

Određivanje fenolnih spojeva i antioksidativnog učinka u dvjema invazivnim vrstama roda *Impatiens* L.

Maleš, Željani; Duka, Ivan; Bojić, Mirza; Vilović, Tihana; Mitić, Božena; Hruševan, Dario

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2020, 76, 1 - 8**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:845137>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2022-01-29**



Repository / Repozitorij:

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



Određivanje fenolnih spojeva i antioksidativnog učinka u dvjema invazivnim vrstama roda *Impatiens* L.

ŽELJAN MALEŠ¹, IVAN DUKA¹, MIRZA BOJIĆ²,
TIHANA VILOVIĆ¹, BOŽENA MITIĆ³, DARIO HRUŠEVAR³

¹Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet,
Zavod za farmaceutsku botaniku, Schrottova 39, 10 000 Zagreb

²Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet,
Zavod za farmaceutsku kemiju, A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb

³Sveučilište u Zagrebu Prirodoslovno-matematički fakultet,
Biološki odsjek, Botanički zavod, Marulićev trg 9a, 10 000 Zagreb

1
2020

Determination of phenolics and antioxidative activity of two invasive species of the genus *Impatiens* L.

Abstract *Himalayan balsam, Impatiens glandulifera* Royle, and *Balfour's touch-me-not, Impatiens balfourii* Hooker f., are invasive weeds that are threatening habitat diversity in many European countries, including Croatia. Various bioactive secondary metabolites from species of genus *Impatiens* L. have been reported and some species are traditionally used as herbal medicines. The aim of this research was to determine total polyphenol (TP) and total flavonoid (TF) content, as well as antioxidant activity of leaves and flowers of species *I. glandulifera* and *I. balfourii*. Spectrophotometric methods were used to obtain TP, TF content and inhibition of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals to measure antioxidant activity. Total polyphenol quantity ranged from 7.9 to 18.6 mg equivalent of gallic acid per g of dried plant material, while total flavonoid content ranged from 4.6 to 20.5 mg equivalent of quercetin per g of dried plant material. Leaves of *I.*

glandulifera contain more polyphenols than flowers of the species (18.5 vs. 13.1 mg EGA/g DPM) but less flavonoids comparing to flowers (5.7 vs. 8.3 mg EQ/g DPM). However, in the case of *I. balfourii* both polyphenols and flavonoids are more abundant in flowers and have the highest quantity of polyphenols and flavonoids overall (18.6 mg EGA/g DPM and 20.5 mg EQ/g DPM). Both TP and TF content showed no significant correlation with antioxidant activity, except in the case of TP and DPPH test where correlation was found ($r=0.67$). Despite differences in phenolics, flowers of *I. glandulifera* exhibit the highest antioxidant activity in both tests, 3.8 and 3.8 mg EGA/g DPM, for DPPH and ABTS test respectively. In sum, flowers seem to possess higher quantity of antioxidant compounds than do leaves in case of both species.

(¹University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Pharmaceutical Botany, Schrottova 39, 10 000 Zagreb, Croatia, ²University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Pharmaceutical Chemistry, A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb, Croatia, ³University of Zagreb Faculty of Science, Department of Botany, Marulićev trg 9a, 10 000 Zagreb, Croatia)

Uvod

Rod *Impatiens* L. je u hrvatskoj flori zastupljen s pet svojiti, od kojih je vrsta *I. noli-tangere* L. jedina samonikla, dok su ostale vrste alohtone tj. stranog podrijetla. Neke od alohtonih svojiti se agresivno rasprostranjuju, postaju invazivne i tako umanjuju bioraznolikost staništa na koje dospiju (1). Stabilne populacije žljezdastog nendirka, *Impatiens glandulifera* Royle (slika 1.), ugrožavaju bioraznolikost u 23 države Europske unije, uključujući i Hrvatsku (2), gdje je zabilježena već krajem šezdesetih godina prošlog stoljeća (1). Druga vrsta – balfourov nendirak, *Impatiens balfourii* Hooker f. (slika 2.), također je invazivni korov, prvotno zabilježen u Istri 1992. godine, a ubrzo je područje njegove rasprostranjenosti prošireno na Sjevernu Hrvatsku, Liku i Dalmaciju (1). Obje vrste se smatraju ukrasnim i medonosnim biljkama, što pridonosi utjecaju čovjeka na njihovu rasprostranjenost. Obzirom da je riječ o jednogodišnjim biljkama, strategija fizičkog uklanjanja mogla bi pridonijeti uspješnoj kontoli širenja (3), a dobiveni materijal bi se možda mogao iskoristiti kao izvor farmaceutski važnih spojeva. Vrsta *I. glandulifera*, kao i neke druge svojite roda *Impatiens*, primjenjuju se u tradicionalnoj medicini područja s kojeg potječu. Primjena kod depresivnih raspoloženja i bolova u zglobovima potakla je proučavanje antinociceptivnog i anksiolitičkog učinka na životinjama. Smatra se da su za te učinke odgovorni fenolni spojevi, ponajprije fenolne kiseline, poput vanilinske i protokatehinske kiseline te flavonoidi, heterozidi kemferola i kvercetina (4).

Učinak na modelu boli je izostao uz usporednu primjenu naloksona što upućuje na uključenost opioidnog sustava, dok je anksiolitički učinak povezan s utjecajem ekstrakta na monoaminske neurotransmitere i moždane čimbenike rasta (5). Jedan od flavonoida, amelopsin, odnosno dihidromiricetin, pronađen u cvjetovima vrste *I. glandulifera*, klinički se ispituje zbog utjecaja na kontrolu glikemije, inzulinske otpornosti te izlučivanje inzulina u bolesnika s dijabetesom tipa 2 (6). Osim spomenutih fenolnih spojeva, za svojite roda *Impatiens* karakteristični bioaktivni spojevi su naftokinoni, polisaharidi te saponini (7). Cilj ovog rada bio je odrediti polifenole, flavonoide i antioksidativni učinak ekstrakata listova i cvjetova vrsta *I. glandulifera* i *I. balfourii*.



Slika 1. ► Cvijet vrste *I. glandulifera*



Slika 2. ► Cvijet vrste *I. balfourii*

Eksperimentalni dio

Biljni materijal

U istraživanju su korišteni listovi i cvjetovi vrsta *I. glandulifera* i *I. balfourii* skupljeni u zagrebačkom naselju Čučerje tijekom kolovoza i rujna 2016. godine. Nakon sabiranja, listovi i cvjetovi su osušeni pri sobnoj temperaturi.

Priprema ekstrakata

Biljni materijal je usitnjen i homogeniziran prethodno ekstrakciji. 0,5 grama tako pripremljenog biljnog materijala preneseno je u tikvicu, u koju je dodano 10 mL metanola te 45 minuta zagrijavano iznad temperature vrenja uz povratno

hladilo. Nakon hlađenja, ekstrakti su filtrirani i prebačeni u odmjerne tikvice od 10 mL te nadopunjeni metanolom do oznake.

Određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Sadržaj ukupnih polifenola određen je spektrofotometrijskim postupkom prema Singletonu i Rossiu (8). Postupak se temelji na redukciji kompleksnih iona Folin-Ciocalteuovog reagensa u prisutnosti fenolatnog iona nastalog disocijacijom protona s polifenola u lužnatom mediju. U 0,25 mL ekstrakta dodano je 1,25 mL Folin-Ciocalteuovog reagensa te je pH povišen nakon 5 minuta dodatkom 1 mL 10 %-tne otopine natrijevog karbonata. Nakon sat vremena inkubacije u mraku, na sobnoj temperaturi, apsorbancija je mjerena na 765 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu. Galna kiselina je korištena kao standard te je mjerenjem apsorbancije niza otopina poznate koncentracije dobivena kalibracijska krivulja. Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu suhog biljnog materijala (mg EGK/g SBM).

Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida određen je spektrofotometrijskom postupkom prema Arvouet-Grandu i sur. (9), koji se temelji na stvaranju stabilnog kompleksa aluminijevih iona s flavonoidima. Reagens je pripremljen otapanjem 1 grama aluminijevog klorida heksahidrata u 50 mL metanola. 1 mL razrijeđenog ekstrakta pomiješan je s 1 mL reagensa, apsorbancija je mjerena na 415 nm nakon petnaestominutne inkubacije uz slijepu probu reagensa. Kalibracijska krivulja izrađena je na temelju reakcije reagensa s nizom razrijeđenja standardne otopine kvercetina u prethodno opisanim uvjetima. Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenta kvercetina po gramu suhog biljnog materijala (mg EK/g SBM).

Antioksidativni učinak

Antioksidativni učinak ekstrakta ispitan je postupcima koji se oslanjaju na sparrivanje elektronskog para slobodnog radikala u otopini, pri čemu mijenjanjem elektronske konfiguracije radikala dolazi do promjene u apsorbanciji smjese na odgovarajućoj valnoj duljini. Stabilni radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) često se primjenjuje za ispitivanje antioksidativnog učinka biljnih ekstrakata (10). Za izradu matične otopine, u metanolu je otopljeno 0,01 grama DPPH. Radna otopina je dobivena razrjeđivanjem matične otopine do volumena u kojem je apsorbancija mjerena na 517 nm iznosila $0,70 \pm 0,05$. 2 mL radne otopine pomiješano je s 10 μ L ekstrakta, a smjesa je zatim inkubirana 30 minuta na sobnoj

temperaturi u mraku. Pad apsorbancije na 517 nm se mjerio uz metanol kao slijepu probu. U drugom primijenjenom postupku (11), matična otopina radikal 2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS) je dobivena šesnaestosatnom inkubacijom vodene otopine diamonijeve soli ABTS (7 mM) s kalijevim peroksodisulfatom (2,45 mM) na sobnoj temperaturi u mraku. Matična otopina je razrjeđivana dok izmjerena apsorbancija na 734 nm nije iznosila $0,70 \pm 0,05$, a tako dobivena otopina je dalje korištena kao radna otopina reagensa. 10 μ L ekstrakta pomiješano je s 2 mL radne otopine, a pad apsorbancije je izmjeren nakon 1 minute uz destiliranu vodu kao slijepu probu. Kalibracijska krivulja za oba postupka dobivena je korištenjem galne kiseline kao standarda pa su rezultati izraženi kao miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu suhog biljnog materijala (mg EGK/g SBM).

Statistička obrada podataka

Mjerenja su provedena u triplikatu, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Korelacija između ispitivanih parametara izražena je kao Pearsonov koeficijent korelacije (r), uz $p < 0,05$ kao kriterij statističke značajnosti. Obrada podataka je provedena uz pomoć programa Graph Pad Prism 8.

Rezultati i rasprava

Određivanje polifenolnih spojeva

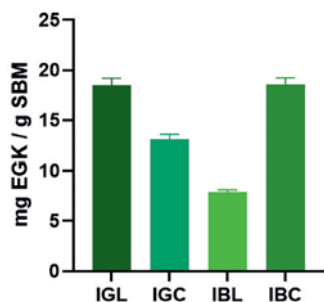
Sadržaj polifenolnih spojeva u ispitivanim biljnim dijelovima kretao se od 7,9 do 18,6 mg EGK/g SBM (tablica 1.), a najviše polifenola pronađeno je u cvjetovima vrste *I. balfourii* (slika 3.). Dobiveni rezultati nisu usporedivi s dostupnim podacima iz literature jer su prethodno provedene analize za uzorak imale nadzemne dijelove bez pobliže navedenih biljnih organa. Prema Szewczyk i sur. (12) sadržaj polifenola u zeleni vrste *I. balfourii* iznosio je 21,6 a za vrstu *I. glandulifera* 16,3 mg EGK/g SBM. Kod suhe zeleni, ukoliko je sadržavala cvjetove, glavninu mase čine listovi i stabljike, a prema dobivenim podacima listovi vrste *I. balfourii* sadrže značajno manje polifenola od listova vrste *I. glandulifera* (slika 3.). Razliku u rezultatima moguće je djelomično obrazložiti različitim ekološkim uvjetima koji utječu na sadržaj polifenola, kao što su primjerice izloženost staništa, klima i nadmorska visina (13).

Velike razlike su primijećene u sadržaju flavonoida, kako između biljnih organa tako i među ispitivanim vrstama (slika 4.). Najviše flavonoida je pronađeno u cvjetovima vrste *I. balfourii*, značajno više u odnosu na listove te trostruko više od literaturnog navoda za sadržaj flavonoida u zeleni ove vrste (12). Razlike u količini flavonoida u biljnim organima vidljive su i u slučaju vrste *I.*

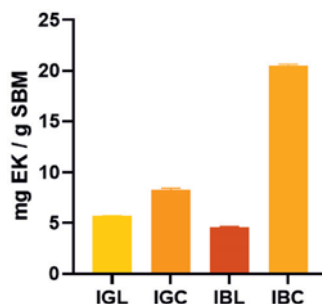
glandulifera. Kvalitativne razlike između vrsta, kao i biljnih dijelova, vidljive su prilikom odjeljivanja ekstrakta tankoslojnom kromatografijom na silikagelu, koristeći standardnu metodu (14) za razdvajanje flavonoida i njihovih heterozida (rezultati nisu prikazani).

Tablica 1. ► Rezultati spektrofotometrijskog određivanja količine bioaktivnih sastavnica te antioksidativnog učinka

	UKUPNI POLIFENOLI	UKUPNI FLAVONOIDI	DPPH TEST	ABTS TEST
	mg EGK/g SBM	mg EK/g SBM	mg EGK/g SBM	mg EGK/g SBM
listovi vrste <i>I. glandulifera</i>	18,5 ± 0,7	5,7 ± 0,1	3,6 ± 0,2	2,8 ± 0,1
cvjetovi vrste <i>I. glandulifera</i>	13,1 ± 0,5	8,3 ± 0,1	3,8 ± 0,2	3,8 ± 0,1
listovi vrste <i>I. balfourii</i>	7,9 ± 0,2	4,6 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,9 ± 0,1
cvjetovi vrste <i>I. balfourii</i>	18,6 ± 0,6	20,5 ± 0,1	2,8 ± 0,2	2,2 ± 0,1



Slika 3. ► Rezultati određivanja količine polifenolnih spojeva; legenda: listovi vrste *I. glandulifera* – IGL, cvjetovi vrste *I. glandulifera* – IGC, listovi vrste *I. balfourii* – IBL, cvjetovi vrste *I. balfourii* – IBC



Slika 4. ► Rezultati određivanja sadržaja flavonoida; legenda: listovi vrste *I. glandulifera* – IGL, cvjetovi vrste *I. glandulifera* – IGC, listovi vrste *I. balfourii* – IBL, cvjetovi vrste *I. balfourii* – IBC

Antioksidativni učinak

Antioksidativni učinak je procijenjen korištenjem dvaju različitih postupaka, odnosno upotrebom DPPH i ABTS radikala. Rezultati pokazuju vrlo dobru korelaciju između testova ($r=0,83$, $p=0,001$), a razliku je moguće objasniti različitim reakcijskim područjem u kojem su se testovi provodili; DPPH test u metanolu, a ABTS u destiliranoj vodi, što utječe na kinetiku reakcije kao i na topljivost sastavnica ekstrakta koje posjeduju antioksidativni učinak (15). Rezultati

nisu značajno korelirani sa sadržajem polifenola i flavonoida, izuzev u slučaju DPPH testa i sadržaja polifenola ($r=0,67$, $p=0,018$) što je vjerojatno posljedica bolje topljivosti polifenola u metanolu nego u destiliranoj vodi. Cvjetovi vrste *I. glandulifera* pokazuju najveći antioksidativni učinak u oba testa. Izuzev fenolnih spojeva, polisaharidi mogu pridonijeti antioksidativnom učinku (16). Prema Szewczyk i sur. (17) vodeni ekstrakt zeleni vrste *I. glandulifera* može sadržavati 8,32 % topljivih polisaharida dok je u ovom istraživanju prilikom odleđivanja metanolnih ekstrakata, koji su skladišteni na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, primijećeno sluzavo zamućenje, u znatnoj mjeri više u ekstraktima cvjetova nego li u ekstraktima listova; zamućenje nestaje protresanjem što bi moglo ukazivati na prisutnost visoko molekularnih polisaharida – sluzi.

Zaključak

Provedeno istraživanje ukazuje da vrste roda *Impatiens* sadrže znatnu količinu fenolnih spojeva. U slučaju vrste *I. glandulifera*, listovi sadrže više polifenola, ali manje flavonoida od cvjetova. Kod vrste *I. balfourii* cvjetovi su bogatiji polifenolima i flavonoidima; dapače, sadrže najviše spomenutih spojeva od svih ispitivanih uzoraka. Cvjetovi vrste *I. glandulifera* pokazuju najveći antioksidativni učinak u oba primijenjena testa, premda se razlike ne mogu objasniti ukupnim polifenolima i/ili flavonoidima; pojedini fenolni spojevi više pridonose antioksidativnom učinku zbog razlike strukturnih srodnika u reaktivnosti spram radikala. Daljnja kvalitativna analiza, posebice vrste *I. balfourii*, mogla bi objasniti slabu povezanost sadržaja fenolnih spojeva s antioksidativnim učinkom kod vrsta roda *Impatiens*.

1. Cigić P, Nikolić T, Plazibat M, Hršak V, Jelaska S. The distribution of the genus *Impatiens* L. (Balsaminaceae) in Medvednica nature park, Croatia. *Nat Croat.* 2003; 12:19–29.
2. Risk Assessment of *Impatiens glandulifera*. <https://circabc.europa.eu>, datum pristupa: 15.9.2019.
3. Nikolić T, Mitić B, Boršić I. Flora Hrvatske: invazivne biljke. Zagreb: Alfa d.d., 2014.
4. Szewczyk K, Orzelska-Górka J, Polakowska M, Biała G. Antinociceptive and antianxiety activity of hydroethanolic extracts of three *Impatiens* species in mice. *Acta Pol Pharm.* 2018; 75:989–1001.
5. Orzelska-Górka J, Szewczyk K, Gawrońska-Grzywacz M, Kędzierska E, Głowacka E, Herbet M, Dudka J, Biała G. Monoaminergic system is implicated in the antidepressant-like effect of hyperoside and protocatechuic acid isolated from *Impatiens glandulifera* Royle in mice. *Neurochem Int.* 2019; 128:206–214.

6. Effect of Dihydromirycetin on Glycemic Control, Insulin Sensitivity and Insulin Secretion in Type 2 Diabetes Mellitus. <https://clinicaltrials.gov>, datum pristupa: 15.9.2019.
7. Szewczyk K. Phytochemistry of the genus *impatiens* (Balsaminaceae): A review. *Biochem Syst Ecol.* 2018; 80:94–121.
8. Singleton V, Rossi J. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965; 16:144–158.
9. Arvouet-Grand A, Vennat B, Pourrat A, Legret P. Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *J Pharm Belg.* 1994; 49:462–468.
10. Molyneux P. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin J Sci Technol.* 2003; 26:211–219.
11. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26:1231–1237.
12. Szewczyk K, Zidorn C, Biernasiuk A, Komsta Ł, Granica S. Polyphenols from *Impatiens* (Balsaminaceae) and their antioxidant and antimicrobial activities. *Ind Crops Prod.* 2016; 86:262–272.
13. Maleš Ž, Žunić K, Suban Jakuš V, Bojić M. Određivanje količine flavonoida u listovima matičnjaka – *Melissa officinalis* L. *Farm. Glas.* 2017; 73:415–424.
14. Kinghorn A D. *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas.* New York: Springer-Verlag, 1996.
15. Shalaby E, Shanab S. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian J Mar Sci.* 2013; 42:556–564.
16. Wang J, Hu S, Nie S, Yu Q, Xie M. Reviews on Mechanisms of in Vitro Antioxidant Activity of Polysaccharides. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; doi: 10.1155/2016/5692852.
17. Szewczyk K, Heise E, Piwowarski J. Preliminary Characterization and Bioactivities of Some *Impatiens* L. Water-Soluble Polysaccharides. *Molecules.* 2018; doi: 10.3390/molecules23030631.

Primljeno 19. rujna 2019.