

# Antioksidacijski učinak i fitokemijski sastav odabranih vrsta roda *Inula* L.

---

**Mustać, Adriana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:175128>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-29**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Adriana Mustać**

**Antioksidacijski učinak i fitokemijski sastav  
odabranih vrsta roda *Inula* L.**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmakognozija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom poslijedoktorandice dr. sc. Marije Kindl.

*Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Mariji Kindl na velikoj pomoći, strpljenju, razumijevanju i ljubaznosti prilikom izrade diplomskog rada. Zahvaljujem se prof. dr. sc. Sandi Vladimir-Knežević na pomoći pri sakupljanju biljnog materijala. Također se zahvaljujem ostalim djelatnicima Zavoda za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta na pruženoj pomoći tijekom eksperimentalnog rada.*

*Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na neizmjerljivoj podršci.*

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| <b>1. UVOD</b> .....  | 1  |
| 1.1. Botanička obilježja vrsta roda <i>Inula</i> L. ....  | 2  |
| 1.1.1. <i>Inula crithmoides</i> L.....  | 2  |
| 1.1.2. <i>Inula ensifolia</i> L.....  | 3  |
| 1.1.3. <i>Inula oculus-christi</i> L.....   | 3  |
| 1.1.4. <i>Inula verbascifolia</i> (Willd.) Hausskn.....   | 3  |
| 1.2. Pregled dosadašnjih istraživanja odabranih vrsta roda <i>Inula</i> .....                                       | 5  |
| 1.2.1. Istraživanja fitokemijskog sastava .....   | 5  |
| 1.2.2. Istraživanja bioloških učinaka .....   | 8  |
| 1.3. Bioaktivni sekundarni metaboliti roda <i>Inula</i> .....   | 12 |
| 1.4. Oksidacijski stres i antioksidansi .....   | 16 |
| <b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....   | 17 |
| <b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....   | 19 |
| 3.1. Materijali .....   | 20 |
| 3.1.1. Istraživani biljni materijal .....   | 20 |
| 3.1.2. Instrumenti i pribor .....   | 20 |
| 3.1.3. Reagensi, standardi i ostale kemikalije .....  | 21 |
| 3.2. Istraživanje polifenolnih sastavnica metodom tankoslojne kromatografije visoke<br>djelotvornosti (HPTLC) ..... | 22 |
| 3.2.1. Priprema uzoraka i standarda .....   | 22 |
| 3.2.2. Ispitivanje fenolnih kiselina .....  | 22 |
| 3.2.3. Ispitivanje flavonoida.....  | 22 |
| 3.3. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja polifenolnih sastavnica .....  | 23 |
| 3.3.1. Određivanje hidroksicimetnih derivata.....   | 23 |
| 3.3.2. Određivanje flavonoida.....  | 23 |
| 3.3.3. Određivanje trjeslovina .....  | 25 |
| 3.4. Istraživanje antioksidacijskog djelovanja.....   | 26 |
| 3.4.1. Priprema uzoraka i standarda .....   | 26 |
| 3.4.2. Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala .....   | 27 |
| 3.4.3. Određivanje sposobnosti redukcije iona željeza(III) .....  | 27 |
| 3.4.4. Određivanje sposobnosti keliranja iona željeza(II) .....   | 28 |
| 3.5. Statistička analiza.....   | 29 |

|   |    |
|---|----|
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....  | 30 |
| 4.1. HPTLC karakterizacija polifenolnih sastavnica .....  | 31 |
| 4.1.1. Fenolne kiseline .....   | 31 |
| 4.1.2. Flavonoidi .....   | 33 |
| 4.2. Sadržaj polifenolnih sastavnica određen spektrofotometrijskim metodama .....                           | 36 |
| 4.2.1. Hidroksicimetni derivati .....   | 36 |
| 4.2.2. Flavonoidi .....   | 37 |
| 4.2.3. Trjeslovine.....   | 38 |
| 4.3. Antioksidacijsko djelovanje.....   | 39 |
| 4.3.1. Sposobnost hvatanja DPPH radikala .....  | 39 |
| 4.3.2. Redukcijska sposobnost .....   | 42 |
| 4.3.3. Kelirajuća aktivnost .....   | 45 |
| 4.3.4. Usporedna antioksidacijska aktivnost etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda<br><i>Inula</i> ..... | 47 |
| 4.3.5. Korelacija antioksidacijske aktivnosti i sadržaja polifenola .....                                   | 49 |
| <b>5. ZAKLJUČCI</b> .....   | 50 |
| <b>6. LITERATURA</b> .....  | 52 |
| <b>7. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....   | 59 |
| <b>8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION<br/>CARD</b>                                     |    |

# 1. UVOD



Rod *Inula* čini više od 100 biljnih vrsta rasprostranjenih u Aziji, Africi i Europi, uglavnom u mediteranskom području. Njihova upotreba u ljekovite svrhe prvi je put zabilježena u antičkoj Grčkoj i Rimu. Danas se vrste roda *Inula* široko primjenjuju te su njihove monografije uvrštene u različite nacionalne farmakopeje. Različiti se biljni organi (*Inulae flos*, *Inulae herba* i *Inulae radix*) često koriste u tradicionalnoj kineskoj medicini kao ekspektoransi, antitusici, dijaforetici, antiemetici, baktericidi itd. Također se tradicionalno koriste u sklopu ajurvedske i tibetanske medicine za liječenje bronhitisa, dijabetesa, vrućice, hipertenzije te upalnih procesa (Seca i sur., 2014). Sve je veći broj znanstvenih istraživanja kojima je cilj pronaći bioaktivne sastavnice i rasvijetliti mehanizme farmakološkog djelovanja *Inula* vrsta kako bi se potvrdila opravdanost njihove tradicionalne primjene i/ili pronašle nove indikacije za njihovu upotrebu. Utvrđeno je da vrste roda *Inula* djeluju protuupalno, antitumorski, antibakterijski, antitusički, antioksidacijski, antidijabetički te hepatoprotektivno, a navedeni se učinci uglavnom pripisuju prisutnosti seskviterpenskikh laktona, fenolnih kiselina i flavonoida (Trendafilova i sur., 2020a). U okviru ovog diplomskog rada istražene su četiri vrste roda *Inula* hrvatske flore.

## **1.1. Botanička obilježja vrsta roda *Inula* L.**

Rod *Inula* L. pripada porodici Asteraceae, a čine ga višegodišnje, rijetko dvogodišnje zeljaste biljke ili mali grmovi. Listovi su nerazdijeljeni i naizmjenični. Cvatne glavice su pojedinačne ili združene u gronju ili metlicu. Ovojni listovi cvata se preklapaju u više redova. Cvjetišta je ravno ili blago izbočeno. Cvjetovi su žute boje. Na rubovima cvatnih glavica nalaze se jezičasti ženski cvjetovi, a u sredini su smješteni cjevasti dvospolni cvjetovi. Plodovi su roške s kunadrom. Dlake kunadre su jednostavne i slobodne (Tutin i sur., 1972).

### **1.1.1. *Inula crithmoides* L.**

Primorski oman je mali grm visok do 1 m (Slika 1). Listovi su goli ili samo na rubu dlakavi, linearni ili linearno-suličasti, mesnati, cjeloviti ili na vrhu trostruko rascijepani. Dugi su 2-6 cm, a široki od 0,2 do 0,9 cm. Cvatna glavica je srednje velika. Vanjski ovojni listovi su linerani i uspravni, dok su unutarnji linearno ušiljeni. Jezičasti cvjetovi su dugi 14-25 mm i dulji su od ovojnih listova cvata. Plod je dlakava roška veličine 2-3 mm s kunadrom. Cvate između srpnja i listopada. Raste na obalama južne i zapadne Europe, a sjeverno do Velike Britanije (Maleš i sur., 2004; Domac, 2002; Tutin i sur., 1972).

### **1.1.2. *Inula ensifolia* L.**

Uskolisni oman je uspravna trajnica visine 10-60 cm (Slika 2). Listovi su cjeloviti, goli, ali na rubu često dlakavi, s 3-13 istaknutih uzdužnih žila. Donji listovi su linearno-suličasti ili suličasti, dugi 3,5-9 cm te široki 0,2-1 cm, dok su gornji sjedeći, a mogu i ne moraju biti blago obmotani oko stabljike. Cvatane glavice su srednje velike do velike. Ovojni listovi imaju svilenastu dlakavu bazu, dugi 1-1,3 cm. Vanjski ovojni listovi su trokutasto-jajoliki, a unutarnji linearno-suličasti. Jezičasti cvjetovi su dugi 15-22 mm i znatno dulji od ovojnih listova cvata. Plod je roška s kunadrom, veličine 2 mm, gola ili dlakava blizu vrha. Cvate od lipnja do rujna. Raste u istočnoj i srednjoistočnoj Europi, zapadno se prostire do sjeverne Italije (Domac, 2002; Forenbacher, 1990; Tutin i sur., 1972).

### **1.1.3. *Inula oculus-christi* L.**

Svilenasti oman je uspravna, dlakava trajnica visine 15-60 cm (Slika 3). Listovi su svilenasto dlakavi, cjeloviti ili nazubljeni. Donji su listovi duguljasti ili duguljasto-suličasti do obrnuto jajasto-eliptični, dugi 7-14 cm i široki 1,5-4,5 cm, dok su gornji listovi manje ili više obmotani oko stabljike. Cvatna glavica promjera 2,5-3 cm, a ovojni listovi cvata dugi 1-1,5 cm. Ovojni listovi su svilenasto dlakavi, vanjski su suličasti, a unutarnji linearni. Jezičasti cvjetovi su dugi 16-20 mm i znatno dulji od ovojnih listova cvata. Plod je dlakava roška veličine 2-3 mm s kunadrom. Cvate od lipnja do kolovoza. Raste u jugoistočnoj i srednjoistočnoj Europi, protežući se na sjever do juga središnje Rusije (Domac, 2002; Forenbacher, 1990; Tutin i sur., 1972).

### **1.1.4. *Inula verbascifolia* (Willd.) Hausskn.**

Bjelušina je gusto bijelo pustenasta trajnica visine do 50 cm (Slika 4). Prizemni listovi su obično jajasto-suličasti, pri bazi klinasti, a na vrhu često zašiljeni. Rub lista je pilasto narovašen do cjelovit, a žile vrlo izražene na naličju. Cvatna glavica je srednje velika. Ovojni listovi cvata su dugi 7-12 mm, a jezičasti cvjetovi dulji za najmanje 2 mm od njih. Plod je dlakava roška s kunadrom gotovo dvostruko većom od ploda. Cvate od lipnja do kolovoza. Raste na Balkanskom poluotoku i u jugoistočnoj Italiji (Forenbacher, 1990; Tutin i sur., 1972).





**Slika 1.** Primorski oman (*Inula crithmoides* L.) (foto M. Kindl)



**Slika 2.** Uskolisni oman (*Inula ensifolia* L.) (foto M. Kindl)



**Slika 3.** Svilenasti oman (*Inula oculus-christi* L.) (foto M. Kindl)



**Slika 4.** Bjelušina (*Inula verbascifolia* (Willd.) Hausskn.) (foto M. Kindl)

## 1.2. Pregled dosadašnjih istraživanja odabranih vrsta roda *Inula*

### 1.2.1. Istraživanja fitokemijskog sastava

#### *Inula crithmoides*

Dosadašnja istraživanja su istaknula fenole kao najvažnije sekundarni metabolite primorskog omana. Tankoslojnom i tekućinskom kromatografijom je u različitim biljnim organima dokazana prisutnost fenolnih kiselina i flavonoida (Oliveira i sur., 2017; Zovko i sur., 2007; Maleš i sur., 2004). Iz korijena su izolirani 1,5-dikafeoilkina kiselina i još dva derivata kina kiseline (1-metil eter 3,5-di-*O*-kafeoilkine kiseline i 1-metil eter 4,5-di-*O*-kafeoilkine kiseline) (Aboul-Ela i sur., 2012a), te je određeno da korijen sadrži 0,035 % w/w 1,5-dikafeoilkina kiseline (Aboul-Ela i sur., 2012b). Iz nadzemnih su dijelova izolirani metoksilirani flavonoli inukritmin i kvecetagetin-3'-metilester (El-Lakany i sur., 1996), te aglikon kvercetin i njegovi glikozidi (Jallali i sur., 2020; Jdey i sur., 2017; Malash i sur., 2015). Među izoliranim fenolnim kiselinama su bile klorogenska kiselina i derivati kina kiseline (3,5-dikafeoilkina, 1,5-dikafeoilkina i 3-*O*-*p*-kumaroil-5-*O*-kafeoilkina kiselina) (Jallali i sur., 2020; Malash i sur., 2015). Jdey i suradnici (2017) su ustanovili da je klorogenska kiselina (0,6 mg/g) bila glavna fenolna sastavnica ekstrakta nadzemnih dijelova primorskog omana. Pronađeno je da nadzemni dijelovi sadrže butilirane glikozide (derivate ksiloze i fruktoze), diterpene labdanske strukture, triterpene i sterole (Malash i sur., 2015), zatim derivate karotana te seskviterpen iz skupine eudesmanolida, inukritmolid (Mahmoud i sur., 1981). Izolirani su derivati timola, karakteristični spojevi za vrste roda *Inula*, među kojima treba istaknuti klorirane spojeve koji su po prvi puta u prirodi otkriveni upravo u ovoj vrsti (Adorisio i sur., 2020; Marco i sur., 1993; Metwally i Dawidar, 1985).

Istražen je sastav eteričnog ulja izoliranog iz nadzemnih dijelova primorskog omana s različitih lokaliteta na Mediteranu, te su dosada objavljeni rezultati ukazali na značajnu varijabilnost sastava ulja. Tsoukatou i Roussis (1999) su analizirali sastav eteričnih ulja uzoraka iz Grčke, Malte i Španjolske. Glavne sastavnice ulja iz Španjolske i Malte su bile *p*-cimen (53,8 % i 26,2 %) i  $\alpha$ -felandren (26,2 % i 18,9 %). U eteričnom ulju grčkog uzorka najviše je bilo  $\beta$ -felandrena (30,7 %), 1-metiletil-trimetilbenzena (14,8 %), skopoletina (13,0 %) i  $\alpha$ -felandrena (11 %). Drugi uzorak iz Grčke bio je bogat *p*-cimenom (63,9 %) i limonenom (20,4 %) (Chorianopoulos i sur., 2007). Istražen je sastav eteričnih ulja nadzemnih dijelova dva talijanska uzorka. Glavne sastavnice eteričnog ulja uzorka iz središnje Italije su bile *p*-cimen (30,1 %), 1-metiletil-trimetilbenzen (18,7 %), skopoletin

(15,3 %) i  $\alpha$ -pinen (13,1 %) (Giamperi i sur., 2010). U eteričnom ulju uzorka sa Sicilije najviše je bilo monoterpenkih ugljikovodika (32,1 %) među kojima je najveći udio određen za  $\alpha$ -pinen (9,3 %),  $\beta$ -felandren (8,5 %) i  $\alpha$ -felandren (4,8 %). Također su bile zastupljene fenolne sastavnice (19,6 %) od kojih je najviše bilo timola (11,8 %). Među seskviterpenima najzastupljeniji su bili kadinol (6,2 %) i germakren D (5,9 %) (Fontana i sur., 2014). Istražen je sastav eteričnih ulja s Korzike izoliranih iz biljnih uzoraka s 25 različitih lokaliteta (Andreani i sur., 2013). Najzastupljenije sastavnice su bile p-cimen (15,1-34,6 %), 3-metoksi-p-ciminen (11,8-28,5 %), 2,5-dimetoksi-p-ciminen (5,9-16,4 %), timol metil eter (1,3-14,9 %),  $\alpha$ -felandren (0,9-11,9 %) i  $\alpha$ -pinen (0,2-13,4 %). Analizirano je eterično ulje izolirano iz dva biljna uzorka sabrana u Tunisu (Jallali i sur., 2014). Kao glavne sastavnice jednog ulja identificirani su p-cimen (23,1 %) i karvakrol metil eter (18,1 %), dok su najzastupljenije sastavnice drugog uzorka bile p-cimen (27,3 %) i  $\alpha$ -limonen (22,0 %).

### ***Inula ensifolia***

Metodom tankoslojne kromatografije dokazana je prisutnost flavonoida (apigenina i hiperozida) i fenolnih kiselina (klorogenske i kavene kiseline) u metanolnim ekstraktima cvjetova vrste *I. ensifolia* (Péter i Dósa, 2002). Iz nadzemnih dijelova su izolirani derivati timola. Pronađeno je da korijen uskolisnog omana sadrži  $\alpha$ -tokoferol, norizoprenoide, glikozide kvercetina, klorogensku kiselinu te 1,5-, 3,4- i 3,5-dikafeoilkina kiselinu (Stojakowska i sur., 2010). U sklopu fitokemijskog istraživanja šest vrsta roda *Inula* iz Bugarske, provedena je kvantitativna analiza fenolnih kiselina u metanolnim ekstraktima cvjetova vrste *I. ensifolia*. Među istraživanim vrstama, određeno je da vrsta *I. ensifolia* sadrži najviše ukupnih polifenola. Također je sadržavala i najviše klorogenske kiseline (28,4 mg/g), dok je udio 3,4-, 3,5-, 1,5- i 4,5-dikafeoilkina kiseline bio u rasponu od 4,9 mg/g do 42,6 mg/g (Trendafilova i sur., 2020a).

U sklopu dosadašnjih istraživanja eteričnih ulja nadzemnih dijelova vrste *I. ensifolia* analiziran je sastav jednog uzorka porijeklom iz Turske i jednog iz Bugarske. Eterično ulje turskog uzorka je bilo bogato seskviterpenima (44,2 %), a najzastupljenije sastavnice su bile palmitinska kiselina (12,4 %), 1,8-cineol (9,1 %),  $\beta$ -burbonen (4,8 %) i intermedeol (4,2 %) (Sen i sur., 2019). Masne kiseline s udjelom 44,1 % su bile glavne sastavnice ulja bugarskog uzorka, te je među njima najviše bilo heksanske (8,1 %), miristične (7,4 %), izovalerične (7,0 %), oktanske (6,1 %) i nonanske kiseline (5,0 %) (Trendafilova i sur., 2020b).

## ***I. oculus-christi***

Pronađeno je da nadzemni dijelovi svilenstog omana sadrže seskviterpenske laktone iz skupine eudesmanolida i gvajanolida (ergolid, gailardin, pulhelin E, pulhelin C i njihovi derivati), te triterpenske spojeve (esteri palmitinske kiseline s 16 $\beta$ -hidroksilupeolom, 16 $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -amirinom i faradiolom (Trendafilova i sur., 2017a; Mosaddegh i sur., 2010; Vajs i sur., 2003). Iz nadzemnih dijelova i cvjetova je izolirano nekoliko flavonoida iz skupine flavona (Trendafilova i sur., 2017b; Vajs i sur., 2003). Utvrđeno je da metanolni ekstrakti cvjetova sadrže derivate kafeoilkina kiseline te je određen njihov sadržaj. Ekstrakt je sadržavao 20,6 mg/g klorogenske kiseline, dok je sadržaj 3,4-, 3,5-, 1,5- i 4,5-dikafeoilkina kiseline bio u rasponu 1,7-17,2 mg/g (Trendafilova i sur., 2020a; Trendafilova i sur., 2017b).

Mitić i suradnici (2019) su ispitali sastav eteričnog ulja izoliranog hidrodestilacijom i hlapljivih komponenti dobivenih metodom statičkog *headspace* uzorkovanja iz biljnog materijala porijeklom iz Srbije. Rezultati su pokazali značajne razlike u broju i vrsti sastavnica. Eterično ulje dobiveno hidrodestilacijom bilo je bogato seskviterpenima, te su najzastupljenije sastavnice bile kariofilen oksid (9,8 %), *trans*-longipinokarveol (9,2 %), 1,8-cineol (7,3 %) i intermedeol (6,2 %). Među hlapljivim sastavnicama najviše je bilo monoterpena, a glavna komponenta je bio 1,8-cineol (87,4 %). Analiziran je sastav eteričnog ulja nadzemnih dijelova bugarskog uzorka. Najprisutniji su bili oksigenirani monoterpeni (51,1 %). Ulje je karakterizirao visoki udio masnih kiselina (16,7 %) i aromatskih spojeva (14,8 %). Najzastupljenije sastavnice su bile 1,8-cineol (19,5 %) i palmitinska kiselina (Trendafilova i sur., 2018). Istražen je sastav eteričnog ulja nadzemnih dijelova uzorka iz Irana. Glavne komponente su bile pentakosan (13,7 %), palmitinska kiselina (13,6 %), diapiol (11,4 %), metil eugenol (9,6 %) i viridiforol (5,7 %) (Javidnia i sur., 2006).

## ***Inula verbascifolia***

Fitokemijski sastav vrste *I. verbascifolia* je slabo istražen. Iz nadzemnih dijelova su izolirani germakranolidi, ksantani i gvajanolidi (Mohamed i sur., 2013; Ahmed i sur., 2003; Harvala i sur., 2002).

Dosadašnjim istraživanjima eteričnog ulja nadzemnih dijelova vrste *I. verbascifolia* obuhvaćen je jedan uzorak iz Hrvatske (otok Badija) koji je sadržavao najviše palmitinske (10,4 %) i linolne kiseline (6,5 %) (Fontana i sur., 2014). Ispitan je sastav eteričnih ulja nadzemnih dijelova dvaju taksona grčkog podrijetla: *I. verbascifolia* subsp. *parnassica* i *I.*

*verbascifolia* subsp. *methanea*. Najzastupljenije komponente eteričnog ulja podvrste *I. verbascifolia* subsp. *parnassica* su bile metil-salicilat (23,4 %) i *cis*-krisantenol (17,3 %), dok su linalol (21,2 %),  $\tau$ -kadinol (19,5 %) i *cis*-nuciferol (16,6 %) bile glavne sastavnice ulja podvrste *I. verbascifolia* subsp. *methanea* (Tzakou i sur., 2001).

### 1.2.2. Istraživanja bioloških učinaka

#### *Inula crithmoides*

Antioksidacijska aktivnost nadzemnih dijelova primorskog omana je bila predmetom nekoliko znanstvenih istraživanja i direktno je povezana sa sadržajem fenolnih metabolita (Jallali i sur., 2020; Jdey i sur., 2017; Bucchini i sur., 2015; Giamperi i sur., 2010). Ispitana je sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala ekstrakata različite polarnosti i eteričnog ulja, a dobiveni rezultati su ukazali na njihovu slabu antiradikalnu aktivnost (Jdey i sur., 2017; Bucchini i sur., 2015; Giamperi i sur., 2010). Heksanski ekstrakt i eterično ulje su pokazali snažnu sposobnost inhibicije 5-lipoksigenaze, te je učinak bio usporediv s referentnim antioksidansima troloksom i vitaminom C (Bucchini i sur., 2015; Giamperi i sur., 2010). Jallali i suradnici (2014) su procijenili antioksidacijski potencijal acetonskog ekstrakta i eteričnog ulja primjenom različitih spektrofotometrijskih metoda. Ispitana je antiradikalna sposobnost, kelirajuća aktivnost, redukcijska moć, sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije u sustavu  $\beta$ -karoten-linolna kiselina te je određen antioksidacijski kapacitet. Eterično ulje je pokazalo slabu učinkovitost u odnosu na acetonski ekstrakt. Bioesejima vođenom izolacijom se pokazalo da su za antioksidacijski učinak ekstrakta cvjetova primorskog omana odgovorne fenolne kiseline (derivati kina kiselina) i flavonoidi (kvercetininski derivati) (Jallali i sur., 2020).

Vodeni ekstrakt primorskog omana je kod štakora u dozi od 370 mg/kg bio siguran te je pokazao protektivni učinak na oksidacijski stres i genotoksičnost uzrokovane ohratoksinom A (Abdel-Wahhab i sur., 2008).

Ispitan je *in vitro* i *in vivo* protektivni učinak metanolnog ekstrakta i različitih frakcija primorskog omana na tetraklorugljikom uzrokovano oštećenje jetre kod štakora (Malash i sur., 2015). Metanolni ekstrakt je primijenjen u dozi od 100, 200 i 300 mg/kg tijekom 3 dana. Rezultati praćenih biokemijskih parametara u serumu (aktivnost aspartat aminotransferaze i alanin aminotransferaze), kao i histopatoloških ispitivanja pokazali su da tretiranje ekstraktom smanjuje hepatotoksičnost u štakora. Učinak u dozi od 300 mg/kg je bio usporediv s referentnim lijekom silimarinom. Bioesejima vođenom izolacijom utvrđeno je da se uočeni učinak može pripisati sadržaju dikafeoilkina kiseline i njezinih derivata.

Vrste roda *Inula* se često istražuju s ciljem ispitivanja njihove citotoksične/antiproliferativne aktivnosti. Međutim, samo je jedna studija ispitala antiproliferacijski učinak primorskog omana. Istražen je učinak na proliferaciju stanica akutne mijeloične leukemije (OCI-AML3) (Adorisio i sur., 2020). Iz heksanskog ekstrakta koji je pokazao inhibitorni učinak pri koncentracijama od 10 µg/mL i 15 µg/mL, izolirana su dva bioaktivna derivata timola: 10-acetoksi-8,9-epoksitimol tiglata (**1**) i 10-acetoksi-9-kloro-8,9-dehidrotimol (**2**). Oba spoja su pokazala značajnu, o dozi ovisnu, inhibiciju stanične proliferacije: Sastavnica **1** je uzrokovala smanjenje broja OCI-AML3 stanica pri koncentraciji od 5 µg/mL, dok je klorirani derivat (**2**) ostvario značajni učinak već pri 1,25 µg/mL. Izolirani spojevi su uzrokovali zaustavljanje staničnog ciklusa u G0/G1 fazi odnosno povećanje apoptoze, te zaustavili staničnu proliferaciju.

Dokazan je antibakterijski, antifungalni i antilešmanijski učinak primorskog omana. Jallali i suradnici (2014) su procijenili antibakterijski učinak acetonskog ekstrakta i eteričnog ulja metodom agar difuzije na Gram-negativne (*E. coli* i *P. aeruginosa*) i Gram-pozitivne (*S. aureus* i *B. cereus*) bakterije. Eterično ulje je pokazalo dobar učinak na Gram-pozitivne bakterije, dok je ekstrakt inhibirao rast samo Gram-negativnih bakterija. Međutim, u istraživanju koje su proveli Jdey i suradnici (2017) etanolni (50 % V/V) ekstrakt nadzemnih dijelova nije inhibirao rast testiranih bakterija (*M. luteus*, *S. aureus* ssp. *aureus*, *E. coli* i *S. enterica* ssp. *arizonae*). Bucchini i suradnici (2015) su istražili antifungalni učinak ekstrakata različite polarnosti nadzemnih dijelova primorskog omana na osam fitopatogenih gljivica primjenom metode dilucije. Metanolni i heksanski ekstrakti su pokazali dobar učinak na *Phytophthora cryptogea* i *Alternaria solani*, dok je učinak bio slabiji na gljivice iz roda *Fusarium*. Oliveira i suradnici (2017) su izvjestili o *in vitro* antilešmanijskoj aktivnosti acetonskih i diklormetanskih ekstrakata 25 ekstremofilnih biljaka iz južnog Portugala na *L. infantum*. Među istraživanim ekstraktima, najpotentniji učinak na promastigote i unutarstanične amastigote pokazao je diklormetanski ekstrakt vrste *I. crithmiodes*. Ekstrakt je također smanjio stvaranje dušikovog oksida u lipopolisaharidom stimuliranim makrofagima RAW264.7 te inhibirao aktivnost acetilkolinesteraze, enzima važnog u stvaranju fosfatidilkolina, glavne komponente membrane *L. infantum*. Ekstrakt nije pokazao hemolitički učinak na ljudske eritrocite.



### ***Inula ensifolia***

Réthy i suradnici (2007) su ispitali *in vitro* antiproliferativnu aktivnost 25 biljnih vrsta iz porodice Asteraceae. Jedna od istraživanih vrsta je bila *I. ensifolia*. Citotoksični učinak na stanice karcinoma cerviksa (HeLa), kože (A431) i dojke (MCF7) ispitan je primjenom MTT testa. Ekstrakti su pripremljeni od različitih biljnih organa korištenjem četiri otapala različite polarnosti (*n*-heksan, kloroform, metanol i voda), te je ukupno testirano 228 ekstrakata. Među testiranim ekstraktima vrste *I. ensifolia* (ekstrakti cvjetova/plodova, listova i korijena), kloroformski ekstrakt cvjetova i plodova je pokazao najbolji učinak, te je ostvario dobar inhibitorski učinak na rast HeLa ( $IC_{50} = 2,7 \mu\text{g/mL}$ ) i A431 stanica ( $IC_{50} = 17,9 \mu\text{g/mL}$ ).

Ispitan je antidijabetički, protuupalni i antioksidacijski učinak eteričnog ulja vrste *I. ensifolia*. Eterično ulje je s  $IC_{50}$  vrijednošću  $23,7 \mu\text{g/mL}$  pokazalo snažan inhibitorski učinak na lipoksigenazu, te je aktivnost bila usporediva s protuupalnim lijekom indometacinom. *In vitro* antidijabetički potencijal eteričnog ulja procjenjen je na temelju inhibicije  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze. Ulje je pokazalo dobar inhibitorski učinak na aktivnost  $\alpha$ -amilaze ( $IC_{50} = 45,9 \mu\text{g/mL}$ ), dok je učinak na aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze bio slabiji ( $IC_{50} = 262,9 \mu\text{g/mL}$ ). Eterično ulje je također pokazalo sposobnost hvatanja ABTS radikala ( $IC_{50} = 102,3 \mu\text{g/mL}$ ), ali je aktivnost bila znatno slabija u odnosu na referentni antioksidans troloks (Sen i sur., 2019).

### ***I. oculus-christi***

Istražen je citotoksični učinak kloroformske frakcije etanolnog ekstrakta nadzemnih dijelova pet vrsta roda *Inula* podrijetlom iz Irana. Učinak je testiran primjenom MTT testa na staničnim linijama karcinoma kolona (CACO-2), dojke (MCF-7), jetre (HEPG-2), bubrega (VERO) te fibrosarkoma (WEHI-164). Među testiranim ekstraktima najbolju aktivnost je pokazao ekstrakt vrste *I. oculus-christi* ( $IC_{50} = 18,0-67,4 \mu\text{g/mL}$ ) (Mosaddegh i sur., 2006). Mosaddegh i suradnici (2010) su iz nadzemnih dijelova svilenastog omana izolirali tri seskviterpenska laktona (ergolid, gailardin i pulhelin C) te ispitali njihovu citotoksičnost na stanice karcinoma bubrega (MDKB), dojke (MCF-7) i fibrosarkoma (WEHI-164). Svi testirani spojevi su pokazali učinak ovisan o koncentraciji na svim staničnim linijama, te je aktivnost ergolida i gailardina ( $IC_{50} = 5,3-15,3 \mu\text{g/mL}$ ) bila bolja u odnosu na aktivnost pulhelina C ( $IC_{50} = 12,0-75,2 \mu\text{g/mL}$ ). Citotoksični učinak izoliranog gailardina također je utvrđen na staničnim linijama karcinoma jetre (HepG-2), pluća (A-549) i kolona ( $IC_{50} = 1,8-6,2 \mu\text{g/mL}$ ). Autori su na temelju rezultata TUNEL (engl. *terminal deoxynucleotidyl transferase Mediated dUTP nick and labeling*) reakcije na MCF-7 stanicama zaključili da je

citotoksični učinak najvjerojatnije povezan s indukcijom apoptoze (Hamzeloo-Moghadam i sur., 2013). Fallahian i suradnici (2015) su potvrdili da gailardin uzrokuje apoptozu stanica karcinoma dojke (MCF-7 i MDAMB-468) aktivacijom kaspaze-3, -6 i -9. Gailardin antitumorsku aktivnost ostvaruje povećanjem proapoptotičkih proteina Bax i p53, te smanjenjem ekspresije antiapoptotičkog Bcl-2 proteina. Njegova apoptotički učinak je također povezan s povećanjem stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i gubitkom membranskog potencijala mitohondrija. Nadalje, ispitan je i antitumorski potencijal ergolida i gailardina izoliranih iz nadzemnih dijelova vrste *I. oculus-christi* na nekoliko staničnih linija akutne limfatične leukemije. Također je istražen njihov učinak u kombinaciji s antitumorskim lijekom vinkristinom (Yami i sur., 2020; Karami i sur., 2019). Seskviterpenski laktoni su pokazali citotoksični učinak na stanicama akutne limfatične leukemije ovisan o koncentraciji, dok citotoksičnost na zdravim stanicama nije utvrđena. Gailardin je pokazao citotoksični učinak na NALM-6 i MOLT-4 stanične linije s IC<sub>50</sub> vrijednostima 7,3 μM i 6,1 μM. Ergolid je također pokazao dobru učinkovitost na više različitih staničnih linija (NALM6, MOLT4, REH, L363, NB4, KMM i U937) s umjerenom do visokom selektivnošću (GI<sub>50</sub> = 1,2-6,6 μM). Mijenjajući ekspresiju proapoptotičkih i antiapoptotičkih gena, ergolid i gailardin povećavaju stvaranje ROS što dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa u G0/G1 fazi i stanične smrti. U kombinaciji s vinkristinom, oba su testirana seskviterpenska laktone pokazala sinergistički učinak.

Istražena je biološka aktivnost metanolnog ekstrakta cvjetova vrste *I. oculus-christi* bugarskog podijetla. Inhibitorni učinak na aktivnost acetilkoliesteraze (AChE) i tirozinaze, kao i citotoksični učinak na epitelne stanice (MDCK II) i tumorske epitelne stanice (A549) bio je vrlo slab. Ekstrakt je pokazao umjerenu antiradikalnu sposobnost (DPPH i ABTS<sup>+</sup>) (Trendafilova i sur., 2020a). Ispitana je sposobnost inhibicije AChE gailardina i pulhelina C izoliranih iz vrste *I. oculus-christi*. Pri koncentraciji od 300 μg/mL gailardin je inhibirao 67 % aktivnosti enzima, dok je pulhelin C pokazao slabiji učinak i inhibirao tek 11 % (Hajimehdipoor i sur., 2014).

Ranjbar Ekbatan i suradnici (2019) su procijenili *in vivo* antikonvulzivni potencijal vodenih i metanolnih ekstrakata sedam *Inula* vrsta sakupljenih u Iranu. Ekstrakti vrste *I. oculus-christi* nisu bili učinkoviti.

Degerli i suradnici (2011) su istražili učinak vodenog ekstrakta vrste *I. oculus-christi* na preživljavanje cisti i trofozoita amebe *Acanthamoeba castelanii*. U prisutnosti ekstrakata u koncentracijama od 1,0 mg/mL do 32,0 mg/mL smanjio se broj vijabilnih trofozoita i cisti, te je učinak bio ovisan o vremenu i dozi. Učinkovitost je bila bolja na trofozite nego ciste.



## ***Inula verbascifolia***

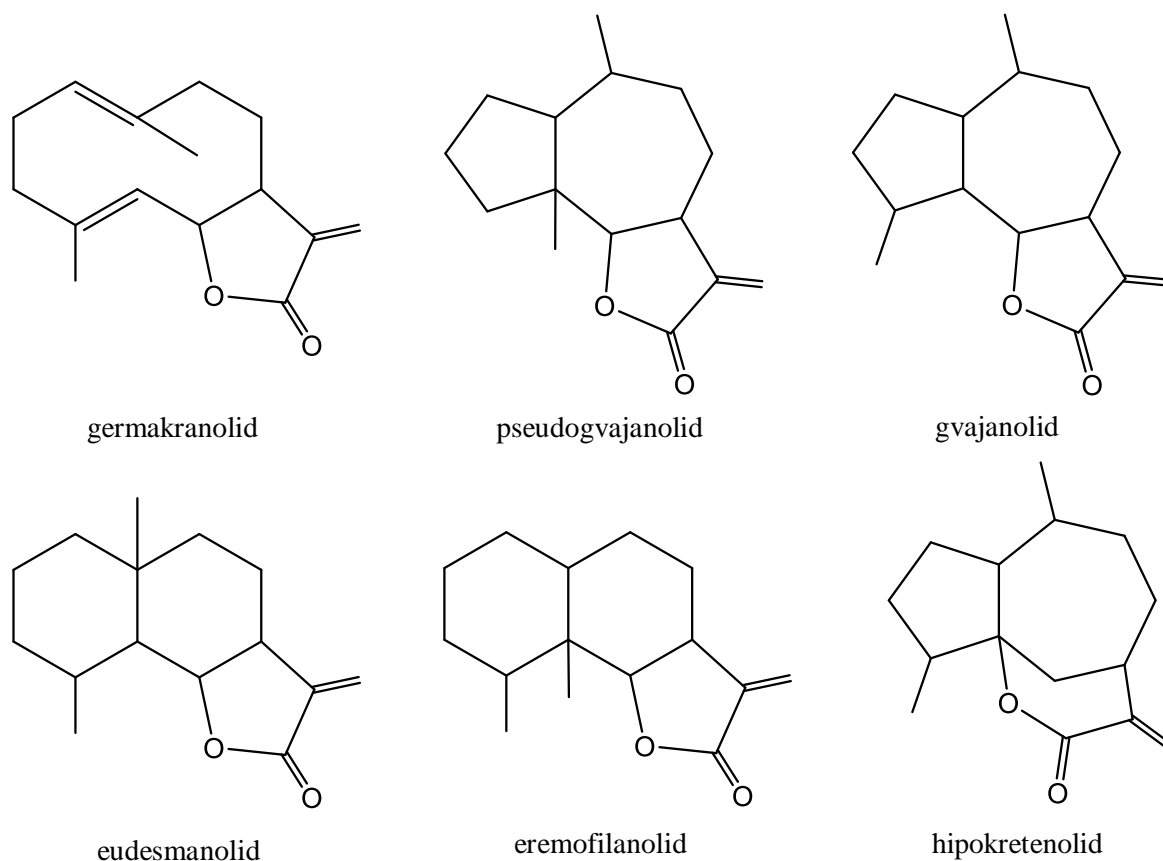
Harvala i suradnici (2002) su ispitali *in vitro* citotoksičnu aktivnost nadzemnih dijelova podvrste *I. verbascifolia* subsp. *methanea* i tri izolirana germakranolida na šest tumorskih staničnih linija. Seskviterpenski laktoni su pokazali najbolji učinak na stanične linije karcinoma kolona (HT-29, HCT-116 i HRT-18) i karcinoma prostate (PC-3), te je najniža dobivena IC<sub>50</sub> vrijednost iznosila 0,4 µg/mL.

Ispitana je antioksidacijska aktivnost i sposobnost inhibicije AChE ekstrakata različite polarnosti nadzemnih dijelova vrste *I. verbascifolia* hrvatske flore. Metanolni ekstrakt, koji je sadržavao najviše ukupnih polifenola, je u odnosu na kloroformski i etil-acetatni ekstrakt pokazao bolju sposobnost hvatanja DPPH radikala (IC<sub>50</sub> = 1,3 µg/mL) i redukcije iona željeza (335 µmol ekvivalenta Fe<sup>2+</sup> po L). Testirani ekstrakti u koncentraciji od 1 mg/mL nisu pokazali sposobnost AChE inhibicije (Jukic i sur., 2012).

### **1.3. Bioaktivni sekundarni metaboliti roda *Inula***

Najvažnija skupina sekundarnih metabolita vrsta roda *Inula* su seskviterpenski laktoni te su dosadašnja istraživanja pokazala da se farmakološki učinci ovih biljnih vrsta povezuju s brojnim biološkim učincima ovih spojeva (Seca i sur., 2014). Međutim, pronađeno je da i druge skupine metabolita, kao što su derivati klorogenske kiseline, flavona, timola i sterola doprinose biološkoj aktivnosti roda *Inula* (Seca i sur., 2015).

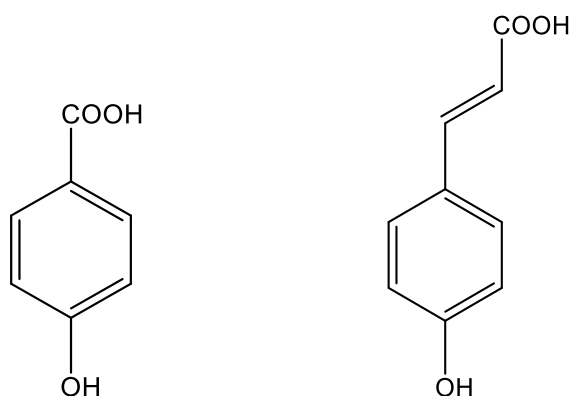
**Seskviterpenski laktoni** (SL) su jedna od najvećih skupina sekundarnih biljnih metabolita s više od 5000 različitih struktura koje nalazimo u oko 16 biljnih porodica (Apiaceae, Magnoliaceae, Laureaceae i druge). Međutim, najčešće su prisutni u biljnim vrstama porodice Asteraceae rodova *Artemisia*, *Arnica*, *Ambrosia*, *Helenium*, *Tanacetum* i *Vernonia*. Jedna biljna vrsta obično proizvodi jednu vrstu SL-a, najčešće u žljezdanim dlakama listova i cvjetova u koncentraciji od 0,01 % do 8 %. SL-i su spojevi s 15 C atoma koji se sastoje od 3 izoprenske jedinice (5-C) i laktonske skupine. Odgovorni su za gorak okus biljnih droga, a njihova lipofilna svojstva rezultat su terpenoidne strukture nastale od 15 cikliziranih i oksidativno transformiranih ugljikovih atoma. Na temelju strukturnih karakteristika, SL-i se mogu podijeliti u nekoliko glavnih skupina: germakranolidi (prsten s 10 C atoma); eudesmanolidi i eremofilanolid (2 spojena šesteročlana prstena); gvajanolidi, pseudogvajanolidi i hipokretenolidi (dva prstena sa 7 i 5 C atoma) (Slika 5).



**Slika 5.** Strukture osnovnih skupina seskviterpenskih laktona

Iako se strukturno razlikuju, zajednički fragment SL-a je  $\gamma$ -laktonski prsten koji u  $\alpha$ -položaju najčešće ima metilensku skupinu. Smatra se da je upravo  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -laktonski prsten odgovoran za biološku aktivnost SL-a jer predstavlja dobar Michael-ov akceptor koji lako može reagirati s različitim biomolekulama. Reakcija alkilacije tiolnih skupina proteina predstavlja i mehanizam kojim biljne vrste iz porodice Asteraceae mogu kod ljudi uzrokovati alergijski dermatitis. SL-i pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti koje uključuju antioksidacijski, antitumorski, protuupalni, imunomodulacijski, antimalarijski, antimikrobni, antivirusni, antiulkusni te hepatoprotektivni učinak. Najpoznatiji i dosad najviše istražen SL je artemizin čiji se derivati danas uspješno koriste u liječenju malarije. Brojna dosadašnja istraživanja su ukazala na potencijalnu ulogu SL-a u liječenju zloćudnih tumora. SL-i ostvaruju antitumorski učinak tako što uzrokuju promjene u redoks ravnoteži stanica te djeluju na različite stanične signalne putove, posebice NF- $\kappa$ B put i STAT3. Ove aktivnosti dovode do promjene ekspresije različitih faktora koji sudjeluju u staničnom ciklusu, apoptozi i metastaziranju tumorskih stanica (Babaei i sur., 2018; Ivanescu i sur., 2015; Amorim i sur., 2013; Bruneton, 1999).

**Fenolne kiseline** su najzastupljenija skupina fenolnih spojeva neflavonoidne strukture. Dije se na derivate hidroksibenzojeve kiseline (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) i derivate hidroksicimetne kiseline (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) (Slika 6). Međusobne razlike među fenolnim kiselinama uvjetovane su brojem i položajem hidroksilnih i metoksi supstituenata na aromatskom prstenu. Hidroksibenzojeve kiseline su u drogama prisutne uglavnom u slobodnom obliku, ali i u obliku estera i glikozida. Najčešće prisutne hidroksibenzojeve kiseline u biljnim drogama su galna, *p*-hidroksibenzojeva, protokatehinska kiselina, salicilna i vanilinska kiselina. Galna kiselina ulazi u sastav trjeslovina koje hidroliziraju (galotanini i elagtanini).

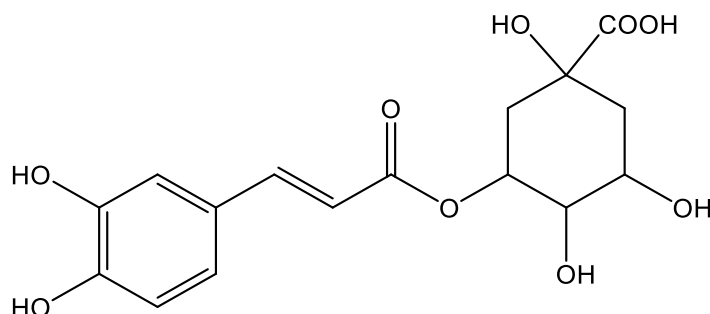


hidroksibenzojeva kiselina

hidroksicimetna kiselina

**Slika 6.** Osnovni strukturni elementi fenolnih kiselina

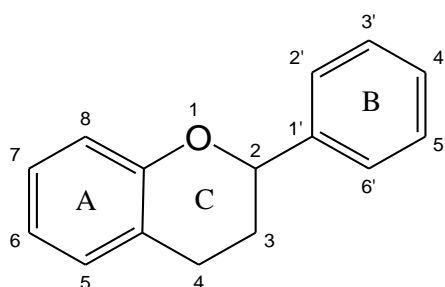
U biljnim drogama zastupljenije su hidroksicimetne kiseline koje rijede dolaze u slobodnom obliku, a uglavnom u konjugiranim oblicima, većinom kao esteri (npr. ružmarinska i klorogenska kiselina), ali i kao amidi i glikozidi. Ferulična, kavena, *p*-kumarna i sinapna kiselina su četiri najčešće hidroksicimetne kiseline. Klorogenska kiselina i njezini izomeri esteri su kavene i kina kiseline (Slika 7) koji su vrlo rasprostranjeni u biljnim vrstama porodica Asteraceae, Solanaceae i Rubiaceae.



**Slika 7.** Struktura klorogenske kiseline

Fenolne kiseline pokazuju brojne farmakološke učinke. Dokazano je da djeluju antioksidacijski, antitumorski, antimikrobno, protuupalno, antidijabetički te neuroprotektivno (Kumar i Goel, 2019; Bruneton, 1999).

**Flavonoidi**, sa više od 6000 identificiranih struktura, najzastupljenija su skupina biljnih polifenola. To su spojevi strukture tipa C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> kod kojih su dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem. U većini flavonoida središnji fragment povezan je s kisikom u piranski prsten (Slika 8). Razlikujemo nekoliko osnovnih struktura flavonoida: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli, flavanonoli, antocijanidini i izoflavonoidi. Navedena podjela se primarno temelji na stupnju oksidacije heterocikličkog prstena (prsten C), zatim dvostrukoj vezi između C2 i C3 središnjeg (C) prstena te hidroksilnim skupinama na B prstenu. Međusobne razlike unutra pojedinih podskupina uvjetovane su brojem i položajem hidroksilnih skupina te opsegom njihove hidroksilacije i/ili glikozilacije. Flavonoidi se u prirodi pojavljuju u slobodnom obliku ili glikozidno vezani kao O-glikozidi, a ponekad i kao C-glikozidi. Šećernu komponentu najčešće čine glukoza, ramnoza, galaktoza i arabinoza.



**Slika 8.** Osnovna struktura flavonoida

Flavonoidi imaju brojne biološke učinke zahvaljujući njihovoj raznolikoj strukturi, a pojedinicima je dokazano antioksidacijsko, antimikrobno, antivirusno, protuupalno, antitumorsko, antitrombozno, kardioprotektivno, neuroprotektivno, hepatoprotektivno, estrogeno i antidijabetičko djelovanje (Santos i sur., 2017; Panche i sur., 2016; Kumar i Pandey, 2013; Vladimir-Knežević i sur., 2012).

## 1.4. Oksidacijski stres i antioksidansi

Osiguravanje redoks homeostaze u organizmu igra središnju ulogu u održavanju zdravlja i prevenciji bolesti. Oksidacijski stres se može definirati kao neravnoteža između stvaranja i eliminacije slobodnih radikala i drugih reaktivnih spojeva. Ova neravnoteža vodi do oksidacije biološki važnih molekula (lipidi, proteini i nukleinske kiseline) te posljedično do oštećenja i smrti stanica. Stoga oksidacijski stres ima značajnu ulogu u patogenezi brojnih bolesti kao što su kardiovaskularne, neurodegenerativne bolesti, karcinom, imunološki poremećaji, dijabetes, ali i na sam proces starenja.

Kako bi se zaštitio od oksidacijskog stresa, organizam je razvio sustav antioksidacijske obrane kojeg čine enzimski (superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza) i neenzimski antioksidansi (vitamini C i E te glutation). Ponekad endogeni zaštitni sustav nije dovoljan za zaštitu organizma od oksidacijskog stresa, što se vrlo često pokazalo u suvremenom načinu života, pa unos egzogenih antioksidansa danas ima veliku popularnost. Velik broj znanstvenih radova objavljenih u posljednjih nekoliko godina ističe polifenole kao prirodne spojeve snažnih antioksidacijskih svojstava. Njihova antioksidacijska aktivnost temelji se na sposobnosti neutraliziranja slobodnih radikala, sprječavanju nastanka radikala preko keliranja metalnih iona, redukcijskoj sposobnosti, inhibiciji lipidne peroksidacije, regulaciji obrambenih enzima i modulaciji staničnih signalnih puteva i genske ekspresije (Kindl i sur., 2015; Vladimir-Knežević i sur., 2012).



U novije vrijeme značajan interes znanstvenika usmjeren je upravo na istraživanje biljnih vrsta kao potencijalnih izvora novih prirodnih antioksidansa. Dosadašnja znanstvena istraživanja su istaknula vrste roda *Inula* kao bogat izvor strukturno različitih sekundarnih metabolita s antioksidacijskim učinkom koji se temelji na različitim mehanizmima djelovanja (Tavares i Seca, 2019).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME



U posljednje vrijeme zastupljenost fitopreparata u ljekarničkoj praksi sve je veća. Stoga se mnoge biljne vrste podvrgavaju različitim kemijskim i biološkim istraživanjima kako bi se otvorila mogućnost njihove primjene u suvremenoj fitoterapiji. Bogata i jedinstvena hrvatska flora sadrži brojne biljne vrste, od kojih su mnoge gotovo nepoznate biomedicinskoj stručnoj javnosti. Dosadašnja znanstvena istraživanja su istaknula vrste roda *Inula* kao bogat izvor strukturno različitih molekula s potencijalom primjene u prevenciji i liječenju različitih oboljenja u čijoj je podlozi oksidacijski stres. Stoga je u okviru ovog diplomskog rada po prvi puta provedeno usporedno istraživanje odabranih vrsta roda *Inula* L. koje samoniklo rastu u Hrvatskoj: *I. crithmoides* L., *I. ensifolia* L., *I. oculus-christi* L. i *I. verbascifolia* (Willd.) Hausskn.

Istraživanja u okviru ovog diplomskog rada su provedena sa sljedećim ciljevima:

-  provesti usporedno istraživanje fitokemijskog sastava cvjetova i listova odabranih vrsta roda *Inula*
  - ispitati prisutnost fenolnih kiselina i flavonoida tankoslojnom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPTLC),
  - odrediti sadržaj ukupnih hidroksicimetnih derivata, flavonoida i trjeslovina primjenom spektrofotometrijskih metoda prema farmakopejskim postupcima,
-  ispitati antioksidacijski potencijal ekstrakata cvjetova i listova odabranih vrsta roda *Inula* primjenom tri različite spektrofotometrijske metode:
  - ispitati sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala,
  - ispitati moć redukcije iona željeza(III),
  - odrediti sposobnost keliranja iona željeza(II).

Istraživanja provedena u ovom radu će pružiti nove znanstvene spoznaje o polifenolnim sastavnicama i antioksidacijskoj aktivnosti cvjetova i listova odabranih vrsta roda *Inula* i mogu usmjeriti daljnja istraživanja njihovog fitokemijskog sastava te *in vitro* i *in vivo* bioloških učinaka.

### **3. MATERIJALI I METODE**





## 3.1. Materijali

### 3.1.1. Istraživani biljni materijal

U eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada korišteni su cvjetovi i listovi četiri vrste roda *Inula* L. (Asteraceae) sakupljeni tijekom 2018. i 2019. godine na različitim lokacijama u Republici Hrvatskoj (Tablica 1). Identifikacija biljnog materijala provedena je na Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta prema dostupnim literaturnim podacima (Domac, 2002; Tutin i sur., 1972). Prikupljeni biljni materijal osušen je na zraku pri sobnoj temperaturi, uz zaštitu od svjetlosti.

**Tablica 1.** Istraživani biljni materijal

| Biljna vrsta                                 | Lokacija sakupljanja | Vrijeme sakupljanja |
|--|----------------------|---------------------|
| <i>Inula crithmoides</i> L.                  | Dugi otok            | kolovoz 2019.       |
| <i>Inula ensifolia</i> L.                    | Kubus                | srpanj 2018.        |
| <i>Inula oculus-christi</i> L.               | Tulove grede         | srpanj 2019.        |
| <i>Inula verbascifolia</i> (Willd.) Hausskn. | Tulove grede         | srpanj 2019.        |

### 3.1.2. Instrumenti i pribor

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su sljedeći instrumenti:

- analitička vaga (Mettler-Toledo, Švicarska-SAD)
- laboratorijska tresilica (GFL, Hannover, Njemačka)
- ploče za tankoslojnu kromatografiju visoke djelotvornosti HPTLC silikagel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- rotacijski vakuum uparivač Büchi (Büchi Labortechnik AG, Postfach, Švicarska)
- termostat (Inko, Zagreb, Hrvatska)
- ultrazvučna kupelj Sonorex Digital 10 P (Bandelin, Berlin, Njemačka)
- UV lampa (Camag, Muttenz, Švicarska)
- UV-Vis spektrofotometar *Helios  $\gamma$*  (Spectronic Unicam, Cambridge, Velika Britanija)
- vodena kupelj (Inko, Zagreb, Hrvatska)

### 3.1.3. Reagensi, standardi i ostale kemikalije

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su sljedeći reagensi, standardi i ostale kemikalije:

- aceton (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- aluminijev klorid heksahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 2-aminoetil-difenilborat (Fluka, Buchs, Švicarska)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- diizopropileter (Fluka, Buchs, Švicarska)
- etanol 96 % p.a. (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- etil-acetat (POCH S. A., Gliwice, Poljska)
- etilendiamin tetraoctena kiselina (EDTA) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- etilformijat  $\geq 97$  % (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ferozin (dinatrijeva sol 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazin-4',4''-disulfonske kiseline) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- Folin-Ciocalteu reagens (Scharlau, Barcelona, Španjolska)
- heksametilentetramin (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kalijev heksacijanoferat (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- kloridna kiselina 37 % (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- kožni prašak (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- metanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- mravlja kiselina 98-100 % (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev hidrogenfosfat dihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev hidroksid (Carlo Erba, Rodano, Italija)
- natrijev karbonat dekahidrat (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev molibdat (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- natrijev nitrit (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- natrijev sulfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- octena kiselina  $\geq 99,5$  % (Carlo Erba, Rodano, Italija)
- pirogalol 99 % (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- polietilenglikol 4000 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- toluen (Macron Avantor, Gliwice, Poljska)
- trikloroctena kiselina (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- troloks  $\geq 98$  % (Fluka, Buchs, Švicarska)

- željezov(II) klorid (VWR Chemicals, Lutterworth, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- željezov(III) klorid (Riedel-de Haën, Seelze, Njemačka)

## **3.2. Istraživanje polifenolnih sastavnica metodom tankoslojne kromatografije visoke djelotvornosti (HPTLC)**

### **3.2.1. Priprema uzoraka i standarda**

Uzeto je po 0,2 g praškasto usitnjenog biljnog materijala (cvjetovi i listovi odabranih *Inula* vrsta) i preliveno s 2 mL metanola. Ekstrakcija je provedena u vodenoj kupelji pri 60 °C tijekom 10 minuta, te je nakon hlađenja ekstrakt profiltriran. Dobiveni filtrati korišteni su kao ispitivane otopine za kromatografska ispitivanja prisutnosti fenolnih kiselina i flavonoida. Otopine standardnih fenolnih kiselina, flavonoidnih glikozida (rutin, izokvercitrin i kvercitrin) i flavonoidnih aglikona (luteolin, apigenin i kvercetin) pripremljene su otapanjem u metanolu u koncentraciji od 0,05 % (Wagner i Bladt, 2009).

### **3.2.2. Ispitivanje fenolnih kiselina**

Prisutnost fenolnih kiselina u metanolnim biljnim ekstraktima ispitana je na pločama s tankim slojem silikagela 60 F<sub>254</sub>, na koje su pomoću kapilare linijski (10 mm duljine) nanoseni uzorci i otopine standarda (10 µL). Sastavnice su odjeljene korištenjem pokretne faze diizopropileter-aceton-voda-mravlja kiselina 5:3:1:1 (V/V/V). Detekcija odijeljenih sastavnica provedena je prskanjem ploče 1 %-tnom metanolnom otopinom β-aminoetilestera difenilboratne kiseline i 5 %-tnom metanolnom otopinom polietilen glikola (NS/PEG, engl. *Natural substance-polyethylene glycol*). Nakon sušenja na zraku ploča se ispita pod UV svjetlom na 365 nm (Fecka i Turek, 2008, Wagner i Bladt, 2009).

### **3.2.3. Ispitivanje flavonoida**

Na HPTLC ploču s tankim slojem silikagela 60 F<sub>254</sub> su pomoću kapilare linijski, u duljini 10 mm, nanoseni uzorci i otopina standarda (10 µL). Kao pokretna faza za odjeljivanje flavonoidnih glikozida korištena je smjesa etil-acetata, mravlje kiseline i vode u volumnim omjerima 8:1:1 (V/V/V) (EDQM, 2018). Također, ispitana je prisutnost flavonoidnih aglikona primjenom smjese otapala toluen, etil-formijat i mravlja kiselina u omjeru 5:4:1 (V/V/V). Odijeljene sastavnice detektirane su nakon prskanja kromatograma NS/PEG reagensom (poglavlje 3.2.2) i promatranjem ploče pod UV svjetlom na 365 nm (Wagner i Bladt, 2009).

### 3.3. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja polifenolnih sastavnica

#### 3.3.1. Određivanje hidroksicimetnih derivata

Određivanje sadržaja hidroksicimetnih derivata u cvjetovima i listovima ispitivanih vrsta roda *Inula* provedeno je spektrofotometrijskom metodom prema Europskoj farmakopeji (EDQM, 2018). 0,300 g praškasto usitnjenog materijala ekstrahirano je s 95 mL 50 %-tnog etanola zagrijavanjem 30 minuta na kipućoj vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Ekstrakt je ohlađen i profiltriran, a zatim je filtrat u odmjernoj tikvici razrijeđen 50 %-tnim etanolom do 100,00 mL. 1,0 mL dobivenog ekstrakta prebačeno je u odmjernu tikvicu od 10 mL, u koju je zatim redom dodano: 2,0 mL 0,5 M kloridne kiseline, 2,0 mL nitrit-molibdat reagensa te 2,0 mL 8,5 % otopine natrijevog hidroksida. Sadržaj tikvice je nadopunjen vodom do oznake. Nitrit-molibdat reagens je pripremljen otapanjem 10 g natrijevog nitrita i 10 g natrijevog molibdata u 100 mL vode. Poredbena otopina je pripremljena miješanjem 1,0 mL ekstrakta s 2,0 mL 0,5 M kloridne kiseline i 2,0 mL 8,5 %-tne otopine natrijevog hidroksida te razrjeđivanjem destiliranom vodom do 10,0 mL. Apsorbancija ispitivane otopine izmjerena je odmah na 525 nm u odnosu na poredbenu otopinu. Maseni udio derivata hidroksicimetne kiseline, izražen kao klorogenska kiselina, izračunat je prema izrazu:

$$\% \text{ hidroksicimetnih derivata} = \frac{A \times 5,3}{m}$$

gdje *A* predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine na 525 nm, a *m* masu droge u gramima.

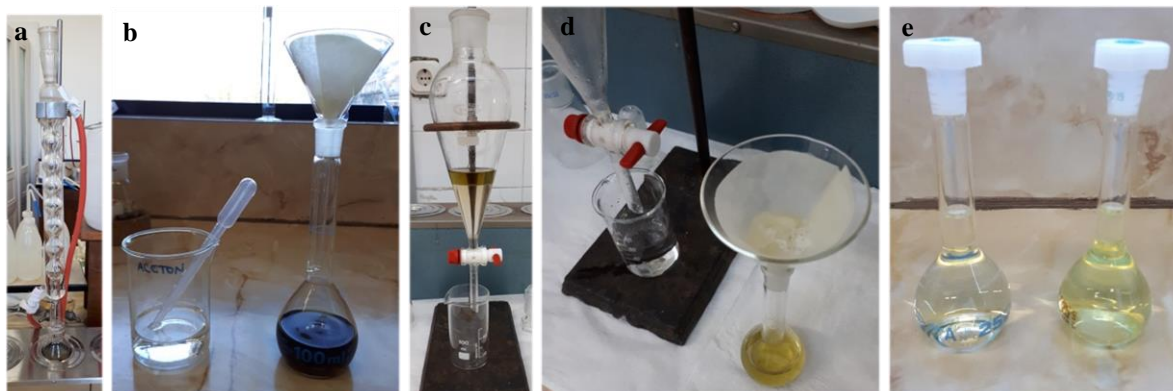
#### 3.3.2. Određivanje flavonoida

Određivanje sadržaja flavonoida u istraživanim biljnim uzorcima provedeno je spektrofotometrijskom metodom prema farmakopejskom postupku (EDQM, 2018). U tikvicu okruglog dna od 100 mL stavljeno je 0,600 g droge u prašku, 1 mL 5 g/L otopine heksametilentetramina, 20 mL acetona i 2 mL kloridne kiseline (250 g/L), te je sadržaj zagrijavan 30 minuta na vodenoj kupelji, uz povratno hladilo (Slika 9a). Hidrolizat je filtriran preko malo pamuka, a ostaci droge u tikvici i na pamuku ponovno su ekstrahirani dva puta s 20 mL acetona, zagrijavanjem tijekom 10 minuta. Nakon hlađenja, sjedinjeni filtrati filtrirani su preko filter-papira uz ispiranje tikvice i filter-papira, te je otopina razrijeđena acetonom do 100,0 mL (Slika 9b). U lijevak za odjeljivanje preneseno je 20,0 mL acetonskog ekstrakta i

pomiješano s 20 mL vode. Sadržaj u lijevku prvo je izmućkivan s 15 mL etil-acetata, a zatim još tri puta s po 10 mL etil-acetata (Slika 9c). Sjedinjeni etil-acetatni slojevi isprani su dva puta s 50 mL vode te filtrirani preko 10 g bezvodnog natrijevog sulfata u odmjernu tikvicu od 50,0 mL te je sadržaj nadopunjen etil-acetatom do oznake (Slika 9d). 10,0 mL dobivenog etil-acetatnog ekstrakta pomiješano je s 1,0 mL reagensa aluminijevog klorida u odmjernoj tikvici od 25,0 mL i razrjeđeno s 5 %-tnom metanolnom otopinom octene kiseline do oznake. Reagens aluminijev klorid pripremljen je otapanjem 2,0 g aluminijeva klorida heksahidrata u 100 mL 5 %-tne metanolne otopine octene kiseline. Za pripremu poredbene otopine 10,0 mL etil-acetatnog ekstrakta je razrjeđeno do 25,0 mL s 5 %-tnom metanolnom otopinom octene kiseline (Slika 9e). Apsorbancija ispitivane otopine izmjerena je nakon 30 minuta na 425 nm u odnosu na poredbenu otopinu. Maseni udio flavonoida, izražen kao izokvercetrozid, izračunat je prema izrazu:

$$\% \textit{flavonoida} = \frac{A \times 1,25}{m}$$

gdje *A* predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine na 425 nm, a *m* masu droge u gramima.



**Slika 9.** Određivanje flavonoida: ekstrakcija na vodenoj kupelji uz povratno hladilo (a), priprema acetonskog ekstrakta (b), izmućkavanje s etil-acetatom (c), filtriranje preko bezvodnog natrijevog sulfata (d), poredbena i ispitivana otopina (e)

### 3.3.3. Određivanje trjeslovina

Sadržaj trjeslovina u cvjetovima i listovima vrsta roda *Inula* određen je spektrofotometrijskom metodom prema farmakopejskom postupku (EDQM, 2018). Po 1,000 g praškasto usitnjenog biljnog materijala pomiješano je u tikvici okruglog dna od 250 mL sa 150 mL vode, nakon čega je provedena ekstrakcija zagrijavanjem 30 minuta na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Dobiveni ekstrakt ohlađen je pod tekućom vodom, kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu, razrijeđen destiliranom vodom do 250,0 mL te profiltriran. Prvih 50 mL filtrata je bačeno dok je ostatak filtrata uzet za analizu. 5,0 mL filtrata je preneseno u odmjernu tikvicu od 25,0 mL te je nadopunjeno vodom do oznake. Potom je 2,0 mL te otopine pomiješano s 1,0 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 10,0 mL vode u odmjernoj tikvici od 25 mL te je sadržaj nadopunjen otopinom natrijevog karbonata (290 g/L) do oznake. Apsorbancija se mjeri nakon 30 minuta na 760 nm ( $A_1$ ), uz vodu kao poredbenu otopinu. Za određivanje polifenola neadsorbiranih na kožni prašak (netaninskih polifenola), u 10,0 mL filtrata dodano je 0,10 g kožnog praška i sadržaj tikvice snažno je mućkan tijekom 60 minuta. Nakon filtriranja, 5,0 mL dobivenog filtrata razrijeđeno je s vodom do 25,0 mL. Potom je 2,0 mL te otopine pomiješano u odmjernoj tikvici od 25 mL s 1,0 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 10,0 mL vode, a sadržaj tikvice je zatim nadopunjen do oznake otopinom natrijevog karbonata (290 g/L). Apsorbancija je izmjerena nakon 30 minuta na 760 nm ( $A_2$ ), uz vodu kao poredbenu otopinu. Standardna otopina pirogalola pripremljena je otapanjem 50,0 mg pirogalola u destiliranoj vodi u odmjernoj tikvici od 100 mL, te je zatim 5,0 mL dobivene otopine razrijeđeno vodom do 100,0 mL. U odmjernoj tikvici od 25,0 mL, alikvot od 2,0 mL dobivene otopine pomiješan je s 1,0 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 10,0 mL vode te je sadržaj tikvice nadopunjen do oznake otopinom natrijevog karbonata (290 g/L). Nakon 30 minuta, izmjerena je apsorbancija na 760 nm ( $A_3$ ), uz vodu kao poredbenu otopinu. Postotni udio trjeslovina, izražen kao pirogalol, izračunat je prema izrazu:

$$\% \text{ trjeslovina} = 62,5 \times \frac{(A_1 - A_2) \times m_2}{A_3 \times m_1}$$

gdje je  $m_1$  masa ispitivanog uzorka u gramima, a  $m_2$  masa pirogalola u gramima.

### 3.4. Istraživanje antioksidacijskog djelovanja

#### 3.4.1. Priprema uzoraka i standarda

U svrhu istraživanja antioksidacijskog djelovanja 5,00 g praškasto usitnjenog biljnog materijala preliveno je sa 50 mL 70 %-tnog etanola i ekstrahirano u ultrazvučnoj kupelji na 30 °C tijekom 30 minuta (Slika 10a). Nakon filtriranja (Slika 10b), biljnom materijalu je dodana nova porcija od 50 mL istog otapala te je ekstrakcija ponovljena pod istim uvjetima. Dobiveni filtrati su sjedinjeni i upareni do suha pomoću rotacijskog vakuum-uparivača (Slika 10c). Nakon hlađenja u eksikatoru (Slika 10d), tikvica s ekstraktom je izvagana. Izračunata su iskorištenja dobivenih ekstrakata prema izrazu:

$$\% \text{iskorištenje} = \frac{m_e}{m_d} \times 100$$

gdje je  $m_e$  masa dobivenog ekstrakta u gramima, a  $m_d$  masa droge u gramima uzeta za pripremu ekstrakta. Dobiveni suhi ekstrakti čuvani su u hladnjaku na 4 °C za daljnja ispitivanja.



**Slika 10.** Priprema etanolnog ekstrakta: ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji (a), filtracija (b), uparavanje pomoću rotacijskog vakuum-uparivača (c), sušenje ekstrakta u eksikatoru (d)

Neposredno prije ispitivanja pripremljene su osnovne otopine *Inula* ekstrakata iz kojih su dvostrukim serijskim razrjeđivanjem dobiveni nizovi testiranih koncentracija. Na isti način su pripremljene otopine standarda, troloksa i etilendiamin tetraoctene kiseline (EDTA).

### 3.4.2. Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala

Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala (antiradikalna aktivnost) istražena je spektrofotometrijskom metodom opisanom u radu Kindl i suradnici (2015). U tu svrhu suhi ekstrakti i troloks, kao referentni antioksidansi, otopljeni su u etanolu (70 %-tni za ekstrakte, a 96 %-tni za troloks) te su serijskim razrjeđivanjem pripremljeni nizovi testiranih koncentracija u rasponu 0,2-100 µg/mL. U epruvete s 1,5 mL etanolnih otopina uzoraka različitih koncentracija dodano je po 0,5 mL svježe pripremljene 0,1 mM etanolne otopine DPPH radikala i sadržaj je snažno promućkan (Slika 11). Reakcijska smjesa je inkubirana pri sobnoj temperaturi na tamnom mjestu tijekom 30 minuta, a potom je izmjerena apsorbancija ispitivanih otopina na valnoj duljini od 517 nm, uz etanol kao slijepu probu. Sposobnost hvatanja DPPH radikala, izražena u postocima, izračunata je prema sljedećem izrazu:

$$\% \text{ DPPH antiradikalne sposobnosti} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

gdje  $A_0$  predstavlja apsorbanciju kontrolne otopine koja je umjesto testiranog uzorka sadržavala jednaku količinu odgovarajućeg otapala, dok  $A_1$  predstavlja apsorbanciju ispitivane otopine.



**Slika 11.** Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala

### 3.4.3. Određivanje sposobnosti redukcije iona željeza(III)

Sposobnost redukcije iona željeza(III) za ekstrakte biljnih vrsta roda *Inula* te referentni antioksidansi troloks istražena je primjenom metode koju su opisali Kindl i suradnici (2015). Serijskim razrjeđivanjem priređen je koncentracijski niz uzoraka u rasponu od 0,8-100



$\mu\text{g/mL}$ . U 1,0 mL uzorka dodano je 2,5 mL fosfatnog pufera (0,2 M, pH 6,6) i 2,5 mL 1 %-tne otopine kalijeva heksacijanoferata, a potom je smjesa inkubirana 20 minuta na 50 °C. Zatim je u smjesu dodano 2,5 mL 10 %-tne trikloroctene kiseline te je uzeto 2,5 mL te otopine i pomješano s 2,5 mL destilirane vode i 0,5 mL 0,1 %-tne otopine željezovog(III) klorida (Slika 12). Apsorbancija dobivene zelenoplave otopine izmjerena je na 700 nm, uz destiranu vodu kao slijepu probu. Koncentracija ispitivanog uzorka koja je uzrokovala apsorbanciju od 0,500 odgovara 50 %-tnoj redukcijskoj sposobnosti ( $\text{IC}_{50}$ ).



**Slika 12.** Određivanje redukcijske aktivnosti

#### 3.4.4. Određivanje sposobnosti keliranja iona željeza(II)

Sposobnost keliranja iona željeza(II) *Inula* ekstrakata određena je spektrofotometrijskom metodom prema ranije opisanom postupku (Kindl i sur., 2015). Serijskim razrjeđivanjem u 70 %-tnom etanolu pripremljen je niz ispitivanih uzoraka u rasponu koncentracija od 50-800  $\mu\text{g/mL}$ . U 400  $\mu\text{L}$  ispitivanog uzorka dodano je 50  $\mu\text{L}$  2 mM otopine željezovog(II) klorida i 3,35 mL 96 % etanola. Nakon 5 minuta je dodano 200  $\mu\text{L}$  5 mM otopine ferozina, otopina je snažno promućkana i ostavljena stajati 10 minuta na sobnoj temperaturi (Slika 13). Apsorbancija ružičaste otopine izmjerena je na 562 nm, uz etanol kao slijepu probu. Usporedno je testirana EDTA kao referentni kelator. Postotak inhibicije formiranja ferozin- $\text{Fe}^{2+}$  kompleksa, odnosno učinak keliranja metalnih iona, izračunat je prema izrazu:

$$\% \text{ keliranja željeza(II)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

gdje  $A_0$  predstavlja apsorbanciju kontrolne otopine bez uzorka, a  $A_1$  označava apsorbanciju ispitivane otopine korigiranu za vrijednost apsorbancije samog uzorka.



**Slika 13.** Određivanje kelirajuće sposobnosti

### **3.5. Statistička analiza**

Za statističku obradu dobivenih rezultata korišten je računalni program Microsoft Excel 2010 programskoga paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD) i SigmaPlot za Windows-e verzija 12.0 (Systat Software, San Jose, SAD). Dobiveni podaci prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija triju određivanja. Koncentracije uzoraka koje ostvaruju 50 %-tni učinak ( $IC_{50}$ ) dobivene su interpolacijom na temelju linearne ili logaritamske regresijske analize odnosa koncentracije i učinka. Određivanjem Spearmanovog koeficijenta korelacije ( $r_s$ ) ispitana je međusobna povezanost pojedinih istraživanih svojstava. Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) i Holm-Sidak post hoc test korišteni su za testiranje statističke razlike između više od dvije skupine podataka. Sva zaključivanja u radu provedena su uz razinu značajnosti  $P < 0,05$ .

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

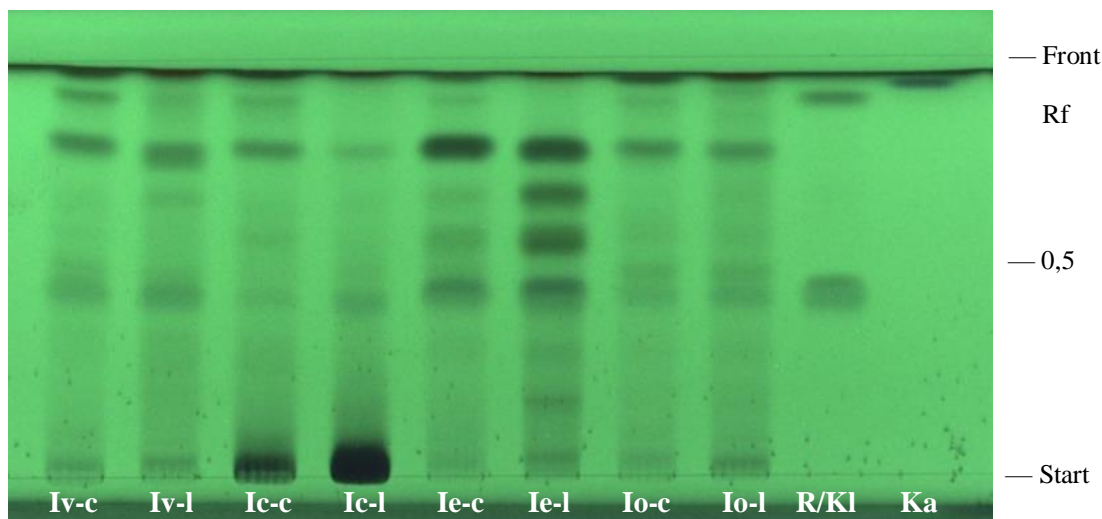


## 4.1. HPTLC karakterizacija polifenolnih sastavnica

Tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti korištena je za kvalitativnu analizu odabranih vrsta roda *Inula*. Ispitana je prisutnost fenolnih kiselina i flavonoida (glikozida i aglikona). Kao nepokretna faza korišten je silikagel, a kao pokretna faza odgovarajuće smjese otapala. Detekcija fenolnih kiselina i flavonoida provedena je pod UV lampom na 254 nm i 365 nm prije i nakon prskanja ploče specifičnim NS/PEG reagensom. Sastavnice su karakterizirane prema položaju odijeljenih zona tj. faktoru zaostajanja ( $R_F$ ) te boji i intenzitetu obojenja tih zona, u usporedbi s odgovarajućim referentnim spojevima (Kaštelan-Macan i sur., 2006).

### 4.1.1. Fenolne kiseline

Metodom tankoslojne kromatografije visoke djelotvornosti ispitana je prisutnost fenolnih kiselina u metanolnim ekstraktima odabranih vrsta roda *Inula*. Za odjeljivanje na tankom sloju silikagela primijenjena je smjesa otapala diizopropileter-aceton-mravlja kiselina-voda 5:3:1:1 (V/V/V/V). Dobiveni kromatogrami prikazani su na Slikama 14 i 15. Na kromatogramu dobivenom nakon prskanja NS/PEG reagensom (Slika 15) mogu se vidjeti plave fluorescirajuće zone koje pripadaju fenolnim kiselinama te narančaste i jedna žuta zona koje pripadaju flavonoidima. U svim uzorcima prisutna je intenzivna plava zona  $R_F$  vrijednosti 0,44 koja kromatografski odgovara klorogenskoj kiselini. Intenzitet fluorescencije te zone bio je najveći u listovima i cvjetovima vrste *I. ensifolia*. U svim je istraživanim vrstama intenzitet te detektirane zone bio veći u listovima nego u cvjetovima. Još jedna intenzivno plava zona s  $R_F$  vrijednošću 0,81 detektirana je u svim uzorcima, a njezin je intenzitet također bio najjači u cvjetovima i listovima vrste *I. ensifolia*. Dobiveni rezultati su među istraživanim vrstama istaknuli vrstu *I. ensifolia* kao najbogatiji izvor fenolnih kiselina.



**Slika 14.** Zone gašenja fluorescencije na kromatogramu fenolnih kiselina u cvjetovima (c) i listovima (l) odabranih vrsta roda *Inula*

*Nepokretna faza:* Kieselgel 60 F<sub>254</sub> TLC ploča

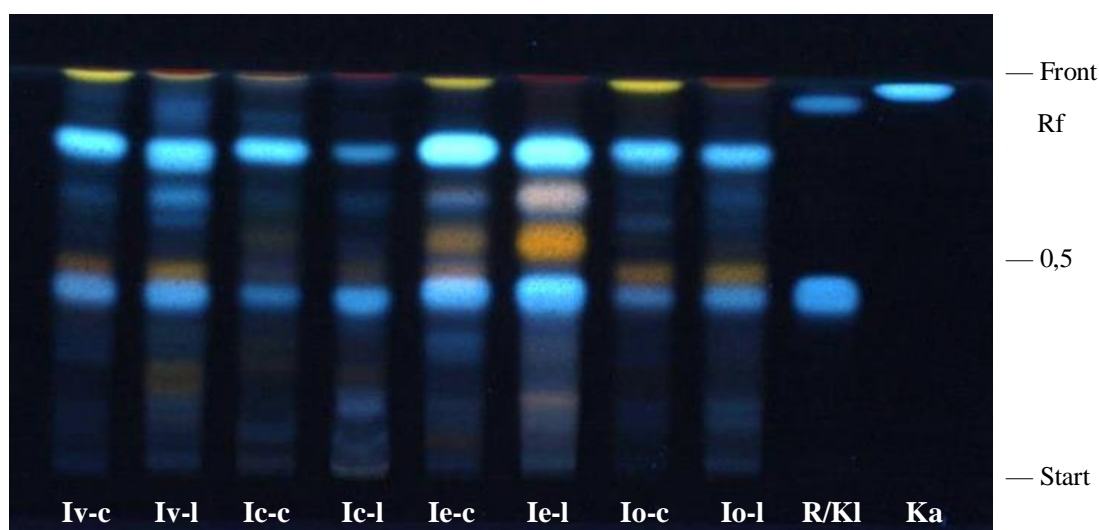
*Pokretna faza:* diizopropileter-aceton-mravlja kiselina-voda 5:3:1:1 (V/V/V/V)

*Detekcija:* UV-254 nm

*Metanolni ekstrakti:* **Iv** – *I. verbascifolia*, **Ic** – *I. crithmoides*, **Ie** – *I. ensifolia*, **Io** – *I. oculus-christi*

*Poredbene tvari:* **R** – ružmarinska kiselina ( $R_F = 0,93$ ), **Kl** – klorogenska kiselina ( $R_F = 0,44$ ),

**Ka** – kavena kiselina ( $R_F = 0,97$ )



**Slika 15.** Zone fluorescencije na kromatogramu fenolnih kiselina u cvjetovima (c) i listovima (l) odabranih vrsta roda *Inula*

*Nepokretna faza:* Kieselgel 60 F<sub>254</sub> TLC ploča

*Pokretna faza:* diizopropileter-aceton-mravlja kiselina-voda 5:3:1:1 (V/V/V/V)

*Detekcija:* NS/PEG, UV-365 nm

*Metanolni ekstrakti:* **Iv** – *I. verbascifolia*, **Ic** – *I. crithmoides*, **Ie** – *I. ensifolia*, **Io** – *I. oculus-christi*

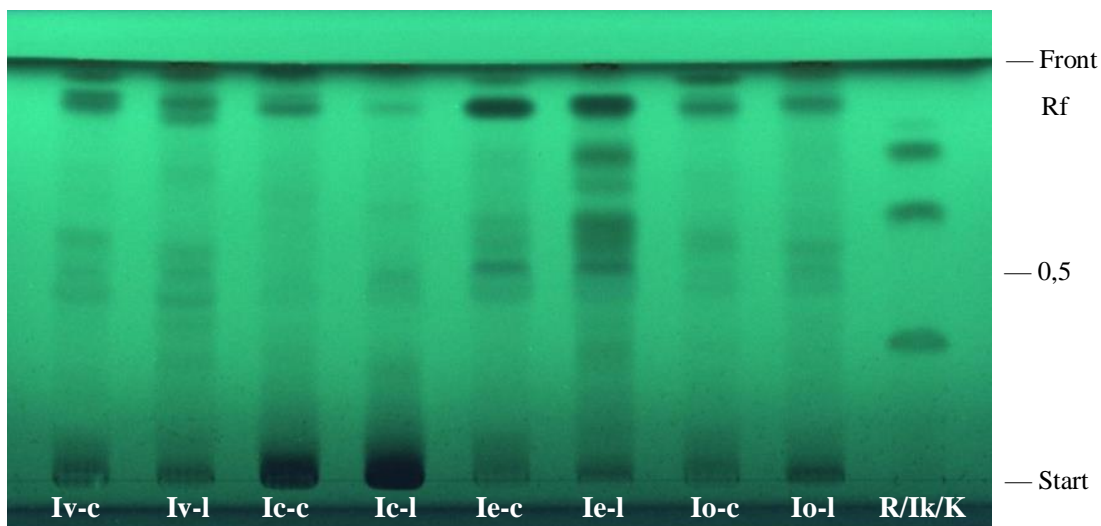
*Poredbene tvari:* **R** – ružmarinska kiselina ( $R_F = 0,93$ ), **Kl** – klorogenska kiselina ( $R_F = 0,44$ ),

**Ka** – kavena kiselina ( $R_F = 0,97$ )

### 4.1.2. Flavonoidi

Prisutnost flavonoidnih glikozida u odabranim vrstama roda *Inula* ispitana je odjeljivanjem metanolnih ekstrakata pomoću smjese etil-acetata, mravlje kiseline i vode u volumnim omjerima 8:1:1. Slike 16 i 17 prikazuju dobivene kromatograme prije i nakon prskanja NS/PEG reagensom. U istraživanim vrstama detektirano je više zona narančaste fluorescencije u  $R_F$  području od 0,34 do 0,80 (Slika 17) te prema boji fluorescencije možemo pretpostaviti da pripadaju derivatima kvercetina. Za njihovu karakterizaciju korištena je poredbena otopina koja je sadržavala rutin, izokvercitrin i kvercitrin (glikozidi kvercetina). U nekim je ekstraktima detektirana prisutnost rutina kao narančasta zona slabe fluorescencije s  $R_F$  vrijednošću 0,34. Intenzitet detektirane zone bio je najjači u ekstraktu listova vrste *I. verbascifolia*. Na kromatogramu cvjetova i listova vrste *I. ensifolia* detektirana je narančasta zona ( $R_F = 0,70$ ) koja je prema položaju i boji odgovarala poredbenoj supstanciji izokvercitrinu. Ovaj je kvercetinški derivat bio prisutan i u ekstraktu listova vrste *I. crithmoides*. Prisutnost kvercitrina ( $R_F = 0,80$ ) uočena je samo na kromatogramu listova vrste *I. ensifolia*. Usporedno istraživanje ove četiri vrste roda *Inula* ukazalo je da listovi vrste *I. ensifolia* sadrže najviše flavonoida. Napolarna zona žute fluorescencije s  $R_F$  vrijednošću 0,97, prisutna u svim ekstraktima cvjetova kao i ekstraktima listova vrsta *I. oculus-christi* i *I. verbascifolia*, ukazala je na prisutnost flavonoidnih aglikona.

Flavonoidni aglikoni iz metanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Inula* odijeljeni su na tankom sloju silikagela uz smjesu otapala toluen, etil-formijat i mravlja kiselina u omjeru 5:4:1 (V/V/V). Na Slikama 18 i 19 prikazani su dobiveni kromatogrami te je u svim ekstraktima osim u ekstraktima listova vrsta *I. crithmoides* i *I. ensifolia* vidljiva žuta zona koja kromatografski odgovara luteolinu ( $R_F = 0,54$ ). Intenzitet fluorescencije detektirane zone bio je najveći u ekstraktima cvjetova vrsta *I. ensifolia*, *I. oculus-christi* i *I. verbascifolia*. Usporedbom kromatograma istraživanih vrsta i poredbenih supstancija ustanovljena je prisutnost apigenina ( $R_F = 0,59$ ) u cvjetovima i listovima vrste *I. verbascifolia*. Iako je utvrđeno da flavonoidni glikozidi pripadaju kvercetinским derivatima, nije uočena prisutnost aglikona kvercetin.



**Slika 16.** Zone gašenja fluorescencije na kromatogramu flavonoidnih glikozida u cvjetovima (c) i listovima (l) odabranih vrsta roda *Inula*

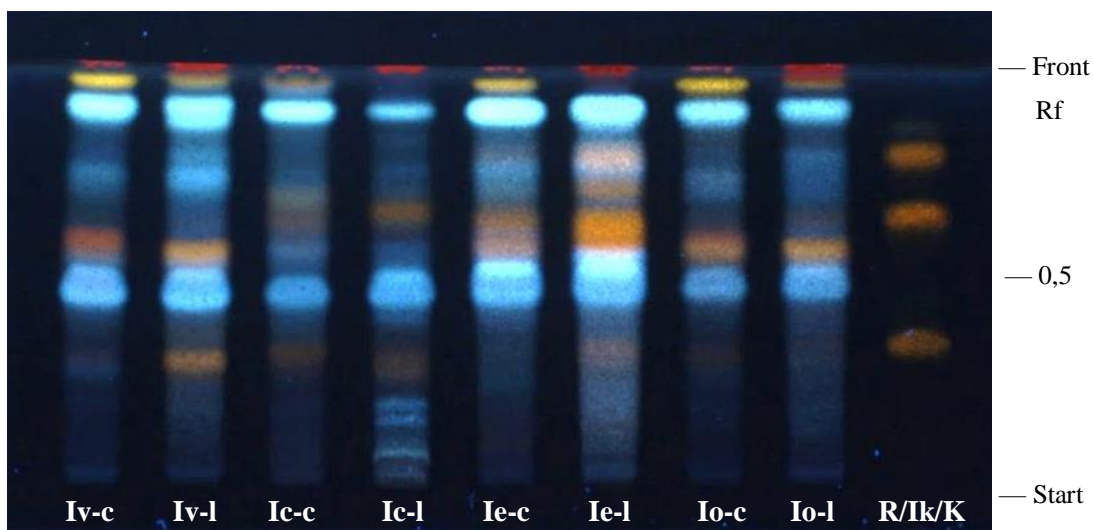
*Nepokretna faza:* Kieselgel 60 F<sub>254</sub> TLC ploča

*Pokretna faza:* etilacetat-mravlja kiselina-voda 8:1:1 (V/V/V)

*Detekcija:* UV-254 nm

*Metanolni ekstrakti:* **Iv** – *I. verbascifolia*, **Ic** – *I. crithmoides*, **Ie** – *I. ensifolia*, **Io** – *I. oculus-christi*

*Poredbene tvari:* **R** – rutin ( $R_F = 0,34$ ), **Ik** – izokvercitrin ( $R_F = 0,70$ ), **K** – kvercitrin ( $R_F = 0,80$ )



**Slika 17.** Zone fluorescencije na kromatogramu flavonoidnih glikozida u cvjetovima (c) i listovima (l) odabranih vrsta roda *Inula*

*Nepokretna faza:* Kieselgel 60 F<sub>254</sub> TLC ploča

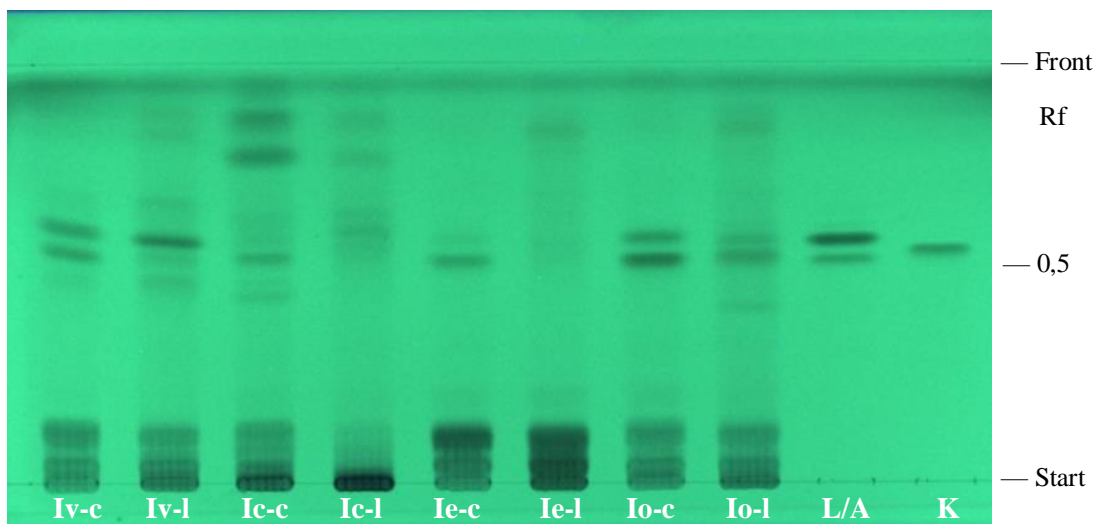
*Pokretna faza:* etil-acetat-mravlja kiselina-voda 8:1:1 (V/V/V)

*Detekcija:* NS/PEG, UV-365 nm

*Metanolni ekstrakti:* **Iv** – *I. verbascifolia*, **Ic** – *I. crithmoides*, **Ie** – *I. ensifolia*, **Io** – *I. oculus-christi*

*Poredbene tvari:* **R** – rutin ( $R_F = 0,34$ ), **Ik** – izokvercitrin ( $R_F = 0,70$ ), **K** – kvercitrin ( $R_F = 0,80$ )





**Slika 18.** Zone gašenja fluorescencije na kromatogramu flavonoidnih aglikona u cvjetovima (c) i listovima (l) odabranih vrsta roda *Inula*

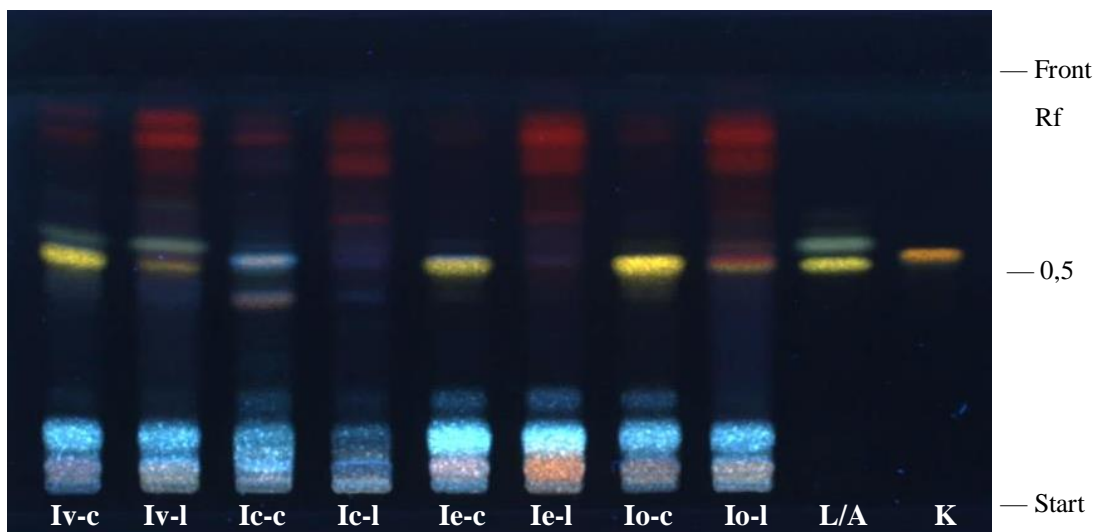
*Nepokretna faza:* Kieselgel 60 F<sub>254</sub> TLC ploča

*Pokretna faza:* toluen-etil-formijat-mravljja kiselina 5:4:1 (V/V/V)

*Detekcija:* UV-254 nm

*Metanolni ekstrakti:* **Iv** – *I. verbascifolia*, **Ic** – *I. crithmoides*, **Ie** – *I. ensifolia*, **Io** – *I. oculus-christi*

*Poredbene tvari:* **L** – luteolin ( $R_F = 0,54$ ), **A** – apigenin ( $R_F = 0,59$ ), **K** – kvercetin ( $R_F = 0,56$ )



**Slika 19.** Zone fluorescencije na kromatogramu flavonoidnih aglikona u cvjetovima (c) i listovima (l) odabranih vrsta roda *Inula*

*Nepokretna faza:* Kieselgel 60 F<sub>254</sub> TLC ploča

*Pokretna faza:* toluen-etilformijat-mravljja kiselina 5:4:1 (V/V/V)

*Detekcija:* NS/PEG, UV-365 nm

*Metanolni ekstrakti:* **Iv** – *I. verbascifolia*, **Ic** – *I. crithmoides*, **Ie** – *I. ensifolia*, **Io** – *I. oculus-christi*

*Poredbene tvari:* **L** – luteolin ( $R_F = 0,54$ ), **A** – apigenin ( $R_F = 0,59$ ), **K** – kvercetin ( $R_F = 0,56$ )

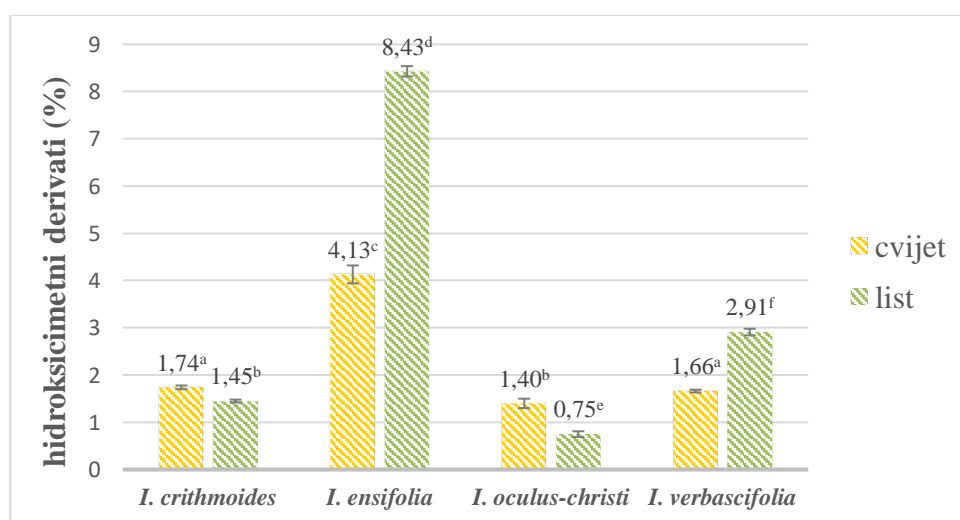


## 4.2. Sadržaj polifenolnih sastavnica određen spektrofotometrijskim metodama

Udio različitih skupina polifenolnih sastavnica određen je u cvjetovima i listovima odabranih vrsta roda *Inula* primjenom odgovarajućih spektrofotometrijskih metoda. U tu svrhu određen je sadržaj ukupnih hidroksicimetnih derivata, flavonoida i trjeslovina.

### 4.2.1. Hidroksicimetni derivati

Za određivanje hidroksicimetnih derivata (jedne skupine fenolnih kiselina) korištena je spektrofotometrijska metoda koja se temelji na stvaranju žuto obojenih kompleksa između o-dihidroksifenolne skupine u strukturi hidroksicimetnih derivata i nitrit-molibdat reagensa. Zaluživanjem žuta boja otopine prelazi u narančastocrvenu. Apsorbancija obojenih otopina mjeri se na 525 nm, a sadržaj ukupnih hidroksicimetnih derivata izrazi se kao klorogenska kiselina uzimajući u obzir njenu specifičnu apsorbanciju koja iznosi 188. Rezultati su pokazali da se među odabranim biljnim vrstama, listovi i cvjetovi vrste *I. ensifolia* mogu smatrati najbogatijim izvorom hidroksicimetnih derivata (Slika 20). Listovi uskolisnog omana sadržavali su 8,43 % hidroksicimetnih derivata, a cvjetovi 4,13 %. Najmanji udio ukupnih hidroksicimetnih derivata određen je u listovima vrste *I. oculus-christi* (0,75 %). Vrste *I. crithmoides* i *I. oculus-christi* su više hidroksicimetnih derivata sadržavale u cvjetovima, dok je za vrste *I. ensifolia* i *I. verbascifolia* više određeno u listovima (otprilike dvostruko više). Sadržaj hidroksicimetnih derivata u cvjetovima vrsta *I. crithmoides* i *I. verbascifolia* nije se međusobno statistički značajno razlikovao.

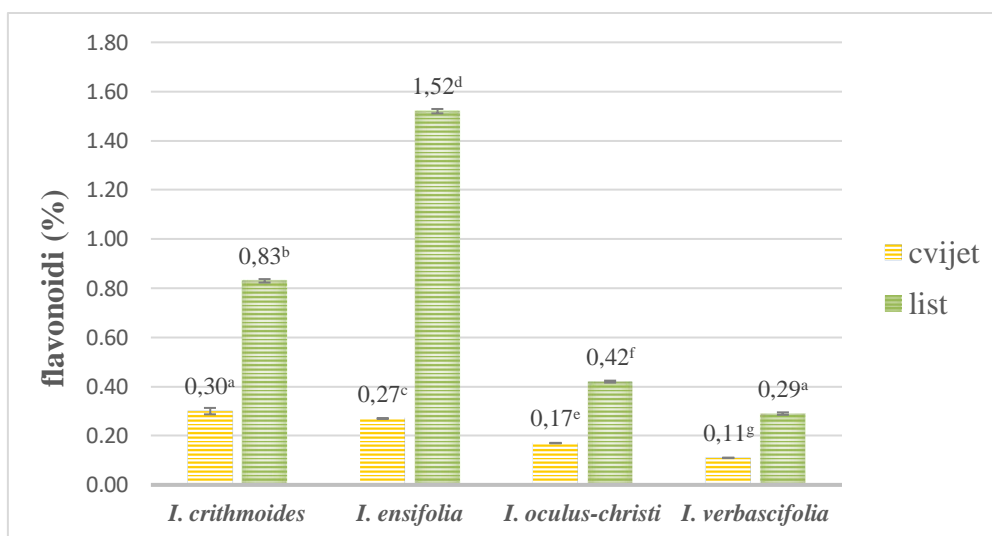


Vrijednosti označene različitim slovom se međusobno statistički značajno razlikuju ( $P < 0,05$ ).

**Slika 20.** Sadržaj hidroksicimetnih derivata u cvjetovima i listovima odabranih vrsta roda *Inula*

#### 4.2.2. Flavonoidi

Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida obuhvaća ekstrakciju biljne droge sa smjesom acetona i kloridne kisline, uz zagrijavanje, pri čemu dolazi do hidrolize flavonoidnih glikozida. Izmućkavanjem s etil-acetatom odjeljuju se slobodni aglikoni koji s aluminijevim kloridom stvaraju žuto obojene kompleksne spojeve s maksimumom apsorpcije u vidljivom području (425 nm). Sadržaj flavonoida, izražen kao izokvercetrozid, izračuna se pomoću specifične apsorbanije koja za izokvercetrozid iznosi 500. Iz rezultata prikazanih na Slici 21 vidljivo je da je sadržaj flavonoida u istraživanim vrstama bio u rasponu 0,11-1,52 %. Listovi svih ispitivanih vrsta su sadržavali veći udio flavonoida od cvjetova te se njihov udio smanjivao prema sljedećem opadajućem nizu: *I. ensifolia* (1,52 %) > *I. crithmoides* (0,83 %) > *I. oculus-christi* (0,42 %) > *I. verbascifolia* (0,29 %). Najviše flavonoida u cvjetovima sadržavala je vrsta *I. crithmoides* (0,30 %), a vrlo sličan udio (0,27 %) određen je u cvjetovima vrste *I. ensifolia*. Najmanji udio flavonoida sadržavali su cvjetovi vrste *I. verbascifolia* (0,11 %).

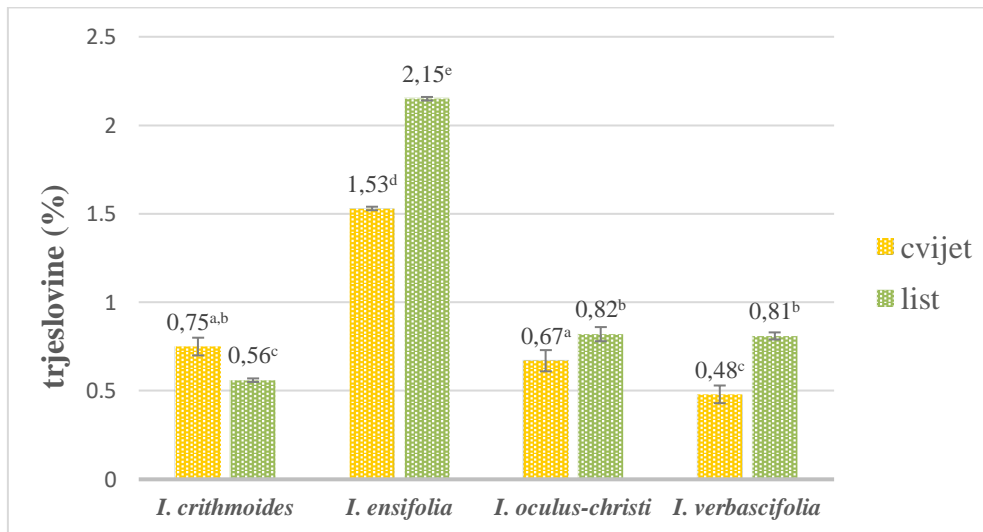


Vrijednosti označene različitim slovom se međusobno statistički značajno razlikuju ( $P < 0,05$ ).

**Slika 21.** Sadržaj flavonoida u cvjetovima i listovima odabranih vrsta roda *Inula*

### 4.2.3. Trjeslovine

Sadržaj ukupnih trjeslovina određen je spektrofotometrijskom metodom uz primjenu kožnog praška. Postupak uključuje određivanje ukupnih polifenolnih sastavnica u ekstraktu biljne droge prije i nakon obrade kožnim praškom koji veže trjeslovine. Polifenolni spojevi s Folin-Ciocalteu reagensom (fosfomolibdenovolframovim reagensom) stvaraju plavo obojene kompleksne spojeve, a apsorbancija se mjeri na 760 nm. Udio trjeslovina određuju se iz razlike udjela ukupnih polifenola i polifenola neadsorbiranih na kožni prašak, a rezultat izražava prema pirogalolu. Dobiveni rezultati su pokazali da je sadržaj trjeslovina u odabranim vrstama roda *Inula* bio u rasponu od 0,48 % do 2,15 % (Slika 22). Sve istraživane vrste osim vrste *I. crithmoides* sadržavale su veći udio trjeslovina u listovima nego u cvjetovima. Listovi i cvjetovi vrste *I. ensifolia* sadržavali su najviše trjeslovina te je njihov udio iznosio 2,15 % i 1,53 %. Najmanji sadržaj trjeslovina određen je u listovima vrste *I. crithmoides* (0,56 %) i cvjetovima vrste *I. verbascifolia* (0,48 %). Udio trjeslovina u listovima vrste *I. oculus-christi* (0,82 %) i *I. verbascifolia* (0,81 %) nije se međusobno statistički značajno razlikovao. Cvjetovi vrsta *I. crithmoides* i *I. oculus-christi* sadržavali su 0,75 % i 0,67 % trjeslovina, također bez statistički značajne razlike.



Vrijednosti označene različitim slovom se međusobno statistički značajno razlikuju ( $P < 0,05$ ).

**Slika 22.** Sadržaj trjeslovina u cvjetovima i listovima odabranih vrsta roda *Inula*

### 4.3. Antioksidacijsko djelovanje

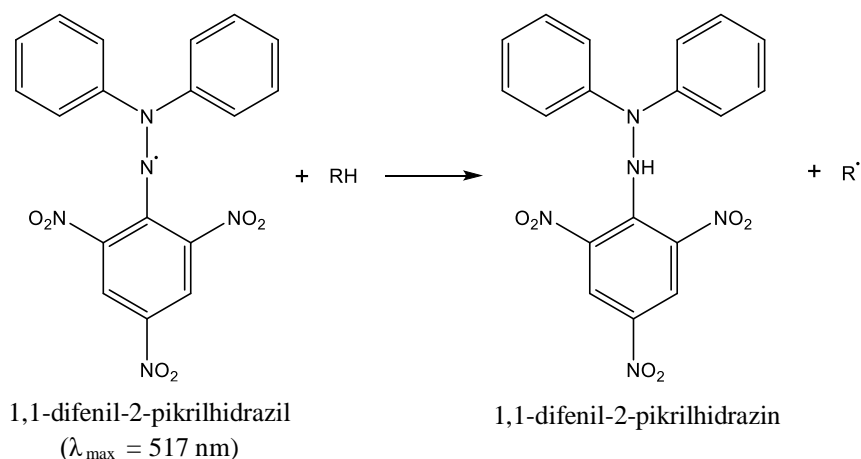
U okviru ovog diplomskog rada istražen je antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Inula*. Da bi se ispitali mogući mehanizmi antioksidacijskog djelovanja korištene su tri različite spektrofotometrijske metode. Ispitana je sposobnost hvatanja slobodnih radikala, keliranja i redukcije *Inula* ekstrakata. U tu svrhu pripremljeni su suhi ekstrakti cvjetova i listova istraživanih biljnih vrsta korištenjem ultrazvuka i 70 %-tnog etanola, a iskorištenja dobivenih ekstrakata prikazana su u Tablici 2.

**Tablica 2.** Iskorištenja etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Inula*

|                          |        | Iskorištenje (%) |
|--------------------------|--------|------------------|
| <i>I. crithmoides</i>    | cvijet | 27,7             |
|                          | list   | 38,8             |
| <i>I. ensifolia</i>      | cvijet | 18,0             |
|                          | list   | 19,5             |
| <i>I. oculus-christi</i> | cvijet | 12,3             |
|                          | list   | 20,9             |
| <i>I. verbascifolia</i>  | cvijet | 17,5             |
|                          | list   | 16,3             |

#### 4.3.1. Sposobnost hvatanja DPPH radikala

Sposobnost istraživanih ekstrakata da neutraliziraju slobodne radikale određena je DPPH metodom. Primjenjena metoda koristi stabilne, komercijano dostupne DPPH radikale i vrlo se često koristi u znanstvenim istraživanjima za ispitivanje antiradikalne aktivnosti. DPPH (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) radikal sadrži nesporeni elektron i zbog toga pokazuje jaku sposobnost apsorpiranja vidljive svjetlosti na valnoj duljini od 517 nm te je ljubičasto obojen. U prisutnosti antioksidansa koji imaju sposobnost doniranja atoma vodika ili elektrona, DPPH radikal se reducira do odgovarajućeg hidrazina svijetlo žute boje (Slika 23). Antiradikalna aktivnost testiranog uzorka direktno je proporcionalna smanjenju intenziteta obojenja reakcijske smjese koje se mjeri spektrofotometrijski.



**Slika 23.** Prikaz reakcije DPPH radikala i antioksidansa

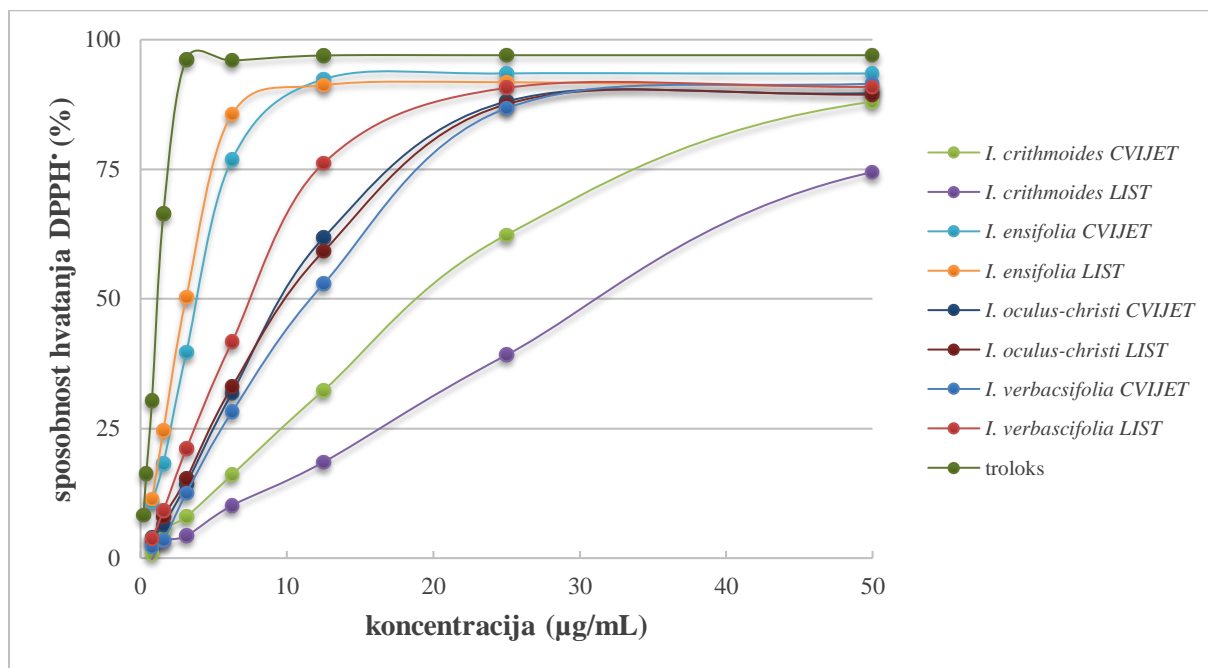
U Tablici 3 prikazani su rezultati ispitivanja antiradikalne aktivnosti ekstrakata cvjetova i listova odabranih vrsta roda *Inula* i referentnog antioksidansa. Biljni ekstrakti su testirani u koncentracijskom nizu od 0,8  $\mu\text{g/mL}$  do 100  $\mu\text{g/mL}$ , a troloks u rasponu 0,2-50  $\mu\text{g/mL}$ . Nakon mjerenja apsorbancija reakcijskih smjesa na 517 nm izračunata je inhibicija slobodnih DPPH radikala za pojedine koncentracije uzoraka i izražena je u postocima (%). Iz dobivenih rezultata može se vidjeti da svi testirani ekstrakti odabranih vrsta roda *Inula* posjeduju sposobnost hvatanja DPPH radikala, te je učinak bio ovisan o primijenjenoj koncentraciji. Pri koncentracijama 3,1  $\mu\text{g/mL}$ , 6,3  $\mu\text{g/mL}$ , 12,5  $\mu\text{g/mL}$  i 25  $\mu\text{g/mL}$  postotak inhibicije slobodnih DPPH radikala iznosio je 4-50 %, 10-86 %, 19-92 % i 39-94 %. Samo su ekstrakti listova i cvjetova biljne vrste *I. ensifolia* postigli 50 %-tni učinak pri koncentracijama 3,1  $\mu\text{g/mL}$  (list) i 6,3  $\mu\text{g/mL}$  (cvijet) što je ukazalo na njihovu snažnu antiradikalnu aktivnost. Najslabiji učinak su pokazali ekstrakti listova i cvjetova vrste *I. crithmoides* koji jedini nisu pri koncentraciji 12,5  $\mu\text{g/mL}$  ostvarili 50 %-tnu učinkovitost. Svi ispitivani ekstrakti, osim ekstrakata cvjetova i listova vrste *I. crithmoides*, su pri koncentracijama  $\geq 25 \mu\text{g/mL}$  ušli u tzv. plato-fazu što znači da se povećanjem koncentracije uzoraka nije promijenila značajno ili se uopće nije promijenila sposobnost hvatanja DPPH radikala. Troloks je već pri 1,6  $\mu\text{g/mL}$  inhibirao više od 50 % slobodnih DPPH radikala dok je pri sljedećoj većoj koncentraciji (3,1  $\mu\text{g/mL}$ ) njegov učinak iznosio 96 %.

**Tablica 3.** Sposobnost hvatanja DPPH<sup>\*</sup> etanolnih ekstrakata cvjetova i listova odabranih vrsta roda *Inula* i referentnog antioksidansa troloksa

|                          |        | Sposobnost hvatanja DPPH <sup>*</sup> (%) ± SD |            |            |            |            |            |            |            |
|--------------------------|--------|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|                          |        | 0,8 µg/mL                                      | 1,6 µg/mL  | 3,1 µg/mL  | 6,3 µg/mL  | 12,5 µg/mL | 25 µg/mL   | 50 µg/mL   | 100 µg/mL  |
| <i>I. crithmoides</i>    | cvijet | 0,8 ± 2,2                                      | 5,5 ± 2,2  | 12,4 ± 6,9 | 16,1 ± 0,0 | 32,4 ± 2,5 | 62,4 ± 3,9 | 88,0 ± 0,8 | 92,0 ± 0,3 |
|                          | list   | na   | 3,3 ± 1,7  | 4,3 ± 1,4  | 10,1 ± 1,9 | 18,5 ± 0,0 | 39,2 ± 1,1 | 74,5 ± 4,1 | 86,4 ± 4,4 |
| <i>I. ensifolia</i>      | cvijet | 10,8 ± 0,8                                     | 18,2 ± 0,3 | 39,7 ± 1,6 | 76,9 ± 2,1 | 92,4 ± 0,3 | 93,5 ± 0,8 | 93,5 ± 1,3 | 94,2 ± 0,3 |
|                          | list   | 11,3 ± 0,3                                     | 24,6 ± 0,5 | 50,3 ± 2,6 | 85,6 ± 0,3 | 91,2 ± 0,3 | 91,8 ± 0,0 | 90,8 ± 0,3 | 89,2 ± 0,0 |
| <i>I. oculus-christi</i> | cvijet | 4,0 ± 0,9                                      | 6,4 ± 1,4  | 14,3 ± 0,6 | 31,9 ± 0,3 | 61,8 ± 0,3 | 88,1 ± 0,3 | 89,7 ± 1,4 | 92,1 ± 0,3 |
|                          | list   | 3,5 ± 0,9                                      | 8,0 ± 0,3  | 15,3 ± 0,9 | 33,1 ± 1,2 | 59,2 ± 1,7 | 87,6 ± 0,3 | 89,4 ± 0,0 | 87,6 ± 2,0 |
| <i>I. verbascifolia</i>  | cvijet | 2,2 ± 1,8                                      | 3,4 ± 2,4  | 12,5 ± 2,7 | 28,2 ± 4,2 | 52,9 ± 0,4 | 86,8 ± 1,4 | 91,5 ± 0,5 | 92,1 ± 0,8 |
|                          | list   | 3,7 ± 0,3                                      | 9,1 ± 1,1  | 21,0 ± 1,6 | 41,7 ± 1,3 | 76,2 ± 5,3 | 90,7 ± 0,5 | 90,9 ± 0,3 | 89,8 ± 0,3 |
| <b>Troloks</b>           |        | 30,3 ± 2,3                                     | 66,4 ± 1,1 | 96,2 ± 0,0 | 96,0 ± 0,8 | 97,0 ± 0,0 | 97,0 ± 0,0 | 97,0 ± 0,7 | nt         |

Rezultati su izraženi u postocima (%), kao srednja vrijednost ± standardna devijacija triju određivanja. na: nije aktivno; nt: nije testirano

Slika 24 donosi grafički prikaz antiradikalne aktivnosti ekstrakata odabranih vrsta roda *Inula* u odnosu na troloks. Svi ispitivani biljni ekstrakti su pokazali slabiju sposobnost hvatanja DPPH radikala od troloksa. No, pri višim koncentracijama ( $\geq 25 \mu\text{g/mL}$ ) aktivnost svih ekstrakata osim za vrstu *I. crithmoides* bila je usporediva s aktivnošću troloksa. Antiradikalni učinak cvjetova i listova vrste *I. ensifolia* koji su među istraživanim ekstraktima pokazali najbolju učinkovitost, približio se učinku troloksa već pri  $12,5 \mu\text{g/mL}$ .

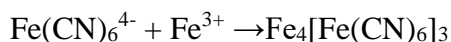
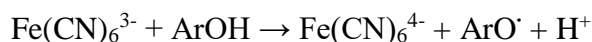


**Slika 24.** Usporedni grafički prikaz sposobnosti hvatanja DPPH\* za različite koncentracije etanolnih ekstrakata cvjetova i listova odabranih vrsta roda *Inula* i troloksa

#### 4.3.2. Redukcijska sposobnost

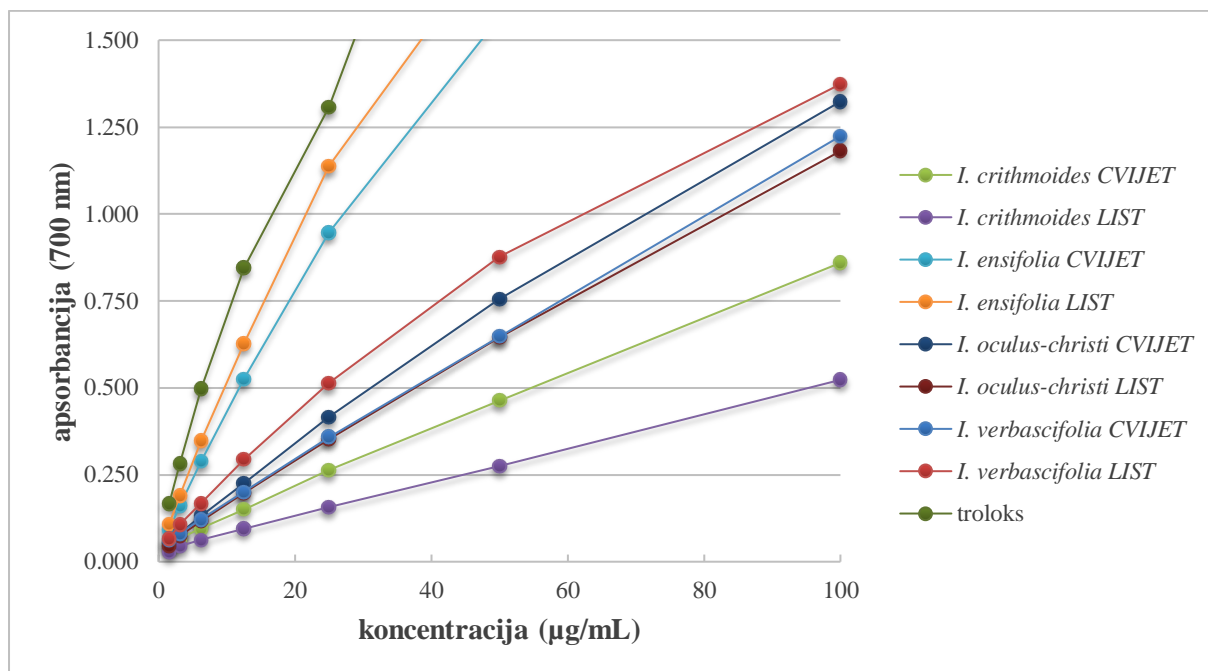
Sposobnost redukcije neke tvari može poslužiti kao pokazatelj njezine antioksidacijske aktivnosti. Reducensi otpuštanjem elektrona zaustavljaju reakcije nastanka slobodnih radikala. Također sprječavaju nastanak reaktivnih kisikovih spojeva tako da reagiraju s određenim prekursorima peroksida (Kindl i sur., 2015). Uzimajući u obzir navedeno, ispitana je redukcijska moć ekstrakata odabranih biljnih vrsta roda *Inula* primjenom metode redukcije kalijevog heksacijanoferata, te je uspoređena s aktivnošću referentnog antioksidansa troloksa. Ako se u reakcijskoj smjesi s kalijevim heksacijanoferatom nalazi reducens, željezo(III) ion se reducira u željezo(II) oblik, a dodatkom soli trovalentnog željeza nastaje plava otopina (Berlinsko modriilo).

Navedene reakcije možemo prikazati na sljedeći način:



Boja ispitivanih otopina prelazi iz žute u različite nijanse zelene i plave, ovisno o tome kolika je redukcijska moć ispitivanih antioksidansa, a apsorbancija se mjeri na 700 nm.

U Tablici 4 su prikazane izmjerene vrijednosti apsorbancije pri različitim koncentracijama (1,6-100 µg/mL) ekstrakata odabranih vrsta roda *Inula* i troloksa. Koncentracije ispitanih uzoraka koje su uzrokovale apsorbanciju od 0,5 odgovaraju njihovoj sposobnosti 50 %-tne redukcije. Ispitivani *Inula* ekstrakti su pokazali slabiju redukcijsku sposobnost od troloksa pri svim koncentracijama. Samo su ekstrakti cvjetova i listova vrste *I. ensifolia* pri koncentraciji od 12,5 µg/mL premašili 50 %-tnu učinkovitost te su izmjerene vrijednosti apsorbancije iznosile 0,525 i 0,628. Ekstakti listova i cvjetova vrste *I. crithmoides* su pokazali najslabiju aktivnost te su ostvarili 50 %-tni učinak tek pri najvišoj testiranoj koncentraciji (100 µg/mL). Na Slici 25 prikazana je ovisnost sposobnosti redukcije iona Fe(III) o primjenjenoj koncentraciji *Inula* ekstrakata i troloksa. Uočena je izražena linearna ovisnost aktivnosti svih testiranih ekstrakata o primijenjenoj koncentraciji ( $R^2 = 0,9808-0,9997$ ).



**Slika 25.** Usporedni grafički prikaz sposobnosti redukcije iona željeza(III) za različite koncentracije etanolnih ekstrakata cvjetova i listova odabranih vrsta roda *Inula* i troloksa



**Tablica 4.** Redukcijska sposobnost etanolnih ekstrakata cvjetova i listova odabranih vrsta roda *Inula* i referentnog antioksidansa troloksa

|                          |        | Sposobnost redukcije Fe(III) (%) ± SD |               |               |               |               |               |               |
|--------------------------|--------|---------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                          |        | 1,6 µg/mL                             | 3,1 µg/mL     | 6,3 µg/mL     | 12,5 µg/mL    | 25 µg/mL      | 50 µg/mL      | 100 µg/mL     |
| <i>I. crithmoides</i>    | cvijet | 0,050 ± 0,001                         | 0,066 ± 0,107 | 0,096 ± 0,003 | 0,151 ± 0,002 | 0,263 ± 0,001 | 0,464 ± 0,002 | 0,860 ± 0,009 |
|                          | list   | 0,027 ± 0,004                         | 0,044 ± 0,003 | 0,063 ± 0,003 | 0,095 ± 0,000 | 0,157 ± 0,000 | 0,275 ± 0,005 | 0,523 ± 0,007 |
| <i>I. ensifolia</i>      | cvijet | 0,093 ± 0,004                         | 0,161 ± 0,004 | 0,289 ± 0,001 | 0,525 ± 0,002 | 0,947 ± 0,006 | 1,567 ± 0,001 | 2,907 ± 0,002 |
|                          | list   | 0,109 ± 0,004                         | 0,190 ± 0,004 | 0,347 ± 0,001 | 0,628 ± 0,002 | 1,139 ± 0,036 | 1,809 ± 0,057 | 3,378 ± 0,029 |
| <i>I. oculus-christi</i> | cvijet | 0,054 ± 0,001                         | 0,082 ± 0,001 | 0,132 ± 0,001 | 0,226 ± 0,001 | 0,417 ± 0,002 | 0,755 ± 0,008 | 1,324 ± 0,039 |
|                          | list   | 0,044 ± 0,001                         | 0,075 ± 0,002 | 0,117 ± 0,001 | 0,198 ± 0,001 | 0,353 ± 0,001 | 0,646 ± 0,006 | 1,181 ± 0,006 |
| <i>I. verbascifolia</i>  | cvijet | 0,062 ± 0,000                         | 0,081 ± 0,004 | 0,122 ± 0,004 | 0,201 ± 0,005 | 0,358 ± 0,004 | 0,648 ± 0,002 | 1,224 ± 0,016 |
|                          | list   | 0,066 ± 0,007                         | 0,107 ± 0,010 | 0,168 ± 0,002 | 0,294 ± 0,004 | 0,514 ± 0,006 | 0,877 ± 0,006 | 1,374 ± 0,110 |
| <b>Troloks</b>           |        | 0,168 ± 0,011                         | 0,282 ± 0,012 | 0,496 ± 0,018 | 0,844 ± 0,034 | 1,308 ± 0,032 | 2,615 ± 0,035 | nt            |

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija triju određivanja. nt: nije testirano

### 4.3.3. Kelirajuća aktivnost

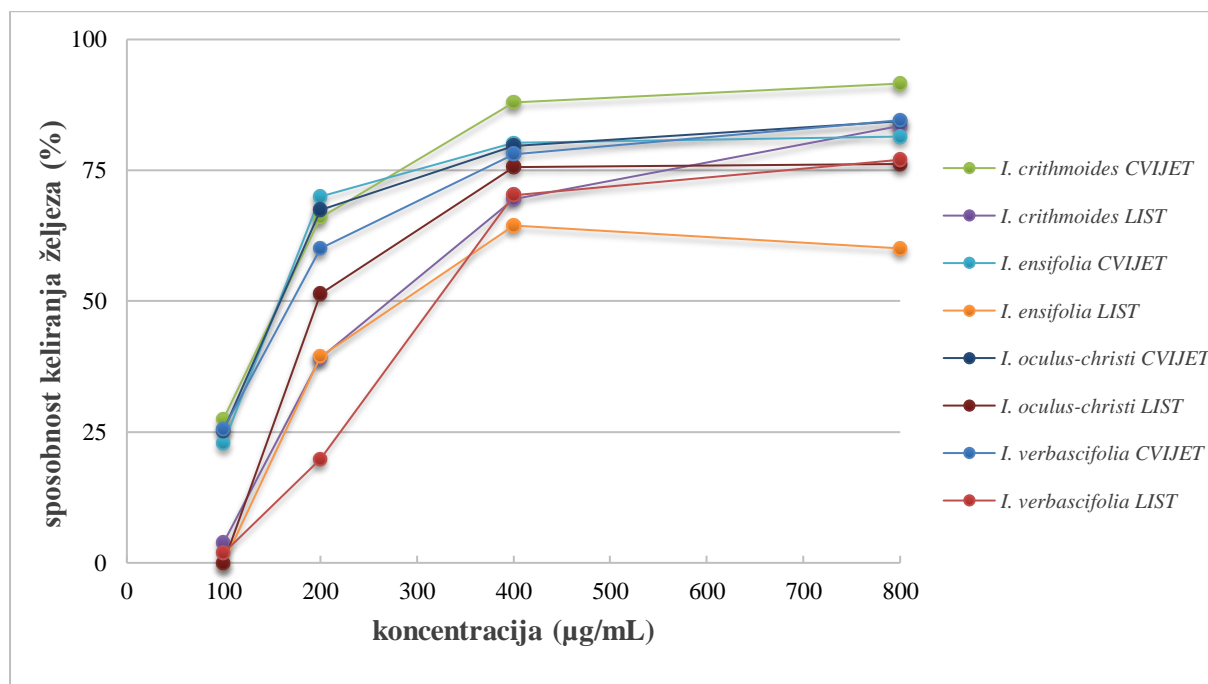
Ioni prijelaznih metala pokazuju izravno prooksidativno djelovanje katalizirajući stvaranje visoko reaktivnih kisikovih spojeva, te tako doprinose oštećenju bioloških važnih makromolekula. Posebice je važna uloga željeza koji služi kao prijenosnik elektrona između kisika i bioloških molekula, te se smatra najvažnijim prooksidansom lipidne oksidacije u organizmu. U reakciji  $\text{Fe}^{2+}$  iona i vodikovog peroksida dolazi do nastanka hidroksilnog radikala koji spada u najjače poznate oksidanse (Fentonova reakcija:  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$ ). Željezo može reagirati i s lipidnim hidroperoksidima pri čemu nastaju reaktivni lipidni alkoksilni radikali koji dalje sudjeluju u širenju lipidne peroksidacije ( $\text{Fe}^{2+} + \text{LOOH} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{LO}^\bullet + \text{OH}^-$ ) (Štefan i sur., 2007). Kelirajuće tvari koje vežu ione željeza mogu stabilizirati taj prooksidans u organizmu i tako umanjiti njegovo potencijalno štetno djelovanje.

Budući da je keliranje iona željeza jedan od mehanizam antioksidacijskog djelovanja u ovom je radu ispitana sposobnost *Inula* ekstrakata da keliraju ione željeza(II), te je u tu svrhu korištena spektrofotometrijskom metodom s ferozinom. Primijenjena metoda temelji se na kvantitativnoj reakciji ferozina s ionima željeza(II) u kojoj nastaje ružičasto obojeni kompleks s maksimumom apsorbancije na 562 nm. Ako je u reakcijskoj smjesi prisutan kelator, neće doći do nastajanja kompleksa ferozina s  $\text{Fe}^{2+}$  i posljedično će se smanjiti intenzitet obojenja reakcijske smjese na temelju čega se procijenjuju kelirajuća svojstva uzoraka. Rezultati istraživanja sposobnosti ekstrakata cvjetova i listova odabranih vrsta roda *Inula* (100-800  $\mu\text{g/mL}$ ) da keliraju ione željeza(II) prikazani su u Tablici 5 i Slici 26. Ekstrakti cvjetova svih ispitivanih *Inula* vrsta su pri najmanjoj testiranoj koncentraciji (100  $\mu\text{g/mL}$ ) pokazali sličnu aktivnost koja je bila u rasponu 23-28 %. Ekstrakti listovi pri toj koncentraciji nisu bili aktivni. Pri sljedećoj većoj koncentraciji (200  $\mu\text{g/mL}$ ) učinak ekstrakata cvjetova je također bio međusobno sličan (60-70 %). Aktivnost ekstrakata listova je pri 200  $\mu\text{g/mL}$  bila u rasponu od 20 % do 40 %, te su ti ekstrakti tek pri 400  $\mu\text{g/mL}$  kelirali više od 50 % iona željeza. Kelirajuća sposobnost svakog od testiranih ekstrakata bila je znatno slabija u usporedbi s etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA) koja je testirana kao referentni metalni kelator (Slika 27). Naime, EDTA je već pri koncentraciji 6,3  $\mu\text{g/mL}$  kelirala 50 % iona željeza(II), a pri koncentraciji od 12,5  $\mu\text{g/mL}$  njezin je učinak iznosio 95 % i ušla je u tzv. plato-fazu.

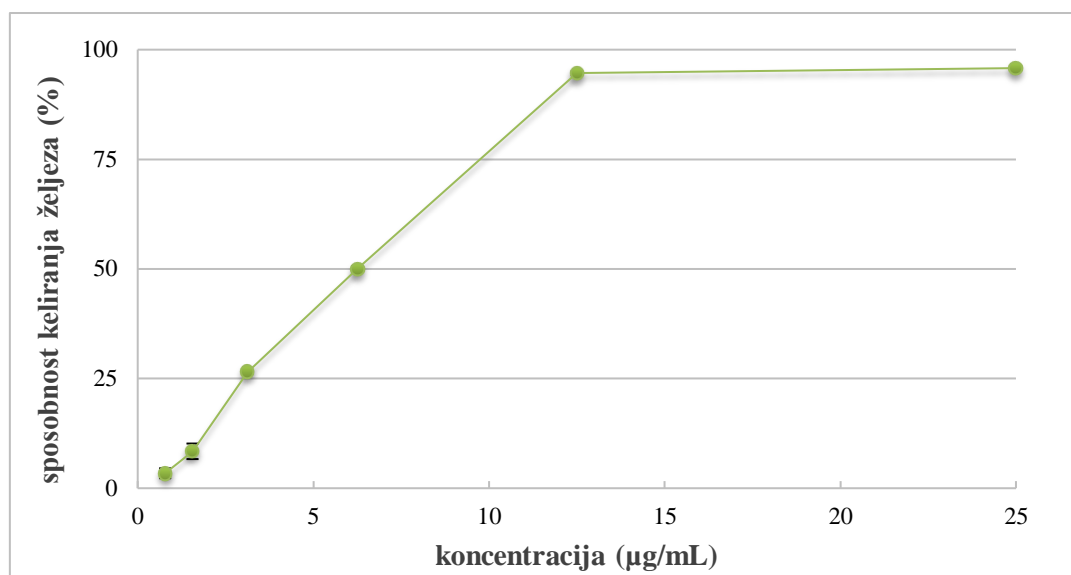
**Tablica 5.** Spособnost keliranja iona željeza(II) etanolnih ekstrakata cvjetova i listova odabranih vrsta roda *Inula*

|                          |        | Spособnost keliranja Fe(II) (%) ± SD |            |            |            |
|--------------------------|--------|--------------------------------------|------------|------------|------------|
|                          |        | 100 µg/mL                            | 200 µg/mL  | 400 µg/mL  | 800 µg/mL  |
| <i>I. crithmoides</i>    | cvijet | 27,5 ± 1,4                           | 66,0 ± 0,5 | 88,0 ± 1,1 | 91,6 ± 0,3 |
|                          | list   | 3,8 ± 3,2                            | 39,2 ± 2,4 | 69,5 ± 3,0 | 83,5 ± 1,9 |
| <i>I. ensifolia</i>      | cvijet | 22,9 ± 2,9                           | 70,0 ± 1,4 | 80,2 ± 2,2 | 81,5 ± 4,6 |
|                          | list   | na                                   | 39,5 ± 2,8 | 64,4 ± 0,2 | 60,0 ± 2,6 |
| <i>I. oculus-christi</i> | cvijet | 25,3 ± 1,2                           | 67,4 ± 0,9 | 79,7 ± 4,6 | 84,4 ± 3,9 |
|                          | list   | na                                   | 31,6 ± 2,6 | 75,7 ± 1,4 | 76,2 ± 0,3 |
| <i>I. verbascifolia</i>  | cvijet | 25,6 ± 1,7                           | 60,1 ± 0,7 | 78,1 ± 2,3 | 84,6 ± 4,1 |
|                          | list   | na                                   | 19,9 ± 2,6 | 69,3 ± 1,9 | 79,0 ± 0,1 |

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija triju određivanja. na: nije aktivno



**Slika 26.** Grafički prikaz spособnosti keliranja iona željeza(II) za različite koncentracije etanolnih ekstrakata cvjetova i listova odabranih vrsta roda *Inula*



**Slika 27.** Grafički prikaz sposobnosti keliranja iona željeza(II) za različite koncentracije etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA)

#### 4.3.4. Usporedna antioksidacijska aktivnost etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Inula*

Antioksidacijski potencijal odabranih vrsta roda *Inula* (*I. crithmoides*, *I. ensifolia*, *I. oculus-christi* i *I. verbascifolia*) procijenjen je primjenom tri različite spektrofotometrijske metode. Istraživanim biljnim ekstraktima ustanovljena je sposobnost hvatanja DPPH radikala, redukcije iona željeza(III) i keliranja iona željeza(II). Kako bi usporedili antioksidacijsku aktivnost testiranih ekstrakata za svaku metodu izračunate su  $IC_{50}$  vrijednosti koje predstavljaju koncentraciju ispitivane tvari kod koje je postignut 50 %-tni učinak (Tablica 6). Niža  $IC_{50}$  vrijednost ukazuje na bolju antioksidacijsku učinkovitost. Najbolju sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala pokazali su ekstrakti cvjetova i listova vrste *I. ensifolia*, s  $IC_{50}$  vrijednostima 4,1 µg/mL i 2,9 µg/mL. Učinak tih ekstrakata bio je usporediv s učinkom referentnog antioksidansa troloksa ( $IC_{50} = 1,2$  µg/mL). Najslabiju antiradikalnu aktivnost imali su ekstrakti cvjetova i listova vrste *I. crithmoides* ( $IC_{50} = 17,8$  µg/mL i  $IC_{50} = 33,2$  µg/mL). Preostala četiri ekstrakta vrsta *I. oculus-christi* i *I. verbascifolia* pokazali su sličnu sposobnost hvatanja DPPH radikala s  $IC_{50}$  vrijednostima u rasponu od 7,9 µg/mL do 10,9 µg/mL. Rezultati ispitivanja redukcijske sposobnosti istaknuli su ekstrakte vrste *I. ensifolia* s  $IC_{50}$  vrijednostima 10,1 µg/mL (list) i 12,4 µg/mL (cvijet) kao posebno snažne reducense, te je njihova učinkovitost bila nešto slabija u odnosu na troloks ( $IC_{50} = 7,5$  µg/mL). Ekstrakti cvjetova i listova vrste *I. crithmoides* pokazali su najslabiju redukcijsku moć ( $IC_{50} = 55,4$  µg/mL i  $IC_{50} = 95,2$  µg/mL). Kelirajuća aktivnost ekstrakata cvjetova svih ispitivanih vrsta

bila je međusobno vrlo slična ( $IC_{50} = 157,3-177,0 \mu\text{g/mL}$ ) te bolja u odnosu na aktivnost ekstrakata listova. Sposobnost keliranja iona željeza(II) ekstrakata listova vrsta *I. crithmoides*, *I. oculus-christi* i *I. ensifolia* je također bila slična, s  $IC_{50}$  vrijednostima u rasponu od 259,8  $\mu\text{g/mL}$  do 278,4  $\mu\text{g/mL}$ , dok je ekstrakt listova vrste *I. verbascifolia* pokazao najslabiju učinkovitost ( $IC_{50} = 320,4 \mu\text{g/mL}$ ). Rezultati antioksidacijskog ispitivanja su među ispitivanim vrstama roda *Inula* istaknuli vrstu *I. ensifolia* kao biljku s najvećom antioksidacijskim potencijalom.

**Tablica 6.** Usporedni prikaz  $IC_{50}$  vrijednosti etanolnih ekstrakata cvjetova i listova odabranih vrsta roda *Inula*, referentnog antioksidansa troloksa i referentnog kelatora EDTA

|                          |        | $IC_{50}^*$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) |                        |                       |
|--------------------------|--------|----------------------------------|------------------------|-----------------------|
|                          |        | Sposobnost hvatanja DPPH*        | Redukcijska sposobnost | Kelirajuća aktivnost  |
| <i>I. crithmoides</i>    | cvijet | $17,8 \pm 0,1^a$                 | $55,4 \pm 0,4^a$       | $157,3 \pm 3,7^a$     |
|                          | list   | $33,2 \pm 1,0^b$                 | $95,2 \pm 0,6^b$       | $260,4 \pm 15,4^b$    |
| <i>I. ensifolia</i>      | cvijet | $4,1 \pm 0,0^c$                  | $12,4 \pm 0,1^c$       | $158,2 \pm 2,4^a$     |
|                          | list   | $2,9 \pm 0,1^d$                  | $10,1 \pm 0,2^d$       | $278,4 \pm 6,1^c$     |
| <i>I. oculus-christi</i> | cvijet | $9,1 \pm 0,1^e$                  | $34,0 \pm 0,6^e$       | $168,0 \pm 8,4^{a,d}$ |
|                          | list   | $9,2 \pm 0,2^e$                  | $39,4 \pm 0,2^f$       | $259,8 \pm 7,7^b$     |
| <i>I. verbascifolia</i>  | cvijet | $10,9 \pm 0,6^f$                 | $38,1 \pm 0,6^g$       | $177,0 \pm 0,9^d$     |
|                          | list   | $7,9 \pm 0,5^g$                  | $26,2 \pm 0,1^h$       | $320,4 \pm 2,2^e$     |
| <b>Troloks</b>           |        | $1,2 \pm 0,1^h$                  | $7,5 \pm 0,2^i$        | nt                    |
| <b>EDTA</b>              |        | nt                               | nt                     | $6,5 \pm 0,0^f$       |

\* $IC_{50}$  vrijednost – koncentracija koja osigurava 50 %-tno hvatanje slobodnih DPPH radikala, keliranje 50 % ukupno prisutnih iona željeza, odnosno koncentracija pri kojoj je izmjerena apsorbancija 0,5 za redukcijsku moć. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost  $\pm$  standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja. Srednje vrijednosti unutar stupca označene različitim slovom se međusobno statistički značajno razlikuju ( $P < 0,05$ ). nt: nije testirano

### 4.3.5. Korelacija antioksidacijske aktivnosti i sadržaja polifenola

Usporedno istraživanje šest vrsta roda *Inula* bugarskog porijekla je pokazalo dobru povezanost između istraživanih bioloških učinaka i sadržaja ukupnih polifenola te pojedinačnih mono i dikafeoilkina derivata (Trendafilova i sur., 2020a). Stoga je i u okviru ovog rada provedena korelacijska analiza međusobne povezanosti antioksidacijskog djelovanja s udjelima različitih skupina polifenola u ispitivanim *Inula* vrstama. Izračunate vrijednosti Spearmanovog koeficijenta korelacije ( $r_s$ ) prikazane su u Tablici 7. Vrlo dobra negativna povezanost ( $r_s = -0,79$ ,  $P = 0,015$ ) utvrđena je između sposobnosti hvatanja DPPH radikala i sadržaja trjeslovina što znači da je antiradikalni učinak jači što je sadržaj trjeslovina veći. Statistički značajne povezanosti između antiradikalne aktivnosti i sadržaja ukupnih hidroksicimetnih derivata i flavonoida nije bilo. Utvrđena je dobra negativna povezanost između sadržaja hidroksicimetnih derivata i sposobnosti redukcije ( $r_s = -0,69$ ,  $P = 0,047$ ), dok nije bilo statistički značajne povezanosti sa sadržajem flavonoida i trjeslovina. Rezultati provedene korelacijske analize su pokazali da se sposobnost keliranja iona željeza(II) ne može pripisati sadržaju polifenola u ispitanim *Inula* ekstraktima.

**Tablica 7.** Rezultati korelacijske analize povezanosti antioksidativne aktivnosti *Inula* ekstrakata i sadržaja različitih skupina polifenolnih sastavnica

|                           | Hidroksicimetni derivati | Flavonoidi        | Trjeslovine              |
|---------------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|
| Sposobnost hvatanja DPPH* | -0,619<br>(0,086)        | -0,024<br>(0,931) | <b>-0,786</b><br>(0,015) |
| Redukcijska sposobnost    | <b>-0,690</b><br>(0,047) | 0,095<br>(0,794)  | -0,667<br>(0,059)        |
| Kelirajuća aktivnost      | 0,143<br>(0,705)         | 0,452<br>(0,233)  | 0,167<br>(0,662)         |

Prikazani rezultati predstavljaju vrijednosti Spearmanovog koeficijenta korelacije ( $r_s$ ) i značajnost koeficijenta korelacije  $P$ .

## 5. ZAKLJUČCI



U ovom je diplomskom radu provedena fitokemijska analiza te ispitan antioksidacijski učinak cvjetova i listova odabranih vrsta roda *Inula* (*I. crithmoides* L., *I. ensifolia* L., *I. oculus-christi* L. i *I. verbascifolia* (Willd.) Hausskn.) koje samoniklo rastu na području Hrvatske.

Prisutnost klorogenske kiseline, kvecetinskih glikozida te aglikona luteolina u metanolnim ekstraktima odabranih vrsta roda *Inula* dokazana je tankoslojnom kromatografijom visoke djelotvornosti. Rezultati usporednog kromatografskog ispitivanja istaknuli su vrstu *I. ensifolia* kao bogat izvor fenolnih kiselina i flavonoida.

Sadržaj različitih skupina polifenolnih spojeva određen je primjenom spektrofotometrijskih metoda prema propisima Europske farmakopeje. Utvrđeno je da cvjetovi i listovi istraživanih vrsta roda *Inula* sadrže 0,75-8,43 % hidroksicimetnih derivata (fenolnih kiselina), 0,11-1,52 % flavonoida i 0,48-2,15 % trjeslovina. Najveći udio hidroksicimetnih derivata i trjeslovina određen je u cvjetovima i listovima vrste *I. ensifolia*, dok su listovi ove vrste također sadržavali i najviše flavonoida.

Antioksidacijski potencijal etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Inula* procijenjen je primjenom tri različite spektrofotometrijske metode te uspoređen s djelovanjem referentnog antioksidans troloksa i referentnog kelatora EDTA. Istraživani ekstrakti su pokazali sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala (IC<sub>50</sub>: 2,9-33,2 µg/mL), redukcije iona željeza(III) (IC<sub>50</sub>: 10,1-95,2 µg/mL) i keliranja iona željeza(II) (IC<sub>50</sub>: 157,3-320,4 µg/mL). Najbolju antiradikalnu aktivnost kao i redukcijska svojstva pokazali su ekstrakti cvjetova i listova vrste *I. ensifolia* te je učinak bio usporediv s troloksom. Kelirajuća aktivnost ekstrakata cvjetova svih ispitivanih vrsta bila je međusobno vrlo slična te bolja u odnosu na aktivnost ekstrakata listova. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da ekstrakti vrste *I. ensifolia* različitim mehanizmima djelovanja ostvaruju snažniji antioksidacijski učinak u odnosu na ekstrakte ostalih istraživanih vrsta.

Provedena je korelacijska analiza međusobne povezanosti antioksidacijskog učinka s udjelima različitih skupina polifenola u ispitivanim *Inula* vrstama. Vrlo dobra negativna povezanost utvrđena je između sposobnosti hvatanja DPPH radikala i sadržaja trjeslovina te dobra negativna povezanost između sposobnosti redukcije i sadržaja hidroksicimetnih derivata.

Rezultati ovog rada pružaju nove znanstve spoznaje o polifenolnim spojevima cvjetova i listova istraživanih vrsta roda *Inula* te njihovoj antioksidacijskoj učinkovitosti. Među istraživanim vrstama, najveći biomedicinski potencijal je pokazala vrsta *I. ensifolia* te je najbolji kandidat za daljna fitokemijska i biološka istraživanja.



## **6. LITERATURA**



- Abdel-Wahhab MA, Abdel-Azim SH, El-Nekeety AA. *Inula crithmoides* extract protects against ochratoxin A-induced oxidative stress, clastogenic and mutagenic alterations in male rats. *Toxicol*, 2008, 52, 566-573.
- Aboul-Ela MA, El-Lakany AM, Abdel-Kader MS, Alqasoumi SI, Shams-El-Din SM, Hammuda HM. New quinic acid derivatives from hepatoprotective *Inula crithmoides* root extract. *Helv Chim Acta*, 2012, 95, 61-66.
- Aboul-Ela MA, El-Lakany AM, Shams-El-Din SM, Hammuda HM. A new validated HPTLC method for quantitative determination of 1,5-dicaffeoylquinic acid in *Inula crithmoides* roots. *Pak J Pharm Sci*, 2012, 25, 721-725.
- Adorisio S, Giamperi L, Bucchini AEA, Delfino DV, Marcotullio C. Bioassay-guided isolation of antiproliferative compounds from *Limbarda crithmoides* (L.) Dumort. *Molecules*, 2020, 25, 1893. 1-13.
- Ahmed AA, Mohamed AEH, Tzakou O, Petropoulou A, Hassan ME, El-Maghraby MA, Zeller KP. Terpenes from *Inula verbascifolia*. *Phytochemistry*, 2003, 62, 1191-1194.
- Amorim MH, Gil da Costa RM, Lopes C, Bastos MM. Sesquiterpene lactones: adverse health effects and toxicity mechanisms. *Crit Rev Toxicol*, 2013, 43, 559-579.
- Andreani S, De Cian MC, Paolini J, Desjobert JM, Costa J, Muselli A. Chemical variability and antioxidant activity of *Limbarda crithmoides* L. essential oil from Corsica. *Chem Biodivers*, 2013, 10, 2061-2077.
- Babaei G, Aliarab A, Abroon S, Rasmi Y, Aziz SG. Application of sesquiterpene lactone: a new promising way for cancer therapy based on anticancer activity. *Biomed pharmacother*, 2018, 106, 239-246.
- Blažeković B, Stanić G, Vladimir-Knežević S. Morfološko-anatomska i fitokemijska obilježja biljnih vrsta *Thymus vulgaris* L. i *Thymus pulegioides* L. *Farm Glas*, 2006, 62, 121-130.
- Bruneton J. Pharmacognosy (Phytochemistry, Medicinal Plants), Paris-New York-London, Editions TEC & DOC, Lavoisier Publishing, Intercept, 1999, str. 619-634.
- Bucchini A, Ricci D, Messina F, Marcotullio MC, Curini M, Giamperi L. Antioxidant and antifungal activity of different extracts obtained from aerial parts of *Inula crithmoides* L. *Nat Prod Res*, 2015, 29, 1173-1176.
- Chorianopoulos NG, Evergetis ET, Aligiannis N, Mitakou S, Nychas GJE, Haroutounian SA. Correlation between chemical composition of greek essential oils and their antibacterial activity against food-borne pathogens. *Nat Prod Commun*, 2007, 2, 419-426.

- Degerli S, Berk S, Malatyali E, Tepe B. Screening of the in vitro amoebicidal activities of *Pastinaca armena* (Fisch. & C.A.Mey.) and *Inula oculus-christi* (L.) on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. *Parasitol Res*, 2011, 110, 565-570.
- Domac R. Flora Hrvatske, Zagreb: Školska knjiga, 2002, str. 345-346.
- EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care). European Pharmacopoeia, 9. izd., Strasbourg: Council of Europe, 2018, str. 288., 1257-1258., 1343-1344., 1521.
- El-Lakany AM, Aboul-Ela MA, Hammada HM, Ghazy NM, Mahmoud ZF. New methoxylated flavonols from *Inula crithmoides* L. *Pharmazie*, 1996, 51, 435-436.
- Fallahian F, Aghaei M, Abdolmohammadi MH, Hamzeloo-Moghadam M. Molecular mechanism of apoptosis induction by gaillardin, a sesquiterpene lactone, in breast cancer cell lines: gaillardin-induced apoptosis in breast cancer cell lines. *Cell Biol Toxicol*, 2015, 31, 295-305.
- Fecka I, Turek S. Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chem*, 2008, 108, 1039-1053.
- Fontana G, Bruno M, Senatore F, Formisano C. Volatile constituents of aerial parts of two Mediterranean species of *Inula*: *Inula crithmoides* L. and *I. verbascifolia* (Willd.) Hausskn. (Asteraceae). *Nat Prod Res*, 2014, 28, 984-993.
- Forenbacher S. Velebit i njegov biljni svijet. Zagreb, Školska knjiga, 1990, str. 653-655.
- Giamperi L, Bucchini A, Fraternali D, Genovese S, Curini M, Ricci D. Composition and antioxidant activity of *Inula crithmoides* essential oil grown in central Italy (Marche region). *Nat Prod Commun*, 2010, 5, 315-318.
- Hajimehdipoor H, Mosaddegh M, Naghibi F, Haeri A, Hamzeloo-Moghadam M. Natural sesquiterpen lactones as acetylcholinesterase inhibitors. *An Acad Bras Cienc*, 2014, 86, 801-806.
- Hamzeloo-Moghadam M, Naghibi F, Atoofi A, Rezaie MA, Irani M, Mosaddegh M. Cytotoxic activity and apoptosis induction by gaillardin. *Z Naturforsch C J Biosci*, 2013, 68, 108-112.
- Harvala E, Aligiannis N, Skaltsounis AL, Pratsinis H, Lambrinidis G, Harvala C, Chinou I. Cytotoxic germacranolides from *Inula verbascifolia* subsp. *methanea*. *J Nat Prod*, 2002, 65, 1045-1048.
- Ivanescu B, Miron A, Corciova A. Sesquiterpene lactones from *Artemisia* genus: biological activities and methods of analysis. *J Anal Methods Chem*, 2015, 2015, D 247685, 1-21.

- Jallali I, Waffo-Téguo P, Smeoui A, Mérillon JM, Abdelly C, Ksouri R. Bio-guided fractionation and characterization of powerful antioxidant compounds from the halophyte *Inula crithmoides*. *Arab J Chem*, 2020, 13, 2680-2688.
- Jallali I, Zaouali Y, Missaoui I, Smeoui A, Abdelly C, Ksouri R. Variability of antioxidant and antibacterial effects of essential oils and acetonic extracts of two edible halophytes: *Crithmum maritimum* L. and *Inula crithmoides* L. *Food Chem*, 2014, 145, 1031-1038.
- Javidnia K, Banani A, Miri R, Kamalinejad M, Javidnia A. Constituents of the volatile oil of *Inula oculus-christi* L. from Iran. *J Essent Oil Res*, 2006, 18, 676-678.
- Jdey A, Falleh H, Ben Jannet S, Mkadmini Hammi K, Dauvergne X, Ksouri R, Magne C. Phytochemical investigation and antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase performances of six medicinal halophytes. *S Afr J Bot*, 2017, 112, 508-514.
- Jukic M, Burcul F, Carev I, Politeo O, Milos M. Screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of selected plants from Croatia. *Nat Prod Res*, 2012, 26, 1703-1707.
- Kaštelan-Macan M, Medić-Šarić M, Turina S. Plošna kromatografija, Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2006, str. 51.
- Karami A, Hamzeloo-Moghadam M, Yami A, Barzegar M, Mashati P, Gharehbaghian A. Antiproliferative effect of gaillardin from *Inula oculus-christi* in human leukemic cells. *Nutr Cancer*, 2019, 23, 1-14.
- Kindl M, Blažeković B, Bucar F, Vladimir-Knežević S. Antioxidant and anticholinesterase potential of six *Thymus* species. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015, ID 403950, 1-10.
- Kumar N, Goel N. Phenolic acids: natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol Rep*, 2019, 24, e00370. 1-10.
- Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci World J*, 2013, 2013, ID 162750, 1-16.
- Mahmoud ZF, Salam NAA, Sarg TM, Bohlmann F. A carotane derivative and a eudesmanolide from *Inula crithmoides*. *Phytochemistry*, 1981, 20, 735-738.
- Malash BN, Ibrahim SM, Ibrahim ARS, Kabbash A, El-Aasr M. In vitro and in vivo hepatoprotective study of *Inula crithmoides* L., *Pluchea dioscoridis* (L.) Desf. and *Phyllanthus reticulatus* Poir. *J Pharm Sci Res*, 2015, 7, 987-993.
- Maleš Ž, Plazibat M, Greiner M. Kvalitativna i kvantitativna analiza flavonoida primorskog omara – *Limbarda crithmoides* (L.) Dumort. *Farm Glas*, 2004, 60, 453-459.

- Marco JA, Sanz-Cervera JF, Manglano E. Chlorinated thymol derivatives from *Inula crithmoides*. *Phytochemistry*, 1993, 33, 875-878.
- Metwally MA, Dawidar AM. A thymol derivative from *Inula crithmoides*. *Phytochemistry*, 1985, 24, 1377-1378.
- Mitić VD, Ilić MD, Stankov Jovanović VP, Djordjevic AS, Marković MS, Stojanović GS. Volatiles composition and antioxidant activity *Inula oculus-christi* L. from Serbia. *Nat Prod Res*, 2019, 1-4.
- Mohamed AEH, Mahmoud HEH, Abdellatif FF, Mohamed YS, Ahmed AA, Ohta S. New guaianolide-type sesquiterpene lactones from *Inula verbascifolia*. *Z Naturforsch C J Biosci*, 2013, 68, 175-180.
- Mosaddegh M, Hamzeloo-Moghadam M, Ghafari S, Naghibi F, Ostad SN, Read RW. Sesquiterpene lactones from *Inula oculus-christi*. *Nat Prod Commun*, 2010, 5, 511-514.
- Mosaddegh M, Ostad SN, Naghibi F, Moghadam MH. Cytotoxic effects of five species of *Inula* against some tumor cell lines. *Iran J Pharm Sci*, 2006, 2, 203-208.
- Oliveira M, João Rodrigues M, Pereira C, Neto RLDM, Junior PAS, Neng NDR, Nogueira JMF, Varela J, Barreira L, Custódio L. First report of the *in vitro* antileishmanial properties of extremophile plants from the Algarve Coast. *Nat Prod Res*, 2017, 32, 600-604.
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*, 2016, 5, 1-15.
- Péter A, Dósa G. Detection of phenoloids in some Hungarian *Inula* and *Centaurea* species. *Acta Bot Hung*, 2002, 44, 129-135.
- Ranjbar Ekbatan M, Khoramjouy M, Gholamine B, Faizi M, Sahranavard S. Evaluation of anticonvulsant effect of aqueous and methanolic extracts of seven *Inula* species. *Iran J Pharm Res*, 2019, 18, 208-220.
- Réthy B, Csupor-Löffler B, Zupkó I, Hajdú Z, Máthé I, Hohmann J, Rédei T, Falkay G. Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part I. *Phytother Res*, 2007, 21, 1200-1208.
- Santos EL, Maia BH, Ferriani AP, Teixeira SD. Flavonoids: Classification, biosynthesis and chemical ecology. U: Flavonoids - from biosynthesis to human health. Justino GC urednik, London, InTech, 2017, str. 3-16.
- Seca AM, Grigore A, Pinto DC, Silva AM. The genus *Inula* and their metabolites: from ethnopharmacological to medicinal uses. *J Ethnopharmacol*, 2014, 154, 286-310.
- Seca AM, Pinto DC, Silva AM. Metabolomic profile of the genus *Inula*. *Chem Biodivers*, 2015, 12, 859-906.

- Sen A, Kurkcuoglu M, Senkardes I, Bitis L, Baser KHC. Chemical composition, antidiabetic, anti-inflammatory and antioxidant activity of *Inula ensifolia* L. essential oil. *J Essent Oil Bear Pl*, 2019, 22, 1048-1057.
- Stojakowska A, Malarz J, Zubek S, Turnau K, Kisiel W. Terpenoids and phenolics from *Inula ensifolia*. *Biochem Syst Ecol*, 2010, 38, 232-235.
- Štefan L, Tepšić T, Zavidčić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Medicina*, 2007, 43, 84-93.
- Tavares WR, Seca AML. *Inula* L. secondary metabolites against oxidative stress-related human diseases. *Antioxidants*, 2019, 8, 122. 1-20.
- Trendafilova A, Ivanova V, Rangelov M, Todorova M, Ozek G, Yur S, Ozek T, Aneva I, Veleva R, Moskova-Doumanova V, Doumanov J, Topouzova-Hristova T. Caffeoylquinic acids, cytotoxic, antioxidant, acetylcholinesterase and tyrosinase enzyme inhibitory activities of six *Inula* species from Bulgaria. *Chem Biodivers*, 2020, 17, e2000051. 1-12.
- Trendafilova A, Ivanova V, Todorova M, Aneva I. New sesquiterpene lactones from *Inula oculus-christi* L. *Phytochem Lett*, 2017, 21, 221-225.
- Trendafilova A, Todorova M, Aneva I. Volatile constituents of *Inula oculus-christi* L. aerial parts. *C R Acad Bulg Sci*, 2018, 71, 1317-1323.
- Trendafilova A, Todorova M, Ivanova V, Aneva I. Phenolic constituents and antioxidant capacity of *Inula oculus-christi* from Bulgaria. *Bulg Chem Commun*, 2017, 49, 176-180.
- Trendafilova A, Todorova M, Ozek T, Ozek G, Aneva I. Volatile constituents of four *Inula* species of Bulgarian origin. *Biochem Syst Ecol*, 2020, 90, 104035. 1-6.
- Tsoukatou M, Roussis V. Chemical composition and intra mediterranean variation of the *Inula crithmoides* L. oil. *J Essent Oil Res*, 1999, 11, 199-202.
- Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. *Flora Europaea*, Vol 3., Cambridge, Cambridge University Press, 1972, str. 133-136.
- Tzakou O, Petropolou A, Harvala C, Constantinidis TH. Volatile compounds of two members of *Inula verbascifolia* group: *I. verbascifolia* (Willd.) Hausskn. ssp. *Parnassica* (Boiss. Et Heldr.) Tutin and *I. verbascifolia* ssp. *Methanea* (Hausskn.) Tutin. *J Essent Oil Res*, 2001, 13, 364-366.
- Vajs V, Neveščanin M, Macura S, Juranić N, Menković N, Milosavljević S. Sesquiterpene lactones from the aerial parts of *Inula oculus-christi*. *Fitoterapia*, 2003, 74, 508-510.
- Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Bival Štefan M, Babac M. Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. U: *Phytochemicals as nutraceuticals - global*

- approaches to their role in nutrition and health. Venketeshwer Rao A, urednik, Rijeka, InTech, 2012, str. 155-180.
- Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas, 2. izd., Berlin-Heidelberg: Springer, 2009, str. 195-197., 362.
- Yami A, Hamzeloo-Moghadam M, Darbandi A, Karami A, Mashati P, Takhviji V, Gharehbaghian A. Ergolide, a potent sesquiterpene lactone induces cell cycle arrest along with ROS-dependent apoptosis and potentiates vincristine cytotoxicity in ALL cell lines. *J Ethnopharmacol*, 2020, 253,112504.
- Zovko M, Kalodera Z, Vladimir-Knežević S, Maleš Ž. Botanical and phytochemical characterization of golden samphire root (*Inulae crithmoides radix*). *Farm glas*, 2007, 63, 583-593.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY





U okviru ovog diplomskog rada po prvi puta je provedeno usporedno istraživanje fitokemijskog sastava i antioksidacijskog učinak cvjetova i listova odabranih vrsta roda *Inula* hrvatske flore (*I. crithmoides* L., *I. ensifolia* L., *I. oculus-christi* L. i *I. verbascifolia* (Willd.) Hausskn.). Primjenom tankoslojne kromatografije visoke djelotvornosti dokazana je prisutnost fenolnih kiselina i flavonoida. Spektrofotometrijskim metodama je određen sadržaj ukupnih hidroksicimetnih derivata (0,75-8,43 %), flavonoida (0,11-1,52 %) i trjeslovina (0,48-2,15 %) u cvjetovima i listovima istraživanih biljnih vrsta. Ispitan je antioksidacijski potencijal etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Inula* primijenom tri različite spektrofotometrijske metode. Utvrđeno je da svi testirani ekstrakti cvjetova i listova imaju sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala (IC<sub>50</sub>: 2,9-33,2 µg/mL), redukcije iona željeza(III) (IC<sub>50</sub>: 10,1-95,2 µg/mL) i keliranja iona željeza(II) (IC<sub>50</sub>: 157,3-320,4 µg/mL). Rezultati ovog rada su pokazali da je među istraživanim *Inula* vrstama, uskolisni oman (*I. ensifolia*) najbogatiji izvor polifenolnih sastavnica te da različitim mehanizmima djelovanja ostvaruje najsnažniji antioksidacijski učinak.

In this diploma thesis, a comparative study of the phytochemical composition and antioxidant activity of flowers and leaves of selected *Inula* species (*I. crithmoides* L., *I. ensifolia* L., *I. oculus-christi* L. and *I. verbascifolia* (Willd.) Hausskn.) from Croatian flora was conducted for the first time. The presence of phenolic acids and flavonoids was detected by high-performance thin-layer chromatography. The contents of total hydroxycinnamic derivatives (0.75-8.43 %), flavonoids (0.11-1.52 %), and tannins (0.48-2.15 %) in flowers and leaves of investigated plant species were determined spectrophotometrically. The antioxidant potential of ethanolic extracts of selected *Inula* species was determined using three different spectrophotometric assays. All tested ethanolic extracts of flowers and leaves possessed DPPH free-radical scavenging activity (IC<sub>50</sub>: 2.9-33.2 µg/mL), ferric reducing ability (IC<sub>50</sub>: 10.1-95.2 µg/mL) and iron-chelating ability (IC<sub>50</sub>: 157.3-320.4 µg/mL). The results of this study showed that among the studied *Inula* species, *I. ensifolia* is the richest source of polyphenolic constituents, and that acting by different mechanisms, displays the most potent antioxidative activity.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmakognoziju  
Trg Marka Marulića 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### ANTIOKSIDACIJSKI UČINAK I FITOKEMIJSKI SASTAV ODABRANIH VRSTA RODA *INULA* L.

Adriana Mustać

#### SAŽETAK

U okviru ovog diplomskog rada po prvi puta je provedeno usporedno istraživanje fitokemijskog sastava i antioksidacijskog učinak cvjetova i listova odabranih vrsta roda *Inula* hrvatske flore (*I. crithmoides* L., *I. ensifolia* L., *I. oculus-christi* L. i *I. verbascifolia* (Willd.) Hausskn.). Primjenom tankoslojne kromatografije visoke djelotvornosti dokazana je prisutnost fenolnih kiselina i flavonoida. Spektrofotometrijskim metodama je određen sadržaj ukupnih hidroksicimetnih derivata (0,75-8,43 %), flavonoida (0,11-1,52 %) i trjeslovina (0,48-2,15 %) u cvjetovima i listovima istraživanih biljnih vrsta. Ispitan je antioksidacijski potencijal etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Inula* primijenom tri različite spektrofotometrijske metode. Utvrđeno je da svi testirani ekstrakti cvjetova i listova imaju sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala (IC<sub>50</sub>: 2,9-33,2 µg/mL), redukcije iona željeza(III) (IC<sub>50</sub>: 10,1-95,2 µg/mL) i keliranja iona željeza(II) (IC<sub>50</sub>: 157,3-320,4 µg/mL). Rezultati ovog rada su pokazali da je među istraživanim *Inula* vrstama, uskolisni oman (*I. ensifolia*) najbogatiji izvor polifenolnih sastavnica te da različitim mehanizmima djelovanja ostvaruje najsnažniji antioksidacijski učinak.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 60 stranica, 27 grafičkih prikaza, 7 tablica i 69 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Inula crithmoides*, *Inula ensifolia*, *Inula oculus-christi*, *Inula verbascifolia*, fenolne kiseline, flavonoidi, trjeslovine, antioksidacijski učinak

Mentor: **Dr. sc. Marija Kindl**, *poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Marija Kindl**, *poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Biljana Blažeković**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Željka Vanić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2020.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmacognosy  
Trg Marka Marulića 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diploma thesis

### ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHYTOCHEMICAL COMPOSITION OF SELECTED *INULA* SPECIES

**Adriana Mustać**

#### SUMMARY

In this diploma thesis, a comparative study of the phytochemical composition and antioxidant activity of flowers and leaves of selected *Inula* species (*I. crithmoides* L., *I. ensifolia* L., *I. oculus-christi* L. and *I. verbascifolia* (Willd.) Hausskn.) from Croatian flora was conducted for the first time. The presence of phenolic acids and flavonoids was detected by high-performance thin-layer chromatography. The contents of total hydroxycinnamic derivatives (0.75-8.43 %), flavonoids (0.11-1.52 %), and tannins (0.48-2.15 %) in flowers and leaves of investigated plant species were determined spectrophotometrically. The antioxidant potential of ethanolic extracts of selected *Inula* species was determined using three different spectrophotometric assays. All tested ethanolic extracts of flowers and leaves possessed DPPH free-radical scavenging activity (IC<sub>50</sub>: 2.9-33.2 µg/mL), ferric reducing ability (IC<sub>50</sub>: 10.1-95.2 µg/mL) and iron-chelating ability (IC<sub>50</sub>: 157.3-320.4 µg/mL). The results of this study showed that among the studied *Inula* species, *I. ensifolia* is the richest source of polyphenolic constituents, and that acting by different mechanisms, displays the most potent antioxidative activity.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 60 pages, 27 figures, 7 tables and 69 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Inula crithmoides*, *Inula ensifolia*, *Inula oculus-christi*, *Inula verbascifolia*, phenolic acids, flavonoids, tannins, antioxidant activity

Mentor: **Marija Kindl, Ph.D. Postdoctorand**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Marija Kindl, Ph.D. Postdoctorand**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Biljana Blažeković, Ph.D. Associate Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Željka Vanić, Ph.D. Associate Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2020.