> (07/2023)	14.25	0.98	9.85	1.45	26.53
	<i>P. hoppeana</i> (08/2023)	21.60	0.61	12.92	1.50	36.62
	<i>P. officinarum</i>	2.45	0.26	1.43	0.52	4.66
(% _{w/w})	<i>P. hoppeana</i> (06/2023)	0.63%	0.06%	0.46%	0.05%	1.21%
	<i>P. hoppeana</i> (07/2023)	0.47%	0.03%	0.33%	0.05%	0.88%
	<i>P. hoppeana</i> (08/2023)	0.72%	0.02%	0.43%	0.05%	1.22%
	<i>P. officinarum</i>	0.08%	0.01%	0.05%	0.02%	0.16%

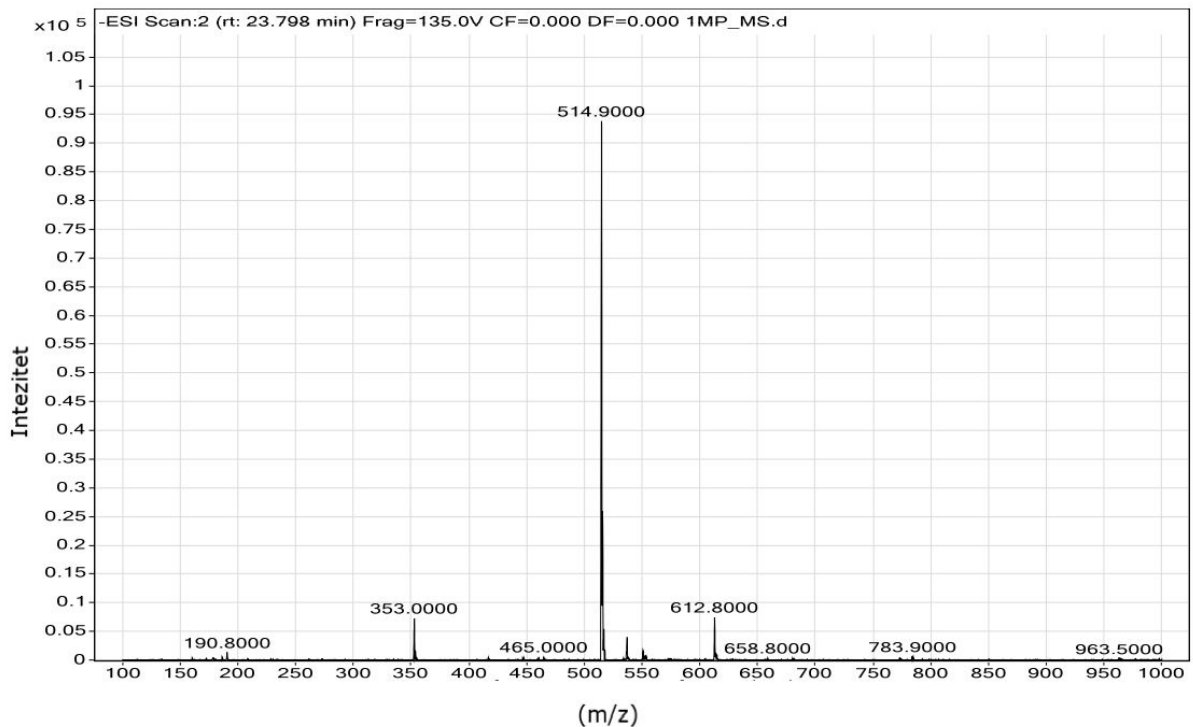
Tablica 9. Sadržaj derivata kaveoilkininskih kiselina izražen u mg/g i (%_{w/w}) u uzorcima *P. hoppeana* i *P. officinarum* ekstrahiranim u etanolu.



Slika 11. Metanol je bolje otapalo za ekstrakciju derivata kaveoilkinske kiseline iz *P. hoppeana* i *P. officinarum*.

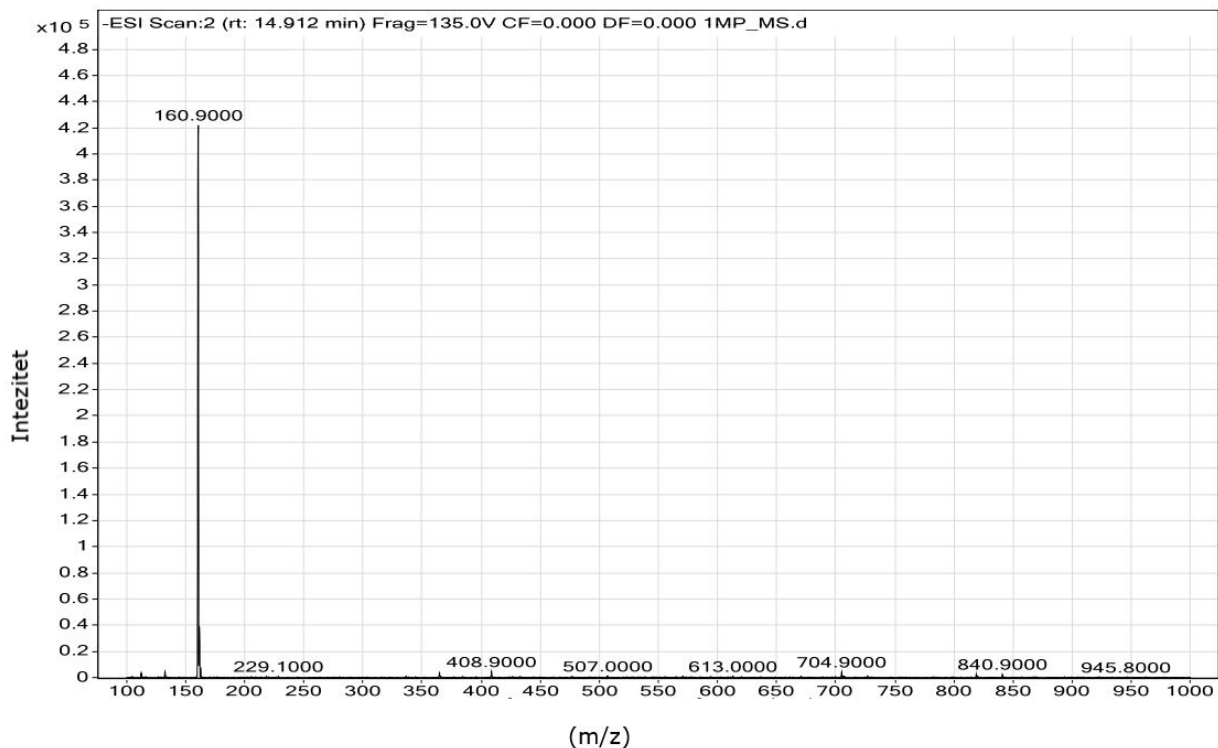
4.4.5. LC-MS

Kako bi se utvrdila selektivnost metode uzorci su se analizirali masenom spektrometrijom. Analizirani su uzorci *P. hoppeana* iz svibnja 2023. godine i uzorak *P. officinarum*.



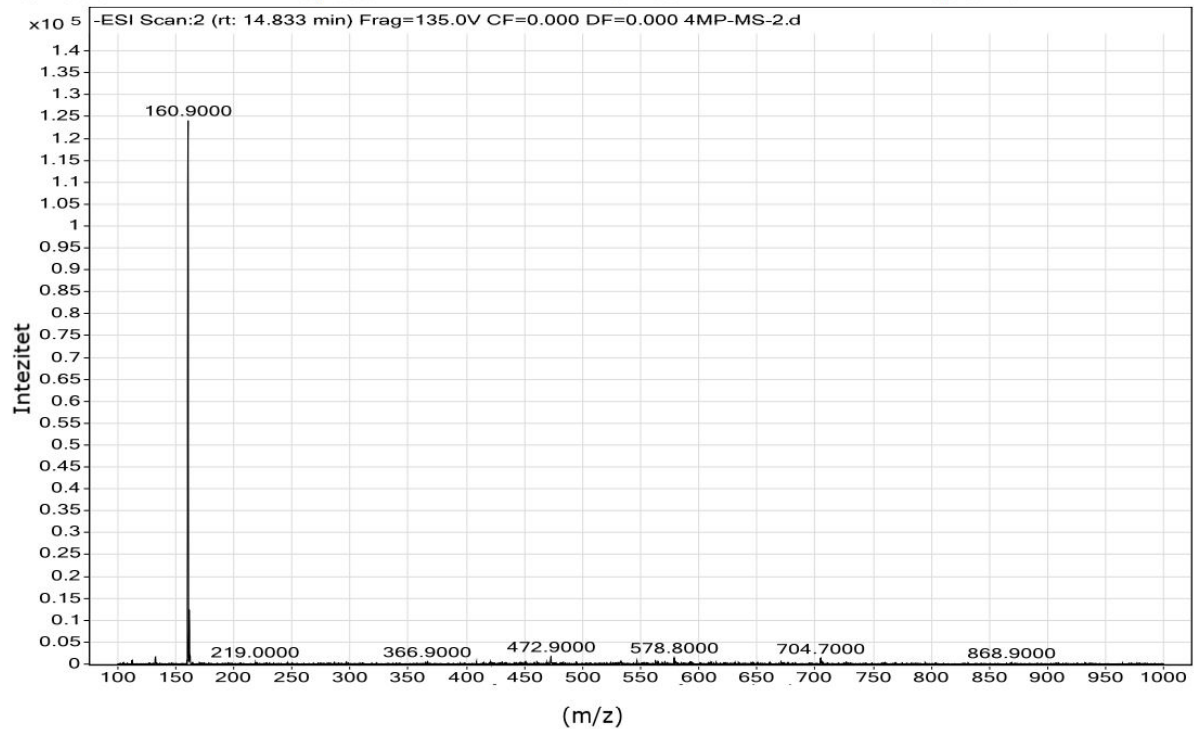
Slika 12. MS spektar uzorka *P. hoppeana* u metanolu iz svibnja 2023. godine, retencijsko vrijeme 23.8 min, odgovarajuća supstanca je 3,5-/1,5-CQA, pozitivan mod.

Prevladavajući pik omjera mase i naboja u uzorcima *P. hoppeana* za 3,4-3,5-/1,5- i 4,5-CQA je 514.9, uz prisutnost dva ostala pika (353.0 i 612.8). Kod MS spektra CGA prevladavaju pikovi od 179.0 i 191.0



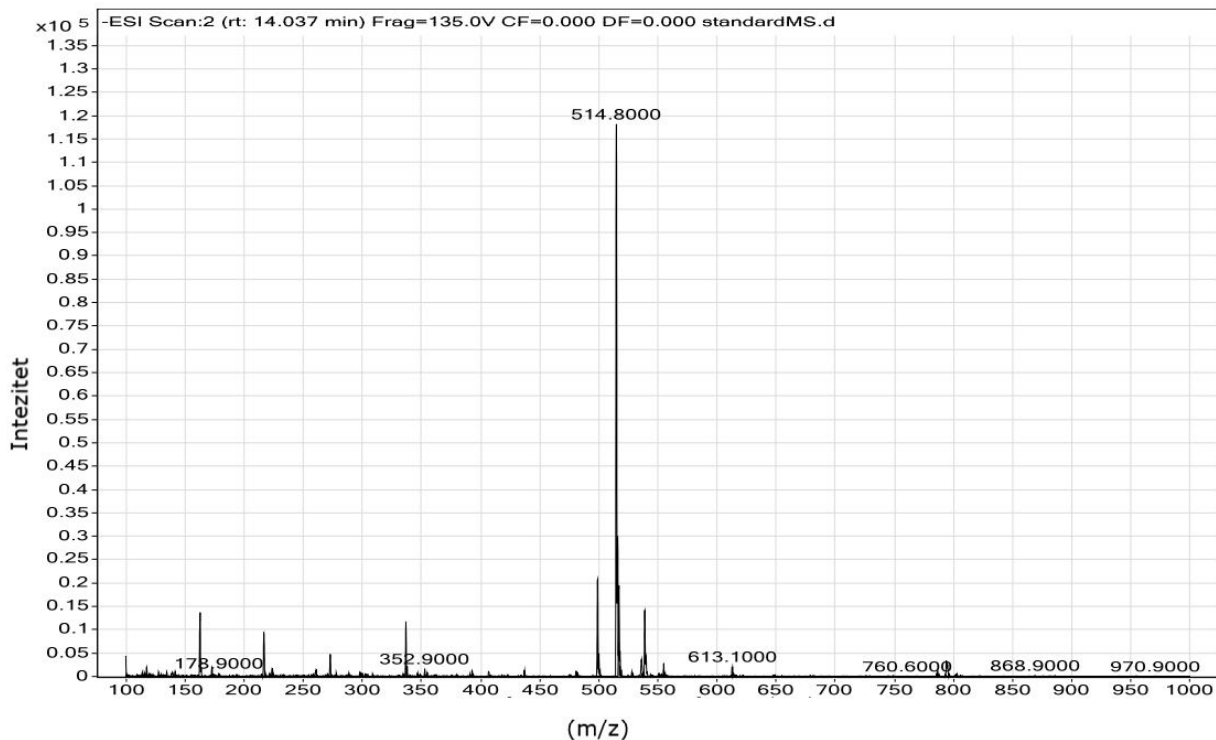
Slika 13. MS spektar uzorka *P. hoppeana* u metanolu iz svibnja 2023. godine, retencijsko vrijeme 14.9 min, nepoznata odgovarajuća supstanca, pozitivan mod.

U MS spektru retencijskog vremena koje odgovara 1,3-CQA ne postoje m/z omjeri koji odgovaraju 1,3-CQA, već dominira pik koji iznosi 160.9. Analizom MS spektra istog retencijskog vremena *P. officinarum*, ustanovila se slična situacija.



Slika 14. MS spektar uzorka *P. officinarum* u metanolu, retencijsko vrijeme 14.8 min, nepoznata odgovarajuća supstance, pozitivan mod.

Kao i u *P. hoppeana*, u uzorku *P. officinarum* retencijskog vremena koje odgovara 1,3-CQA ne postoje m/z omjeri koji odgovaraju 1,3-CQA, već dominira pik s omjerom 160.9. Radi neočekivanih rezultata, izvršila se LC-MS analiza čistog purificiranog standarda 1,3-CQA.



Slika 15. MS spektar standarda 1,3-CQA u metanolu, retencijsko vrijeme 14 min, pozitivan mod.

MS spektar pročišćenog standarda 1,3-CQA u 14 minuti prikazuje jedan pik od 514.8 uz nekoliko manjih pikova. Nije prisutan pik od 160.9 prisutan u uzorcima *P. hoppeana* i *P. officinarum*.

4.4.6. Validacija

Točnost metode odredila se injektiranjem već pripremljenih otopina za validaciju. Otopina standard : metanol 1:1 uspoređivala se s razrjeđenjem standarda od 0.5 mg/mL. Otopina uzorak *P. hoppeana* : metanol 1:1 uspoređivao se s uzorkom *P. hoppeana* iz svibnja podijeljen s 2. Otopina standard : uzorak 1:1 uspoređivao se s zbrojem razrijeđenog standarda od 0.5 mg/mL i uzorka *P. hoppeana* iz svibnja podijeljen s 2.

	CGA	3,4-CQA	1,5/3,5-CQA	4,5-CQA	Izračunati prosjek
Standard: metanol (1:1)	16%	17%	16%	18%	17%
Standard: metanol (1:1)*	101%	100%	97%	112%	103%*
Uzorak: metanol (1:1)	89%	NA	100%	74%	88%
Standard: uzorak (1:1)	91%	99%	96%	89%	94%

Tablica 10. Povratne vrijednosti (*recovery*) izračunatih koncentracija za svaki derivat. Otopine za validaciju uspoređivane su s razrjeđenjem standarda od 0.5 mg/mL i uzorcima *P. hoppeana* iz svibnja. * korigirana koncentracija.

Povratne vrijednosti za uzorak : metanol (1:1) i standard : uzorak (1:1) iznose 88%, to jest 94%, što je prihvatljivo. Kod otopine standard : metanol (1:1) povratna vrijednost iznosi 17%, što nije prihvatljivo. Činjenicom da sve povratne vrijednosti prate trend ($\approx 17\%$, $c \approx 0.085$ mg/mL), uz pretpostavku da je došlo do greške u pipetiranju tokom pripreme samih otopina, mogu se izračunati korigirane povratne vrijednosti uspoređivanjem površina ispod pikova ispitivane otopine s površinama ispod pikova koji odgovaraju koncentraciji standarda 0.085 mg/mL. Korekcijom povratne vrijednosti standard : metanol (1:1) i 103%, što je prihvatljivo. Koncentracija 3,4-CQA u 50% razrjeđenju uzorka *P. hoppeana* je ispod granica detekcije te se ne uzima u obzir.

5. Rasprava

Biljke proizvode različite vrste metabolita, od kojih se neki proizvode tijekom sekundarnog metabolizma, nazivaju se sekundarnim metabolitima. Među njima su važni alkaloidi, terpenoidi, steroidi i polifenolni spojevi. Te kemikalije (fitokemikalije) raspoređene su u različitim dijelovima biljke. Točna uloga ovih metabolita nije u potpunosti istražena, u biljaka oni služe za odbijanje biljojeda, patogena i insekata, privlačenja oprašivača te suočavanja s abiotiskim stresom [43]. Osim toga, poznato je da fitokemikalije pokazuju niz bioaktivnosti poput antimikrobne, antikancerogene, antioksidacijske, i repelentne aktivnosti prema insektima [43]. Iz navedenog razloga biljni sekundarni metaboliti imaju veliki potencijal za upotrebu u medicini, industriji, poljoprivredi i prehrambenoj tehnologiji. Biljke bogate fenolnim kiselinama pokazuju se kao moguće terapijske opcije za veliki spektar indikacija. Jedna od tih terapijskih biljki bogatih fenolnim kiselinama je *P. officinarum*. Europska Medicinska Agencija nedavno je odobrila korištenje *P. officinarum* u obliku biljnog čaja ili usitnjenog biljnog materijala za povećavanje volumena urina [2]. Nadalje, CGA i derivati CQA, koji čine većinu sastava fenolnih kiselina *P. officinarum*, osim diuretičkih svojstava [37], sve se više pokazuju kao dobri antioksidansi [20], anti mikrobni [40][29] te protu upalni spojevi [28][27]. Veliki znanstveni interes za terapijskim svojstvima i medicinskom primjenom *P. officinarum* posljedica je njenog korištenja u narodnoj i tradicionalnoj medicini, pogotovo u južnoj i jugozapadnoj Europi [4]. Iako je *P. officinarum* najistraživanija vrsta roda *Pilosella*, taj rod također sadrži druge vrste vrlo sličnog makroskopskog izgleda. Neminovno je da se nije koristila isključivo *P. officinarum* za svoja ljekovita svojstva, nego i ostali pripadnici tog roda. Činjenica da su kemijski sastavi vrsta roda *Pilosella* kvalitativno vrlo slični [6], dovodi do znanstvenog interesa za drugim vrstama roda kako bi se pronašle bolje opcije za liječenje indikacija.

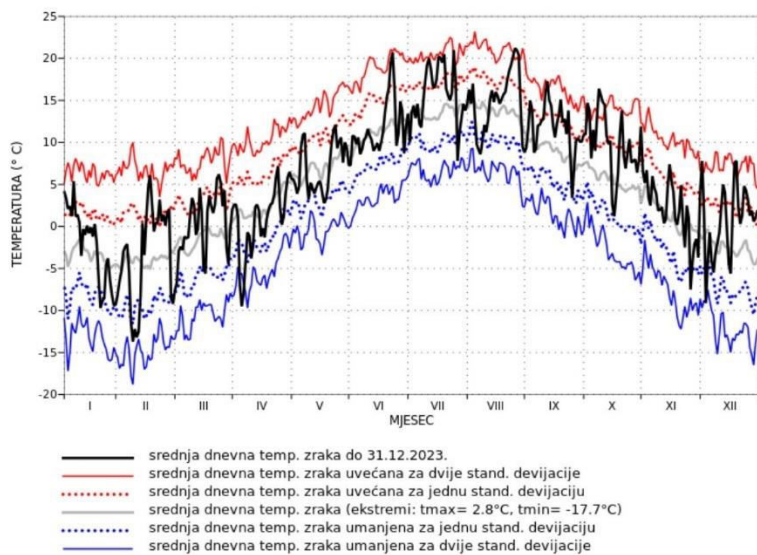
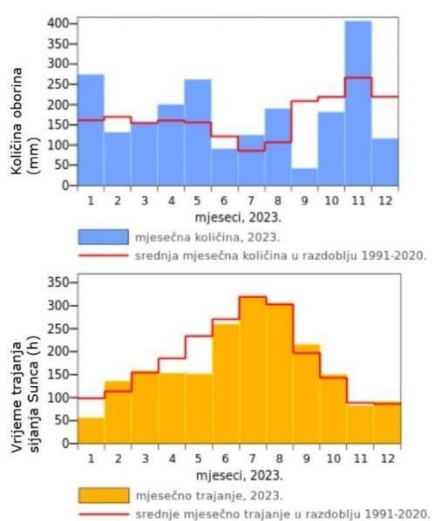
Jedna od vrsti od interesa radi pretpostavke za njenim ljekovitim svojstvima je *P. hoppeana*. Zbog svojeg kemijskog sastava sličnom *P. officinarum* može se pretpostaviti njeno korištenje u istim indikacijama. U radu su se HPLC metodom računale koncentracije i maseni udjeli fenoličnih kiselina (specifično klorogenska i dikaveoilkininske kiseline) za obje vrste.

Dokazana je prisutnost CGA, 3,4 – CQA, 3,5 – CQA, 1,5 – CQA i 4,5 – CQA u obje vrste. Identifikacijom i kvantifikacijom CGA i CQA utvrđeno je da je količina fenolnih kiselina u *P. hoppeana* veća nego u *P. officinarum*. Analizom ekstrakata *P. hoppeana* u metanolu iz tri mjeseca 2023. godine dobivene su maseni udjeli: 1.91 % (srpanj 2023), 1.5 % (lipanj 2023) te 1.59% (kolovoz 2023). Srednja vrijednost masenih udjela iznosi 1.67 %, što je veće od masenog udjela fenolnih kiselina u *P. officinarum* koji iznosi svega 0.48 %. Posljedično, iz navedenih rezultata, diuretički, antioksidativni, antimikrobni te anti upalni učinci *P. officinarum* vezani uz njene koncentracije fenolnih kiselina mogu se pridodati *P. hoppeana* te je ovo još jedan korak bliže prihvaćanju *P. hoppeana* kao herbalnog medicinskog pripravka od strane EMA-e.

Analizom pojedinih derivata CQA u ekstraktima *P. hoppeana* jasno je da CGA dominira (≈ 64 % ukupnog masenog udjela opada na CGA). 3,4- i 4,5-CQA su najmanje zastupljene CQA (zajedno ≈ 5 %). Nadalje, precizna količina nije uspješno definirana za 3,5- i 1,5- CQA radi preklapanja njihovih odgovarajućih pikova. U prethodno objavljenom metodi [41] pikovi za 3,5- i 1,5-CQA uspješno su se mogli razdvojiti i integrirati te nije bilo prisutno preklapanje. Jedan od mogućih razloga zašto je u eksperimentu opisanom u radu došlo do preklapanje je činjenica da se koristila kolona dimenzija 150 mm x 4.6 mm, 3.5 μ m, dok se u prethodno objavljenom metodi koristila kolona dimenzija 150 mm x 2.1 mm, 3.5 μ m. Uži promjer kolone produžuje retencijska vremena svih spojeva te omogućava preciznije razlikovanje pojedinih spojeva sa sličnim karakteristikama. Također, razlike u širini kolone

zaslužne su za male razlike u retencijskim vremenima svih ispitivanih čestica između radova. Korištenjem kolone sa užim promjerom u budućim eksperimentima mogu se bolje opisati i točno kvantificirati količine 3,5- i 1,5- CQA u *P. hoppeana*.

Mogu se uočiti fluktuacije u ukupnom masenom sastavu fenolnih kiselina u *P. hoppeana* kroz 3 mjeseca. Količina je najveća u lipnju, zatim opada u srpnju te ponovo se bilježi blagi rast za kolovoz. Moguće objašnjenje za taj fenomen je činjenica da su fenolne kiseline sekundarni metaboliti. Biljka ih proizvodi kako bi se zaštitila od različitih tipova biotičkih i abiotičkih stresova, što uključuje vremenske prilike i mikroklimu lokacije na kojoj biljka raste.



Slika 16. Količine oborina, vrijeme trajanja sijanja Sunca i prosječna dnevna temperatura za postaju Zavižan u 2023. godini. Podaci su preuzeti s web stranice DHMZ [44].

Uspoređivanjem podataka vremenskih prilika područja na kojemu je biljka rasla s količinom sekundarnih metabolita mogu se objasniti fluktuacije u njihovim količinama. U lipnju se može zamijetiti smanjena količina oborina i znatno viša temperatura zraka u odnosu na srednje mjesečnu za razdoblje od prethodnih 30 godina. U kolovozu je također zabilježena znatno viša

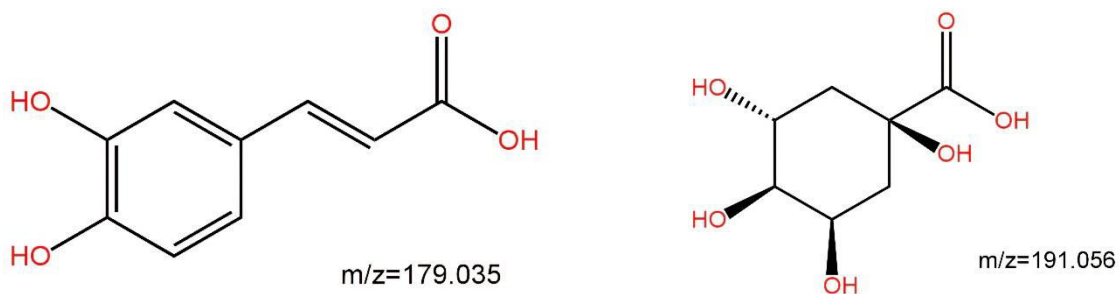
temperatura zraka, no i količina oborina je veća. Nagle i ekstremne promjene temperatura zraka i količina padalina uzrokuju stres biljci, čiji je odgovor povećana proizvodnja obrambenih sekundarnih metabolita, uključujući CGA i CQA. Bitno je napomenuti da ne postoje podatci o mikroklimi točne lokacije na kojima su biljke prikupljene, već se koriste dostupni podaci najbliže meteorološke postaje, te se potencijalne razlike između dostupnih podataka i stvarnih vrijednosti trebaju uzeti u obzir.

Ukupan sastav fenolnih kiselina u ekstraktu *P. officinarum* iznosi 0.48 %, što je znatno manje nego kao prethodno opisano koristeći istu metodu [41], u kojoj zabilježen ukupan sastav iznosi 1.0 %. Potencijalni razlozi velike razlike u (w/w) omjerima CQA mogu biti razni. Jedan razlog može biti razlika samog biljnog materijala, točnije uzorkovanja. U spomenutom radu nisu navedeni način, vrijeme i mjesto prikupljanja te nije opisano skladištenje biljnog materijala korištenog u eksperimentu, no navedeno je da je biljni materijal sadržavao nadzemni dio kao i gornje dijelove korijenja. Činjenica da je u ovom radu korišten suhi biljni materijal nabavljen komercijalno te da su korišteni isključivo listovi za ekstrakciju, može biti potencijalni razlog razlika među rezultatima. Drugi razlog za razliku u kvantificiranim masenim udjelima može se pripisati činjenici da se u spomenutom radu u obzir uzimao spoj za kojeg se smatralo da je 1,3-CQA, no na temelju rezultata dobivenih u ovom istraživanju postoje čvrsti razlozi za sumnju da je taj spoj uistinu 1,3-CQA.

Glavni razlog za sumnju proizlazi iz rezultata masene spektrometrije. Uspoređivanjem retencijskih vremena standarada s vremenima spojeva u uzorku, ona su identična za sve derivate uz manje pomake (koji se mogu pripisati promjenama u molekulskim silama i manjim promjenama uvjeta kada se analizira više molekula odjednom, nego svaka zasebno). No, za standard 1,3 - CQA retencijsko vrijeme iznosi 14.5 min, dok u analizi uzoraka obje vrste, retencijsko vrijeme tog derivata iznosilo je 14.9 min, što

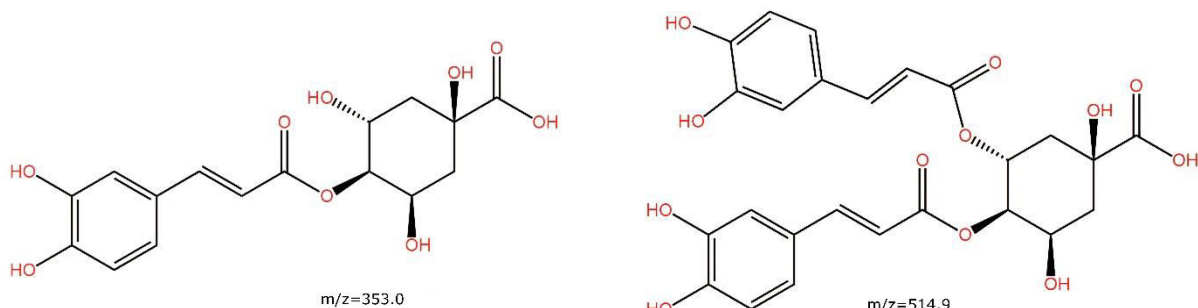
je prevelika razlika da bi se mogla jednostavno opravdati prethodno navedenim razlozima. Nadalje, jedini istaknuti pik u tom retencijskom vremenu iznosi 160.9, što ne odgovara niti jednom zabilježenom fragmentu CQA. Daljnja MS analiza čistoga standarda prikazala je pik koji iznosi 514.9, što se podudara s očekivanim omjerom. Svi ovi rezultati ukazuju da je u uzorku obje biljke prisutan spoj s vrlo sličnim retencijskim vremenom 1,3 – CQA, no MS analizom utvrđeno da se uopće ne radi o 1,3 – CQA. Daljnjim ispitivanjem i eksperimentima trebalo bi se utvrditi o kojem se spoju radi, obzirom da je maseni udio tog neidentificiranog spoja u biljci relativno velik.

U nastavku analize pikova koji pripadaju CGA uočeni su ioni omjera mase i naboja 179.0 i 191.0. Identični rezultati dobiveni su u još jednoj studiji [21]. Na Slici 17 prikazane su kemijske strukture produkti fragmentacije s odgovarajućim m/z omjerima.



Slika 17. Produkti fragmentacije CGA i njihovi m/z omjeri.

Pikovi omjera 514.8 i 353.0 dominiraju na MS spektru CQA, te su također identični kao već prije opisani očekivani fragmenti u literaturi [21]. Njihovi fragmenti prikazani su na Slici 18.



Slika 18. Produkti fragmentacije CQA i njihovi m/z omjeri.

Pik omjera 612.8 nije opisan u literaturi, no obzirom da njegov intenzitet nije velik, može se pretpostaviti da je vjerojatno produkt reakcije između nekih od fragmenata.

Nadalje, radi činjenice da je etanol daleko prihvatljivije otapalo nego metanol u ekološkom i logističkom smislu, u eksperimentima u radu analizirala se uspješnost ekstrakcije obaju biljki u etanolu i uspoređivala se s ekstrakcijom u metanolu. U slučaju da je etanol približno dobar ili identičan izbor za otapalo prilikom ekstrakcije kao i metanol, u budućnosti se može predložiti zamjena metanola etanolom za ekstrakciju (pogotovo ako nastane potreba za povećanjem procesa). No, HPLC utvrđeno je da etanol nije dobro otapalo za ekstrakciju *P. officinarum*, niti *P. hoppeana*. Maseni udjeli flavonoida u etanolnom ekstraktu *P. hoppeana* iznose 1.21 %, 0.88 % te 1.22 %, a u *P. officinarum* svega 0.16 %. *P. hoppeana* se ekstrahira 33 % lošije, dok se *P. officinarum* ekstrahira 66 % lošije u etanolu, s obzirom na metanol.

Iako ovi rezultati prikazuju *P. hoppeana* kao bolji odabir za liječenje određenih indikacija nego *P. officinarum* na temelju usporedbe njihovih kemijskih sastava, to se ne može sa sigurnošću konstatirati. Jedan od nedostataka ovog istraživanja je uzorkovanje. Naime, analizirali su se uzorci *P. hoppeana* prikupljeni kroz period od 3 mjeseca, no na istoj lokaciji. Kako mikroklima i vremenske prilike mogu znatno utjecati na proizvodnju sekundarnih metabolita, nije pogrešno za pretpostaviti da bi se količine

derivata CQA razlikovale kada bi se prikupljali uzorci s drugih lokacija. Također, uzorci *P. officinarum* nabavljeni su komercijalno; kvaliteta podataka bi bila znatno viša kada bi se uzorci i ove vrste prikupljali s više lokacija te bi se dobio bolji uvid analizom pojedinih jedinki nego analizom industrijski prerađene mješavine više jedinki. Nadalje, sva mjerenja u istraživanju su provedena jedan put. Kako bi rezultati bili pouzdaniji, u narednim eksperimentima potrebno je mjerenja provoditi u multiplikatu.

6. Zaključak

P. hoppeana sadrži veće količine fenolskih kiselina kao aktivnih tvari, a koje doprinose ljekovitim svojstvima vrste *P. officinarum*. *P. hoppeana* sadrži više derivata kaveoilkinske kiseline za koje je opisano da imaju diuretična svojstva. Ekstrakti obje vrste imaju veći faktor ekstrakcije kada se koristi metanol kao otapalo u usporedbi sa etanolom. U obje biljke prisutni su klorogenska kiselina, 3,4 – dikaveoilkininska kiselina, 1,5 – dikaveoilkininska kiselina, 3,5 – dikaveoilkininska kiselina i 1,4 – dikaveoilkininska kiselina, dok nije pronađena 1,3 – dikaveoilkininska kiselina za koju se smatralo da je prisutna u biljci.

Postoji nekoliko izazova povezanih s pouzdanom karakterizacijom pojedinačnih CQA, uključujući degradaciju i transformaciju kroz obradu uzorka, nedostatak komercijalno dostupnih autentičnih standarda i prisutnost više izomera sa sličnim fizikalno-kemijskim svojstvima koji čine nedvosmislenu karakterizaciju izomera izazovnom. U budućim istraživanjima ove vrste potrebno je izvršiti uzorkovanje biljaka s različitih lokacije i te postavke uzeti u razmatranje. Nadalje, ispitivanjem uzoraka u multiplikatu također bi se poboljšala kvaliteta rezultata.

Trenutni rezultati pokazuju da je nemoguće razlikovati vrstu *P. officinarum* od *P. hoppeana* određivanjem derivata CQA i njihovim ukupnim sadržajem u biljci. Ukoliko će se razvijati monografija Europske farmakopeje, biti će potrebno naći optimalne biomarkere za razlikovanje ovih dviju vrsta. Europska agencija za lijekove trenutno navodi primjenu isključivo vrste *P. officinarum*.

U svakom slučaju, iako rezultati ukazuju na sličan kemijski sastav *P. hoppeana* i *P. officinarum*, bilo bi korisno provesti dodatne pretkliničke studije i klinička ispitivanja kako bi se u potpunosti poduprla tradicionalna upotreba vrste i razumio specifičan način na koji pomaže kod bolesti

mokraćnog sustava. Glavna aktivna tvar *P. hoppeana*, CGA, prirodan je spoj sa širokom paletom farmakoloških utjecaja (antioksidativni, anti upalni, anti bakterijski te diuretički učinak). Trenutačno se za istraživanje CGA povećava znanstveni interes, međutim, biosinteza, regulacija, farmakološka aktivnost te primjena CGA nije sistematizirana i daleko je od savršene. Daljnje pretkliničke i kliničke studije se trebaju provesti kako bi se potvrdio njen mehanizam djelovanja i opisali toksikološki podatci te posljedično, *P. hoppeana* mogla prihvatiti kao ljekovita biljka od strane medicinskih agencija.

7. Literatura

1. World Health Organisation [WHO] (2023) Traditional medicine. <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/traditional-medicine>. Accessed 24 Jul 2024
2. Medicines Agency E (2015) Assessment report on *Hieracium pilosella* L., herba cum radice.
3. Orrell TM, Bailly N (2018) Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2018 Annual Checklist.
4. Willer J, Zidorn C, Juan-Vicedo J (2021) Ethnopharmacology, phytochemistry, and bioactivities of *Hieracium* L. and *Pilosella* Hill (Cichorieae, Asteraceae) species. *J Ethnopharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114465>
5. Leksikografski zavod Miroslav Krleža (2024) runjika. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje
6. Bishop GF, Davy AJ (1994) BIOLOGICAL FLORA OF THE BRITISH ISLES*.

7. Gadella ThWJ, Kliphuis E (1970) Cytotaxonomic Investigations in Some Angiosperms Collected in the Valley of Aosta and in Tre National Park « Gran Paradiso ». *Caryologia* 23:363–379
8. Dioscorides Pedanius of Anazarbos, Osbaldeston TAnne, Wood RP (2000) *De materia medica : being an herbal with many other medicinal materials : written in Greek in the first century of the common era : a new indexed version in modern English*. IBIDIS
9. Redzic S (2010) Wild medicinal plants and their usage in traditional human therapy (Southern Bosnia and Herzegovina, W. Balkan). *Journal of Medicinal Plants Research* 4:1003–1027
10. Sokmen A, Jones BM, Erturk M (1999) The in vitro antibacterial activity of Turkish medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 67:79–86
11. Ivancheva S, Stantcheva B (2000) Ethnobotanical inventory of medicinal plants in Bulgaria. *J Ethnopharmacol* 69:165–172
12. Popović ZS, Smiljanic M (2014) Wild flora and its usage in traditional phytotherapy.
13. María Vázquez F, Ramos S (2008) *Plantas Medicinales en la Comunidad de Extremadura*.

14. Rigat M, GA, Ves, J, GT, (2017) Estudis etnobotànics a la comarca del Ripollès (Pirineu, Catalunya, península Ibèrica). *Collect Bot*
15. Astrologova LE, Feklistov PA (2002) *Lekarstvennyye Rasteniya Severak*. Arkhangelsk State Technical University, Arkangelsk
16. Kolosova VB (2010) The Role of Plant Characteristics in Slavic Folk Medicine. *Folklorica*. <https://doi.org/10.17161/folklorica.v10i2.3762>
17. Leporatti ML, Ivancheva S (2003) Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *J Ethnopharmacol* 87:123–142
18. Fakultät N, Maja Dal Cero von (2016) *Swiss Medicinal Flora: a Result of Knowledge Transmission over the Last Two Millennia*.
19. Sareedenchai V, Zidorn C (2010) Flavonoids as chemosystematic markers in the tribe Cichorieae of the Asteraceae. *Biochem Syst Ecol* 38:935–957
20. Stanojević L, Stanković M, Nikolić V, Nikolić L, Ristić D, Čanadanovic-Brunet J, Tumbas V (2009) Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of *Hieracium pilosella* L. extracts. *Sensors* 9:5702–5714

21. Alcázar Magaña A, Kamimura N, Soumyanath A, Stevens JF, Maier CS (2021) Caffeoylquinic acids: chemistry, biosynthesis, occurrence, analytical challenges, and bioactivity. *Plant Journal* 107:1299–1319
22. Kremr D, Bajer T, Bajerová P, Surmová S, Ventura K (2016) Unremitting problems with chlorogenic acid nomenclature: A review. *Quim Nova* 39:530–533
23. Gonthier M-P, Verny M-A, Besson C, Rémésy C, Scalbert A (2003) Chlorogenic Acid Bioavailability Largely Depends on Its Metabolism by the Gut Microflora in Rats. *J Nutr* 133:1853–1859
24. Brandes MS, Gray NE (2020) NRF2 as a Therapeutic Target in Neurodegenerative Diseases. *ASN Neuro* 12:175909141989978
25. Liang N, Dupuis JH, Yada RY, Kitts DD (2019) Chlorogenic acid isomers directly interact with Keap 1-Nrf2 signaling in Caco-2 cells. *Mol Cell Biochem* 457:105–118
26. Stevens JF, Revel JS, Maier CS (2018) Mitochondria-Centric Review of Polyphenol Bioactivity in Cancer Models. *Antioxid Redox Signal* 29:1589–1611
27. Zheng S, Zhang H, Liu R, Huang C, Li H, Deng Z, Tsao R (2021) Do short chain fatty acids and phenolic metabolites of the gut have

synergistic anti-inflammatory effects? – New insights from a TNF- α -induced Caco-2 cell model. *Food Research International* 139:109833

28. Monagas M, Khan N, Andrés-Lacueva C, Urpí-Sardá M, Vázquez-Agell M, Lamuela-Raventós RM, Estruch R (2009) Dihydroxylated phenolic acids derived from microbial metabolism reduce lipopolysaccharide-stimulated cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *British Journal of Nutrition* 102:201–206
29. Fiamegos YC, Kastritis PL, Exarchou V, Han H, Bonvin AMJJ, Vervoort J, Lewis K, Hamblin MR, Tegos GP (2011) Antimicrobial and Efflux Pump Inhibitory Activity of Caffeoylquinic Acids from *Artemisia absinthium* against Gram-Positive Pathogenic Bacteria. *PLoS One* 6:e18127
30. Krzaczek T, Gawrońska-Grzywacz M (2011) Flavonoids and coumarins from *Hieracium pilosella* L. (Asteraceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 78:189–195
31. Perna S, Biserni M, Borsani F, Berardi M, Spadaccini D, Rondanelli M (2020) Effect of a mixture of botanicals extracts plus mannitol on hydration and bloating sensation. An open label study in women with high extra cellular water. *Nat Prod Res* 34:2500–2504
32. Zidorn C, Ellmerer-Müller EP, Stuppner H (2001) A germacranolide and three hydroxybenzyl alcohol derivatives from *Hieracium murorum* and *Crepis bocconi*. *Phytochemical Analysis* 12:281–285

33. Adekenov SM (2015) Searching for natural sesquiterpene lactones—sources of new drug substances. Abstract Retrieves from the Proceedings of 2nd Russian Conference on Medicinal Chemistry
34. Milutinović V, Niketić M, Krunić A, Nikolić D, Petković M, Ušjak L, Petrović S (2018) Sesquiterpene lactones from the methanol extracts of twenty-eight Hieracium species from the Balkan Peninsula and their chemosystematic significance. *Phytochemistry* 154:19–30
35. Gawrońska-Grzywacz M, Krzaczek T (2007) Identification and determination of triterpenoids in *Hieracium pilosella* L. *J Sep Sci* 30:746–750
36. Krzaczek T, Lukaszewicz E, Gawronska-Grzywacz M (2002) Sterols in the roots and herb from *Hieracium pilosella* L. *Herba Polonica* 48:206–209
37. Beaux D, Fleurentin J, Mortier F Effect of extracts of *Orthosiphon stamineus* Benth, *Hieracium pilosella* L., *Sambucus nigra* L. and *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. in Rats.
38. S. Canello, S. Centenaro, G. Guidetti (2017) Nutraceutical approach for struvite uroliths management in cats. *Int J Appl Res Vet Med* 15:19–25

39. Stanojevic L, Stankovic M, Nikolic V, Nikolic L (2008) Anti-oxidative and antimicrobial activities of Hieracium pilosella L. extracts. Journal of the Serbian Chemical Society 73:531–540
40. Bonomo M G, Cafaro ;, Russo ;, Faraone ;, Milella L, Saturnino C, Capasso A, Sinicropi ;, Salzano G (2020) ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT PROPERTIES AND PHYTOCHEMICAL SCREENING OF DIFFERENT MOTHER TINCTURES AGAINST FOOD-BORNE BACTERIA. 1:150–161
41. Borisova-Jan L, Fransson D, Claeson P, Burman R (2017) Liquid Chromatographic Method for the Determination of Caffeoylquinic Acid Derivates in Hieracium pilosella L. Phytochemical Analysis 28:550–557
42. Bae M-J, Shin HS, Shon D-H (2013) Immunosuppression of the Trimellitic Anhydride-Induced Th2 Response by Novel Nonnatural Products Mixture in Mice. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2013:1–8
43. Kumar A, P N, Kumar M, et al (2023) Major Phytochemicals: Recent Advances in Health Benefits and Extraction Method. Molecules 28:887
44. Državni hidrometeorološki zavod (DHMZ) Praćenje klime. In: https://meteo.hr/klima.php?section=klima_pracenje¶m=srednja_temperatura&Grad=zv_sred&Godina=2023.

8. Životopis

Marin Forgić

Državljanstvo: hrvatsko Datum rođenja: 29/01/2001 Spol: Muško Telefonski broj: (+385) 98688924

E-adresa: marin.forgic1@gmail.com

Kućna: Košičevac 5a, 51000 Rijeka (Hrvatska)

O MENI

Student 2. godine diplomskog studija Istraživanje i razvoj lijekova na Odjelu za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci. Uz studiranje, povremeno radim studentske poslove. Komunikativan sam, odgovoran i snalažljiv. Tečno govorim engleski jezik i snalazim se s talijanskim. Zainteresiran sam za nova saznanja i otvoren za nove izazove.

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

Osnovnoškolsko obrazovanje

Osnovna škola Srdoči [2007 – 2015]

Mjesto: Rijeka | Zemlja: Hrvatska

Srednjoškolsko obrazovanje

Prva sušačka hrvatska gimnazija [2015 – 2019]

Mjesto: Rijeka | Zemlja: Hrvatska

Preddiplomski studij Biotehnologija i istraživanje lijekova

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci [2019 – 2022]

Mjesto: Rijeka | Zemlja: Hrvatska

Stručna praksa

Nastavni Zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije [2022 – 2022]

Mjesto: Rijeka | Zemlja: Hrvatska

Upoznavanje s tehnikama analize uzoraka - korištenje metoda HPLC i plinska kromatografija.

Diplomski studij Istraživanje i razvoj lijekova

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci [2022 – Trenutačno]

Mjesto: Rijeka | Zemlja: Hrvatska

JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici: hrvatski

Drugi jezici:

engleski

SLUŠANJE C1 ČITANJE C1 PISANJE C1

GOVORNA PRODUKCIJA C1 GOVORNA INTERAKCIJA C1

talijanski

SLUŠANJE B1 ČITANJE B1 PISANJE B1

GOVORNA PRODUKCIJA B1 GOVORNA INTERAKCIJA B1

Razine: A1 i A2: temeljni korisnik; B1 i B2: samostalni korisnik; C1 i C2: iskusni korisnik

DIGITALNE VJEŠTINE

MS Office (Word Excel PowerPoint) / Komunikacijski programi (Skype Zoom TeamViewer)

VOZAČKA DOZVOLA

Vozačka dozvola: B