

# Actividad de barrido de los radicales libres de *Inula cappa*

## *Free Radical Scavenging activity of Inula cappa*

KALOLA J<sup>1</sup>, SHAH M<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Phytochemistry and Pharmacognosy, L. M. College of Pharmacy, Navrangpura, Ahmedabad-380009, India

\*Dirección de contacto: Dr. Mamta B. Shah\* Department of Phytochemistry and Pharmacognosy, L. M. College of Pharmacy, P. B. No. 4011, Navrangpura, Ahmedabad-380009 Gujarat, India  
E-mail: mamta\_b\_shah@yahoo.com

### RESUMEN

Se evaluó la actividad antioxidante (AA) del extracto crudo y las fracciones derivadas de *Inula cappa* mediante el ensayo de barrido de radicales  $\alpha, \alpha$ -difenil- $\beta$ -picrilhidracil (DPPH), ensayo de barrido de radicales superóxido, la medición del poder reductor y la medición del efecto sobre la peroxidación lipídica en homogeneizado de hígado de rata, y comparándolos con los del hidroxitolueno butilado (BHT), el ácido gálico (GA) y el ácido ascórbico (AscA). Los resultados muestran que el extracto metanólico y la fracción soluble en acetato presentan una mayor actividad antioxidante. También se determinó el contenido total fenólico, de taninos y flavonoides. Se observa por primera vez el ácido clorogénico en esta planta, y se desarrolla un método de TLC densitométrica para la cuantificación del ácido clorogénico.

PALABRAS CLAVE: *Inula cappa*. Antioxidante. Ácido clorogénico. HPTLC.

### ABSTRACT

*Antioxidant activity (AA) of the crude extract and fractions derived from Inula cappa, was evaluated using the  $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay, superoxide radical scavenging assay, measurement of reducing power and the measurement of effect on lipid peroxidation in rat liver homogenate, and compared with that of butylated hydroxytoluene (BHT), gallic acid (GA), and ascorbic acid (AscA). The results showed that the methanolic extract and the ethyl acetate-soluble fraction exhibited higher antioxidant activity. The total phenolic, total tannin and total flavonoids content were also determined. Chlorogenic acid is reported for the first time from this plant and a TLC densitometric method was developed for the quantification of Chlorogenic acid.*

KEY WORDS: *Inula cappa*. Antioxidant. Chlorogenic acid. HPTLC.

Fecha de recepción: 09-11-06

Fecha aceptación: 19-12-06

## 1. INTRODUCCIÓN

La *Inula cappa* (Buch.-Ham.) DC. (Fam: Asteraceae), conocida comúnmente como hinojo dorado o 'Chirchitta', es una planta muy valorada en la medicina Ayurveda como expectorante, broncodilatadora, calmante, antiflogística, car-

## 1. INTRODUCTION

*Inula cappa* (Buch.-Ham.) DC. (Fam: Asteraceae), commonly known as 'Chirchitta', is highly valued in Ayurveda as an expectorant, bronchodilator, anodyne, antiphlogistic, carminative and depurative. The root juice is used in the

minativa y depurativa. El jugo de su raíz se utiliza en el tratamiento de úlceras pépticas, indigestión y otros trastornos gástricos. El jugo de su corteza, mezclado con cantidades iguales de jugo de la corteza de *Ficus semicordata* y *Myrica esculenta*, se utiliza en el tratamiento de los trastornos menstruales<sup>1</sup>. El aceite esencial de la *I. cappa* ha demostrado poseer actividad antibacteriana frente a *Bacillus pumilus*, *Sarcina lutea*, *Xanthomonas malvacearum*, *Micrococcus species*, *Staphylococcus albus*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*<sup>2,3</sup>. También se ha analizado su actividad antiviral contra el herpes, pero se demostró que no era activa<sup>4</sup>.

Algunos constituyentes químicos importantes de la raíz son: terpenos como cariofileno,  $\beta$ -farneseno, timol, isobutirato de timol, lupeol, ácido oleanólico y escualeno; carbohidratos como inositol en sus distintas formas; esteroides como  $\beta$ -sitosterol; ácidos grasos como ácido cáprico, ácido caprílico, ácido lignocérico, ácido mirístico, ácido oleico y ácido palmítico<sup>5,6</sup>.

En los últimos años, numerosos estudios han indicado que los radicales libres y las especies reactivas al oxígeno (ROS) desempeñan un papel importante en el avance de numerosas enfermedades humanas<sup>7</sup>. Una producción de ROS superior a la capacidad antioxidante celular puede ocasionar daños a lípidos, proteínas y ADN. Los daños oxidativos al ADN llevan a la carcinogénesis, especialmente en la fase de promoción<sup>8</sup>.

Los antioxidantes con actividad de barrido de radicales libres podrían tener gran importancia como agentes profilácticos y terapéuticos en enfermedades en las que estén implicados oxidantes o radicales libres<sup>7</sup>. Entre los antioxidantes naturales, los fenólicos están a la vanguardia, ya que todas las clases fenólicas (fenoles simples, ácidos fenólicos, antocianinas, derivados del ácido hidroxicinámico y flavonoides) cumplen los requisitos estructurales de los antioxidantes y los agentes de barrido de radicales libres<sup>9</sup>. El ácido clorogénico es uno de ellos, y ha demostrado una potente actividad antioxidante en diversos sistemas<sup>10</sup>.

En el presente artículo publicamos nuestro trabajo para establecer la actividad antioxidante de las raíces de *I. cappa* para neutralizar los radicales libres generados en diversos modelos *in vitro* y *ex vivo*. También comunicamos la presencia y un método de cuantificación densitométrico de TLC del ácido clorogénico, que contribuye a la actividad antioxidante de la raíz de *I. cappa*.

treatment of peptic ulcers, indigestion and other gastric disorders. The juice of the bark, mixed with equal quantities of the juice from the bark of *Ficus semicordata* and *Myrica esculenta*, is used in the treatment of menstrual disorders<sup>1</sup>. The essential oil of *I. cappa* is reported to possess antibacterial activity against *Bacillus pumilus*, *Sarcina lutea*, *Xanthomonas malvacearum*, *Micrococcus species*, *Staphylococcus albus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*<sup>2,3</sup>. It was also tested for antiviral activity against herpes virus, but was found to be inactive<sup>4</sup>.

Some important chemical constituents of root include terpenes like caryophyllene,  $\beta$ -farnesene, thymol, thymol isobutyrate, lupeol, oleanolic acid, and squalene; carbohydrates like inositol and its different forms; sterols like  $\beta$ -sitosterol; fatty acids like capric acid, caprylic acid, lignoceric acid, myristic acid, oleic acid and palmitic acid<sup>5,6</sup>.

In recent years, considerable numbers of studies have indicated that free radicals and reactive oxygen species (ROS) play an important role in the progress of many human diseases<sup>7</sup>. ROS production in excess of cellular anti-oxidant capacity may result in damage to lipids, proteins, and DNA. Oxidative damage to DNA leads to carcinogenesis, especially in the promotion stage<sup>8</sup>.

Antioxidants, with free radical scavenging activities could have great importance as prophylactic and therapeutic agents in diseases in which oxidants or free radicals are implicated<sup>7</sup>. Among natural antioxidants, phenolic antioxidants are in the forefront since all the phenolic classes (simple phenolics, phenolic acids, anthocyanins, hydroxycinnamic acid derivatives, and flavonoids) have the structural requirements of free radical scavengers and antioxidants<sup>9</sup>. Chlorogenic acid is one of them, which is shown to demonstrate powerful antioxidant activity in a number of systems<sup>10</sup>.

In the present paper, we report our work on establishing antioxidant activity of *I. cappa* roots, in quenching free radicals that are generated in several *in vitro* and *ex vivo* models. We also report the presence and TLC densitometric quantification method of chlorogenic acid, which contributes to the antioxidant activity of the *I. cappa* root.

## 2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 2.1 Materiales

Etileno diamina tetra acetato (EDTA), reactivo de Folin Ciocalteu, ácido acético glacial y dodecil-sulfato sódico (SDS) [SD Fine Chemicals, India]. 1, 1-Difenil-2-picril hidracil (DPPH), riboflavina, adenil difosfato (ADP), clorhidrato de azul de nitrotetrazolio (NBT), ácido tiobarbitúrico (TBA) y pirogalol [HIMEDIA Ltd, India]. Ácido ascórbico [Cadila Pharmaceuticals Ltd., Ahmedabad, India]. Ferrocianuro potásico [Qualigens Fine Chemicals, India], ácido tricloroacético (TCA) y cloruro férrico (III) ( $\text{FeCl}_3$ ) [E. Merck India Ltd., India]. Ácido gálico y ácido tánico [Tetrahedron Ltd., India]. Ácido clorogénico [Sigma].

Espectrofotómetro UV/VIS (Shimadzu 2450) y analizador de muestras automático CAMAG Linomat V (Muttentz, Suiza).

### 2.2 Extracción de las raíces de *Inula cappa*

Las raíces de *I. cappa* se recolectaron en Nepal en marzo de 2005. Las muestras se autenticaron y se conservó un espécimen de catálogo (N° 153) en el Departamento de fitoquímica y Farmacología de la Escuela Superior de Farmacia L. M. de Ahmedabad. Se extrajeron 100 g de polvo de raíz seca con metanol (2 x 500 ml) en un extractor Soxhlet durante 6 h. El extracto combinado se evaporó en vacío hasta secarse, obteniéndose 7,8 g de sólido marrón (extracto A), que se utilizó para el análisis fitoquímico. Además, el sólido se sumergió en agua (100 ml) y se fraccionó con acetato de etilo (3 x 100 ml) para obtener al evaporar el disolvente 2,5 g de extracto de acetato de etilo soluble (extracto A1). El extracto acuoso restante se secó en vacío para obtener 3,0 g de fracción acuosa (extracto A2). Estos extractos se utilizaron para la actividad antioxidante.

### 2.3 Estimación de fenoles totales

El contenido fenólico total del extracto se estimó según el método descrito por Singleton y Rossi<sup>11</sup>.

De la solución de almacenamiento (1 mg/ml) del extracto metanólico se introdujo la cantidad

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1 Materials

Ethylene diamine tetra acetate (EDTA), Folin Ciocalteu's reagent, glacial acetic acid and sodium dodecyl sulphate (SDS) [SD Fine Chemicals, India]. 1, 1-Diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH), riboflavin, adenyl diphosphate (ADP), nitro blue tetrazolium chloride (NBT), thiobarbituric acid (TBA) and pyrogallol [HIMEDIA Ltd, India]. Ascorbic acid [Cadila Pharmaceuticals Ltd., Ahmedabad, India]. Potassium ferricyanide [Qualigens Fine Chemicals, India], Trichloroacetic acid (TCA) and Iron (III) chloride ( $\text{FeCl}_3$ ) [E. Merck India Ltd., India]. Gallic acid and tannic acid [Tetrahedron Ltd., India]. Chlorogenic acid [Sigma].

UV/VIS spectrophotometer (Shimadzu 2450) and CAMAG Linomat V Automatic Sample Spotter Camag (Muttentz, Switzerland).

### 2.2 Extraction of *Inula cappa* roots

Roots of *I. cappa* were collected from Nepal in March 2005. The sample was authenticated and a voucher specimen (No. 153) was preserved in the Phytochemistry and Pharmacognosy department, L. M. College of pharmacy, Ahmedabad. 100 g dried root powder was extracted with methanol (2 x 500 ml) in a Soxhlet extractor for 6 h. The pooled extract was evaporated under vacuum to dryness, yielding 7.8 g of brown solid (extract A), which was used for the phytochemical screening. Further, the solid was taken up in water (100 ml) and was fractionated with ethyl acetate (3 x 100 ml) to yield on evaporation of solvent 2.5 g ethyl acetate soluble extract (extract A1). The remaining aqueous extract was dried in vacuum to yield 3.0 g aqueous fraction (extract A2). These extracts were used for antioxidant activity.

### 2.3 Estimation of total phenolics

The total phenolic content of the extract was estimated according to the method described by Singleton and Rossi<sup>11</sup>.

From the stock solution (1 mg/ml) of the methanolic extract, suitable quantity was taken into a 25 ml volumetric flask and mixed with

adecuada en un matraz volumétrico de 25 ml y se mezcló con 10 ml de agua y 1,5 ml de reactivo de Folin Ciocalteu. Transcurridos 5 minutos, se añadieron 4 ml de solución de carbonato sódico al 20 % (p/v) y se completó el volumen hasta 25 ml con agua bidestilada. Se registró la absorbancia a 765 nm después de 30 min. El porcentaje de fenoles totales se calculó a partir de la curva de calibración del ácido gálico (50 – 250  $\mu$ g) trazada mediante el mismo procedimiento, y los fenoles totales se expresaron como % del ácido gálico.

#### 2.4 Estimación de taninos totales<sup>12</sup>

Se hirvieron 2 g de polvo de raíz desengrasado durante 2 h en 300 ml de agua bidestilada, se enfriaron, se diluyó hasta 500 ml y se filtró. Tras añadir 20 ml de solución índigo y 750 ml de agua bidestilada a 25 ml de esta infusión, se tituló con solución  $\text{KMnO}_4$  estándar hasta que la solución azul se volvió de color amarillo dorado. De forma similar, se efectuó una titulación sustituyendo el extracto con agua destilada.

Cada ml de 0,1 N  $\text{KMnO}_4 \cong 0.004157$  g de taninos totales

#### 2.5 Estimación de flavonoides totales<sup>13</sup>

Se extrajo 1 g de polvo de raíz de *I. cappa* con 25 ml de etanol al 95% agitándolo a 200 RPM durante 24 h. Después de la filtración, se ajustó el filtrado a 25 ml con etanol al 80%. Se mezclaron 0,5 ml de este extracto con 1,5 ml de etanol al 95 %, 0,1 ml de cloruro de aluminio al 10 %, 0,1 ml de acetato potásico 1M y 2,8 ml de agua destilada. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 30 min., se midió la absorbancia de la mezcla de reacción a 415 nm con un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A. El 10% de cloruro de aluminio se substituyó por la misma cantidad de agua destilada sin aditivos.

#### 2.6 Actividad de barrido de los radicales libres

##### 2.6.1 Ensayo de la actividad antirradicales

La actividad antirradical se midió mediante el descenso provocado por la muestra en la ab-

10 ml of water and 1.5 ml of Folin Ciocalteu's reagent. After 5 min, 4 ml of 20 % (w/v) sodium carbonate solution was added and volume was made up to 25 ml with double distilled water. The absorbance was recorded at 765 nm, after 30 min. Percentage of total phenolics was calculated from calibration curve of gallic acid (50 – 250  $\mu$ g) plotted by using the same procedure and total phenolics were expressed as % gallic acid.

#### 2.4 Estimation of total tannins<sup>12</sup>

2 g of defatted root powder was boiled for 2 h with 300 ml of double distilled water, cooled, diluted up to 500 ml and filtered. After adding 20 ml indigo solution and 750 ml double distilled water to 25 ml of this infusion, it was titrated with standard  $\text{KMnO}_4$  solution, until blue solution turned to golden yellow in color. Similarly, a blank titration was carried out by replacing the extract with distilled water.

Each ml of 0.1 N  $\text{KMnO}_4 \cong 0.004157$  g of total Tannins

#### 2.5 Estimation of total flavonoids<sup>13</sup>

1 g of root powder of *I. cappa* was extracted with 25 ml of 95% ethanol under 200 RPM shaking for 24 h. After filtration, the filtrate was adjusted to 25 ml with 80% ethanol. 0.5 ml of this extract was mixed with 1.5 ml of 95 % ethanol, 0.1 ml of 10 % aluminium chloride, 0.1 ml of 1M potassium acetate and 2.8 ml of distilled water. After incubation at room temperature for 30 min, the absorbance of the reaction mixture was measured at 415 nm with Shimadzu UV-160A spectrophotometer. The amount of 10% aluminium chloride was substituted by the same amount of distilled water in blank.

#### 2.6 Free radical scavenging activity

##### 2.6.1 Assay for antiradical activity

Antiradical activity was measured by a decrease in absorbance at 516 nm of a methanolic solution of colored DPPH brought about by the sample<sup>14</sup>. A stock solution of DPPH (1.3 mg/ml methanol) was prepared such that 75  $\mu$ l of it

sorbancia a 516 nm de una solución metanólica de DPPH<sup>14</sup>. Se preparó una solución de almacenamiento de DPPH (1,3 mg/ml de metanol) de manera que 75  $\mu$ l de ella en 3 ml de metanol dieran una absorbancia inicial de 0,9. Esta solución de almacenamiento se utilizó para medir la actividad antirradicales. Se observó un descenso de la absorbancia en presencia de distintas concentraciones de los extractos de raíz de *I. cappa* tras 15 min. EC<sub>50</sub> se calculó a partir de la inhibición porcentual. Como control positivo se utilizó pirogallol.

#### 2.6.2 Estudio de la actividad de barrido de radicales superóxido

El estudio se basó en la capacidad de los extractos de raíz de *I. cappa* para inhibir la formación de formazones mediante el barrido de los radicales superóxido generados en un sistema riboflavina-luz-NBT<sup>15</sup>. La mezcla de reacción contenía 50 mM de tampón fosfato pH 7.6, 20  $\mu$ g de riboflavina, 12 mM EDTA y NBT 0,1 mg/3 ml, añadidos en ese orden. Para iniciar la reacción se iluminó la mezcla con distintas concentraciones de extractos de raíz durante 90 seg. Inmediatamente después, se midió la absorbancia a 590 nm. Como control positivo se utilizó ácido ascórbico.

#### 2.6.3 Medición de la capacidad reductora

La capacidad reductora de los extractos de raíz se midió mediante la transformación de Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup> en presencia de los extractos a 700 nm. El aumento de absorbancia de la mezcla de reacción indicó un aumento de poder reductor<sup>15</sup>. En 1 ml de agua se mezclaron distintas concentraciones de extractos con 2,5 ml de tampón fosfato y 2,5 ml de ferrocianuro potásico. Después de una incubación a 50 °C durante 20 min., se añadieron 2,5 ml de ácido tricloroacético y se centrifugó la mezcla a 3000 RPM durante 10 min. Por último, se mezclaron 2,5 ml de la solución de la capa superior con 2,5 ml de agua destilada y 0,5 ml de solución de FeCl<sub>3</sub>, y se midió la absorbancia a 700 nm. El aumento de absorbancia de la mezcla de reacción indicó un aumento del poder reductor. Como controles positivos se utilizaron ácido gálico y ácido tánico.

in 3 ml methanol gave an initial absorbance of 0.9. This stock solution was used to measure the antiradical activity. Decrease in the absorbance in the presence of different concentrations of the extracts of *I. cappa* root was noted after 15 min. EC<sub>50</sub> was calculated from % inhibition. Pyrogallol was used as positive control.

#### 2.6.2 Assay for superoxide radical scavenging activity

The assay was based on the capacity of the extracts of *I. cappa* root to inhibit formazon formation by scavenging the superoxide radicals generated in riboflavin-light-NBT system<sup>15</sup>. The reaction mixture contained 50 mM phosphate buffer pH 7.6, 20  $\mu$ g riboflavin, 12 mM EDTA, NBT 0.1 mg/3 ml, added in that sequence. Reaction was initiated by illuminating the reaction mixture with different concentrations of root extracts for 90 sec. Immediately after illumination, the absorbance was measured at 590 nm. Ascorbic acid was used as positive control.

#### 2.6.3 Measurement of reducing power

The reducing capability of the root extracts was measured by the transformation of Fe<sup>3+</sup> to Fe<sup>2+</sup> in the presence of the extracts at 700 nm. Increased absorbance of the reaction mixture indicated increased reducing power<sup>15</sup>. Different concentrations of extracts in 1ml of water were mixed with 2.5 ml of phosphate buffer and 2.5 ml of potassium ferricyanide. After incubating at 50°C for 20 min, 2.5 ml of trichloroacetic acid was added and the mixture was centrifuged at 3000 RPM for 10 min. Finally, 2.5 ml of upper layer solution was mixed with 2.5 ml distilled water and 0.5 ml of FeCl<sub>3</sub> solution and the absorbance was measured at 700 nm. Increased absorbance of the reaction mixture indicated increased reducing power. Gallic acid and tannic acid were used as positive controls.

#### 2.6.4 Estimation of lipid peroxidation

Rat liver homogenate (10% w/v) was prepared according to the procedure described by Tripathi et. al.<sup>16</sup>. Peroxidation was induced in liver tissue by Iron- ADP complex in the presence of ascorbic acid. The incubation medium constituted 0.5 ml of liver homogenate (10 % w/v), 100  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>,



#### 2.6.4 Estimación de la peroxidación lipídica

El homogeneizado de hígado de rata (10% p/v) se preparó según el procedimiento descrito por Tripathi et. al.<sup>16</sup>. La peroxidación se indujo en el tejido hepático mediante complejo hierro - ADP en presencia de ácido ascórbico. El medio de incubación constituía 0.5 ml del homogeneizado de hígado (10 % p/v), 100  $\mu$ M de FeCl<sub>3</sub>, 1.7  $\mu$ M de ADP, 500  $\mu$ M de ascorbato y distintas concentraciones de extractos en 2 ml de medio de incubación total. El medio se incubó durante 20 min. a 37 °C. El grado de peroxidación lipídica se midió mediante la estimación del contenido de malondialdehído (MDA). Los resultados se expresaron en términos de descenso en la formación de MDA en presencia de extractos de muestra. Como control positivo se utilizó  $\alpha$ -tocoferol acetato.

#### 2.7 Cuantificación de los compuestos de marcador mediante HPTLC

##### 2.7.1 Condiciones de la TLC.

Placa : Placa de TLC con revestimiento primario de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> (E. Merck) (0,2 mm de grosor)

Analizador de manchas : Analizador de manchas de muestras automático CAMAG Linomat V

Cámara de desarrollo: cámara de doble paso de cristal CAMAG (20 x 10 cm)

Escáner : Escáner CAMAG TLC Scanner 3 y software WINCATS

Condiciones experimentales: Temperatura 25  $\pm$  2 °C, humedad relativa 40 %

Sistema disolvente : Acetato de etilo: ácido acético glacial: ácido fórmico: agua (10 : 1,1 : 1,1 : 2,6)

##### 2.7.2 Preparación de la solución de muestra

Se extrajo exhaustivamente 1,0 g de polvo de raíz de *I. cappa* con metanol (4 x 25 ml) y el extracto se filtró y se combinó, y el extracto combinado se concentró en vacío, completándose el volumen hasta 25 ml en un matraz volumétrico.

1.7  $\mu$ M ADP, 500  $\mu$ M of ascorbate and different concentrations of extracts in 2 ml of total incubation medium. The medium was incubated for 20 min at 37 °C. Extent of lipid peroxidation was measured by estimation of malondialdehyde (MDA) content. Results were expressed in terms of decrease in MDA formation in presence of sample extracts.  $\alpha$ -tocopherol acetate was used as positive control.

#### 2.7 Quantification of marker compounds by HPTLC

##### 2.7.1 TLC Conditions.

Plate : Precoated silica gel 60 F<sub>254</sub> TLC plate (E. Merck) (0.2 mm thickness)

Spotter : CAMAG Linomat V Automatic Sample Spotter

Developing chamber : CAMAG glass twin trough chamber (20 x 10 cm)

Scanner : CAMAG TLC Scanner 3 and WINCATS software

Experimental conditions: Temperature 25  $\pm$  2 °C, relative humidity 40 %

Solvent system : Ethyl acetate: glacial acetic acid: formic acid: water (10 : 1.1 : 1.1 : 2.6)

##### 2.7.2 Preparation of sample solution

1.0 g of root powder of *I. cappa* was extracted exhaustively with methanol (4 x 25 ml) and the extract was filtered, pooled and the combined extract was concentrated under vacuum and volume was made up to 25 ml in a volumetric flask.

##### 2.7.3 Preparation of standard solutions

*Standard solution of chlorogenic acid:* A stock solution of chlorogenic acid (80  $\mu$ g/ml) was prepared in methanol by dissolving 2 mg of chlorogenic acid in 25 ml methanol.

##### 2.7.4 Calibration curve

*Calibration curve for chlorogenic acid:* 10  $\mu$ ml each of the standard solutions containing 160 to 280  $\mu$ g/ml chlorogenic acid were applied in triplicate on a TLC plate. The plate was developed in a mobile phase, Ethyl acetate: glacial acetic acid: formic acid: water (10: 1.1: 1.1: 2.6)<sup>17</sup> and scanned at 330 nm. Calibration curve of chloro-

### 2.7.3 Preparación de las soluciones estándar

*Solución estándar de ácido clorogénico:* Se preparó una solución de almacenamiento de ácido clorogénico (80 µg/ml) en metanol, disolviendo 2 mg de ácido clorogénico en 25 ml de metanol.

### 2.7.4 Curva de calibración

*Curva de calibración del ácido clorogénico:* 10 µ. Se aplicaron por triplicado en una placa de TLC cada una de las soluciones estándar con un contenido de entre 160 y 280 µg/ml de ácido clorogénico. La placa se desarrolló en una fase móvil, acetato de etilo: ácido acético glacial: ácido fórmico: agua (10: 1,1: 1,1: 2,6)<sup>17</sup> y se escanearon a 330 nm. La curva de calibración del ácido clorogénico se preparó trazando las áreas pico en relación a la concentración.

### 2.7.5 Cuantificación del ácido clorogénico en las raíces de *I. cappa*

10 µl de la solución de muestra se aplicaron por triplicado en una placa de TLC previamente recubierta de gel de sílice 60 F<sub>254</sub>. La placa se desarrolló en el sistema de disolvente de acetato de etilo: ácido acético glacial: ácido fórmico: agua (10: 1,1 : 1,1: 2,6) y se escaneó a 330 nm de la forma indicada anteriormente. Se registraron las áreas pico y los espectros de absorción. Para el cálculo de la cantidad de ácido clorogénico de la muestra se utilizó la curva de calibración.

### 2.7.6 Validación del método.

Para la validación del procedimiento analítico se siguieron las indicaciones de ICH (CPMP/ICH/381/95; CPMP/ICH/281/95). Se validaron la precisión, reproducibilidad y exactitud del método. Para comprobar la precisión del instrumental se escaneó siete veces la misma mancha de ácido clorogénico y se expresó como coeficiente de varianza (% CV). La repetibilidad del método se confirmó mediante el análisis de 200 ng/macha de ácido clorogénico tras la aplicación sobre la placa de TLC (n = 5) y se expresó como % CV.

Para comprobar la exactitud del método se efectuaron estudios de recuperación en tres niveles (adición de 50%, 100% y 125%). Se calcularon los porcentajes de recuperación y recuperación media. Para la evaluación de los límites de detección y

genic acid was prepared by plotting peak areas vs. concentration.

### 2.7.5 Quantification of chlorogenic acid in the roots of *I. cappa*

10 µl of the sample solution was applied in triplicate on a pre-coated silica gel 60 F<sub>254</sub> TLC plate. The plate was developed in the solvent system of Ethyl acetate: glacial acetic acid: formic acid: water (10 : 1.1 : 1.1: 2.6) and scanned at 330 nm as mentioned above. The peak areas and absorption spectra were recorded. The amount of chlorogenic acid in the sample was calculated using the calibration curve.

### 2.7.6 Method validation.

ICH guidelines (CPMP/ICH/381/95; CPMP/ICH/281/95) were followed for the validation of the analytical procedure. The method was validated for precision, repeatability and accuracy. Instrumental precision was checked by repeated scanning of the same spot of chlorogenic acid seven times and was expressed as coefficient of variance (% CV). The repeatability of the method was affirmed by analyzing 200 ng/spot of chlorogenic acid after application on the TLC plate (n = 5) and was expressed as % CV.

Accuracy of the method was tested by performing recovery studies at three levels (50%, 100% and 125% addition). The percent recovery as well as average percent recovery was calculated. For the evaluation of limit of detection and limit of quantification different dilutions of the standard solution of chlorogenic acid were applied along with methanol as blank and determined on the basis of signal to noise ratio.

## 3. RESULTS

Preliminary phytochemical screening of the roots of *I. cappa* showed the presence of phenolics, flavonoids, tannins, terpenoids and coumarins (Table1). Subsequent quantification showed the presence of a high amount of total phenolics (2.27% w/w calculated as gallic acid), whereas total tannins and total flavonoids were found to be 0.42% and 0.26% respectively.

cuantificación se aplicaron distintas diluciones de la solución estándar de ácido clorogénico junto con metanol como blanco, y se determinaron en base a la relación señal-ruido.

### 3. RESULTADOS

El análisis fitoquímico preliminar de las raíces de *I. cappa* mostró la presencia de fenoles, flavonoides, taninos, terpenoides y cumarinas (Tabla 1). La cuantificación subsiguiente mostró la presencia de una elevada cantidad de fenoles totales (2,27% p/p calculados como ácido gálico), mientras que los taninos y flavonoides totales fueron 0,42% y 0,26% respectivamente.

**TABLA 1.** Análisis fitoquímico preliminar de las raíces de *Inula cappa*.  
**TABLE1.** Preliminary phytochemical screening of *Inula cappa* roots.

Grupo químico <i>Chemical group</i>	Observación <i>Observation</i>
Fenoles <i>Phenols</i>	+++
Flavonoides <i>Flavonoids</i>	+++
Esteroides/terpenoides <i>Steroids/terpenoids</i>	++
Taninos <i>Tannins</i>	++
Cumarinas <i>Coumarins</i>	++
Alcaloides <i>Alkaloids</i>	-
Antraquinonas <i>Anthraquinones</i>	-

+++ , Abundante; ++, Media; - , Ausente  
+++ , *Abundant*; ++, *Average*; - , *Absent*

#### 3,1 Actividad de barrido de los radicales DPPH

En el ensayo de DPPH, los extractos consiguieron reducir el radical libre estable DPPH a difenilpicrilhidrazina de color amarillo. Como se observa en la Tabla 2, ambos extractos, el A y el A1, presentaron una actividad de barrido del radical DPPH dependiente de la concentración, pero el extracto A1 presentó mayor actividad. Sin embargo, el extracto A2 no mostró ninguna actividad hasta concentraciones de 1000 µg/ml en este sistema de ensayo.

#### 3.1 DPPH radical-scavenging activity

In the DPPH test, the extracts were able to reduce the stable radical DPPH to the yellow-coloured diphenylpicrylhydrazine. As can be seen in Table 2, both the extracts, extract A and extract A1 exhibited a concentration-dependent DPPH radical scavenging activity but the extract A1 showed more potent activity. The extract A2 however did not show any activity up to a concentration of 1000 µg/ml in this assay system.



**TABLA 2.** Actividad antirradicales del extracto metanólico de raíz de *Inula cappa* observado con DPPH.  
**TABLE 2.** Antiradical activity of methanolic extract of *Inula cappa* roots observed with DPPH.

Muestra <i>Sample</i>	Concentración ( $\mu\text{g}$ ) <i>Concentration (<math>\mu\text{g}</math>)</i>	Inhibición porcentual* <i>% Inhibition*</i>	EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}$ ) <i>EC<sub>50</sub> (<math>\mu\text{g}</math>)</i>
Extracto metanólico <i>Methanolic extract</i>	20	5,09	116,64
	50	19,17	
	100	27,45	
	150	64,22	
	200	80,16	
	300	83,94	
Extracto de acetato de etilo <i>Ethyl acetate extract</i>	10	9,53	71,06
	20	25,47	
	30	47,01	
	50	58,52	
	100	84,43	
Pirogalol <i>Pyrogallol</i>			4,85

\* Media  $\pm$  SD (n=3)

\* Mean  $\pm$  SD (n=3)

### 3.2 Estudio de la actividad de barrido de radicales superóxido

La actividad de barrido de radicales superóxido de los extractos A y A1 aumentó con la concentración (Tabla 3). El valor de IC<sub>50</sub> del extracto metanólico y la fracción soluble de acetato de etilo de la fracción soluble fue de 297,28  $\mu\text{g}$  y 135,36  $\mu\text{g}$  respectivamente. El extracto A2 no presentó ninguna actividad.

### 3.2 Assay for superoxide radical scavenging activity

The superoxide radical scavenging activity of extract A as well as extract A1 increased with the increase in the concentration (Table 3). IC<sub>50</sub> value for methanolic extract and ethyl acetate soluble fraction was found to be 297.28  $\mu\text{g}$  and 135.36  $\mu\text{g}$  respectively. The extract A2 did not show any activity.

**TABLA 3.** Actividad de barrido de aniones superóxido del extracto de metanol de raíces de *Inula cappa* observada con un sistema de riboflavina-luz-NTB.

**TABLE 3.** Superoxide anion scavenging activity of methanolic extract of *Inula cappa* roots observed with a riboflavin-light-NBT system.

Muestra <i>Sample</i>	Concentración ( $\mu\text{g}$ ) <i>Concentration (<math>\mu\text{g}</math>)</i>	Inhibición porcentual* <i>% Inhibition*</i>	EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}$ ) <i>EC<sub>50</sub> (<math>\mu\text{g}</math>)</i>
Extracto metanólico <i>Methanolic extract</i>	10	8,91	297,28
	50	36,70	
	200	42,52	
	500	49,63	
	700	54,98	
	1000	56,60	
Extracto de acetato de etilo <i>Ethyl acetate extract</i>	10	28,7	135,36
	30	41,87	
	50	48,24	
	100	52,17	
	150	64,35	
	200	69,67	
	250	81,90	
300	83,19		
Ácido ascórbico <i>Ascorbic acid</i>			45,39

\* Media  $\pm$  SD (n=3)

\* Mean  $\pm$  SD (n=3)

### 3.3 Actividad reductora de hierro (III) a hierro (II)

Tanto el extracto A como el A1 tienen capacidad de reducción del hierro (III) y también de forma lineal dependiente de la concentración (Tabla 4).

### 3.3 Iron (III) to iron (II) reducing activity

Both extract A and extract A1 possessed the ability to reduce iron (III) and also in a linear concentration dependent manner (Table 4).

**TABLA 4.** Análisis de la capacidad reductora del extracto metanólico de raíz de *Inula cappa* medido mediante la transformación de Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup>.

**TABLE 4.** Reducing power assay of methanolic extract of *Inula cappa* roots measured by the transformation of Fe<sup>3+</sup> to Fe<sup>2+</sup>.

Muestra Sample	Concentración (µg) Concentration (µg)	absorbancia* Absorbance*
Extracto metanólico Methanolic extract	20	0,026 ± 0,006
	50	0,077 ± 0,001
	100	0,130 ± 0,002
	300	0,334 ± 0,008
	500	0,586 ± 0,009
	700	0,763 ± 0,004
	1000	0,987 ± 0,009
Extracto de acetato de etilo Ethyl acetate extract	20	0,078 ± 0,012
	50	0,179 ± 0,013
	100	0,238 ± 0,002
	150	0,388 ± 0,001
	200	0,492 ± 0,017
	300	0,706 ± 0,009
	400	1,018 ± 0,009
Estándar de ácido gálico Gallic acid standard	5	0,088 ± 0,008
	10	0,183 ± 0,001
	20	0,523 ± 0,031
	50	1,218 ± 0,015
Estándar de ácido tánico Tannic acid Standard	5	0,146 ± 0,019
	10	0,306 ± 0,008
	20	0,710 ± 0,010
	50	1,482 ± 0,034

\* Media ± SD (n=3)

\*Mean ± SD (n=3)

### 3.4 Inhibición de la peroxidación lipídica microsómica

Ambos extractos, A y A1, fueron equipotentes en la inhibición de la peroxidación lipídica de los microsomas de hígado. Pero, a diferencia de otros sistemas de ensayo, el extracto A presentó una mayor actividad en comparación con el extracto A1. Los valores de IC<sub>50</sub> para el extracto A y el extracto A1 fueron de 21,4 y 30,16 µg/ml, respectivamente (Tabla 5).

### 3.4 Inhibition of microsomal lipid peroxidation

Both, extract A and extract A1 were equipotent in inhibiting LPO of liver microsomes. But unlike other assay systems, extract A showed a better activity compared to extract A1. IC<sub>50</sub> values for the extract A and extract A1 were 21.4 and 30.16 µg/ml, respectively (Table 5).

**TABLA 5.** Inhibición con raíz de *Inula cappa* de la peroxidación lipídica inducida por un sistema de hierro/ADP/ascorbato en homogeneizado de hígado de rata.

**TABLE 5.** Inhibition of lipid peroxidation induced by iron/ADP/ascorbate system in rat liver homogenate by *Inula cappa* roots.

Muestra Sample	Concentración (µg) Concentration (µg)	Inhibición porcentual* % Inhibition*	EC <sub>50</sub> (µg) EC <sub>50</sub> (µg)
Extracto metanólico <i>Methanolic extract</i>	5	22,55	21,4
	10	34,64	
	20	43,65	
	30	53,13	
	40	61,35	
	50	71,75	
	100	84,59	
Extracto de acetato de etilo <i>Ethyl acetate extract</i>	5	25,23	30,79
	10	35,27	
	20	42,07	
	30	48,23	
	40	54,95	
	50	61,59	
	100	73,78	
	200	86,08	
?-Tocoferol <i>?-Tocopherol</i>			27,35

\* Media ±± SD (n=3)

\* Mean ±± SD (n=3)

### 3.5 HPTLC

En el método de densitometría TLC se observó que la mejor resolución de ácido clorogénico, evitando la interferencia de otros componentes de los extractos, se obtuvo en el sistema de disolvente acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (10: 1,1: 1,1: 2,6). La identidad del ácido clorogénico en los extractos se estableció comparando el valor de R<sub>f</sub> (0,55) con el compuesto estándar (Fig. 1), y superponiendo el espectro de absorción del compuesto estándar y el de la banda correspondiente de la pista de muestra (Fig. 2). La pureza de la banda respectiva debida al ácido clorogénico presente en la muestra se aseguró mediante la superposición de los espectros de absorción registrados en las posiciones inicial, media y final de la banda (Fig. 3). La relación lineal del ácido clorogénico se obtuvo en el rango de 160-280 ng/mancha con un coeficiente de correlación de 0,995. Se valoraron la precisión, repetibilidad y exactitud del método (Tabla 6). Los límites de detección y cuantificación fueron de 40 ng/mancha y 80

### 3.5 HPTLC

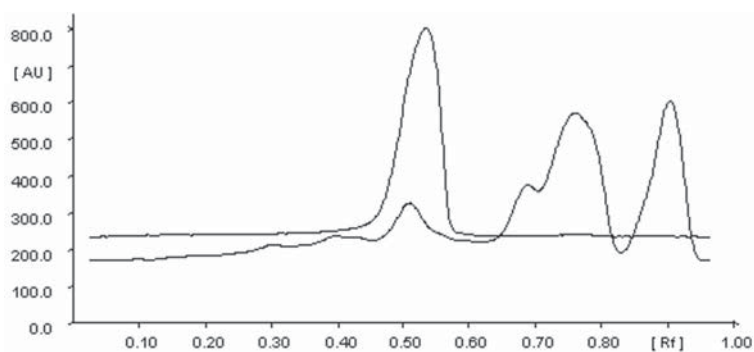
In the TLC densitometric method it was observed that the best resolution of Chlorogenic acid, avoiding interference from the other components of the extracts, was obtained in the solvent system of Ethyl acetate: formic acid: Glacial acetic acid: water (10: 1.1: 1.1: 2.6). The identity of chlorogenic acid in the extracts was established by comparing the R<sub>f</sub> (0.55) with the standard compound (Fig.1), and by overlay of the absorption spectra of the standard compound and that of the corresponding band in the sample track (Fig. 2). The purity of the respective band due to chlorogenic acid in the sample was ensured by overlay of the absorption spectra recorded at start, middle and end position of the band (Fig. 3). Linear relationship was obtained for chlorogenic acid in the range of 160-280 ng/spot with a correlation coefficient of 0.995. The method was validated in terms of precision, repeatability and accuracy (Table 6). The limit of detection and limit of quantification were found to be 40 ng/spot and 80 ng/spot respectively. The content

ng/mancha respectivamente. El contenido de ácido clorogénico estimado en la muestra de raíz de *I. cappa* fue de 0,047 %  $\pm$  0,0002. En los estudios de recuperación efectuados en tres niveles distintos, 50%, 100% y 125% de adición de compuesto marcador, el porcentaje de recuperación media obtenido fue de 100,42% (Tabla 7).

of chlorogenic acid estimated in the *I. cappa* root sample was found to be 0.047 %  $\pm$  0.0002. From the recovery studies that were carried out at three different levels i.e. 50 % addition, 100 % addition and 125 % addition of marker compound, the average percentage recovery obtained was 100.42% (Table 7).

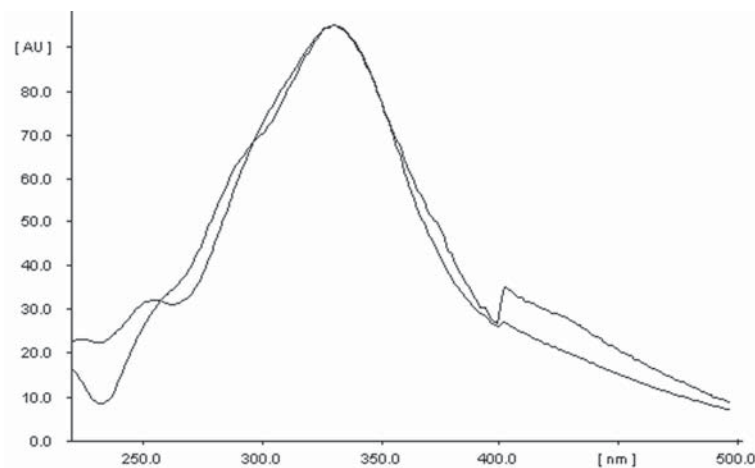
**FIGURA 1.** Cromatogramas de TLC densitométrica del extracto de raíz de *Inula cappa* con estándar de ácido clorogénico (2).

**FIGURE 1.** TLC densitometric chromatograms of extract of *Inula cappa* root with chlorogenic acid standard (2).



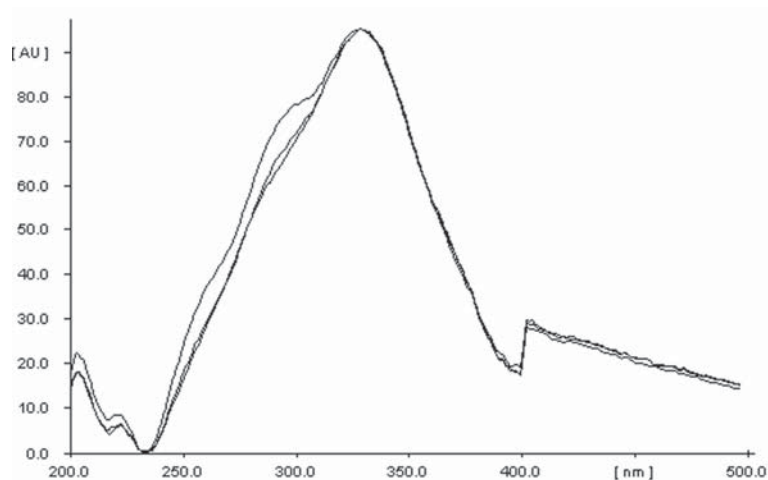
**FIGURA 2.** Superposición de los espectros de absorción del estándar de ácido clorogénico y las bandas correspondientes de la pista de muestra del extracto de raíz de *Inula cappa*.

**FIGURE 2.** Overlay of the absorption spectra of chlorogenic acid standard and the corresponding bands in the sample track of *Inula cappa* root extract.



**FIGURA 3.** Superposición de los espectros de absorción registrados en las posiciones inicial, media y final de la banda del ácido clorogénico en la pista de muestra del extracto de raíz de *Inula cappa*.

**FIGURE 3.** Overlay of the absorption spectra recorded at the start, middle and end position of the band of chlorogenic acid in the sample track of *Inula cappa* root extract



**TABLA 6.** Parámetros de validación del método para la cuantificación del ácido clorogénico.

**TABLE 6.** Method validation parameters for the quantification of Chlorogenic acid.

Parámetros <i>Parameters</i>	Ácido clorogénico <i>Chlorogenic acid</i>
Precisión instrumental (% CV) (n=7) <i>Instrumental Precision (% CV) (n=7)</i>	0,16
Repetibilidad <i>Repeatability</i>	1,26
Límite de detección <i>Limit of detection</i>	40 ng/mancha
Límite de cuantificación <i>Limit of quantification</i>	80 ng/mancha
Especificidad <i>Specificity</i>	Específica
Linealidad (coeficiente de correlación) <i>Linearity (correlation coefficient)</i>	0,995
Rango (ng/mancha) <i>Range (ng/spot)</i>	160-280 ng/mancha
Cantidad de ácido clorogénico encontrada en las raíces de <i>Inula cappa</i> (% p/p) <i>Amount of chlorogenic acid found in Inula cappa roots (%w/w)</i>	0,047 ± 0,0002

**TABLA 7.** Estudio de recuperación del ácido clorogénico mediante el método de HPTLC.

**TABLE 7.** Recovery study of Chlorogenic acid by HPTLC method.

Compuesto marcador <i>Marker compound</i>	Cantidad presente en la muestra (µg) <i>Amount present in the sample (µg)</i>	Cantidad añadida (µg) <i>Amount added (µg)</i>	Cantidad encontrada? (µg) <i>Amount found? (µg)</i>	Recuperación? (%) <i>Recovery? (%)</i>	Recuperación media (%) <i>Average recovery (%)</i>
Ácido clorogénico <i>Chlorogenic acid</i>	240	120	358,4 ± 1,32	99,50 ± 0,07	100,42
	240	240	486,2 ± 4,53	101,29 ± 0,49	
	240	300	542,6 ± 3,31	100,48 ± 0,58	

\* Media ±SD (n=3)

\* Mean ±SD (n=3)



#### 4. DISCUSIÓN

Se sabe que los compuestos fenólicos son potentes agentes antioxidantes. Dado que la *I. cappa* contiene una buena cantidad de fenoles totales (2,27%), se consideró de interés analizar su posible actividad antioxidante. La actividad antioxidante puede derivarse de la neutralización de los radicales libres que inician los procesos de oxidación o de la terminación de las reacciones en cadena de los radicales. Por esta razón se utilizaron los métodos de estimación de la actividad antioxidante mencionados anteriormente.

La acción de barrido de los radicales protón es un atributo importante de los antioxidantes, que se mide mediante el análisis de barrido de radicales DPPH. El método se basa en la reducción de la solución alcohólica de DPPH en presencia de un antioxidante donante de hidrógeno debida a la formación de la forma no radical DPPH-H mediante la reacción, lo que como resultado un cambio de color de púrpura a amarillo. Como se observa en los resultados, el extracto A1 presentó una mayor actividad en comparación con el extracto A. Además, el extracto A3 no presentó ninguna actividad, lo que indica que los compuestos con mayor actividad en el barrido de radicales en *I. cappa* son de polaridad media.

Los radicales de superóxido se generan durante el proceso fisiológico normal, principalmente en las mitocondrias. Aunque el anión superóxido es en sí mismo un oxidante débil, da lugar a los potentes y peligrosos radicales hidroxilo y a los singletes de oxígeno, que sí contribuyen al estrés oxidativo<sup>18,19</sup>. La capacidad de ambos extractos (A y A1) para barrer los radicales superóxido revela que estos extractos poseen una actividad superóxido similar a la dismutasa. No obstante, la actividad demostró ser menor que la actividad de barrido del ácido ascórbico en todos los rangos de dosificación. Es interesante observar que, al igual que en el experimento anterior, el extracto A1 tuvo una capacidad de barrido mayor que el extracto A, presentando una inhibición del 83% en concentraciones de 300 $\mu$ g/ml. Esto puede deberse al enriquecimiento de las sustancias fenólicas del extracto de acetato de etilo.

La actividad antioxidante de ambos extractos de *I. cappa*, (A y A1) puede relacionarse con su actividad reductora, es decir, con el desarrollo de reductonas, que se consideran terminadores de las reacciones en cadena de los radicales libres. La

#### 4. DISCUSSION

Phenolic compounds are known to be powerful antioxidant agents. Since *I. cappa* contains good amount of total phenolics (2.27%) it was thought of interest to screen it for its possible antioxidant activity. The antioxidant activity may result from the neutralization of free radicals initiating oxidation processes, or from the termination of radical chain reactions. For this reason, the above-mentioned methods of antioxidant activity estimation were used.

Proton-radical scavenging action is an important attribute of antioxidants, which is measured by DPPH radical scavenging assay. The method is based on the reduction of alcoholic DPPH solution in the presence of a hydrogen-donating antioxidant due to the formation of the non-radical form DPPH-H by the reaction resulting in a color change from purple to yellow. As seen from the results extract A1 exhibited a more potent activity compared to the extract A. Also extract A3 did not show any activity indicating that the compounds with strongest radical scavenging activity in *I. cappa* are of medium polarity.

Superoxide radicals are generated during the normal physiological process mainly in mitochondria. Although superoxide anion is by itself a weak oxidant, it gives rise to the powerful and dangerous hydroxyl radicals as well as singlet oxygen both of which contribute to the oxidative stress<sup>18,19</sup>. The capacity of both the extracts (A and A1) to scavenge superoxide radical reveals that these extracts possess superoxide dismutase like activity. Although the activity was found to be lower than scavenging activity of ascorbic acid in entire dosage ranges. It is interesting to note that, like previous experiment, extract A1 was found to be better scavenger than extract A, showing 83 % inhibition at a concentration of 300 $\mu$ g/ml. This might be due to the enrichment of the phenolic substances in the ethyl acetate extract.

The antioxidant activity of both the extracts of *I. cappa*, (extract A and A1) may relate to their reductive activity i.e. the development of reductones, which are reported to be terminators of free radical chain reactions. Table 4 indicates that both extract A and A1 have a significant reduction power when compared with standard reducing agents like gallic acid and tannic acid.

Tabla 4 indica que tanto el extracto A como el A1 tienen una capacidad reductora significativa en comparación con agentes reductores estándar como el ácido gálico y el ácido tánico.

La peroxidación lipídica ha sido ampliamente definida como el deterioro oxidativo de lípidos poliinsaturados<sup>20</sup>. El MDA y 4- hidroxinonenal son los principales productos resultantes de la peroxidación lipídica. El MDA se toma normalmente como marcador de la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo<sup>21</sup>. La disminución en la formación de MDA, indicada por una reducción de la absorbancia, indica la posible función de ambos extractos (A y A1) en la inhibición de la peroxidación lipídica. Además, resulta evidente a partir de los resultados que los compuestos que contribuyen a la actividad son de naturaleza comparativamente más polar, ya que el extracto A presentó una mayor actividad en comparación con el extracto A1.

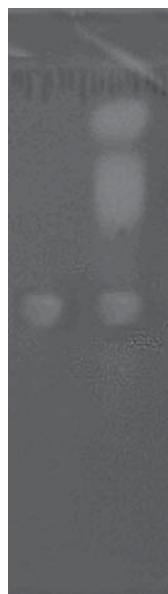
Uno de los compuestos que contribuyen a la actividad de la planta se identificó como ácido clorogénico (Fig. 4). El ácido clorogénico se descubre en esta planta por primera vez. Su presencia fue confirmada mediante TLC y la superposición de los espectros UV a una muestra de ácido clorogénico estándar. El método de TLC densitométrico desarrollado para la cuantificación del ácido clorogénico de las raíces de *I. cappa* demostró ser simple, preciso, exacto y fiable, y se puede utilizar para el control de calidad de las raíces de *I. cappa*. El aislamiento, la purificación y el mecanismo del ácido clorogénico y otros componentes de la *I. cappa* tienen interés para investigaciones adicionales que se realizarán en futuros estudios.

Lipid Peroxidation has been broadly defined as the oxidative deterioration of polyunsaturated lipids<sup>20</sup>. MDA and 4- hydroxynonenal are the major break down products of Lipid Peroxidation. MDA is usually taken as a marker of Lipid Peroxidation and oxidative stress<sup>21</sup>. The decrease in the MDA formation, shown by a decrease in the absorbance, indicates the possible role of both the extracts (A and A1) in inhibiting lipid peroxidation. Also, it is evident from the results that the compounds contributing towards the activity are comparatively more polar in nature as extract A showed a better activity compared to extract A1.

One of the compounds contributing to the activity of the plant was identified as Chlorogenic acid (Fig. 4). Chlorogenic acid is reported for the first time in this plant. It was confirmed by TLC and overlapping UV spectra with a standard chlorogenic acid sample. The TLC densitometric method developed for the quantification of chlorogenic acid from *I. cappa* roots was found to be simple precise, accurate and robust and can be used for quality control of *I. cappa* roots. The isolation, purification and mechanism of chlorogenic acid and other components of *I. cappa* are of interest for further investigation and will be carried out in future studies.

**FIGURA 4.** Perfil de TLC del extracto metanólico de *I. cappa* después de pulverizarlo con DPPH metanólico al 0,2%.

**FIGURE 4.** TLC profile of methanolic extract of *I. cappa* after spraying with 0.2% methanolic DPPH.



#### AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Dr. M. Rajani, Jefe y Director adjunto del Departamento de Fitoquímica y Farmacología, B. V. Patel PERD Centre, por proporcionar las instalaciones instrumentales, y al Dr. Sheetal Anandjiwala por su ayuda para la realización del ensayo.

#### ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank Dr. M. Rajani, Head and Assistant Director, Phytochemistry and Pharmacognosy Department, B. V. Patel PERD Centre, for providing the instrumental facilities and Dr. Sheetal Anandjiwala for the help in doing the assay.

#### BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Manandhar NP, An inventory of some vegetable drug resources of Makawanpur district Nepal. *Fitoterapia*. 1995; 66: 231-238.
2. Saxena VK, Saroj J, Archana S, Antibacterial activity of essential oil from the flowers of *Inula cappa*. *Indian Drugs*. 1981, 18, 33- 35.
3. Jain S, Saxena VK, Antibacterial activity of the essential oil from the leaves of *Inula cappa*. *Indian Drugs*. 1983; 20: 464 -466.
4. Taylor RSL, Hudson JB, Manandhar NP, Towers GHN, Antiviral activities of medicinal plants of southern Nepal. *J. Ethnopharmacol*. 1996; 53: 97-104.
5. Baruah NC, Sharma RP, Thyagarajan G, Herz W, Govindan SV, New Flavonoids from *Inula cappa*. *Phytochemistry*. 1979; 18: 2003-2006.
6. Bohlmann F, Ahmed M, Jakupovic J, Inositol angelates from *Inula cappa*. *Phytochemistry*. 1982; 21: 780-782.
7. Halliwell B, How to characterize an antioxidant: an update. In: Rice-Evans, C., Halliwell B, Lunt GG, (Eds.), *Free Radical and Oxidative Stress: Environments, Drugs and Food Additives*. Portland Press, 1995; pp. 73-102.
8. Breimer LH, Molecular mechanism of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage. *Mol. Carcinog*. 1990; 3: 188-197.
9. Bandoniene D, Murkovic M, On-line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L.). *J. Agric. Food. Chem*. 2002; 50: 2482-2487.
10. Fukumoto LR, Mazza G, Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem*. 2000; 48: 3597-3604.
11. Singleton VL, Rossi Jr JA, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic acid-phosphotungstic acid reagents.

- Am. J. Enol. Viticult. 1965; 16: 44–158.
12. William H, In: Official methods of analysis. Association of Official Agriculture Chemists, Washington DC, 1960; pp. 185.
  13. Woisky RG, Salatino A, Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. Journal of Apiculture Research, 1998; 37: 99–105.
  14. Navarro MC, Montilla MP, Martin A, Jimenez J, Utrilla MP, Free radical scavenger and antihepatotoxic activity of *Rosamarinus tomentosus*. Planta Med. 1993; 59: 312-314.
  15. Beauchamp C, Fridovich I, Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal. Biochem. 1971; 44: 276–287.
  16. Tripathi YB, Chaurasia S, Tripathi E, Upadhyay A., Dubey GP, *Bacopa monniera* Linn. as an Antioxidant: Mechanism of action. Indian J. Exp. Biol. 1996; 34: 523-526.
  17. Wagner H, Blatt S, In: Plant Drug Analysis- A Thin Layer Chromatography Atlas, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1996; pp. 210.
  18. Dahl MK, Richardson T., Photogeneration of superoxide anion in serum of bovine milk and in model systems containing riboflavin and amino acids. J. Dairy Sci. 1978; 61: 400–407.
  19. Meyer AS, Isaksen A, Application of enzymes as food antioxidants. Trends Food Sci. Tech. 1995; 6: 300–304.
  20. Kappus H, Lipid peroxidation—Mechanism and biological relevance. In: O. I. Aruoma, & B. Halliwell (Eds.), Free radicals and Food Additives. London: Taylor and Francis 1991.
  21. Janero D, Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Radic. Biol. Med. 1990; 9: 515–540.