

# Identifikacija cinarina u ekstraktu lista artičoke primjenom LC/DAD/MS/MS tehnike

---

Mornar, Ana; Nigović, Biljana

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2012, 68, 541 - 550**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:596888>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2022-05-23**



Repository / Repozitorij:

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



# Identifikacija cinarina u ekstraktu lista artičke primjenom LC/DAD/MS/MS tehnike

ANA MORNAR, BILJANA NIGOVIĆ

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

## Identification of cynarin in artichoke leaf extract by LC/DAD/MS/MS technique

*A b s t r a c t – Artichoke (Cynara scolymus), belonging to the family of Asteraceae, is an herbaceous perennial crop, widely cultivated in the Mediterranean area. The heads of the artichoke are edible and used worldwide, while the leaves are an herbal medicine recognized for a long time for their beneficial and therapeutic effects, including induction of choleresis, LDL oxidation and significant antioxidant, antifungal, antibacterial as well as strong hepatoprotective activity.*

*Artichoke contains very little fat and high levels of minerals, vitamins, fibre, inuline and polyphenols. The most abundant phenolic compounds reported in artichoke leaf are flavonoides such as apigenin and luteolin (both glycosides and rutosides), as well as phenolic acids, particularly derivatives of mono- and di-caffeoylquinic acid. Although all polyphenols are included in cholesterol lowering effect of artichoke leaf, the most responsible one is cynarin, derivative of dicaffeoylquinic acid.*

*As dietary supplements have an important position in health care systems worldwide, their current assessment and quality control are a major bottleneck. Over the last years, major steps were taken to improve the quality of the dietary supplements and also to develop analytical methods ensuring their quality. High performance liquid chromatography has become the most popular analytical technique for analyzing dietary supplements. The main advantages of the technique are high resolution, selectivity, sensitivity and possibility to couple the technique to different detectors.*

*Therefore, the aim of the present work was to develop a new HPLC/DAD/MS/MS method for identification of cynarin present in artichoke leaf extract tablets.*

*(Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Croatia)*

## UVOD

Artičoka (*Cynara cardunculus* subsp. *Scolymus*) je dvogodišnja, ponekad višegodišnja, biljka visoka i do dva metra koja pripada porodici glavočika (slika 1.). Oko središnje stabljike, koja kod većih i starijih biljaka često odrveni, naizmjenično rastu jednostruko do trostruko perasto razdjeljeni, srebrnozeleni listovi. Cvjetne glavice artičoke su prilično velike, promjera i do 15 cm, s bogatim mesnim dnom cvata. Cvate od travnja do kolovoza predivnim plavo-ljubičastim cvjetnim vjenčićem (1).

Ime artičoke potječe od arapske riječi *ardishoki*, međutim u hrvatskom jeziku je u upotrebi i naziv gardun koji potječe ili od arapskog naziva *khurshif* ili od latinskog *cardunculus* kojima je izgovor slova K prešao u G (2).

Točno podrijetlo artičoke još uvijek nije u potpunosti razjašnjeno. Prema nekim autorima podrijetlo potječe iz Etiopije, no njene su slike nađene i na zidovima grobnica egipatskih faraona. Stari Grci su je posluživali kao vrlo cijenjenu delikatesu, a tradiciju uzgoja artičoke od starih Grka preuzeli su i Rimljani. Iako su rimski liječnici često naglašavali ljekovita svojstva artičoke, nakon pada Rimskog Carstva njena upotreba je dugo vremena bila zaboravljena. No, u 15. stoljeću ponovo se uzgaja u Italiji te se iz Italije prenosi dalje u Francusku, Englesku te u Sjedinjene Američke Države (1, 3, 4).

Danas se prvenstveno uzgaja kultivirani oblik artičoke u mediteranskim zemljama te u manjoj mjeri na obalama Tihog i Atlantskog oceana. Vodeći uzgajivač artičoke u svijetu je sigurno Italija koja pokriva preko 50 % svjetske proizvodnje (5). Za pripremu jela koriste se cvjetne glavice odnosno mladi, neotvoreni pupoljci, koji se beru u svibnju i lipnju, dok se u terapijske svrhe upotrebljavaju listovi koji se beru u prvoj godini nakon cvatnje (3, 6, 7).

Danas se artičoka smatra funkcionalnom hranom zahvaljujući njenom bogatstvu mineralima, vitaminima te fitonutrijentima. Sadržava oko 3 % bjelancevina, 10 % ugljikohidrata te svega 0,5 % masti. Prisutne su značajne količine minerala poput kalija, natrija, fosfora, magnezija, kalcija, bakra, željeza, cinka te mangana. Od vitamina najzastupljeniji su vitamini B skupine, vitamin A te vitamin C (3, 8–10). Artičoka je iznimno bogat izvor prebiotika u koje se ubrajaju biljna vlakna, inulin te fruktooligosaharidi. Prebiotici imaju blago laksativno djelovanje te pomažu pri zatvoru. Nadalje, poboljšavaju preživljavanje probiotika ili »dobrih« bakterija tijekom njihova prolaska kroz gornji dio probavnog sustava omogućavajući njihov rast i aktivaciju u



Slika 1. Artičoka (*Cynara cardunculus* subsp. *Scolymus*)

mikroflori debelog crijeva. Također potiskuju rast patogenih bakterija u debelom crijevu. Stoga se posljednjih godina sve više ispituje uloga artičoke odnosno njenih prebiotika u sprječavanju crijevnih infekcija, upalnih bolesti crijeva te snižavanju pojave raka debelog crijeva (11, 12).

Kao što je navedeno ljekovita svojstva artičoke poznata su još iz doba starih Rimljana. Čaj pripremljen iz lišća artičoke tradicionalno se primjenjivao za poboljšanje apetita, pri dispepsiji te za sprječavanje crijevnih infekcija. U posljednje vrijeme proveden je niz kliničkih studija koje su potvrdile antioksidativno, hepatoprotektivno, hipolipemičko, koleretičko, antikolestatičko, antiemetičko, spazmolitičko, karminativno i diuretsko djelovanje ekstrakta lista artičoke (13–18).

Danas je poznato da artičoka svoju ljekovitost ima zahvaljujući prvenstveno bogatom sastavu polifenola, poznatim hvatačima slobodnih radikala. Do sada je nađeno više od 45 različitih polifenola prisutnih u lišću ili glavici artičoke (19). No, struktura i djelovanje svih sastavnica artičoke još uvijek nisu poznati i predstavljaju veliki izazov istraživačima diljem svijeta. Među najzastupljenijim polifenolima ubrajaju se fenolne kiseline poput kavene, kumarinske, hidroksicimne kiseline te derivata mono- i dikaveoilkina kiseline. Flavonoidi apigenin i luteolin, iako prisutni u obliku aglikona, najčešće se javljaju u obliku glikozida rutinozida, glukozida i glukuronida (19–22). Premda se u gotovo svim dijelovima artičoke nalaze značajne količine polifenola, najzastupljeniji su u listovima, stoga se prvenstveno listovi artičoke koriste u terapijske svrhe (3). Na sastav i sadržaj polifenola značajno utječu klimatski uvjeti, biljna sorta, dio biljke uzet za pripremu ekstrakta kao i način pripreme te skladištenja (3, 16). Iako je potvrđeno kako hipolipemičko djelovanje posjeduje niz sastavnica artičoke potrebno je naglasiti da su brojna znanstvena istraživanja pokazala kako je cinarin, derivat di-kaveoilkina kiseline, najzaslužniji polifenol za hipolipemičko djelovanje ekstrakta lista artičoke (18, 23). Uz gore navedene polifenole u ekstraktu artičoke mogu se naći i sapononi, fitosteroli, kumarini, lignani, seskviterpenski laktoni poput cinaropikrina i dehidrocinaropikrina (4, 17).

Značajnije neželjene popratne pojave tijekom uzimanja preparata artičoke do sada nisu zabilježene. Ipak, osobe s opstrukcijom žučnih kanala i žučnim kamencima trebale bi ih izbjegavati. Artičoka sadrži cinaropikrin, potencijalni alergen, stoga bi osobe alergične na biljke iz porodice *Asteraceae* trebale pripaziti pri upotrebi ekstrakta artičoke. Sastavnice artičoke nepovoljno utječu na produkciju mlijeka te se preparati artičoke ne preporučuju dojiljama. Iako ne postoje nikakvi dokazi o štetnosti (mutagenosti i embriotoksičnosti), poželjno je preparate artičoke izbjegavati i u trudnoći. Nadalje, kako nema dovoljno podataka o sigurnost primjene dodatka prehrani koji sadrže artičoku kod djece, poželjno ih je ne davati djeci mlađoj od 12 godina (4).

Na tržištu se nalaze dodaci prehrani koji sadrže ekstrakt lista artičoke dostupni u različitim oblicima kao tablete, efervete, kapsule i pripravak spremljen od svježe biljke (SIPF). Obično se uzimaju uz obrok ili neposredno nakon obroka. Preporučene

terapijske doze su 1,5 g/dan. No na tim proizvodima često nije navedeno sadrže li cinarin i u kojoj koncentraciji.

Ako se primjenjuju za snižavanje kolesterola i lipida uz te preparate poželjno je uzimati i još neke druge prirodne hipolipemike poput omega-3 masnih kiselina, crvene riže te maslinovog ulja. Moguće je koristiti i neke lijekove iz skupine hipolipemika, međutim prethodno je nužno savjetovati se s liječnikom ili ljekarnikom da ne bi došlo do neželjenih popratnih pojava (24–26).

U posljednje vrijeme upotreba dodataka prehrani u svijetu sve više raste, posebice u visoko razvijenim zemljama s ciljem poboljšanja kvalitete života te u prevenciji bolesti. Nažalost je uobičajeno pogrešno mišljenje da su dodaci prehrani s jedne strane vrlo sigurni a s druge strane često slabo djelotvorni. Povjerenje liječnika, ljekarnika i pacijenata u kvalitetu dodataka prehrani poljuljala su brojna istraživanja koja upućuju na njihovu iznimno nisku kvalitetu (27, 28). Istraživanja su pokazala da dodaci prehrani često ne sadrže aktivne tvari ili su one prisutne u nedovoljnoj količini. Posebno zabrinjavajuća činjenica je da preparati ne samo da nisu sadržavali djelatne tvari već su nađene štetne tvari poput teških metala, pesticida i gljivica (29). Stoga je kontrola kvalitete dodataka prehrani od esencijalne važnosti. U posljednje vrijeme veliki su naponi napravljeni da bi se poboljšala kvaliteta dodataka prehrani te je predložen niz analitičkih metoda za ispitivanje njihove kvalitete (30).

Cilj ovog rada je predložiti novu analitičku metodu za potvrdu identiteta cinarina u ekstraktu lista artičoke primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (engl. *High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry, LC/MS/MS*).

## Metode

### Priprema uzoraka

Za ispitivanje prisutnosti cinarina u tabletama koje sadrže ekstrakt lista artičoke korišten je dijetetski proizvod komercijalno dostupan u javnim ljekarnama, specijaliziranim prodavaonicama za promet na malo lijekovima te trgovinama zdrave i organske hrane u Republici Hrvatskoj. Na deklaraciji proizvoda naznačeno je da se u jednoj tableti od 500 mg nalazi minimalno 5 % cinarina.

10 tableta je odvagano te usitnjeno u tarioniku. 0,5 g sadržaja preneseno je u odmjernu tikvicu od 10,0 mL te otopljeno u 8 mL 50 % metanola, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka). Ekstrakcija analita iz uzorka provedena je na ultrazvučnoj kupelji (Elma, Singen, Njemačka) 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon ekstrakcije otopina je nadopunjena do oznake istim otapalom te centrifugirana 10 minuta na 25 °C pri 3000 rpm (Thermo Electron Industries, Saint Herblain, Francuska). Otopina je ostavljena stajati na sobnoj temperaturi 30 minuta te je supernatant filtriran kroz 0,45 µm injekcijski filter (Chromafil, Macherey-Nagel, Düren, Njemačka).

### Analiza uzoraka primjenom LC/MS/MS

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti provedena je na instrumentu Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka) koristeći obrnuto-faznu kolonu Symmetry C18, dimenzija 150 mm × 4,6 mm i veličine čestica 3,5 μm (Waters, Irska). Gradijentna metoda čija se tekuća faza sastojala od 0,1 % otopine mravlje kiseline (otapalo A) i acetonitrila (otapalo B) korištena je za identifikaciju cinarina (tablica 1.). Sva korištena otapala bila su čistoće za tekućinsku kromatografiju. Voda korištena za pripremu pokretne faze pripremljena je primjenom Mili-Q plus sustava za pročišćavanje vode (Millipore, Bedford, MA, SAD). Pokretna faza profiltrirana je pomoću sustava za filtriranje pokretnih faza te celuloznog nitratnog filtera s porama veličine 0,45 μm (Sartorius, Goettingen, Njemačka).

Tablica 1. Gradijentni program za analizu cinarina u tabletama koje sadrže ekstrakt lista artičoke

Vrijeme (min)	0	20	25
Udio otapala			
% A	90	35	35
% B	10	65	65

Volumen injektiranja bio je 5 μL. Protok pokretne faze podešen je na 0,4 mL/min, a temperatura kolone održavana je na 25 °C. Tijekom analize uzorci su čuvani u tamnim bočicama na temperaturi od 4 °C u autoinjektoru. Optimalna valna duljina UV/Vis detektora je podešena s obzirom na maksimalnu apsorpciju cinarina u UV spektru ( $\lambda = 326$  nm).

Računalni program ChemStation for LC 3D (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka) korišten je za obradu dobivenih kromatograma.

Masena spektrometrija provedena je na instrumentu Agilent 6300 Series Ion Trap (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka). Sva pokretna faza eluirana s tekućinskog kromatografa dovedena je do masenog spektrometra. Ionizacija ispitivanih spojeva provedena je primjenom elektrosprej ionizacije u pozitivnom i negativnom modu. Za sušenje i raspršivanje pokretne faze korišten je dušik te su optimalni uvjeti ionizacije postignuti pri njegovom protoku od 5,0 L/min te tlaku 15,0 psi. Temperatura izvora podešena je na 350 °C dok je napon na kapilari iznosio 3,5 kV. Broj iona zadržanih u analizatoru iznosio je 10 000, a zadržavani su do 200 ms. Spektar snimanja masa iona bio je u rasponu od  $m/z$  100–600. Tlak plina helija bio je  $6 \times 10^{-6}$  mbar.

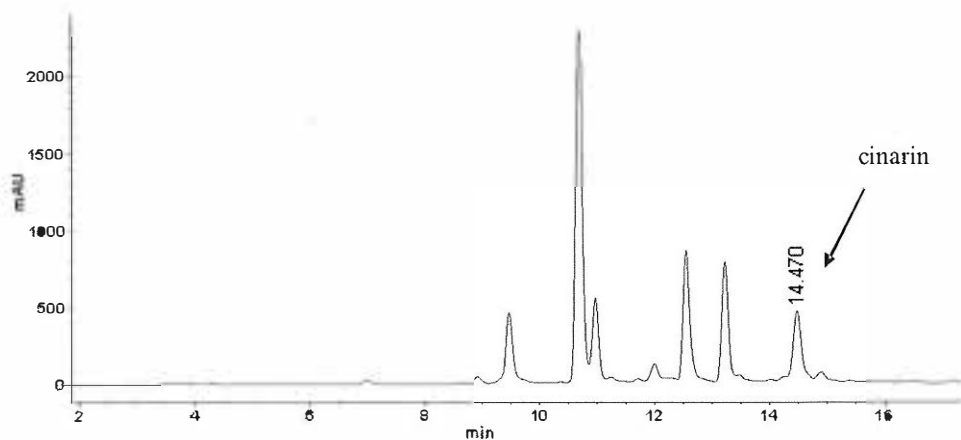
### Rezultati i rasprava

Ekstrakt lista artičoke danas je jedan od korištenijih prirodnih hipolipemika za čije hipolipemičko djelovanje je najzaslužniji derivat di-kaveoilkina kiseline, cinarin. Na sastav i udio polifenola, pa tako i cinarina, u ekstraktu artičoke utječe niz

čimbenika: sorta biljke, mjesto uzgoja, klimatske prilike, uvjeti skladištenja skupljenih listova te način pripreme ekstrakta. Kontrola kvalitete dodataka prehrani koji sadrže artičoku trebala bi se provoditi redovito da bi se ispitalo prisustvo cinarina.

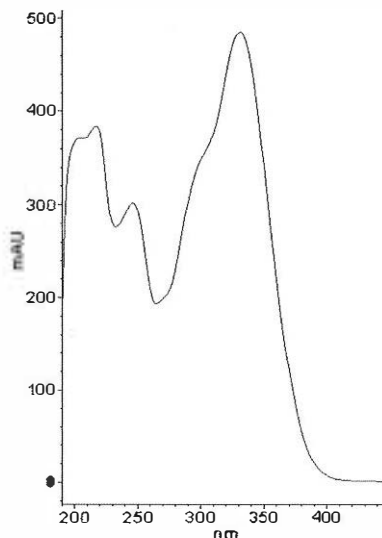
Kao što je već navedeno, cilj ovog rada bio je predložiti novu analitičku metodu za identifikaciju cinarina u dodacima prehrani koji sadrže ekstrakt lista artičoke. U tu svrhu izabrana je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti kao izvrsna tehnika za razdvajanje sastavnica iz složene smjese (24, 31–34). Da bi se potvrdila prisutnost cinarina u ispitivanom uzorku korištene su dvije vrste detektora, UV/Vis detektor te maseni spektrometar. Kako je već navedeno u uvodnom dijelu rada ekstrakt artičoke je iznimno složen uzorak, stoga je bilo potrebno prvo optimirati ekstrakciju analita iz tableta. Preliminarna istraživanja su pokazala da se najbolja ekstrakcija svih sastavnica lista artičoke postiže primjenom 50 % metanola. Nakon toga provedena je optimizacija uvjeta za razdvajanje sastavnica ispitanog uzorka primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Ispitan je utjecaj sastava pokretne faze, njezine brzine protoka kao i temperature analize. Pri prethodno opisanim uvjetima postiže se optimalno razdvajanje glavnih sastavnica lista artičoke uz prihvatljivo vrijeme analize. Optimizacija uvjeta detekcije masenom spektrometrijom provedena je primjenom sustava za direktno unošenje uzorka (KD Scientific Inc., Holliston, SAD) da bi se postigla što bolja osjetljivost analize te optimalna fragmentacija dobivenog molekulskog iona. Preliminarna ispitivanja pokazala su da se bolja osjetljivost metode postiže primjenom negativnog ionizacijskog moda te je on korišten u daljnim istraživanjima. Za sušenje i raspršivanje pokretne faze korišten je plin dušik čiji se protok mijenjao u rasponu od 3 do 15 L/min, a tlak od 5 do 20 psi.

Na slici 2. prikazan je kromatogram ispitivanog uzorka. Identifikacija cinarina provedena je primjenom dvaju detektora, te je na slici 3. prikazan UV spektar kromatografskog pika čije vrijeme zadržavanja iznosi 14,47 minuta. Usporedbom s literaturnim

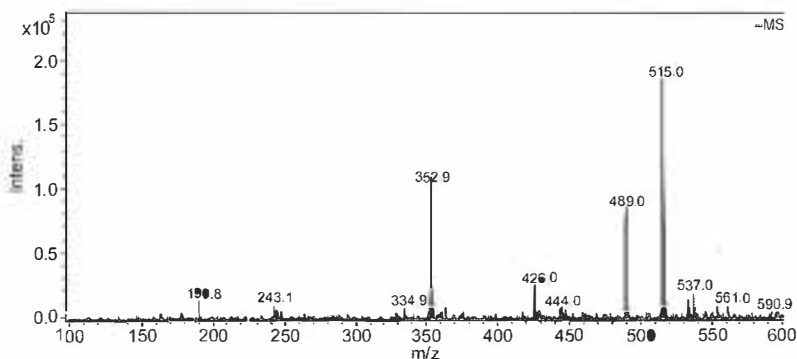


Slika 2. Kromatogram ispitivanog uzorka artičoke ( $\lambda = 326$  nm)

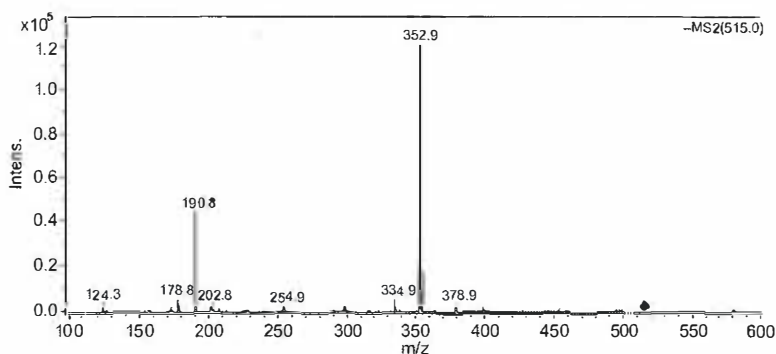
podacima bilo je moguće pretpostaviti da je u ispitivanom uzorku prisutan cinarin (19). Nadalje, identifikacija cinarina provedena je primjenom masene spektrometrije. Na slici 4. prikazan je MS spektar kromatografskog pika čije vrijeme zadržavanja iznosi 14,47 minuta. Na spektru je moguće uočiti glavni ion pri  $m/z$  515 koji bi odgovarao molekulskom ionu  $[M-H]^-$  cinarina. Ipak, za detaljniju strukturnu karakterizaciju bilo je potrebno provesti fragmentaciju molekulskog iona, odnosno snimiti MS2 spektar (slika 5.). Fragmentacijom iona pri  $m/z$  515 dobiven je jednostavan MS2 spektar s dva glavna fragmentna iona pri  $m/z$  353 i 191. Iz dobivenog MS2 spektara moguće je pretpostaviti da su navedeni fragmentni ioni



Slika 3. UV spekter cinarina



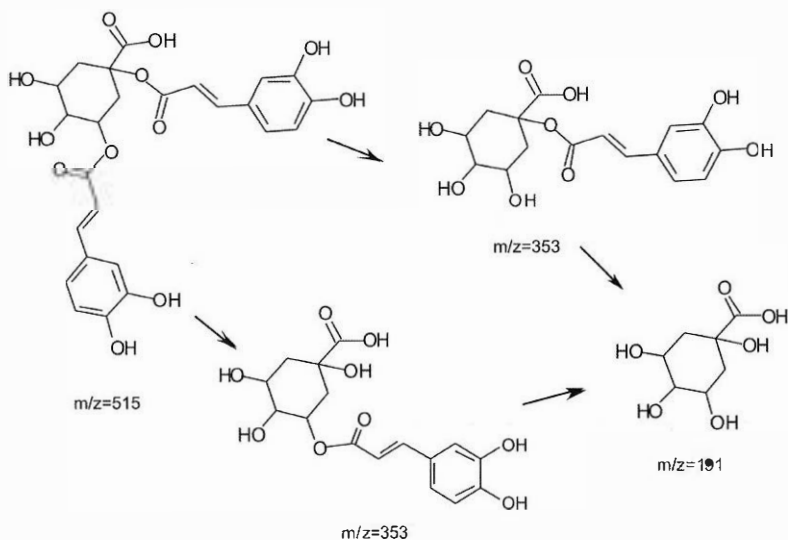
Slika 4. MS spektar cinarina



Slika 5. MS2 spektar cinarina



nastali nakon gubitka jedne odnosno obje kavene kiseline vezane esterskim vezama za kina kiselinu te je na slici 6. prikazan predloženi fragmentacijski put.



Slika 6. Predloženi fragmentacijski put cinarina

Konačno, moguće je zaključiti da je u ispitivanom uzorku prisutan cinarin te je njegovo vrijeme zadržavanja predloženom LC/DAD/MS/MS metodom 14,47 minuta. S obzirom da je razlučivanje cinarina od ostalih sastavnica ekstrakta lista artičoke bilo veće od 1,83 moguće je zaključiti da je predložena metoda selektivna za identifikaciju cinarina u ispitivanom uzorku. Nadalje, postignuta je i zadovoljavajuća simetrija dobivenog kromatografskog pika (0,97), kao i djelotvornost kolone izražena brojem teorijskih tavana (138 191). Površina pika cinarina iznosila je 5366 mAU, odnosno njegova je površina bila 8,95 % od ukupne površine svih pikova (pikovi čije površine su bile manje od 5 mAU nisu uzeti u razmatranje).

## ZAKLJUČAK

Ekstrakt lista artičoke je prirodni hipolipemik koji svoja ljekovita svojstva može zahvaliti cinarinu, derivatu di-kaveoilkina kiseline. Kako je u javnim ljekarnama, specijaliziranim prodavaonicama za promet na malo lijekovima te trgovinama zdrave i organske hrane u Republici Hrvatskoj moguće naći niz proizvoda koji sadrže ekstrakt artičoke, a nemaju navedeno na deklaraciji sadrže li cinarin te u kojoj koncentraciji, nameće se važnost njihove redovite kontrole kvalitete. Stoga je cilj ovog rada bio predložiti novu LC/DAD/MS/MS metodu za identifikaciju cinarina u tabletama ekstrakta lista artičoke. Provedena ispitivanja pokazala su da se u odabranom uzorku nalazi cinarin, a naša daljnja istraživanja bit će usmjerena na određivanje sadržaja cinarina u ekstraktima lista artičoke.

*Zahvala* – Autorice se zahvaljuju Ministarstvu znanosti, obrazovanja i sporta na financijskoj potpori u okviru projekta Istraživanje novih metoda u analitici ljekovitih i bioaktivnih tvari (no. 006-0061117-1240).

1. Kuštrak D. Farmakognozija Fitofarmacija. Zagreb: Golden marketing– Tehnička knjiga, 2005.
2. Pickett JP. The American heritage dictionary of English language. Boston: Houghton Mifflin Company, 2006.
3. Romani A, Pinelli P, Cantini C, Cimato A, Heimler D. Characterization of *Violetto di Toscana*, a typical Italian variety of artichoke (*Cynara scolymus* L.). Food Chem. 2006; 95:221–225.
4. Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. Herbal Medicines. London: Pharmaceutical Press, 2002.
5. <http://faostat.fao.org>, pristupljeno 22. travnja 2012.
6. Fratianni F, Tucci M, De Palma M, Pepe R, Nazzaro F. Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori). Food Chem. 2007; 104:1282–1286.
7. Lupattelli G, Marchesi S, Lombardini R, Roscini AR, Trinca F, Gemelli F, Vaudo G, Mannarino E. Artichoke juice improves endothelial function in hyperlipemia. Life Sci. 2004; 76:775–782.
8. Lurz M, Henríquez C, Escobar M. Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara Scolymus* L.) raw and cooked. J. Food Compos. Anal. 2011; 24:49–54.
9. Pandino G, Lombardo S, Mauromicale G, Williamson G. Profile of polyphenols and phenolic acids in bract and receptacles of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) germplasm. J. Food Compos. Anal. 2011; 24:148–153.
10. López G, Ros G, Rincón F, Periago MJ, Martínez, Ortuno J. Mineral composition of isolated fibre fractions from artichoke and the effect of phosphate buffer on its structure and mineral content. Food Chem. 1997; 60:541–547.
11. López-Molina D, Navarro-Martínez MD, Melgarejo FR, Hiner ANP, Chazarra S, Rodríguez-López JN. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.). Phytochem. 2005; 66:1476–1484.
12. Goni I, Jimenez-Escrig A, Gudiel M, Saura-Calixto FD. Artichoke (*Cynara scolymus* L) modifies bacterial enzymatic activities and antioxidant status in rat cecum. Nutr. Res. 2005; 25:607–615.
13. Marakis G, Walker AF, Middleton RW, Booth JCL, Wright J, Pike DJ. Artichoke leaf extract reduces mild dyspepsia in an open study. Phytomedicine. 2002; 9:694–699.
14. Kraft K. Artichoke leaf extract — Recent findings reflecting effects on lipid metabolism, liver and gastrointestinal tracts. Phytomedicine. 1997; 4:369–378.
15. Zapolska-Downar D, Zapolski-Downar A, Naruszewicz M, Siennicka A, Krasnodębska B, Kolodziej B. Protective properties of artichoke (*Cynara scolymus*) against oxidative stress induced in cultured endothelial cells and monocytes. Life Sci. 2002; 71:2897–2908.
16. Coinu R, Carta S, Urgghe PP, Mulinacci N, Pinelli P, Franconi F, Romani A. Dose-effect study on the antioxidant properties of leaves and outer bracts of extracts obtained from *Violetto di Toscana* artichoke. Food Chem. 2007; 101:524–531.
17. Kukić J, Popović V, Petrović S, Mucaji P, Ćirić A, Stojković D, Soković M. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. Food Chem. 2008; 107:861–868.

18. Heidarian E, Jafari-Dehkordi E, Seidkhani-Nahal A. Lipid-lowering effect of artichoke on liver phosphatidate phosphohydrolase and plasma lipids in hyperlipidemic rats. *J. Med. Plants Res.* 2011; 5:4918-4924.
19. Sánchez-Rabanela F, Jauregui O, Lamuela-Raventos RM, Bastida J, Viladomat F, Codina C. Identification of phenolic compounds in artichoke waste by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2003; 1008:57–72.
20. Lombardo S, Pandino G, Mauromicale G, Knödler M, Carle R, Schieber A. Influence of genotype, harvest time and plant part on polyphenolic composition of globe artichoke [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori]. *Food Chem.* 2010; 119:1175–1181.
21. Mulinacci N, Prucher D, Peruzzi M, Romani A, Pinelli P, Giaccherini C, Vincieri FF. Commercial and laboratory extracts from artichoke leaves: estimation of caffeoyl esters and flavonoidic compounds content. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004; 34:349–357.
22. Pinelli P, Agostini F, Comino C, Lanteri S, Portis E, Romani A. Simultaneous quantification of caffeoyl esters and flavonoids in wild and cultivated cardoon leaves. *Food Chem.* 2007; 105:1695–1701.
23. Sharaf-Eldin MA, Schnitzler WH, Nitz G, Razin AM, El-Oksh II. The effect of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) on some phenolic substances in globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* (L.) Fiori). *Sci. Hortic-Amsterdam.* 2007; 111:326–329.
24. Mornar A, Nigović B, Sertić M. Identifikacija monakolina i citrulina u crvenoj fermentiranoj riži primjenom LC/MS/MS tehnike. *Farm. glas.* 2012; 68: 243–253.
25. Nigović B, Fabijanić P, Bačić-Vrca V, Statini. *Farm. Glas.* 2007; 63:315–331.
26. Rozman D, Monostory K. Perspectives of the non-statin hypolipidemic agents. *Pharmacol. Therapeut.* 2010; 127:19–40.
27. Wolsko PM, Solondz DK, Phillips RS, Schachter SC, Eisenberg DM. Lack of herbal supplement characterization in published randomized controlled trials. *Am. J. Med.* 2005; 118:1087–1093.
28. Ernst E. Toxic heavy metals and undeclared drugs in Asian herbal medicines. *Trends Pharmacol. Sci.* 2002; 23:136–139.
29. Sahoo N, Manchikanti P, Dey S. Herbal drugs: standards and regulation. *Fitoterapia.* 2010; 81:462–471.
30. Tistaert C, Dejaegher B, Heyden YV. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: a review. *Anal. Chim. Acta.* 2011; 690:148–161.
31. Amidžić Klarić D, Klarić I, Mornar A. Polyphenol content and antioxidant activity of commercial blackberry wines from Croatia: The application of multivariate analysis for the geographical origin differentiation. *J. Food Nutr. Res.* 2011; 50:199–209.
32. Plazonić A, Bucar F, Maleš Ž, Mornar A, Nigović B, Kujundžić N. Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules.* 2009; 14:2466–2490.
33. Plazonić A, Maleš Ž, Mornar A, Nigović B, Kujundžić N. Characterization and quantification of flavonoid aglycones and phenolic acids in the hydrolyzed methanolic extract of *Caucalis platycarpos* using HPLC-DAD-MS/MS. *Chem. Nat. Compd.* 2011; 47:27–32.
34. Liang Y-Z, Wie P, Chan K. Quality control of herbal medicines. *J. Chromatogr. B.* 2004; 812:53–70.