

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład Farmakognozji i Leku Roślinnego

**Badania związków wielofenolowych w gatunku *Cistus × incanus* L.**

**The study of polyphenolic compounds in *Cistus × incanus* L.**

Rozprawa doktorska w oparciu o cykl publikacji naukowych

w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

w dyscyplinie nauki farmaceutyczne

mgr Aneta Starzec

Promotor: prof. dr hab. n. farm. Izabela Fecka

Promotor pomocniczy: dr n. farm. Maciej Włodarczyk

Wrocław 2023



## Spis treści

<b>STRESZCZENIE</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu</b> .....	9
<b>1. Wprowadzenie</b> .....	10
<b>2. Cel podjętych badań</b> .....	13
<b>3. Materiały i metody</b> .....	15
3.1. Materiał roślinny .....	15
3.2. Ekstrakcja i rozdzielanie polifenoli liści <i>C. incanus</i> w skali preparatywnej .....	18
3.3. Przygotowanie wyciągów wodno-metanolowych z <i>C. incanus</i> .....	18
3.4. Substancje wzorcowe i materiały odniesienia .....	19
3.5. Metody spektroskopowe i spektrometryczne .....	19
3.6. Metoda UHPLC-ESI-qTOF-MS .....	20
3.7. Metoda HPLC-DAD .....	20
3.8. Metody spektrofotometryczne do oceny ogólnej zawartości polifenoli i flawonoidów .....	21
3.9. Testy antyoksydacyjne .....	21
3.10. Test hamowania $\alpha$ -glukozydazy .....	22
3.11. Analiza statystyczna .....	22
<b>4. Najważniejsze wyniki i dyskusja</b> .....	23
4.1. Identyfikacja głównych polifenoli liści <i>C. incanus</i> .....	23
4.2. Zawartość polifenoli, elagotanoidów, flawonoidów i fenolokwasów w liściach <i>C. incanus</i> .....	26
4.3. Właściwości antyoksydacyjne .....	29
4.4. Potencjał hamowania aktywności $\alpha$ -glukozydazy .....	32
<b>5. Podsumowanie</b> .....	34
<b>6. Wnioski</b> .....	36
<b>7. Piśmiennictwo</b> .....	37
<b>Publikacje naukowe</b> .....	
<b>P1. Charakterystyka, potencjał leczniczy i prozdrowotny <i>Cistus × incanus</i> L. (Characteristics, therapeutic and health-promoting potential of <i>Cistus × incanus</i> L.)</b> .....	40
<b>P2. Isolation and structure elucidation of cistusins: a new ellagitannin from <i>Cistus × incanus</i> L. leaves</b> .....	59
<b>P3. Polyphenol profile of <i>Cistus × incanus</i> L. and its relevance to antioxidant effect and <math>\alpha</math>-glucosidase inhibition.</b> .....	68
<b>Oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład w powstanie prac</b> .....	87

<b>Dorobek BBL</b> .....	92
<b>OSIĄGNIĘCIA</b> .....	95

### **SPIS TABEL**

<b>Tabela I</b> Lista produktów <i>C. incanus</i> użytych w badaniach.....	15
<b>Tabela II</b> Korelacja pomiędzy składem chemicznym liści <i>C. incanus</i> a ich aktywnością antyoksydacyjną (mapa typu <i>heat</i> ).....	31

### **SPIS RYCIN**

<b>Rycina I</b> Abstrakt graficzny do publikacji <b>P3</b> . ....	14
<b>Rycina II</b> Struktury elagotanoidów T1 (punikalaginy, środek), T2 (terflawiny A, po lewej) i T3 (cystuzyny, po prawej). ....	25
<b>Rycina III</b> Potencjał hamowania $\alpha$ -glukozydazy przez wybrane polifenole <i>C. incanus</i> . ....	33



## STRESZCZENIE

*Cistus × incanus* L. (czystek szary) to wiecznie zielony krzew należący do rodziny *Cistaceae* szeroko rozpowszechniony w rejonie basenu Morza Śródziemnego. Od wielu lat przetwory z liści czystka szarego i jego aromatyczna żywica były stosowane w tradycyjnej medycynie Bliskiego Wschodu do leczenia zaburzeń żołądkowo-jelitowych, chorób zapalnych układu oddechowego i nerek, ran skórnych i in. Ponadto, w Maroku czystek był polecany w leczeniu cukrzycy. Obecnie *C. incanus* cieszy się wyjątkową popularnością, a jego liście lub szczyty pędów są szeroko wykorzystywane przez przemysł farmaceutyczny i spożywczy oraz polecane jako środek o działaniu antyoksydacyjnym, przeciwzapalnym, przeciwbakteryjnym, przeciwwirusowym, a także wspomagającym funkcjonowanie układu pokarmowego, oddechowego i odpornościowego. Z dostępnych źródeł naukowych wiadomo, że o jego aktywnościach decydują m.in. polifenole, w tym związki flawonoidowe, flawan-3-ole oraz garbniki, jednakże jego skład nie został w pełni poznany ani nie wskazano, które związki lub grupy związków są jednoznacznie odpowiedzialne za obserwowane działanie biologiczne.

Z tych powodów celem niniejszej pracy było przeprowadzenie szczegółowej analizy składu chemicznego liści *C. incanus* w zakresie polifenoli, w tym zidentyfikowanie i wyjaśnienie struktur związków o charakterze garbników hydrolizujących – elagotanoidów. Badania przeprowadzono w ujęciu jakościowym i ilościowym za pomocą technik chromatograficznych, spektroskopowych i spektrometrycznych. Dodatkowo w testach *in vitro* oceniono wybrane właściwości biologiczne potencjalnie związane z efektem przeciwcukrzycowym *C. incanus* i profilaktyką powikłań cukrzycy, tj. aktywność antyoksydacyjną oraz hamującą wobec  $\alpha$ -glukozydazy enzymu metabolizującego cukry złożone.

Badania własne wykazały, że liście czystka szarego są cennym źródłem związków polifenolowych, w szczególności elagotanoidów, których głównymi przedstawicielami były punikalagina, cystuzyna i terflawina A; flawonoidów, w tym glikozydów mirycetyny, kwercetyny i kemferolu; a także fenolokwasów reprezentowanych przez kwas galusowy i kwas elagowy. W efekcie badań skład polifenoli *C. incanus* został wzbogacony o nowy związek należący do garbników hydrolizujących – cystuzynę. Produkty zawierające liście czystka charakteryzowały się silnym działaniem antyoksydacyjnym w testach FRAP, ABTS i DPPH co było dodatnio skorelowane z zawartością flawonoidów, elagotanoidów i sumy polifenoli. Dodatkowo wykazano zdolność do hamowania  $\alpha$ -glukozydazy *in vitro* przez wyciągi z

*C. incanus* oraz jego indywidualne składniki, w śród których najwyższy efekt hamujący przypisano elagotanoïdom i produktom ich degradacji hydrolitycznej (jak kwas elagowy).

## ABSTRACT

*Cistus × incanus* L. is an evergreen shrub belonging to the *Cistaceae* family widely distributed in the Mediterranean region. For many years, preparations of *C. incanus* leaves and its aromatic resin have been used in traditional Middle Eastern medicine to treat gastrointestinal disorders, inflammatory diseases of the respiratory system and kidneys, skin wounds, etc. In addition, it was recommended in Morocco for the treatment of diabetes. Today, *C. incanus* is extremely popular, and its leaves or shoot tops are widely used by the pharmaceutical and food industries and recommended for its antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, as well as gastrointestinal, respiratory and immune system support. From available scientific sources, it is known that its activities are determined, among other things, by polyphenols, including flavonoid compounds, flavan-3-ols and tannins; however, its composition has not been fully described, nor has it been indicated which compounds or groups of compounds are clearly responsible for the observed biological effects.

For these reasons, the purpose of this study was to conduct a detailed analysis of the chemical composition of *C. incanus* leaves in terms of polyphenols, including the identification and elucidation of the structures of compounds with the nature of hydrolyzing tannins - ellagitannins. The study was carried out qualitatively and quantitatively using chromatographic, spectroscopic and spectrometric techniques. In addition, selected biological properties potentially related to the antidiabetic effect of *C. incanus* and prevention of diabetes complications, i.e. antioxidant activity and inhibitory activity against  $\alpha$ -glucosidase, an enzyme that metabolizes complex sugars, were evaluated in *in vitro* tests.

Our own research has shown that the leaves of *C. incanus* are a valuable source of polyphenolic compounds, in particular, ellagitannins, the main representatives of which were punicalagin, cistusins and terflavin A; flavonoids, including the glycosides myricetin, quercetin and kemferol; and phenolic acids represented by gallic acid and ellagic acid. As a result of the study, the composition of *C. incanus* polyphenols was enriched with a new compound belonging to hydrolyzing tannins - cistusins.

*C. incanus* products in our study showed strong antioxidant activity in FRAP, ABTS and DPPH tests which was positively correlated with the content of flavonoids, ellagitannins and total polyphenols. In addition, the ability to inhibit  $\alpha$ -glucosidase *in vitro* was demonstrated by *C. incanus* extracts and its individual components, among which the highest inhibitory effect was attributed to ellagitannins and their hydrolytic degradation products (such as ellagic acid).



## Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu

**P1. Aneta Starzec**, Maciej Włodarczyk, Iwona Urbanowicz, Izabela Fecka. Charakterystyka, potencjał leczniczy i prozdrowotny *Cistus × incanus* L. (Characteristics, therapeutic and health-promoting potential of *Cistus × incanus* L.). Farm. Pol. 2020, 76, 11, DOI: 10.32383/farmopol/132057

Pkt. MNiSW: 70,00

**P2.** Izabela Fecka, Maciej Włodarczyk, **Aneta Starzec**. Isolation and structure elucidation of cistusins: a new ellagitannin from *Cistus × incanus* L. leaves. Ind. Crop. Prod. 2020, 158, 112971 DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112971

Pkt. MNiSW/KBN: 200,00; IF: 5,645

**P3. Aneta Starzec**, Maciej Włodarczyk, Dominika Kunachowicz, Andrzej Dryś, Marta Kepinska, Izabela Fecka. Polyphenol profile of *Cistus × incanus* L. and its relevance to antioxidant effect and  $\alpha$ -glucosidase inhibition. Antioxidants 2023, 12, 553, <https://doi.org/10.3390/antiox12030553>

Pkt. MNiSW: 100,00; IF: 7,675

Sumaryczny współczynnik wpływu IF      za cykl: **13,320**      za całość dorobku: **18,247**

Punkty MNiSW      za cykl: **370** pkt.      za całość dorobku: **580** pkt.

## 1. Wprowadzenie

Czystek szary (*Cistus × incanus* L.) to wiecznie zielony krzew o liściach pomarszczonych, pokrytych obficie włoskami wydzielniczymi oraz pięciopłatkowych kwiatach przyjmujących kolory od jasnoróżowego do ciemnego fioletu. To naturalnie występujący gatunek makii w rejonach basenu Morza Śródziemnego i północno-zachodniej Afryki (1,2).

*C. incanus* należy do rodzaju *Cistus* L. z rodziny *Cistaceae* Juss. Taksonomia tego gatunku jest złożona, ze względu na występujący polimorfizm organów wegetatywnych i generatywnych oraz hybrydyzację pomiędzy spokrewnionymi gatunkami, co powoduje powstawanie licznych podgatunków. Przyjmuje się, że *C. incanus* jest mieszańcem *C. albidus* L. i *C. crispus* L. Wyróżnia się jego trzy podgatunki: *C. incanus* subsp. *incanus* (czystek szary), *C. incanus* subsp. *corsicus* (czystek korsykański) i *C. incanus* subsp. *creticus* (syn. *C. creticus*, czystek kreteński) (1,3). W piśmiennictwie *C. incanus* nazywany jest również różą skalną (ang. *rock-rose*, *pink rock-rose*) i różą świętą (ang. *holly rose*) (1,2).

Kwiaty, liście i łodygi czystka szarego zalicza się do surowców zielarskich i farmaceutycznych. Chociaż rośliny z tego gatunku nie są ujęte w Farmakopei Polskiej i Farmakopei Europejskiej a monografia *Cisti cretici herba* jest dopiero w trakcie przygotowania przez ekspertów Komitetu ds. Produktów Leczniczych Roślinnych (ang. *Committee on Herbal Medicinal Products*, HMPC) przy Europejskiej Agencji Leków (ang. *European Medicines Agency*, EMA), ich właściwości lecznicze były już znane w IV wieku p.n.e. Napary, wyciągi i balsam z czystka były używane głównie w tradycyjnej medycynie Bliskiego Wschodu, w szczególności w Turcji. Stosowano je w przeziębieniach i zaburzeniach żołądkowo-jelitowych, zwłaszcza w chorobie wrzodowej i bieguncie (1). Wykorzystywane były również jako środki przeciwbakteryjne i przeciwzapalne w stanach zapalnych skóry, reumatyzmie, chorobach zapalnych układu oddechowego i nerek (1,4). W Maroku różne gatunki z rodzaju *Cistus* stosowano także jako tradycyjny środek przeciwcukrzycowy (5).

Współcześnie *C. incanus* cieszy się coraz większą popularnością, co jest związane z licznymi doniesieniami naukowymi potwierdzającymi niektóre z tradycyjnych zastosowań czystka, a także ukazującymi nowe możliwości tego surowca. Czystek szary zalecany jest jako środek wspomagający w chorobach przewlekłych takich jak cukrzyca, choroby układu sercowo-naczyniowego i schorzenia neurodegeneracyjne (1). W wielu badaniach naukowych potwierdzono właściwości takie jak działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwgrzybicze, antyproliferacyjne i cytotoksyczne

(6–10). Od 2010 roku preparaty z czystka szarego i jego podgatunków polecane są przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. *European Food Safety Authority, EFSA*) jako bogate źródło związków o działaniu przeciwutleniającym, które poprawiają profil antyoksydacyjny organizmu i są wsparciem dla układu odpornościowego (11). Za prozdrowotne właściwości liści *C. incanus* odpowiadają głównie związki polifenolowe, jednakże pomimo dostępności danych piśmiennictwa naukowego pełna charakterystyka chemiczna czystka nie jest jeszcze znana.

Zawartość poszczególnych składników surowców roślinnych jest uzależniona od genotypu, warunków środowiskowych, miejsca pochodzenia i sposobu przechowywania po zbiorze (8,12). Dotychczasowe badania wykazały, że wśród polifenoli czystka występują związki flawonoidowe, w tym glikozydy flawonoli (mirycetyny, kwercetyny i kemferolu) oraz flawan-3-ole (pochodne katechiny i epikatechiny, proantocyjanidyny). Wśród związków nie-flawonoidowych występują garbniki hydrolizujące, przede wszystkim elagotanoidy (punikalina i punikalagina) oraz fenolokwasy takie jak kwas galusowy i kwas elagowy. Wszystkie gatunki rodzaju *Cistus* dostarczają olejek eteryczny oraz żywicę, zwaną *labdanum* lub *ladanum*, bogatą w związki terpenowe (głównie bicykliczne diterpeny typu labdanu) (1,2,8,12,13).

Uważa się, że brak równowagi pomiędzy antyoksydantami i prooksydantami w organizmie wiąże się silnie z występowaniem stresu oksydacyjnego i wzmożoną produkcją reaktywnych form tlenu (RTF lub ROS, ang. *Reactive Oxygen Species*). Te dwa czynniki odgrywają istotną rolę w procesach przyspieszonego starzenia organizmu i patogenezie niezakaźnych chorób przewlekłych, w szczególności chorób układu sercowo-naczyniowego, chorób wątroby i nerek, chorób neurodegeneracyjnych, dyslipidemii oraz cukrzycy typu 2 i jej powikłań naczyniowych. Związki o działaniu przeciwutleniającym mają zdolność do neutralizowania RTF i chelatowania metali przejściowych, przez co zmniejszają proces peroksydacji lipidów i pełnią funkcję ochronną dla białek i DNA przed szeregiem szkodliwych metabolitów (6,7,14). Badania przeprowadzone na zdrowych ochotnikach, którym regularnie podawano napar z czystka, wykazały obniżenie czynników ryzyka kardiometabolicznego, poprzez zmniejszenie stresu oksydacyjnego i poprawę profilu lipidowego, w tym zmniejszenie poziomu triglicerydów i dialdehydu malonowego oraz zwiększenie poziomu HDL-C (cholesterol frakcji HDL, ang. *High Density Lipoprotein*) (15).

Stres oksydacyjny i powiązany z nim stres karbonylowy są również skorelowane z nadmierną poposiłkową hiperglikemią (ang. *Post-prandial hyperglycemia, PPHG*), która jest jednym z

najważniejszych czynników rozwoju cukrzycy typu 2 – choroby wpływającej na zwiększenie śmiertelności na świecie i stanowiącej ogromny problem zdrowotny i ekonomiczny wielu krajów (16,17). Nadmierne wytwarzanie RFT i związków dikarbonylowych (np. glioksalu, metylglioksalu, dialdehydu malonowego) towarzyszy przewlekłym zaburzeniom metabolicznym jakim jest cukrzyca oraz powoduje uszkodzenie śródbłonna naczyniowego i powstawanie stanów zapalnych, co z kolei może prowadzić do rozwoju miażdżycy i zaburzeń sercowo-naczyniowych (17). Na podwyższoną zawartość glukozy we krwi po posiłku wpływa natomiast podaż węglowodanów w diecie oraz skuteczność działania enzymów biorących udział w metabolizmie polisacharydów i transporcie cukrów prostych. Kluczowe enzymy uczestniczące w tym procesie to hydrolazy glikozydowe -  $\alpha$ -amylaza i  $\alpha$ -glukozydaza (17,18). Zmniejszenie aktywności tych enzymów, a co za tym idzie, opóźnienie trawienia i wchłaniania węglowodanów w układzie pokarmowym może mieć terapeutyczne lub wspomagające właściwości w kontrolowaniu hiperglikemii (17). Inhibitorami  $\alpha$ -glukozydazy (enzymu rąbka szczoteczkowego rozkładającego oligosacharydy i disacharydy) stosowanymi w leczeniu jako środki hipoglikemizujące są akarboza i wogliboza. W piśmiennictwie naukowym istnieją doniesienia sugerujące, że wybrane wyciągi i związki roślinne, jak elagotanoid punikalagina, mogą mieć zdolność do hamowania hydrolaz glikozydowych. Niektóre z nich dotyczą gatunków z rodzaju *Cistus*, natomiast brak jest doniesień na temat takiego działania w odniesieniu do czystka szarego (17).

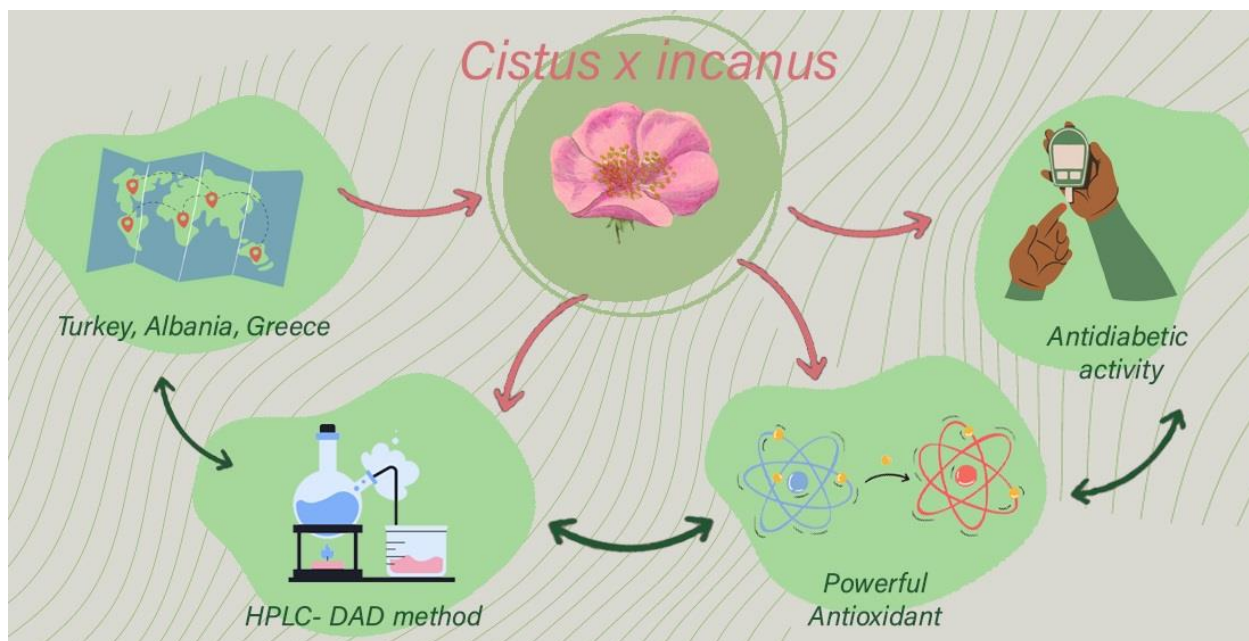
## 2. Cel podjętych badań

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było scharakteryzowanie składu chemicznego liści *C. incanus* w zakresie polifenoli, w szczególności uwzględniając wyodrębnienie i wyjaśnienie budowy związków o charakterze garbników hydrolizujących – elagotanoidów. Powyższy cel realizowano w ujęciu jakościowym i ilościowym za pomocą technik chromatograficznych, spektroskopowych i spektrometrycznych.

Dalsze cele obejmowały:

- standaryzację metody ekstrakcji polifenoli z liści czystka szarego do rutynowych oznaczeń laboratoryjnych;
- zweryfikowanie składu glikozydów flawonoidowych i kwasów fenolowych liści *C. incanus*;
- oznaczenie zawartości poszczególnych związków garbnikowych, flawonoidowych i fenolokwasów, a także ich sumy oraz zawartości polifenoli i flawonoidów ogółem w dostępnych surowcach roślinnych;
- porównanie zawartości polifenoli, garbników (głównie elagotanoidów), flawonoidów i fenolokwasów w materiale pochodzącym z różnych miejsc uprawy (m.in. Turcji, Albanii i Grecji);
- porównanie metod badawczych wykorzystywanych do oznaczeń zawartości polifenoli i flawonoidów w przetworach liści *C. incanus*.

Zaplanowano również ocenę niektórych właściwości biologicznych *in vitro* istotnych dla potencjalnego efektu przeciwcukrzycowego przetworów *C. incanus* i ochronnego przed powikłaniami cukrzycy, w tym aktywności antyoksydacyjnej oraz hamującej wobec  $\alpha$ -glukozydazy – enzymu metabolizującego cukry złożone (**Rycina I**). Na tym etapie wykorzystane będą indywidualne polifenole czystka szarego oraz wyciągi wodno-metanolowe z analizowanego materiału roślinnego. Metodami statystycznymi zbadany będzie związek między składem chemicznym a ocenianą aktywnością biologiczną.



**Rycina I** Abstrakt graficzny do publikacji **P3**.

### 3. Materiały i metody

#### 3.1. Materiał roślinny

Badaniom poddano 52 produkty zawierające liście lub szczyty pędów *C. incanus* dostępne komercyjnie w Polsce **Tabela I**. Wszystkie próbki *C. incanus* (po ok. 10 g) rozdrabniano i homogenizowano w młynku analitycznym A 11 basic (IKA, Polska) i przesiewano przez sito 0,355 mm (Multiserw–Morek, Polska).

W pracy **P2** (*Isolation and structure elucidation of cistusins: A new ellagitannin from Cistus × incanus L. leaves*), badany materiał były wysuszone liście *C. incanus* z firmy Herbapol Kraków S.A., Poland.

W pracy **P3** (*Polyphenol profile of cistus × incanus L. and its relevance to antioxidant effect and  $\alpha$ -glucosidase inhibition*), materiał badawczy stanowiły 52 produkty komercyjne (herbaty ziołowe) zawierające wysuszone liście lub szczyty pędów *C. incanus*. Produkty miały różnych producentów a surowiec roślinny pochodził z Turcji, Albanii, Grecji lub nie miały określonego miejsca uprawy.

**Tabela I** Lista produktów *C. incanus* użytych w badaniach.

	Nazwa	Producent	Pochodzenie	Forma
Ci1	Czystek suplement diety, susz ziołowy	Natura Wita	Albania	luzem
Ci2	Czystek suszone ziele - dziko rosnący	Astron	Turcja	luzem
Ci3	Czystek suszone ziele - dziko rosnący	Astron	Turcja	luzem
Ci4	Czystek suszone ziele - dziko rosnący	Oxalis	Turcja	luzem
Ci5	Ekologiczny czystek, herbatka ziołowa	Batom	Turcja	luzem
Ci6	Czystek liść, suplement diety	Vital Life	Turcja	luzem
Ci7	Ziele czystka, suplement diety	Flos	Nieznane	luzem
Ci8	Ziele czystka, suplement diety	Flos	Nieznane	luzem
Ci9	Czystek, herbatka ziołowa	Bioplanet	Turcja	luzem
Ci10	Czystek, suplement diety	MyVita	Turcja	luzem
Ci11	Czystek, herbatka ziołowa	Taheebo	Turcja	luzem
Ci12	Czystek	Mat-Wer	Turcja	luzem
Ci13	Czystek suszony	Intenson	Turcja	luzem
Ci14	Bio czystek pocięty	NatVita	Turcja	luzem
Ci15	Herbatka z czystka	Herbarium Św. Franciszka	Grecja	luzem

Ci16	Czystek, suplement diety	FitoApteka	Albania	luzem
Ci17	Czystek, herbatka ziołowa	Herbarium Św. Franciszka	Albania	torebki
Ci18	Czystek ziele fix, herbatka ziołowa	Herbapol Wrocław	Albania	torebki
Ci19	Czystek	Lord Nelson	Albania	torebki
Ci20	Czystek fix	Herbapol - Zielnik Apteczny	Nieznane	torebki
Ci21	Czystek	Zielnik DOZ	Nieznane	torebki
Ci22	Czystek	Herbarium	Albania	torebki
Ci23	Czystek, suplement diety	Vitax zioła	Albania	torebki
Ci24	Ziele czystka, suplement diety	Dary Natury	Turcja	torebki
Ci25	Czystek, suplement diety	Biofix	Nieznane	torebki
Ci26	Ziele czystka	Belin	Nieznane	torebki
Ci27	Czystek	Herbapol Zielnik Polski	Nieznane	torebki
Ci28	Czystek	Nieznana - kupowano na wagę	Nieznane	luzem
Ci29	<i>Cistus incanus</i>	Alfred Galke	Nieznane	luzem
Ci30	Czystek kretański	Astron	Grecja - Kreta	luzem
Ci31	Czystek suszony	Targroch	Turcja	luzem
Ci32	Ziele czystka	Flos	Nieznane	luzem
Ci33	Ziele czystka	Flos	Nieznane	luzem
Ci34	Czystek	Look Food	Albania	luzem
Ci35	Czystek	Zielnik DOZ	Nieznane	luzem
Ci36	Czystek	Lord Nelson	Nieznane	luzem
Ci37	Ekologiczny czystek	NaturAvena	Turcja	luzem
Ci38	Liść czystka	Farnvit - Tajemnica Mnicha	Turcja	luzem
Ci39	Czystek, suplement diety	Vita medicus	Albania	luzem
Ci40	Herbatka Ziołowa, Czystek	Piotr i Paweł Plus	Nieznane	torebki
Ci41	Czystek kretański	LuciVita	Grecja	luzem
Ci42	Czystek	Progressive, Agata Szurlej	Turcja	luzem
Ci43	Czystek	Farvit	Nieznane	torebki
Ci44	Czystek ekologiczny	Look Food	Albania	luzem
Ci45	Czystek ziele suszone	Kuchnie Świata S.A.	Turcja	luzem
Ci46	Czystek, suplement diety	AGNEX	Turcja	luzem
Ci47	Ekologiczne ziele czystka	Dary Natury	Turcja	luzem
Ci48	Ziele czystka	Flos	Nieznane	luzem
Ci49	Czystek, suplement diety	AGNEX	Turcja	luzem
Ci50	Czystek	Szczypta Natury	Turcja	luzem



Ci51	Ziele czystka	Flos	Nieznane	luzem
Ci52	Czystek liść	Herbapol Poznań	Nieznane	luzem

---

### 3.2. Ekstrakcja i rozdzielanie polifenoli liści *C. incanus* w skali preparatywnej

300 g wysuszonych liści *C. incanus* dwukrotnie homogenizowano w mieszaninie wody i acetonu (1:1, V/V; odpowiednio 3 i 1,5 L). Otrzymane ekstrakty wodno-acetonowe połączono, przefiltrowano i oddestylowano z nich aceton pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40°C (Rotavapor R-200; Büchi, Szwajcaria). Następnie pozostałość wodną poddano dalszemu zagęszczeniu metodą SPE (ekstrakcja do fazy stałej, ang. *Solid Phase Extraction*) i frakcjonowaniu metodą chromatografii kolumnowej na oktadecylu (kolumna szklana, 45 × 4 cm; Bakerbond Octadecyl 40 µm, 60 Å, Prep LC Packing; J.T. Baker, USA). Frakcjonowanie prowadzono z użyciem mieszanin wody i metanolu (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 3:7; V/V) oraz metanolu w gradiencie stopniowym, zbierając eluaty po 200 mL. Rozdzielanie polifenoli monitorowano za pomocą TLC na żelu krzemionkowym Si60 (fazy ruchome E – dla elagotanoidów, F – dla flawonoidów i P – dla kwasów fenolowych) i HPLC-DAD. Te o podobnych profilach chromatograficznych połączono, uzyskując 17 frakcji (Ci0 i CiI-CiXVI). Frakcja Ci0 była eluowana wodą, CiI-CiIII w mieszaninie woda-metanol 9:1, CiIV i CiV w 8:2, CiVI-CiIX w 7:3, CiX i CiXI w 6:4, CiXII-CiXIV w 5:5, CiXV w 3:7, a CiXVI metanolem. Uzyskane frakcje zagęszczono z użyciem wyparki próżniowej oraz metody SPE na krótkiej kolumnie C18 (szklana kolumna, 10 × 4 cm i.d.; Bakerbond Octadecyl 40 µm, 60 Å, Prep LC Packing;) i pozostawiono do wyschnięcia lub krystalizacji. Frakcje oczyszczano kolejno na kolumnach szklanych wypełnionych żelem Sephadex LH-20 prowadząc elucję mieszaninami metanolu i acetonu 2:8 (elagotanoidy) oraz metanolem (flawonoidy). Otrzymane związki oraz podfrakcje z pojedynczym składnikiem poddano dalszym analizom opisanym niżej (**P2** i **P3**).

### 3.3. Przygotowanie wyciągów wodno-metanolowych z *C. incanus*

Około 1 g homogennego materiału roślinnego zalano 50 mL 55% wodnego roztworu metanolu (V/V) i ogrzewano w łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną przez 15 min. po osiągnięciu temperatury wrzenia. Następnie ekstrakty dekantowano i sączono przez filtry Durapore 0,45 i 0,22 µm (Millipore, Merck, Niemcy). Stosunek materiału roślinnego do wytworzonego wyciągu (DER) wynosił 1:50. Wyciągi przygotowano w trzech powtórzeniach (**P3**).

### 3.4. Substancje wzorcowe i materiały odniesienia

Na potrzeby badań przygotowano odpowiednie roztwory wzorcowe wybranych związków polifenolowych dostępnych komercyjnie: mirycetyna, 3-*O*- $\alpha$ -ramnozyd mirycetyny (= mirycytryna), 3-*O*- $\beta$ -galaktozyd mirycetyny, kwercetyna, 3-*O*- $\alpha$ -ramnozyd kwercetyny (= kwercytryna), 3-*O*- $\beta$ -glukozyd kwercetyny (= izokwercytryna lub izokwercetyna), 3-*O*- $\beta$ -galaktozyd kwercetyny (= hiperozyd), 3-*O*- $\beta$ -glukuronid kwercetyny, kemferol, 3-*O*- $\beta$ -glukozyd kemferolu (= astragalina), 3-*O*- $\beta$ -glukuronid kemferolu, tilirozyd, kwas galusowy, kwas elagowy, (+)-katechina, (-)-epikatechina, procyjanidyny A2, B1, B2, C1. Szczegóły dotyczące producenta i klasy czystości tych substancji wzorcowych zawarte są w publikacjach **P2** i **P3**. Substancje takie jak cystuzyna, punikalagina, terflawina A zostały wyizolowane i opisane w **P2**; 3-*O*- $\beta$ -glukuronid mirycetyny został wyizolowany przez I. Fecką (19). Oznaczone związki wykazywały co najmniej 95% czystości chromatograficznej.

Podstawowe roztwory wzorcowe w stężeniu 1 mg/mL (*m/V*) sporządzono poprzez rozpuszczenie odważonej dokładnie substancji w odpowiedniej objętości metanolu lub DMSO (kwas elagowy). Przygotowano odpowiednie rozcieńczenia roztworów wzorcowych w zakresie 0,02; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 mg/mL (publikacje **P2** i **P3**) przez zmieszanie z 50% wodnym roztworem metanolu (*V/V*).

W analizie chromatograficznej jako materiał odniesienia wykorzystano *Cistus incanus hb. conc.* (Lot: 29594, 03.01.2018) oraz *Granati cort. fruct. conc.* (skórka granatu; Lot: 26131, 24.10.2016) firmy Alfred Galke GmbH (Niemcy).

### 3.5. Metody spektroskopowe i spektrometryczne

Wyizolowane związki oraz podfrakcje z dominującym pojedynczym składnikiem otrzymane metodą chromatografii kolumnowej z wodno-acetonowego wyciągu *C. incanus* (szczegółowy opis w publikacji **P2**) poddano badaniom HRMS, MS/MS oraz 1D- i 2D-NMR. Eksperymenty <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, HSQC, HMBC, COSY, DOSY i NOESY były wykonane w spektrometrach Bruker Avance (300 MHz) i Bruker Avance (600 MHz) (Bruker Biospin, Niemcy). Widma 1D i 2D-NMR garbników wykonano w deuterowanych rozpuszczalnikach D<sub>2</sub>O lub CD<sub>3</sub>OD, a polifenoli drobnocząsteczkowych w CD<sub>3</sub>OD lub DMSO-*d*<sub>6</sub>. Widma UV-Vis analizowano w wodzie i metanolu w spektrometrze Cecil CE 3021 (Cecil Instruments LTD, UK). Szczegóły dotyczące pozostałych warunków analiz spektroskopowych znajdują się w

publikacji **P2**, natomiast dla analizy ESI-qTOF-MS opisano poniżej oraz w publikacjach **P2** i **P3**.

Dane NMR były analizowane przy użyciu oprogramowania MestReNova 12 (Mestrelab Research, Hiszpania). Uzyskane wyniki porównano z piśmiennictwem naukowym oraz analogicznymi danymi dla autentycznych wzorców.

### **3.6. Metoda UHPLC-ESI-qTOF-MS**

Identyfikacje poszczególnych polifenoli w wyciągach wodno-metanolowych z badanego materiału roślinnego dokonano z pomocą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas (UHPLC-ESI-qTOF-MS). Rozdzielanie mieszanin związków polifenolowych prowadzono chromatografem cieczowym Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA) wyposażonym w detektory diodowy DAD (DAD-3000) i mas ESI-qTOF Compact (Bruker Daltonics, Niemcy), autosampler (WPS-3000TSL), termostat (TCC-3000SD), pompę (LPG-3400SD) oraz kolumnę oktadecylową Kinetex (150 × 2,1 mm; Ø 2,6 µm; Phenomenex, USA). Analizy wykonano w trybie jonów ujemnych, w zakresie skanowania  $m/z$  100-2200. Jako eluenty zastosowano 0,1% kwas mrówkowy w wodzie (V/V) i 0,1% kwas mrówkowy w acetonitrylu (V/V). Parametry walidacji, program gradientu i pozostałe dane techniczne metody opisano w publikacjach **P2** i **P3**. Otrzymane chromatogramy UHPLC, wraz z bazowymi i fragmentacyjnymi widmami mas, były analizowane przy użyciu oprogramowania Data Analysis 4.2 software (Bruker, Niemcy).

### **3.7. Metoda HPLC-DAD**

Ocenę ilościową polifenoli w ekstraktach wodno-metanolowych z liści *C. incanus* przeprowadzono z pomocą chromatografii cieczowej z detektorem diodowym (HPLC-DAD; Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, USA). Jako eluenty zastosowano 1,5% kwas mrówkowy w wodzie (V/V) i 1,5% kwas mrówkowy w acetonitrylu (V/V). Chromatogramy analizowano w trzech wybranych długościach światła UV: 254 nm dla flawonoli, kwasu elagowego i elagotanoidów; 280 nm dla flawan-3-oli i kwasu galusowego; 320 nm dla kumaroiloflawonoli. Otrzymane dane odczytano w programie Chromeleon 7 (Thermo Fischer Scientific, USA). Metodę HPLC-DAD przed przystąpieniem do rutynowych oznaczeń rewalidowano (materiały uzupełniające do **P3**; Tabela A7: Parametry walidacji metody HPLC-

DAD). Program gradientu i pozostałe parametry analizy chromatograficznej HPLC-DAD opisano w publikacji **P3**.

Dla każdego związku polifenolowego określono średnią zawartość (mg/g s.m.) w badanym materiale roślinnym (produkcie *C. incanus*) oraz odchylenie standardowe (SD). Dodatkowo dla grup produktów z surowcem roślinnym o różnym pochodzeniu obliczono średnią zawartość danego związku, SD, medianę, zawartość minimalną i maksymalną. Ze względu na brak autentycznych wzorców niektóre składniki obliczono z równań regresji dla związków pokrewnych. Ilość heksahydroksydifenoilglukozy (HHDP-glukoza) i punikaliny obliczono jako punikalaginę, 3-*O*-glukozyd mirycetyny i 3-*O*-arabinozyd mirycetyny jako 3-*O*-galaktozyd mirycetyny, *O*-arabinozyd kwercetyny jako 3-*O*-galaktozyd kwercetyny (hiperozyd), helichryzozyd i kumaroilotilirozyd jako tilirozyd. W obliczeniach uwzględniono różnice w masach cząsteczkowych. Sumy elagotanoidów (SET), kwasów fenolowych (SPA), flawonoidów (SF, flawonole+flawan-3-ole) i polifenoli (SPP) uzyskano sumując związki w każdej grupie.

### **3.8. Metody spektrofotometryczne do oceny ogólnej zawartości polifenoli i flawonoidów**

Zawartość polifenoli ogółem (TPC) oznaczono metodą Folina-Ciocalteu a zawartość flawonoidów ogółem (TFC) zgodnie z metodą Farmakopei Polskiej/Europejskiej dla *Betulae folium*. Szczegółowy opis procedur znajduje się w uprzedniej publikacji mojego współautorstwa (14). Pomiarzy przeprowadzono przy użyciu spektrofotometru Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, USA). Absorbancję mierzono przy długościach fal: 725 nm dla TPC i 420 nm dla TFC. Zawartość polifenoli ogółem wyrażono jako równoważnik (ekwiwalent) kwasu galusowego na gram suchej masy materiału roślinnego (mg GAE/g s.m.), zawartość flawonoidów ogółem jako równoważnik mirycetyny (mg ME/g s.m.). Szczegółowy opis metod znajduje się w publikacji **P3**.

### **3.9. Testy antyoksydacyjne**

Do oceny aktywności antyoksydacyjnej wyciągów wodno-metanolowych wykorzystano spektrofotometryczne testy ABTS, DPPH i FRAP. Wszystkie pomiary przeprowadzono przy użyciu spektrofotometru Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, USA). Absorbancję

mierzono przy następujących długościach fal: dla DPPH – 517 nm; dla ABTS – 734 nm i FRAP – 593 nm. Wyniki w testach ABTS i DPPH wyrażono jako procent zahamowania (% inhibicji) rodników oraz jako mM równoważnika (ekwiwalentu) kwasu galusowego na gram suchej masy materiału roślinnego (GAE/g s.m.). Wyniki z testu FRAP wyrażono jako mM Fe(II) na gram suchej masy materiału roślinnego i mM GEA/g s.m. Dokładny opis testów antyoksydacyjnych przedstawiono w publikacji **P3**.

### **3.10. Test hamowania $\alpha$ -glukozydazy**

Oznaczenie aktywności hamującej enzym  $\alpha$ -glukozydazę, przez wodno-metanolowe ekstrakty *C. incanus* oraz wybrane związki polifenolowe, przeprowadzono metodą spektrofotometryczną z użyciem *p*-NPG (4-nitrofenylo- $\alpha$ -D-glukopiranozyd). Wyniki odczytywano przy długości fali 405 nm w spektrofotometrze Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, USA). Jako pozytywną kontrolę zastosowano akarbozę. Wyniki wyrażono jako procent zahamowania (% inhibicji). Szczegółowy opis metody zawiera publikacja **P3**.

### **3.11. Analiza statystyczna**

Wartości średnie, maksymalne, minimalne, mediany i odchylenia standardowe dla wszystkich danych obliczano w programie Excel (Microsoft, USA). Analizę statystyczną wyników wykonano w programie Statistica (StatSoft, TIBCO Software Inc., USA).

Aby określić istotność różnic dla wyników otrzymanych w badaniach chromatograficznych i spektrofotometrycznych zweryfikowano hipotezy o normalności rozkładu danych za pomocą testu Shapiro-Wilka. Następnie przeprowadzono analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc LSD Fishera. Korelację między danymi sprawdzano za pomocą regresji liniowej i współczynnika korelacji rang Spearmana.

Istotność statystyczną dla wszystkich testów przyjęto jako  $p < 0,05$ .

## 4. Najważniejsze wyniki i dyskusja

Przed przystąpieniem do zaplanowanych badań laboratoryjnych dokonałam przeglądu piśmiennictwa naukowego odnoszącego się do składu chemicznego, właściwości leczniczych (lub prozdrowotnych) i tradycyjnego zastosowania liści *C. incanus*. Pod uwagę wzięłam badania biologiczne i farmakologiczne w modelach *in vitro* i *in vivo*. Zebrane dane (do roku 2020) opisałam i opublikowałam w pracy **P1**. Wiele z nich podkreśla potencjalnie terapeutyczne właściwości czystka szarego, a w szczególności jego działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe i antyproliferacyjne (1,4–7). Przetworom czystka przypisuje się również właściwości przeciwcukrzycowe, jednak dostępne badania w tym zakresie dotyczą głównie innych gatunków z rodzaju *Cistus*, np. *C. salviifolius* L. (20) i *C. laurifolius* L. (16). Wśród naukowych doniesień brakowało również pełnej charakterystyki składu polifenoli *C. incanus*, zarówno w ujęciu jakościowym jak i ilościowym. Dlatego, utrudnione jest wskazanie, które składniki lub grupy związków wpływają na obserwowane właściwości prozdrowotne lub lecznicze liści czystka oraz odpowiadają za jego aktywność antyoksydacyjną czy przeciwcukrzycową. Z tych powodów postanowiłam przeprowadzić badania, których wyniki uzupełniłyby zakres wiedzy o czystku szarym. Poszerzanie i promowanie informacji na temat właściwości *C. incanus* może w przyszłości przynieść korzyści dla zdrowia człowieka.

### 4.1. Identyfikacja głównych polifenoli liści *C. incanus*

*C. incanus* oraz przetwory przygotowane z tego surowca są źródłem składników biologicznie aktywnych, w tym przede wszystkim polifenoli. Jednak pełny skład chemiczny liści tego gatunku nie został jeszcze scharakteryzowany. Z dostępnych źródeł naukowych wiadomo, że przy użyciu metod chromatograficznych (LC-MS, LC-DAD, TLC) zostało zidentyfikowanych nieco ponad 30 związków (7,8,21,22). Szczególnie niewiele wiadomo na temat garbników hydrolizujących występujących w czystku szarym. Wittpahl i wsp. (8) zidentyfikowali i zaproponowali wstępnie struktury kilku elagotanoidów (izomerów heksahydroksydifenoiloglukozy, punikaliny i punikalaginy) na podstawie analizy jonów pseudomolekularnych i fragmentarycznych z eksperymentów LC-MS przeprowadzonych dla ekstraktów z *C. incanus*. W przytoczonej pracy opisane zostały również cztery izomery galusanu punikalaginy, których budowa nie została ostatecznie wyjaśniona. Dlatego te bliżej niescharakteryzowane pochodne punikalaginy stały się celem badań opisanych w publikacji **P2**.

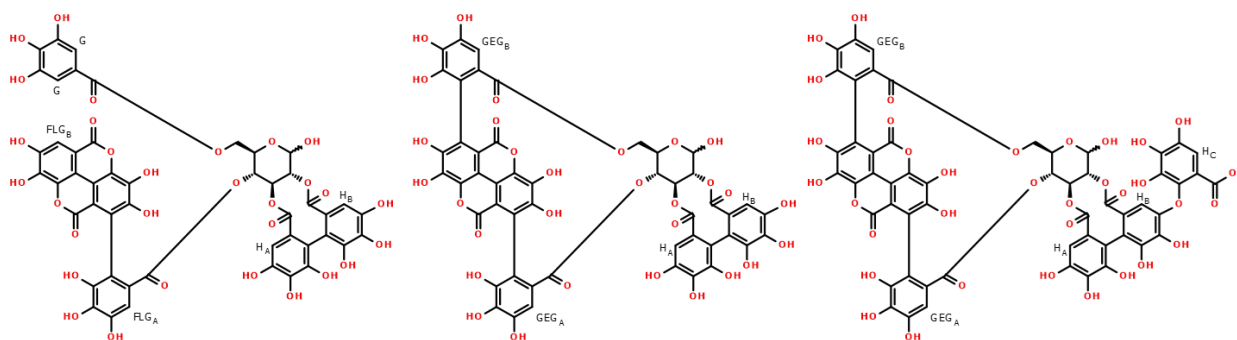
Dominujące polifenole *C. incanus* izolowano z wyciągu wodno-acetonowego metodą chromatografii kolumnowej z użyciem oktadecylu i mieszanin woda-metanol. Uzyskane frakcje Ci0, CiI-CiXVI zagęszczono (wyparka próżniowa, metoda SPE) i oczyszczano kolejno na kolumnach wypełnionych żelom Sephadex LH-20 prowadząc elucję mieszaninami acetonu i metanolu (elagotanoidy) oraz metanolu (flawonoidy). W ten sposób uzyskano 3 jednorodne elagotanoidy oznaczone jako T1–T3 (publikacja **P2**) i 7 glikozydów flawonoidowych (publikacja **P3**). Struktury wydzielonych polifenoli określono na podstawie analiz spektroskopowych i spektrometrycznych (HRMS, MS/MS, 1D i 2D-NMR, UV-Vis).

W badaniu własnym wśród wydzielonych elagotanoidów potwierdzono obecność wcześniej opisaną punikalaginy (T1) oraz nieznaną w tym gatunku terflawiny A (T2) i elagotanoidu T3 (określano dotychczas jako galusan punikalaginy), którego struktura nie była w pełni zdefiniowana. Struktury wyizolowanej punikalaginy i terflawiny A zostały wyjaśnione na podstawie danych spektroskopowych w porównaniu z odpowiednim piśmiennictwem (23–25).

Analiza HRMS, MS/MS, 1D i 2D-NMR dowiodła, że budowa elagotanoidu T3 jest inna niż sugerowano wcześniej (8). W badaniach przedstawionych w **P2** potwierdzono, że w T3 występuje dodatkowa jednostka kwasu galusowego, jednak połączona wiązaniem eterowym a nie estrowym z grupą heksahydroksydifenoilową (HHDP) cząsteczki punikalaginy (T1). Układ ten tworzy jednostkę acylującą znaną jako waloneoil. Na podstawie wnikliwej analizy spektroskopowej zaproponowano strukturę T3 (**Rycina II**) oraz nadano jej nazwę cystuzyna. Jest to nowy, wcześniej nie opisany, elagotanoid *C. incanus*.

Wszystkie wyizolowane elagotanoidy w roztworach wodnych i wodno-metanolowych dawały dwa piki na chromatogramach HPLC-DAD odpowiadające anomeroom  $\alpha$ - i  $\beta$ - w stanie równowagi. Zjawisko to jest charakterystyczne dla garbników z niepodstawionym hydroksylem w pozycji C-1 glukozy, co dodatkowo wspiera analizę NMR. **Rycina II** przedstawia wzory strukturalne wydzielonych elagotanoidów *C. incanus*.





**Rycina II** Struktury elagotanoidów T1 (punikalaginy, środek), T2 (terflawiny A, po lewej) i T3 (cystuzyny, po prawej).

Identyfikację pochodnych flawonoidowych *C. incanus* przedstawiono w publikacji **P3**. Z pomocą HRMS, MS/MS oraz z NMR zidentyfikowałam znane flawonole: 3-*O*-galaktozyd mirycetyny (= gmelinozyd I), 3-*O*-ramnozyd mirycetyny (= mirycytryna) i 3-*O*-arabinozyd mirycetyny. Spośród nich 3-*O*-galaktozyd mirycetyny był wcześniej wyizolowany przez Gürbuz i wsp. (26) z *C. salviifolius* i opisany przez Riehle i wsp. (27) w *C. incanus*. Nie potwierdzono natomiast dotychczas występowania w czystku szarym 3-*O*-arabinozydu mirycetyny. Inne pochodne mirycetyny obecne w badanym materiale to galusan *O*-heksozydu mirycetyny i nieokreślony *O*-pentozyd mirycetyny. Oznaczone glikozydy kwercetyny obejmowały 3-*O*-galaktozyd (= hiperozyd), 3-*O*-glukozyd (= izokwercytryna) i 3-*O*-ramnozyd (= kwercytryna). Spośród nich hiperozyd był wyizolowany wcześniej przez Gürbuz i wsp. (26) z *C. salviifolius* i opisany przez Wittpahl i wsp. (8) oraz Riehle i wsp. (27). Wśród pentozydów kwercetyny za główny izomer uznano 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopiranozyd ze względu na jego największą intensywność w tej grupie i wcześniejsze doniesienie o tym związku (26), a także na podstawie jego widma MS/MS typowego dla 3-*O*-podstawionych flawonoli. Kolejne pochodne, zidentyfikowano przez porównanie z materiałem odniesienia (z ekstraktem *Polygonum aviculare* L.), to 3-*O*-ksylozyd kwercetyny i awikularyna (= 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinofuranozyd kwercetyny). Podobnie jak w przypadku mirycetyny, wstępnie zidentyfikowano również galusan *O*-heksozydu kwercetyny. Wśród glikozydów kemferolu zaobserwowano dwa *O*-heksozydy, z których oba dały fragmenty MS/MS typowe dla 3-*O*-podstawionych flawonoli. Pierwszy zidentyfikowano, na podstawie wzorca zewnętrznego, jako astragalinę, natomiast drugi jako trifolinę (= 3-*O*- $\beta$ -D-galaktopiranozyd kemferolu) przez porównanie z wyciągiem z *Menyanthes trifoliata* L. W niewielkich ilościach obecny był także 3-*O*-pentozyd kemferolu. Ostatnią wyróżniającą się grupę flawonoli stanowiły estry z kwasem kumarowym (kumaroiloflawonole). Najbardziej intensywne jony pochodziły z pary izomerów

*E/Z*-tilirozydu (oznaczone w Tabeli A5, w materiałach dodatkowych do publikacji **P3**, jako izomery *b* i *c*, potwierdzone wzorcem) oraz analogu tilirozydu (prawdopodobnie 7-*O*-podstawiona pochodna, np. buddlenoid A lub analog z cząsteczką galaktozy zamiast glukozy). Na końcu chromatogramu zaobserwowano trzy dodatkowe małe piki odpowiadające *m/z* i fragmentacją estrom kumaroilowym tilirozydu. Kumaroilotilirozyd został wcześniej zasugerowany (lecz nie wyizolowany) przez Wittpahl i wsp. (8). Zaobserwowano również trzy piki o *m/z* 609 i wzorce fragmentacji analogicznym do tilirozydu, z wyjątkiem tego, że ich aglikonem (MS/MS) była kwercetyna lub jej izomer. Wstępnie opisano je jako helichryzoyd (potwierdzono z wyciągiem z *Helichrysum arenarium* (L.) Moench) i jego izomery, których wcześniej nie zidentyfikowano w czystku.

#### **4.2. Zawartość polifenoli, elagotanoidów, flawonoidów i fenolokwasów w liściach**

##### ***C. incanus***

W pracy **P3** obejmującej badanie składu chemicznego 52 komercyjnych produktów *C. incanus*, metodami chromatograficznymi UHPLC-ESI-qTOF-MS i HPLC-DAD, wykazano obecność 54 związków polifenolowych, w tym garbniki hydrolizujące – elagotanoidy (izomery HHDP-glukozy, punikaliny, punikalaginy, terflawiny A, cystuzyny), fenolokwasów (kwasu galusowego i kwasu elagowego oraz ich pochodnych glikozydowych), flawan-3-oli (katechiny, epikatechiny, galokatechiny, galusanu galokatechiny) oraz licznych flawonoidów (glikozydów mirycetyny, kemferolu i kwercetyny, opisane powyżej). Szczegółowy skład i nazwy zidentyfikowanych związków znajdują się w Tabeli A5 w materiałach dodatkowych do publikacji **P3**.

Przed przystąpieniem do badań zawartości polifenoli przeprowadzono optymalizację procesu ekstrakcji liści *C. incanus* (*Section A1: Standardization of the C. incanus extraction proces*, materiały dodatkowe do **P3**). Wyniki dla różnych metod ekstrakcji porównano testami statystycznymi T-studenta, U-Manna-Whitneya i Wilcoxona. Przy wyborze optymalnego rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (50%, 55%, 60%, 70% metanol, *V/V*) przeprowadzono analizę wariancji powtarzanych pomiarów dla rang Friedmana – ANOVA Friedmana. Zawartość polifenoli, flawonoidów, elagotanoidów i fenolokwasów oznaczono metodą HPLC-DAD. Dodatkowo określono zawartość polifenoli ogółem i flawonoidów ogółem z użyciem odpowiednich metod spektrofotometrycznych. Szczegółowe dane znajdują się w Tabelach 1 i 2 w publikacji **P3** i Tabeli A6 w materiałach dodatkowych. Za optymalną metodę ekstrakcji

polifenoli z liści *C. incanus* uznano wytrawianie rozdrobnionego materiału roślinnego 55% metanolem, na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną przez 15 min. po osiągnięciu temperatury wrzenia rozpuszczalnika ekstrakcyjnego.

Dalsze prace obejmowały przygotowanie wyciągów wodno-metanolowych z materiału roślinnego i oznaczenie zawartości poszczególnych związków i grup związków polifenolowych z zastosowaniem metod HPLC-DAD i spektrofotometrycznych.

Średnia zawartość sumy polifenoli (SPP), oznaczona metodą HPLC-DAD, w wodno-metanolowych ekstraktach *C. incanus* wynosiła 102 mg/g s.m. (zakres 54–229 mg/g) przy czym produkty pochodzenia Tureckiego charakteryzowały się najwyższą zawartością (124 mg/g) w porównaniu z produktami Greckimi (92 mg/g) i Albańskimi (80 mg/g). Różnice te były istotne statystycznie (szczegółowe dane w tabeli A10 i A11, Rycina A3 w materiałach dodatkowych do publikacji **P3**).

Główną grupą związków polifenolowych występującą w ekstraktach z liści *C. incanus* były elagotanoidy (SET, średnio 73 mg/g s.m), a wśród nich najwyższe wartości odnotowano dla punikalaginy (29 mg/g), następnie dla cystuzyny – 25 mg/g i terflawiny A – 14 mg/g. W mniejszych ilościach oznaczono HHDP-glukozę i punikalinę. Zaobserwowano, że różnice w występowaniu elagotanoidów między produktami zawierającymi surowiec roślinny różnego pochodzenia były statystycznie istotne, a produkty tureckie miały ich najwięcej – SET (94 mg/g) w porównaniu do pozostałych krajów, Grecji (64 mg/g) i Albanii (52 mg/g). Zawartość flawonoidów (SF) oszacowano na poziomie 18 mg/g s.m. w zakresie 12–23 mg/g. Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie dla produktów z materiałem roślinnym o odmiennym pochodzeniu. Flawan-3-ole (w tym katechina i epikatechina) występowały średnio w ilości ~1 mg/g. Flawonole były głównie reprezentowane przez glikozydy mirycetyny, kwercetyny i kemferolu. Najwyższe wartości otrzymano dla ramnozydów i galaktozydów, w szczególności dla mirycytriny 4 mg/g, hiperozydu 3 mg/g i 3-*O*-galaktozydu mirycetyny (poniżej 3 mg/g) oraz kumaroiloflawonoli w tym tilirozydu 2,4 mg/g i kumaroilotilirozydu 1,3 mg/g. Kolejną grupą polifenoli występujących w ekstraktach były kwasy fenolowe (SPA), których średnia zawartość wynosiła 11 mg/g s.m., a ich głównymi przedstawicielami były kwas galusowy i elagowy osiągające odpowiednio wartości 7 i 3 mg/g. We wszystkich produktach odnotowano podobne ilości tych związków (różnice nie były istotne statystycznie, Tabela A10, materiały dodatkowe do publikacji **P3**).

Danych piśmiennictwa dotyczących zawartości poszczególnych polifenoli w czystku szarym jest niewiele. We wcześniej wspomnianej pracy (8), autorzy oszacowali zawartość polifenoli ogółem, w wodno-metanolowych ekstraktach z czterech produktów czystka, na poziomie 9–30 mg/g s.m. Suma elagotanoidów, w przeliczeniu na kwas galusowy wahała się w zakresie od 4 do 15 mg/g, a zawartość flawonoidów wynosiła 5–15 mg/g s.m. (ekwiwalent rutyny). Wartości dla poszczególnych składników opisanych w przytoczonym badaniu są zdecydowanie niższe od tych oszacowanych w publikacji **P3**. Warto natomiast zaznaczyć, że punikalagina, tak samo jak w badaniu własnym, była dominującym składnikiem z grupy elagotanoidów. Dodatkowo autorzy otrzymali podobne wartości dla mirycytryny (~4 mg/g). Viapiana i wsp. (2) w swoich badaniach wodno-metanolowych ekstraktów czystka szarego, oznaczyli 14 związków polifenolowych w tym flawonoidy i kwasy fenolowe. Badacze otrzymali istotnie niższe wartości dla tych związków ale odnotowali podobną korelację pomiędzy zawartością polifenoli a krajem pochodzenia materiału roślinnego. Wskazali również, że wyższa zawartość związków aktywnych występuje w produktach tureckich i albańskich w porównaniu z pochodzącymi z Cypru lub o nieznanym pochodzeniu.

W tej samej publikacji (**P3**) oznaczono zawartość polifenoli ogółem (TPC) i flawonoidów ogółem (TFC). Średnia TPC dla wszystkich badanych próbek wyniosła 350 mg GAE/g s.m. (zakres 14–623 mg/g). Najwyższą wartość obserwowano dla produktów greckich (403 mg/g), natomiast ze względu na niereprezentacyjną ilość próbek (3) wynik ten może być niemiarodajny. Średnie dla próbek pochodzenia tureckiego i albańskiego wyniosły odpowiednio 354 mg/g i 328 mg/g. Odnotowane różnice nie były istotne statystycznie (Tabela A10, materiały dodatkowe do **P3**). Wartości TPC zbliżone do niniejszego badania otrzymali Gawel-Bęben i wsp. (7) dla 60% wodno-metanolowego wyciągu i metanolowego wyciągu z czystka szarego (269–347 mg/g). Zdecydowanie niższe wartości TPC otrzymano dla ekstraktów 30% (28), 50% (29) i 80% (2), w których zawartość polifenoli ogółem wynosiła odpowiednio 36–89 mg, 42–99 mg i 2–148 mg GAE/g s.m. Jednakże, podobnie jak w badaniu własnym zauważono, że produkty pochodzenia tureckiego charakteryzowały się większym TPC (84 mg/g), zwłaszcza w porównaniu z produktami zawierającymi surowiec roślinny niewiadomego pochodzenia, które były najuboższe w te związki (17 mg/g) (2). Średnią zawartość flawonoidów ogółem w badaniu własnym dla wszystkich próbek oszacowano na 40 mg ME/g s.m. Ponownie, produkty oparte o materiał roślinny turecki były najbogatsze w związki flawonoidowe (średnio 45 mg ME/g s.m.) w porównaniu do tych pochodzenia greckiego i albańskiego (odpowiednio 40 i 33 mg/g). Różnice w odnotowanych wartościach

były istotne statystycznie (Tabela A10, materiały dodatkowe do **P3**). W dostępnym piśmiennictwie naukowym wartości TFC przeliczane są zwykle na wybrane flawonole, np. kwercetynę lub rutynę, a ich wartość jest zazwyczaj niższa (2,30). Zbliżone wartości TFC dla ekstraktów z *C. incanus* otrzymali Gawel-Bęben i wsp. (7) w przeliczeniu na kwercetynę (45–54 mg QE mg/g s.m.). Wyższe zawartości flawonoidów ogółem odnotowano natomiast w (28) dla 30% wodno-etanolowych ekstraktów, które mieściły się w granicach od 41–138 mg QE mg/g s.m., w zależności od długości czasu procesu ekstrakcji (5-390 min.).

W badaniu własnym zaobserwowano duże różnice w wynikach otrzymanych dla metod spektrofotometrycznych i chromatograficznych. Wartość średnia sumy polifenoli (SPP) była ponad 3-krotnie niższa niż średnia zawartość polifenoli ogółem (TPC), a średnie wartości suma flawonoidów (SF) ponad 2-krotnie niższa od zawartości flawonoidów ogółem (TFC) (Tabela 1 w publikacji **P3** i A8 w materiałach dodatkowych). Należy jednak pamiętać, że metody spektrofotometryczne stosuje się do szacunkowego oznaczania zawartości grup związków, np. polifenoli, a wyniki uzyskane tymi metodami mogą być przeszacowane ze względu na obecność w ekstraktach roślinnych innych substancji, które reagują z zastosowanym odczynnikiem (np. Folina-Ciocalteu). Istotny jest także wybór substancji wzorcowej, na którą przeliczany jest wynik. Zastosowanie odpowiednio dobranego wzorca, w tym przypadku mirycetyny, daje bardziej realistyczne wyniki niż stosowanie rutyny, której użyli Waed i wsp. (30). Z kolei metody chromatograficzne pozwalają na ilościową analizę poszczególnych związków polifenolowych, co zwiększa dokładność w porównaniu z metodami spektrofotometrycznymi, zwłaszcza w przypadku zastosowania odpowiedniego zestawu substancji wzorcowych. Na wyniki zawartości związków w badanym materiale ma również wpływ wybór metody i warunków ekstrakcji oraz jakość materiału roślinnego.

### **4.3. Właściwości antyoksydacyjne**

Zdolność do hamowania aktywności wolnych rodników przez ekstrakty z *C. incanus* została sprawdzona *in vitro* za pomocą trzech testów – ABTS, DPPH i FRAP. Wyniki wyrażono jako % hamowania oraz przeliczono na ekwiwalent kwasu galusowego GAE (przedstawiono w Tabeli 3 i Tabeli A8, **P3**).

Aktywność antyoksydacyjna wyrażona jako % zahamowania dla wszystkich badanych próbek *C. incanus* wynosiła średnio 79% (zakres 69–89%) w teście DPPH i 29% (zakres 6–69%) w ABTS. Wyniki wyrażone jako GAE wynosiły odpowiednio 3 mM GAE/g s.m. (zakres 0,7–7

mM) w ABTS i 151 mM GAE/g s.m. (zakres 133–172 mM) w DPPH. W DPPH nie odnotowano różnicy pomiędzy produktami z surowcem roślinnym o odmiennym pochodzeniu, próbki z badanych miejsc wykazywały działanie na poziomie średnim ~80% hamowania. Natomiast surowiec turecki wykazywał wyższą aktywność w teście ABTS (38%) w porównaniu do greckiego (25%) i albańskiego (20%). Najwyższy potencjał redukujący w teście FRAP również posiadały próbki pochodzące z Turcji – 231 mM Fe(II)/g, nieco niższe z Grecji – 224 mM Fe(II)/g. Wyniki dla wszystkich próbek w tym teście wynosiły średnio 205 mM Fe(II)/g s.m. i wahały się w granicach 110–337 mM Fe(II)/g s.m. W testach ABTS i FRAP różnice w aktywności antyoksydacyjnej dla ekstraktów *C. incanus* pomiędzy produktami zawierającymi materiał roślinny o różnym pochodzeniu były istotne statystycznie. Takiej zależności nie odnotowano dla DPPH.

Badacze Viapiana i wsp. (2) uzyskali porównywalne wartości dla 80% wodno-metanolowych ekstraktów *C. incanus* (3–169 mM Fe<sup>2+</sup>) w teście FRAP. Produkty tureckie i albańskie w ich badaniu cechowały się wyższym potencjałem antyoksydacyjnym niż te pochodzące z Cypru lub o nieznanym pochodzeniu. Podobną zależność względem kraju pochodzenia badacze zaobserwowali także w teście DPPH dla próbek tureckich, które wykazały najwyższe wyniki w przeliczeniu na ekwiwalent troloksu (20–97 μM TE/g s.m.). Ponadto zaobserwowali, że 30% wodno-metanolowe ekstrakty z liści zebranych w sezonie letnim miały wyższą zdolność neutralizacji RTF (IC<sub>50</sub>~144 μg TE/mL), w porównaniu z liśćmi z sezonu zimowego (IC<sub>50</sub>~202 μg TE/mL), co Autorzy wiążą z większą zawartością związków polifenolowych w liściach z tego sezonu (28). Wydaje się, że większa aktywność antyoksydacyjna jest silnie związana z całkowitą zawartością polifenoli.

Analizując zależność między zawartością badanych grup związków polifenoli *C. incanus* a potencjałem antyoksydacyjnym (**Tabela II**), zaobserwowano silną korelację między wynikami z FRAP a zawartością flawonoidów ogółem (TFC) (~0,8) oraz umiarkowaną korelację z sumą polifenoli (SPP) i sumą elagotanoidów (SET) (~0,7), a także sumą flawonoidów (SF), sumą kwasów fenolowych (SPA) i zawartością polifenoli ogółem (TPC) (~0,5). Wyniki z ABTS wykazały natomiast umiarkowaną zależność z flawonoidami ogółem, sumą flawonoidów i sumą polifenoli (~0,5). Dla DPPH obserwowano jedynie słabą zależność (z wyjątkiem TFC). Szczegółowe dane analizy znajdują się w Tabeli 1 i Tabeli A15 w materiałach dodatkowych w publikacji **P3**.

Powyższe obserwacje i analiza składu chemicznego produktów *C. incanus*, sugeruje że wszystkie grupy polifenoli biorą udział w działaniu antyoksydacyjnym ale szczególnie istotne dla tej aktywności są flawonoidy i elagotanoidy (FRAP).

**Tabela II** Korelacja pomiędzy składem chemicznym liści *C. incanus* a ich aktywnością antyoksydacyjną (mapa typu *heat*).

Metoda	Grupa związków	Regresja liniowa	Korelacja rang Spearmana
		R	R
ABTS	Suma polifenoli (SPP)	0,41	0,47
	Suma flawonoidów (SF)	0,47	0,52
	Suma elagotanoidów (SET)	0,37	0,43
	Suma fenolokwasów (SPA)	0,34	0,41
	Polifenole ogółem (TPC)	0,37	0,38
	Flawonoidy ogółem (TFC)	0,47	0,57
DPPH	Suma polifenoli (SPP)	0,37	0,34
	Suma flawonoidów (SF)	0,31	0,28
	Suma elagotanoidów (SET)	0,33	0,31
	Suma fenolokwasów (SPA)	0,47	0,39
	Polifenole ogółem (TPC)	0,33	0,35
	Flawonoidy ogółem (TFC)	0,62	0,57
FRAP	Suma polifenoli (SPP)	0,68	0,69
	Suma flawonoidów (SF)	0,46	0,52
	Suma elagotanoidów (SET)	0,66	0,65
	Suma fenolokwasów (SPA)	0,45	0,46
	Polifenole ogółem (TPC)	0,51	0,55
	Flawonoidy ogółem (TFC)	0,78	0,77

R, współczynnik korelacji

#### 4.4. Potencjał hamowania aktywności $\alpha$ -glukozydazy

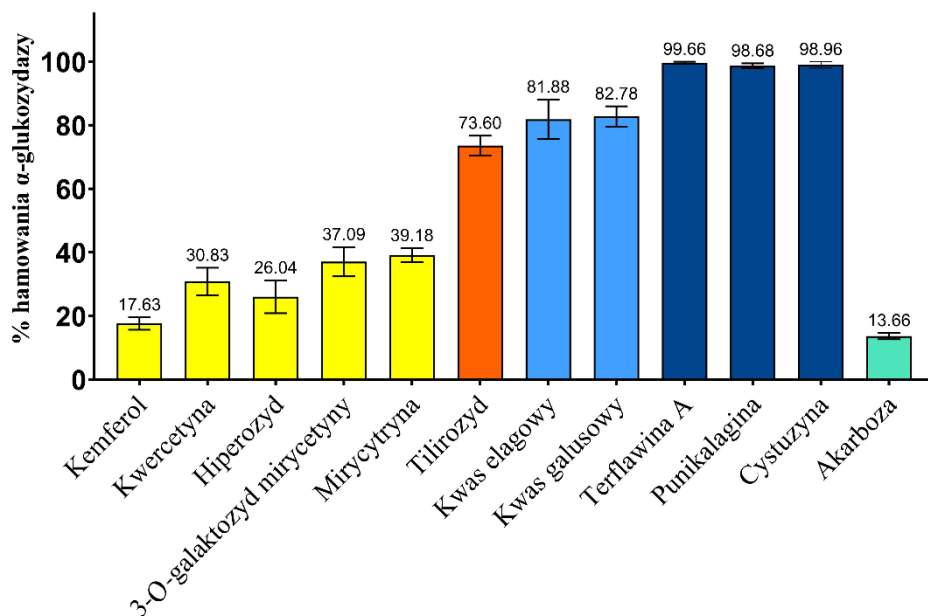
Badania hamowania aktywności  $\alpha$ -glukozydazy (publikacja **P3**) wykonano we współpracy z Zakładem Biomedycznych Analiz Środowiskowych przy Katedrze Biochemii Farmaceutycznej, Wydziału Farmaceutycznego, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Obejmowały one ocenę wyciągów wodno-metanolowych z *C. incanus* oraz wybranych indywidualnych polifenoli zidentyfikowanych w tym surowcu. Wyciągi rozcieńczono w mieszaninie metanolu i buforu (1:1, V/V; bufor fosforanowy, pH = 6.9) do 250  $\mu\text{g/mL}$ , gdyż we wstępnych testach cechowały się wysoką zdolnością hamowania aktywności enzymu, ze średnią wartością sięgającą  $97,8 \pm 2,7\%$  i średnim  $\text{IC}_{50}$  równym 127,9  $\mu\text{g/mL}$ . Wybrane próbki (wyciągi z Ci17, Ci43, Ci48, Ci52, Ci53) poddano dalszym badaniom. Większość ekstraktów w stężeniu 1  $\mu\text{g/mL}$  wykazywała działanie hamujące w ok. 90%, a siła tego działania słabła z kolejnymi rozcieńczeniami, osiągając średnio 50% przy stężeniu  $\sim 0,5 \mu\text{g/mL}$ . Wykazano, że hamowanie  $\alpha$ -glukozydazy przez ekstrakty, zachodzi w sposób zależny od stężenia.

Dalsze badania dotyczyły indywidualnych polifenoli w tym elagotanoidów (cystuzyna, punikalagina, terflawina A), aglikonów flawonoli (mirycetyna, kwercetyna, kemferol), glikozydów flawonoli (mirycetryna, 3-*O*-galaktozyd mirycetyny, hiperozyd, tilirozyd) oraz kwasów fenolowych (kwas galusowy i elagowy). Spośród badanych związków (w stężeniu 500  $\mu\text{g/mL}$ ), elagotanoidy wykazywały najsilniejsze działanie hamujące na  $\alpha$ -glukozydazę wynoszące prawie 100% (**Rycina III**). Znaczący % hamowania obserwowano również w przypadku fenolokwasów – kwasu elagowego i kwasu galusowego (odpowiednio 81,9% i 82,8%) oraz tilirozydu (73,6%). Umiarkowane wartości (30–40% hamowania) miały mirycetryna, 3-*O*-galaktozyd mirycetyny i kwercetyna. Natomiast kemferol i hiperozyd działały najslabiej (odpowiednio 17,6 i 26,0%). Warto zaznaczyć, że wszystkie związki charakteryzowały się silniejszą aktywnością wobec  $\alpha$ -glukozydazy niż akarboza (13,7%).

Analizując uzyskane wyniki, można zaobserwować, że zdolność hamowania  $\alpha$ -glukozydazy przez aglikony flawonoli jest skorelowana z liczbą grup hydroksylowych w cząsteczce. Podobnie jest w przypadku glikozydów flawonoidowych gdzie 3-*O*-galaktozyd mirycetyny posiadający więcej grup -OH wykazuje wyższą aktywność hamującą niż hiperozyd. Ponadto wydaje się, że estryfikacja flawonoli istotnie wpływa na wzrost aktywności wobec  $\alpha$ -glukozydazy, co widać na przykładzie tilirozydu, który charakteryzuje się silniejszym działaniem niż glikozydy i aglikony flawonoli. Fenolokwasy, tj. kwas galusowy i kwas elagowy



okazały się natomiast słabszymi inhibitorami niż elagotanoidy, które są estrami kwasu galusowego i/lub HHDP z glukozą. Wartości  $IC_{50}$  badanych polifenoli czystka były następujące: cystuzyna 0,8  $\mu\text{g/mL}$  (0,7  $\mu\text{M}$ ), terflawina A i punikalagina 1,2  $\mu\text{g/mL}$  (1,1  $\mu\text{M}$ ), kwas elagowy 3,3  $\mu\text{g/mL}$  (10,8  $\mu\text{M}$ ), kwas galusowy 116,7  $\mu\text{g/mL}$  (686,0  $\mu\text{M}$ ) i tilirozyd 168,5  $\mu\text{g/mL}$  (283,5  $\mu\text{M}$ ).



**Rycina III** Potencjał hamowania  $\alpha$ -glukozydazy przez wybrane polifenole *C. incanus*. Na wykresie przedstawiono % hamowania  $\pm$  SD badanych związków w stężeniu 500  $\mu\text{g/mL}$ ; test wykonano w trzech powtórzeniach.

## 5. Podsumowanie

W ostatnich latach produkty z liści czystka szarego zyskały duże uznanie i są polecane przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności do samodzielnego przyjmowania jako bogate źródło związków o działaniu przeciwutleniającym, które poprawiają profil antyoksydacyjny organizmu i są wsparciem dla układu odpornościowego. Swoją popularność *C. incanus* zawdzięcza szerokiej aktywności biologicznej, przynajmniej częściowo zweryfikowanej i opisananej we współczesnych badaniach naukowych, w których potwierdzono jego efekty lecznicze znane już w tradycyjnej medycynie Bliskiego Wschodu. Obecnie badania naukowe skupiają się wokół właściwości antyhiperglikemicznych oraz usprawniających metabolizm glukozy i lipidów w kontekście potencjalnego zastosowania przetworów *C. incanus* w terapii wspomagającej cukrzycy typu 2 i innych chorób kardiometabolicznych. Jest to szczególnie ważne z uwagi na odnotowany światowy wzrost zachorowań na cukrzycę i choroby układu krążenia. Jednym z wiodących trendów w ochronie zdrowia jest poszukiwanie substancji leczniczych, m.in. roślinnych, które znalazłyby zastosowanie w holistycznym podejściu do zdrowia i życia człowieka. W tym kontekście przetwory z liści czystka wydają się być pomocne. Wśród najważniejszych właściwości *C. incanus* wymienić należy działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, antyproliferacyjne, przeciwdrobnoustrojowe, wspomagające funkcje układu odpornościowego i obniżające czynniki ryzyka chorób kardiometabolicznych (wykazane w badaniach na zdrowych ochotnikach). Za powyższe właściwości prawdopodobnie odpowiadają zawarte w nim związki polifenolowe.

Z racji niewielu doniesień naukowych oraz licznych niewiadomych na temat składu liści *C. incanus* przeprowadziłam szczegółową analizę w zakresie związków polifenolowych produktów czystka szarego zawierających materiał roślinny pochodzący z upraw prowadzonych w różnych krajach. Dzięki zastosowaniu metod chromatograficznych, spektrometrycznych i spektroskopowych udało się wykryć obecność 54 związków polifenolowych należących do garbników hydrolizujących, fenolokwasów i flawonoidów, a także wydzielić i określić strukturę cystuzyny nowego elagotanoиду.

Wyniki przedstawionych badań potwierdzają, że liście *C. incanus* są bogatym źródłem polifenoli (5,5–23%) o aktywności antyoksydacyjnej i zdecydowanie mogą być polecane jako środek przeciwutleniający. Do głównych związków polifenolowych w czystku szarym należą elagotanoidy (2,5–19%), w tym punikalagina, cystuzyna i terflawina A oraz flawonoidy (1,2–2,3%), wśród których głównymi przedstawicielami są ramnozydy, galaktozydy i glukozydy

mirycetyny, kwercetyny i kemferolu, a także tilirozyd i inne kumaroiloflawonole. Przebadany materiał roślinny cechował się wysokim potencjałem przeciwutleniającym w testach *in vitro* oraz silnie hamującym działaniem wobec  $\alpha$ -glukozydazy enzymu uczestniczącego w metabolizmie oligo- i polisacharydów dzięki obecności elagotanoidów, fenolokwasów i flawonoidów. Najsilniejszym inhibitorem  $\alpha$ -glukozydazy była cystuzyna. Ważnymi inhibitorami okazały się również inne elagotanoidy i kwas elagowy (cystuzyna > terflawina A > punikalagina > kwas elagowy), który powstaje obficie w jelicie w wyniku ich biotransformacji. Spośród przebadanych produktów, te zawierające surowiec roślinny pochodzenia tureckiego charakteryzowały się najwyższą zawartością składników aktywnych, szczególnie elagotanoidów, które obok flawonoidów warunkują działanie antyoksydacyjne i najprawdopodobniej antyhiperglikemiczne.

## 6. Wnioski

- Liście *C. incanus* są bogatym źródłem związków polifenolowych, wśród których głównymi są elagotanoidy (punikalagina, cystuzyna, terflawina A), flawonoidy (glikozydy mirycetyny, kwercetyny, kemferolu) i fenolokwasy (kwas galusowy, kwas elagowy). Pochodne flawan-3-oli występowały w zdecydowanie mniejszych ilościach, choć istnieją wcześniejsze doniesienia o ich obecności.
- Dotychczas znany skład związków polifenolowych *C. incanus* został uzupełniony o nowy związek z grupy garbników hydrolizujących – elagotanoid cystuzynę.
- Przeprowadzone na dużej grupie produktów (próbek materiału roślinnego) badania potwierdziły, że przetwory z liści *C. incanus* charakteryzują się silnym działaniem antyoksydacyjnym, które jest dodatnio skorelowane z zawartością związków polifenolowych, a w szczególności z poziomem flawonoidów i elagotanooidów.
- Wyciągi wodno-metanolowe z *C. incanus* oraz jego indywidualne składniki w modelu *in vitro* wykazały zdolność hamowania  $\alpha$ -glukozydazy, enzymu związanego z metabolizmem węglowodanów, co może mieć istotne znaczenie dla właściwości antyhiperglikemicznych przetworów z tego surowca roślinnego. Wśród poznanych składników *C. incanus* najwyższy efekt hamujący przypisano elagotanoidom i produktom ich degradacji hydrolitycznej.

## 7. Piśmiennictwo

1. Kubica P, Ekiert H, Ekiert R, Szopa A. Gatunki rodzaju *Cistus* sp. - taksonomia, występowanie, skład chemiczny, aplikacje terapeutyczne i badania biotechnologiczne. *Postępy Fitoterapii*. **2016**;17(3):179–188.
2. Viapiana A.; Konopacka A.; Waleron K.; Wesolowski M. *Cistus incanus* L. commercial products as a good source of polyphenols in human diet. *Ind Crops Prod*. **2017**, 107, 297–304.
3. Guzmán B.; Vargas P. Historical biogeography and character evolution of *Cistaceae* (*Malvales*) based on analysis of plastid *rbcL* and *trnL-trnF* sequences. *Org Divers Evol*. **2009**, 9, 83–99.
4. Tomou E.M.; Lytra K.; Rallis S.; Tzakos A.G.; Skaltsa H. An updated review of genus *Cistus* L. since 2014: traditional uses, phytochemistry, and pharmacological properties. *Phytochem. Rev.* **2022**, 21, 2049–2087.
5. Barkaoui M.; Katiri A.; Boubaker H.; Msanda F. Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes in Chtouka Ait Baha and Tiznit (Western Anti-Atlas), Morocco. *J Ethnopharmacol*. **2017**, 198, 338–350.
6. Vitali F.; Pennisi G.; Attaguile G.; Savoca F.; Tita B. Antiproliferative and cytotoxic activity of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. on human prostate cell lines. *Nat Prod Res*. **2011**, 25, 188–202.
7. Gawel-Bęben K.; Kukula-Koch W.; Hoian U.; Czop M.; Strzępek-Gomółka M.; Antosiewicz B. Characterization of *Cistus × incanus* L. and *Cistus ladanifer* L. Extracts as Potential Multifunctional Antioxidant Ingredients for Skin Protecting Cosmetics. *Antioxidants*. **2020**, 9, 202.
8. Wittpahl G.; Kölling-Speer I.; Basche S.; Herrmann E.; Hannig M.; Speer K.; et al. The Polyphenolic Composition of *Cistus incanus* Herbal Tea and Its Antibacterial and Anti-adherent Activity against *Streptococcus mutans*. *Planta Med*. **2015**, 81, 1727–1735.
9. Mansoor K.A.; Matalka K.Z.; Qa'dan F.S.; Awad R.; Schmidt M. Two new proanthocyanidin trimers isolated from *Cistus incanus* L. demonstrate potent anti-inflammatory activity and selectivity to cyclooxygenase isoenzymes inhibition. *Nat Prod Res*. **2016**, 30, 1919–1926.
10. Ait Lahcen S.; El Hattabi L.; Benkaddour R.; Chahboun N.; Ghanmi M.; Satrani B.; et al. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antifungal activity of Moroccan *Cistus Creticus* leaves. *Chemical Data Collections*. **2020**, 26, 100346.
11. Agostoni C.; Bresson J.L.; Fairweather-Tait S.; Flynn A.; Golly I.; Korhonen H.; et al. Scientific opinion on the substantiation of health claims related to various food(S)/food constituent(s) and protection of cells from premature aging, antioxidant activity, antioxidant content and antioxidant properties, and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage pursuant to article 13(1) of regulation (EC) no 1924/2006. *EFSA J*. **2010**, 8, 1489.
12. Papaefthimiou D.; Papanikolaou A.; Falara V.; Givanoudi S.; Kostas S.; Kanellis A.K.; Genus *Cistus*: A model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Front Chem*. **2014**, 2, 1–19.
13. Demetzos C.; Dimas K.S.; Labdane-type diterpenes: Chemistry and biological activity. *Studies in Natural Products Chemistry*. **2001**, 25, 235–292.

14. Bernacka K.; Bednarska K.; Starzec A.; Mazurek S.; Fecka I.; Antioxidant and Antiglycation Effects of *Cistus × incanus* Water Infusion, Its Phenolic Components, and Respective Metabolites. *Molecules*. **2022**, *27*, 2432.
15. Kuchta A.; Konopacka A.; Waleron K.; Viapiana A.; Wesołowski M.; Dąbkowski K.; et al. The effect of *Cistus incanus* herbal tea supplementation on oxidative stress markers and lipid profile in healthy adults. *Cardiol J*. **2013**, *20*, 1–9.
16. Orhan N.; Aslan M.; Şüküroğlu M.; Deliorman Orhan D.; In vivo and in vitro antidiabetic effect of *Cistus laurifolius* L. and detection of major phenolic compounds by UPLC-TOF-MS analysis. *J Ethnopharmacol*. **2013**, *146*, 859–865.
17. Joshi SR, Standl E, Tong N, Shah P, Kalra S, Rathod R. Therapeutic potential of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors in type 2 diabetes mellitus: An evidence-based review. Vol. 16, Expert Opinion on Pharmacotherapy. Taylor and Francis Ltd; 2015. p. 1959–81.
18. Funke I.; Melzig M.F.; Melzig M.M. Effect of different phenolic compounds on  $\alpha$ -amylase activity: screening by microplate-reader based kinetic assay. *Pharmazie* **2005**, *60*, 796–797.
19. Fecka I. Qualitative and quantitative determination of hydrolysable tannins and other polyphenols in herbal products from meadowsweet and dog rose. **Phytochemical Analysis**. **2009**, *20*, 177–190.
20. Sayah K.; Mrabti H.N.; Belarj B.; Kichou F.; Cherrah Y.; El Abbes Faouzi M. Evaluation of antidiabetic effect of *Cistus salviifolius* L. (*Cistaceae*) in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic mice. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. **2021**, *32*, 121–127.
21. Gori A.; Ferrini F.; Marzano M.C.; Tattini M.; Centritto M.; Baratto M.C. et al. Characterisation and antioxidant activity of crude extract and polyphenolic rich fractions from *C. Incanus* leaves. *Int J Mol Sci*. **2016**, *17*, 1344.
22. Riehle P.; Vollmer M.; Rohn S. Phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal infusions - Antioxidant capacity and thermal stability during the brewing process. *Food Res. Int*. **2013**, *53*, 891–899.
23. Kraszni M.; Marosi A.; Larive C.K. NMR assignments and the acid–base characterization of the pomegranate ellagitannin punicalagin in the acidic pH-range. *Anal Bioanal Chem*. **2013**, *405*, 5807–5816.
24. Tanaka T.; Nonaka G.I.; Nishioka I. Tannins and related compounds. XL. Revision of the structures of punicalin and punicalagin, and isolation and characterization of 2-O-galloylpunicalin from the bark of *Punica granatum* L. *Chem Pharm Bull*. **1986**, *34*, 650–655.
25. Tanaka T.; Nonaka G.I.; Nishioka I. Tannins and related compounds. XLII. Isolation and characterization of four new hydrolyzable tannins, terflavins A and B, tergallagin and tercatin from the leaves of *Terminalia catappa* L. *Chem Pharm Bull*. 1986, *34*, 1039–1049.
26. Gürbüz P.; Demirezer L.Ö.; Güvenalp Z.; Kuruüzüm-Uz A.; Kazaz C.; Isolation and Structure Elucidation of Uncommon Secondary Metabolites from *Cistus salviifolius* L. *Rec. Nat. Prod*. 2015, *9*, 175–183.
27. Riehle P.; Rusche N.; Saake B.; Rohn S. Influence of the leaf content and herbal particle size on the presence and extractability of quantitated phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal teas. *J Agric Food Chem*. 2014, *62*, 10978–10988.
28. Dimcheva V.; Karsheva M. *Cistus incanus* from strandja mountain as a source of bioactive antioxidants. *Plants*. **2018**, *7*, 8.

29. Dimcheva V.; Karsheva M. Antioxidant activity and polyphenolic content of the Bulgarian wild herb *cistus incanus* L. stored under different conditions. *J. Chem. Technol. Metall.* **2017**, 52, 781–790
30. Waed A.; Ghalia S.; Adawia K. Evaluation of Radical Scavenging Activity, Total Phenolics and Total Flavonoids Contents of *Cistus* Species in Syria. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* **2016**, 8, 1071–1077.

**P1. Charakterystyka, potencjał leczniczy i prozdrowotny  
*Cistus × incanus* L. (Characteristics, therapeutic and health-  
promoting potential of *Cistus × incanus* L.)**



# Charakterystyka, potencjał leczniczy i prozdrowotny *Cistus × incanus* L.

Aneta Starzec<sup>1</sup>, Maciej Włodarczyk<sup>1</sup>, Iwona Urbanowicz<sup>2</sup>, Izabela Fecka<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra i Zakład Farmakognozji i Leku Roślinnego, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Polska

<sup>2</sup> Katedra Analityki Medycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, Polska

Farmacja Polska, ISSN 0014-8261 (print); ISSN 2544-8552 (on-line)

## Adres do korespondencji

Aneta Starzec, Katedra i Zakład Farmakognozji i Leku Roślinnego, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, ul. Borowska 211a, 50-556 Wrocław; e-mail: aneta.starzec@student.umed.wroc.pl

## Źródła finansowania

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu; grant nr: SUB.D110.19.005

## Konflikt interesów:

Nie istnieje konflikt interesów.

Otrzymano: 2020.11.16

Zaakceptowano: 2020.12.21

Opublikowano on-line: 2021.01.05

## DOI

10.32383/farmpol/132057

## ORCID

Aneta Starzec (ORCID id: 0000-0002-5001-9696)

Maciej Włodarczyk (ORCID id: 0000-0002-8437-2711)

Iwona Urbanowicz (ORCID id: 0000-0002-9489-322X)

Izabela Fecka (ORCID id: 0000-0002-1139-4581)

## Copyright

© Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne

To jest artykuł o otwartym dostępie, na licencji CC BY NC



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

## Characteristics, therapeutic and health-promoting potential of *Cistus × incanus* L.

One of the modern nutritional trends is to enthusiastically look for natural products that can be considered functional food and be a source of ingredients with a health-promoting effect. Today, many food manufacturers offer *Cistus × incanus* leaves to prepare common self-preparations (e.g., infusions) or as ready-to-use dietary supplements. *Cistus × incanus* (rock rose, pink rock-rose, hoary rock-rose), belonging to the family *Cistaceae*, is widespread in Mediterranean countries. For many years, cistus extracts and its aromatic resin have been used in traditional Middle East medicine to treat, among others, colds, fever, stomach problems, and skin wounds. In past years, this plant was rediscovered by the public. Due to the growing popularity of *Cistus* products, the most recent scientific literature on this subject is reviewed here. This article aims to present the latest research results on the phytochemical composition of *Cistus × incanus* and the impact of its consumption on human health. Particular emphasis is put on antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, and antiproliferative activities and support of digestive system functions. Studies have shown that the main active ingredients of *Cistus × incanus* are flavonoid compounds, including flavonol glycosides (myricetin, quercetin, kaempferol), flavan-3-ols, and tannins. It was demonstrated that the presence of these compounds determines the therapeutic and health-promoting properties of cistus leaves and its products. That applies primarily to a strong antioxidant effect, which may reduce the risk of noncommunicable diseases, including cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases, and cancer. *Cistus* preparations are also recommended as immunostimulants, supporting the treatment of bacterial and viral infections. Labdanum oleoresin and essential oil are a valuable source of substances with strong antibacterial and anti-inflammatory properties, which can be used in the future in the production of pharmaceutical and cosmetic preparations, and also serve as a natural food preservative.

**Keywords:** *Cistus × incanus*, health-promoting properties, polyphenols, antioxidant properties, labdanum, essential oil.

© Farm Pol, 2020, 76(11): 647–664

## Wstęp

Czystek szary (*Cistus × incanus* L.) to wieczniezielony krzew należący do rodziny *Cistaceae*. Naturalnie występuje w regionie basenu Morza Śródziemnego, gdzie wraz z innymi krzewami tworzy zarośla makii. Przygotowywane z jego liści napary i wyciągi, a także pozyskiwana z czystka oleożywica (balsam) i olejek eteryczny, były przez wiele lat wykorzystywane w medycynie tradycyjnej do leczenia różnych stanów chorobowych, m.in. przeziębienia, gorączki, problemów żołądkowo-jelitowych, uszkodzeń i ran skóry. Obecnie badania naukowe koncentrują się na szczególnej identyfikacji składników chemicznych ekstraktów, oleożywicy i olejku z czystka szarego. Ponadto, porównuje się chemizm i własności terapeutyczne gatunków i odmian spotykanych w handlu. Poddając ocenie ich skład oraz aktywności biologiczne i farmakologiczne, można przewidywać wynikające z nich właściwości lecznicze bądź prozdrowotne.

Badania fitochemiczne z wykorzystaniem technik chromatograficznych i spektroskopowych wykazały, że głównymi składnikami czynnymi w wyciągach z *C. incanus* są związki flawonoidowe, w tym glikozydy flawonoli (mirycetyny, kwercetyny, kemferolu), flawan-3-ole (katechina, epikatechina, galokatechiny), proantocyjanidyny i garbniki hydrolizujące. Balsam i olejek eteryczny bogate są w związki terpenowe, przede wszystkim diterpeny typu labdanu (tlenek manoilu, tlenek 13-*epi*-manoilu, sklareol). Wymienione metabolity warunkują właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne, spazmolityczne, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe oraz wzmacniające układ odpornościowy, co może pozwolić na zastosowanie *C. incanus* jako środka obniżającego ryzyko wystąpienia niektórych przewlekłych chorób niezakaźnych oraz wspomagającego leczenie infekcji i różnych dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego.

Niniejsza praca ma na celu przedstawienie wybranych leczniczych i prozdrowotnych właściwości czystka szarego oraz jego podgatunków – *C. incanus* ssp. *incanus*, *C. incanus* ssp. *corsicus*, *C. incanus* ssp. *creticus*, na podstawie przeglądu prac naukowych dostępnych w bazach PubMed, GoogleScholar i Scopus. Przenalizowano prace o charakterze przeglądowym oraz oryginalne prace badawcze, w językach polskim i angielskim, z lat 1991–2020. Do wyszukiwania publikacji używano następujących słów kluczowych i ich kombinacji w języku polskim, czystek, czystek szary, czystek kretański, oleożywica labdanum, właściwości lecznicze/prozdrowotne,

działanie przeciwutleniające, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, cytotoksyczne, oraz ich odpowiedników w języku angielskim.

## Charakterystyka botaniczna i występowanie gatunku

*Cistaceae* (czystkowate, syn. posłonkowate) to średniej wielkości rodzina należąca do rzędu *Malvales* (ślazowe), składająca się z ośmiu rodzajów – *Cistus*, *Crocanthemum*, *Fumana*, *Halimium*, *Helianthemum*, *Hudsonia*, *Lechea* i *Tuberaria* – obejmujących łącznie około 180 gatunków krzewów i roślin zielnych [1–3]. W piśmiennictwie naukowym można odnaleźć informacje, że rodzaj *Cistus* L. (czystek) liczy, zależnie od podejścia botanicznego, od 16 do 28 gatunków, jednak obecnie przyjmuje się, że rodzaj ten obejmuje ich ok. 20. Pierwsza klasyfikacja taksonomiczna została utworzona przed 1800 r. (Linneusz, 1753), a doprecyzowano ją w 1993 r. (Demoly i Montserrat) [1, 3]. Obecnie klasyfikacja rodzaju *Cistus* opiera się na obserwacjach fenotypowych, w tym na cechach morfologicznych, takich jak kształt i liczba nerwów, kolor i kształt włosków na liściach i łodygach oraz na cechach reprodukcyjnych, takich jak: liczba płatków i działek kielicha, kształt i kolor kwiatów, kształt i wielkość owoców [1, 2]. Dodatkowo stosuje się porównania jądrowych (*ncpGS*, *ITS*) i plastydowych (*trnL-trnF*, *trnK-matK*, *trnS-trnG*, *rbcl*) sekwencji DNA. Wyróżnia się 3 podrodzaje *Cistus*: *Cistus*, o kwiatach fioletowych oraz *Leucocistus* i *Halimoides* o kwiatach białych [1, 3, 4]. Ze względu na występowanie polimorfizmu i tworzenie hybryd między pokrewnymi gatunkami, częstym zjawiskiem jest występowanie licznych podgatunków [2]. Schematyczny podział rodzaju przedstawiono w tabeli 1.

Czystek szary (**rycina 1**) znany jest pod kilkoma spolszczonymi anglojęzycznymi nazwami zwyczajowymi, m.in. róża skalna (ang. *rock-rose*, *pink rock-rose*, *hoary rock-rose*) lub róża święta (ang. *holly-rose*). Uważa się, że jest mieszańcem dwóch gatunków: *C. albidus* L. i *C. crispus* L. [6]. W piśmiennictwie często wymieniany jest również jako podgatunek czystka kretańskiego (*C. creticus* L.) lub rzadziej jako czystek szorstki (*C. villosus* L.) [2, 7]. W naturze występują jego 3 podgatunki – *C. incanus* ssp. *incanus* (*C. creticus* ssp. *eriocephalus*), *C. incanus* ssp. *corsicus*, *C. incanus* ssp. *creticus* [8]. Gatunki z rodzaju *Cistus* są szeroko rozpowszechnione w regionie Morza Śródziemnego. Teren jego występowania obejmuje obszary od Wysp Kanaryjskich i Madery po Kaukaz i Izrael, w tym półwyspy Iberyjski, Apeniński,

**Tabela 1.** Podział taksonomiczny rodzaju *Cistus* L., w oparciu o dane konsorcjum WFO [5].

**Table 1.** Taxonomic classification of the genus *Cistus* L., based on WFO data [5].

g. <i>Cistus</i> L.		
sg. <i>Cistus</i>	sg. <i>Leucocistus</i> Willk.	sg. <i>Halmioides</i> (Willk.) Demoly & P. Monts.
<b>sect. <i>Cistus</i></b>	<b>sect. <i>Ladanium</i> (Spach) Gren. ex Gren. &amp; Godr.</b>	<i>C. clusii</i> Dunal
<i>C. albidus</i> L.	<i>C. ladanifer</i> L.	<i>C. libanotis</i> L.
<i>C. creticus</i> L.	<i>C. laurifolius</i> L.	<i>C. munbyi</i> Pomel
<i>C. crispus</i> L.		
<i>C. heterophyllus</i> Desf.	<b>sect. <i>Ledonia</i> Dunal ex DC.</b>	
<i>C. × incanus</i> L.	<i>C. grancanariae</i> Marrero Rodr., R. S. Almeida & C. Ríos	
	<i>C. inflatus</i> Pourr. ex Demoly	
<b>sect. <i>Macrostyliia</i> Willk.</b>	<i>C. monspeliensis</i> L.	
<i>C. asper</i> Demoly & R. Mesa	<i>C. parviflorus</i> Lam.	
<i>C. chinamadensis</i> Bañares & P. Romero	<i>C. populi folius</i> L.	
<i>C. horrens</i> Demoly	<i>C. psilosepalus</i> Sweet	
<i>C. osbeckiifolius</i> Webb	<i>C. salviifolius</i> L.	
<i>C. palmensis</i> Bañares & Demoly	<i>C. sintenisii</i> Litard. (syn. <i>C. albanicus</i> E. F. Warb. ex Heywood)	
<i>C. symphytifolius</i> Lam. (syn. <i>C. ochreatus</i> C. Sm. ex Buch)		
	<b>sect. <i>Stephanocarpoidea</i> Rouy &amp; Foucaud</b>	
	<i>C. pouzolzii</i> Delile ex Gren. & Godr.	

g., *genus* – rodzaj; sg., *subgenus* – podrodzaj; sect., *sectio* – sekcja

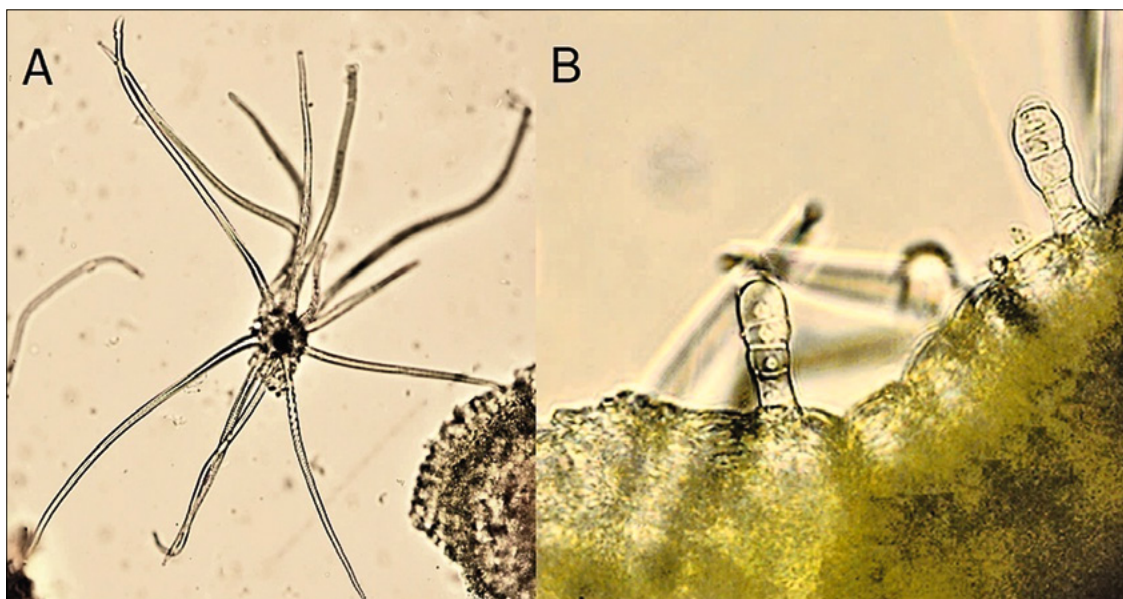
Bałkański, Krym i Azję Mniejszą oraz Afrykę Północną [1]. Czystek szary, spotykany w handlu, najczęściej pozyskiwany jest w Grecji, Albanii i Turcji [6]. Rodzaj *Cistus* stanowi ważny element półsuchych ekosystemów basenu Morza Śródziemnego. Najczęściej rośliny te tworzą gęste zarośla, na suchych, otwartych, mocno nasłonecznionych terenach z piaszczystym, kamiennym lub wapiennym podłożem [1, 2]. Spotkać je można również jako dominujący gatunek podszycia lasów sosnowych i dębowych oraz w suchych pasmach górskich do 1200 m n.p.m. [1, 9].

Rośliny z rodzaju *Cistus* to wieloletnie, małe, drewniejące krzewy sięgające około 1,5 metra wysokości. Od pędu głównego odchodzą rozłożyste pędy boczne, na których wyrastają naprzeciwległe liście. W zależności od gatunku mogą być one proste lub faliste, ogonkowe lub siedzące, o długości 2–8 cm. Zwykle ich powierzchnia jest lekko szorstka, owłosiona. Kwiaty są aktynomorficzne, obupłciowe ze słupkiem dolnym, z trzema lub pięcioma działkami kielicha, umieszczonymi przeciwległe do płatków korony [9]. Kwiaty są efemeryczne, stymulowane porannym światłem i w zależności od gatunku przyjmują kolory od białego do ciemnoróżowego i fioletowego. Liście, łodygi i kielich pokryte są włoskami (trichomami). Włoski mogą być proste lub gwiazdziste (liczba ramion jest zależna od gatunku), niegruczołowe lub gruczołowe – zawierające olejki eteryczne oraz oleożywicę zwaną labdanum (syn. ladanum,



**Rycina 1.** *Cistus × incanus* L. (autor: Aneta Starzec).

**Figure 1.** *Cistus × incanus* L. (author: Aneta Starzec).



**Rycina 2.** Włoski *C. incanus*: A – gwiaździsty, B – gruczołowy. Fotografia spod mikroskopu świetlnego w powiększeniu  $\times 40$  [15].  
**Figure 2.** *C. incanus* trichomes: A – stellate, B – glandular. Brightfield microphotograph at  $\times 40$  magnification [15].

gr. *λαδανο*), która odpowiada za charakterystyczny aromatyczny zapach tych roślin (**rycina 2**) [1].

*C. incanus* jest krzewem osiagającym ok. metr wysokości [7]. Posiada krzewiaste i mocno rozgałęzione pędy. Gałęzie pokryte są gęsto włoskami. Szypułki kwiatowe są krótkie, zwykle jednokwiatowe. Kielich pięciopetalowy, kosmkowo owłosiony [10]. Spodeczkowate kwiaty składające się z 5 różowych, pofalowanych płatków, z małą żółtą plamką w pobliżu podstawy, pojawiają się od maja do czerwca [7, 11]. Liczne jasnożółte pręciki otaczają główkowate znamię słupka, którego szyjka jest gładka, smukła i wyższa od pręcików. Pyłek kwiatowy jest jasnopomarańczowego koloru [1, 10]. Liście tego gatunku są bezszypułkowe, owalne lub jajowate, pofalowane, zwężające się w kierunku podstawy. Pokryte są białym kutnerem, który z wiekiem organu odpada [10]. Liście poszczególnych podgatunków czystka szarego mogą się różnić wymiarami oraz kształtem brzegów. U *C. incanus* ssp. *incanus* liście osiagają wymiary 25–50 mm  $\times$  15–30 mm i posiadają gładze brzegi, podczas gdy *C. incanus* ssp. *creticus* charakteryzuje się mniejszymi liśćmi o wymiarach 15–25 mm  $\times$  8–15 mm i falistym brzegiem [8]. Dodatkowo u *C. incanus*, a także innych gatunków z rodzaju *Cistus*, obserwuje się występowanie dymorfizmu sezonowego, który umożliwia przetrwanie letnich upałów i suszy [1, 12, 13]. Zimowe pędy u czystka szarego są średnio 14 razy dłuższe niż te rozwijane latem. Pędy letnie posiadają mniejszą liczbę gęsto osadzonych małych liści, podczas gdy na długich pędach zimowych występują liście o większych powierzchniach. Przekroje poprzeczne liści również wykazują różnice

anatomiczne. Odnotowano, że zimowe liście są płaskie, natomiast liście występujące w lecie posiadają karbowaną blaszkę, która ulega częściowo podwinięciu. W okresie zimowym górne komórki skórki są znacznie większe, a miękisz palisadowy znacznie grubszy niż w sezonie letnim. Jednakże latem, tkanka asymilacyjna (palisadowa) często jest obecna po obu stronach blaszki, a komórki mezofilu i przestrzenie międzykomórkowe znacznie mniejsze, co zwiększa zwartość budowy [12, 13]. W obu sezonach aparaty szparkowe występują tylko na dolnej powierzchni liścia, jednak zimą są one równomiernie rozmieszczone na skórcie, a w lecie występują głównie w kryptach [13]. Z każdej strony liście pokryte są warstwą włosków. Bez względu na sezon, spodnia część zawiera ich więcej niż górna, a ich gęstość jest zwiększona w cieplejszym okresie. Dodatkowo, zimą włoski zbudowane są z mniejszej liczby komórek gwiaździstych, przez co liście wydają się bardziej zielone [12, 13].

Jak wspomniano wcześniej, kształt i ilość włosków wykorzystuje się w celu odróżnienia poszczególnych podgatunków *C. incanus*. Za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (ang. *scanning electron microscope*, SEM), przeprowadzono analizę topografii powierzchni 3 podgatunków czystka szarego. Podgatunki *incanus* i *corsicus* na górnej części liścia posiadają podobny zwarty układ włosków gwiaździstych, które mają od 8 do 18 ramion. Spodnia część liścia jest również gęsto pokryta włoskami, ale nie wykazują one szczególnych różnic między podgatunkami i nie mają znaczenia taksonomicznego. Włoski tych dwóch podgatunków różnią się długością. U czystka szarego waha się ona w granicach

100–300 µm, a u korsykańskiego osiągają wartości 150–400 µm. Zupełnie inny układ włosków obserwuje się w przypadku *C. incanus* ssp. *creticus*, gdzie zarówno na górnej, jak i dolnej powierzchni liścia włoski gwiaździste są rzadziej rozmieszczone i odznaczają się mniejszą liczbą ramion (6–12) o długości 100–300 µm. Włoski wydzielnicze występujące we wszystkich 3 podgatunkach i charakteryzują się identycznym wyglądem – posiadają podłużny trzon zakończony główką o długości od 100 do 250 µm. Najwięcej tych włosków występuje u czystka korsykańskiego [14].

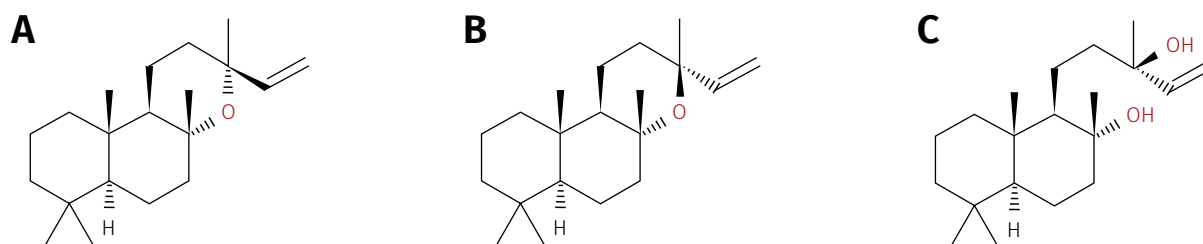
### Charakterystyka składu chemicznego rodzaju *Cistus*

W rodzaju *Cistus* występuje bardzo duża różnorodność metabolitów wtórnych. Pełny skład chemiczny nie jest jeszcze znany. Dostępne dane pokazują, że zawartość poszczególnych składników różni się w zależności od gatunku i podgatunku, miejsca pochodzenia, czynników środowiskowych, okresu zbioru oraz warunków uprawy i przechowywania. Czystki charakteryzują się obecnością substancji aktywnych o charakterze hydrofilowym i lipofilowym takich jak wielofenole (polifenole) i terpeny. Wśród polifenoli zidentyfikowano liczne flawonoidy z grupy flawonoli (glikozydy mirycetyny, kwercetyny i kemferolu), flawan-3-oli i ich oligomerów (pochodnych katechiny, epikatechiny i galokatechiny), garbników hydrolizujących i kwasów fenolowych. Liście i łodygi wszystkich gatunków *Cistus* sp. zawierają olejki eteryczne oraz brązowiejącą oleożywicę, która składa się z terpenów, a w szczególności diterpenów [1, 2]. W przeglądzie obejmującym 10 gatunków z rodzaju *Cistus*, za pomocą metod metabolomicznych, wykazano występowanie ok. 733 substancji chemicznych, w tym 397 terpenów (101 monoterpenów, 178 seskwiterpenów i 118 diterpenów), 162 związków o charakterze fenylopropanoidowym (128 flawonoidów, 17 fenoli i 12 garbników), 24 węglowodory, 35 kwasów tłuszczowych, 36 związków karbonylowych oraz 18 fitohormonów i witamin [1].

### Oleożywica i olejek eteryczny

Rośliny z rodzaju *Cistus* wydzielają z włosków gruczołowych, obecnych na powierzchni liści, łodyg i kielicha, wysoce aromatyczną oleożywicę zwaną labdanum lub ladanum. Olejek eteryczny pozyskiwany jest bezpośrednio z balsamu lub z części nadziemnych czystka przez destylację z parą wodną. Charakteryzuje się on żółtym zabarwieniem i posiada bardzo silny zapach, z tego powodu jest jednym z cenniejszych surowców dla przemysłu perfumeryjnego [9, 16]. Metodą

Farmakopei Polskiej VI (2002), z użyciem aparatu Derynga, oszacowano, że zawartość olejku eterycznego w kilku partiach ziela *C. incanus* przeznaczonego do zaparzania, dostępnych w Polsce, wahała się na poziomie 0,04–0,12 ml/100 g suchego surowca [6, 17]. Hydrodestylacja rozdrobionych liści czystka szarego, standaryzowaną metodą opisaną w Farmakopei Europejskiej 6.0 (2008), wykazała, że zawartość olejku wahała się w granicach 0,09–0,12% [18]. Wcześniejsze doniesienia naukowe dotyczące zawartości olejku eterycznego w różnych podgatunkach czystka szarego metodą destylacji z parą wodną, w oparciu o Farmakopeę Grecką (1989), szacują zawartość olejku na 0,4% dla czystka szarego i 0,6% dla czystka kreteńskiego [19, 20]. Czynniki, które mogą mieć wpływ na zawartość olejku eterycznego to między innymi: czynniki genetyczne, wiek rośliny, czynniki środowiskowe, czas i miejsca zbioru, jakość surowca, warunki przechowywania surowca oraz stopień rozdrobnienia surowca do destylacji [6, 17, 21]. Wpływają one również na różnice w zawartości poszczególnych związków chemicznych w olejkach eterycznych takich jak: kwasy, estry, aldehydy, ketony i węglowodory, wśród których przeważają diterpeny (18–75%) [22], następnie seskwiterpeny (3–44%) [21, 22], monoterpeny (1–10%) [21, 22] oraz ich pochodne. Do tej pory w czystku kreteńskim zidentyfikowano ogółem 92 terpeny, w tym 36 monoterpenów, 35 seskwiterpenów i 21 diterpenów, natomiast w czystku szarym – 47 terpenów, które obejmowały 17 monoterpenów, seskwiterpenów i 11 diterpenów typu labdanu [1]. Do głównych monoterpenów, oznaczonych za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas, w olejku eterycznym z czystka można zaliczyć:  $\alpha$ -pinen (1–3%),  $\beta$ -pinen (0,5–4%), eukaliptol (0,5–6%), kamfen (< 0,5%), tymol (0,5–4%) i karwakrol (1–13%) [11, 16–19]. Z obecnych seskwiterpenów można wyróżnić:  $\beta$ -kariofilen (do 1,6%), tlenek kariofilenu (do 0,8%), kubenol (do 2%), izomery wiridiflorolu (do 7%) i kadinenu (do 3%) [11, 17–20, 23]. Zarówno w żywicy, olejku, jak i w częściach nadziemnych *C. incanus* występują pochodne diterpenów, głównie typu labdanu (**rycina 3**). W największej ilości występuje tlenek manoilu (4–15%) [17] i jego izomery – tlenek 13-*epi*-manoilu (7–29%) [17] i tlenek 8-*epi*-manoilu (9–25%) [24]. Ponadto, sklareol (do 10%) [17], labda-7,13(*E*)-dien-15-ol (do 5%) [21], tlenek 3 $\beta$ -hydroksy-13-*epi*-manoilu [25], tlenek 3 $\beta$ -acetoksy-13-*epi*-manoilu [25]. Kwasy tłuszczowe mają wysoki udział w składzie olejku eterycznego (37–68%) [22, 23] i są reprezentowane przez kwas linolenowy (ok. 39%), palmitynowy (ok. 15%) oraz linolowy (13%) [22].



**Rycina 3.** Diterpeny obecne w labdanum, oleożywicy pozyskiwanej z czystków: A-(+)-tlenek 13-*epi*-manoilu, B-(+)-tlenek manoilu, C-(-)-sklareol.

**Figure 3.** Diterpens present in labdanum, (an oleoresin obtained from *Cistus* sp.): A-(+)-13-*epi*-manoyl oxide, B-(+)-manoyl oxide, C-(-)-sclareol.

### Wielofenole (polifenole) roślinne

Produkty z *C. incanus* uważane są za bogate źródło polifenoli, które warunkują niektóre z właściwości tej rośliny. Tak samo jak w przypadku zawartości składników w olejku eterycznym i żywicy, ilość polifenoli, w tym flawonoidów jest zależna od wielu czynników. W jednym z badań wyciągi wodno-metanolowe (80% V/V) przygotowane z suszonych i sproszkowanych części nadziemnych (liście, łodygi, kwiaty) z *C. incanus* pochodzącego z Syrii, charakteryzowały się całkowitą zawartością polifenoli (TPC, ang. *total phenolic content*) na poziomie  $68 \pm 4,68$  mg w przeliczeniu na kwas galusowy (GAE, ekwiwalent kwasu galusowego) na gram suchej masy produktu (GAE/g s.m.). Oznaczenie przeprowadzono z użyciem metody Folina-Ciocalteu, powszechnie stosowanej w tego typu badaniach. Natomiast całkowita zawartość flawonoidów (ang. *total flavonoid content*, TFC) w tych samych ekstraktach, mierzona metodą spektrofotometryczną z użyciem chlorku glinu, wynosiła  $11 \pm 0,34$  mg w przeliczeniu na ekwiwalent rutozydu (rutyny; RUE/g s.m.) [26]. W innym badaniu oznaczano TPC i TFC w 15 produktach komercyjnych czystka szarego pochodzących z różnych krajów (Turcja, Cypr, Albania oraz produkty o nieznanym pochodzeniu). Przygotowano wyciągi wodne według zaleceń producentów (1 g ziela zalewano 100 ml wrzącej wody i parzono przez 15 min.). W celu uzyskania 80%

wyciągów wodno-metanolowych przeprowadzono ekstrakcje 1 g surowca w łaźni ultradźwiękowej. Ogólną zawartość polifenoli oszacowano na 4–272 mg GAE/g s.m. dla naparów i 2–148 mg GAE/g s.m. dla ekstraktów wodno-metanolowych. Produkty o nieznanym pochodzeniu zawierały najmniejszą ilość wielofenoli w obu rodzajach ekstraktów, natomiast *C. incanus* pochodzenia tureckiego charakteryzował się najwyższą zawartością tych związków. Zawartość flawonoidów ogółem zmierzono za pomocą metody opisanej w Farmakopei Europejskiej IV (2002), wg monografii *Betulae folium*. Wyniki zostały przeliczone na ekwiwalent kwercetyny i wynosiły do 3 mg QE/g s.m. dla wyciągów wodno-metanolowych i 2–4 mg QE/g s.m. dla wyciągów wodnych [27]. Analizowano również części nadziemne czystka szarego pochodzącego z Bułgarii. Przygotowano 30% wyciągi wodno-etanolowe (1:20, m/V), a ekstrakcję prowadzono przez 80 min w temperaturze pokojowej. Zawartość polifenoli oznaczano metodą Folina-Ciocalteu w odniesieniu do czasu ekstrakcji (5–500 min.). Wyniki przedstawiono jako ekwiwalent kwasu galusowego (36–115 mg GAE/g s.m), pirogalolu (27–87 mg PE/g s.m.) oraz w przeliczeniu na tanię (72–229 mg TE/g s.m.). Najniższą wartość polifenoli zanotowano w 5. min ekstrakcji, a najwyższą po 6,5 godzinach. Całkowita zawartość flawonoidów w wyciągach etanolowych została zmierzona metodą z chlorkiem glinu oraz wyrażona jako ekwiwalenty kwercetyny (41–120 mg QE/g s.m.), rutozydu (20–60 mg RUE/g s.m.) i (+)-katechiny (6–18 mg CE/g s.m.). Największe ich ilości odnotowano również w 390. min ekstrakcji [28]. W tym samym badaniu naukowcy zauważyli także różnicę ilości polifenoli i flawonoidów ogółem w ekstraktach z liści zbieranych w sezonie zimowym i letnim. Liście letnie charakteryzowały się prawie 2-krotnie większą zawartością związków aktywnych niż liście zimowe [28]. Podobną zależność udokumentowali również Dimcheva i wsp. [29] dla składników takich jak: kwas galusowy, (-)-epigalokatechyna,

**Tabela 2.** Zawartość polifenoli i flawonoidów w liściach *C. incanus* w sezonie letnim i zimowym, według [29].

**Table 2.** The content of polyphenols and flavonoids in leaves of *C. incanus* in the summer and winter seasons, according to [29].

Składniki i ich całkowita zawartość przeliczeniowa	Lato [mg/g s.m.]	Zima [mg/g s.m.]	
Polifenole	GAE, ekwiwalent kwasu galusowego	85,73	42,71
	TE, ekwiwalent tani	169,92	84,65
	PE, ekwiwalent pirogalolu	64,54	32,15
Flawonoidy	QE, ekwiwalent kwercetyny	81,77	51,04

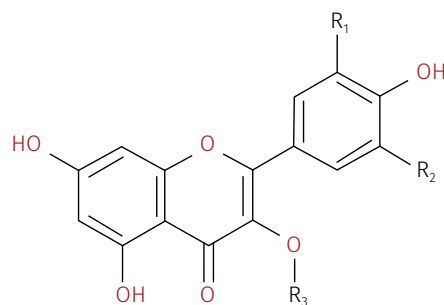
s.m. – sucha masa

mirycetyna. Nie odnotowano jej dla kemferolu i rutozydu, których wartości były porównywalne lub wyższe w sezonie zimowym [29]. Poszczególne różnice w zawartości TPC, TFC i niektórych składników zależnych od pory roku w liściach *C. incanus* przedstawiono w tabeli 2.

Spośród polifenoli występujących w czystku szarym najliczniejszą grupę stanowią flawonoidy, wśród których głównymi są flawonole, flawony występują w niższym stężeniu. Zidentyfikowano wolne aglikony flawonoli takich jak: mirycetyna, kwercetyna i kemferol oraz ich liczne formy glikozydowe (glukozydy, galaktozydy, glukuronidy/glukuronozyny, ramnozydy, ksylozydy, arabinozydy i in.) (rycina 4). Przypuszcza się, że obecność flawonoli w rodzaju *Cistus* jest uwarunkowana klimatem śródziemnomorskim, w którym występuje intensywne nasłonecznienie. Związki te, absorbując znaczne ilości promieniowania UV, chronią roślinę przed jego szkodliwym działaniem [29–32].

Do najczęściej identyfikowanych glikozydów mirycetyny zalicza się: 3-*O*-glukozyd mirycetyny [29–31], 3-*O*-ramnozyd mirycetyny (mirycytryna) [30], 3-*O*-galaktozyd mirycetyny [31, 33] oraz bliżej niezidentyfikowane: ksylozyd mirycetyny [31] i ramnozylo-heksozyd mirycetyny [33]. Wśród glikozydów kwercetyny wyróżnia się: 3-*O*-glukozyd kwercetyny (izokwercytryna) [30], 3-*O*-ramnozyd kwercetyny (kwercytryna), 3-*O*-galaktozyd kwercetyny (hiperozyd), 3-*O*-ksylozyd kwercetyny, 3-*O*-arabinozyd kwercetyny [30, 33], 3-*O*-rutozyd kwercetyny (rutozyd, rutyna) oraz 7-*O*-heksozydo-3-*O*-rutozyd kwercetyny [34]. Do glikozydów kemferolu występujących w czystku szarym należą: 3-*O*-glukozyd kemferolu (astragalina) [33], 3-*O*-galaktozyd kemferolu (trifolina), 3-*O*-rutozyd kemferolu (nikotyfloryna) [34, 35], bliżej niezidentyfikowany *O*-ramnozydo-*O*-heksozyd kemferolu [23]. Dodatkowo, zidentyfikowano obecność glikozydoestrów flawonoidowych, których głównym przedstawicielem jest tilirozyd (3-*O*-β-(6''-*O*-*p*-kumaroilo)-glukozyd kemferolu) występujący w formie *cis* i *trans* [33, 35–37].

Flawonole występują głównie w formie monomerycznej lub jako oligomery. Wśród flawan-3-oli, obecnych w *C. incanus*, wskazuje się obecność następujących związków: (+)-katechiny [34, 35, 37, 38], (-)-katechiny [29], (-)-epikatechiny [29, 34, 35, 37], (-)-galokatechiny [35,37], (-)-epigalokatechiny [29, 34, 35], 3-*O*-galusanu(-)-katechiny [37], 3-*O*-galusanu(-)-epikatechiny, 3-*O*-galusanu(-)-galokatechiny [37, 39], 3-*O*-galusanu(-)-epigalokatechiny. Problemатyczne wydaje się raportowanie w wielu pracach identyfikacji wyłącznie jednej z izomerycznych form poszczególnych



	R1	R2	R3
Mirycetyna	-OH	-OH	-H
Mirycytryna	-OH	-OH	-Rha
3- <i>O</i> -galaktozyd mirycetyny	-OH	-OH	-Gal
Kwercetyna	-OH	-H	-H
Kwercytryna	-OH	-H	-Rha
Izokwercytryna	-OH	-H	-Glc
Rutozyd (Rutyna)	-OH	-H	-Glc(6''←1'')Rha
Hiperozyd	-OH	-H	-Gal
Kemferol	-H	-H	-H
Astragalina	-H	-H	-Glc
Trifolina	-H	-H	-Gal
Nikotyfloryna	-H	-H	-Glc(6''←1'')Rha
Tilirozyd	-H	-H	-Glc(6''- <i>O</i> - <i>p</i> -Cou)

Glc – glukoza; Gla – galaktoza; Rha – ramnoza; *p*-Cou – *p*-kumaroil

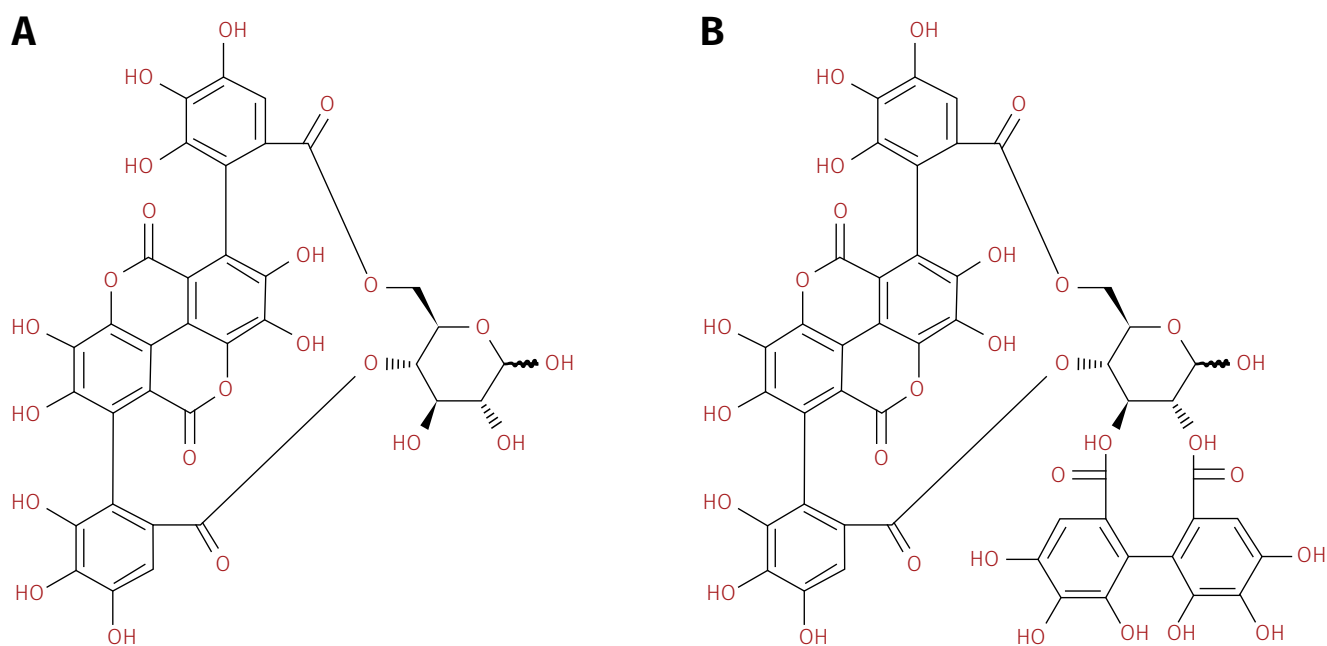
Rycina 4. Główne flawonoidy zidentyfikowane w *C. incanus*.

Figure 4. The main flavonoids identified in *C. incanus*.

flawan-3-oli (np. (+)- lub (-)-katechiny), gdy autory nie dysponują kompletem wzorców lub stosownym detektorem (np. polarymetrycznym).

Formy oligomeryczne flawan-3-oli nazywane są inaczej proantocyjanidynami i klasyfikowane jako garbniki niehydrolizujące (skondensowane). W czystku szarym są to głównie dimeryczne procyjanidyny B<sub>1</sub> (epikatechino-(4β→8)-katechyna) [40] i B<sub>3</sub> (katechino-(4α→8)-katechyna), dimeryczne prodelfinidyny jak prodelfinidyna B<sub>3</sub> (galokatechino-(4α→8)-galokatechyna) [33, 34, 40–42], galokatechino-(4α→6)-galokatechyna [31, 35, 41], katechino-(4α→8)-galokatechyna [31, 35, 40, 41] oraz trimery: prodelfinidyna C<sub>2</sub> (galokatechino-(4α→8)-galokatechino-(4α→8)-katechyna) [39,41], galokatechino-(4α→8)-galokatechino-(4α→8)-galokatechyna, galokatechino-(4α→6)-galokatechino-(4α→8)-galokatechyna, 3-*O*-galusan epigalokatechino-(4β→8)[3-*O*-galusanu] epigalokatechino-(4β→8)-galokatechiny [40].

Kolejną grupą związków wielofenolowych są kwasy fenolowe, dokładniej hydroksylowe pochodne kwasu benzoowego i cynamonowego (tabela 3). Występują one najczęściej w postaci związanej z innymi fenolokwasami lub alkoholkwasami, tworząc depsydy lub z cukrami, tworząc



**Rycina 5.** Garbniki hydrolyzujące zidentyfikowane w *C. incanus*; A – punikalina, B – punikalagina.

**Figure 5.** Hydrolyzable tannins identified in *C. incanus*; A – punicalin, B – punicalagin.

glikozydy. W jednym z badań oznaczono całkowitą zawartość kwasów fenolowych w 80% ekstraktach wodno-metanolowych oraz w naparach za pomocą metody opisanej w Farmakopei Polskiej VI (2002). Wyniki zostały przeliczone na ekwiwalent kwasu kawowego (CAE) na gram suchej masy. W naparach, ilość kwasów fenolowych wahała się w granicach 6–20 mg CAE/g s.m., natomiast ekstrakty alkoholowe charakteryzowały się nieco niższą ich zawartością – do 18 mg CAE/g s.m. [27]. Uważa się, że spośród związków tej grupy, w czystku szarym i jego podgatunkach obecne są głównie pochodne kwasu benzoowego – kwas galusowy oraz jego didepsyd kwas elagowy. Oba kwasy są podstawowymi składnikami garbników hydrolyzujących – galotanoidów i elagotanoidów. W *C. incanus* zidentyfikowano przede wszystkim elagotanoidy z rzadkim ugrupowaniem galagilowym (ang. *gallagyl*) w cząsteczce – punikalinę, punikalaginę oraz pochodną punikalaginy (**rycina 5**) [23, 33]. Spośród pochodnych kwasu cynamonowego, wykazano natomiast obecność kwasu *p*-kumarrowego, kawowego, ferulowego, synapinowego i chlorogenowego [27, 32, 37]. W **tabeli 3** przedstawiono zawartość wybranych związków polifenolowych w naparach i ekstraktach wodno-metanolowych z czystka szarego.

### Właściwości lecznicze i prozdrowotne czystka szarego

Pozyskiwane z rodzaju *Cistus* nadziemne części (kwiaty, liście, łodygi) zalicza się do surowców

zielarskich i farmaceutycznych. Czystek szary, ani inne gatunki z tego rodzaju nie są ujęte w oficjalnych lekospisach czy farmakopeach europejskich, jednakże z roku na rok rośnie zainteresowanie tym gatunkiem. Jest to związane ze wzrostem liczby doniesień w piśmiennictwie naukowym na temat właściwości leczniczych i profilaktycznych tej rośliny oraz popularyzacją wiedzy na temat jej wieloletnich zastosowań w tradycyjnej medycynie Bliskiego Wschodu, w szczególności w medycynie tureckiej, a także greckiej i włoskiej [1, 2]. Napary i wyciągi oraz balsam były używane do leczenia przeziębień, dolegliwości ze strony układu pokarmowego, zwłaszcza w biegunkach i chorobie wrzodowej żołądka. Wykorzystywano je także jako środki przyspieszające gojenie ran, przeciwzapalne w chorobach skóry, schorzeniach reumatycznych i stanach zapalnych nerek. Obecnie przetwory z czystka wykorzystuje się w profilaktyce wielu chorób przewlekłych, m.in. cukrzycy, chorób układu sercowo-naczyniowego czy chorób neurodegeneracyjnych [1, 2]. Rekomendowane są jako środki o działaniu przeciwzapalnym, przeciwbakteryjnym, przeciwwirusowym, przeciwgrzybicznym, antyproliferacyjnym oraz wzmacniającym układ odpornościowy [2, 6, 27]. Olejek eteryczny z czystka został zatwierdzony w USA przez Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drugs Administration, FDA*) jako dodatek do żywności i substancja aromatyzująca [18]. Przeprowadzone badania naukowe nad właściwościami tej rośliny, potwierdzają niektóre z tradycyjnych zastosowań, a także wskazują nowe profile



aktywności biologicznej oraz odkrywają związki czynne odpowiedzialne za poszczególne działania [1]. W poniższej części artykułu omówione zostały wybrane działania lecznicze i prozdrowotne *C. incanus*.

### Działanie przeciwutleniające

Rośliny klimatu śródziemnomorskiego, w tym *C. incanus*, narażone są na wiele stresogennych czynników, szczególnie w okresie letnim, kiedy niedobory wody występują jednocześnie z wysokim nasłonecznieniem i temperaturami. Takie warunki sprzyjają występowaniu silnego stresu oksydacyjnego oraz wytwarzaniu wielu reaktywnych form tlenu (pol. RFT; ang. *reactive oxygen species*, ROS). Nadmierne ilości RFT powodują zachwianie homeostazy komórkowej, uszkodzenie DNA oraz peroksydację lipidów i białek [35]. U ludzi stres oksydacyjny oraz RFT, pochodzące ze źródeł endogennych, jak i egzogennych, są traktowane jako czynniki etiologiczne przewlekłych chorób niezakaźnych takich jak: choroby sercowo-naczyniowe, neurodegeneracyjne (ch. Parkinsona, ch. Alzheimerera) czy nowotworowe [2, 43]. Stres oksydacyjny indukuje aktywację układów obronnych opartych na działaniu enzymów przeciwutleniających (takich jak: dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza), a także na wzmożonej produkcji metabolitów wtórnych posiadających działanie antyoksydacyjne. Związki wielofenolowe, a w szczególności flawonoidy, mają zdolność neutralizowania RFT, chelatowania metali przejściowych i pułapkowania reaktywnych dikarbonyli (glioksal, metyloglioksal), w efekcie zmniejszają peroksydację lipidów oraz chronią białka i DNA przed interakcją z szeroką gamą metabolitów. Oddziałują także na kinazy białkowe, które związane są z kluczowymi etapami wzrostu i różnicowaniem komórek [1, 2, 34, 42, 74]. Działania te mogą zmniejszać ryzyko inicjacji i rozwoju niektórych chorób, dlatego też czystek szary oraz jego podgatunki są polecane przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. *European Food Safety Authority*, EFSA) jako bogate źródło związków polifenolowych oraz naturalny środek o działaniu przeciwutleniającym [44].

Działanie przeciwutleniające (redukujące) wyciągów z *C. incanus* udowodniono w wielu badaniach za pomocą testów laboratoryjnych takich jak: DPPH, FRAP i ABTS. W teście DPPH ekstrakty wodno-metanolowe z czystka charakteryzowały się silnymi właściwościami redukującymi ( $IC_{50}$ ~18 µg/ml), porównywalnymi do kwasu askorbinowego ( $IC_{50}$ ~15 µg/ml). Wyciągi octanowe wykazywały umiarkowaną aktywność

**Tabela 3.** Zawartość wybranych związków polifenolowych w ekstraktach wodnych i wodno-metanolowych z *C. incanus*[27, 37, 42].

**Table 3.** Content of selected polyphenolic compounds in aqueous and water-methanol extracts from *C. incanus* [27, 36, 41].

Składniki polifenolowe i ich zawartość	Ekstrakty wodno-metanolowe [mg/g s.m.]	Ekstrakty wodne/Napary [mg/g s.m.]
<b>Flawonole</b>		
Mirycetyna	0,10–0,36 <sup>a</sup> [27]	1,44–1,79 [27]
Kwercetyna	0,04–0,50 <sup>a</sup> [27]	0,85–1,17 [27]
Kemferol	0,03–0,08 <sup>a</sup> [27]	0,05–0,07 [27]
Kwercytryna	0,68 <sup>b</sup> [42]	B.D.
Izokwercytryna	0,03–0,70 <sup>a</sup> [27]	0,86–1,19 [27]
Rutozyd (Rutyna)	0,01–0,75 <sup>a</sup> [27]	0,24–0,77 [27]
<b>Flawony</b>		
Cynarozyd	0,006–0,62 <sup>a</sup> [27]	0,11–0,61 [27]
<b>Flawanole</b>		
Galokatechina	0,003 <sup>b</sup> [42]	0,73–2,10 [37]
Katechina	B.D.	0,15–0,51 [37]
Epikatechina	0,10 <sup>b</sup> [42]	0,007–0,01 [37]
3-O-Galusan epigalokatechiny	B.D.	0,05–0,23 [37]
3-O-Galusan galokatechiny	B.D.	0,001–0,02 [37]
3-O-Galusan epikatechiny	B.D.	0,007–0,01 [37]
3-O-Galusan katechiny	B.D.	0,002–0,003 [37]
<b>Kwasy fenolowe</b>		
Kwas galusowy	0,01–0,17 <sup>a</sup> [27]	0,20–0,89 [27]
Kwas protokatechowy	B.D.	0,14–0,18 [37]
Kwas wanilinowy	0,005–0,09 <sup>a</sup> [27]	0,05–0,09 [27]
Kwas syringowy	0,03–0,43 <sup>a</sup> [27]	0,006–0,01 [37]
Kwas elagowy	0,12–0,39 <sup>a</sup> [27]	0,05–0,35 [27]
Kwas p-kumarowy	0,069–0,45 <sup>a</sup> [27]	0,12–0,13 [27]
Kwas kawowy	0,01–0,81 <sup>a</sup> [27]	0,02–0,35 [27]
Kwas ferulowy	0,05–0,78 <sup>a</sup> [27]	0,004–0,06 [37]
Kwas synapowy	B.D.	0,001–0,009 [37]
Kwas chlorogenowy	0,07–0,29 <sup>a</sup> [27]	0,01–0,41 [37]

Proporcje woda: metanol: <sup>a</sup> 2:8; <sup>b</sup> 4:6; B.D. – brak danych.

antyoksydacyjną ( $IC_{50}$ ~329 µg/ml), natomiast heksanowe nie wykazywały tej aktywności w badanym zakresie stężeń [45]. Zauważono, że silniejszym działaniem charakteryzują się 30% wodno-metanolowe wyciągi z liści i łodyg w stosunku do wyciągów uzyskanych z nasion. Co więcej, wyciągi z liści pozyskanych w sezonie letnim wykazywały większą zdolność neutralizowania RFT ( $IC_{50}$ ~144 µg/ml) w teście DPPH, w przeliczeniu na ekwiwalent troloksu (ang. *trolox equivalent*, TRE), niż liście z okresu zimowego ( $IC_{50}$ ~202 µg/ml). Odnotowano również, że większa aktywność przeciwutleniająca była silnie powiązana z całkowitą ilością polifenoli [28]. Wyciągi wodno-etanolowe (50% V/V) z bułgarskiego czystka o wyższej zawartości polifenoli ogółem charakteryzowały się większą aktywnością

antyoksydacyjną. Autorzy sugerują, że 67% zdolności przeciwutleniającej badanych ekstraktów wynika z obecności związków polifenolowych. Pozostałą aktywność przypisują innym metabolitom wtórnym, takim jak terpeny (w tym składniki olejku, karoteny) i witaminy [46]. Zależność pomiędzy siłą działania antyoksydacyjnego (przeciwrodnikowego) a całkowitą zawartością polifenoli odnotowano także w badaniu na wyciągach wodnych oraz 80% wodno-metanolowych uzyskanych z produktów czystka szarego, przy użyciu testów DPPH i FRAP. Wartości DPPH dla ekstraktów wodno-metanolowych i wodnych wynosiły odpowiednio 20–97  $\mu\text{mol TRE/g s.m.}$  i 2–97  $\mu\text{mol TRE/g s.m.}$  W teście FRAP wartości mieściły się w zakresach 3–169  $\text{mmol Fe}^{2+}/\text{g s.m.}$  dla ekstraktów wodno-metanolowych i 10–148  $\text{mmol Fe}^{2+}/\text{g s.m.}$  dla ekstraktów wodnych. Zarówno napary, jak i wyciągi metanolowe o większej zawartości polifenoli ogółem posiadały silniejsze działanie antyoksydacyjne w obu testach. Dodatkowo, autorzy uznali, że na właściwości antyoksydacyjne ma wpływ pochodzenie surowca, ponieważ produkty pochodzenia tureckiego i albańskiego charakteryzowały się wyższą zawartością polifenoli ogółem niż produkty z Cypru lub o nieznanym pochodzeniu [27, 47]. Analiza frakcji polifenolowych pozyskanych z ekstraktu z czystka szarego potwierdziła, że za właściwości przeciwutleniające odpowiadają głównie flawonole. Frakcja octanowa, bogata w tę grupę związków, wykazywała silniejsze właściwości neutralizowania RFT w teście DPPH ( $\text{IC}_{50} \sim 1 \mu\text{M}$ ) niż frakcje wodne, które zawierały głównie proantocyjanidyny o różnym stopniu polimeryzacji ( $\text{IC}_{50} \sim 12$  i  $11 \mu\text{M}$ ). Wyniki porównywano z substancją wzorcową – mirycytryną ( $\text{IC}_{50} \sim 0,68 \mu\text{M}$ ) [35]. Dzięki zastosowaniu techniki LC-DAD/ESI-MS/MS, Riehle i wsp. [31] zidentyfikowali 32 związki fenolowe w wodnym wyciągu czystka szarego, które następnie ocenili pod kątem zdolności antyoksydacyjnej. Autorzy wykorzystali metodę LC-online TEAC, która umożliwia szacunkowe przypisanie udziału poszczególnych składników wyciągu w ogólnej zdolności wyciągu do neutralizacji RTF (po wykonaniu mikrofrakcjonowania wyciągu za pomocą HPLC). Najwyższą aktywnością charakteryzowała się mirycytryna (395  $\mu\text{M TRE}/100 \text{ g}$  naparu), co stanowiło 24% całkowitej aktywności przeciwutleniającej wszystkich związków zidentyfikowanych w naparze. Dużą zdolnością do usuwania rodników cechowały się kolejno: heksahydroksydifenilo-glukoza, galokatechina, kwas galusowy i katechina, przyjmując odpowiednio wartości 320, 311, 249 i 242  $\mu\text{M TRE}/100 \text{ g}$  naparu. Zauważono, że nawet związki występujące w stosunkowo małej ilości przyczyniają się do znacznej

aktywności antyoksydacyjnej przetworu [31]. Oprócz stężenia, za wysoki udział w aktywności antyoksydacyjnej odpowiadają też specyficzne elementy struktury chemicznej. Zdolność neutralizowania wolnych rodników przez polifenole zależy od miejsca i wzajemnego podstawienia ich grup fenolowych (-OH), a dokładniej od możliwości stabilizowania rodników poprzez wiązanie wodrowe lub delokalizację elektronów. Wymogi strukturalne, które zostały uznane za niezbędne do skutecznego usuwania wolnych rodników, to przede wszystkim obecność grup -OH we wzajemnym położeniu *orto* w jednym z pierścieni fenolowych flawonoidów, flawanoli, kwasów fenolowych lub garbników, a dodatkowo – podwójne wiązanie w łańcuchu  $\text{C}_3$  fenylopropaidów i ewentualnie grupa karbonylowa w pierścieniu C flawonoidów [31, 35]. Spośród związków obecnych w ekstraktach z czystka, mirycytryna spełnia wszystkie te kryteria, co przekłada się na jej najsilniejsze działanie w stosunku do innych związków, mimo obecności reszty cukrowej w pozycji C-3 pierścienia C. Glikozylacja (i wynikający z niej wzrost masy molowej związku) powoduje zazwyczaj relatywny spadek aktywności antyoksydacyjnej [31]. Potwierdza to również porównanie  $\text{IC}_{50}$  w teście DPPH mirycetyny (0,68  $\mu\text{M}$ ) i epikatechiny (1,49  $\mu\text{M}$ ), gdzie wartość dla mirycetyny jest prawie o połowę mniejsza. Flawan-3-ole, takie jak katechina czy epikatechina, nie posiadają wiązania podwójnego C-2/C-3 i grupy 4-okso, co ogranicza ich potencjał wychwytywania rodników. Natomiast estryfikacja katechin kwasem galusowym kompensuje brak wyżej wymienionych struktur i, mimo wzrostu masy molowej, zwiększa aktywność przeciwutleniającą galokatechin ( $\text{IC}_{50} \sim 1 \mu\text{M}$ ). Ponadto, uważa się, że związki zawierające większe ilości grup fenolowych wykazują silniejsze właściwości antyoksydacyjne. W przypadku polimerycznych proantocyjanidyn cecha ta nie wpływa jednak na zwiększenie ich aktywności. Uważa się, że ich struktura chemiczna może zawierać przeszkody steryczne [35].

Badaniom poddano również olejek eteryczny z czystka szarego otrzymany metodą destylacji z parą wodną. Przeprowadzono testy z zastosowaniem metod DPPH i ABTS, wykorzystując kwas askorbinowy jako substancję wzorcową ( $\text{IC}_{50}$  5 i 2  $\mu\text{g/ml}$  odpowiednio) oraz test FRAP wobec butylowanego hydroksytoluenu – BHT ( $\sim 63 \mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g}$ ). Uzyskane wyniki wykazały słabe właściwości przeciwutleniające olejku z *C. incanus* ( $\text{IC}_{50}$  dla DPPH – 828  $\mu\text{g/ml}$ , dla ABTS – 395  $\mu\text{g/ml}$ , dla FRAP – 0,4  $\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g}$ ). Olejki z innych gatunków *C. salvifolius*, *C. libanotis* i *C. monspeliensis* również cechowały się niewielkim potencjałem antyoksydacyjnym [18].

## Działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze

Olejki eteryczne oraz oleożywice pozyskane z czystka szarego i jego podgatunków były oceniane pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej oraz przeciwgrzybiczej w kilku pracach greckich badaczy [19–21, 25]. W jednym z badań olejki eteryczne z czystka szarego i kreteńskiego charakteryzowały się słabą aktywnością wobec bakterii Gram(-) (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), ale znacznie wyższą w stosunku do bakterii Gram(+) (*Bacillus cereus*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*) i drożdżaków (*Candida albicans*). Najskuteczniej olejki działały wobec *S. aureus*, *B. cereus* i *B. subtilis* [20]. W opinii autorów, za działanie przeciwdrobnoustrojowe odpowiadają izomery tlenku manoilu jako głównego i reaktywnego składnika olejku eterycznego. Swoje przypuszczenia potwierdzili w kolejnym badaniu na wyizolowanych związkach z olejku i oleożywicy czystka kreteńskiego wobec *S. aureus*, *S. epidermidis* i *Staphylococcus hominis*. Otrzymane wyniki porównano do działania standardowego antybiotyku – streptomycyny [25]. Badanie prowadzone dla olejku eterycznego z czystka kreteńskiego przez innych autorów potwierdziło działanie przeciwdrobnoustrojowe, ale tylko dla olejku w niewielkim rozcieńczeniu (1:8, V/V) w stosunku do *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* i *Micrococcus luteus*, niższe stężenia olejku nie hamowały wzrostu bakterii. Niemniej jednak, naukowcy potwierdzili dużą aktywność w hamowaniu rozwoju grzybów i pleśni: *Gloeophyllum trabeum*, *Coniophora puteana*, *Poria placenta*, *Coriolus versicolor*, *Aspergillus niger*, *Penicillium digitatum* i *Penicillium expansum*. Szczególnie wrażliwymi okazały się szczepy *C. puteana* i *P. placenta* [48]. Aktywność przeciwbakteryjną olejku przypisali diterpenom o układzie labdanu, m.in. tlenkom manoilu, 13-*epi*-manoilu i 3-acetoksy-manoilu oraz fenolowemu monoterpenu – karwakrolowi [49]. Składniki te wykazywały się również silnym działaniem przeciwbakteryjnym wobec *Borrelia burgdorferi* [49, 50].

Szereg badań oleożywicy *C. incanus* potwierdził jej działanie antybakteryjne, które również przypisuje się głównie diterpenom typu labdanu [51]. Dichlorometanowo-metanolowy ekstrakt (1:1, V/V) z balsamu hamował namnażanie się zarówno bakterii Gram(-) (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter mitratus*, *Proteus mirabilis*), jak i Gram(+) (*S. aureus*). Silną aktywność przeciwdrobnoustrojową potwierdzono dla obecnego w oleożywicy malonianu labd-7,13(E)-dien-15-ylu

[52], sklareolu i tlenku 3 $\beta$ -hydrokso-13-*epi*-manoilu wobec szczepów bakteryjnych Gram(+) [25]. Oceniano również potencjał przeciwbakteryjny i przeciwgrzybiczy sześciu naturalnych diterpenów izolowanych z balsamu oraz ich 15 półsyntetycznych pochodnych. Badane związki były pochodnymi labd-7,13(E)-dien-15-olu (10 związków) oraz labd-13(E)-en-8 $\alpha$ ,15-diolu (11 związków). Z substancji naturalnych, malonian labd-7,13(E)-dien-15-ylu ponownie okazał się związkiem o najszerszym spektrum działania (*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*). Z kolei labd-13(E)-en-8 $\alpha$ ,15-diol jako jedyny z tej grupy wykazał potencjał przeciwgrzybiczy wobec 2 z 3 badanych szczepów (*C. albicans*, *C. tropicalis*). Warto zwrócić uwagę, że oznaczona aktywność badanych związków była porównywalna z działaniem wybranych standardowych antybiotyków [53].

Działanie hamujące namnażanie się bakterii i grzybów przedstawiono również dla ekstraktów z liści i owoców różnych gatunków *Cistus* (w tym *C. incanus*). Badaniom poddano wyciągi wodne, metanolowe, *n*-butanolowe, octanu etylu, chloroformowe i heksanowe [54, 55]. Wykazano, że wyciągi z liści i owoców czystka szarego charakteryzują się najwyższymi właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi spośród badanych gatunków. Wyciągi wodne i *n*-butanolowe charakteryzowała aktywność wobec większości badanych szczepów, z czego tylko butanolowe miały działanie hamujące namnażanie *E. coli*. Wszystkie wyciągi posiadały umiarkowane właściwości przeciwko *B. subtilis* i *B. cereus*, ale nie wykazano działania hamującego wobec *P. aeruginosa* i *C. albicans*. Badania potwierdziły znaczną aktywność ekstraktów z czystka szarego wobec bakterii Gram(+) i stosunkowo słabą wobec Gram(-) oraz drożdżaków (wyjątek stanowił *Candida glabrata*, gdzie wykazano silne właściwości przeciwgrzybicze) [54]. Wyciągi sporządzone z liści charakteryzowały się silniejszymi działaniami niż te z owoców. Związki rozpuszczalne w rozpuszczalnikach polarnych (woda i *n*-butanol) były skuteczniejsze niż te rozpuszczalne w roztworach niepolarnych [55]. Polscy naukowcy oceniali działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze wyciągów wodnych z 15 produktów czystka szarego dostępnych na krajowym rynku wobec siedmiu szczepów bakterii Gram(+), trzech Gram(-) oraz dwóch szczepów grzybów. Aktywność oceniali na podstawie minimalnego stężenia hamującego (ang. *minimum inhibitory concentration*, MIC). Wykazano, że napary były skuteczniejsze przeciwko bakteriom Gram(+), głównie *S. aureus* i *S. epidermidis* (MIC odpowiednio 0,5–8 i 0,25–4 mg/ml). Natomiast wśród bakterii Gram(-) najbardziej

wrażliwy był *Helicobacter pylori* (MIC 32–64 mg/ml). W odróżnieniu od wcześniej przytoczonych badań, wyciągi z czystka wykazywały słaby lub całkowity brak aktywności wobec *E. coli*, *C. albicans* i *C. glabrata* [27]. Silniejszą aktywność przeciwbakteryjną wobec bakterii Gram(+) (*B. subtilis*), w stosunku do Gram(-) (*Aliivibrio fischeri*) stwierdzono również dla szesciu (I–VI) fenolowych frakcji pozyskanych za pomocą wieloetapowej ekstrakcji *C. incanus*. Aktywność oceniano metodą chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej z bezpośrednią bioautografią (*ang. thin-layer chromatography-direct bioautography*, TLC-DB). Najsilniejszy efekt wywierały frakcje I i II zawierające odpowiednio aglikony flawonoidowe i wolne kwasy fenolowe [56].

Niemieccy naukowcy badali wpływ naparu z czystka na adhezję bakterii w płytce nazębnej (łac. *pellicula*). Specjalnie przygotowane, oszkliwione płytki umieszczano w jamie ustnej 4 ochotników, w rejonie górnych zębów trzonowych i przedtrzonowych. Jamę ustną płukano zimnym naparem z czystka przez 10 minut. Obecność bakterii na płytkach oceniano za pomocą metody barwienia DAPI i fluoroscencyjnej hybrydizacji *in situ* (FISH), porównując do próby kontrolnej. Potwierdzono, że płukanie jamy ustnej naparem z czystka miało znaczący wpływ na liczbę bakterii po 2 godz. od zastosowania płukanki. Wykryto zmniejszenie adhezji *Eubacterium* i *Streptococcus* w porównaniu z próbą kontrolną [57]. W kontynuacji swoich badań, naukowcy testowali wpływ różnych napojów bogatych w polifenole (czarna i zielona herbata, czerwone wino, sok winogronowy i napar z czystka). Potwierdzono, że każdy z wybranych napojów zmniejszał adhezję eubakterii i paciorkowców. Najmniejszą liczbę bakterii stwierdzono po płukaniu naparem z czystka, czerwonym winem i czarną herbata (do 66% redukcji bakterii w porównaniu do próby kontrolnej). Za działanie przeciwdrobnoustrojowe odpowiadają najprawdopodobniej związki polifenolowe, wśród których wymieniono flawan-3-ole, galaktozyd i ramnozyd mirycetyny oraz glukozyd kwercetyny [58].

Przytoczone powyżej badania sugerują, że silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe nie zawsze korelują z dużą całkowitą zawartością związków polifenolowych. Właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze można przypisać określonym związkom polifenolowym oraz możliwości występowaniu efektów synergistycznych z innymi, niefenolowymi, składnikami obecnymi w wodnych wyciągach z *C. incanus*, co wymaga dalszych badań. Niemniej jednak, dostępne wyniki potwierdzają możliwość wykorzystania olejku eterycznego, żywicy i ekstraktów z czystka szarego

i jego podgatunków jako potencjalnego, alternatywnego źródła składników o działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybiczym w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym i spożywczym [27, 57–59] oraz w profilaktyce np. chorób przyzębia.

### Działanie przeciwwirusowe

Pomimo dostępności leków stosowanych w chorobach wirusowych nadal istnieje silna potrzeba poszukiwania nowych środków, które udoskonalą aktualne terapie lub będą skuteczne w niestandardowy sposób. Pozwoli to na bezpośrednie wdrożenie do terapii lub opracowanie nowych strategii w przypadku niewyleczalnych obecnie chorób wirusowych. Za potencjalne źródło nowych leków brane są naturalne produkty pochodzenia roślinnego, jednakże stosowanie ziołowych środków przeciwwirusowych wymaga dogłębnych badań nad ich skutecznością, bezpieczeństwem, składem i mechanizmem działania.

Wyciągi wodne z czystka szarego zostały przebadane pod kątem właściwości przeciw wirusowi HIV na linii komórek zainfekowanych HIV (LC5-RIC) i technologii przeznaczonej do identyfikacji inhibitorów HIV (EASY-HIT29). Wykorzystano ekstrakt przygotowany z preparatu CYSTUS052, napar z komercyjnie dostępnego suszu z czystka szarego, oraz wyciąg przygotowany ze świeżych liści tego gatunku. Otrzymane wyniki wykazały, że wszystkie trzy ekstrakty wodne hamowały infekcje komórek LC5-RIC przed wirusem HIV-1. Do dalszych eksperymentów na różnych klinicznych izolatach wirusa HIV, wykorzystano wyłącznie komercyjny preparat. Ekstrakt hamował zakażenie komórek LC5-RIC i limfocytów krwi obwodowej zarówno przez typ HIV-1, jak i HIV-2. Odnotowano również, że wyciąg hamował infekcje wirusami z mutacjami oporności na leki. Badacze, przypuszczając, że za działanie przeciwwirusowe odpowiadają polifenole, stworzyli frakcję wzbogaconą w polifenole (CiPP) i poddali dalszym testom. CiPP wykazał zależną od dawki aktywność przeciwwirusową (0,7–2  $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) wobec wszystkich testowanych izolatów HIV. Ekstrakt czystka charakteryzował się działaniem podobnym do inhibitorów fuzji. Związki zawarte w czystku selektywnie blokowały glikoproteinę g120, występującą w białku otoczek wirusów, która umożliwia wnikanie wirusa do komórek gospodarza. Takie samo działanie wykazywały wyciągi z czystka wobec wirusa Ebola z podgatunku Zair i wirusa Marburga [60].

Przeciwwirusowe działanie czystka wykazano również wobec wirusa ptasiej grypy A (H7N7) w testach *in vitro* na hodowli komórkowej oraz

*in vivo* na modelu zwierzęcym (myszy). W obu testach używano preparatu aerozolowego, ze względu na niską biodostępność polifenoli o wysokiej masie cząsteczkowej. W komórkach MDCK (komórki psiej nerki Madin-Darby) osiągnięto 90% zmniejszenie liczby lysinek (obszarów przejaśnienia) na komórkach, gdy przeprowadzono nebulizację ekstraktem roślinnym na 10 minut przed rozpyleniem wirusa. Takich zmian nie odnotowano, gdy nebulizację wykonywano równolegle lub po zakażeniu wirusem. Na podstawie przeprowadzonych badań zasugerowano, że bogaty w polifenole ekstrakt CYSTUS052 zapobiega adsorpcji wirusa do komórek, natomiast nie wykazuje on właściwości przeciwwirusowych, gdy podawany jest po lub w trakcie infekcji. W testach na zwierzętach użyto specjalnego sytemu do pomiaru temperatury ciała i ogólnej aktywności motorycznej. U myszy inhalowanych aerozolowym preparatem z czystka nie rozwijały się objawy choroby i nie wykazano różnic w temperaturze ciała i aktywności ruchowej. Myszy z grupy kontrolnej wykazały po 8 dniach od zakażenia wirusem objawy kliniczne [61]. Podobne obserwacje odnotowali Ehrhardt i wsp. [62]. Ekstrakt CYSTUS052 hamował aktywność różnych podtypów ptasiej i ludzkiej grypy w hodowlach komórek A549 i MDCK. Przy dawce 50 µg/ml wyciąg z czystka nie wykazywał szkodliwego wpływu na żywotność komórek, ich metabolizm ani podziały. Wirusy nie rozwijały oporności na ekstrakt w porównaniu z amantadyną, kiedy to wytworzenie wariantów opornych następowało po kilku pasażach. Autorzy tego badania uważają, że polifenole obecne w preparacie zaburzają wiązanie się protein powierzchniowych wirusa z receptorami komórkowymi gospodarza [62].

Przeprowadzono prospektywne, randomizowane, kontrolowane placebo badanie kliniczne na 160 pacjentach (7–81 lat) z objawami infekcji górnych dróg oddechowych. W celu określenia czynnika etiologicznego choroby (infekcja bakteryjna czy wirusowa), badanym pobierano wymazy z gardła i wykonano testy celem wykrycia wirusa grypy A i B (BioStar OIA FLU A/B). W przeprowadzonych badaniach 57,5% pacjentów wykazywało zakażenie wirusowe. Badanych przydzielono losowo do dwóch grup. Pierwsza otrzymywała tabletki do ssania z preparatem CYSTUS052 (ok. 220 mg polifenoli), druga grupa otrzymywała placebo. Pacjentów leczono i obserwowano do 7 dni. Za pomocą kwestionariusza oceniano występowanie objawów klinicznych u pacjenta (ból gardła, kaszel, w tym kaszel produktywny, katar). Dodatkowo oznaczano we krwi markery stanu zapalnego (prokalcytonina, białko C-reaktywne) w 1, 4 i 7 dniu. Odnotowano, że preparat z czystka

zmniejszał średni czas trwania choroby i nasilenie objawów, które ustępowały szybciej w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną. Spośród markerów stanu zapalnego, stężenie białka C-reaktywnego uległo znacznemu obniżeniu w grupie stosującej pastylki z czystkiem. Mechanizm działania przeciwwirusowego i przeciwbakteryjnego w zakażeniu górnych dróg oddechowych nie jest jasny. Oprócz wcześniejszych sugestii, naukowcy przypisują skuteczność działania kombinacji kilku efektów biologicznych. Uznali za prawdopodobne, że substancje czynne uwalniane z pastylek do ssania są transportowane z jamy ustnej w postaci aerozolu wraz z aspirowanym do dróg oddechowych powietrzem [63]. Ci sami autorzy przeprowadzili drugie prospektywne, randomizowane badanie z udziałem 300 pacjentów (5–85 lat) w celu porównania działania wyciągu z czystka z zieloną herbatą w infekcji górnych dróg oddechowych. Tak samo jak poprzednio zidentyfikowano przyczynę infekcji. Wśród ochotników 43,7% miało infekcję wirusową, u 2% pacjentów wystąpiła infekcja obu typów. Terapię rozpoczęto od pierwszych objawów klinicznych i leczono przez okres do 7 dni. Badanych przydzielono do dwóch grup. Pierwsza otrzymywała pastylki z preparatem CYSTUS052, 6 razy dziennie po 2 sztuki. Druga grupa w pierwszym dniu płukała jamę ustną i przyjmowała doustnie 8 razy dziennie po 100 ml zielonej herbaty, a przez kolejne dni cztery razy dziennie. Badanie objawów subiektywnych (ból, intensywność i częstotliwość kaszlu, obecność płwociny, nieżyt nosa) oceniano na podstawie kwestionariusza. Odnotowano wyraźną poprawę i ustępowanie objawów w grupie pacjentów leczonych wyciągiem z czystka po średnio 3 dniach. Porównano intensywność poszczególnych objawów klinicznych w obu badanych grupach wykazując, że w grupie pacjentów stosujących preparat z czystka objawy kliniczne były mniej nasilone, z wyjątkiem nieżyty nosa. W przypadku zielonej herbaty odnotowano tylko nieznaczne obniżenie intensywności bólu. Wydaje się, że jakościowe i ilościowe różnice w składnikach aktywnych, ich budowie i biodostępności to główne powody, dla których preparat z czystkiem okazuje się bardziej skuteczny w porównaniu z zieloną herbatą, jako środek przeciwwirusowy i przeciwbakteryjny w infekcjach górnych dróg oddechowych [64].

### **Działanie przeciwzapalne**

Za działanie przeciwzapalne przetworów z czystka odpowiadają głównie flawonoidy, które wpływają hamująco na aktywność cyklooksygenaz (COX), powodując w ten sposób zmniejszenie

wytwarzania prozapalnych cytokin (leukotrienów i prostagladyn) oraz zmniejszenie odczynu zapalnego.

U myszy wywołano ostry stan zapalny aplikując na ucho octan tetradekanoiloforbolu (TPA). Powodowało to znaczny obrzęk i tkliwość uszu u badanych zwierząt. Grupie badanej podawano miejscowo jednocześnie wodny ekstrakt z czystka szarego lub wyizolowaną frakcję bogatą w oligomeryczne proantocyjanidyny. Odnotowano zmniejszenie stanu zapalnego zależne od dawki (0,5 i 1 mg), które wynosiło 64–74% dla wyciągu wodnego i 72–82% dla frakcji proantocyjanidynowej. Porównując, 1 mg frakcji wzbogaconej w proantocyjanidyny wywoływał efekt przeciwzapalny podobny do 0,5 mg indometacyny. Dodatkowo przeprowadzono testy hamowania działania COX-1 i -2. Wykazano, że wodny wyciąg działał skuteczniej ( $IC_{50}$  63,2  $\mu$ M) niż frakcja proantocyjanidyn ( $IC_{50}$  93,7  $\mu$ M) wobec COX-1, natomiast odwrotną zależność odnotowano przy COX-2 ( $IC_{50}$  wynosiło odpowiednio 23,1 i 44,7  $\mu$ M). Efekty odniesiono do działania kwasu acetylosalicylowego. Oceniono również aktywność hamowania COX przez wyizolowane związki galokatechiny (4 $\alpha$ →6)-galokatechiny (4 $\alpha$ →8)-galokatechiny i galusan-3-O-galokatechiny (4 $\beta$ →8)-galusanu-3-epigalokatechiny (4 $\beta$ →8)-galokatechiny. Związek drugi charakteryzował się silniejszym działaniem hamującym ( $IC_{50}$  4,5  $\mu$ M) COX-2 niż związek kontrolny (17,4  $\mu$ M) [39].

Leukocyty, m.in. neutrofile i limfocyty T, a w tkankach makrofagi, pełnią istotne funkcje w kontroli prawidłowego przebiegu miejscowej reakcji zapalnej. Proteazy, uwalniane przez te komórki, regulują miejscową odpowiedź układu immunologicznego poprzez aktywację lub degradację neuropeptydów, czynników wzrostu i cytokin. Mechanizmy te są zwykle kontrolowane przez endogenne inhibitory, jednakże zaburzenia w układzie proteolitycznym i antyproteolitycznym często towarzyszą przewlekłemu stanowi zapalnemu. W takich przypadkach korzystne może być zarówno hamowanie aktywności proteolitycznej, jak i zmniejszenie liczby naciekających komórek układu odpornościowego [65, 66]. Obserwuje się wzmożoną ekspresję aminopeptydazy alaninowej i dipeptydylopeptydazy IV w trakcie aktywacji komórek. T. Lendeckel i wsp. [66] przeprowadzili testy *in vitro* oceniające przeciwzapalne działanie wodnego wyciągu z czystka szarego, mierząc zahamowanie aktywności enzymatycznej wymienionych peptydaz. Ponadto, badano wpływ ekstraktu na proliferację i syntezę DNA ludzkich komórek T i linii ludzkich komórek T (KARPAS-299). Autorzy badania odnotowali hamujące działanie wyciągu z czystka na powierzchniowe peptydazy

leukocytów, przy czym aminopeptydaza alaninowa wydawała się bardziej wrażliwa. Zauważono, że hamowanie produkcji cytokin prozapalnych (interleukiny-1) jest zależne od dawki. Niższe stężenia wyciągu (0,05%) indukowały ekspresję cytokin, podczas gdy wyższe stężenia (0,5%) nie sprzyjały ich produkcji i wydzielaniu. Wykazano, że wodne wyciągi z czystka, zależnie od dawki, zmniejszały syntezę DNA komórek T oraz hamowały szybkość proliferacji ludzkiej linii komórkowej KARPAS-299. Wyniki tego badania pokazują, że wodne ekstrakty w zależności od dawki modulują wzrost, żywotność i uwalnianie cytokin przez leukocyty. Dzięki normalizacji ilości i funkcji komórek układu odpornościowego oraz cytokin prozapalnych możliwe jest zmniejszenie uszkodzeń wywołanych nadmierną odpowiedzią immunologiczną oraz przyspieszenie procesu gojenia się ran [66].

### Działanie antyproliferacyjne i cytotoksyczne

Dla ekstraktów z pędów i korzeni czystka kreteńskiego przeprowadzono testy *in vitro* oceniające cytotoksyczność wobec linii komórek nowotworowych z wykorzystaniem metody z barwnikiem sulforodaminą B (SRB). Udowodniono cytotoksyczne działanie wyciągów z pędów czystka wobec komórek nowotworowych szyjki macicy (HeLa), gruczołu sutkowego (MDA-MB-453) i czerniaka (FemX). Takiego działania nie udokumentowano w przypadku ekstraktu z korzeni. Fakt ten tłumaczy się obecnością diterpenów typu labdanu, które występowały w pędach roślin, ale nie potwierdzono ich w ekstrakcie z korzeni [67]. W piśmiennictwie naukowym można odnaleźć wiele badań na temat działania cytotoksycznego i przeciwnowotworowego diterpenów typu labdanu, pozyskiwanych z żywicy labdanum oraz z nadziemnych części gatunków rodzaju *Cistus*. W jednym z pierwszych eksperymentów *in vitro* nad działaniem antyproliferacyjnym, prowadzonym na kilku liniach komórek nowotworowych (KB, P-388 i NSCLCN6), wykazano, że wysoką aktywność hamującą proliferację posiadają octan labd-13(E)-en-8 $\alpha$ -ol-15-yli, sklareol i 13-epi-sklareol. Natomiast labd-7,13(E)-dien-15-ol, tlenek manoilu i tlenek 13-epi-manoilu charakteryzowały się działaniem umiarkowanym [51]. W innym badaniu wykazano, że labd-7,13(E)-dien-15-ol, labd-13(E)-en-8 $\alpha$ ,15-diol, oraz octan labd-7,13(E)-dien-15-yli wykazywały właściwości cytotoksyczne wobec linii komórkowych MOLT 3 i H9 (linia ludzkich komórek T pochodząca od pacjenta z ostrą białaczką limfoblastyczną), RAJI (linia komórkowa limfocytów B pochodząca od pacjenta z chłoniakiem Burkitta) [68].

Labd-13(E)-en-8 $\alpha$ ,15-diol i jego octan, w testach *in vitro* w stężeniach niższych niż 100  $\mu$ M, charakteryzowały się silnym działaniem hamującym rozwój różnych linii komórkowych ludzkich białaczek. Różnica w strukturze związków, jaką jest obecność grupy acetylowej w pozycji C-13, nie wpływała znacząco na działanie antyproliferacyjne, oba związki posiadały podobną aktywność wobec testowanych linii [69, 70]. Sklareol, występujący w liściach i owocach czystka kreteńskiego, indukował śmierć komórek w liniach T-komórkowych ludzkich białaczek i zakłócał cykl komórkowy, zatrzymując go w fazie G<sub>0/1</sub>. Analiza metodą Western Blot potwierdziła zmniejszoną ekspresję protoonkogenu c-myc i maszyną apoptozę w komórkach H33AJ-JA1 i MOLT3. Ekspresja białka antyapoptotycznego Bcl-2 pozostała niezmienną [71]. Sklareol wpływał również na czynniki charakterystyczne dla indukcji apoptozy w liniach komórkowych raka okrężnicy (HCT116). W badaniu *in vitro* wykazano, że związek ten hamował syntezę DNA, indukował zatrzymanie komórek w fazie G<sub>1</sub> cyklu komórkowego oraz aktywował kaspazy 8 i 9, degradację PARP i fragmentację DNA. Autorzy przeprowadzili również badanie *in vivo* na mysim modelu z heteroprzeszczepem raka jelita grubego (HCT116). Oceniano przeciwnowotworowe właściwości sklareolu u myszy NOD/SCID pozbawionych funkcjonalnych limfocytów B i T. Podawanie wodnego roztworu w dawkach do 50 mg/kg m.c. nie wpływało w ogóle na progresję guzów. Większe dawki okazywały się toksyczne i prowadziły do śmierci zwierząt. Zastosowanie liposomów, jako nośników substancji lipofilowych, pozwoliło na zwiększenie dawki związku do 275 mg/kg m.c., nie powodując przy tym efektów toksycznych. Wykazano, że u zwierząt, którym podano sklareol w postaci liposomów, średnia masa nowotworów była o 50% niższa niż w grupie kontrolnej [72]. Ponadto, sklareol hamował wzrost w fazie G<sub>1/S</sub> ludzkich linii komórkowych raka piersi MN1 i MDD2. Dodatkowo zwiększał aktywność stosowanych leków przeciwnowotworowych (etopozydu, doksorubicyny i cisplatyny) w stosunku do MDD2 [73].

Inni naukowcy zasugerowali, że przetwory z czystka szarego i substancje aktywne w nim zawarte mogą okazać się pomocne przy leczeniu łagodnego przerostu prostaty. Oceniano cytotoksyczne i antyproliferacyjne działanie liofilizowanego, wodnego wyciągu z czystka szarego pochodzącego z Sycylii. W badaniach wykorzystano linię komórkową fibroblastów płuc (V79-4) oraz ludzkie linie komórkowe prostaty (PZ-HPV-7, PNT1A). Działanie hamujące wzrost badano za pomocą testu MTT (redukcji soli tetrazolowej) oraz testu SRB (z sulfrodaminą). W teście cytotoksyczności

(metodą barwienia błękitem trypanu) wyciąg z czystka działał hamująco na rozwój komórek oraz powodował spadek ich żywotności. Prawdopodobnie, za odnotowane aktywności odpowiadają związki polifenolowe, a w szczególności flawonoidy, jednakże mechanizm działania nie jest jasny [74].

### Inne właściwości

Jak wcześniej wspomniano, *C. incanus* był używany tradycyjnie w leczeniu chorób i dolegliwościach przewodu pokarmowego, w biegunkach oraz jako środek o działaniu spazmolitycznym. W jednym z badań *in vitro* oceniano działanie rozkurczające liofilizowanego wodnego wyciągu z czystka szarego, pochodzącego z Sycylii, na izolowaną mięśniówkę gładką szczurzego jelita oraz aorty. Wyciąg zależnie od stężenia hamował skurcz mięśni wywołany acetylocholiną, fenylefryną i KCl. Mechanizmy leżące u podstaw tego działania wymagają jednak dalszych badań, choć sugeruje się zarówno bezpośrednie działanie na mięśnie gładkie, jak i pośrednie działanie przez uwalnianie neuroprzekaźników. Aktywność spazmolityczną przypisano związkom flawonoidowym, w tym kwercytynie, kemferolowi, mirycetynie, flawan-3-olom i proantocyjanidynom. Działanie rozkurczowe na mięśnie gładkie jelita wyjaśnia tradycyjne zastosowanie przetworów z czystka szarego w dolegliwościach trawiennych, natomiast obniżanie napięcia mięśniówki naczyń krwionośnych może w przyszłości znaleźć zastosowanie w terapii wspomagającej w chorobie nadciśnieniowej [75].

Związki zidentyfikowane w czystku szarym, a w szczególności należące do diterpenów typu labdanu, flawonoli, flawan-3-oli, proantocyjanidyn, mają szeroko udokumentowane działanie gastroprotektoryjne. Wymienione składniki chronią błonę śluzową przewodu pokarmowego przed uszkodzeniami eksperymentalnie indukowanymi chemicznie i przed różnymi czynnikami wywołującymi zmiany martwicze. Efekty te są tłumaczone różnymi mechanizmami działania. Przede wszystkim, wielofenole roślinne wykazują silne właściwości przeciwutleniające, chroniąc komórki przed uszkodzeniami wywołanymi stresem oksydacyjnym i stanem zapalnym. Wykazują działanie cytoprotekcyjne oraz wpływają na wzrost produkcji śluzu w przewodzie pokarmowym. Kwercetyna hamuje działanie ATP-azy, zależnej od jonu potasowego i wodorowego (H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPaza), obecnej w komórkach okładzinowych żołądka oraz wykazuje właściwości przeciwhistaminowe, co wpływa na zmniejszenie wydzielania kwasu żołądkowego. Dodatkowo kwercetyna i katechina hamują wzrost i rozwój *Helicobacter pylori* [76, 77]. Odnotowano działanie przeciwrzodowe wodnego wyciągu

z nadziemnych części *C. incanus* w badaniu *in vivo*. U zwierząt doświadczalnych wywołano uszkodzenia żołądka kwasem solnym, etanolem, indometacyną, serotoniną i rezerpiną. Ekstrakt bogaty we flawonoidy podawano doustnie (0,25–0,5 g/kg m.c.). Stwierdzono zależny od dawki efekt ochronny wobec wszystkich użytych substancji. Największą aktywność zauważono w przypadku przekrwienia błony śluzowej i wrzodów krwotocznych indukowanych rezerpiną i serotoniną. Autorzy tego badania sugerują, że działanie ochronne czystka szarego związane jest z poprawą mikrokrążenia śluzówkowego oraz hamowaniem degranulacji komórek tucznych, których rozpad uwalnia duże ilości histaminy [77].

Oceniano wpływ wodnego ekstraktu z czystka szarego na stres oksydacyjny i dyslipidemię, które są kluczowymi czynnikami w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych. Dwudziestu czterem zdrowym ochotnikom podawano przez 12 tygodni, 3 razy dziennie, napar z *C. incanus* zawierający flawonoidy i fenolokwasy. Analizowano profil lipidowy oraz markery stresu oksydacyjnego, (di) aldehyd malonowy (MDA) jako marker peroksydacji lipidów i zaawansowane produkty utleniania białek (ang. *advanced oxidation protein products*, AOPP) jako marker peroksydacji białek. Profil lipidowy osób badanych uległ znacznej poprawie. Odnotowano wzrost stężenia HDL oraz spadek poziomu triglicerydów (TG). Zmniejszyły się również poziomy markerów stresu oksydacyjnego (MDA o 16%, AOPP o 18%) po 6 tygodniach badania. Zmiany markerów nie postępowały w następnych tygodniach. Przytoczone wyniki pozwalają wnioskować, że wyciągi z czystka, jako źródło polifenoli w diecie, mogą obniżyć ryzyko wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych [78].

Olejek eteryczny pozyskiwany z *C. incanus* wykazywał *in vitro* właściwości neuroochronne. Silnie hamował działanie butyrylocholinesterazy, słabiej acetylocholinoesterazy – enzymów związanych z rozwojem choroby Alzheimera. Efekt ten tłumaczy się synergicznym działaniem mieszaniny niektórych związków terpenowych, w szczególności  $\alpha$ -pinenu,  $\beta$ -pinenu, *p*-cymenu, 1,8-cyneolu i linalolu [18].

### Podsumowanie

Niniejszy przegląd piśmiennictwa naukowego pozwala stwierdzić, że *C. incanus* oraz jego podgatunki mogą być cennym uzupełnieniem diety w związki wielofenolowe. Przedstawiane analizy chemiczne wykazały, że głównymi składnikami występującymi w czystku szarym są flawonoidy, w tym glikozydy flawonoli (mirycetyny, kwercetyny, kemferolu), flawan-3-ole oraz garbniki.

Obecność tych związków warunkuje terapeutyczne i prozdrowotne właściwości liści czystka szarego i jego przetworów. Dotyczy to przede wszystkim silnego działania przeciwutleniającego, które może obniżyć ryzyko wystąpienia przewlekłych chorób niezakaźnych, w tym chorób układu krążenia, neurodegeneracyjnych oraz chorób nowotworowych. Przetwory z czystka mogą być również rekomendowane jako środki immunomodulujące, wspomagające leczenie infekcji bakteryjnych i wirusowych. Aromatyczna olejowica labdanum oraz olejek eteryczny pozyskiwany z czystka szarego stanowią cenne źródło substancji o właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwzapalnych, które mogą w przyszłości być szerzej wykorzystane w produkcji preparatów farmaceutycznych i kosmetycznych oraz jako naturalny konserwant do żywności.

O ile użycie tego surowca jako środka przeciwdrobnoustrojowego nie stanowi wyzwania w przypadku stosowania miejscowego, to wykorzystanie produktów z czystka szarego w zakresie przeciwwirusowym (ogólnym) wymaga opracowania efektywnej metody podania składników do miejsca infekcji. Popularyzując zastosowania liści czystka w sposób zrównoważony, nie można pomijać możliwych interakcji składników tej substancji roślinnej (korzystnych i niekorzystnych) z mikrobiotą jelitową oraz ich potencjalnego wpływu na wchłanianie z przewodu pokarmowego składników pokarmowych i substancji trzecich, np. leków – analogicznie jak ma to miejsce w przypadku nadmiernego przyjmowania wyciągów z liści herbaty. Podobnie jak w przypadku innych przetworów ziołowych, stosowanych przez pacjentów „na własną rękę”, wiele działań (zarówno korzystnych, jak i niepożądanych) umyka uwadze ogółu. Wartościowe byłoby, gdyby pacjenci korzystający z samodzielnie przygotowywanych przetworów z czystka szarego, informowali o tym swoich lekarzy prowadzących. Samoobserwacja w trakcie takiej terapii i odnotowywanie sytuacji, w których szczególnie widoczny jest wpływ na terapię wiodącą lub gdy dochodzi do zdarzeń nie do końca wyjaśnionych, powinna być jednocześnie dobrą praktyką i zwiększać wiedzę na temat praktycznego aspektu ziołolecznictwa – wśród pacjentów, lekarzy i instytucji odpowiedzialnych za monitorowanie działań produktów leczniczych, w tym działań niepożądanych.

### Piśmiennictwo

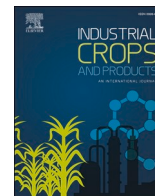
1. Papaefthimiou D, Papanikolaou A, Falara V, Givanoudi S, Kostas S, Kanellis AK. Genus *Cistus*: A model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Front Chem.* 2014; 2: 35.



2. Kubica P, Ekiert H, Ekiert R, Szopa A. Gatunki rodzaju *Cistus* sp. – taksonomia, występowanie, skład chemiczny, aplikacje terapeutyczne i badania biotechnologiczne. *Postępy Fitoter.* 2016; 17(3): 179–188.
3. Guzmán B, Vargas P. Historical biogeography and character evolution of *Cistaceae* (*Malvales*) based on analysis of plastid *rbcL* and *trnL-trnF* sequences. *Org Divers Evol.* 2009; 9(2): 83–99.
4. Guzmán B, Vargas P. Systematics, character evolution, and biogeography of *Cistus* L. (*Cistaceae*) based on ITS, *trnL-trnF*, and *matK* sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 2005; 37(3): 644–660.
5. World Flora Online [online]. Dostępny w internecie: <http://www.worldfloraonline.org>. Dostęp: 5.11.2020.
6. Newerli-Guz J, Erdman M. Ocena wybranych wyróżników jakościowych czystka (róży skalnej) *Cistus incanus* L. *Probl Hig Epidemiol.* 2015; 96(3): 693–696.
7. Falchi A, Paolini J, Desjoberg JM, Melis A, Costa J, Varesi L. Phylogeography of *Cistus creticus* L. on Corsica and Sardinia inferred by the *trnL-F* and *rpl32-trnL* sequences of cpDNA. *Mol Phylogenet Evol.* 2009; 52(2): 538–543.
8. Čarni A, Matevski V, Šile U. Morphological, chorological and ecological plasticity of *Cistus incanus* in the southern Balkans. *Plant Biosyst.* 2010; 144(3): 602–617.
9. Barrajón-Catalán E, Tomás-Menor L, Morales-Soto A, Bruñá NM, López DS, Segura-Carretero A, et al. Rockroses (*Cistus* sp.) Oils. W: Preedy VR, red. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Cambridge: Academic Press; 2016. s. 649–658.
10. Robert S. *Cistinae: The Natural Order of Cistus, or Rock-Rose; Illustrated by Coloured Figures & Descriptions of All the Distinct Species*. Sydney: Wentworth Press; 2016. s. 35–112.
11. Paolini J, Falchi A, Quilichini Y, Desjoberg JM, de Cian MC, Varesi L, et al. Morphological, chemical and genetic differentiation of two subspecies of *Cistus creticus* L. (*C. creticus* subsp. *eriocephalus* and *C. creticus* subsp. *corsicus*). *Phytochemistry* 2009; 70(9): 1146–1160.
12. Christodoulakis NS, Georgoudi M, Fasseas C. Leaf structure of *Cistus creticus* L. (rock rose), a medicinal plant widely used in folk remedies since ancient times. *J Herbs, Spices Med Plants.* 2014; 20(2): 103–114.
13. Aronne G, de Micco V. Seasonal dimorphism in the Mediterranean *Cistus incanus* L. subsp. *incanus*. *Ann Bot.* 2001; 87(6): 789–794.
14. Gülz PG, Herrmann T, Hangst K. Leaf trichomes in the genus *Cistus*. *Flora.* 1996; 191(1): 85–104.
15. Klebańska J. Porównanie składu chemicznego produktów *Cistus × incanus* L. dostępnych komercyjnie. Praca magisterska, promotor: Fecka I. Wrocław: Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu; 2017.
16. Demetzos C, Mitaku S, Loukis A, Harvala C, Gaily A. A new dimeric sesquiterpene, isomers of manoyl oxide and other volatile constituents from the resin “Ladano” of *Cistus incanus* subsp. *creticus* (L.) Heywood. *J Essent Oil Res.* 1994; 6(1): 37–41.
17. Szeremeta D, Knas M, Długosz E, Sajewicz M. Qualitative evaluation of composition of the volatile fraction in commercial samples of *Cistus incanus* L. *Acta Chromatogr.* 2017; 29(3): 427–442.
18. Loizzo MR, Jemia MB, Senatore F, Bruno M, Menichini F, Tundis R. Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils. *Food Chem Toxicol.* 2013; 59(9): 586–594.
19. Demetzos C, Loukis A, Spiliotis V, Zoakis N, Stratigakis N, Katerinopoulos HE. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cistus creticus* L. *J Essent Oil Res.* 1995; 7(4): 407–410.
20. Demetzos C, Katerinopoulos H, Kouvarakis A, Stratigakis N, Loukis A, Ekonomakis C, et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*. *Planta Med.* 1997; 63(5): 477–479.
21. Demetzos C, Anastasaki T, Perdetzoglou D. A chemometric interpopulation study of the essential oils of *Cistus creticus* L. growing in Crete (Greece). *Zeitschrift für Naturforsch - Sect C J Biosci.* 2002; 57(1–2): 89–94.
22. Mastino PM, Marchetti M, Costa J, Usai M. Interpopulation variability in the essential oil composition of *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* from Sardinia. *Chem Biodivers.* 2018; 15(9): 151.
23. Maggi F, Lucarini D, Papa F, Peron G, Dall’Acqua S. Phytochemical analysis of the labdanum-poor *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* (Viv.) Greuter et Burdet growing in central Italy. *Biochem Syst Ecol.* 2016; 66(3): 50–57.
24. Anastasaki T, Demetzos C, Perdetzoglou D, Gazouli M, Loukis A, Harvala C. Analysis of labdane-type diterpens form *Cistus creticus* (subsp. *creticus* and subsp. *eriocephalus*), by GC and GC-MS. *Planta Med.* 1999; 65(8): 735–739.
25. Demetzos C, Stahl B, Anastasaki T, Gazouli M, Tzouveleki LS, Rallis M. Chemical analysis and antimicrobial activity of the resin Ladano, of its essential oil and of the isolated compounds. *Planta Med.* 1999; 65(1): 76–78.
26. Waed A, Ghaliya S, Adawia K. Evaluation of radical scavenging activity, total phenolics and total flavonoids contents of *Cistus* species in Syria. *Int J Pharmacogn Phytochem Res.* 2016; 8(7): 1071–1077.
27. Viapiana A, Konopacka A, Waleron K, Wesolowski M. *Cistus incanus* L. commercial products as a good source of polyphenols in human diet. *Ind Crops Prod.* 2017; 107(22): 297–304.
28. Dimcheva V, Karsheva M. *Cistus incanus* from Strandja mountain as a source of bioactive antioxidants. *Plants* 2018; 7(1): 1–15.
29. Dimcheva V, Kaloyanov N, Karsheva M. The polyphenol composition of *Cistus incanus* L., *Trachystemon orientalis* L. and *Melissa officinalis* L. infusions by HPLC-DAD method. *Open J Anal Bioanal Chem.* 2019; 3(1): 31–38.
30. Gori A, Nascimento LB, Ferrini F, Centritto M, Brunetti C. Seasonal and diurnal variation in leaf phenolics of three medicinal mediterranean wild species: What is the best harvesting moment to obtain the richest and the most antioxidant extracts? *Molecules* 2020; 25(4): 956.
31. Riehle P, Vollmer M, Rohn S. Phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal infusions – Antioxidant capacity and thermal stability during the brewing process. *Food Res Int.* 2013; 53(2): 891–899.
32. Kubica P, Szopa A, Ekiert H. In vitro shoot cultures of pink rock-rose (*Cistus × incanus* L.) as a potential source of phenolic compounds. *Acta Soc Bot Pol.* 2017; 86(4): 1–11.
33. Wittpahl G, Kölling-Speer I, Basche S, Herrmann E, Hannig M, Speer K, et al. The Polyphenolic composition of *Cistus incanus* herbal tea and its antibacterial and anti-adherent activity against *Streptococcus mutans*. *Planta Med.* 2015; 81(18): 1727–1735.
34. Barrajón-Catalán E, Fernández-Arroyo S, Roldán C, Guillén E, Saura D, Segura-Carretero A, et al. A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: Evolutionary relationship. *Phytochem Anal.* 2011; 22(4): 303–312.
35. Gori A, Ferrini F, Marzano MC, Tattini M, Centritto M, Baratto MC, et al. Characterisation and antioxidant activity of crude extract and polyphenolic rich fractions from *C. incanus* leaves. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(8): 1344.
36. Riehle P, Rusche N, Saake B, Rohn S. Influence of the leaf content and herbal particle size on the presence and extractability of quantitated phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal teas. *J Agric Food Chem.* 2014; 62(45): 10978–10988.
37. Jeszka-Skowron M, Zgola-Grześkowiak A, Frankowski R. *Cistus incanus* a promising herbal tea rich in bioactive compounds: LC-MS/MS determination of catechins, flavonols, phenolic acids and alkaloids – A comparison with *Camellia sinensis*, Rooibos and Hoan Ngoc herbal tea. *J Food Compos Anal.* 2018; 74(11–12): 71–81.
38. Santagati NA, Salerno L, Attaguile G, Savoca F, Ronsisvalle G. Simultaneous determination of catechins, rutin, and gallic acid in *Cistus* species extracts by HPLC with diode array detection. *J Chromatogr Sci.* 2008; 46(2): 150–156.
39. Mansoor KA, Matalka KZ, Qa’dan FS, Awad R, Schmidt M. Two new proanthocyanidin trimers isolated from *Cistus incanus* L. demonstrate potent anti-inflammatory activity and selectivity to cyclooxygenase isoenzymes inhibition. *Nat Prod Res.* 2016; 30(17): 1919–1926.
40. Kreimeyer J, Peteret F, Nahrstedt A. Separations of flavan-3-ols and dimeric proanthocyanidins by capillary electrophoresis. *Planta Med.* 1998; 64(1): 63–67.
41. Peteret F, Kolodziej H, Nahrstedt A. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochemistry* 1991; 30(3): 981–985.
42. Gawel-Bęben K, Kukula-Koch W, Hoian U, Czop M, Strzypek-Gomółka M, Antosiewicz B. Characterization of *Cistus × incanus* L. and *Cistus ladanifer* L. extracts as potential multifunctional antioxidant ingredients for skin protecting cosmetics. *Antioxidants* 2020; 9(3): 202.
43. Attaguile G, Russo A, Campisi A, Savoca F, Acquaviva R, Ragusa N, et al. Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. *Cell Biol Toxicol.* 2000; 16(2): 83–90.
44. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to various food(s)/food constituent(s) and protection of cells from premature aging, antioxidant activity, antioxidant content and antioxidant properties, and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) (online). EFSA J. 2010; 8(2): 1–63. Dostępny w internecie: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2010.1489>. Dostęp: 3.11.2020.

45. Alsabri SG, Zetrini AE, Ermeli NB, Mohamed SB, Bensaber SM, Hermann A, et al. Study of eight medicinal plants for antioxidant activities. *J Chem Pharm Res.* 2012; 4(8): 4028–4031.
46. Dimcheva V, Karsheva M. Antioxidant activity and polyphenolic content of the Bulgarian wild herb *Cistus incanus* L. stored under different conditions. *J Chem Technol Metall.* 2017; 52(5): 781–790.
47. Szeremeta D, Knaś M, Długosz E, Kowalska T, Sajewicz M. Thin-layer chromatographic fingerprinting of the nonvolatile fraction extracted from the medicinal herb *Cistus incanus* L. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2017; 40(5–6): 304–310.
48. Ait Lahcen S, El Hattabi L, Benkaddour R, Chahboun N, Ghanmi M, Satrani B, et al. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antifungal activity of Moroccan *Cistus creticus* leaves. *Chem Data Collect.* 2020; 26(2): 100346.
49. Hutschenreuther A, Birkemeyer C, Grötzinger K, Straubinger RK, Rauwald HW. Growth inhibiting activity of volatile oil from *Cistus creticus* L. against *Borrelia burgdorferi* s.s. *in vitro.* *Pharmazie* 2010; 65: 290–295.
50. Kubica P, Ekiert H, Ekiert RJ, Szopa A. Gatunki rodzaju *Cistus* sp. – taksonomia, występowanie, skład chemiczny, aplikacje terapeutyczne i badania biotechnologiczne. Species of the genus *Post Fitoter.* 2016; 17(3): 179–188.
51. Chinou I, Demetzos C, Harvala C, Roussakis C, Verbist F. Cytotoxic and antibacterial labdane-type diterpenes from the aerial parts of *Cistus incanus* subsp. *creticus.* *Planta Med.* 1994; 60(1): 34–36.
52. Kalpoutzakis E, Chinou I, Mitaku S, Skaltsounis A, Harvala C. Antibacterial labdane-type diterpenes from the resin “Ladano” of *Cistus creticus* subsp. *creticus.* *Nat Prod Lett.* 1998; 11(2): 173–179.
53. Kalpoutzakis E, Aligiannis N, Mitaku S, Chinou I, Harvala C, Skaltsounis A. New semisynthetic antimicrobial labdane-type diterpenoids derived from the resin “Ladano” of *Cistus creticus.* *Zeitschrift für Naturforsch C.* 2014; 56(1–2): 14–17.
54. Bouamama H, Noël T, Villard J, Benharref A, Jana M. Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. *J Ethnopharmacol.* 2006; 104(1–2): 104–107.
55. Güvenç A, Yıldız S, Özkan AM, Erdurak CS, Coşkun M, Yılmaz G, et al. Antimicrobial studies on Turkish *Cistus* species. *Pharm Biol.* 2005; 43(2): 178–183.
56. Szeremeta D, Knaś M, Długosz E, Krzykała K, Mrozek-Wilczkiewicz A, Musiol R, et al. Investigation of antibacterial and cytotoxic potential of phenolics derived from *Cistus incanus* L. by means of thin-layer chromatography–direct bioautography and cytotoxicity assay. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2018; 41(6):349–357.
57. Hannig C, Spitzmüller B, Al-Ahmad A, Hannig M. Effects of *Cistus*-tea on bacterial colonization and enzyme activities of the *in situ* pellicle. *J Dent.* 2008; 36(7): 540–545.
58. Hannig C, Sorg J, Spitzmu B, Hannig M, Al-Ahmad A. Polyphenolic beverages reduce initial bacterial adherence to enamel *in situ.* *J Dent.* 2009; 37(7): 560–566.
59. Tomás-Menor L, Morales-Soto A, Barrañón-Catalán E, Roldán-Segura C, Segura-Carretero A, Micol V. Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species. *Food Chem Toxicol.* 2013; 55(5): 313–322.
60. Rebensburg S, Helfer M, Schneider M, Koppensteiner H, Eberle J, Schindler M, et al. Potent *in vitro* antiviral activity of *Cistus incanus* extract against HIV and filoviruses targets viral envelope proteins. *Sci Rep.* 2016; 6: 20394.
61. Droebner K, Ehrhardt C, Poetter A, Ludwig S, Planz O. CYSTUS052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice. *Antiviral Res.* 2007; 76(1): 1–10.
62. Ehrhardt C, Hrincius ER, Korte V, Mazur I, Droebner K, Poetter A, et al. A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antiviral Res.* 2007; 76(1): 38–47.
63. Kalus U, Grigorov A, Kadecki O, Jansen JP, Kiesewetter H, Radtke H. *Cistus incanus* (CYSTUS052) for treating patients with infection of the upper respiratory tract. A prospective, randomised, placebo-controlled clinical study. *Antiviral Res.* 2009; 84(3): 267–271.
64. Kalus U, Kiesewetter H, Radtke H. Effect of CYSTUS052 and green tea on subjective symptoms in patients with infection of the upper respiratory tract. *Phytoterapy Res.* 2010; 24(1): 96–100.
65. Demetzos C, Dimas KS. Labdane-type Diterpenes: Chemistry and Biological Activity. W: Atta-ur-Rahman, red. *Studies in Natural Products Chemistry: tom 25 (Bioactive Natural Products, część F).* Amsterdam: Elsevier Science; 2001. s. 235–292.
66. Lendeckel U, Arndt M, Wolke C, Reinhold D, Kähne T, Ansoerge S. Inhibition of human leukocyte function, alanyl aminopeptidase (APN, CD13) and dipeptidylpeptidase IV (DP IV, CD26) enzymatic activities by aqueous extracts of *Cistus incanus* L. ssp. *incanus.* *J Ethnopharmacol.* 2002; 79(2): 221–227
67. Skorić M, Todorović S, Gligorijević N, Janković R, Zivković S, Ristić M, et al. Cytotoxic activity of ethanol extracts of *in vitro* grown *Cistus creticus* subsp. *creticus* L. on human cancer cell lines. *Ind Crops Prod.* 2012; 38(4): 153–159.
68. Demetzos C, Mitaku S, Couladis M, Kokkinopoulos D. Natural metabolites of *ent*-13-*epi*-manoyl oxide and other cytotoxic diterpenes from the resin “Ladano” of *Cistus creticus.* *Planta Med.* 1994; 60(6): 590–591.
69. Dimas K, Demetzos C, Marsellos M, Sotiriadou R, Malamas M., Kokkinopoulos D. Cytotoxic activity of labdane type diterpenes against human leukemic cell lines *in vitro.* *Planta Med.* 1998; 64(3): 208–211.
70. Demetzos C, Dimas K, Hatziantoniou S, Anastasaki T, Angelopoulos D. Cytotoxic and anti-inflammatory activity of labdane and *cis*-clerodane type diterpenes. *Planta Med.* 2001; 67(7): 614–618.
71. Dimas K, Demetzos C, Vaos V, Ioannidis P, Trangas T. Labdane type diterpenes down-regulate the expression of *c-myc* protein, but not of *bcl-2*, in human leukemia T-cells undergoing apoptosis. *Leuk Res.* 2001; 25(6): 449–454.
72. Dimas K, Hatziantoniou S, Tseleni S, Khan H, Georgopoulos A, Alevizopoulos K, et al. Sclareol induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells *in vitro* and suppression of HCT116 tumor growth in immunodeficient mice. *Apoptosis* 2007; 12(4): 685–694.
73. Dimas K, Papadaki M, Tsimplouli C, Hatziantoniou S, Alevizopoulos K, Pantazis P, et al. Labd-14-ene-8,13-diol (sclareol) induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells and enhances the activity of anticancer drugs. *Biomed Pharmacother.* 2006; 60(3): 127–133.
74. Vitali F, Pennisi G, Attaguile G, Savoca F, Tita B. Antiproliferative and cytotoxic activity of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. on human prostate cell lines. *Nat Prod Res.* 2011; 25(3): 188–202.
75. Attaguile G, Perticone G, Mania G, Savoca F, Pennisi G, Salomone S. *Cistus incanus* and *Cistus monspeliensis* inhibit the contractile response in isolated rat smooth muscle. *J Ethnopharmacol.* 2004; 92(2–3): 245–250.
76. de Lira Mota KS, Dias GEN, Pinto MEF, Luiz-Ferreira A, Souza-Brito ARM, Hiruma-Lima CA, et al. Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules* 2009; 14(3): 979–1012.
77. Attaguile G, Caruso A, Pennisi G, Savoca F. Gastroprotective effect of aqueous extract of *Cistus incanus* L. in rats. *Pharmacol Res.* 1995; 31(1): 29–32.
78. Kuchta A, Konopacka A, Waleron K, Viapiana A, Wesołowski M, Dąbkowski K, et al. The effect of *Cistus incanus* herbal tea supplementation on oxidative stress markers and lipid profile in healthy adults. *Cardiol J.* ew droku. doi: 10.5603/CJ.a2019.0028.

**P2. Isolation and structure elucidation of cistusins: a new ellagitannin from *Cistus × incanus* L. leaves.**



# Isolation and structure elucidation of cistus: A new ellagitannin from *Cistus × incanus* L. leaves

Izabela Fecka\*, Maciej Włodarczyk, Aneta Starzec

Department of Pharmacognosy and Herbal Medicines, Faculty of Pharmacy, Wrocław Medical University, Borowska 211, 50-556, Wrocław, Poland

## ARTICLE INFO

### Keywords:

*Cistus incanus*  
Cistus  
Terflavin A  
Punicalagin  
Ellagitannin  
Hydrolyzable tannin

## ABSTRACT

The leaves of *Cistus × incanus* L. (pink rock-rose) are used as plant material rich in antioxidants by the pharmaceutical and food industry. The main components which occur in pink rock-rose are polyphenols, especially flavonoids (glycosides of flavonols) and tannins (proanthocyanidins and ellagitannins). Derivatives of flavonols and flavan-3-ols as bioactive compounds of this species were identified previously. However, the full composition of ellagitannins has not been characterized yet. In this context, the study aimed to characterize the chemical composition of pink rock-rose ellagitannins and to identify and elucidate structures of major compounds from this group. In conclusion, the new ellagitannin cistus together with well-known terflavin A and punicalagin from *C. incanus* leaves were isolated. Their structures, including the gallagyl, flavogallonyl, valoneoyl, and hexahydroxydiphenoyl acyl groups, were revealed by spectroscopic evidence (HR-ESI-MS, 1D and 2D-NMR).

## 1. Introduction

The genus *Cistus* represents about 20 species from the Cistaceae family. A taxonomic division of these plants is based mainly on morphological features of vegetative and generative organs. Due to the polymorphism and the possible hybridization between related species, the appearance of numerous subspecies in this genus is a frequent phenomenon. The object of this study, *Cistus × incanus* L., named pink rock-rose, is a result of crossover between *C. albidus* L. and *C. crispus* L. In nature, it exists as three subspecies – *C. incanus* subsp. *incanus*, *C. incanus* subsp. *corsicus*, *C. incanus* subsp. *creticus* (Gülz et al., 1996; Papaefthimiou et al., 2014).

*Cistus* species are widespread in Mediterranean countries and

northwestern Africa. They also occur on the Iberian Peninsula and in Middle Eastern countries. All plants of this genus grow on dry and stone grounds in warm areas with plenty of sunlight. They achieve different sizes – from small herbs up to 3-meter-high shrubs. *C. incanus* is an evergreen shrub with dark green, wrinkled leaves and five-petal violet to pink flowers (Barrajón-Catalán et al., 2011; Gülz et al., 1996; Papaefthimiou et al., 2014).

For many years the most recognizable product obtained from *Cistus* plants was *Labdanum* (ladan or ladanon), a kind of aromatic resin. Today, also the leaves of *C. incanus* and other related species are used as plant material by the pharmaceutical and food industry. In European countries, *C. incanus* leaves are not considered as EMA-defined or pharmacopoeial material, but their healing properties were known

**Abbreviations:** [M–2H]<sup>–2</sup>, ion of doubly deprotonated molecule; [M–H]<sup>–</sup>, ion of deprotonated molecule; <sup>1</sup>H-NMR, one-dimensional proton nuclear magnetic resonance; C18, octadecyl reversed phase for chromatography; CC, column chromatography; CD, circular dichroism spectroscopy; CD<sub>3</sub>OD, deuterated methanol for NMR; COSY, two-dimensional <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H correlation spectroscopy; D<sub>2</sub>O, deuterated water for NMR; DMSO, dimethylsulfoxide; DOG, hexahydroxydiphenoyl with galloyl attached via C–O–C bond, semi-systematic abbreviation; DOSY, two-dimensional diffusion-ordered spectroscopy; EA, ellagic acid; ESI-qTOF, electrospray ionization coupled with mass detector built of quadrupole and time-of-flight detector; FLG, flavogallonyl, semi-systematic abbreviation; G, galloyl, semi-systematic abbreviation; GA, gallic acid; GEG, gallagyl, semi-systematic abbreviation; GOD, galloyl with hexahydroxydiphenoyl attached via C–O–C bond, semi-systematic abbreviation; HHDP, hexahydroxydiphenoyl, semi-systematic abbreviation; HMBC, two-dimensional heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy; HPLC-DAD, high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector; HSQC, two-dimensional heteronuclear single quantum correlation spectroscopy; LC-MS, liquid chromatography coupled with mass spectrometry detector; LH-20, type of Sephadex chromatographic bed; m, mass; NMR, nuclear magnetic resonance; NOESY, two-dimensional nuclear Overhauser effect spectroscopy; ppm, parts per million, accuracy of MS measurement, unit of NMR scale; TLC, thin-layer chromatography; UHPLC-MS, ultra-high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detector; UV-Vis, ultraviolet to visible light spectroscopy; V, volume.

\* Corresponding author.

E-mail address: [izabela.fecka@umed.wroc.pl](mailto:izabela.fecka@umed.wroc.pl) (I. Fecka).

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112971>

Received 17 April 2020; Received in revised form 20 August 2020; Accepted 22 September 2020

Available online 30 September 2020

0926-6690/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

before the fourth century B.C. (Szeremeta et al., 2017). The genus *Cistus* was used mainly in traditional medicine in Near East countries, especially in Turkey. Leaves of pink rock-rose were utilized as anti-inflammatory agents in skin inflammation, inflammatory diseases of the respiratory system and kidneys, or rheumatism. They were also recommended in chronic diseases of the gastrointestinal tract, for example, in ulcers and diarrhea, and in liver diseases. Nowadays, the pink rock-rose infusion is also recommended as a dietary supplement in chronic illnesses such as diabetes mellitus, cardiovascular and neurodegenerative disease (Attaguile et al., 2004; Barrajón-Catalán et al., 2011; Mansoor et al., 2016; Riehle et al., 2014).

Currently, many studies confirm some *C. incanus* properties, particularly antioxidant, antiphlogistic, antibacterial, antifungal, antiviral and immune system strengthening activities. The anti-inflammatory effect of *Cistus* species is mainly associated with their antioxidant properties. These properties are usually connected with a significant level of polyphenolic compounds (Viapiana et al., 2017). Extracts from leaves of *C. incanus* influence growth, vitality, and release of cytokines by human leukocytes, which is associated with the normalization of the immune system cells (Lendeckel et al., 2002). The study of Attaguile et al. (2000) demonstrated the protective effect of aqueous extracts from *C. incanus* and *C. monspeliensis* on DNA and the reduction in the concentration of free radicals in rat microsomes. Researchers have also demonstrated spasmolytic properties of *C. incanus* and *C. monspeliensis*, which exhibited a diastolic effect on isolated smooth muscles of intestines and aorta during *in vitro* studies (Attaguile et al., 2004). The antimicrobial activity of *C. incanus* was confirmed by Kalus et al. (2009) in clinical trials on patients with infections of the upper respiratory tract. In the study group a decrease in subjective symptoms of the disease and a reduced level of inflammatory markers were observed. Another study showed that *Cistus* extract inhibited the replication of avian and human influenza viruses *in vitro* (Ehrhardt et al., 2007). The antifungal activity of *Cistus* is worth highlighting in the field of crop preservation (Kalli et al., 2018; Viapiana et al., 2017). *C. incanus* and *C. ladanifer* extracts possess also natural sun protecting activity, enhancing their anti-hyperpigmentation and anti-melanoma potential (Gawel-Bęben et al., 2020).

The full range of bioactive compounds of the genus *Cistus* has not been characterized yet. Available data show that the content of secondary metabolites in this genus strongly depends on the genotype, origin, and environmental conditions. The main bioactive compounds which occur in *C. incanus* are polyphenols. The presence of flavonols such as glycosides of myricetin, quercetin and kaempferol; monomeric flavan-3-ols, proanthocyanidins, hydrolyzable tannins and other polyphenolics including simple phenolic acids (e.g. gallic, ellagic, gentisic) was described as typical for *Cistus* plants (Gawel-Bęben et al., 2020; Gori et al., 2016; Jeszka-Skowron et al., 2018; Móricz et al., 2018; Petereit et al., 1991; Riehle et al., 2013, 2014; Wittpahl et al., 2015). Additionally, leaves and stems of all *Cistus* species contain essential oils (monoterpenes and sesquiterpenes) and brown resin, which mostly consists of labdane-type diterpenes (Gori et al., 2016; Mansoor et al., 2016; Szeremeta et al., 2017).

Our previous observations revealed the incompleteness of the literature data considering ellagitannin components of plant material from *Cistus* sp. In this context, the present study aimed to characterize the chemical composition of ellagitannins from the *C. incanus* leaves, and to identify and elucidate the structures of the main compounds of this type.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Solvents and standards

All of the solvents were of analytical grade or LC-MS grade for the appropriate experiments. High purity acetonitrile, methanol, and 98–100 % formic acid were from Merck (Germany). Diisopropyl ether was from Sigma-Aldrich (USA), whereas DMSO, methanol, acetone, and

others were from POCh (Poland). Water was glass-distilled and deionized. D<sub>2</sub>O and CD<sub>3</sub>OD were from Armar Chemicals (Switzerland).

Ellagic acid (EA; declared purity > 95 %) was obtained from Sigma-Aldrich (USA), gallic acid (GA; declared purity > 99 %) from Extrasynthese (France). Rugosin A (RuA) was isolated from flowers of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim with 95 % purity (HPLC-DAD,  $\lambda = 254$  nm) (Fecka, 2009). The stock solutions of EA, GA and RuA (1 mg/mL) were prepared by dissolving 5 mg of a reference standard in 5 mL of DMSO or methanol, respectively. Working standard solutions in the range of 20–200  $\mu$ g/mL were made by mixing with 50 % aq. methanol (V/V), filtered through hydrophilic Millex Syringe Filters (Durapore 0.22  $\mu$ m; Millipore, USA) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2. Plant material

Dried leaves of *Cistus*  $\times$  *incanus* L. (pink rock-rose, origin: Turkey, 300 g, Lot: 010316, 03.2018) were purchased from herbal company Herbapol Kraków S.A., Poland (certified Good Manufacturing Practice, ISO 9001 and ISO 22000). A voucher specimen Ci1/2018 was deposited in the Herbarium of the Department of Pharmacognosy and Herbal Medicines (Wrocław Medical University). *Cistus incanus* hb. conc. (pink rock-rose herb cut; Lot: 29594, 03.01.2018) and *Granati cort. fruct. conc.* (pomegranate peel cut; Lot: 26131, 24.10.2016) from Alfred Galke GmbH (Germany) were used as herbal reference materials.

### 2.3. Preparation of extracts for preliminary study

For the preliminary chromatographic analysis, water infusions, and aqueous methanol extracts (1:100, m/V) of *C. incanus* leaves and herbal reference materials were prepared. Therefore, 1 g of plant material was brewed with 100 mL of boiling water and infused for 15 min (*C. incanus*, pH = 4.75). Aqueous methanol extracts were prepared from the same amount of plant material, with the usage of 100 mL of 30, 50, and 80 % aq. methanol (V/V) in an ultrasonic bath at  $40^{\circ}\text{C}$  for 15 min. The extracts were filtered through cotton pads into a volumetric flask and made up to 100 mL with suitable solvent. A 2 mL sample of each was finally filtered through hydrophilic Millex Syringe Filters (Durapore 0.22  $\mu$ m).

### 2.4. Preparative scale extraction and isolation of ellagitannins

Dried *C. incanus* leaves (300 g) were homogenized in the water-acetone mixture twice (1:1, V/V; 3 and 1.5 L respectively) at ambient temperature ( $20$ – $24^{\circ}\text{C}$ ), and the homogenates were filtered through fritted glass (G0) and combined. The aq. acetone extract was then concentrated under reduced pressure at  $40^{\circ}\text{C}$  (Rotavapor R-200; Büchi, Switzerland) to yield a water residue ( $\sim 2$  L), which was next cooled and acidified with formic acid (5 mL per 1 L). The first step of this experiment included solid-phase extraction (SPE) and fractionation by column chromatography (CC) on octadecyl (C18). The acidified water residue of the aq. acetone extract was subjected to further concentration and column chromatography over C18 (glass column,  $45 \times 4$  cm i.d.; Bakerbond Octadecyl 40  $\mu$ m, 60 Å, Prep LC Packing; J.T. Baker, USA). The compounds were fractionated using water-methanol (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 3:7; V/V) and methanol in a stepwise gradient manner, and collecting 200 mL eluates (flow rate:  $\sim 1$ – $5$  mL/min, laboratory membrane pump; total amount of eluate:  $\sim 20$  L; ambient temperature:  $\sim 20$ – $24^{\circ}\text{C}$ ). The eluent level was changed when its elution efficiency decreased, and the compounds were no longer detected by TLC on Si60 (mobile phases E, F and P) and HPLC-DAD analyses. Collected eluates with similar chromatographic profiles were combined to afford 17 fractions (Ci0 and CiI–CiXVI). The fraction Ci0 was eluted with acidified water (attained from application of acidified water residue of aq. acetone extract), CiI–CiIII were eluted with a water-methanol gradient of 9:1, CiIV and CiV with 8:2, CiVI–CiIX with 7:3, CiX and CiXI with 6:4, CiXII–CiXIV with 5:5, CiXV with 3:7 and CiXVI with methanol. From CiI–

CiXV methanol was evaporated under reduced pressure at 40 °C (Rotavapor R-200) to afford suitable water residues which were acidified with formic acid (0.5 mL per 100 mL) and successively concentrated by the SPE method on a short C18 column (glass column, 10 × 4 cm i.d.; Bakerbond Octadecyl 40 µm, 60 Å, Prep LC Packing; flow rate: ~5 mL/min, laboratory membrane pump; ambient temperature). After the application of each acidified fraction water residue, the short C18 column was dried for 15 min, and then the compounds were eluted with methanol (~500–1000 mL, depending on the initial volume of fraction). Methanol solutions of CiI–CiXVI were afterward concentrated under reduced pressure and left for crystallization or to dry. Fractions CiI (~3.2 g) and CiII (~3.8 g) were subsequently purified over Sephadex LH-20 (glass column, 65 × 5 cm i.d.; Sephadex® LH-20, GE Healthcare, USA; ambient temperature) with methanol-acetone (2:8, V/V), collecting 150 mL eluates (flow rate: ~1–5 mL/min). **T1** (2.03 g) was obtained from CiI, whereas **T3** (1.18 g) and a mixture of **T2** + **T3** (0.96 g) was obtained from CiII. The latter yielded **T2** (0.12 g) by purification over Sephadex LH-20 (55 × 3.5 cm i.d. column) with methanol-acetone (1:1, V/V), collecting 100 mL eluates. The compounds **T1**, **T2** and **T3** were free from other phenolic impurities that could significantly affect the results of structural analysis (purity ~95 %; HPLC-DAD,  $\lambda$  = 254 nm, conditions are defined in 2.7.).

### 2.5. Acid hydrolysis

A solution of ellagitannin (~50 mg) in 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 mL) was heated (90 °C, water bath) under reflux for 8 h (Tanaka et al., 1986b). After cooling, the reaction mixture was subjected to the octadecyl C18 column (Isolute C18, 10 g, 70 mL) and eluted with methanol (2 × 20 mL), then concentrated under reduced pressure (40 °C, Rotavapor R-200; Büchi) and diluted in 5 mL of methanol.

### 2.6. Spectroscopic evidence

<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, HSQC, HMBC, COSY, DOSY and NOESY experiments were recorded primarily on a Bruker Avance (300 MHz) and finally on a Bruker Avance (600 MHz) spectrometers (Bruker Biospin, Germany) using the residual solvent peaks as an internal standard. 1D and 2D-NMR spectra were analyzed in D<sub>2</sub>O or CD<sub>3</sub>OD. The data were processed using MestReNova 12 software (Mestrelab Research, Spain).

MS spectra in the negative mode were recorded in water and methanol (0.1 mg/mL) on an ESI-qTOF Compact mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany). Parameters for UHPLC-ESI-MS are listed below (2.7.).

UV-Vis absorption spectra of ellagitannins were recorded in water and methanol (0.03 mM) on a Cecil CE 3021, 3000 series spectrometer (Cecil Instruments Ltd., UK).

CD (Circular dichroism) spectra of **T1** and **T3** were measured in water (0.1 mM) on a Jasco J-1500 CD spectrophotometer with a Jasco ATS-530 syringe (Jasco Int., Japan); scan parameters: cell length 10 mm, measure range 350–220 nm, data pitch 0.2 nm, D.I.T. 1 s, band width 2.0 nm, scanning speed 200 nm/min, accumulations 5.

### 2.7. Chromatographic methods for monitoring ellagitannin separation

Thin-layer chromatography was carried out on 10 × 20 cm glass TLC plates coated with silica gel 60 containing a fluorescent indicator (TLC Si60 F254, 0.25 mm; Merck, Germany). The eluates from column chromatography (20–35 µL), isolated ellagitannins and stock standard solutions of **EA**, **GA**, **RuA** (5–15 µL) were manually applied as 5 mm bands and separated in mobile phases composed of diisopropyl ether-acetone-formic acid-water (**E** – 4:4:1:1 for ellagitannins or **F** – 5:3:1:1 for flavonoids, and **P** – 5:2:2:1 for phenolic acids and depsides; V/V/V/V) at a distance of 9 cm. TLC Si60 chromatograms were developed in horizontal Teflon DS-chambers (Chromdes, Poland). Analyzed compounds were detected under UV light at 254 and 366 nm before and after spraying

with 2 % methanolic AlCl<sub>3</sub> (flavonoids) and in Vis after spraying with 1 % methanolic FeCl<sub>3</sub> (tannins and phenolic acids). TLC procedures were performed at ambient temperature.

The HPLC Smartline system (Knauer, Germany) equipped with a degasser (Manager 5000), pump (1000), dynamic mixing chamber (V7119-1), DAD detector (2800), manual 6-port-2-channel injection valve (A1366) and column thermostat (Jetstream 2 Plus) was used. Data were processed using EuroChrom for Windows Basic Edition V3.05 (V7568-5). The separation was achieved on a Hypersil GOLD™ C18 column (250 × 4.6 mm, particle size 5 µm) with a C18 precolumn (10 × 4.6 mm, particle size 5 µm; both from Thermo Scientific™, USA). Chromatograms were recorded at wavelengths of 254, 280, 320, and 360 nm. The following solvent mixtures were used as eluents: A, water-formic acid (98.5:1.5, V/V) and B, acetonitrile-formic acid (98.5:1.5, V/V). The HPLC gradient was as follows: 0–30 min (0–30 % B in A), 30–33 min (30–70 % B in A), 33–50 min (70–100 % B in A). The flow rate was 1.0 mL/min, injection volume 20 µL, the column was operated at 20 °C. Spectral measurements were made in the wavelength range 200–600 nm, in steps of 2 nm.

The UHPLC Ultimate 3000 apparatus (Thermo Fisher Scientific, USA) with a Kinetex C18 column (150 × 2.1 mm, size 2.6 µm; Phenomenex, USA) connected to an ESI-qTOF Compact mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany) was used. The following solvent mixtures were applied as eluents: C, water-formic acid (99.9:0.1, V/V) and D, acetonitrile-formic acid (99.9:0.1, V/V) in gradient: 0–1 min (2–2 % D in C), 1–31 min (2–40 % D in C), 31–31.5 min (40–100 % D in C), 31.5–35.5 min (100 % D). UHPLC parameters: flow 0.3 mL/min, injection volume 5 µL, column oven temperature 30 °C. ESI-MS parameters: calibration with the Tunemix (beginning of each analysis), negative mode, scan range 200–2200 *m/z*, dry gas (N<sub>2</sub>) 7.0 L/min, temperature 200 °C, capillary voltage 2.2 kV, ion energy 5 eV, collision energy 10 eV. Data were processed using Data Analysis software (Bruker Daltonics, Germany).

## 3. Results and discussion

Preparations of *Cistus × incanus* L. leaves, e.g., infusions, hydro-methanolic and hydroacetic extracts, can be characterized by a high concentration of water-soluble polyphenolics (Figs. 1 and S4), including glycosides of flavonols, monomeric and oligomeric flavan-3-ols, as well as ellagitannins (Barrajón-Catalán et al., 2011; Gürbüz et al., 2018; Petereit et al., 1991). Using the LC-MS<sup>n</sup> method, more than thirty compounds have been identified in pink rock-rose by some authors (Gawel-Beben et al., 2020; Gori et al., 2016; Riehle et al., 2013, 2014; Wittpahl et al., 2015). Previously, several ellagitannins, except hexahydroxydiphenoyl-glucose (HHDP-glucose) isomers, were tentatively identified in *C. incanus* by Wittpahl et al. (2015). Their structures were established on the basis of pseudomolecular and fragment ions from LC-MS<sup>2</sup> experiments only as punicalin with [M–H]<sup>–</sup> at *m/z* 781 (two isomers), punicalagin with [M–H]<sup>–</sup> at 1084 (two isomers; the reported even number was probably a typo), cornuinin B with [M–H]<sup>–</sup> at 1085, and four ‘isomeric’ punicalagin-gallates with [M–H]<sup>–</sup> at 1251, but the final chemical structures of the latter compounds were not concluded. It is possible, that Wittpahl et al. (2015) reported α- and β-forms (anomers) of all mentioned ellagitannins as ‘isomers.’ However, the number of four punicalagin-gallate ‘isomers’, suggested the presence of two pairs of compounds with different structures (constitutional isomers). Because MS and MS/MS data were tabulated only qualitatively as the same patterns while neither MS/MS-collision energy nor resulting relative quantities of fragment ions were reported, the authors (Wittpahl et al., 2015) could not resolve this problem on the basis of this single analysis.

Punicalin and punicalagin are predominant monomeric ellagitannins isolated at first as yellow-colored hydrolyzable tannins from the pomegranate pericarp (peel of *Punica granatum* L., Puniceae) by Mayer et al. (1977). These compounds possess a relatively rare gallagyl (GEG) acyl

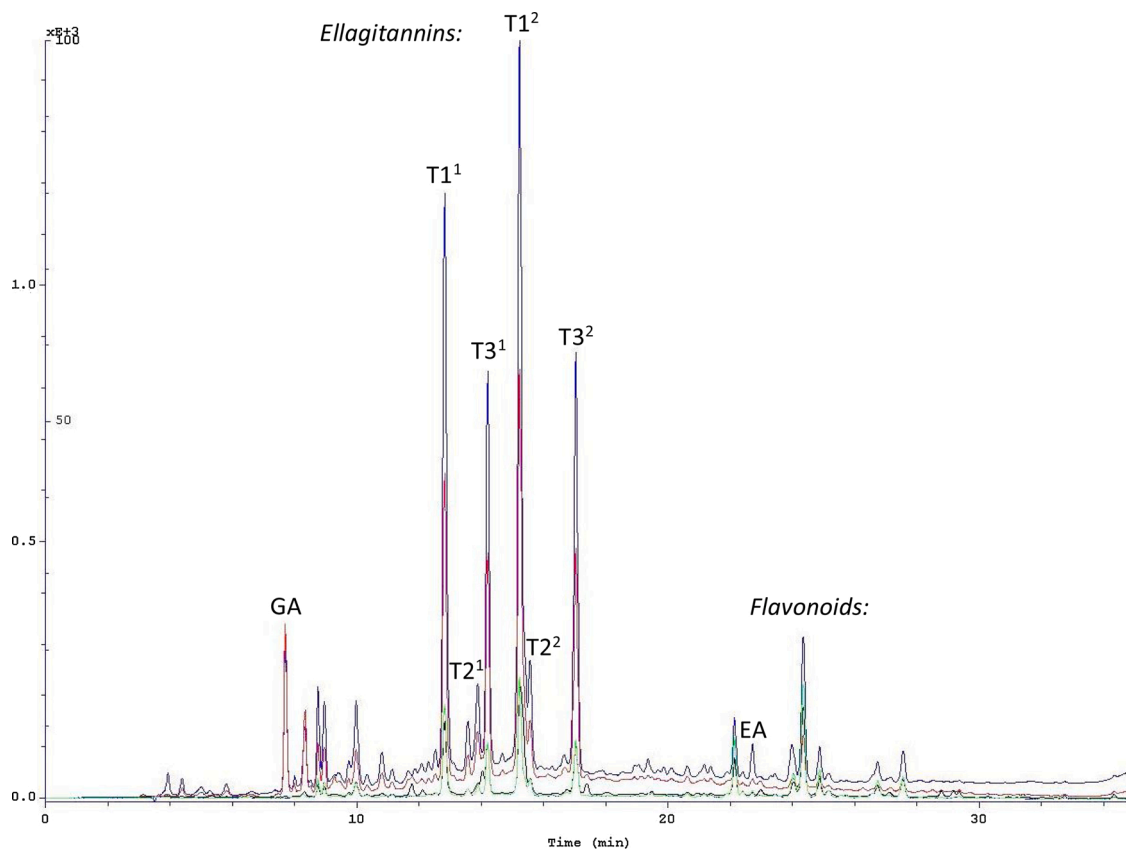


Fig. 1. HPLC-DAD chromatograms of the *C. incanus* infusion (1:100, m/V) at 254 (dark blue), 280 (red), 320 (black) and 360 nm (green). GA, gallic acid; EA, ellagic acid; T1<sup>1</sup> and T1<sup>2</sup>, punicalagin anomers; T2<sup>1</sup> and T2<sup>2</sup>, terflavin A anomers; T3<sup>1</sup> and T3<sup>2</sup>, cistusins anomers.

group attached at the C-4 and C-6 position of D-glucopyranose (GlcP), which was evidenced by Tanaka et al. (1986a). The same authors separated and characterized 2-O-galloylpunicalin from the *P. granatum* bark (Tanaka et al., 1986a).

The plant material selected by us for the isolation of ellagitannins from *C. incanus* leaves (Herbapol Kraków S.A., Poland) was positively verified by comprising with authentic reference material (*Cistus incanus* hb. conc., Alfred Galke GmbH, Germany), with the usage of macro- and microscopic analysis, as well as chromatography. The preliminary HPLC-DAD and UHPLC-ESI-MS analysis of the water infusion and aq. methanol extracts from *C. incanus* leaves (Figs. 1 and S4) revealed the presence of several predominant compounds (peaks) with the UV-Vis and MS spectra typical for hydrolyzable tannins (Table 1). The location of punicalagin anomers on chromatograms of *C. incanus* extracts, their retention time, UV-Vis, and MS spectra were initially determined using extracts from *P. granatum* peel as herbal reference material (Alfred Galke GmbH, Germany). This preliminary analysis led us to the conclusion that *C. incanus* purchased from both producers was qualitatively identical. Nevertheless, the ellagitannin level in the material from Herbapol Kraków S.A., was considerably higher and more promising to successfully isolate the individual compounds.

After that, the extraction of pink rock-rose leaves in a preparative

scale was performed and initial fractionation of the aq. acetone extract from *C. incanus* was achieved by reversed-phase chromatography on octadecyl C18 with eluents consisting of water containing an increasing concentration of methanol. The selection of water-acetone (1:1, V/V) for the extraction of hydrolyzable tannins was based on the works of Tanaka et al. (1986a,b, 1993) and Yoshida et al. (1989), as well as our own experience (Fecka, 2009). Two fractions, CiI and CiII, were repeatedly chromatographed over a Sephadex LH-20 gel with methanol-acetone to yield ellagitannins T1-T3, among which T1 was found to be identical to punicalagin (Kraszni et al., 2013; Tanaka et al., 1986a) and T2 to terflavin A (Tanaka et al., 1986b). Structures of T1, T2 and T3 were elucidated by HR-ESI-MS, 1D and 2D-NMR, UV-Vis and CD (Fig. 2, S1a-S3f; Tables 1, 2, S1-S3), and compared with literature data.

All ellagitannins isolated in our study in aqueous and aqueous methanol solutions gave two peaks on HPLC-DAD chromatograms (Fig. 1) corresponding to  $\alpha$ - and  $\beta$ -anomers in the equilibrium state. That observation tentatively suggested the lack of galloyl or another acyl at the C-1 position of the glucopyranose core.

The new ellagitannin, initially named T3, was obtained as a yellow crystalline powder (methanol-acetone), m.p. > 250 °C (dec.). On TLC Si60 in mobile phase E, T3 gave a single spot ( $R_f = 0.25$ ) quenching the fluorescence in a short wavelength (254 nm) and giving intense green

Table 1  
MS data for ellagitannins T1-T3.

Ellagitannin	Symbol	Molecular formula	[M-H] <sup>-</sup> (meas., m/z)	[M-H] <sup>-</sup> (calc., m/z)	err. [ppm]	[M-2H] <sup>-2</sup> (meas., m/z)	[M-2H] <sup>-2</sup> (calc., m/z)	err. [ppm]	Acquisition mode
Punicalagin	T1	C <sub>48</sub> H <sub>28</sub> O <sub>30</sub>	1083.0539	1083.0593	5.0	541.0251	541.0260	1.7	UHPLC-ESI-MS
Terflavin A	T2	C <sub>48</sub> H <sub>30</sub> O <sub>30</sub>	1085.0701	1085.0749	4.4	542.0329	542.0338	1.7	UHPLC-ESI-MS
Cistusins	T3	C <sub>55</sub> H <sub>32</sub> O <sub>35</sub>	1251.0577	1251.06	5.9	625.0268	625.02	3.4	UHPLC-ESI-MS
			1251.0630	51	1.7	625.0286	89	0.5	direct injection-MS

coloration after spraying with 1 % FeCl<sub>3</sub> methanolic solution (in visible light). An aqueous solution of **T3** showed in the UV-Vis spectrum two absorption maxima with  $\lambda_{\text{max}}$  at 258 nm (1.94) and 375 nm (0.36) (Table S2). **T3** chromatographed on UHPLC-ESI-MS in negative mode revealed a pseudomolecular ion  $[\text{M}-\text{H}]^-$  at  $m/z$  1251.0577 (vs. calc. 1251.0651, err. 5.9 ppm) together with dominant doubly charged  $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$  at  $m/z$  625.0268 (vs. calc. 625.0289, err. 3.4 ppm), which were relevant to the C<sub>55</sub>H<sub>32</sub>O<sub>35</sub> molecular formula (Table 1). An additional strong (65 % intensity of ion at  $m/z$  625) and doubly charged fragment ion at  $m/z$  603.0324 (vs. calc. 603.0340, err. 2.7 ppm) was linked to the neutral formula C<sub>54</sub>H<sub>32</sub>O<sub>33</sub> (calc. 1208.0826 Da). From the difference in formulas, we inferred that the doubly negatively charged 603-ion should correspond to  $[\text{M}-44/\text{CO}_2-2\text{H}]^{2-}$ , assuring one free and outlier carboxylic group in the **T3** molecule. Further analysis in direct-MS-injection mode resulted in better accuracy. Mild fragmentation of the 603 precursor ion with 10–25 eV (Fig. S3e–f) led to formation of the following doubly charged ions: **603.0301** (83.4 %), 589.0156 (21.2 %), 587.0168 (36.5 %), 583.0299 (31.5 %), 568.0271 (74.8 %), **541.0205** (100 %), 532.0162 (35.8 %), 531.0090 (30.6 %), and single charged ions 1083.0696 (2.1 %), 1065.0400 (2.9 %), 807.0288 (5.1 %), 781.0487 (15.7 %), 763.0382 (16.1 %), 745.0288 (7.1 %), 719.0468 (10.9 %), **600.9857** (37.5 %), 481.0627 (3.0 %), 450.9923 (3.6 %), 425.0160 (6.0 %), 355.0129 (7.7 %), 329.0292 (9.7 %), **300.9968** (58.7 %), 275.0172 (19.8 %), 273.0040 (7.1 %). The ions are listed in Table S3 and were used as additional proof of stepwise degradation of the **T3** molecule. The strongest doubly charged fragment ion at  $m/z$  541 was equivalent to doubly deprotonated punicalagin (**T3** without gallic acid unit). A strong diagnostic single deprotonated ion of gallagic acid dilactone (terminalin) at  $m/z$  601 was reported in the literature (Isobe et al., 1989), together with ions of unknown depside at  $m/z$  451, and ellagic acid at 301 was visible when collision energy of 30–45 eV was used (Fig. S3e–f).

With information from high-resolution ESI-MS the presence of the additional gallic acid unit ( $\Delta$  168 Da) in **T3** was deduced. It was possibly substituted by an ether bond to the hexahydroxydiphenoyl group (HHDP-G) of punicalagin molecule (**T1**). That gallic acid unit (G) can form the structure of sanquisorbol (HHDP at C-3 of G, *m*-GOD type), valoneoyl (G at C-5 of HHDP, 5-DOG type, previously *m*-DOG), tergalloyl (G at C-4 of HHDP, 4-DOG type, previously *p*-DOG) or macaranoyl (G at C-3 of HHDP, 3-DOG type) substituents, which are products of oxidative coupling between gallic acid and HHDP (respectively symbolized by the letters G and D in the acronyms above).

Monomeric, oligomeric and macrocyclic ellagitannins with the valoneoyl acyl group are common in plants from Rosaceae (e.g., rugosins A, B, C, D), Euphorbiaceae (e.g., euphorbin A), Cornaceae (e.g., cornusiins and camptothins) and Onagraceae (e.g., oenothin B and woodfordin C). Sanquisorbol, tergalloyl, and macaranoyl groups are less often encountered for example in sanguins and lambertianins isolated from the *Sanguisorba* and *Rubus* genera (Okuda et al., 1993), in tergalagin from *Terminalia catappa* L. (Tanaka et al., 1986b), alnusiin from *Alnus sieboldiana* Matsum. (Yoshida et al., 1989), and euphorbins B and I from *Euphorbia watanabei* Makino (Amakura and Yoshida, 1996). These characteristic polyphenolic acyls on structures of ellagitannins are readily recognized in the aromatic region of the <sup>1</sup>H-NMR spectrum as a 2H singlet (from galloyl), two 1H singlets (from HHDP or flavogallonyl), three 1H singlets (from valoneoyl, tergalloyl or macaranoyl) and only one 1H singlet with two *m*-coupled doublets each 1H (from sanquisorbol).

<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR assignments (by HSQC and HMBC) as well as correlation spectra of  $\alpha$ - and  $\beta$ -punicalagin anomers in aqueous solution after gaining the equilibrium population were published previously by Kraszni et al. (2013). Therefore, we conducted spectroscopic analyses of isolated ellagitannins **T1** and **T3** in D<sub>2</sub>O (Fig. S1a–c, S3a–c) and compared collected data with results achieved by Kraszni et al. (2013). Unaffected shifts of the anomeric proton of Glcp in **T1** confirmed the previous assumption. Other NMR data (HSQC, HMBC, COSY and

NOESY) of **T1** were very similar to punicalagin reported by Kraszni et al. (2013) and are presented in Table 2. In NMR-tube D<sub>2</sub>O solution, **T1** (identified as punicalagin) was found to exist in both  $\alpha$  and  $\beta$  forms in the ratio 2:1.

For **T3**, the <sup>1</sup>H-NMR and HSQC spectra examination revealed two anomeric protons (dominant  $\delta$  4.93/88.59 ppm for  $\alpha$  and 4.52/92.63 ppm for  $\beta$ ; anomers were attributed by <sup>13</sup>C-NMR shifts of anomeric carbons and coupling constants of anomeric doublets). These signals were slightly upfield shifted in comparison to punicalagin (**T1**). That suggested possible substitution of **T1** with a gallic acid unit close to the anomeric proton and confirmed assumptions from MS fragmentation. All glucopyranose <sup>13</sup>C-NMR signals were almost unaffected, and <sup>1</sup>H-NMR shifts differed slightly from punicalagin. That proved substitution in the neighboring area of H-1 of the central Glcp, but not directly in the sugar ring. <sup>1</sup>H-NMR/HSQC spectra of **T3** showed five pairs of signals in the aromatic region – five for each of the anomers (Fig. 2).

In comparison to punicalagin (**T1**), an upfielded equilibrium group of aromatic protons ( $\delta$  6.32/104.21 ppm for  $\beta$  and 6.26/104.21 ppm for  $\alpha$ ) was observed while overlapping signals from the  $\delta$  6.75–6.65/106.6 ppm region of the HHDP unit were cleared. It caught our attention, suggesting that substitution should be connected with this part of the molecule. Because  $\alpha$ -anomer was a dominant form of **T3** in solution, the next steps of elucidation will be conducted on its basis only, for simplicity of presentation. All further <sup>1</sup>H-NMR and HSQC signals were attributed to the  $\alpha$ - or  $\beta$ -anomer by their areas in relation to anomeric proton peaks (Table 2).

All aromatic proton signals seemed to be separated, and no hidden narrow doublets were detected (COSY). Two aromatic protons of  $\alpha$ -**T3** with  $\delta$  6.92/111.64 and 6.84/110.21 ppm (singlets, 1H each) were assigned to the gallagyl group by comparison of <sup>1</sup>H-NMR/HSQC with punicalagin (**T1**) and the literature (Kraszni et al., 2013). The next two ones ( $\delta$  6.66/106.68 and 6.26/104.21, singlets, 1H each) were connected to the HHDP-G unit, which was confirmed by comparison of their assigned <sup>13</sup>C-NMR shifts with punicalagin. An additional, aromatic 1H singlet with the high values of <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR ( $\delta$  6.97/109.87 ppm) came from the asymmetric gallic acid residue of the HHDP-G unit. This extra proton was undoubtedly not possible to assign to the symmetrical galloyl ester, which confirmed our earlier assumptions (from UHPLC-ESI-MS and MS/MS). Thus, the G unit was connected with an ether bond to HHDP, forming a valoneoyl item (Fig. 3).

For most of the well-known ellagitannins with a valoneoyl substituent, three specific protons (namely H<sub>A</sub>, H<sub>B</sub>, H<sub>C</sub>, Fig. 3) show up respectively at  $\delta$  6.66–6.42 ppm, 6.32–6.10 ppm and 7.20–7.05 ppm (Yoshida et al., 1992). When comparing analogical shifts of  $\alpha$ -**T3** with experimental data for rugosin A (RuA) as well as literature data for both rugosin A and isorugosin A (Yoshida et al., 1992) we supposed that gallic acid forms an ether bond with the OH group at the C-5' position of HHDP (and creates valoneic acid diacyl) in neighborhood of the H<sub>B</sub> proton. The signal of this proton was shifted upfield from 6.68 to 6.26 ppm (when compared with  $\alpha$ -**T1**) in the asymmetric way of a valoneoyl and not a sanquisorbol or other HHDP-G unit. The shift of the H<sub>A</sub> proton remained unaffected, including in its distinct 'equilibrium shape' where the dominant H<sub>A</sub> from the  $\alpha$ -anomer was in a lower field than H<sub>A</sub> from the  $\beta$ -anomer (contrary to other aromatic protons). That implied substitution of punicalagin with an extra gallic acid unit close to the H<sub>B</sub> proton of HHDP (Tanaka et al., 1993; Yoshida et al., 1992). The structures of both gallagyl and valoneoyl acyl groups were also confirmed after acid hydrolysis of **T3** and co-chromatography with phenolic acid standards (EA, GA) as well as hydrolytic degradation products of punicalagin and rugosin A (TLC Si60, mobile phase P; gallagyl dilactone-terminalin, R<sub>f</sub>=0.13; valoneoyl trilactone, R<sub>f</sub>=0.42; EA, R<sub>f</sub>=0.63; GA, R<sub>f</sub>=0.89).

HMBC of  $\alpha$ -**T3** showed the presence of four carboxylic groups forming esters ( $\delta$  GEG<sub>A</sub>/169.8, H<sub>A</sub>/169.4, H<sub>B</sub>/169.2 and GEG<sub>B</sub>/168.8 ppm) and one free carboxylic group (the lowest one, at  $\delta$  H<sub>C</sub>/168.2 ppm). The following glucopyranose protons were correlated by



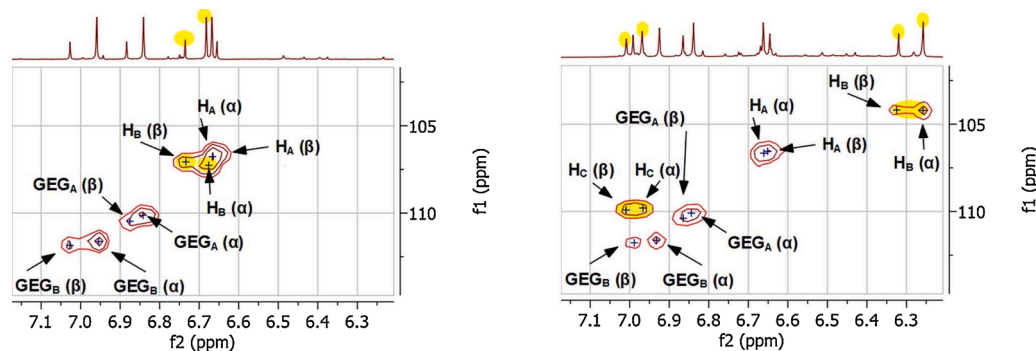
**Table 2**  
NMR assignments of **T1** and **T3**; measured in D<sub>2</sub>O.

Position	$\alpha$ -punicalagin (Kraszni et al., 2013)			$\alpha$ -T1			$\alpha$ -T3		
	$\delta$ ( <sup>1</sup> H)	Multiplicity (J/Hz)	$\delta$ ( <sup>13</sup> C)	$\delta$ ( <sup>1</sup> H)	Multiplicity (J/Hz)	$\delta$ ( <sup>13</sup> C)	$\delta$ ( <sup>1</sup> H)	Multiplicity (J/Hz)	$\delta$ ( <sup>13</sup> C)
<b>1</b>	5.19	d (3.5)	88.85	5.13	d (3.5)	88.71	4.93	d (2.3)	88.59
<b>2</b>	4.97	dd (9.7, 3.5)	73.21	4.91	dd (9.8, 3.4)	73.08	4.80	m	73.09
<b>3</b>	5.05	t (9.4)	76.86	5.00	t (9.4)	76.71	4.95	m	76.62
<b>4</b>	4.95	dd (10.0, 9.2)	70.13	4.87	m	69.97	4.85*	m	69.89
<b>5</b>	2.99	td (10.2, 1.5)	65.82	2.92	td (10.9, 1.7)	65.63	2.86	t (11.0)	65.62
<b>6a</b>	4.00	t (10.9)	63.96	3.89	t (10.9)	63.84	3.82	t (10.7)	63.75
<b>6b</b>	2.23	dd (11.4, 1.5)	63.96	2.16	d (11.1)	63.84	2.11	d (11.0)	63.75
<b>GEG<sub>B</sub></b>	7.03	s	111.81	6.96	s	111.63	6.92	s	111.64
<b>GEG<sub>A</sub></b>	6.88	s	110.20	6.84	s	110.13	6.84	s	110.21
<b>H<sub>A</sub></b>	6.70	s	106.71	6.67	s	106.77	6.66	s	106.68
<b>H<sub>B</sub></b>	6.73	s	107.38	6.68	s	107.27	6.26	s	104.21
<b>H<sub>C</sub></b>	–	–	–	–	–	–	6.97	s	109.87

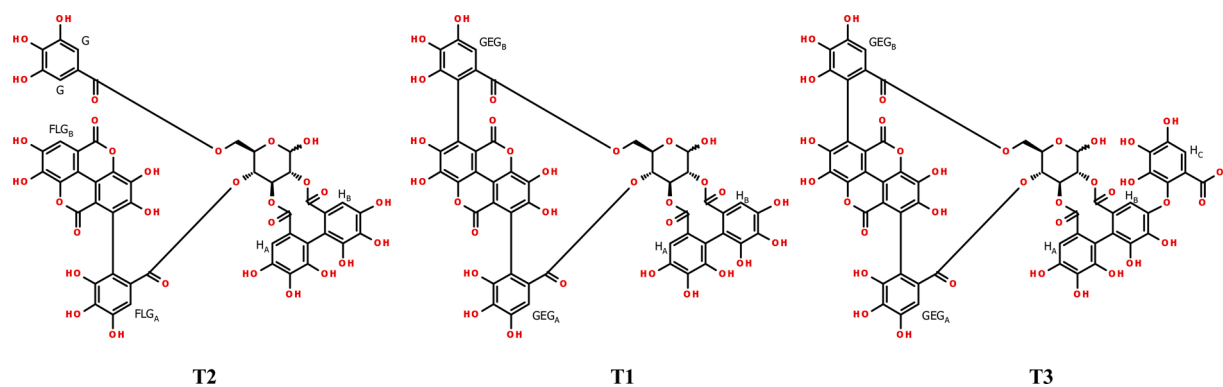
  

Position	$\beta$ -punicalagin (Kraszni et al., 2013)			$\beta$ -T1			$\beta$ -T3		
	$\delta$ ( <sup>1</sup> H)	Multiplicity (J/Hz)	$\delta$ ( <sup>13</sup> C)	$\delta$ ( <sup>1</sup> H)	Multiplicity (J/Hz)	$\delta$ ( <sup>13</sup> C)	$\delta$ ( <sup>1</sup> H)	Multiplicity (J/Hz)	$\delta$ ( <sup>13</sup> C)
<b>1</b>	4.70	d (8.1)	92.94	4.65	d (8.0)	92.85	4.52	d (8.1)	92.63
<b>2</b>	4.74	dd (9.3, 8.1)	75.60	4.69	dd (9.3, 8.0)	75.46	4.59	dd (9.3, 8.2)	75.52
<b>3</b>	4.90	t (9.0)	78.87	4.85	m	78.74	4.79	m	78.72
<b>4</b>	4.98	t (9.3)	69.84	4.91	m	69.81	4.85*	m	69.89
<b>5</b>	2.38	td (10.0, 1.3)	72.00	2.31	td (9.9, 1.3)	71.89	2.27	td (9.9, 1.5)	71.78
<b>6a</b>	4.07	dd (11.5, 10.4)	63.68	3.99	t (10.8)	63.56	3.94	t (10.7)	63.58
<b>6b</b>	2.30	dd (11.5, 1.6)	63.68	2.23	d (10.7)	63.56	2.17	d (11.0)	63.58
<b>GEG<sub>B</sub></b>	7.08	s	111.98	7.03	s	111.85	6.99	s	111.79
<b>GEG<sub>A</sub></b>	6.92	s	110.62	6.88	s	110.50	6.87	s	110.27
<b>H<sub>A</sub></b>	6.69	s	106.67	6.65	s	106.66	6.65	s	106.58
<b>H<sub>B</sub></b>	6.77	s	107.16	6.74	s	107.06	6.32	s	104.21
<b>H<sub>C</sub></b>	–	–	–	–	–	–	7.01	s	109.87

\* overlapping signals; GEG, gallagyl unit.



**Fig. 2.** HSQC detail of aromatic regions of **T1** anomers (punicalagin, left) and **T3** anomers (cistus, right); 600 MHz in D<sub>2</sub>O. Main differences marked in yellow.  $\alpha$ - and  $\beta$ - means the anomer of glucose in the molecule, not the relative position of proton. Other proton assignments as shown at [Table 2](#). GEG, gallagyl unit.



**Fig. 3.** Structures of **T1** (punicalagin, center), **T2** (terflavin A, left) and **T3** (cistus, right, proposal) with assigned names of essential aromatic protons. Proton assignments as shown at [Tables 2](#) and [S1](#).

HMBC with respective carboxylic groups: H-2/169.2 ppm, H-3/169.4 ppm, H-4/169.8 ppm, that additionally assured assignments of aromatic protons to appropriate parts of the molecule. The crucial crosspeak in NOESY was  $GEG_A/6.84$  ppm with  $H_A/6.66$  ppm, which was similar in both  $\alpha$ -T1 and  $\alpha$ -T3, confirming a lack of change in this, inner part of the molecule.

Thus, in our opinion ellagitannin T3 is a new compound (Fig. 3), namely cyclic-4,6-[2,2'-(5,10-dihydro-2,3,7,8-tetrahydroxy-5,10-dioxo [1]benzopyrano[5,4,3-cde][1]benzopyran-1,6-diyl)-bis-[3,4,5-trihydroxybenzoate]]-cyclic-2,3-[4-(6-carboxy-2,3,4-trihydroxyphenoxy)-4',5',6'-pentahydroxy[1,1'-biphenyl]-2,2'-dicarboxylate]-D-glucopyranose, with the proposed common name **cistus**.

Punicalagin and cistus showed identical signs of the Cotton effect in CD experiments (at 277.6 nm; T1,  $-15.1$  mdeg and T3,  $-17.1$  mdeg). Thus, the S,S-axial chiralities in the gallagyl group (4,6-(S,S)-gallagyl-D-glucopyranose) were deduced for both these ellagitannins (Tanaka et al., 1986b).

Spectroscopic data for well-known terflavin A (T2, pseudomolecular ion at  $m/z$  1085.0701; calc. 1085.0749) are presented as supplementary materials (Fig. S2a–c, Tables S1 and S2). Terflavin A (Fig. 3) was previously isolated from leaves of *Terminalia catappa* L. and its structure was characterized by Tanaka et al. (1986b). In our study T2 was obtained as pale-yellow crystals which were poorly soluble in water, and for this reason its spectroscopic analysis was performed in CD<sub>3</sub>OD. Thus, the positions of substitution of T2-glucopyranose core with polyphenolic units were based on HSQC and HMBC correlations of chemical shifts of protons and carbons, especially carbonyls. The lowest carbonyl signal at about 161 ppm from the flavogallonyl group (FLG, Fig. S2a–b) was not correlated with any Glcp protons. The next two FLG carbonyls at about 167 ppm were correlated with the proton at C-4 of Glcp. The galloyl –COOR signal at about 168 ppm was correlated with both protons at C-6 of Glcp (4.79 ppm visible as dd on HMBC). HHDP carbonyl signals at 170.1 and 170.6 ppm were HMBC correlated with protons at C-2 and C-3 of Glcp, respectively. The above mentioned data allow us to exclude other T2 structures such as the reported cornusini B (Wittpahl et al., 2015).

#### 4. Conclusions

With this study, basic knowledge of the chemistry of *Cistus* × *incanus*, a popular herbal tea that is enjoying success in many European markets, is provided. Briefly, three tannins, T1–T3, that occur in the aqueous extracts from pink rock-rose, each as a pair of  $\alpha$ - and  $\beta$ -forms, were easily detectable by chromatographic methods with both DAD and MS detection. After isolation, HR-ESI-MS, UV-Vis, and NMR experiments were applied to characterize them fully. We revealed the presence of well-known punicalagin (T1) and terflavin A (T2) together with a compound T3, that seemed to be only partly defined. An in-depth analysis of MS/MS and 2D-NMR spectra confirmed that its structure is different than suggested previously. Thus, we would like to announce the discovery of **cistus**, a new hydrolyzable ellagitannin in *C. incanus*.

#### CRedit authorship contribution statement

**Izabela Fecka:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Visualization, Writing - review & editing, Project administration, Supervision. **Maciej Włodarczyk:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Visualization, Writing - review & editing. **Aneta Starzec:** Investigation, Data curation, Writing - review & editing.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

#### Acknowledgments

The study was funded by Wrocław Medical University, grant no. SUB.D110.19.005.

UHPLC-ESI-MS and NMR (300 MHz) analyses were carried out in the Laboratory of Elemental Analysis and Structural Research, Faculty of Pharmacy, Wrocław Medical University. NMR analyses (600 MHz) were carried out in the Laboratory of NMR Structural Research, Wrocław University of Science and Technology. The technical assistance of Czapor-Irzabek, H., Fajfrowski, Ł. and Paluch, S. is greatly appreciated.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112971>.

#### References

- Amakura, Y., Yoshida, T., 1996. Tannins and related polyphenols of euphorbiaceae plants. XIV. euphorbin I, a new dimeric hydrolyzable tannin from *Euphorbia watanabei*. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 44, 1293–1297. <https://doi.org/10.1248/cpb.44.1293>.
- Attaguile, G., Russo, A., Campisi, A., Savoca, F., Acquaviva, R., Ragusa, N., Vanella, A., 2000. Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. Cell Biol. Toxicol. 16, 83–90. <https://doi.org/10.1023/A:1007633824948>.
- Attaguile, G., Perticone, G., Mania, G., Savoca, F., Pennisi, G., Salomone, S., 2004. *Cistus incanus* and *Cistus monspeliensis* inhibit the contractile response in isolated rat smooth muscle. J. Ethnopharmacol. 92, 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.020>.
- Barrajón-Catalán, E., Fernández-Arroyo, S., Roldán, C., Guillén, E., Saura, D., Segura-Carretero, A., Micol, V., 2011. A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: evolutionary relationship. Phytochem. Anal. 22, 303–312. <https://doi.org/10.1002/pca.1281>.
- Ehrhardt, C., Hrinčius, E.R., Korte, V., Mazur, I., Droebner, K., Poetter, A., Dreschers, S., Schmolke, M., Planz, O., Ludwig, S., 2007. A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti-influenza virus activity in cell culture without toxic side effects and the tendency to induce viral resistance. Antiviral Res. 76, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.05.002>.
- Fecka, I., 2009. Qualitative and quantitative determination of hydrolysable tannins and other polyphenols in herbal products from meadowsweet and dog rose. Phytochem. Anal. 20, 177–190. <https://doi.org/10.1002/pca.1113>.
- Gawel-Beben, K., Kukula-Koch, W., Hoian, U., Czop, M., Strzpek-Gomółka, M., Antosiewicz, B., 2020. Characterization of *Cistus* × *incanus* L. and *Cistus ladaniifera* L. extracts as potential multifunctional antioxidant ingredients for skin protecting cosmetics. Antioxidants 9 (3), 202. <https://doi.org/10.3390/antiox9030202>.
- Gori, A., Ferrini, F., Marzano, M., Tattini, M., Centritto, M., Baratto, M., Pogni, R., Brunetti, C., 2016. Characterisation and antioxidant activity of crude extract and polyphenolic rich fractions from *C. incanus* leaves. Int. J. Mol. Sci. 17, 1344. <https://doi.org/10.3390/ijms17081344>.
- Gülz, P.-G., Herrmann, T., Hangst, K., 1996. Leaf trichomes in the genus *Cistus*. Flora 191, 85–104. [https://doi.org/10.1016/S0367-2530\(17\)30692-8](https://doi.org/10.1016/S0367-2530(17)30692-8).
- Gürbüz, P., Koşar, M., Güvenalp, Z., Kurutüzüm Uz, A., Demirezer, L.Ö., 2018. Simultaneous determination of selected flavonoids from different *Cistus* species by HPLC-PDA. Marmara Pharm. J. 22, 405–410. <https://doi.org/10.12991/jrp.2018.80>.
- Isobe, R., Tanaka, T., Nonaka, G.-I., Nishioka, I., 1989. A new method for structural study of hydrolyzable tannins by negative ion fast atom bombardment mass spectrometry. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 37, 1748–1750. <https://doi.org/10.1248/cpb.37.1748>.
- Jeszka-Skowron, M., Zgola-Grzeskowiak, A., Frankowski, R., 2018. *Cistus incanus* a promising herbal tea rich in bioactive compounds: LC-MS/MS determination of catechins, flavonols, phenolic acids and alkaloids - A comparison with *Camellia sinensis*, Rooibos and Hoan Ngoc herbal tea. J. Food Compos. Anal. 74, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.09.003>.
- Kalli, V., Kollia, E., Roidaki, A., Proestos, C., Markaki, P., 2018. *Cistus incanus* L. extract inhibits Aflatoxin B1 production by *Aspergillus parasiticus* in macadamia nuts. Ind. Crops Prod. 111, 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.003>.
- Kalus, U., Grigorov, A., Kadecki, O., Jansen, J.-P., Kiesewetter, H., Radtke, H., 2009. *Cistus incanus* (CYSTUS052) for treating patients with infection of the upper respiratory tract. Antiviral Res. 84, 267–271. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.001>.
- Kraszni, M., Marosi, A., Larive, C.K., 2013. NMR assignments and the acid-base characterization of the pomegranate ellagitannin punicalagin in the acidic pH-range. Anal. Bioanal. Chem. 405, 5807–5816. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6987-x>.
- Lendeckel, U., Arndt, M., Wolke, C., Reinhold, D., Kähne, T., Ansoerg, S., 2002. Inhibition of human leukocyte function, alanyl aminopeptidase (APN, CD13) and dipeptidylpeptidase IV (DP IV, CD26) enzymatic activities by aqueous extracts of *Cistus incanus* L. ssp. *incanus*. J. Ethnopharmacol. 79, 221–227. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00385-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00385-3).

- Mansoor, K.A., Matalka, K.Z., Qa'dan, F.S., Awad, R., Schmidt, M., 2016. Two new proanthocyanidin trimers isolated from *Cistus incanus* L. demonstrate potent anti-inflammatory activity and selectivity to cyclooxygenase isoenzymes inhibition. *Nat. Prod. Res.* 30, 1919–1926. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1089242>.
- Mayer, W., Görner, A., Andrä, K., 1977. Punicalagin und Punicalin, zwei Gerbstoffe aus den Schalen der Granatapfel. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1977, 1976–1986. <https://doi.org/10.1002/jlac.197719771119>.
- Móricz, Á.M., Szeremeta, D., Knaś, M., Długosz, E., Ott, P.G., Kowalska, T., Sajewicz, M., 2018. Antibacterial potential of the *Cistus incanus* L. phenolics as studied with use of thin-layer chromatography combined with direct bioautography and in situ hydrolysis. *J. Chromatogr. A* 1534, 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.056>.
- Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T., 1993. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. *Phytochemistry* 32, 507–521. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)95129-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)95129-X).
- Papaefthimiou, D., Papanikolaou, A., Falara, V., Givanoudi, S., Kostas, S., Kanellis, A.K., 2014. Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Front. Chem.* 2 <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00035>.
- Petereit, F., Kolodziej, H., Nahrstedt, A., 1991. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochemistry* 30, 981–985. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85291-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85291-7).
- Riehle, P., Vollmer, M., Rohn, S., 2013. Phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal infusions – antioxidant capacity and thermal stability during the brewing process. *Food Res. Int.* 53, 891–899. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.020>.
- Riehle, P., Rusche, N., Saake, B., Rohn, S., 2014. Influence of the leaf content and herbal particle size on the presence and extractability of quantitated phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal teas. *J. Agric. Food Chem.* 62, 10978–10988. <https://doi.org/10.1021/jf504119s>.
- Szeremeta, D., Knaś, M., Długosz, E., Sajewicz, M., 2017. Qualitative evaluation of composition of the volatile fraction in commercial samples of *Cistus incanus* L. *Acta Chromatogr.* 29, 427–442. <https://doi.org/10.1556/1326.2017.29.3.13>.
- Tanaka, T., Nonaka, G.-I., Nishioka, I., 1986a. Tannins and related compounds. XL. Revision of the structures of punicalin and punicalagin, and isolation and characterization of 2-O-galloylpunicalin from the bark of *Punica granatum* L. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 34, 650–655. <https://doi.org/10.1248/cpb.34.650>.
- Tanaka, T., Nonaka, G.-I., Nishioka, I., 1986b. Tannins and related compounds. XLII. Isolation and characterization of four new hydrolyzable tannins, terflavins A and B, tergalagin and tercatalin from the leaves of *Terminalia catappa* L. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 34, 1039–1049. <https://doi.org/10.1248/cpb.34.1039>.
- Tanaka, T., Tachibana, H., Nonaka, G.-I., Nishioka, I., Hsu, F.-L., Kohda, H., Tanaka, O., 1993. Tannins and related compounds. CXXII. New dimeric, trimeric and tetrameric ellagitannins, lambertianins A-D, from *Rubus lambertianus* Seringe. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 41, 1214–1220. <https://doi.org/10.1248/cpb.41.1214>.
- Viapiana, A., Konopacka, A., Waleron, K., Wesolowski, M., 2017. *Cistus incanus* L. commercial products as a good source of polyphenols in human diet. *Ind. Crops Prod.* 107, 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.066>.
- Wittpahl, G., Kölling-Speer, I., Basche, S., Herrmann, E., Hannig, M., Speer, K., 2015. The polyphenolic composition of *Cistus incanus* herbal tea and its antibacterial and anti-adherent activity against *Streptococcus mutans*. *Planta Med.* 81, 1727–1735. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1557822>.
- Yoshida, T., Yazaki, K., Memon, M.U., Maruyama, I., Kurokawa, K., Shingu, T., Okuda, T., 1989. Structures of alnusiin and bicornin, new hydrolyzable tannins having a monolactonized tergalloyl group. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 37, 2655–2660. <https://doi.org/10.1248/cpb.37.2655>.
- Yoshida, T., Hatano, T., Okuda, T., 1992. Two-dimensional NMR spectra of hydrolysable tannins which form equilibrium mixtures. *Magn. Reson. Chem.* 30, S46–S55. <https://doi.org/10.1002/mrc.1260301311>.

**P3. Polyphenol profile of *Cistus × incanus* L. and its relevance to antioxidant effect and  $\alpha$ -glucosidase inhibition.**



## Article

# Polyphenol Profile of *Cistus × incanus* L. and Its Relevance to Antioxidant Effect and $\alpha$ -Glucosidase Inhibition

Aneta Starzec<sup>1</sup>, Maciej Włodarczyk<sup>1</sup> , Dominika Kunachowicz<sup>2</sup>, Andrzej Dryś<sup>3</sup>, Marta Kepinska<sup>2</sup>   
and Izabela Fecka<sup>1,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacognosy and Herbal Medicines, Faculty of Pharmacy, Wrocław Medical University, Borowska 211a, 50-556 Wrocław, Poland

<sup>2</sup> Department of Pharmaceutical Biochemistry, Division of Biomedical and Environmental Sciences, Faculty of Pharmacy, Wrocław Medical University, Borowska 211a, 50-556 Wrocław, Poland

<sup>3</sup> Department of Physical Chemistry and Biophysics, Faculty of Pharmacy, Wrocław Medical University, Borowska 211a, 50-556 Wrocław, Poland

<sup>4</sup> Committee for Therapeutics and Drug Sciences, Polish Academy of Sciences, Defilad 1, 00-901 Warsaw, Poland

\* Correspondence: izabela.fecka@umw.edu.pl

**Abstract:** The European Food Safety Authority recommends *C. incanus* as a natural source of antioxidants. Its activity is essentially determined by polyphenols, although specific compounds are not finally indicated. The available plant material comes from different subspecies and locations, which can lead to differences in chemical composition and potency. For this reason, we conducted a detailed analysis of the polyphenol content and antioxidant activity of 52 different *C. incanus* teas from Turkey, Albania, Greece, and unspecified regions. We focused special attention on ellagitannins, which have not been properly determined so far. Besides oxidative stress, hyperglycemia is an essential component of cardiometabolic diseases. Therefore, in subsequent experiments, we evaluated the ability of *C. incanus* extracts and individual polyphenols to inhibit  $\alpha$ -glucosidase. Using statistical methods, we analyzed how differences in chemical composition affect activity. The results showed that *C. incanus* is a rich source of ellagitannins (2.5–19%), which dominate among polyphenols (5.5–23%). Turkish-origin products had higher ellagitannin content and a greater antioxidant effect (FRAP, ABTS) than Albanian and Greek products. In contrast, the flavonoid and phenolic acid contents and DPPH values were at similar levels in all products. An in-depth analysis of their composition indicated that all groups of polyphenols are involved in the antioxidant effect, but a significant contribution can be attributed to ellagitannins and flavonoids. *C. incanus* extracts showed a high capacity to inhibit  $\alpha$ -glucosidase activity ( $IC_{50}$  125–145  $\mu$ g/mL). Ellagitannins were the most effective inhibitors ( $IC_{50}$  0.7–1.1  $\mu$ M), with a potency exceeding acarbose (3.3 mM). In conclusion, *C. incanus*, due to the presence of ellagitannins and flavonoids, exhibits powerful antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effects.

**Keywords:** *Cistus × incanus*; polyphenols; flavonols; ellagitannins; antioxidants;  $\alpha$ -glucosidase inhibition



**Citation:** Starzec, A.; Włodarczyk, M.; Kunachowicz, D.; Dryś, A.; Kepinska, M.; Fecka, I. Polyphenol Profile of *Cistus × incanus* L. and Its Relevance to Antioxidant Effect and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibition. *Antioxidants* **2023**, *12*, 553. <https://doi.org/10.3390/antiox12030553>

Academic Editor: Stanley Omaye

Received: 29 January 2023

Revised: 17 February 2023

Accepted: 20 February 2023

Published: 22 February 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

*Cistus × incanus* L. is widely used in the food and pharmaceutical industries as an excellent source of antioxidants. Preparations of *C. incanus* have been recommended as a natural product providing compounds with such effects by the European Food Safety Authority (EFSA) since 2010 [1]. Its antioxidant activity is mainly associated with the presence of polyphenols.

The taxonomy of the *Cistus* (rock-rose) genus is complex, which can cause problems identifying individual species and plant material. Frequent polymorphism of vegetative and generative organs and possible hybridization between related species result in numerous subspecies being distinguished. For example, *C. incanus* is considered a hybrid

between *C. albidus* and *C. crispus*. At present, we distinguish three subspecies: *incanus*, *cor-sicus*, and *creticus* (= *C. creticus*) [2–4]. Plant material from different subspecies and regions can vary significantly in chemical composition and activity.

Plants of the genus *Cistus* have been widely used in the traditional medicine of Mediterranean countries. Rock-rose has been recommended for skin wounds, respiratory inflammation, circulatory and urinary disease, and diabetes. Its extracts have also been used for gastrointestinal disorders, peptic ulcers, and diarrhea [4,5].

An imbalance between endogenous antioxidants and prooxidants is associated with the occurrence of oxidative stress and the production of multiple reactive oxygen species (ROS), which is strongly correlated with the pathogenesis of non-communicable chronic diseases. Polyphenols can quench ROS, chelate transition metals, trap reactive dicarbonyls (e.g., methylglyoxal), and, as a result, reduce lipid peroxidation and post-translational modification of proteins and lipoproteins, and protect DNA from interaction with a wide range of metabolites [6–8]. Therefore, *C. incanus* preparations are suggested as dietary supplements to strengthen the immune system and prevent many chronic diseases such as type 2 diabetes and cardiovascular, liver, and kidney diseases [4,6,7].

Type 2 diabetes is a severe chronic metabolic disorder that causes many health complications and is one of the leading causes of mortality [9,10]. Excessive postprandial hyperglycemia (PPHG) is one of the most important factors in the development of diabetes. PPHG is also a strong predictor of cardiovascular disease; it increases oxidative stress through vascular endothelial dysfunction and subclinical inflammation, resulting in atherosclerosis and cardiovascular events [10]. High post-meal glucose levels are closely related to the diet's carbohydrate content and the action of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase in the gastrointestinal tract. These enzymes are crucial for carbohydrate digestion [10,11]. In light of this, agents that can reduce PPHG by delaying the digestion of complex carbohydrates in the diet may be an attractive preventative option and an adjunctive treatment for diabetes [10]. There are scientific reports suggesting that some polyphenols may have the ability to inhibit carbohydrate hydrolases, but there are few such studies on *Cistus* extracts [11].

Rock-rose is characterized by a wide variety of polyphenols. Despite the availability of literature data, its complete chemical profile is not yet known. The contents of individual components depend on genotype, environmental, cultivation, and storage conditions [4,12]. The main compounds found in *C. incanus* include flavonoids; among them, flavonols and flavan-3-ols are distinctive [13–17]. The non-flavonoid compounds include ellagitannins [15,18,19]. In addition, free phenolic acids are present [17,20]. All *Cistus* species also contain essential oil and a brown resin comprising labdane-type diterpenes [13,14,16].

In a study evaluating the effect of regular administration of *C. incanus*, Kuchta et al. [21] observed a reduction in cardiometabolic risk factors in healthy volunteers, including oxidative stress and dyslipidemia, by improving the lipid profile. Moreover, our previous in vitro studies showed that rock-rose flavonols exhibit antiglycative activity by inhibiting protein glycation [8]. However, the components responsible for the observed antioxidant, antidiabetic, and hypolipidemic effects have not been identified, while the market of *Cistus* products of different or unspecified origins is growing.

Therefore, we aimed to compare the antioxidant activity in relation to the chemical composition of *C. incanus* teas of different origins. We evaluated the content of polyphenols, including individual ellagitannins, flavonoids, and phenolic acids. Furthermore, in our study, we assessed in vitro the potential of *C. incanus* to modify polysaccharide metabolism through the effects on  $\alpha$ -glucosidase by analysis of both the extracts themselves and individual polyphenols. Using statistical methods, we investigated how the chemical profile and its revealed differences affect antioxidant and anti-glucosidase activity.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals and Reference Materials

Folin–Ciocalteu reagent, iron (III) chloride, and iron (II) sulfate heptahydrate were obtained from Chempur (Poland). Aluminium chloride and 2,4,6-tris-(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) was from Fluka (Switzerland). ABTS, DPPH, DMSO, Trolox, acarbose, 4-nitrophenol (*p*-NP), 4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (*p*-NPG),  $\alpha$ -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae*, LC and LC-MS grade solvents, and others were from Sigma-Aldrich (Germany).

Myricetin, myricetin-3-*O*- $\alpha$ -rhamnoside (myricitrin), myricetin-3-*O*- $\beta$ -galactoside (gmelinoside I), quercetin, quercetin-3-*O*- $\alpha$ -rhamnoside (quercitrin), quercetin-3-*O*- $\beta$ -glucoside (isoquercitrin), quercetin-3-*O*- $\beta$ -galactoside (hyperoside), quercetin-3-*O*- $\beta$ -glucuronoside, kaempferol, kaempferol-3-*O*- $\beta$ -glucoside (astragalol), kaempferol-3-*O*- $\beta$ -glucuronoside, kaempferol-3-*O*- $\beta$ -(6''-*O*-*p*-coumaroyl)glucoside (tiliroside), gallic acid, ellagic acid, (+)-catechin, (–)-epicatechin, procyanidins A2, B1, B2 and C2 were purchased from Extrasynthese (France). Cistus, punicalagin, and terflavin A were isolated from *C. incanus* by Fecka et al. [18], and myricetin-3-*O*- $\beta$ -glucuronoside by Fecka [22]. All assayed compounds were at least of 95% purity (HPLC-DAD).

Stock solutions (1 mg/mL) were prepared with methanol for most compounds and with DMSO for ellagic acid. The obtained solutions were then diluted with 50% aq. methanol (*v/v*) to concentrations 20–200  $\mu$ g/mL, and filtered by Durapore 0.45 and 0.22  $\mu$ m filters (Millipore, Sigma-Aldrich).

Some minor polyphenols were identified by co-chromatography with the reference materials (Galke, Germany): helichryoside  $\rightarrow$  *Helichrysum arenarium* [23,24], kaempferol-3-*O*- $\beta$ -galactoside  $\rightarrow$  *Menyanthes trifoliata* [25], myricetin-3-*O*- $\beta$ -glucoside  $\rightarrow$  *Humulus lupulus* and *Vitis vinifera* [26,27], myricetin-3-*O*- $\alpha$ -arabinofuranoside  $\rightarrow$  *Polygonum aviculare* [28], quercetin-3-*O*- $\beta$ -xyloside  $\rightarrow$  *Malus domestica* and *Pyrus communis* [29], quercetin-3-*O*- $\alpha$ -arabinofuranoside  $\rightarrow$  *Polygonum aviculare* [28], punicalin  $\rightarrow$  *Punica granatum* [30].

### 2.2. General Equipment

LC analysis was performed in a Dionex Ultimate 3000 liquid chromatograph with an autosampler (WPS-3000TSL), a pump (LPG-3400SD), a column thermostat (TCC-3000SD), and a diode detector (DAD-3000) (Thermo-Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA). The system was connected with Chromeleon 7 software.

Spectrophotometric measurements were conducted using a Multiskan GO Spectrophotometer (Thermo-Fisher Scientific). The %Inhibition was calculated from the formula

$$\% \text{ inhibition} = \left( \frac{A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}} \right) \times 100$$

MS spectra in the negative mode were recorded on an ESI-qTOF Compact mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany). The mass spectrometer was re-calibrated for every run [31].  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , HSQC, HMBC, and COSY experiments were recorded on Avance 300 MHz spectrometer (Bruker) in DMSO-*d*<sub>6</sub> and calibrated using the residual solvent peak. The data were processed with MestReNova 12 software (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, A Coruña, Spain).

### 2.3. Plant Material and Extracts

The material used in this study consisted of 52 commercial products (teas) containing dried leaves or shoot tops (herbs) of *Cistus  $\times$  incanus* L. (labeled as Ci1–Ci52). The products were purchased from various companies and came from different countries (Albania, Greece, Turkey) or had no specific origin. All *C. incanus* samples (approx. 10 g each) were homogenized with an analytical mill A 11 basic (IKA, Königswinter, Germany) and sieved through a 0.355 mm sieve (Multiserw-Morek, Marcyporeba, Poland).

Approx. 1 g of homogenized material was transferred into 50 mL of 55% aq. methanol (*v/v*) and heated in a water bath under a reflux condenser for 15 min after reaching the

boiling point. Next, the extracts were decanted and filtered through Durapore 0.45 and 0.22  $\mu\text{m}$  filters. The drug-extract ratio was 1:50. Extracts were prepared in triplicate.

#### 2.4. Preparative Separation of *C. incanus* Flavonols

The main flavonols were isolated from *C. incanus* water-acetone extract on octadecyl by column chromatography and then purified on Sephadex LH-20. Mixtures of water-methanol (RP-18) and methanol (LH-20) were used as eluents. The procedure was described previously [18].

The resulting compounds were subjected to MS and NMR. Spectroscopic data were compared with data from the scientific literature and authentic standards.

#### 2.5. UHPLC-ESI-qTOF-MS and HPLC-DAD Experiments

In general, the conditions for confirming the analyzed polyphenols' identity were described before [18,31]. The separations were achieved on the Ultimate 3000 liquid chromatograph with DAD and ESI-qTOF Compact detectors and an octadecyl Kinetex column (150  $\times$  2.1 mm; 2.6  $\mu\text{m}$ ; Phenomenex, Torrance, CA, USA). The resulting chromatograms, together with base and fragmentation mass spectra, were analyzed with Data Analysis 4.2 software (Bruker).

The content of polyphenols was analyzed on an octadecyl Hypersil Gold column (250  $\times$  4.6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ; Thermo-Fisher Scientific) by the method described previously [18]. Flavonols, ellagic acid and ellagitannins were detected at 254 nm, gallic acid and flavan-3-ols at 280 nm, and coumaroyl-flavonols at 320 nm (Table S5). For each polyphenol, the mean content in the test product and the standard deviation (SD) were determined. In addition, the mean compound content, SD, median, minimum, and maximum values were calculated for the groups of products. Due to the lack of authentic standards, some components were calculated from regression equations of related compounds. The amount of hexahydroxydiphenoyl-glucose and punicalin was calculated as punicalagin, myricetin-3-*O*-glucoside and myricetin-3-*O*-arabinoside as myricetin-3-*O*-galactoside, quercetin-*O*-arabinoside as quercetin-3-*O*-galactoside, helichryoside and coumaroyl-tiliroside as tiliroside. Differences in molecular masses were taken into account in each conversion. Sums of ellagitannins (SET), phenolic acids (SPA), flavonoids (SF, flavonols+flavan-3-ols), and polyphenols (SPP) were obtained by summing the compounds in each group.

#### 2.6. Total Phenolic (TPC) and Flavonoid (TFC) Content

TPC was estimated using the Folin–Ciocalteu method described by Singleton et al. [32], while TFC was estimated according to the European Pharmacopoeia method for *Betulae folium* [33], with some modifications. A detailed description of the procedures can be found in our publication [8]. TPC results were expressed as mg of gallic acid equivalents per gram of dry weight (mg GAE/g d.w.). The TFC was expressed as myricetin equivalents (mg ME/g d.w.).

#### 2.7. Antioxidant Activity Tests

##### 2.7.1. DPPH and ABTS

The modified Blois method was used [34]. In a 96-well microplate, 200  $\mu\text{L}$  of DPPH solution was added to 20  $\mu\text{L}$  of each diluted extract (1:30). The plate was incubated for 30 min at ambient temperature in the dark. The absorbance was measured at 517 nm.

The method developed by Chen and Kang [35] was applied to evaluate the antioxidant effect using the ABTS radical. ABTS reagent was obtained according to the procedure described previously [8]. In a 96-well microplate, 200  $\mu\text{L}$  of ABTS reagent and 2  $\mu\text{L}$  of each diluted extract (1:30) were mixed. The plate was incubated for 15 min. Absorbance was measured at 734 nm.

Calibration was set for gallic acid (0.06–0.6  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ). Results were expressed as a percentage of DPPH or ABTS radical inhibition and as mM of gallic acid equivalents per gram of dry weight (GAE/g d.w.).



### 2.7.2. FRAP

The FRAP assay, according to the method of Benzie and Strain [36] with slight modifications [8], was used. Then, 20  $\mu\text{L}$  of diluted extracts (1:30) and 200  $\mu\text{L}$  of FRAP reagent were each applied to the microplate. The plate was incubated for 4 min at ambient temperature in the dark. Absorbances at 593 nm were measured.

Calibration was performed for both ferrous ions Fe(II) (0.01–0.6  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) and gallic acid (0.1–2  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ). Results were expressed as mM of Fe(II) per gram of dry weight and mM of GAE/g d.w.

### 2.8. $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Assay

The  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity was conducted in a 96-well microplate using 4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (*p*-NPG), as reported previously [37]. Briefly, 90  $\mu\text{L}$  of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH = 6.9) was mixed with 50  $\mu\text{L}$  of sample (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , methanol-buffer 1:1) and 40  $\mu\text{L}$  of enzyme solution (0.25 U/mL). Acarbose (5 mg/mL) was used as a positive control. The microplate with samples and enzyme solution was initially incubated for 5 min at 37 °C. After preincubation, the reaction was started by adding 20  $\mu\text{L}$  of 5 mM *p*-NPG to the wells containing extracts/polyphenols or acarbose. The reaction was allowed to run for 10 min and afterward stopped by adding 50  $\mu\text{L}$  of 0.1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . The absorbance was measured at 405 nm. All of the samples were tested in triplicate.

The readings were reduced by absorbance of the sample blanks measured separately for each extract/polyphenol, which consisted of 50  $\mu\text{L}$  of extract diluted in 150  $\mu\text{L}$  of buffer solution only, while values obtained for uninhibited controls were reduced by absorbance values of the buffer solution (buffer blank). The activity was expressed as %inhibition. The half-maximal inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) values, defined as concentration of inhibitor necessary to reduce the rate of an enzymatic process by 50%, were calculated as follows:

$$\text{IC}_{50} = \frac{\text{sample concentration} \times 50}{\% \text{ inhibition}}$$

### 2.9. Kinetics of $\alpha$ -Glucosidase Inhibition

Polyphenols with >70% of  $\alpha$ -glucosidase inhibition (gallic acid, ellagic acid, cistus, punicalagin, terflavin A, tiliroside) were subjected to a kinetic study aiming to determine their mode of enzyme inhibition. Inhibition modes of  $\alpha$ -glucosidase were determined according to Chu et al. [38]. Basically, the varying concentrations of polyphenols (0.5–250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and acarbose (2.5–10 mg/mL) were tested for inhibitory activity in the range of increasing *p*-NPG concentrations (1–20 mM) with a fixed enzyme concentration (0.25 U/mL). After 5 min of preincubation, the addition of the substrate started the reaction, and the changes in absorbance were measured at 30 s intervals. The uninhibited reaction was also run. The reaction was terminated after 10 min, and the absorbance values obtained in the kinetic study were used to create Lineweaver–Burk plots of  $1/v$  against  $1/[S]$ .

### 2.10. Statistical Analysis

Statistica software (StatSoft, TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA) was used for statistical analysis. Normality of distribution was checked using the Shapiro–Wilk test. Analysis of variance (ANOVA) and post-hoc Fisher’s LSD test was performed. Correlation between data was checked using linear regression and Spearman’s rank correlation coefficient. Statistical significance for all tests was taken as  $p < 0.05$ . For details, see the Supplementary Materials in Section S4.

## 3. Results and Discussion

*C. incanus* teas are popular as products with antioxidant potential. Therefore, they are used in the prevention and supportive therapy of many chronic diseases, including cardiometabolic diseases, in which oxidative stress and hyperglycemia are relevant to pathomechanism [5–7,16,21,39].

Rock-rose is also a source of many polyphenols, but their profile has not been fully defined, especially for materials of diverse origins [5,13,15,16,18,20,21]. Therefore, we carried out a detailed study of the polyphenol profile in 52 commercial *C. incanus* teas, of which 23 were of Turkish origin, 10 were from Albania, and 3 were from Greece (the data obtained for these materials may not be precise due to the small number of samples). The other products had no specified place of cultivation. However, our previous study showed that these products were possibly Albanian [8]. The present work is a continuation of that research.

Since *C. incanus* is well described in terms of antioxidant properties, we conducted antioxidant tests to compare the effect of the chemical profile on this action. It is likely that one of the groups of rock-rose polyphenols is ellagitannins, as described previously [18], so we focused on the determination of individual compounds from this group (punicalagin, cistus, terflavin A). Flavonoids and phenolic acids were also quantified. In the first stage, we standardized the extraction method. Comprehensive information can be found in the Supplementary Materials (Section S1, Tables S1–S4). Extraction with 55% aq. methanol was chosen for routine assays. Then, the content of polyphenols determined by chromatographic and spectrophotometric methods was compared. Since punicalagin is a known inhibitor of  $\alpha$ -glucosidase [40], we decided to test *C. incanus* extracts and individual polyphenols as potential inhibitors of an enzyme involved in polysaccharide metabolism.

### 3.1. *C. incanus* Polyphenols

The polyphenol profile was verified by UHPLC-ESI-qTOF-MS using extracts from six products (Ci5, Ci30, Ci38, Ci47, Ci48, Ci53) of different origins. In addition, two solvent gradients were used to enhance the information on co-eluting compounds. For polyphenol identification, authentic standards, ellagitannins, and flavonoids isolated from *C. incanus* (Section 2.4) were used. Details of the identified compounds are summarized in Table S5.

UHPLC-ESI-qTOF-MS analysis identified 54 polyphenolic compounds (peaks 1–54) based on reference substances, literature data, interpretation of UV/Vis spectra, retention times, and mass spectra. Among the tannins and related compounds were cistus, punicalagin, punicalin, terflavin A, hexahydrodiphenoyl-glucose (HHDP-Glc), gallic and ellagic acids, ellagic acid glycosides, as well as flavan-3-ols such as catechin, epicatechin, and galocatechin.

We isolated the main ellagitannins and flavonoids according to the procedure described before [18]. The following common flavonols were identified by HRMS and MS/MS together with NMR: myricetin-3-*O*- $\beta$ -galactoside (=gmelinoside-I), myricetin-3-*O*- $\beta$ -rhamnoside (=myricitrin) and myricetin-3-*O*- $\alpha$ -arabinoside. Of them, myricetin-3-*O*- $\beta$ -galactoside was isolated by Gürbüz et al. [41] from *C. salviifolius* and reported by Riehle et al. [42] in *C. incanus*, myricetin-3-*O*- $\alpha$ -arabinoside was not confirmed in *C. incanus* previously while myricetin-3-*O*- $\beta$ -rhamnoside was reported in the genus *Cistus* by Wittpahl et al. [15]. The other observed compounds with a myricetin core were myricetin-*O*-hexoside gallate and minor pentoside. The latest one was co-chromatographed with *Polygonum aviculare* herb extract and identified as myricetin-3-*O*- $\alpha$ -arabinoside (=betmidin, furanoside form) [28].

The main quercetin glycosides—3-*O*- $\beta$ -galactoside (=hyperoside), 3-*O*- $\beta$ -glucoside (=isoquercitrin), and 3-*O*- $\beta$ -rhamnoside (=quercitrin)—from fractions were additionally compared with authentic standards. Of them, hyperoside was isolated by Gürbüz et al. [41] from *C. salviifolius* and reported by Wittpahl et al. [15] and Riehle et al. [42]. Among quercetin pentosides, the main isomer was presumed as 3- $\alpha$ -L-arabinopyranoside due to its highest intensity in this group and a previous report of this compound [41], and above its MS/MS typical for 3-*O*-substituted flavonols; quercetin-*O*-pentoside at 12.10 min with MS/MS in the manner of 3-*O*-substituted flavonols was presumed to be 3-*O*-xyloside of quercetin, following co-chromatography with its known source, i.e., pear and apple skin extracts [29], while the slower isomer at 12.35 min was confirmed to be avicularin (quercetin-3- $\alpha$ -L-arabinofuranoside) by co-chromatography with *Polygonum aviculare* extract [28]. Still, the amount was insufficient to perform an NMR analysis. Similarly to myricetin, tentatively

identified quercetin-*O*-hexoside gallate was observed at 11.28 min. The following two compounds were previously reported in the genus *Cistus*: CAS: 1891055-64-3 and quercetin-3-*O*- $\alpha$ -arabinopyranoside in *C. salviifolius* [41].

Concerning kaempferol glycosides, two *O*-hexosides were observed, both giving MS/MS fragments typical for 3-*O*-substituted flavonols. The second, at 12.42 min, was confirmed as astragalin with the authentic standard, while the first, at 12.19 min, was confirmed to be trifolin (=kaempferol-3-*O*- $\beta$ -D-galactopyranoside) by co-chromatography with *Menyanthes trifoliata* extract [25]. Previously, the sugars for kaempferol glycosides were attributed by Wittpahl et al. [15] tentatively only. A minor compound at 417 *m/z* was identified as kaempferol-3-*O*-pentoside.

The last distinctive group of flavonols comprised esters with coumaric acid. The most intense ions originated from a pair of *E/Z*-tilirosides (denoted in Table S5 as its isomers b and c, confirmed with the authentic standard) accompanied by a more rapidly eluting small one (probably 7-*O*-substituted kaempferol-6''-coumaroylglucoside, e.g., buddlenoid A) or tiliroside analog with galactose core instead of glucose. Three additional small molecules corresponding to coumaroyl esters of tiliroside were observed at the end of the chromatogram. Coumaroyl-tiliroside was previously described by Wittpahl et al. [15]. On the chromatogram, tiliroside was preceded by three molecules with 609 *m/z* and a fragmentation pattern analogous to tiliroside, except that the core molecule (MS/MS) was quercetin or its analog. Such compounds were helichryoside (confirmed by co-chromatography) with *Helichrysum arenarium* extract [24] and its isomers, not previously reported in rock-rose.

All ellagitannins appeared on UHPLC chromatograms as two peaks each, most likely according to an equilibrium of  $\alpha/\beta$  anomers of the central sugar. Other known polyphenols such as gallic acid, ellagic acid, catechin, and epicatechin were also identified compared to authentic standards. Additionally, minor amounts of glycosides such as ellagic acid pentosides, hexoside, and deoxyhexoside were observed in the extracts.

The used MS conditions were insufficient to observe and identify procyanidins that were reported previously [43]. It may be that other polyphenols present in larger quantities hindered the analysis. A different assay or extraction technique would have to be used to obtain the procyanidin fractions, which requires further experiments.

### 3.2. Quantification of Polyphenols, Flavonoids, Tannins, and Phenolic Acids in *C. incanus*

In most scientific works, the total phenolic content (TPC) was determined by the Folin–Ciocalteu method; therefore, we initially determined the TPC of extracts using this method. In addition, the total flavonoid content (TFC) expressed as myricetin equivalents (ME) was determined. The same extracts were then subjected to quantitative analysis by HPLC-DAD. Detailed data (mean, SD, median, minimum, and maximum values) for products of different origins are shown in Table 1. It also includes the sum of polyphenols, flavonoids, ellagitannins, and phenolic acids determined by HPLC-DAD, while the content of individual polyphenolic compounds is shown in Table 2.

**Table 1.** Contents of polyphenols, flavonoids, ellagitannins, and phenolic acids by HPLC-DAD, and total phenolic and flavonoid content by spectrophotometric methods in *C. incanus* teas.

Origin		HPLC-DAD Method				Spectrophotometric Method	
		SPP Sum of Polyphenols [mg/g d.w.]	SF Sum of Flavonoids [mg/g d.w.]	SET Sum of Ellagitannins [mg/g d.w.]	SPA Sum of Phenolic Acids [mg/g d.w.]	TPC [mg GAE/g d.w.]	TFC [mg ME/g d.w.]
All (n = 52)	Mean	101.65	17.68	73.24	10.73	349.59	39.71
	SD	41.07	2.28	39.06	2.83	137.26	12.05
	Median	90.43	18.12	65.43	10.44	372.95	36.79
	Max	228.75	22.89	189.36	20.92	623.40	72.12
	Min	54.35	12.13	26.48	4.68	13.62	21.45
Turkey (n = 23)	Mean	123.71	18.42	94.10	11.18	354.80	44.68
	SD	47.53	1.96	45.40	3.20	156.50	13.48
	Median	105.47	18.62	76.22	11.15	374.13	44.67
	Max	228.75	22.89	189.36	20.92	609.58	72.12
	Min	55.35	14.54	27.79	4.68	13.62	23.20
Albania (n = 10)	Mean	80.18	17.33	51.82	11.03	327.70	33.47
	SD	21.27	2.52	18.86	2.18	115.45	6.13
	Median	78.60	17.82	50.07	10.54	358.91	34.06
	Max	124.68	21.13	92.78	15.82	472.57	42.12
	Min	54.76	12.64	29.17	8.67	94.36	22.75
Greece (n = 3)	Mean	92.27	17.85	64.14	10.27	403.43	40.38
	SD	28.00	0.70	27.28	1.38	50.76	7.34
	Median	83.23	17.79	55.53	9.90	374.92	40.56
	Max	123.67	18.58	94.69	11.80	462.03	47.63
	Min	69.90	17.19	42.21	9.11	373.34	32.95

TPC—total phenolic content; TFC—total flavonoid content; mg GAE—gallic acid equivalents; mg ME—myricetin equivalents; SD—standard deviation; Min—minimum value; Max—maximum value; g d.w.—a gram of dry weight.

**Table 2.** Content of individual polyphenolic compounds in *C. incanus* teas.

Origin		HHDP-Glc <sup>1,2</sup>	Punicatin <sup>1,2</sup>	Gallic Acid	Punicalagin <sup>1</sup>	Terflavin A <sup>1</sup>	Cistus <sup>1</sup>	Catechin	Epicatechin	Myricetin-3-O-galactoside	Myricetin-3-O-glucoside <sup>3</sup>	Ellagic Acid	Myricetin-3-O-arabinoside <sup>3</sup>	Myricitrin	Hyperoside	Isoquercitrin	Quercetin-3-O-arabinoside <sup>4</sup>	Quercitrin	Kaempferol-3-O-glucoside	Helichryoside <sup>1,5</sup>	Tiliroside <sup>1</sup>	Coumaroyl-tiliroside <sup>1,5</sup>
		[mg/g d.w.]																				
All (n = 52)	Mean	4.62	0.41	7.29	29.41	14.01	24.79	1.14	1.11	2.66	0.21	3.44	0.63	3.80	3.22	0.30	0.27	0.11	0.09	0.40	2.42	1.32
	SD	2.36	0.33	2.12	18.14	4.98	15.70	0.48	0.43	0.95	0.33	1.00	0.32	1.83	0.64	0.27	0.30	0.20	0.13	0.08	0.76	0.56
	Median	4.30	0.39	7.10	25.77	13.28	20.67	1.15	1.09	2.74	0.04	3.36	0.60	3.53	3.04	0.22	0.22	LOQ	0.02	0.39	2.24	1.16
	Max	13.05	1.06	16.11	82.86	33.08	74.93	2.27	2.44	4.54	1.26	5.59	1.32	8.59	5.07	0.98	1.10	0.97	0.46	0.65	4.38	2.72
	Min	0.68	LOQ	3.53	7.77	6.51	5.55	0.42	0.42	LOQ	LOQ	1.15	LOQ	0.39	2.46	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	0.21	1.25	0.55
Turkey (n = 23)	Mean	6.05	0.58	7.45	37.96	16.25	33.27	1.13	1.30	2.84	0.28	3.73	0.65	3.48	3.39	0.33	0.32	0.12	0.12	0.38	2.58	1.49
	SD	2.75	0.30	2.50	21.72	5.98	17.71	0.56	0.43	0.91	0.34	1.12	0.32	1.91	0.70	0.31	0.32	0.25	0.16	0.08	0.85	0.55
	Median	6.22	0.49	7.17	29.00	15.45	26.00	1.17	1.35	2.91	0.13	3.54	0.61	3.38	3.22	0.25	0.28	LOQ	0.03	0.38	2.54	1.52
	Max	13.05	1.06	16.11	82.86	33.08	74.93	2.27	2.44	4.16	1.26	5.52	1.28	8.59	5.07	0.98	1.10	0.97	0.46	0.61	4.38	2.48
	Min	1.97	LOQ	3.53	8.46	7.13	8.93	0.42	0.42	0.49	LOQ	LOQ	1.15	0.02	0.39	2.47	LOQ	LOQ	LOQ	0.21	1.25	0.55
Albania (n = 10)	Mean	3.14	0.17	7.76	19.95	13.08	15.49	1.30	0.74	2.83	0.17	3.26	0.71	4.34	3.04	0.20	0.23	0.13	0.02	0.38	2.21	1.02
	SD	1.20	0.20	1.50	8.04	3.55	7.64	0.38	0.21	0.68	0.37	0.75	0.37	1.28	0.41	0.16	0.25	0.13	0.04	0.05	0.69	0.55
	Median	3.32	0.08	7.54	19.56	12.78	15.87	1.27	0.71	2.81	LOQ	2.93	0.71	4.85	3.13	0.24	0.17	0.08	LOQ	0.38	2.11	0.88
	Max	4.52	0.59	10.86	33.05	20.39	34.24	1.81	1.08	3.92	1.03	4.96	1.28	5.80	3.82	0.45	0.69	0.34	0.14	0.45	3.99	2.54
	Min	0.68	LOQ	5.89	8.87	8.09	6.64	0.75	0.47	1.66	LOQ	2.53	LOQ	1.63	2.47	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	0.31	1.36	0.58
Greece (n = 3)	Mean	4.39	0.21	7.25	26.46	13.34	19.74	1.18	1.19	2.61	0.39	3.02	0.64	3.82	3.15	0.38	0.36	0.03	LOQ	0.33	2.55	1.23
	SD	0.17	0.20	0.77	17.16	4.39	9.84	0.44	0.35	0.62	0.67	0.72	0.21	1.04	0.62	0.26	0.36	0.04	LOQ	0.07	0.82	0.59
	Median	4.45	0.14	7.37	18.79	12.84	14.20	1.25	1.01	2.67	LOQ	2.69	0.70	4.30	3.01	0.26	0.35	LOQ	LOQ	0.36	2.13	0.97
	Max	4.53	0.43	7.95	46.11	17.96	31.10	1.58	1.60	3.19	1.16	3.85	0.82	4.54	3.83	0.67	0.73	0.08	LOQ	0.38	3.49	1.91
	Min	4.20	0.05	6.42	14.47	9.23	13.92	0.71	0.97	1.96	LOQ	2.53	0.41	2.62	2.61	0.21	LOQ	LOQ	LOQ	0.25	2.02	0.81

SD—standard deviation; HHDP-Glc—hexahydrodiphenylglucose; Min—minimum value; Max—maximum value; g d.w.—grams of dry weight; LOQ—below the limit of quantification; <sup>1</sup> the values quoted are the sum of the isomers; <sup>2</sup> calculated as punicalagin equivalents; <sup>3</sup> calculated as myricetin-3-O-galactoside equivalents; <sup>4</sup> calculated as hyperoside equivalents; <sup>5</sup> calculated as tiliroside equivalents.

### 3.2.1. Quantification of TPC and TFC

Total phenolics in *C. incanus* extracts are presented as gallic acid equivalents per gram of dry weight of the product. The mean TPC for all samples (Ci1-Ci52) was estimated at 350 mg GAE/g d.w. (range 14–623 mg/g). Samples of Turkish and Albanian origin had similar TPC, 354 mg/g and 328 mg/g, respectively. A high content was recorded in samples from Greece, with 403 mg/g. However, the differences were not statistically significant (Table S10). Slightly lower TPC values (269–347 mg/g) were recorded in the study of Gawel-Beben et al. [6] in 60% hydromethanolic and methanolic extracts. In 80%

hydromethanolic extracts of a dozen *C. incanus* products of different origins, TPC ranged from 2 to 148 mg GAE/g d.w. As in our study, it was noted that products of Turkish origin had the highest content of polyphenols (84 mg/g), especially compared to products of unknown origin, which were the poorest in these compounds [20]. Lower TPC was also obtained for 50% [44] and 30% [45] hydroethanolic extracts, where the amount of polyphenols was 42–99 mg and 36–89 mg GAE/g d.w., respectively.

In addition to the high TPC content, samples of Turkish origin had the highest TFC (mean 45 mg ME/g d.w.) compared to Greek and Albanian origin (mean 40 and 33 mg/g, respectively). The TFC for all samples tested averaged 40 mg/g and ranged from 21 to 72 mg/g. In other studies, TFC values, converted to the selected flavonol, e.g., quercetin equivalents (QE) or rutin equivalents (RUE), were significantly lower than the results expressed as ME. Similar TFC values to those in the present study, expressed as quercetin, were obtained by Gawel-Beben et al. [6] (45–54 mg QE mg/g d.w.). A higher flavonoid content calculated as quercetin 41–138 mg QE mg/g d.w. was obtained in another study [45]. The TFC expressed as rutin was 11 mg (RUE/g d.w.) [46].

### 3.2.2. Quantification of Polyphenols, Flavonoids, Tannins, and Phenolic Acids by HPLC-DAD

Analyzing the mean contents of individual polyphenols in the *C. incanus* products, the largest amounts were recorded for ellagitannins, 73 mg/g d.w. (SET range 26–189 mg/g). Turkish products had the highest SET content (94 mg/g) compared to the other countries, Greece (64 mg/g) and Albania (52 mg/g). The differences were statistically significant (Tables S10 and S11, Figure S3). A total of five compounds belonging to this group were determined, of which punicalagin was the main one with an average value of 29 mg/g d.w., followed by cistus with 25 mg/g and terflavin A with 14 mg/g. In addition, the hexahydroxydiphenoyl-glucose isomers previously mentioned by Wittpahl et al. [15] were detected. Their amount was six times lower than that of punicalagin, with a mean 5 mg/g d.w. (range 0.7–13 mg/g). Furthermore, small amounts of punicalin were reported (mean 0.4 mg/g). It was not possible to determine proanthocyanidins because their content was below the LOD (Table S7).

The mean phenolic acid content of *C. incanus* teas was estimated at ~10–11 mg/g d.w. (SPA range 5–21 mg/g). Among these, only gallic and ellagic acids were present in higher amounts, averaging 7 and 3 mg/g, respectively. Both compounds were found in similar amounts in products of different origins.

The third group consisted of flavonoids, in which monomeric flavan-3-ols (epicatechin and catechin) and flavonols (glycosides of myricetin, quercetin, and kaempferol) were recorded. It was consistent with previous reports [13–17,20]. The sum of flavonoids (SF, flavonols+flavan-3-ols) was determined to be 18 mg/g d.w. (range 12–23 mg/g). There were no statistically significant differences between products of various origins. Flavan-3-ols occurred at similar levels (1 mg/g) in the 0.4–2.4 mg/g. Products from different origins contained comparable amounts of catechin and epicatechin. *C. incanus* contained flavonol monoglycosides with sugars such as galactose, glucose, rhamnose, arabinose, and xylose. Larger amounts were recorded for rhamnosides and galactosides, i.e., myricitrin (mean 4 mg/g), hyperoside (mean 3 mg/g), myricetin-3-*O*-galactoside (below 3 mg/g), and coumaroyl-flavonols such as tiliroside (mean 2 mg/g). In addition, myricetin-3-*O*-arabinoside, myricetin-3-*O*-glucoside, quercetin-*O*-arabinoside, quercitrin, and kaempferol-3-*O*-glucoside were detected in smaller amounts. Other coumaroyl-flavonols were also detected in relatively large amounts—coumaroyl-tiliroside (mean 1 mg/g) and helichryoside (mean 0.4 mg/g). The flavonoid content estimated by HPLC-DAD vs. spectrophotometric methods was ~2 times lower but reached the same order of magnitude (18 vs. 40 mg/g d.w., respectively). The ratio of TFC:SF varied around a value of 1.2–4 (median 2). It is believed that using an appropriately selected standard (myricetin) gives more realistic results than using rutin or quercetin, which were used in other studies, and the calculated flavonoid content was lower [6,20,46].

The sum of polyphenols (SPP), obtained by adding the determined contents for the individual compounds, in all *C. incanus* products was estimated at 102 mg/g d.w. (range 54–229 mg/g), and the highest polyphenol sum was found in Turkish (124 mg/g), followed by Greek (92 mg/g) and Albanian (80 mg/g) products. The differences were statistically significant (Tables S10 and S11, Figure S3). SPP was more than three times lower compared to TPC. The ratio of polyphenol content for both methods ranged from 0.2 to 10 (median 3). The spectrophotometric method is used for the approximate estimation of polyphenols, and its results may be overestimated due to the presence of other substances in the extracts that can react with the Folin–Ciocalteu reagent. Chromatographic methods, on the other hand, allow quantitative analysis of individual polyphenols, which improves accuracy, especially if the appropriate profile of compounds is used as reference substances. In the statistical analysis, we detected a correlation between the results from the spectrophotometry and HPLC-DAD, which means that they reflect the difference in the content of components but do not accurately report their quantity.

In Ci1-Ci52 products, ellagitannins accounted for the majority of all polyphenols at ~69% (range 48–85%, median 69%), followed by flavonoids at ~20% (range 8–41%, median 18%) and phenolic acids at ~11% (range 5–16%, median 12%). In products of Turkish origin, the ellagitannin content was the highest compared to the other countries, reaching 73% (Greece 68%, Albania 63%). In these products, the greatest difference was also noted between ellagitannins and flavonoids, with five times lower content (17%). In products from other countries, the percentage of flavonoids in SPP was higher, at 23% for Albanian and 21% for Greek products. Albanian products had the highest proportion of phenolic acids (14%), followed by Greek (11%) and Turkish (10%) products. Most of the polyphenols determined by the chromatographic method were found in the highest amount among teas of Turkish origin (12 out of 21 compounds). Detailed data on their content can be found in the Supplementary Material in Tables S6 and S8.

There are only a few works in the scientific literature dedicated to the content of individual polyphenols in *C. incanus*. Wittpahl et al. [15] analyzed 50% hydromethanolic extracts of four products. The sum of polyphenols in this study was 9–30 mg/g d.w., a significantly lower result than ours. The sum of ellagitannins (per gallic acid) in the German study ranged from 4 to 15 mg/g, and the dominant representative of this group was punicalagin (~4 mg/g). Nevertheless, these authors did not use authentic standards of ellagitannins. In the current work, the sum of ellagitannin significantly exceeded the results of the data cited above, but it is worth noting that punicalagin was also present in the highest amount (29 mg/g). The situation is similar for flavonoids. Results of Wittpahl et al. [15] ranged from 5 to 15 mg/g d.w. per rutin, with myricitrin in the highest amount (~4 mg/g). Our sum of flavonoids is slightly higher, while an identical amount of myricitrin was recorded. It should be noted that we determined a higher number of flavonoids. Their content, and simple glycosides, are influenced by the abundance of coumaroyl-flavonols, such as tiliroside and its analogs.

Viapiana et al. [20] determined 14 polyphenolic compounds (including flavonoids and phenolic acids) in hydromethanolic extracts but in lower amounts. The authors emphasize that higher contents of active compounds are found in products of Turkish and Albanian origin compared to products from Cyprus or of unknown origin. The results of the present study are significantly greater, while a similar correlation was noted between the content of polyphenols and the country of origin of the product.

The determination of polyphenol content is influenced by the choice of the test method, the parameters used, the apparatus settings, and the standard substances used. In addition, a very important factor influencing the content of polyphenolic compounds is the raw material itself—this mainly concerns environmental factors (place of origin, time of harvest, etc.) and factors related to the preparation of the commercial product (e.g., storage conditions, particle size, the ratio of leaf and stem content) [12,42,44,45,47].

### 3.3. In Vitro Antioxidant Potential of *C. incanus*

Frequently used methods to measure antioxidant activity include DPPH, ABTS, or FRAP tests. These methods work according to the single electron transfer mechanism; however, the principle of operation is different [34–36]. The results of *C. incanus* antioxidant activity, by country of origin, obtained in this study are shown in Table 3.

**Table 3.** Antioxidant activity of *C. incanus* teas.

Origin		DPPH		ABTS		FRAP	
		Inhibition [%]	GAE [mM/g d.w.]	Inhibition [%]	GAE [mM/g d.w.]	Fe(II) [mM/g d.w.]	GAE [mM/g d.w.]
All ( <i>n</i> = 52)	Mean	78.55 ± 5.22	151.30 ± 10.06	29.34 ± 16.70	3.17 ± 1.80	204.84 ± 51.65	45.41 ± 11.45
	Median	79.38	152.90	25.63	2.77	205.15	45.47
	Min	68.95	132.82	6.21	0.67	109.67	24.31
	Max	89.08	171.59	68.70	7.41	336.75	74.64
Turkey ( <i>n</i> = 23)	Mean	79.73 ± 4.69	153.57 ± 9.59	38.22 ± 18.50	4.12 ± 2.00	230.63 ± 49.30	51.12 ± 10.93
	Median	80.96	155.95	36.67	3.96	225.46	49.98
	Min	69.34	133.56	10.28	1.11	133.27	29.54
	Max	85.93	165.52	68.70	7.41	336.75	74.64
Albania ( <i>n</i> = 10)	Mean	78.95 ± 4.95	152.08 ± 9.54	19.55 ± 10.37	2.11 ± 1.17	175.22 ± 41.29	38.84 ± 9.15
	Median	80.54	155.13	18.00	1.94	168.47	37.34
	Min	69.80	134.45	6.21	0.67	109.67	24.31
	Max	86.70	167.00	40.81	4.40	234.12	51.89
Greece ( <i>n</i> = 3)	Mean	78.56 ± 5.93	151.32 ± 11.42	26.01 ± 10.37	2.81 ± 1.12	223.50 ± 39.89	49.54 ± 8.84
	Median	81.85	157.65	29.28	3.16	205.29	45.50
	Min	71.71	138.13	14.40	1.55	195.97	43.44
	Max	82.11	158.16	34.35	3.71	269.24	59.68

GAE—gallic acid equivalents; Min—minimum value; Max—maximum value; g d.w.—a gram of dry weight.

The free radical inhibition capacity (expressed as mean %inhibition) was 79% (range 69–89%) in DPPH and 29% (range 6–69%) in ABTS. The results calculated as GAE were 151 mM GAE/g d.w. (range 133–172) and 3 mM GAE/g d.w. (range 0.7–7) for DPPH and ABTS, respectively. In the DPPH, products from all regions showed an effect at a similar level of ~80% inhibition. Larger differences can be seen in the ABTS, where Turkish products showed the highest activity, 38%, compared to Greek, 26%, and Albanian, 20%. In the FRAP test, the results ranged from 110 to 337 mM Fe(II)/g d.w., with an average value of 205 mM Fe(II)/g. The highest reduction activity was observed for samples of Turkish origin with 233 mM Fe(II)/g and slightly lower for Greek with 224 mM Fe(II)/g. The lowest values were obtained for Albanian samples with 175 mM Fe(II)/g. Considering the place of origin, the differences in antioxidant activity of *C. incanus* teas revealed by ABTS and FRAP were statistically significant. In contrast, no statistically significant differences were observed with the DPPH test. Details of the antioxidant activity in the extracts can be found in Tables S12–S14 and Figure S4.

In our previous work [8], we evaluated the antioxidant activity of *C. incanus* water infusions prepared mostly from the same products used here. The infusions had more than 2.5 times lower inhibitory activity in DPPH (~25% inhibition) and slightly lower in ABTS (~27%). As with the extracts, the Turkish products showed the highest inhibitory capacity. The FRAP test also showed a much lower ability of the infusions to reduce iron compounds (134 mM/g d.w.) compared to the extracts. It is noteworthy that water infusions contained more than six times fewer polyphenols than extracts (TPC 55 vs. 350 mg/g d.w.).

Viapiana et al. [20], in the FRAP assay, obtained comparable values for 80% hydromethanolic extracts (up to 169 mM Fe<sup>2+</sup>). Samples of Turkish and Albanian origin showed the highest antioxidant potential compared to samples from Cyprus or of unknown origin. Similarly, the DPPH test for samples from Turkey yielded the highest results (20–97 μM TE/g d.w.) in terms of Trolox equivalents [45]. It is suggested that greater antioxidant activity is strongly related to the total amount of polyphenols, which in turn is influenced by genetic and environmental factors and country of origin [20].

Analyzing the correlation between groups of *C. incanus* polyphenols and antioxidant potential, we found (1) a strong positive correlation between TFC and FRAP (~0.8) and a moderate correlation with SPP, SET (~0.7) and SF, SPA, TPC (~0.5); (2) moderate, but weaker correlations with TFC, SF, and SPP (~0.5) were observed in ABTS; (3) results with DPPH exhibited only weak correlations except for TFC, where a moderate correlation was noted (~0.6) (Table 4 and Table S15). The above observations are consistent with those previously published for *C. incanus* water infusions [8]. However, Dimcheva and Karsheva [44], for the twelve Bulgarian *C. incanus* samples, reached a slightly higher linear correlation of DPPH results with TPC values calculated at 0.667 ( $R^2$ ). This could be related to the different chemical compositions of Bulgarian plant material and the smaller number of samples tested.

**Table 4.** Correlation between chemical composition and antioxidant effect (as heat map).

Method	Group of Compounds	Linear Regression	Spearman's Rank
		R	Order Correlation R
ABTS	Sum of polyphenols (SPP)	0.41	0.47
	Sum of flavonoids (SF)	0.47	0.52
	Sum of ellagitannins (SET)	0.37	0.43
	Sum of phenolic acids (SPA)	0.34	0.41
	Total phenolic content (TPC)	0.37	0.38
	Total flavonoid content (TFC)	0.47	0.57
DPPH	Sum of polyphenols (SPP)	0.37	0.34
	Sum of flavonoids (SF)	0.31	0.28
	Sum of ellagitannins (SET)	0.33	0.31
	Sum of phenolic acids (SPA)	0.47	0.39
	Total phenolic content (TPC)	0.33	0.35
	Total flavonoid content (TFC)	0.62	0.57
FRAP	Sum of polyphenols (SPP)	0.68	0.69
	Sum of flavonoids (SF)	0.46	0.52
	Sum of ellagitannins (SET)	0.66	0.65
	Sum of phenolic acids (SPA)	0.45	0.46
	Total phenolic content (TPC)	0.51	0.55
	Total flavonoid content (TFC)	0.78	0.77

R—correlation coefficient. The color intensity is proportional to correlation intensity.

An in-depth analysis of the composition of *C. incanus* products showed that all groups of polyphenols are involved in its antioxidant activity. However, a significant share can be attributed to ellagitannins and flavonoids, which are the main components of this plant material. In summary, among the antioxidant tests used, FRAP best characterized the potential of *C. incanus* products. The antioxidant activity of rock-rose polyphenols is mainly due to their redox properties, which allow them to act as reducing agents, hydrogen donors, or metal ions chelators [5,6,8,45].

### 3.4. In Vitro $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activity of *C. incanus* Extracts and Their Constituents

A common condition in diabetes is postprandial hyperglycemia, which, along with oxidative stress, appears to be a key element in the pathophysiology of its late complications, particularly cardiovascular disease. Therefore, achieving proper glycemic control plays a crucial role in the effective treatment of diabetes and limiting its complications [48,49]. As postprandial hyperglycemia can occur even when glycated hemoglobin (HbA1c) levels are within the standard range, it is emerging to be an important target in diabetes treatment [50]. In addition, plenty of plant-derived compounds and extracts have been found over the past few years to inhibit the activity of digestive enzymes to a considerable extent, with particular regard to  $\alpha$ -glucosidase [51–54].

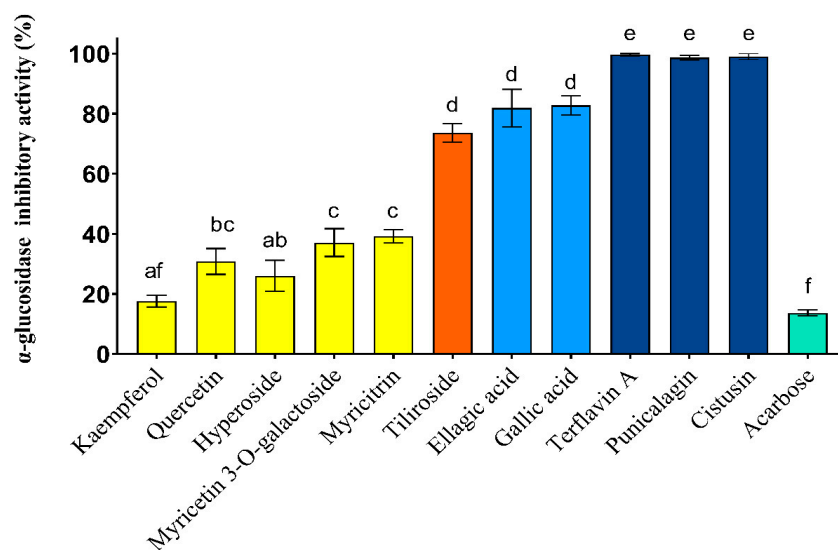
$\alpha$ -Glucosidase, a digestive enzyme located in the brush border of enterocytes, is capable of hydrolyzing glycosidic bonds in dietary polysaccharides to liberate glucose,



subsequent intestinal absorption of which leads to a postprandial increase of blood glucose level. Consequently, its inhibitors would delay the digestion of carbohydrates and reduce the postprandial spike in blood glucose levels along with insulin secretion [55]. Therefore, owing to the utmost importance of glucose level control, the identification of substances able to target  $\alpha$ -glucosidase offers a great strategy for treating diabetes. Currently, there are three drugs available that belong to the synthetic inhibitors, i.e., acarbose, voglibose, and miglitol, used in diabetes treatment since the 1990s [56].

In the present study, extracts of *C. incanus* teas have been examined to assess their ability to inhibit  $\alpha$ -glucosidase. Basically, all of the tested extracts in a concentration of 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (drug-extract ratio  $\mu\text{g}:\text{mL}$ ) and under the assay conditions were characterized by an exceptional ability to inhibit  $\alpha$ -glucosidase, with the mean value reaching  $97.8 \pm 2.7\%$ , and mean  $\text{IC}_{50}$  equal to 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Further analysis of the selected five extracts (Ci17, Ci43, Ci48, Ci52, Ci53) showed that the inhibition presented by 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  extract dilutions exceeded 90%, with the exception of the sample Ci52, whose inhibitory activity was noticeably lower. However, after further diluting extracts to a final concentration of 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the lowest inhibition was exhibited by Ci48, and the highest was observed in the case of Ci43. As shown in Figure S1, inhibition of  $\alpha$ -glucosidase by the *C. incanus* extracts occurred in a concentration-dependent manner.

The ability of each pure compound at 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to inhibit  $\alpha$ -glucosidase varied (Figure 1). The tested set of compounds contained flavonol aglycones (kaempferol, quercetin, myricetin), flavonol glycosides (myricitrin, myricetin-3-*O*-galactoside, hyperoside), phenolic acids (ellagic and gallic), and ellagitannins (cistus, punicalagin, terflavin A). Among the compounds assayed, ellagitannins exhibited the highest activity towards  $\alpha$ -glucosidase with nearly 100% inhibition. A considerable inhibitory effect could also be seen in the case of phenolic acids (81.9% and 82.8% for ellagic and gallic acid, respectively) and tiliroside (73.6%). Moderate values (30–40% inhibition) were calculated for myricitrin, myricetin-3-*O*-galactoside, and quercetin. On the other hand, kaempferol and hyperoside presented weaker inhibitory activity (17.6% and 26% inhibition). Remarkably, all tested polyphenols exhibited stronger anti-glucosidase activity than acarbose assayed in the same concentration (13.7%). Unfortunately, myricetin could not be tested here due to its darkening under test conditions to an intense brown color (most likely due to decomposition), which limited the use of the method.



**Figure 1.** Inhibitory effect on  $\alpha$ -glucosidase activity of *C. incanus* polyphenols. The graph shows %inhibition of compound solutions in a concentration equal to 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  performed in triplicate  $\pm$  SD. Values not sharing a common letter are significantly different at  $p < 0.05$  by Tukey's multiple comparisons tests.

From our results, it can be noted that the ability to inhibit  $\alpha$ -glucosidase by flavonol aglycones increases with the increasing number of hydroxyl groups. Likewise, the same trend can be observed in the case of flavonol glycosides, as hyperoside possesses fewer OH groups than myricitrin and presents significantly lower inhibitory action. The type of sugar forming the glycoside, on the other hand, does not seem to be important (myricitrin vs. myricetin-3-O-galactoside). Meanwhile, the esterification of glycosides was concurrent with the increase of anti-glucosidase activity, as seen in the example of tiliroside, whose effect significantly exceeds the inhibitory properties of the tested glycosides. Also, phenolic acids, represented by gallic and ellagic acids have been determined to be weaker enzyme inhibitors than ellagitannins, which are glucose esters. In this study, three ellagitannins—cistus, punicalagin, and terflavin A—presented the highest anti-glucosidase activity among *C. incanus* polyphenols assayed with a comparable level of inhibition.

### 3.5. Mode of $\alpha$ -Glucosidase Inhibition by *C. incanus* Polyphenols and Extracts

In the next step, we investigated the inhibitory activity of *C. incanus* constituents, followed by a kinetic study aiming to determine the type of  $\alpha$ -glucosidase inhibition shown by the six most potent among the tested polyphenols. Some have been previously demonstrated to possess anti-glucosidase activity, e.g., gallic and ellagic acids [51–53]. Abdelli et al. [54], in their molecular docking study, demonstrated that gallic acid interacts via numerous H-donor bonds with key amino acid residues located in the active site of the enzyme, reducing its activity. Here, based on the results of kinetic studies, we found that gallic acid inhibits  $\alpha$ -glucosidase with an  $IC_{50}$  value equal to 117  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in a mixed mode of inhibition, which is in agreement with a recent report by Choudhary et al. [57]. Another widely studied compound is punicalagin, the main component of pomegranate, which is attributed to anti-diabetic and health-promoting properties [58]. Extensive studies also covered the ability of punicalagin to inhibit  $\alpha$ -glucosidase [59,60], and it has been revealed that it occurs in a competitive manner via direct binding to the enzyme. It is suspected to be related to the abundance of -OH groups in its molecule, given that their presence determines the formation of hydrogen bonds with the residues of the  $\alpha$ -glucosidase active site and subsequent blocking activity [40]. In addition, tiliroside was previously reported as a potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitor [61,62].

A kinetic study was conducted using increasing concentrations of p-NPG and varying concentrations of polyphenols or without the presence of any inhibitor. In order to graphically present the kinetics of enzyme inhibition, Lineweaver–Burk plots, also known as double reciprocal plots, were created (Figure S2).

Accordingly, evaluation of inhibition kinetics revealed that patterns presented by acarbose and punicalagin are typical for competitive inhibition type, while the other compounds exhibit features of both competitive and noncompetitive inhibition manifested by a change in both the Michaelis constant ( $K_m$ ) and maximum velocity of reaction ( $V_{max}$ ), which is consistent with the effects of a mixed inhibitor which binds both the free enzyme and the substrate–enzyme complex with different affinities.

According to the results, the most potent inhibitor among the tested compounds was cistus, with an  $IC_{50}$  value of 0.7  $\mu\text{M}$  (nevertheless, the results presented here were obtained only using in vitro methods; thus, further experiments in appropriate in vivo models will be necessary to verify the proposed indications in clinical practice Table 5), followed by punicalagin and terflavin A (1.1  $\mu\text{M}$  both). Ellagic acid was the fourth inhibitor in the series, which seems relevant because it is a degradation product of ellagitannins (11  $\mu\text{M}$ ). In comparison, the half-maximal inhibitory concentration of acarbose, under the assay conditions, equaled 3.3 mM. Several extracts were also subjected to a kinetic study. Their mode of  $\alpha$ -glucosidase inhibition according to the calculated parameter change has been determined as mixed, which is comprehensible as they contain a variety of compounds presenting competitive, non-competitive, or mixed inhibition. The concentrations of ellagitannins and flavonoids in *C. incanus* extracts, determined at 530–3787  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 242–458  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , greatly exceed the  $IC_{50}$  values ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) necessary for  $\alpha$ -glucosidase inhibition.

**Table 5.** Half-maximal  $\alpha$ -glucosidase inhibition ( $IC_{50}$ ) values of *C. incanus* polyphenols and acarbose (positive control).

Compound	Molar Mass [g/mol]	Inhibition Type	$IC_{50}$ [ $\mu$ g/mL]	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]
Gallic acid	170.1	mixed	116.70	685.99
Ellagic acid	302.2	mixed	3.27	10.81
Cistus	1252.8	mixed	0.83	0.66
Punicalagin	1084.7	competitive	1.23	1.14
Terflavin A	1086.7	mixed	1.19	1.10
Tilioside	594.5	mixed	168.50	283.47
Acarbose	645.6	competitive	2.16 <sup>1</sup>	3.34 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> mg/mL; <sup>2</sup> mM

According to bioavailability studies, ellagitannins (such as punicalagin and punicalin) are not absorbed into the bloodstream due to their size. Instead, after consumption of ellagitannin-rich foods, they are hydrolyzed to ellagic acid and metabolized by the gut microbiota to urolithins. Taking the above into account and considering their long-term persistence in the body, these human metabolites are currently recognized bioactive forms responsible for various health-promoting effects [8,63].

Nevertheless, the results presented here were obtained only using in vitro methods; thus, further experiments in appropriate in vivo models will be necessary to verify the proposed indications in clinical practice.

#### 4. Conclusions

Our results show that *C. incanus* is a rich source of polyphenols (5.5–23%), especially ellagitannins (2.5–19%), among which punicalagin, cistus, and terflavin A were the main representatives. Flavonoids were the second most abundant group (1.2–2.3%), with myricitrin, myricetin-3-*O*-galactoside, hyperoside, and tilioside.

*C. incanus* teas have shown high antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory potential due to the presence of ellagitannins, flavonoids, and phenolic acids. The most powerful inhibitor was cistus. Ellagic acid, which is formed abundantly in the intestine by the biotransformation of ellagitannins, also proved to be an important inhibitor. The activity of the extracts against  $\alpha$ -glucosidase was significantly superior to acarbose regardless of differences in chemical composition and site of origin (mean  $IC_{50}$  128  $\mu$ g of plant material per 1 mL of extract). Among the products tested, those of Turkish origin exhibited the highest antioxidant potential and ellagitannin content.

Therefore, the ability to reduce oxidative stress and inhibit polysaccharide metabolism possibly determines the *C. incanus* hypoglycemic and antidiabetic effects. These properties may also reduce cardiometabolic risk. However, further in vivo studies are needed.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox12030553/s1>, Section S1: Standardization of the *C. incanus* extraction process. Table S1: Comparison of mean peak areas (A-P) in methods I and II using Student's *t*-test and Mann–Whitney U-test. Table S2: Comparison of methods I and II by Student's *t*-test for dependent samples and Wilcoxon paired *t*-test. Table S3: Friedman's ANOVA and Kendall's concordance coefficient for 4 solvent concentrations. Table S4: Comparison of methanol-concentration-dependent peak areas (peaks A-P) in methods I and II using Student's *t*-test and Mann–Whitney U-test. Section S2 Chemical composition of *C. incanus* teas. Table S5: Data on compounds identified by UHPLC-ESI-qTOF-MS in *C. incanus* teas. Table S6: Content of individual polyphenolic compounds in *C. incanus* teas. Table S7: Validation parameters of the HPLC-DAD method. Table S8: Content of total polyphenols, flavonoids, ellagitannins, phenolic acids by HPLC-DAD and spectrophotometric method, antioxidant activity,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity, and ratio of content of individual groups of compounds in *C. incanus* teas. Section S3: Ability of  $\alpha$ -glucosidase inhibition by *C. incanus*. Figure S1: Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase by *C. incanus* extracts at different concentrations. Figure S2: Lineweaver–Burk plots—the inverse initial velocity as a function of the inverse of the substrate

concentration—with p-NPG as a substrate of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of tiliroside, ellagic acid, gallic acid, terflavin A, punicalagin, and cistus. Section S4: Statistical analysis. Table S9: Test of normality of distribution. Table S10: Statistical significance between the results of the mean contents of groups of components. Figure S3: Groups of *C. incanus* components with statistically significant difference in contents. Table S11: Fisher's LSD test for selected groups of components between countries. Table S12: Normality of distribution for antioxidant assays. Table S13: Analysis of variance (ANOVA) for antioxidant assays. Figure S4: Antioxidant tests showing statistically significant differences. Table S14: Fisher's LSD test for ABTS and FRAP tests between countries. Table S15: Linear regression and Spearman's rank correlation coefficient between component groups and antioxidant tests ABTS, DPPH, FRAP. Table S16: Linear regression between sum of polyphenols (SPP) and sum of ellagitannins (SET) in products of different origin. Figure S5: Correlation between sum of polyphenols (SPP) and sum of ellagitannins (SET) in products of different origin.

**Author Contributions:** Conceptualization, I.F.; methodology, I.F. and M.W.; validation, I.F. and A.S.; formal analysis, A.S., M.W., A.D. and I.F.; investigation, A.S., M.W. and D.K.; data curation, A.S. and M.W.; writing—original draft preparation, A.S.; writing—review and editing, I.F.; visualization, A.S. and D.K.; supervision, I.F. and M.K.; project administration, I.F.; funding acquisition, I.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The study was funded by Wroclaw Medical University, grant no. SUBZ.D110.22.019.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data is included in the article/supplementary data.

**Acknowledgments:** The authors thank M. Ruszkiewicz for her technical help with preparative separations. UHPLC-DAD and UHPLC-ESI-qTOF-MS, and NMR analyses were carried out in the Laboratory of Elemental Analysis and Structural Research, Faculty of Pharmacy, Wroclaw Medical University. The technical assistance of A. Złocińska, H. Czapor-Irzabek and Ł. Fajfrowski is appreciated.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Agostoni, C.; Bresson, J.L.; Fairweather-Tait, S.; Flynn, A.; Golly, I.; Korhonen, H.; Lagiou, P.; Løvik, M.; Marchelli, R.; Martin, A.; et al. Scientific opinion on the substantiation of health claims related to various food(S)/food constituent(s) and protection of cells from premature aging, antioxidant activity, antioxidant content and antioxidant properties, and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage pursuant to article 13(1) of regulation (EC) no 1924/2006. *EFSA J.* **2010**, *8*, 1489. [[CrossRef](#)]
2. Guzmán, B.; Vargas, P. Historical biogeography and character evolution of *Cistaceae* (Malvales) based on analysis of plastid *rbcl* and *trnL-trnF* sequences. *Org. Divers. Evol.* **2009**, *9*, 83–99. [[CrossRef](#)]
3. Čarni, A.; Matevski, V.; Šilc, U. Morphological, chorological and ecological plasticity of *Cistus incanus* in the southern Balkans. *Plant Biosyst.* **2010**, *144*, 602–617. [[CrossRef](#)]
4. Papaefthimiou, D.; Papanikolaou, A.; Falara, V.; Givanoudi, S.; Kostas, S.; Kanellis, A.K. Genus *Cistus*: A model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Front. Chem.* **2014**, *2*, 35. [[CrossRef](#)]
5. Tomou, E.-M.; Lytra, K.; Rallis, S.; Tzakos, A.G.; Skaltsa, H. An updated review of genus *Cistus* L. since 2014: Traditional uses, phytochemistry, and pharmacological properties. *Phytochem. Rev.* **2022**, *21*, 2049–2087. [[CrossRef](#)]
6. Gawel-Beben, K.; Kukula-Koch, W.; Hoian, U.; Czop, M.; Strzpek-Gomółka, M.; Antosiewicz, B. Characterization of *Cistus × incanus* L. and *Cistus ladanifer* L. extracts as potential multifunctional antioxidant ingredients for skin protecting cosmetics. *Antioxidants* **2020**, *9*, 202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Vitali, F.; Pennisi, G.; Attaguile, G.; Savoca, F.; Tita, B. Antiproliferative and cytotoxic activity of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. on human prostate cell lines. *Nat. Prod. Res.* **2011**, *25*, 188–202. [[CrossRef](#)]
8. Bernacka, K.; Bednarska, K.; Starzec, A.; Mazurek, S.; Fecka, I. Antioxidant and antiglycation effects of *Cistus × incanus* water infusion, its phenolic components, and respective metabolites. *Molecules* **2022**, *27*, 2432. [[CrossRef](#)]
9. Orhan, N.; Aslan, M.; Şüküroğlu, M.; Deliorman Orhan, D. In vivo and in vitro antidiabetic effect of *Cistus laurifolius* L. and detection of major phenolic compounds by UPLC-TOF-MS analysis. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *146*, 859–865. [[CrossRef](#)]
10. Joshi, S.R.; Standl, E.; Tong, N.; Shah, P.; Kalra, S.; Rathod, R. Therapeutic potential of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors in type 2 diabetes mellitus: An evidence-based review. *Expert Opin. Pharmacother.* **2015**, *16*, 1959–1981. [[CrossRef](#)]

11. Funke, I.; Melzig, M.F. Effect of different phenolic compounds on  $\alpha$ -amylase activity: Screening by microplate-reader based kinetic assay. *Pharmazie* **2005**, *60*, 796–797. [[PubMed](#)]
12. Gori, A.; Nascimento, L.B.; Ferrini, F.; Centritto, M.; Brunetti, C. Seasonal and diurnal variation in leaf phenolics of three medicinal mediterranean wild species: What is the best harvesting moment to obtain the richest and the most antioxidant extracts? *Molecules* **2020**, *25*, 956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Dimcheva, V.; Kaloyanov, N.; Karsheva, M. The polyphenol composition of *Cistus incanus* L., *Trachystemon orientalis* L. and *Melissa officinalis* L. infusions by HPLC-DAD method. *Open J. Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *3*, 31–38. [[CrossRef](#)]
14. Kubica, P.; Szopa, A.; Ekiert, H. In vitro shoot cultures of pink rock-rose (*Cistus × incanus* L.) as a potential source of phenolic compounds. *Acta Soc. Bot. Pol.* **2017**, *86*. [[CrossRef](#)]
15. Wittpahl, G.; Kölling-Speer, I.; Basche, S.; Herrmann, E.; Hannig, M.; Speer, K.; Hannig, C. The polyphenolic composition of *Cistus incanus* herbal tea and its antibacterial and anti-adherent activity against *Streptococcus mutans*. *Planta Med.* **2015**, *81*, 1727–1735. [[CrossRef](#)]
16. Gori, A.; Ferrini, F.; Marzano, M.; Tattini, M.; Centritto, M.; Baratto, M.; Pogni, R.; Brunetti, C. Characterisation and antioxidant activity of crude extract and polyphenolic rich fractions from *C. incanus* leaves. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Jeszka-Skowron, M.; Zgoła-Grześkowiak, A.; Frankowski, R. *Cistus incanus* a promising herbal tea rich in bioactive compounds: LC–MS/MS determination of catechins, flavonols, phenolic acids and alkaloids—A comparison with *Camellia sinensis*, Rooibos and Hoan Ngoc herbal tea. *J. Food Compos. Anal.* **2018**, *74*, 71–81. [[CrossRef](#)]
18. Fecka, I.; Włodarczyk, M.; Starzec, A. Isolation and structure elucidation of cistus: A new ellagitannin from *Cistus × incanus* L. leaves. *Ind. Crops Prod.* **2020**, *158*, 112971. [[CrossRef](#)]
19. Starzec, A.; Włodarczyk, M.; Urbanowicz, I.; Fecka, I. Charakterystyka, potencjał leczniczy i prozdrowotny *Cistus × incanus* L. [Characteristics, therapeutic and health-promoting potential of *Cistus × incanus* L.]. *Farm. Pol.* **2021**, *76*, 647–664. [[CrossRef](#)]
20. Viapiana, A.; Konopacka, A.; Waleron, K.; Wesolowski, M. *Cistus incanus* L. commercial products as a good source of polyphenols in human diet. *Ind. Crops Prod.* **2017**, *107*, 297–304. [[CrossRef](#)]
21. Kuchta, A.; Konopacka, A.; Waleron, K.; Viapiana, A.; Wesolowski, M.; Dąbkowski, K.; Ćwiklińska, A.; Mickiewicz, A.; Śledzińska, A.; Wieczorek, E.; et al. The effect of *Cistus incanus* herbal tea supplementation on oxidative stress markers and lipid profile in healthy adults. *Cardiol. J.* **2021**, *28*, 534–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Fecka, I. Qualitative and quantitative determination of hydrolysable tannins and other polyphenols in herbal products from meadowsweet and dog rose. *Phytochem. Anal.* **2009**, *20*, 177–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Akaberi, M.; Sahebkar, A.; Azizi, N.; Emami, S.A. Everlasting flowers: Phytochemistry and pharmacology of the genus *Helichrysum*. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *138*, 111471. [[CrossRef](#)]
24. Lavault, M.; Richomme, P. Constituents of *Helichrysum stoechas* variety *olonense*. *Chem. Nat. Compd.* **2004**, *40*, 118–121. [[CrossRef](#)]
25. Krebs, K.G.; Matern, J. Über die Inhaltsstoffe von *Menyanthes trifoliata* L. 3. Mitt.: Zur Identität von Trifoliosid und Trifolin. *Arch. Pharm.* **1958**, *291*, 163–165. [[CrossRef](#)]
26. Hilbert, G.; Tamsamani, H.; Bordenave, L.; Pedrot, E.; Chaher, N.; Cluzet, S.; Delaunay, J.-C.; Ollat, N.; Delrot, S.; Mérillon, J.-M.; et al. Flavonol profiles in berries of wild *Vitis* accessions using liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectrometry. *Food Chem.* **2015**, *169*, 49–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Tanaka, Y.; Yanagida, A.; Komeya, S.; Kawana, M.; Honma, D.; Tagashira, M.; Kanda, T.; Shibusawa, Y. Comprehensive separation and structural analyses of polyphenols and related compounds from bracts of hops (*Humulus lupulus* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 2198–2206. [[CrossRef](#)]
28. Kim, H.J.; Woo, E.-R.; Park, H. A novel lignan and flavonoids from *Polygonum aviculare*. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 581–586. [[CrossRef](#)]
29. Dare, A.P.; Tomes, S.; McGhie, T.K.; Klink, J.W.; Sandanayaka, M.; Hallett, I.C.; Atkinson, R.G. Overexpression of chalcone isomerase in apple reduces phloridzin accumulation and increases susceptibility to herbivory by two-spotted mites. *Plant J.* **2020**, *103*, 293–307. [[CrossRef](#)]
30. Tanaka, T.; Nonaka, G.-I.; Nishioka, I. Tannins and related compounds. XL. Revision of the structures of punicalin and punicalagin, and isolation and characterization of 2-O-galloylpunicalin from the bark of *Punica granatum* L. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 650–655. [[CrossRef](#)]
31. Bodalska, A.; Kowalczyk, A.; Włodarczyk, M.; Fecka, I. Analysis of polyphenolic composition of a herbal medicinal product – peppermint tincture. *Molecules* **2020**, *25*, 69. [[CrossRef](#)]
32. Rossi, J.A.; Singleton, V.L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158.
33. Anonym. Birch leaf (*Betulae folium*) monograph. In *European Pharmacopoeia*, 10th ed.; Council of Europe: Strasbourg, France, 2020; pp. 1345–1347.
34. Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **1958**, *181*, 1199–1200. [[CrossRef](#)]
35. Chen, L.; Kang, Y.-H. Antioxidant activities of *Agrimonia pilosa* Ledeb: In vitro comparative activities of its different fractions. *Korean J. Plant Resour.* **2014**, *27*, 642–649. [[CrossRef](#)]
36. Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Rouzbehan, S.; Moein, S.; Homaei, A.; Moein, M.R. Kinetics of  $\alpha$ -glucosidase inhibition by different fractions of three species of *Labiatae* extracts: A new diabetes treatment model. *Pharm. Biol.* **2017**, *55*, 1483–1488. [[CrossRef](#)]
38. Chu, Y.-H.; Wu, S.-H.; Hsieh, J.-F. Isolation and characterization of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory constituents from *Rhodiola crenulata*. *Food Res. Int.* **2014**, *57*, 8–14. [[CrossRef](#)]
39. Barkaoui, M.; Katiri, A.; Boubaker, H.; Msanda, F. Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes in Chtouka Ait Baha and Tiznit (Western Anti-Atlas), Morocco. *J. Ethnopharmacol.* **2017**, *198*, 338–350. [[CrossRef](#)]
40. Liu, Y.; Kong, K.W.; Wu, D.-T.; Liu, H.-Y.; Li, H.-B.; Zhang, J.-R.; Gan, R.-Y. Pomegranate peel-derived punicalagin: Ultrasonic-assisted extraction, purification, and its  $\alpha$ -glucosidase inhibitory mechanism. *Food Chem.* **2022**, *374*, 131635. [[CrossRef](#)]
41. Gürbüz, P.; Demirezer, L.Ö.; Güvenalp, Z.; Kuruüzüm-Uz, A.; Kazaz, C. Isolation and structure elucidation of uncommon secondary metabolites from *Cistus salvifolius* L. *Rec. Nat. Prod.* **2015**, *9*, 175–183.
42. Riehle, P.; Rusche, N.; Saake, B.; Rohn, S. Influence of the leaf content and herbal particle size on the presence and extractability of quantitated phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal teas. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 10978–10988. [[CrossRef](#)]
43. Peterleit, F.; Kolodziej, H.; Nahrstedt, A. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 981–985. [[CrossRef](#)]
44. Dimcheva, V.; Karsheva, M. Antioxidant activity and polyphenolic content of the Bulgarian wild herb *Cistus incanus* L. stored under different conditions. *J. Chem. Technol. Metall.* **2017**, *52*, 781–790.
45. Dimcheva, V.; Karsheva, M. *Cistus incanus* from Strandja Mountain as a source of bioactive antioxidants. *Plants* **2018**, *7*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Waed, A.; Ghalia, S.; Adawia, K. Evaluation of radical scavenging activity, Total phenolics and total flavonoids contents of *Cistus* species in Syria. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* **2016**, *8*, 1071–1077.
47. Riehle, P.; Vollmer, M.; Rohn, S. Phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal infusions—Antioxidant capacity and thermal stability during the brewing process. *Food Res. Int.* **2013**, *53*, 891–899. [[CrossRef](#)]
48. Augustin, L.S.A.; Kendall, C.W.C.; Jenkins, D.J.A.; Willett, W.C.; Astrup, A.; Barclay, A.W.; Björck, I.; Brand-Miller, J.C.; Brighenti, F.; Buyken, A.E.; et al. Glycemic index, glycemic load and glycemic response: An International Scientific Consensus Summit from the International Carbohydrate Quality Consortium (ICQC). *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2015**, *25*, 795–815. [[CrossRef](#)]
49. Vlachos, D.; Malisova, S.; Lindberg, F.A.; Karaniki, G. Glycemic Index (GI) or Glycemic Load (GL) and dietary interventions for optimizing postprandial hyperglycemia in patients with T2 diabetes: A review. *Nutrients* **2020**, *12*, 1561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Kaku, K. Efficacy of voglibose in type 2 diabetes. *Expert Opin. Pharmacother.* **2014**, *15*, 1181–1190. [[CrossRef](#)]
51. You, Q.; Chen, F.; Wang, X.; Jiang, Y.; Lin, S. Anti-diabetic activities of phenolic compounds in muscadine against  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase. *LWT—Food Sci. Technol.* **2012**, *46*, 164–168. [[CrossRef](#)]
52. Benalla, W.; Bellahcen, S.; Bnouham, M. Antidiabetic medicinal plants as a source of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Curr. Diabetes Rev.* **2010**, *6*, 247–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Aleixandre, A.; Gil, J.V.; Sineiro, J.; Rosell, C.M. Understanding phenolic acids inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase and influence of reaction conditions. *Food Chem.* **2022**, *372*, 131231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Abdelli, I.; Benariba, N.; Adjdir, S.; Fekhikher, Z.; Daoud, I.; Terki, M.; Benramdane, H.; Ghalem, S. *In silico* evaluation of phenolic compounds as inhibitors of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2021**, *39*, 816–822. [[CrossRef](#)]
55. Ali Asgar, M. Anti-diabetic potential of phenolic compounds: A review. *Int. J. Food Prop.* **2013**, *16*, 91–103. [[CrossRef](#)]
56. Khwaja, N.U.D.; Arunagirinathan, G. Efficacy and cardiovascular safety of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Curr. Drug Saf.* **2021**, *16*, 122–128. [[CrossRef](#)]
57. Choudhary, D.K.; Chaturvedi, N.; Singh, A.; Mishra, A. Characterization, inhibitory activity and mechanism of polyphenols from faba bean (gallic-acid and catechin) on  $\alpha$ -glucosidase: Insights from molecular docking and simulation study. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2020**, *50*, 123–132. [[CrossRef](#)]
58. Viuda-Martos, M.; Fernández-López, J.; Pérez-Álvarez, J.A. Pomegranate and its many functional components as related to human health: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2010**, *9*, 635–654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Bellesia, A.; Verzelloni, E.; Tagliacuzzi, D. Pomegranate ellagitannins inhibit  $\alpha$ -glucosidase activity in vitro and reduce starch digestibility under simulated gastro-intestinal conditions. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2015**, *66*, 85–92. [[CrossRef](#)]
60. Lee, D.Y.; Kim, H.W.; Yang, H.; Sung, S.H. Hydrolyzable tannins from the fruits of *Terminalia chebula* Retz and their  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities. *Phytochemistry* **2017**, *137*, 109–116. [[CrossRef](#)]
61. Yuca, H.; Özbek, H.; Demirezer, L.Ö.; Kasil, H.G.; Güvenalp, Z. *trans*-Tiliroside: A potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from the leaves of *Elaeagnus angustifolia* L. *Phytochemistry* **2021**, *188*, 112795. [[CrossRef](#)]
62. Indrianiingsih, A.W.; Tachibana, S.; Dewi, R.T.; Itoh, K. Antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitor activities of natural compounds isolated from *Quercus gilva* Blume leaves. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2015**, *5*, 748–755. [[CrossRef](#)]
63. Banc, R.; Rusu, M.E.; Filip, L.; Popa, D.S. The impact of ellagitannins and their metabolites through gut microbiome on the gut health and brain wellness within the gut-brain axis. *Foods* **2023**, *12*, 270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

**Oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład w  
powstanie prac**

## OŚWIADCZENIE

współautorów określające indywidualny wkład w powstanie pracy:

**Aneta Starzec, Maciej Włodarczyk, Iwona Urbanowicz, Izabela Fecka.** Charakterystyka, potencjał leczniczy i prozdrowotny *Cistus × incanus* L. (Characteristics, therapeutic and health-promoting potential of *Cistus × incanus* L.). *Farmacja Polska* 2020, 76, 11, DOI: 10.32383/farmpol/132057

Oświadczam, że w powyższej pracy mój udział polegał na zebraniu i przeanalizowaniu piśmiennictwa naukowego, przygotowaniu wszystkich wersji manuskryptu i jego ostatecznej formy oraz na opracowaniu graficznym i korespondencji z redakcją.

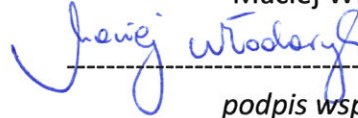
Aneta Starzec



-----  
*podpis autora*

Oświadczam, że w powyższej pracy mój udział polegał na współuczestnictwie w przygotowaniu manuskryptu i redagowaniu jego wstępnej formy.

Maciej Włodarczyk



-----  
*podpis współautora*

Oświadczam, że w powyższej pracy mój udział polegał na korekcie merytorycznej ostatecznej formy manuskryptu.

Iwona Urbanowicz



-----  
*podpis współautora*

Oświadczam, że w powyższej pracy mój udział polegał na tworzeniu koncepcji i założeń pracy, nadzorze nad przebiegiem zadań, korekcie merytorycznej manuskryptu, redakcji manuskryptu na każdym etapie oraz pozyskiwaniu źródeł finansowania.

Izabela Fecka



-----  
*podpis współautora*

25.04.2023r.



## OŚWIADCZENIE

współautorów określające indywidualny wkład w powstanie pracy:

Izabela Fecka, Maciej Włodarczyk, **Aneta Starzec**. Isolation and structure elucidation of cistusins: a new ellagitannin from *Cistus × incanus* L. leaves. *Industrial Crops and Products* 2020, 158, 112971 DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112971

Oświadczam, że w powyższej pracy mój udział polegał na tworzeniu koncepcji i założeń pracy, opracowaniu metodologii przeprowadzonych badań, nadzorze nad przebiegiem zaplanowanych eksperymentów, w tym badań chromatograficznych, spektroskopowych i spektrometrycznych współuczestnictwie w analizie struktur izolowanych elagotanoidów, w interpretacji oraz opisanu wyników, w kwerendzie naukowej, przygotowaniu manuskryptu i jego korekcie na każdym etapie prac, korespondencji z redakcją oraz pozyskaniu źródeł finansowania.

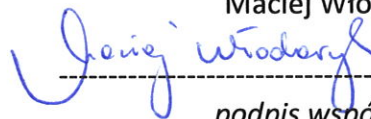
Izabela Fecka



-----  
*podpis autora*

Oświadczam, że w powyższej pracy mój udział polegał na współuczestnictwie w badaniach spektroskopowych i spektrometrycznych oraz w analizie struktur izolowanych elagotanoidów, interpretacji i opisanu wyników z tego zakresu; opracowaniu materiałów do suplementu, a także w przygotowaniu manuskryptu, jego korekcie i korespondencji z redakcją.

Maciej Włodarczyk



-----  
*podpis współautora*

Oświadczam, że w powyższej pracy mój udział polegał na przygotowaniu materiału do badań, wykonaniu ekstrakcji surowca roślinnego, przeprowadzeniu i zebraniu wyników z badań chromatograficznych technikami CC, TLC i LC, oczyszczeniu frakcji i podfrakcji z polifenolami, współuczestnictwa w badaniach spektroskopowych i spektrometrycznych izolowanych elagotanoidów, w interpretacji oraz opisanu wyników badań chromatograficznych i spektrometrycznych, zebraniu piśmiennictwa naukowego, współtworzeniu manuskryptu w jego ostatecznej formie.

Aneta Starzec



-----  
*podpis współautora*

25.04.2023r.

## OŚWIADCZENIE

współautorów określające indywidualny wkład w powstanie pracy:

**Aneta Starzec**, Maciej Włodarczyk, Dominika Kunachowicz, Andrzej Dryś, Marta Kepinska, Izabela Fecka. Polyphenol profile of *Cistus × incanus* L. and its relevance to antioxidant effect and  $\alpha$ -glucosidase inhibition. *Antioxidants* 2023, 12, 553, DOI: 10.3390/antiox12030553

Oświadczam, że w powyższej pracy mój udział polegał na przygotowaniu materiału do badań, opracowaniu i optymalizacji procesu ekstrakcji, przygotowaniu ekstraktów z surowca roślinnego; wykonaniu badań chromatograficznych i spektrofotometrycznych (w tym oceny aktywności przeciwutleniającej); zebraniu, interpretacji i opisanu wyników z analiz chromatograficznych (CC, TLC, LC) i spektrofotometrycznych (TPC, TFC, ABTS, DPPH, FRAP); współuczestnictwie w badaniach spektroskopowych i spektrometrycznych izolowanych polifenoli oraz w ocenie aktywności hamującej  $\alpha$ -glukozydazę przez polifenole i wyciągi z *C. incanus*; współudziale w opracowaniu materiałów do suplementu; zebraniu piśmiennictwa naukowego; na tworzeniu szkicu manuskryptu i współtworzeniu jego ostatecznej formy oraz opracowaniu graficznym i korespondencji z redakcją.

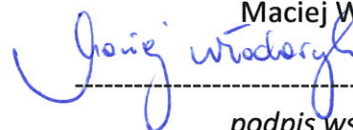
Aneta Starzec



-----  
podpis autora

Oświadczam, że w powyższej pracy mój udział polegał na przeprowadzeniu badań spektroskopowych i spektrometrycznych izolowanych polifenoli, interpretacji oraz opisanu wyników w tym zakresie, współuczestnictwie w opracowaniu materiałów do suplementu oraz w redagowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Maciej Włodarczyk



-----  
podpis współautora

Oświadczam, że w powyższej pracy mój udział polegał na przeprowadzeniu oceny aktywności hamującej  $\alpha$ -glukozydazę indywidualnych polifenoli i wyciągów z *C. incanus*, zebraniu i interpretacji wyników w tym zakresie, a także na przygotowaniu opracowania graficznego.

Dominika Kunachowicz



-----  
podpis współautora

## OŚWIADCZENIE

współautorów określające indywidualny wkład w powstanie pracy:

Oświadczam, że w powyższej pracy mój udział polegał na wykonaniu analiz statystycznych do przygotowanych zestawień wyników; współudziałe w opracowaniu materiałów do suplementu.

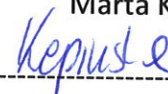
Andrzej Dryś



-----  
*podpis autora*

Oświadczam, że w powyższej pracy mój udział polegał na sprawowaniu nadzoru nad przebiegiem oceny aktywności hamującej  $\alpha$ -glukozydazę przez polifenole i wyciągi z *C. incanus* oraz prawidłową interpretacją wyników w tym zakresie.

Marta Kepinska



-----  
*podpis współautora*

Oświadczam, że w powyższej pracy mój udział polegał na tworzeniu koncepcji i założeń pracy, opracowaniu planu badań, nadzorze nad przebiegiem eksperymentów, uczestnictwie w ocenie i interpretacji otrzymanych wyników, korekcie wszystkich wersji manuskryptu i suplementu oraz na pozyskaniu źródeł finansowania.

Izabela Fecka



-----  
*podpis współautora*

25.04.2023r.

Aneta Starzec

## Wykaz publikacji

## 1. Publikacje w czasopismach naukowych

## 1.1 Publikacje w czasopiśmie z IF

Lp	Opis bibliograficzny	IF	Punkty
1	Fecka Izabela, Włodarczyk Maciej, <b>Starzec Aneta</b> : Isolation and structure elucidation of cistus: a new ellagitannin from <i>Cistus × incanus</i> L. leaves, <i>Industrial Crops and Products</i> , 2020, vol. 158, art.112971 [8 s.], DOI:10.1016/j.indcrop.2020.112971	5,645	200
2	Bernacka Karolina, Bednarska Katarzyna, <b>Starzec Aneta</b> , Mazurek Sylwester, Fecka Izabela: Antioxidant and antiglycation effects of <i>Cistus × incanus</i> water infusion, its phenolic components, and respective metabolites, <i>Molecules</i> , 2022, vol. 27, nr 8, art.2432 [22 s.], DOI:10.3390/molecules27082432	4,927*	140
3	<b>Starzec Aneta</b> , Włodarczyk Maciej, Kunachowicz Dominika, Dryś Andrzej Bolesław, Kepinska Marta, Fecka Izabela: Polyphenol profile of <i>Cistus × incanus</i> L. and its relevance to antioxidant effect and $\alpha$ -glucosidase inhibition, <i>Antioxidants</i> , 2023, vol. 12, nr 3, art.553 [18 s.], DOI:10.3390/antiox12030553	7,675*	100
	Podsumowanie	18,247	440,00

\*IF 2021

## 1.2 Publikacje w czasopiśmie bez IF

Lp	Opis bibliograficzny	Punkty
1	<b>Starzec Aneta</b> , Raj Danuta, Fecka Izabela: Właściwości prozdrowotne owoców jabłoni domowej w świetle najnowszych badań naukowych ( <i>Malus x domestica</i> Borkh.), <i>Farmacja Polska</i> , 2020, vol. 76, nr 3, s. 137-148, DOI:10.32383/farmpol/121026	70
2	<b>Starzec Aneta</b> , Włodarczyk Maciej, Urbanowicz Iwona, Fecka Izabela: Charakterystyka, potencjał leczniczy i prozdrowotny <i>Cistus × incanus</i> L., <i>Farmacja Polska</i> , 2020, vol. 76, nr 11, s. 647-664, DOI:10.32383/farmpol/132057	70
	Podsumowanie	140,00

## 1.3 Publikacje w czasopiśmie - prace kontrybutorskie -

## 2. Monografie naukowe

## 2.1 Książka autorska -

## 2.2 Książka redagowana -

## 2.3 Rozdziały -

## 3. Varia

### 3.1 Komentarz -

### 3.2 Inne -

### 4. Abstrakty

Lp	Opis bibliograficzny
1	<b>Starzec Aneta</b> , Fecka Izabela: Właściwości prozdrowotne jabłek i ich przetworów, W: II Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie substancji pochodzenia naturalnego w farmacji i medycynie". Wrocław, 20 maja 2016 r. Książka abstraktów 2016, s. 36
2	<b>Starzec Aneta</b> , Nowicka Agnieszka, Fecka Izabela: Ocena zawartości wybranych związków fenolowych w przetworach owoców jabłoni domowej ( <i>Malus x domestica</i> Borkh.), W: II Konferencja Doktorantów Nauk Przyrodniczych. Gdańsk, 19-22 czerwca 2018 2018, 87 poz.P33
3	<b>Starzec Aneta</b> , Nowicka Agnieszka, Fecka Izabela: Ocena zawartości związków polifenolowych w produktach spożywczych zawierających nasiona kakaowca, W: II Konferencja Doktorantów Nauk Przyrodniczych. Gdańsk, 19-22 czerwca 2018 2018, 88 poz.P34
4	Fecka Izabela, Klebańska Joanna, <b>Starzec Aneta</b> : Polifenole jako kryterium oceny jakości produktów czystka szarego, W: III Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie metod analitycznych w farmacji i medycynie". Wrocław, 9 kwietnia 2018 r. Książka abstraktów 2018, s. 10, [[Dostęp 12.04.2018]. Dostępny w: <a href="http://www.farmacja.wroclaw.pl/images/ksi%20C4%85%C5%BCka%20abstrakt%C3%B3w%20kwiecie%C5%84%202018.pdf">http://www.farmacja.wroclaw.pl/images/ksi%20C4%85%C5%BCka%20abstrakt%C3%B3w%20kwiecie%C5%84%202018.pdf</a> ]
5	<b>Starzec Aneta</b> , Gleńsk Michał, Fecka Izabela: Oznaczenie zawartości antocyjanów w wybranych herbatach owocowych i kwiatowo-owocowych, W: III Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie metod analitycznych w farmacji i medycynie". Wrocław, 9 kwietnia 2018 r. Książka abstraktów 2018, 39 poz.P22, [[Dostęp 12.04.2018]. Dostępny w: <a href="http://www.farmacja.wroclaw.pl/images/ksi%20C4%85%C5%BCka%20abstrakt%C3%B3w%20kwiecie%C5%84%202018.pdf">http://www.farmacja.wroclaw.pl/images/ksi%20C4%85%C5%BCka%20abstrakt%C3%B3w%20kwiecie%C5%84%202018.pdf</a> ]
6	<b>Starzec Aneta</b> , Nowicka Agnieszka, Fecka Izabela: Składniki żywności o korzystnych właściwościach w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych, W: IV Ogólnopolska Konferencja Dyplomantów i Studentów Kierunków Przyrodniczych i Przyrodniczo-Technicznych z udziałem przedstawicieli przedsiębiorstw oraz instytucji otoczenia biznesu "Biopotencjał 2018". [Warszawa], 8 czerwca 2018 [e-Pub] 2018, [27], [[Dostęp 28.08.2018]. Dostępny w: <a href="https://drive.google.com/open?id=1xQxAd6pmmSQ_xnU9_lvsozH-OXr_Wdsr">https://drive.google.com/open?id=1xQxAd6pmmSQ_xnU9_lvsozH-OXr_Wdsr</a> ]
7	<b>Starzec Aneta</b> : Pokonać bakterie - czyli o olejkach słów kilka, W: Interdyscyplinarność przyszłości nauki. Zieloniec, 10-12 listopada 2018. Księga abstraktów 2018, s. 46, [[Dostęp 12.09.2019]. Dostępny w: <a href="http://www.doktoranci.umed.wroc.pl/wp-content/uploads/2019/09/Jesie%20C5%84-2018-Biomed.pdf">http://www.doktoranci.umed.wroc.pl/wp-content/uploads/2019/09/Jesie%20C5%84-2018-Biomed.pdf</a> ]
8	<b>Starzec Aneta</b> : Parzący problem barszczu - czyli o furanokumarynach w <i>Heracleum Sosnowskyi</i> , W: Konferencja "Interdyscyplinarność przyszłości nauki". Zieloniec, 13-15 kwietnia 2018. Księga abstraktów 2018, s. 64
9	<b>Starzec Aneta</b> , Nowicka Agnieszka, Fecka Izabela: Właściwości prozdrowotne <i>Cistus x incanus</i> L. (czystka szarego), W: Konferencja BioMedTech Silesia 2018. [Zabrze, 6-7 kwietnia 2018 r.] Referaty - profesjonalna [online] 2018, poz.20, [[Dostęp 22.05.2018]. Dostępny w: <a href="http://biomedtech.eu/wp-content/uploads/2018/04/referaty_2018_profesjonalna_20.pdf">http://biomedtech.eu/wp-content/uploads/2018/04/referaty_2018_profesjonalna_20.pdf</a> ]
10	Kuś Piotr, Kominek F., Chwieńko A., <b>Starzec Aneta</b> , Brożyna Malwina: Plant substances in dermatological medications and cosmetics - source of safe bioactive compounds or potential danger?, W: 3rd Wrocław Scientific Meetings. Wrocław, 1st-2nd March 2019, (red.) Julita Kulbacka, Nina Rembiałkowska, Joanna Weźgowiec, Wrocław 2019, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o., 114 poz.P60, ISBN 978-83-65932-64-8
11	Piątkowska Elżbieta, Brożyna Malwina, <b>Starzec Aneta</b> , Kominek F.: Cooperation is the key to success - synergistic combinations of essential oils, W: 3rd Wrocław Scientific Meetings. Wrocław, 1st-2nd March 2019, (red.) Julita Kulbacka, Nina Rembiałkowska, Joanna Weźgowiec, Wrocław 2019, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o., 145 poz.P91, ISBN 978-83-65932-64-8
12	<b>Starzec Aneta</b> , Brożyna Malwina, Kominek F., Fecka Izabela: Self-preserving cosmetics - is it possible?, W: 3rd Wrocław Scientific Meetings. Wrocław, 1st-2nd March 2019, (red.) Julita Kulbacka, Nina Rembiałkowska, Joanna Weźgowiec, Wrocław 2019, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o., 164 poz.P110, ISBN 978-83-65932-64-8

13	<b>Starzec Aneta</b> , Brożyna Malwina, Fecka Izabela: Metody analityczne stosowane w przemyśle kosmetycznym, W: IV Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie metod analitycznych w farmacji i medycynie". Wrocław, 12 kwietnia 2019 r. Książka abstraktów 2019, [40], [[Dostęp 18.04.2019]. Dostępny w: <a href="http://www.farmacja.wroclaw.pl/images/ksiazka%CC%A8z%CC%87ka-abstrakto%CC%81w-kwiecien%CC%81-2019.pdf">http://www.farmacja.wroclaw.pl/images/ksiazka%CC%A8z%CC%87ka-abstrakto%CC%81w-kwiecien%CC%81-2019.pdf</a> ]
14	<b>Starzec Aneta</b> : Pacjent - (nie)wie lepiej co dla niego dobre!, W: Interdyscyplinarność przyszłością nauki. Zieleniec, 12-14 kwietnia 2019. Księga abstraktów 2019, s. 42, [[Dostęp 12.09.2019]. Dostępny w: <a href="http://www.doktoranci.umed.wroc.pl/wp-content/uploads/2019/09/Wiosna-2019-Biomed-1.pdf">http://www.doktoranci.umed.wroc.pl/wp-content/uploads/2019/09/Wiosna-2019-Biomed-1.pdf</a> ]
15	<b>Starzec Aneta</b> : Inkantacje - fakty i mity, W: Konferencja "Interdyscyplinarność przyszłością nauki". Zieleniec, 15-17.11.2019. Księga abstraktów, Wrocław 2019, s. 37
16	<b>Starzec Aneta</b> , Brożyna Malwina, Fecka Izabela: Naturalne konserwanty w produktach kosmetycznych, W: XVI Konferencja Naukowa BioMedTech Silesia 2019. Zabrze, 05.04.2019 roku. Streszczenia : referaty - junior 2019 - profesjonalna [online] 2019, poz.03
17	Brożyna Malwina, <b>Starzec Aneta</b> : Charakterystyka biofilmu, W: XVI Konferencja Naukowa BioMedTech Silesia 2019. Zabrze, 05.04.2019 roku. Streszczenia : referaty - junior 2019 - profesjonalna [online] 2019, poz.09
18	Kotyra Łukasz, <b>Starzec Aneta</b> : Thyroid carcinoma in the light of new research - a review, W: 4th International Wrocław Scientific Meetings. Wrocław, 09-10 October 2020, (red.) Julita Kulbacka, Nina Rembiałkowska, Joanna Weźgowiec, Wrocław 2020, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o., s. 145, ISBN 978-83-66489-37-0
19	<b>Starzec Aneta</b> , Brożyna Malwina, Kotyra Łukasz, Fecka Izabela: Anti-inflammatory and skin regenerating properties of vegetable oils, W: 4th International Wrocław Scientific Meetings. Wrocław, 09-10 October 2020, (red.) Julita Kulbacka, Nina Rembiałkowska, Joanna Weźgowiec, Wrocław 2020, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o., s. 225, ISBN 978-83-66489-37-0
20	Brożyna Malwina, Paleczny Justyna, Dydak Karolina, <b>Starzec Aneta</b> , Junka Adam: Antimicrobial activity of thyme, tea tree and eucalyptus essential oils against Staphylococcus aureus biofilm, W: 4th International Wrocław Scientific Meetings. Wrocław, 09-10 October 2020, (red.) Julita Kulbacka, Nina Rembiałkowska, Joanna Weźgowiec, Wrocław 2020, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o., s. 90-91, ISBN 978-83-66489-37-0
21	Bernacka Karolina, <b>Starzec Aneta</b> , Bednarska Katarzyna, Fecka Izabela: Ziele czystka szarego - czy właściwości popularnego suplementu znajdują potwierdzenie w badaniach naukowych?, W: VI Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie metod analitycznych w farmacji i medycynie". Wrocław, 03 grudnia 2021 r. Książka abstraktów, Wrocław 2021, s. 15
22	Kunachowicz Dominika, <b>Starzec Aneta</b> , Kepinska Marta, Fecka Izabela: Wyciąg wodno-metanolowy z liści czystka szarego jako źródło inhibitorów $\alpha$ -glukozydazy, W: VII Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie metod analitycznych w farmacji i medycynie". Wrocław, 15 grudnia 2022 roku. Książka abstraktów, Wrocław 2022, s. 32-33

**Impact Factor:** 18,247

**Punkty ministerialne:** 580,00

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
Biblioteka Główna  
DZIAŁ BIBLIOGRAFII I BIBLIOMETRII  
ul. Marcinkowskiego 2-6, 50-368 Wrocław  
tel. 71 784 19 25, faks 71 784 19 31

21.04.2023. Ewa Strobomska

## OSIĄGNIĘCIA

**Tytuł zawodowy:** magister dietetyki (2016 r., nr dyplomu: 6181)

### **Praca zawodowa:**

- 2023 – obecnie | Quality Assurance, Junior Tester | **Awaken Realms**
- 2023 – obecnie | Zoofizjoterapeuta i zoodietetyk zwierząt domowych | **Działalność własna**
- 2017 – 2022 | Dietetyk kliniczny | **Centrum Medyczne Endo-Med**

### **Edukacja:**

- 2017 – 2023 | Studia doktoranckie na Wydziale Lekarskim Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu;
- 2014 – 2016 | Studia magisterskie na kierunku dietetyka (2°) na Wydziale Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu im. Piastów Śląskich, zakończone uzyskaniem tytułu magistra dietetyki z oceną bardzo dobrą;
- 2011 – 2014 | Studia licencjackie na kierunku dietetyka (1°) na Wydziale Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu im. Piastów Śląskich, zakończone uzyskaniem tytułu licencjat z oceną ponad dobrą.

### **Staże, kursy, szkolenia:**

- Wrzesień 2022 – kwiecień 2023 | Kurs zoofizjoterapeuta: psy i koty w Studium Fizjoterapii Zwierząt w Warszawie;
- Wrzesień 2022 – marzec 2023 | Certyfikowany kurs żywienia psów;
- 2021 – 2022 | Ukończenie ponad 100 certyfikowanych kursów z zakresu żywienia w jednostkach chorobowych, żywienia w sporcie, żywienia kobiet ciężarnych, karmiących i dzieci, psychodietetyki;
- 2011 – 2012 | Uczestnictwo w projekcie POWER: Dolnośląscy liderzy Medycyny – wdrożenie zintegrowanego programu podnoszenia kompetencji studentów, doktorantów, kadry dydaktycznej i administracyjnej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Projekt dofinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój. Moduł 5: Wdrożenie programu stypendiów dydaktycznych jako działania uzupełniającego program studiów doktoranckich.

### **Projekty naukowe:**

- Udział w badaniach statutowych jako członek zespołu badawczego Katedry i Zakładu Farmakognozji i Leku Roślinnego:
  1. "Ocena składu chemicznego i właściwości biologicznych wybranych nefarmakopealnych substancji roślinnych o potencjale leczniczym", nr: SUB.D110.19.005, okres realizacji 2019-2020;
  2. „Ocena składu chemicznego wybranych substancji pochodzenia roślinnego o właściwościach leczniczych i prozdrowotnych”, nr: SUB.D110.21.101, okres realizacji 2021;

### **Zajęcia dydaktyczne ze studentami:**

- Farmakognozja, ćwiczenia laboratoryjne – Farmacja, III rok (2017-2021)
- Ziołowe środki lecznicze, ćwiczenia laboratoryjne – Dietetyka, II rok 2° (2017-2021)

### **Popularyzacja nauki:**

- Dolnośląski Festiwal Nauki – 2020-2021;

Uczestnictwo w przygotowaniu zajęć laboratoryjnych i prezentacji, nt. „Niezwykła skrobia” (2020), „Podróż leku w naszym organizmie” (2020), „Barwy natury” (2021), „Farmaceutyczny ogródek” (2021).

- II Wrocławskie Dni Doktoranta (2018) – Prelegent - „Gatunki i rozwój DOGtorantów – o procesie wzrostu DOGtorantów słów kilka”

### **Zainteresowania:**

- Aktywny zawodnik Agility, wystawca psów rasowych – aktualny podopieczny Schipperke ‘Astrid’ (2021 – obecnie)
- Trener psich sportów, żywieniowiec i fizjoterapeuta psów sportowych (2021 – obecnie)
- Designer/miniature painter – artystyczne zdobienie miniatur kolekcjonerskich, gier planszowych i bitewnych, aktywnie współpracujący z firmą Awaken Realms (2016 – obecnie)