



You have downloaded a document from
RE-BUŚ
repository of the University of Silesia in Katowice

Title: Skład chemiczny rośliny leczniczej *Cistus incanus* L. (czystek szary) a jej wybrane właściwości biologiczne

Author: Dariusz Szeremeta

Citation style: Szeremeta Dariusz. (2019). Skład chemiczny rośliny leczniczej *Cistus incanus* L. (czystek szary) a jej wybrane właściwości biologiczne. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.





UNIWERSYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH

**Skład chemiczny rośliny leczniczej
Cistus incanus L. (czystek szary)
a jej wybrane właściwości biologiczne**

Rozprawa doktorska

Dariusz Szeremeta

Promotor:

dr hab. Mieczysław Sajewicz

Promotor pomocniczy:

dr Magdalena Knaś

Katowice 2019

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania:

Panu dr hab. Mieczysławowi Sajewiczowi
za opiekę naukową, cenne wskazówki
w czasie wykonywania badań, poświęcony
czas i pomoc podczas realizacji pracy.

Pani dr Magdalenie Knaś *za cenne rady*
oraz pomoc w trakcie prowadzenia badań.

Pani prof. dr hab. Teresie Kowalskiej *za*
cenne uwagi, a także za wszelką pomoc
udzieloną podczas realizowania pracy.

SPIS TREŚCI

| | |
|---|---------------|
| SPIS TREŚCI | - 3 - |
| I. STRESZCZENIE | - 6 - |
| II. SYMBOLE | - 8 - |
| III. WPROWADZENIE | - 9 - |
| IV. CZĘŚĆ TEORETYCZNA | - 12 - |
| 1. Ogólna charakterystyka gatunku <i>C. incanus</i> L. | - 12 - |
| 2. Wybrane klasy związków występujących w <i>C. incanus</i> L. | - 15 - |
| 2.1 Terpeny i terpenoidy | - 15 - |
| 2.1.1 Monoterpeny i ich pochodne | - 16 - |
| 2.1.2 Seskwiterpeny i ich pochodne | - 17 - |
| 2.1.3 Diterpeny i ich pochodne | - 17 - |
| 2.2 Polifenole | - 19 - |
| 2.2.1 Kwasy fenolowe | - 19 - |
| 2.2.2 Flawonoidy | - 21 - |
| 3. Właściwości biologiczne gatunku <i>C. incanus</i> L. | - 26 - |
| 3.1 Właściwości antyoksydacyjne | - 26 - |
| 3.2 Właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze | - 29 - |
| 3.3 Właściwości cytotoksyczne | - 32 - |
| 3.4 Inne właściwości | - 35 - |
| V. CEL PRACY | - 37 - |
| VI. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA | - 38 - |
| 1. Aparatura i odczynniki | - 38 - |
| 2. Materiał roślinny | - 42 - |
| 3. Analiza frakcji lotnej techniką chromatografii gazowej | - 43 - |
| 3.1 Izolacja, rozdział i identyfikacja – metodyka badań | - 43 - |
| 3.1.1 Destylacja z parą wodną w aparacie Derynga | - 43 - |
| 3.1.2 Analiza fazy nadpowierzchniowej | - 43 - |
| 3.1.3 Analiza GC/MS | - 43 - |
| 3.1.4 Identyfikacja związków | - 44 - |
| 3.2 Analiza chromatograficzna frakcji lotnej [114] | - 45 - |
| 4. Analiza frakcji nielotnej - właściwości antyoksydacyjne | - 54 - |
| 4.1 Ekstrakcja i analiza chromatograficzna - metodyka badań | - 54 - |

| | | |
|-----------------|--|----------------|
| 4.1.1 | Przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem (ASE) | - 54 - |
| 4.1.2 | Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) | - 55 - |
| 4.1.3 | Właściwości antyoksydacyjne | - 56 - |
| 4.2 | Analiza wodno-metanolowych ekstraktów techniką chromatografii cienkowarstwowej [116] | - 57 - |
| 4.3 | Określenie aktywności antyoksydacyjnej wodno-metanolowych ekstraktów <i>C. incanus</i> L. [116] | - 61 - |
| 5. | Analiza frakcji nietlotnej - właściwości przeciwbakteryjne | - 66 - |
| 5.1 | Ekstrakcja i analiza chromatograficzna – metodyka badań | - 66 - |
| 5.1.1 | Wyczerpująca ekstrakcja w aparacie Soxhleta – surowy ekstrakt | - 66 - |
| 5.1.2 | Wielostopniowa ekstrakcja związków fenolowych – frakcje fenolowe I-VI | - 67 - |
| 5.1.3 | Warunki analizy chromatograficznej zastosowanej do rozdziału surowych metanolowych ekstraktów <i>C. incanus</i> oraz sześciu frakcji (I-VI) uzyskanych metodą wielostopniowej ekstrakcji związków fenolowych | - 71 - |
| 5.1.4 | Wywoływanie płytek TLC | - 71 - |
| 5.1.5 | Bezpośrednia bioautografia - TLC | - 72 - |
| 5.2. | Identyfikacja związków aktywnych biologicznie – metodyka badań | - 73 - |
| 5.2.1 | Izolacja związków o właściwościach przeciwbakteryjnych, występujących we frakcji I- | - 73 - |
| 5.2.2 | Analiza techniką HPLC-DAD-ESI-MS | - 73 - |
| 5.2.3 | Układy chromatograficzne HPTLC zastosowane do detekcji związków występujących w frakcji I w postaci koniugatów glukozy lub kemferolu | - 74 - |
| 5.3 | Analiza chromatograficzna surowych metanolowych ekstraktów <i>C. incanus</i> oraz ocena ich potencjału przeciwbakteryjnego [129]. | - 76 - |
| 5.4 | Analiza chromatograficzna frakcji fenolowych (I-VI) próbki A3 oraz ocena ich potencjału przeciwbakteryjnego [129] | - 80 - |
| 5.5 | Identyfikacja bioaktywnych składników frakcji fenolowej I [130] | - 85 - |
| 6. | Analiza frakcji nietlotnej - właściwości przeciwnowotworowe | - 98 - |
| 6.1 | Linie komórkowe | - 98 - |
| 6.2 | Test cytotoksyczności - MTS | - 98 - |
| 6.3 | Analiza właściwości przeciwnowotworowych <i>C. incanus</i> L. przeciwko ludzkim liniom komórkowym raka jelita grubego (HCT116) [129] | - 101 - |
| VII. | WNIOSKI | - 103 - |
| | Analiza frakcji lotnej | - 103 - |
| | Analiza nietlotnej frakcji | - 104 - |
| VIII. | ZAŁĄCZNIKI | - 107 - |
| Aneks 1. | Lista prac własnych | - 107 - |

| | | |
|------------|--|----------------|
| Aneks 2. | Lista publikacji konferencyjnych _____ | - 108 - |
| Aneks 3. | Spis rysunków _____ | - 112 - |
| Aneks 5. | Spis tabel _____ | - 116 - |
| IX. | BIBLIOGRAFIA _____ | - 117 - |

I. STRESZCZENIE

Przez millenia wiele tysięcy roślin leczniczych wykorzystywano jako tradycyjne leki w różnych kulturach na całym świecie. Ze względu na bardzo dużą liczbę roślin o potencjale leczniczym, jak dotąd spora ich część nie została systematycznie przebadana, a wiele ziół wciąż czeka na kompleksową ocenę ich terapeutycznych właściwości. W związku z tym ewidentnym opóźnieniem na szczególną uwagę zasługują badania koncertujące się na analizie składu chemicznego i właściwości farmaceutycznych roślin leczniczych oraz na metodach umożliwiających szybkie, przesiewowe badanie aktywności biologicznej materiału roślinnego.

W prezentowanej rozprawie doktorskiej jako materiał badawczy wykorzystano 12 próbek ziela z gatunku *C. incanus* L., różniących się pochodzeniem (Turcja, Albania, Grecja) i sprzedawanych na polskim rynku jako preparaty ziołowe.

W części teoretycznej rozprawy przedstawiono ogólną charakterystykę gatunku, omówiono główne grupy związków wyizolowanych z materiału roślinnego i żywicy „Labdanum” oraz zaprezentowano dotychczasowy stan badań nad aktywnością biologiczną wykazywaną przez zawarte w tej roślinie składniki.

Celem przeprowadzonych w ramach pracy badań była analiza lotnych i nielotnych frakcji wyodrębnionych z próbek handlowych ziela *C. incanus* L. oraz ocena wybranych właściwości biologicznych, wykazywanych przez składniki zawarte w metanolowych i wodno-metanolowych ekstraktach tych próbek.

W pierwszym etapie badań przy pomocy chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS). określono i porównano skład frakcji lotnej poszczególnych próbek czystka oraz oceniono skuteczność wyodrębniania lotnych składników przy użyciu dwóch technik izolacyjnych, tj. desorpcji do fazy nadpowierzchniowej oraz destylacji z parą wodną w aparacie Derynga.

Druga część badań poza porównaniem składu metanolowych i wodno-metanolowych ekstraktów próbek handlowych czystka koncentrowała się na określeniu ich właściwości przeciwutleniających, przeciwbakteryjnych i przeciwnowotworowych. Zastosowanie metod łączących technikę chromatografii cienkwarstwowej z testami aktywności antyoksydacyjnej i antybakteryjnej (TLC-DPPH i TLC-DB) pozwoliło na rozdział składników obecnych w badanych ekstraktach oraz ocenę ich potencjału biologicznego. Aktywność przeciwutleniającą rozdzielonych

ekstraktów mierzono chemiczną metodą opartą na zdolności do wychwytywania rodnika DPPH, natomiast właściwości przeciwbakteryjne ekstraktów testowano wobec Gram-dodatniej bakterii *Bacillus subtilis* oraz Gram-ujemnej bakterii *Aliivibrio fischeri*. Poza badaniami przeciwbakteryjnymi surowych ekstraktów przeprowadzono również analizę TLC-DB sześciu frakcji fenolowych (od I do VI), otrzymanych w wyniku selektywnej wielostopniowej ekstrakcji metanolowych ekstraktów czystka. Badania aktywności przeciwnowotworowej przeprowadzono stosując test kolorymetryczny MTS dla metanolowych ekstraktów względem dwóch linii komórkowych raka jelita grubego, różniących się stanem genu TP53 (HCT116 p53^{+/+} z dziką formą genu TP53 oraz HCT116 p53^{-/-} pozbawionego obu alleli tego genu).

Ostatni etap badań dotyczył identyfikacji związków o najsilniejszym efekcie hamującym wzrost testowanych szczepów bakterii. Do zidentyfikowanych związków o wyraźnie zaznaczonym potencjale antybakteryjnym należały apigenina, 3-O-metylokemferol, *cis*- i *trans*-tylirozyd oraz izomery dikumaroilo-glukozydu kemferolu. Na potrzeby identyfikacji tych związków opracowano trzy niezależne metody HPTLC (wielokrotne rozwijanie próbek na żelu krzemionkowym modyfikowanym aminą i dwie metody oparte na dwukierunkowym rozwijaniu próbek na żelu krzemionkowym) połączone z hydrolizą kwasową *in situ*, służące do wykrywania związanego strukturalnie kemferolu i glukozy.

II. SYMBOLE

| AKRONIM | TERMIN POLSKOJĘZYCZNY |
|------------------|--|
| 2D-TLC | dwukierunkowa chromatografia cienkowarstwowa (ang. <i>Two-Dimensional Thin Layer Chromatography</i>) |
| ABTS | 2,2'-azo-bis(3-etylo-benzotiazolino)-6-sulfonian |
| ASE | przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem (ang. <i>Accelerated Solvent Extraction</i>) |
| CCD | centralny plan kompozycyjny (ang. <i>Central Composite Design</i>) |
| DAD | detektor z matrycą diodową (ang. <i>Diode Array Detector</i>) |
| DPPH | 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl |
| ESI | jonizacja przez elektrorozpraszanie (ang. <i>Electrospray ionization</i>) |
| FRAP | zdolność redukcji kompleksu żelaza Fe ⁺³ z tripirydylotriazyną (ang. <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>) |
| HPLC | wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>) |
| HPTLC | wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa (ang. <i>High Performance Thin Layer Chromatography</i>) |
| HS-GC/MS | analiza fazy nadpowierzchniowej techniką chromatografii gazowej (ang. <i>Headspace Gas Chromatography</i>) |
| IC ₅₀ | połowa maksymalnego stężenia hamującego (ang. <i>Half Maximal Inhibitory Concentration</i>) |
| MD-TLC | chromatografia cienkowarstwowa z wielokrotnym rozwijaniem (ang. <i>Multiple Development Thin Layer Chromatography</i>) |
| MS | spektrometria mas (ang. <i>Mass Spectrometry</i>) |
| MTS | o3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, |
| MTT | bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy |
| NIST | Narodowy Instytut Standaryzacji I Technologi (ang. <i>National Institute of Standards and Technology</i>) |
| p53 | białko kodowane przez gen supresorowy TP53 (ang. <i>tumor protein p53</i>) |
| PMS | metosiarczanu fenazyny (ang. <i>phenazine methosulfate</i>) |
| RFT | reaktywne formy tlenu (ROS, ang. <i>Reactive Oxygen Species</i>) |
| RSD | względne odchylenia standardowe (ang. <i>Relative Standard Deviation</i>) |
| RSM | metoda odpowiedzi powierzchni (ang. <i>Response Surface Methodology</i>) |
| TEAC | ekwiwalent potencjału przeciwutleniającego Troloksu w reakcji z kationorodnikiem ABTS ⁺ (ang. <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>) |
| TFC | całkowita zawartość flawonoidów (ang. <i>Total Flavonoid Content</i>) |
| TLC-DB | bioautografia bezpośrednia połączona z chromatografią cienkowarstwową (ang. <i>Thin layer chromatography coupled with direct bioautography</i>) |
| TPC | całkowita zawartość związków fenolowych (TPC, ang. <i>Total Phenolic Content</i>) |

III. WPROWADZENIE

Przez tysiące lat ludzie wykorzystywali właściwości niektórych roślin w leczeniu wielu dolegliwości i chorób. Obecnie po latach kryzysu medycyny naturalnej i dominacji medycyny opartej na lekach syntetycznych obserwuje się powrót do ziołolecznictwa. Zaczęto doceniać zalety otrzymywanych z roślin leków ziołowych, do których zalicza się m.in. znacznie lepszą przyswajalność przez organizm oraz fakt, że mogą być stosowane przez długi okres czasu, wykazując przy tym małą toksycznością ogólną i narządową. Ponadto, leki ziołowe są tańsze, w porównaniu z lekami syntetycznymi, łatwo dostępne, oraz nie powodują zanieczyszczenia środowiska [1], [2]. Preparaty naturalne mają zastosowanie głównie w leczeniu przewlekłych schorzeń (np.: sercowo-naczyniowych, przewodu pokarmowego, dróg oddechowych i chorób skóry) [3], [4]. Dzięki rozwojowi fitochemii i farmakognozji, stosowanie w leczeniu niektórych preparatów ziołowych zostało naukowo udokumentowane. Nie tylko uwierzytelniono efekt terapeutyczny wielu roślin leczniczych, ale ustalono również struktury chemiczne związków odpowiedzialnych za aktywność biologiczną tych roślin. Często związki te stawały się później prekursorami do otrzymania nowych leków syntetycznych. Według szacunków, w składzie ponad 25% leków obecne są substancje pochodzenia naturalnego lub ich syntetyczne odpowiedniki [5]. Dzisiaj nie ma wątpliwości, że medycyna naturalna może wspierać i uzupełniać metody leczenia oparte na środkach syntetycznych. Mimo dużego postępu w badaniach poszczególnych roślin o znaczeniu leczniczym, do tej pory nie określono pełnego składu chemicznego oraz wszystkich właściwości dużej części tych roślin. Szacuje się, że z puli około 40 000 gatunków roślin uznawanych za lecznicze, dokładnie przebadano zaledwie parę tysięcy [6], [7]. Ze względu na niewykorzystany ogromny potencjał preparatów ziołowych, uzasadnione wydaje się prowadzenie badań mających na celu lepsze poznanie składu chemicznego oraz właściwości biologicznych poszczególnych gatunków roślin.

Ekstrakty roślinne są złożonymi mieszaninami, zawierającymi często setki substancji, z których tylko część wykazuje istotne działanie biologiczne. Uzyskanie pełnego zasobu informacji o składzie i właściwościach związków pochodzących z wyciągów roślinnych ma zasadniczy wpływ na skuteczność i bezpieczeństwo terapii fitofarmaceutykami oraz pozwala na wyselekcjonowanie związków o najbardziej interesującym potencjale farmaceutycznym.

Szeroko stosowanym narzędziem do analizy składników roślinnych są techniki chromatograficzne, przy znacznym udziale wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Technika ta daje duże możliwości rozdzielcze, a w połączeniu z metodami spektroskopowymi, takimi jak spektrometria mas (MS) może dostarczyć również informacji o strukturze rozdzielonych związków. Trudno jednak powiązać te dane z informacjami otrzymanymi w testach biologicznych, gdzie wynik stanowi sumaryczny efekt wykazywany przez całość obecnych w ekstrakcie składników [8]. Technika, pozwalająca na uzyskanie informacji o właściwościach farmakologicznych poszczególnych związków jest chromatografia cienkowarstwowa (TLC), połączona z odpowiednim testem aktywności biologicznej. Przewaga TLC, nad innymi technikami chromatograficznymi wynika z faktu, że jest to system otwarty, dający bezpośredni dostęp do rozdzielonych składników mieszaniny, unieruchomionych na złożu adsorbentu. Zastosowanie *in situ* odpowiednich testów aktywności biologicznej (np. przeciwdrobnoustrojowych, enzymatycznych, antyoksydacyjnych), pozwala wykryć wśród rozdzielonych związków te substancje, które daną aktywność posiadają [8], [9]. Ponadto, zastosowanie różnych faz stacjonarnych, eluentów, sposobów rozwijania (np. wielokrotne (MD-TLC), dwukierunkowe (2D-TLC)) [10], odczynników derywatyzujących i wizualizujących [11], [12], jak również możliwość elucji lub desorpcji substancji zawartych w aktywnych strefach [13]–[16], pozwala na wysoce ukierunkowaną charakterystykę i identyfikację obecnych na płycie substancji. Nie bez znaczenia pozostaje również fakt, że TLC jest techniką umożliwiającą równoległą analizę kilkunastu próbek oraz badanie surowych ekstraktów bez konieczności wstępnego oczyszczania próbki. Wszystkie te czynniki sprawiają, że używana w różnych wariantach technika TLC sprawdza się jako względnie niedroga i łatwa w użyciu narzędzie do analizy składu chemicznego materiału roślinnego oraz szybkiego, przesiewowego badania próbek pod kątem ich aktywności biologicznej (bioprofilowania), umożliwiając badanie nowych gatunków roślin o potencjale leczniczym oraz kontrolę jakości preparatów ziołowych [14], [17]–[20].

W gronie roślin o wyraźnym potencjale prozdrowotnym wyróżnić można gatunki należące do rodzaju *Cistus* L. (czystek), wśród których szczególnym zainteresowaniem cieszy się gatunek *Cistus incanus* L.. Popularność tego gatunku wynika z jego wieloletniego zastosowania w tradycyjnej medycynie bliskowschodniej i śródziemnomorskiej, gdzie stosowany był m.in., jako środek przeciwzapalny, przeciwwrzodowy, przyspieszający gojenie ran oraz zwalczających szereg infekcji

mikrobiologicznych [21], [22]. Obecnie prowadzone są badania, które potwierdzają dotychczasowe, tradycyjne zastosowania oraz odnotowują nowe profile aktywności biologicznej ekstraktów tego gatunku, jak również wyodrębnionych z materiału roślinnego metabolitów wtórnych. Wśród związków chemicznych, które determinują właściwości farmakologiczne *C. incanus*, szczególną rolę odgrywają polifenole oraz terpeny i terpenoidy zawarte we frakcji lotnej czystka [23], [24]. Mimo rosnącego z roku na rok zainteresowania tym gatunkiem, otrzymywane z *C. incanus* L. surowce nie są do tej pory uznawane w krajach europejskich jako farmakopealne [21].

IV. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA GATUNKU *C. INCANUS* L.



Rys. 1. *Cistus incanus* L. [25].

Cistus incanus L., czystek szary (Rys. 1) jest niewielkim wieloletnim krzewem (wysokości poniżej 1 m) z prostymi naprzeciwległymi liśćmi oraz spodeczkowatymi kwiatami o pięciu różowych płatkach (czas kwitnienia od maja do czerwca) [26]–[28]. Gatunek ten należy do rodzaju *Cistus* L. (czystek; od greckiego słowa kistos- κῑστος), stanowiącego część względnie niewielkiej rodziny *Cistaceae* (czystkowatych) (Rys. 2). Rodzina ta składa się z 180 gatunków roślin zielnych i krzewów podzielonych na 8 jednostek taksonomicznych [29]. Gatunki z rodzaju *Cistus*, znane są pod nazwą

zwyczajową, jako skalna róża lub święta róża [30], [31], są charakterystycznym i ważnym elementem półsuchych ekosystemów basenu Morza Śródziemnego. Tworzą one gęste zarośla, najczęściej na otwartych, nasłonecznionych terenach z piaszczystym lub wapiennym podłożem [21], [28], [32]–[34].

Królestwo: *Plantae* (rośliny)

Podkrólestwo: *Tracheophyta* (naczyniowce)

Gromada: *Magnoliophyta* (okrytonasienne)

Podgromada: *Magnoliophytina* (okrytozalążkowe)

Klasa: *Rosopsida* (dwuliścienne właściwe)

Podklasa: *Dilleniidae* (ukleślowe)

Rząd: *Malvanae* (ślazowce)

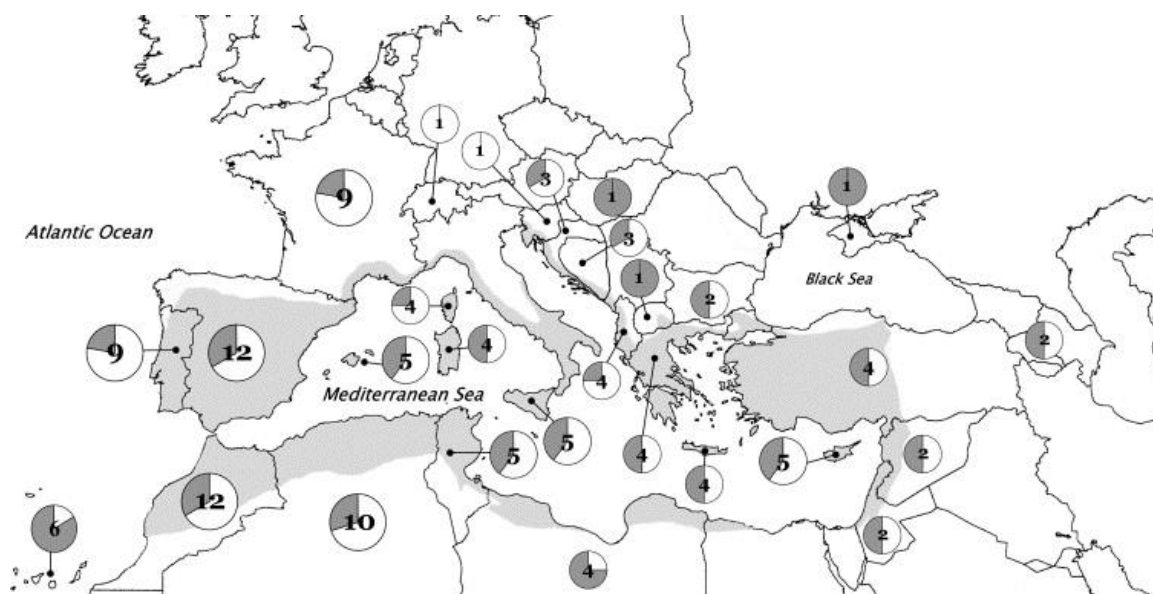
Rodzina: *Cistaceae* (czystkowate)

Rodzaj: *Cistus* (czystek)

Gatunek: *Cistus incanus* L. (czystek szary)

Rys. 2. Klasyfikacja taksonomiczna gatunku *C. incanus* L. (według Reveala).

Obecnie rozpoznano około 20 gatunków *Cistus* L.. Ich kwiaty są hermafrodyczne, aktynomorficzne i hipogeniczne, w zależności od podrodzaju występują w kolorach od białego do fioletowego, z trzema lub pięcioma działkami kielicha rozmieszczonymi przeciwległe do płatków korony [23]. Cechą charakterystyczną tego rodzaju jest kombinacja różnych typów włosków na liściach, łodydze oraz kielichu, który w odróżnieniu od dwóch pozostałych organów nie posiada trichomów gruczołowych [24]. Włoski te głównie w miesiącach letnich wydzielają wysoce aromatyczną żywicę znaną pod nazwą „Ladanum”. Wydzielina ta bogata jest w biologicznie aktywne i interesujące farmakologiczne metabolity, takie jak flawonoidy, glikozydy fenolowe i terpenoidy, w tym diterpeny typu labdanu. [24], [35]. Między innymi z tego powodu żywica, jak i cała roślina stosowana była w śródziemnomorskiej medycynie ludowej do leczenia wielu chorób [36]. Zdaniem części badaczy roślin biblijnych wzmianki o ladanum pochodzącym z czystka szarego pojawiają się już w Księdze Rodzaju [37]. Gatunki tych roślin występują zarówno we wschodnim, jak i zachodnim rejonie Morza Śródziemnego (gdzie obserwuje się ich najwyższą różnorodność gatunkową), są także szeroko rozpowszechnione na Balearach i Wyspach Kanaryjskich [38], [39]. Szczegóły dystrybucji gatunków *Cistus* L. przedstawiono na Rys. 3.



Rys. 3. Mapa rozmieszczenia gatunków *Cistus*. Diagramy kołowe obrazują proporcje występowania w poszczególnych krajach gatunków o kwiatach białych (biały) i fioletowych (szary). Region Morza Śródziemnego pokazany na szaro [38].

Rośliny z rodzaju *Cistus*, podobnie jak inne śródziemnomorskie gatunki karłowatych krzewów przeszły szereg adaptacji umożliwiających przetrwanie letnich upałów i suszy oraz zapewniających szybką regenerację po często występujących w tym obszarze pożarach [40]. Wśród nich wyróżnić można między innymi:

- płytki i rozległy system korzeniowy [41];
- trwałe nasiona o zwiększonej zdolności kiełkowania po ekspozycji na działanie wysokich temperatur [42], [43];
- włoski naskórka (gruczołowe i mechaniczne) [44];
- sezonowy dimorfizm umożliwiający dostosowanie się rośliny do warunków suszy i zwiększonego nasłonecznienia. (zmniejszenie rozmiaru liści oraz zwiększenie ilości włosków epidermalnych) [45].

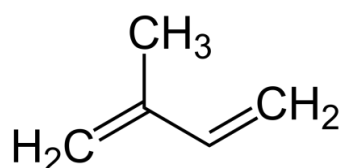
Występowanie sezonowego dimorfizmu oraz łatwość tworzenia hybryd pomiędzy pokrewnymi gatunkami sprawia, że systematyka rodzaju *Cistus* L. jest mocno skomplikowana [21], [46], [47]. Powszechnym zjawiskiem jest występowanie w obrębie rodzaju licznych podgatunków (przykład: *C. creticus* ssp. *creticus*, *C. creticus* ssp. *eriocephalus*, *C. creticus* ssp. *corsicus*) [21], [35]. Z wyżej wymienionych powodów sporo roślin uznawanych początkowo za odmienne jednostki taksonomiczne zostało w wyniku ponownej klasyfikacji uznanych za ten sam gatunek. Za przykład posłużyć może czystek szary. Nazwa *Cistus incanus* L. pojawia się w publikacjach naukowych zamienienie z nazwą *Cistus creticus* L. i *Cistus villosus* L., jednakże przez większość współczesnych naukowców są one uznawane za synonimy tego samego gatunku rośliny [40], [46], [48], [49].

2. WYBRANE KLASY ZWIĄZKÓW WYSTĘPUJĄCYCH W *C. INCANUS* L.

2.1 Terpeny i terpenoidy

Terpeny stanowią rozległą grupę naturalnych związków o wzorze ogólnym $(C_5H_8)_n$, będących oligomerami izoprenu (2-metylo-1,3-butadienu). Szkielet główny tych związków powstaje w wyniku połączenia (zgodnie z regułą izoprenową) dwóch lub więcej jednostek izoprenowych (Rys. 4). W zależności od stopnia polimeryzacji n , wyróżniamy następujące grupy terpenów:

- monoterpeny ($C_{10}H_{16}$), $n=2$;
- seskwiterpeny ($C_{15}H_{24}$), $n=3$;
- diterpeny ($C_{20}H_{32}$), $n=4$;
- sesterterpeny ($C_{25}H_{40}$), $n=5$;
- triterpeny ($C_{30}H_{48}$), $n=6$;
- tetraterpeny ($C_{40}H_{64}$), $n=8$;
- politerpeny, $n>8$.



Rys. 4. Struktura izoprenu (2-metylo-1,3-butadienu).

Pochodne terpenów zawierające różnorodne grupy funkcyjne: karboksylowe, hydroksylowe, karbonylowe, czy nadtlencowe nazywamy terpenoidami [50], [51].

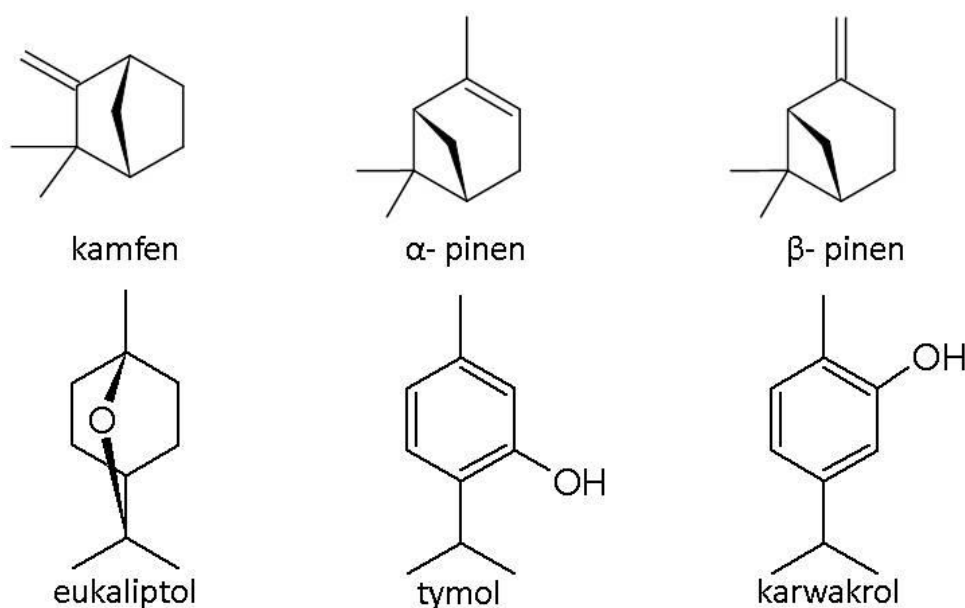
Badania olejków eterycznych otrzymanych z ziela oraz żywicy *C. incanus* wykazały zróżnicowany, zależny od podgatunku, wieku rośliny, czasu i miejsca zbiorów skład frakcji lotnej tej rośliny [35], [46], [52]. Mimo sporych różnic w kompozycji olejków eterycznych otrzymanych przez różne grupy badawcze, można stwierdzić, że głównymi składnikami terpenowymi występującymi w tej roślinie są diterpeny typu labdanu i klerodanu, wraz z mono- i seskwiterpenami oraz ich tlenowymi pochodnymi [35], [49], [53]. Ogólnie w podgatunku *C. creticus* ssp. *creticus* zidentyfikowano do tej pory 92 związki terpenowe (36 monoterpenów, 35 seskwiterpenów i 21 diterpenów). W *C. creticus* ssp. *eriocephalus* wykryto ich 47 (składających się z 17 monoterpenów, 19 seskwiterpenów i 11 diterpenów typu labdanu) [24]. Oprócz składników terpenowych

w olejkach eterycznych obserwowana była również duża ilość kwasów tłuszczowych [49].

2.1.1 Monoterpeny i ich pochodne

Monoterpeny są szeroko rozpowszechnionymi w świecie roślin dimerami izoterpenu. Tworzą liczne pochodne tlenowe (monoterpenoidy), takie jak alkohole, aldehydy, ketony oraz tlenki terpenowe. Monoterpeny i monoterpenoidy są związkami o silnym zapachu i dobrze udokumentowanej aktywności biologicznej. Są bardzo trudno rozpuszczalne w wodzie, natomiast dobrze rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych. Częstym zjawiskiem wśród tych związków jest występowanie izomerii geometrycznej i optycznej. Są one składnikami olejków eterycznych, balsamów i żywic, stanowiących wydzieliny roślinne. Po względem struktury związki te można podzielić na: acykliczne, monocykliczne, dicykliczne, tricykliczne [50], [54].

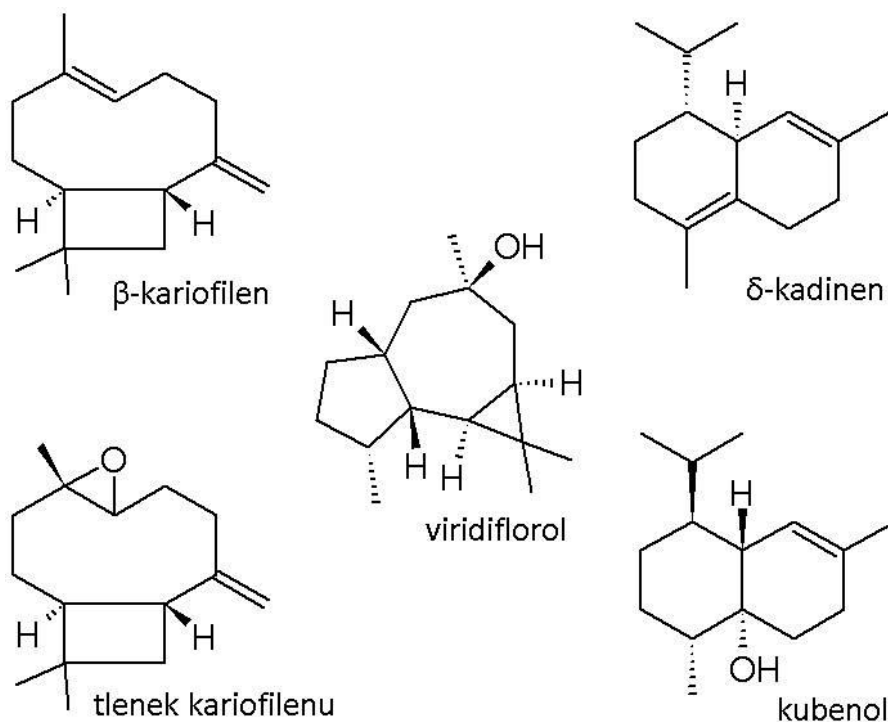
Do głównych monoterpenu i ich pochodnych zidentyfikowanych w olejkach i ekstraktach czystka zaliczyć można: α i β -pinen, kamfen, eukaliptol, karwakrol i tymol (Rys. 5)



Rys. 5. Wzory strukturalne wybranych monoterpenu i ich pochodnych obecnych w olejku eterycznym *C. incanus*.

2.1.2 Seskwiterpeny i ich pochodne

Seskwiterpeny stanowią grupę trimerów izoprenu o zasadniczym wzorze sumarycznym $C_{15}H_{24}$, posiadającą pochodne o różnorodnym charakterze. Do grupy tej zaliczane są zarówno lotne, jak i nielotne związki, przy czym te o właściwościach lotnych często towarzyszą monoterpenom w licznych olejkach eterycznych. Seskwiterpeny i ich pochodne mogą mieć strukturę łańcuchową (niecykliczną), mono-, di-, tri- i tetracykliczną [50], [51]. Do głównych związków należących do tej grupy, które zostały zidentyfikowane, jako składniki *C. incanus* zaliczamy: tlenek kariofilenu, β -kariofilen, kubenol, izomery kadinenu i viridiflorolu (Rys. 6). Największą ilość seskwiterpenów zidentyfikowano w olejkach eterycznych podgatunku *C. creticus* ssp. *eriocephalus*, rosnącym w Grecji [24], [53].

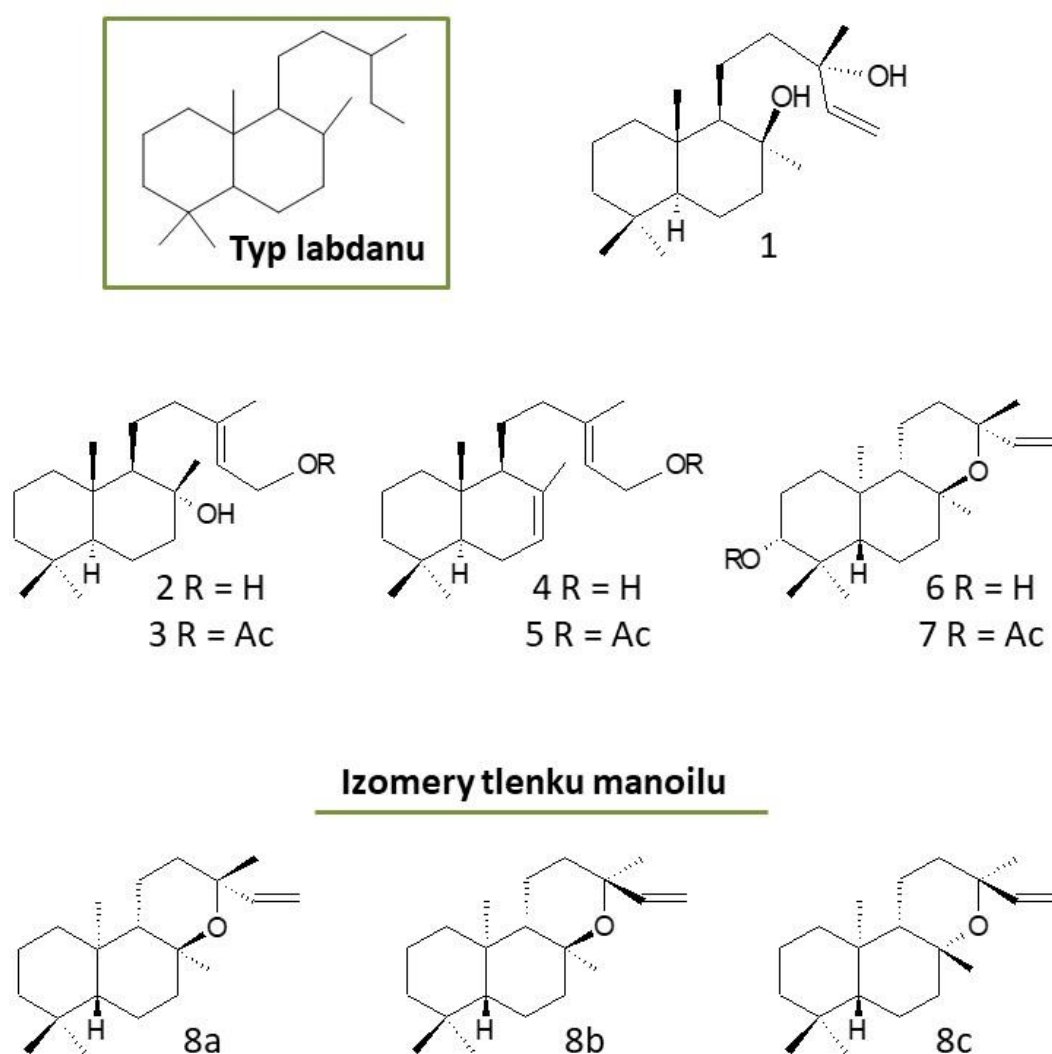


Rys. 6. Wzory strukturalne wybranych seskwiterpenów i ich pochodnych obecnych w olejku eterycznym *C. incanus*.

2.1.3 Diterpeny i ich pochodne

Diterpeny są to związki o wzorze ogólnym $C_{20}H_{32}$, który odpowiada połączeniu się czterech jednostek izoprenowych. Ze względu na dużą masę cząsteczkową, związki te charakteryzują się wysoką temperaturą wrzenia. Są to substancje występujące głównie w żywicach roślinnych. Tak jak niższe terpeny, związki diterpenowe mogą posiadać

strukturę liniową oraz składającą się z pojedynczego pierścienia, bądź ich większej ilości [50], [51]. Do głównych typów budowy diterpenów zaliczamy: typ abietanu, typ tiglianu, typ labdanu, typ kauranu, typ klerodanu i typ gibanu. W ziele oraz żywicy *C. incanus* występują głównie pochodne diterpenów typu klerodanu i typu labdanu, przy czym te drugie są przeważnie dominującymi komponentami żywicy, liści i łodyg [35], [55]–[58]. Przeprowadzone przez Falara i wsp. [59] badania wykazały, że wytwarzanie diterpenów typu labdanu w gatunkach z rodzaju *Cistus* jest specyficzne dla ich trichomów gruczołowych. Na Rys. 7 przedstawione zostały wybrane diterpeny typu labdanum zidentyfikowane jako metabolity wtórne występujące w gatunku *C. incanus*.



Rys. 7. Wybrane diterpeny typu labdanu zidentyfikowane w ziele i żywicy *C. incanus*. (1) sklareol; (2) labd-13(E)-en-8 α -15-diol; (3) octan labd-13(E)-en-8 α -ol-15-yłu; (4) labd-7,13(E)-dien-15-ol; (5) octan labd-7,13(E)-dien-15-yłu; (6) tlenek 3 β -hydroksy-13-epi-manoilu; (7) tlenek 3 β -acetoksy-13-epi-manoilu; (8) izomery tlenku manoilu (tlenek 13-epi-manoil **8a**; tlenek manoilu **8b**; tlenek 8-epi-manoyl **8c**).

2.2 Polifenole

Polifenole są obszerną grupą roślinnych metabolitów wtórnych o mocno zróżnicowanej budowie, masie cząsteczkowej i właściwościach chemicznych, biologicznych i fizycznych. Substancje te, są wytwarzane przez rośliny m.in. w celach obronnych lub w odpowiedzi na czynniki stresowe (jony metali ciężkich, szok cieplny, promieniowanie UV, infekcje bakteryjne i grzybowe) [60]. Ogólnie, związki fenolowe możemy zdefiniować, jako hydroksylowe pochodne węglowodorów aromatycznych. Przeważnie w związkach tych obok ugrupowania fenolowego występują inne grupy funkcyjne (np. grupa karboksylowa w fenolokwasach lub karbonylowa we flawonach). Biorąc pod uwagę budowę szkieletu węglowego można wśród polifenoli wyróżnić cztery główne grupy związków [60]–[62]:

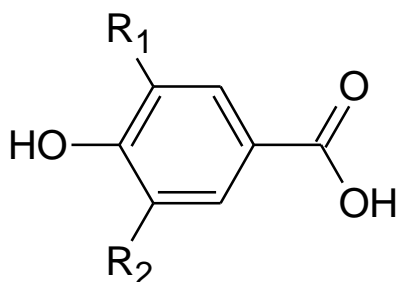
- kwasy fenolowe;
- flawonoidy;
- stilbeny;
- lignany.

Gatunek *C. incanus* uznawany jest za bogate źródło polifenoli, które determinują część wykazywanych przez tą rośliną właściwości biologicznych. Oszacowana metodą Folina-Ciocalteu'a (F-C) całkowita zawartość fenoli (TPC, ang. *Total Phenolic Content*) w ekstraktach *C. incanus* w przeliczeniu na kwas galusowy różni się w zależności od użytego ekstrahenta i mieści się w zakresie od 46 do 258 mg·g⁻¹ suchej próbki [63], [64].

2.2.1 Kwasy fenolowe

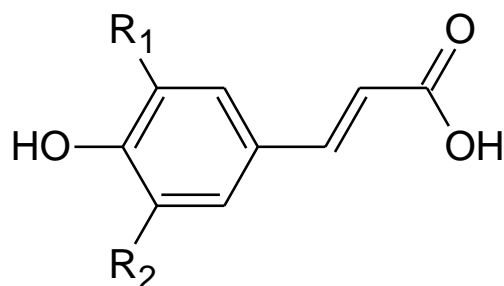
Kwasy fenolowe (fenolokwasy) są związkami posiadającymi w swojej strukturze fenolową grupę hydroksylową i grupę karboksylową. Największe znaczenie mają hydroksylowe pochodne kwasu benzoowego (Rys. 8a) i cynamonowego (Rys. 8b). W roślinach częściej niż w postaci wolnej występują one w formie związanej, tworząc połączenia z innymi związkami posiadającymi grupy hydroksylowe, najczęściej z cukrami (glikozydy) oraz kwasami fenolowymi (depsydy) [65], [66].

a)



kwasy hydroksybenzoesowe

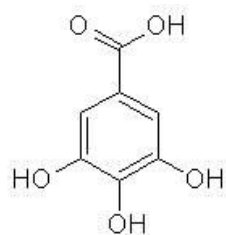
b)



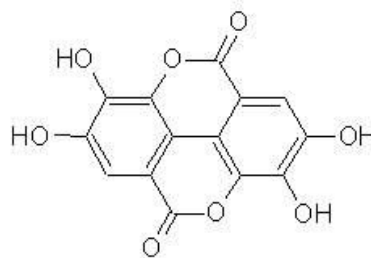
kwasy hydroksycynamonowe.

Rys. 8. Podstawowe struktury kwasów fenolowych występujących w przyrodzie [67].

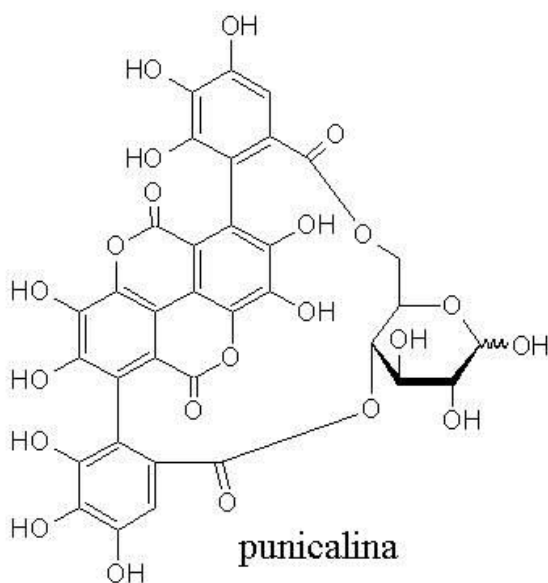
Szacowana farmakopealną metodą, całkowita zawartość kwasów fenolowych (TPAC, ang. *Total Phenolic Acid Content*) w wodnych i wodno-metanolowych ekstraktach *C. incanus* w przeliczeniu na kwas kawowy oscyluje w zakresie od 5 do 20 mg·g⁻¹ suchej próbki [64]. Głównymi kwasami fenolowymi obecnymi w czystku szarym i jego podgatunkach są: kwas galusowy oraz jego pochodne (heksahydroksydifenoilo-glukoza oraz kwas elagowy) (Rys. 9) [22], [49], [64], [68]–[72]. Kwas elagowy jest didepsydem kwasu galusowego, którego cząsteczki połączone są wiązaniem C-C oraz dwoma symetrycznymi wiązaniami estrowymi (laktonowymi). Oba kwasy są głównymi składnikami licznych tanin hydrolizujących, nazywanych odpowiednio galotaninami i elagotaninami. Znaczna obecność elagotanin, takich jak izomery punicaliny i punicalaginy została wykryta w wodnych i wodno-metanolowych ekstraktach czystka [71], [72]. Oprócz wymienionych związków należących do hydroksylowych pochodnych kwasu benzoowego, w zielu czystka zidentyfikowano również kilka pochodnych kwasu cynamonowego, m.in.: kwas kawowy, *p*-kumarowy i ferulowy [64], [71].



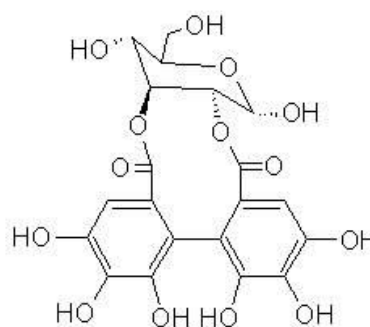
kwas galusowy



kwas elagowy



punicalina

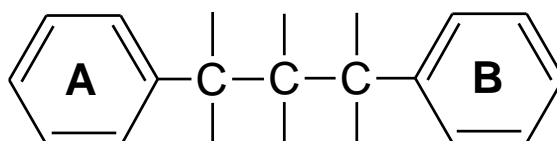


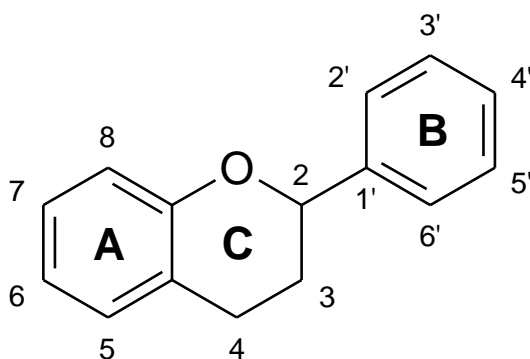
heksahydroksydifenoilo-glukoza

Rys. 9. Wybrane kwasy fenolowe i ich pochodne glikozydowe zidentyfikowane w *C. incanus*.

2.2.2 Flawonoidy

Flawonoidy stanowią dużą grupę metabolitów wtórnych o charakterze polifenoli, które pełnią zróżnicowane funkcje biologiczne w roślinach. Podstawowym elementem strukturalnym tych związków jest piętnastowęglowy szkielet diarylopropanu układający się w ugrupowanie C₆-C₃-C₆, przy czym u większości flawonoidów między pierścieniami aromatycznymi A i B powstaje układ heterocykliczny C, w skład którego wchodzi atom tlenu (Rys. 10).





Rys. 10. Podstawowa struktura flawonoidu: **A** – pierścień benzenowy, **B** – pierścień fenyłowy, **C** – pierścień piranowy.

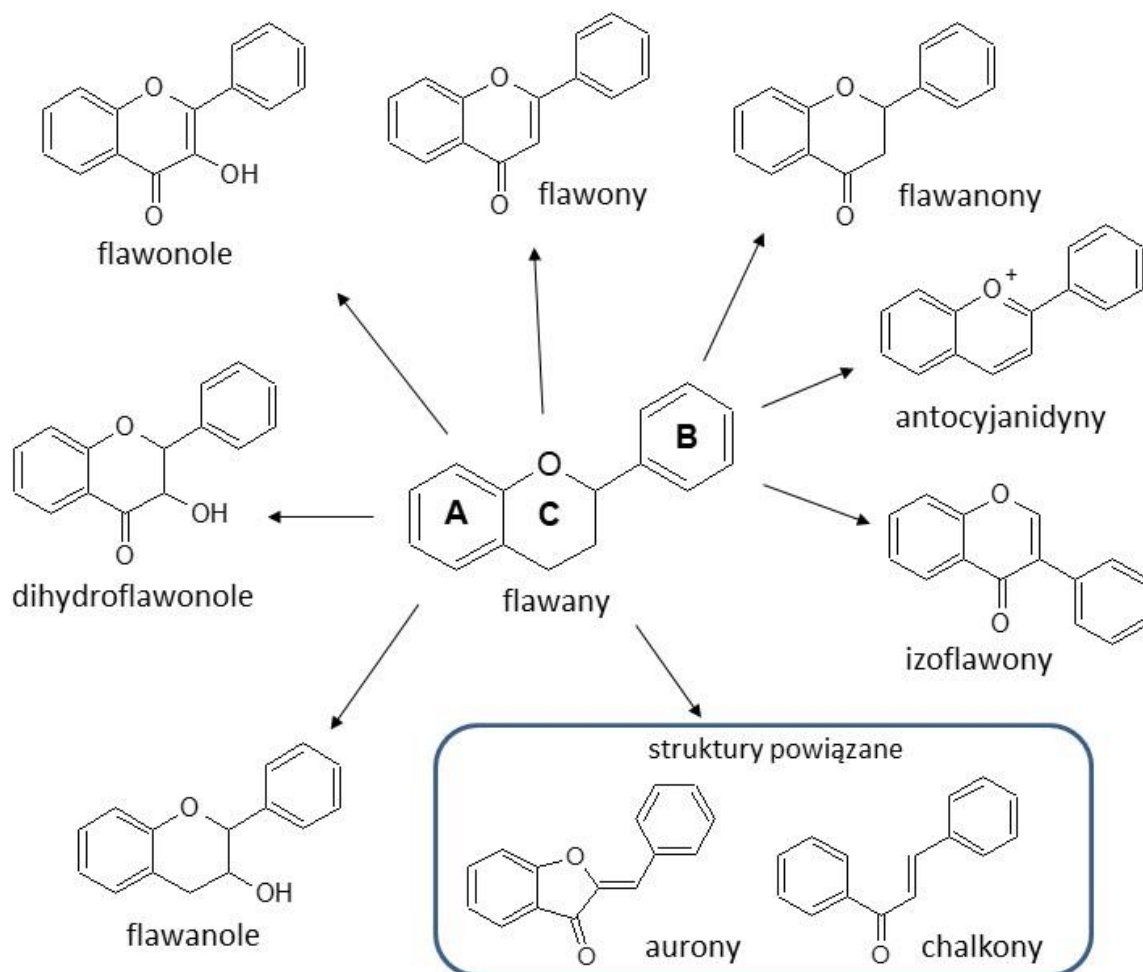
Obecnie szacuje się, że liczba znanych flawonoidów przekracza 6000 [73], przy czym grupa ta stale powiększa się o nowo odkryte związki. Klasyfikacja flawonoidów odbywa się na podstawie różnic w ich budowie chemicznej, która może dotyczyć np.[73]–[75]:

- stopnia utlenienia pierścienia C;
- miejsca podstawienia pierścienia fenyłowego B;
- liczby i rozmieszczenia grup hydroksylowych w pierścieniach;
- typu wiązania glikozydowego (np. O- lub C-glikozydy);
- liczby przyłączonych cząsteczek cukrów;
- występowania układów oligomerycznych.

Wyszczególniamy wśród nich takie klasy związków jak: flawony, izoflawony, flawonole, dihydroflawonole, flawany, izoflawany, flawanole (katechiny i proantocyjanidyny), flawanony, antocyjanidyny, chalkony, aurony (Rys. 11). Opisane różnice w budowie chemicznej i rozmieszczeniu podstawników w znaczny sposób determinują właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne tych związków.

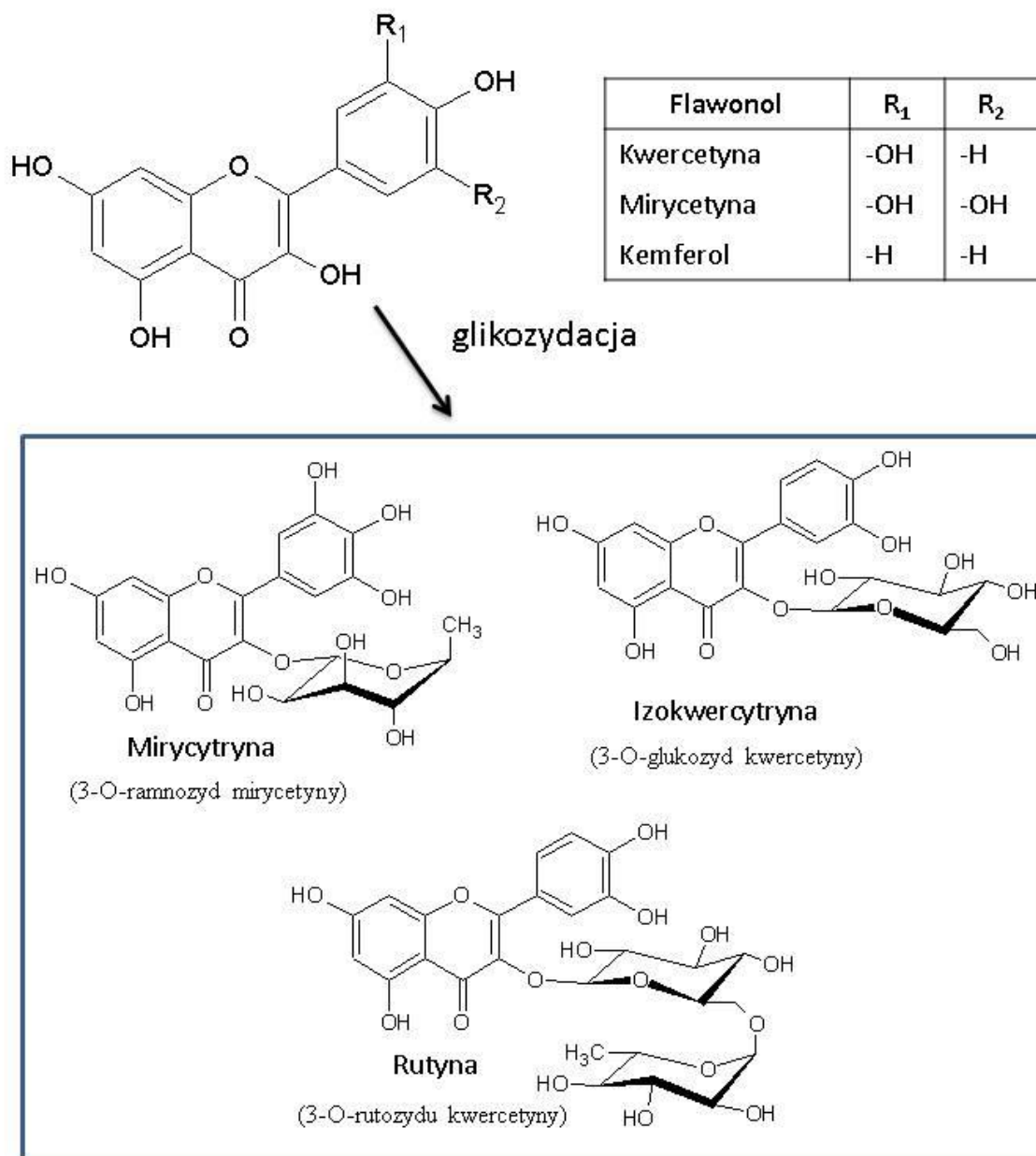
Flawonoidy występują w przyrodzie nie tylko jako wolne cząsteczki (aglikony), lecz także – i to znacznie częściej, jako glikozydy. W zależności od postaci, w jakiej występują, wykazują różną rozpuszczalność. Wolne flawonoidy są słabo rozpuszczalne w wodzie, ale na ogół dobrze rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych. Przyłączenie do aglikonu cząsteczki cukru zwiększa polarność tych związków, dlatego postać glikozydowa znacznie lepiej rozpuszcza się w wodzie i alkoholu etylowym, słabo rozpuszcza się natomiast w eterze, chloroformie i benzenie. Składnikami cukrowymi glikozydów są cukry proste (pentozy, heksozy) lub cukry złożone (głównie w postaci

disacharydów). Glikozydy pod działaniem kwasów ulegają rozpadowi na odpowiedni cukier (glikon) oraz aglikon flawonoidu [74], [76].



Rys. 11. Podstawowe struktury flawonoidów.

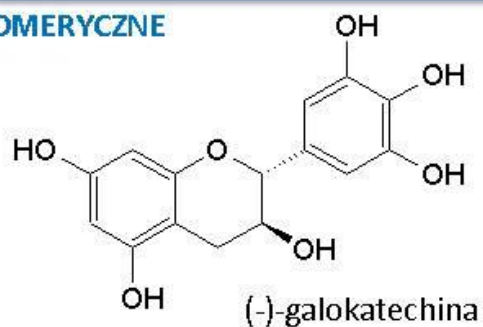
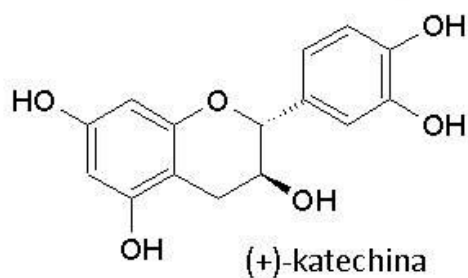
Głównymi klasami flawonoidów występującymi w gatunku *C. incanus* są: flawonole oraz flavanole. Zidentyfikowane zostały zarówno wolne cząsteczki flawonoli (mirycetyna, kwercetyna i kemferol), jaki i ich liczne formy glikozydowe, które stanowią dominującą postać występowania tych związków (Rys. 12) [22], [49], [64], [68]–[72], [77]. Obecność dużej ilości flawonoli nie może dziwić, ze względu na występujące w klimacie śródziemnomorskim intensywne nasłonecznienie. Związki te w szczególności są gromadzone w zewnętrznych partiach tkanek liści i skórce owoców, ponieważ ich synteza zachodzi z udziałem światła. Metabolity te są zdolne do absorpcji dużych ilości promieniowania UV, przez co jedną z ich funkcji jest ochrona roślin przed jego działaniem [67].



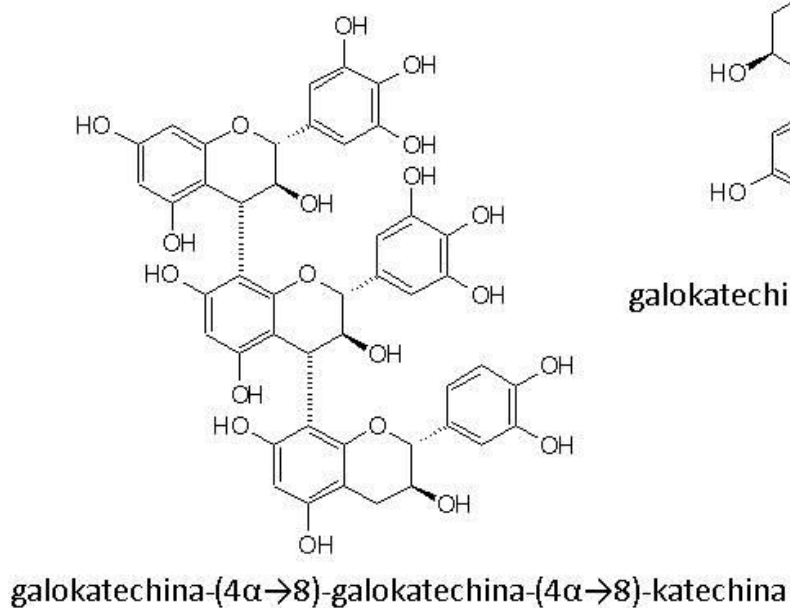
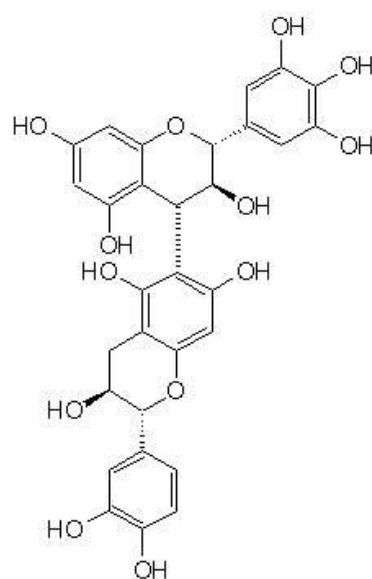
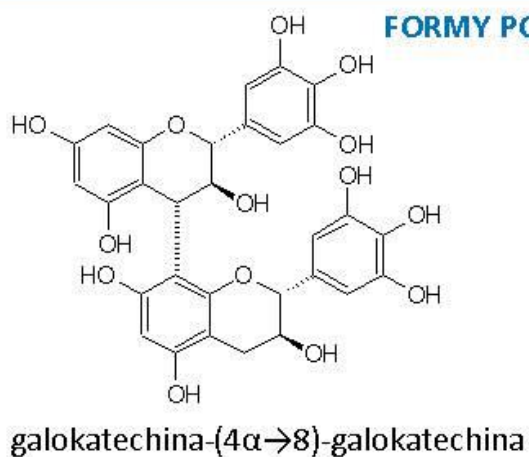
Rys. 12. Główne flawonole oraz ich wybrane formy glikozydowe występujące w *C. incanus*.

Druga klasa związków (flawanole) występuje głównie jako aglikony w formach monomerycznej i spolimeryzowanej. W formie monomerycznej flawan-3-ole są nazywane katechinami, natomiast w formie spolimeryzowanej występują, jako taniny niehydrolizujące (proantocyjanidyny). Spośród monomerów flawanoli w czystku występują głównie (+)-katechina i (-)-galokatechina, natomiast grupa proantocyjanidyn zdominowana jest przez dimeryczne prodelfinidyny [78], [79]. Na Rys. 13 przedstawione zostały wybrane flawanole zidentyfikowane w *C. incanus* i jego podgatunkach.

FORMY MONOMERYCZNE



FORMY POLIMERYCZNE



Rys. 13. Struktury chemiczne wybranych flawanoli zidentyfikowanych w *C. incanus*.

3. WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE GATUNKU *C. INCANUS* L.

3.1 Właściwości antyoksydacyjne

Przeciwutleniacze mają ogromne znaczenie ze względu na ich zdolność do ochrony przed szkodliwym działaniem wolnych rodników. Narażenie komórek na długotrwałe i wzmożone działanie wolnych rodników może powodować uszkodzenie DNA, co z kolei prowadzi do różnego rodzaju mutacji i powstania chorób nowotworowych. Skutkiem nadmiernego oddziaływania wolnych rodników są również choroby ośrodkowego układu nerwowego (choroba Parkinsona, Alzheimer), schorzenia układu pokarmowego, cukrzyca, miażdżyca oraz ogólne starzenie się organizmu [80]. Medycyna współczesna radzi sobie z powstającymi schorzeniami poprzez zastosowanie terapii z wykorzystaniem syntetycznych leków. Leki chemiczne mają silne działanie, ale ich długotrwałe stosowanie w leczeniu chorób przewlekłych może wykazywać różne i ciężkie skutki uboczne. Dlatego zintensyfikowane prace badawcze skupiają się na odkryciu i wykorzystaniu naturalnych środków antyoksydacyjnych, które charakteryzuje znacznie lepsza przyswajalność przez organizmy.

Rośliny występujące w ekosystemach śródziemnomorskich, takie jak *Cistus incanus* są narażone na wiele czynników stresogennych, szczególnie w okresie letnim, kiedy niedobór wody współwystępuje z wysokim natężeniem promieniowania słonecznego i wysokimi temperaturami. Te czynniki środowiskowe wywołują silny stres fotooksydacyjny w roślinach, powodując powstawanie wielu reaktywnych form tlenu (RFT). W toku ewolucji rośliny te wykształciły mechanizmy obronne, pozwalające na obniżenie zawartości wolnych rodników w komórkach. Jedną z form odpowiedzi rośliny na czynniki stresogenne jest wytwarzanie dużej ilości związków o właściwościach antyoksydacyjnych [69], [80]–[82]. Uzasadnia to poszukiwania wśród gatunków śródziemnomorskich roślin mogących stać się ważnym źródłem przeciwutleniaczy o potencjale farmaceutycznym.

Badania prowadzone na ośmiu różnych libijskich gatunkach roślin, w tym na *C. incanus* wykazały zdolność ich ekstraktów do zmiatania wolnych rodników w teście DPPH. Potencjał antyoksydacyjny metanolowego ekstraktu otrzymanego z naziemnych części *C. incanus* ($17,75 \pm 1,5$ IC₅₀ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) był porównywalny z wartościami potencjału antyoksydacyjnego oznaczonymi dla takiego przeciwutleniacza, jakim jest kwas askorbinowy ($15,35 \pm 1,4$ IC₅₀ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Udokumentowane zostały również umiarkowane

właściwości przeciwutleniające wykazywane przez wyciąg z tej rośliny, otrzymany przy użyciu octanu etylu ($329,1 \pm 8,2$ IC₅₀ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Heksanowe ekstrakty żadnego z badanych gatunków nie wykazywały w badanym zakresie stężeń zdolności do wymiatania wolnych rodników [83].

Ocenie poddano również frakcje lotnych związków obecnych w liściach *C. incanus*. Analiza wyników uzyskanych z zastosowaniem chemicznych metod oznaczania zdolności przeciwutleniającej takich, jak DPPH, ABTS czy FRAP wykazała słabe właściwości przeciwutleniające otrzymanych w wyniku hydrodestylacji olejków eterycznych (DPPH \rightarrow 828-880 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (IC₅₀)) [52]. Wyniki tych dwóch grup badawczych pokazują niski wkład lipofilowych składników w główny profil antyoksydacyjny tej rośliny.

W innym badaniu porównana została zdolność wygaszania wolnych rodników DPPH przez 30% wodno-etanolowe wyciągi uzyskane z różnych naziemnych części rośliny (nasiona, pąki oraz mieszanina łodyg i liści), zbadano również wpływ sezonowości na uzyskiwaną zdolność przeciwutleniającą ekstraktów z liści. Badacze wykazali, że wszystkie badane naziemne części rośliny posiadają potencjał przeciwutleniających, przy czym najwyższym potencjałem charakteryzują się liście i łodygi, a najniższym nasiona. Co ważne, wysoka aktywność przeciwutleniająca widoczna była zarówno dla liści zebranych zimą, jak i latem, przy 25% wyższej aktywności liści letnich. Wykazany potencjał antyoksydacyjny wodno-etanolowych ekstraktów był dobrze skorelowany z całkowitą zawartością składników fenolowych TPC oraz flawonoidów (TFC, ang. *Total Flavonoid Content*) [63].

Podobną korelację pomiędzy parametrami opisującymi całkowitą zawartość związków fenolowych a właściwościami przeciwutleniającymi czystka zaobserwowano dla piętnastu różnych preparatów handlowych *C. incanus*. Działanie antyoksydacyjne wodnych i wodno-metanolowych ekstraktów próbek oceniano przy pomocy testów DPPH i FRAP. Badane próbki w obu testach wykazały znaczące różnice we właściwościach przeciwutleniających, czego główna przyczyna upatrywana jest przez autorów w pochodzeniu próbek [64].

Analiza trzech fenolowych frakcji (octanu etylu i dwóch frakcji wodnych) uzyskanych z 70% wodno-etanolowego ekstraktu liści pokazała, że głównymi składnikami odpowiadającymi za właściwości przeciwrodnikowe ekstraktu są flawonole i flawanole zawarte we frakcji octanu etylu. Obecne we frakcjach wodnych

proantocyjanidyny (o różnym stopniu polimeryzacji) nie miały istotnego wpływu na mierzoną metodą DPPH aktywność przeciwutleniającą surowego ekstraktu [69].

Riehel i wsp. [22] przeprowadzili badanie mającą na celu ocenę zdolności antyoksydacyjnej poszczególnych substancji fenolowych zawartych w wodnym ekstrakcie *C. incanus*. Dzięki zastosowaniu techniki LC-DAD/ESI-MS/MS zidentyfikowano trzydzieści dwa związki fenolowe, a następnie metodą LC-onlineTEAC substancjom tym przypisywano wartości potencjału antyoksydacyjnego. Najwyższe wartości TEAC zmierzono dla mirycytryny (3-O-ramnozyd mirycetyny), heksahydroksydifenoilo-glukozy, kwasu galusowego, katechiny i galokatechiny. Te pięć substancji pochodzi z różnych podklas związków fenolowych. Co ważne, związki występujące w stosunkowo małej ilości mogą przyczyniać się do dużej części całkowitej aktywności przeciwutleniającej rośliny. Co za tym idzie, niewielki różnice w zawartości tych związków mogą w dużym stopniu przekładać się na końcowy efekt antyoksydacyjny wyciągu.

3.2 Właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze

Liczne badania dotyczące aktywności przeciwbakteryjnej oraz przeciwgrzybiczej składników lotnej frakcji *C. incanus* L. przeprowadzone zostały przez zespół naukowców z Wydziału Farmacji Uniwersytetu Narodowego im. Kapodistriasa w Atenach (Grecja) [53], [57], [84]–[89]. Badane przez nich olejki eteryczne oraz niepolarne ekstrakty uzyskiwane z naziemnych części roślin dwóch podgatunków (*C. creticus* ssp. *eriocephalus* oraz *C. creticus* ssp. *creticus*) wykazywały bardzo słabą aktywność przeciwko Gram-ujemnym szczepom bakterii oraz znacznie wyższą w stosunku do bakterii Gram-dodatnich. Aktywność ta była najwyższa dla szczepów: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* i *Bacillus subtilis* [53], [84], [85], [87]. Warto zwrócić uwagę, że heksanowy ekstrakt owoców czystka wykazywał słabszą aktywność przeciwbakteryjną niż analogiczny ekstrakt otrzymany z liści tej rośliny [87]. Udokumentowany został również szeroki potencjał antybakteryjny żywicy labdanum oraz części wyizolowanych z niej diterpenów typu labdanu [57], [88], [89]. Surowy dichlormetanowo-metanolowy (50:50, v/v) ekstrakt żywicy hamował wzrost nie tylko Gram-dodatnich bakterii *S. aureus*, ale również takich Gram-ujemnych bakterii jak: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter anitratus*, *Proteus mirabilis*. W badaniu tym potwierdzono także aktywność antybakteryjną 5 wyizolowanych z żywicy diterpenów, wśród których (labd-7,13(E)-dien-15-yl)-kwas malonowy wykazywał znaczną aktywność wobec wszystkich badanych szczepów [88]. Eksperyment przeprowadzony z trzema Gram-dodatnimi szczepami bakterii udowodnił również aktywność antybakteryjną takich składników żywicy jak sklareol oraz tlenek 3 β -hydroksy-13-epi-manoilu [57]. W innym badaniu przeprowadzonym przez naukowców z Uniwersytetu Ateńskiego oceniony został potencjał przeciwdrobnoustrojowy 6 naturalnych diterpenów wyizolowanych z żywicy i naziemnych części rośliny *C. incanus* oraz ich 15 półsyntetycznych pochodnych. Badane związki stanowiły pochodne labd-7,13(E)-dien-15-olu (10 związków) oraz labd-13(E)-en-8 α -15-diolu (11 związków). Aktywność przeciwdrobnoustrojowa powyższych związków sprawdzana była zarówno przeciw Gram-dodatnim, jak i Gram-ujemnym bakteriom, a także przeciw patogennym grzybom. Wśród naturalnych diterpenów ponownie najbardziej zróżnicowany potencjał przeciwbakteryjny obserwowany był dla (labd-7,13(E)-dien-15-yl)-kwasu malonowego. Innym godnym uwagi bioaktywnym składnikiem żywicy był labd-13(E)-en-8 α -15-diol, który jako jedyny

z 6 badanych naturalnych diterpenów wykazał potencjał przeciwwgrzybiczy wobec 2 z 3 badanych szczepów grzybów. Co ważne, aktywność przeciwdrobnoustrojowa badanych związków była porównywalna z tą otrzymaną dla standardowych antybiotyków. Wśród półsyntetycznych diterpenów najsilniejszym działaniem przeciwdrobnoustrojowych charakteryzowały się dwie pochodne, będące estrem kwasu chloroetylo-karbaminowego [89].

Właściwości przeciwbakteryjne oraz przeciwwgrzybicze gatunku *Cistus incanus* zostały udokumentowane również przez inne grupy badawcze. W badaniach *in vitro* prowadzonych na ekstraktach z liści i owoców różnych gatunków *Cistus* L. (w tym ziela *C. incanus*) oceniano aktywność przeciwdrobnoustrojową przeciw kilku szczepom bakterii oraz grzybów [30], [90]. Testowano ekstrakty oraz frakcje ekstraktów otrzymane przy pomocy takich rozpuszczalników, jak woda, metanol, chloroform, heksan, octan etylu oraz *n*-butanol. Najwyższą inhibicją wzrostu drobnoustrojów charakteryzował się gatunek *C. incanus*, w szczególności frakcja *n*-butanolowa, która wykazała aktywność wobec większości badanych mikroorganizmów. Aktywność ta była znaczna przeciwko bakteriom Gram-dodatnim i stosunkowo słaba wobec bakterii Gram-ujemnych oraz drożdży (wyjątek stanowiła *Candida glabrata*, przeciwko której ekstrakty wykazywały bardzo silne właściwości przeciwwgrzybicze [30]). Aktywność wyciągów sporządzonych z liści była większa od tej otrzymanej dla ekstraktów z owoców czystka [90].

Badania *in vitro* potwierdziły również działanie przeciwbakteryjne preparatów roślinnych *C. incanus* w stosunku do bakterii *Borrelia burgdorferi*. Analizie poddano olejek eteryczny oraz ekstrakty o różnej polarności (wodny, octanu etylu, heksanowy), otrzymane z liści czystka. Porównanie aktywności tych czterech preparatów roślinnych na bazie czystka wykazało, że olejek eteryczny charakteryzuje się najsilniejszym efektem hamowania wzrostu bakterii *B. burgdorferi*. Olejek eteryczny o stężeniu w pożywce hodowlanej równym 0,02% (w/v) po ośmiodniowym okresie hodowli ograniczył wzrost bakterii do 2% w stosunku do próby kontrolnej. Inkubacja z ekstraktami heksanu i octanu etylu również hamowała wzrost drobnoustrojów, podczas gdy wodny ekstrakt nie wykazywał właściwości hamujących [91].

Właściwości przeciwbakteryjne i przeciwwgrzybicze ziela *C. incanus* wykazano również na podstawie analizy aktywności przeciwdrobnoustrojowej wodnych ekstraktów otrzymanych z dostępnych na polskim rynku próbek handlowych czystka. W badaniu tym użyto siedmiu szczepów bakterii Gram-dodatnich i trzech Gram-ujemnych oraz dwóch szczepów grzybów. Na podstawie otrzymanych wyników zaobserwowano, że ekstrakty

wykazywały większą aktywność przeciwbakteryjną niż przeciwgrzybiczą. Wśród szczepów bakterii ekstrakty wodne wykazywały silniejszą aktywność przeciwbakteryjną wobec bakterii Gram-dodatnich, głównie *S. aureus* i *S. epidermidis* [64].

Dodatkowe eksperymenty *in situ* prowadzone przez Hanniga i wsp. wykazały, że płukanie jamy ustnej naparem *C. incanus* ogranicza ilość bakterii na powierzchni szkliwa zębów, powodując także zmniejszenie początkowej adhezji bakteryjnej [92], [93].

3.3 Właściwości cytotoksyczne

Badania przeprowadzone na hodowanych *in vitro* roślinach *C. incanus* udowodniły działanie cytotoksyczne tego gatunku. Wykazano, że etanolowe ekstrakty pędów (bogate w diterpeny labdanum) z hodowli *in vitro* powodują zahamowanie rozwoju linii komórkowych raka szyjki macicy (HeLa), raka piersi (MDA-MB-453) oraz czerniaka (FemX). Ekstrakty korzeni z tej hodowli nie wykazywały właściwości cytotoksycznych wobec żadnej linii komórek nowotworowych. Fakt ten powiązany został z zaobserwowanym brakiem w ekstrakcie korzeni diterpenów typu labdanu, którym z tego powodu przypisano zdolność hamowania proliferacji komórek nowotworowych [21], [35].

Szeroko zakrojone badania aktywności cytotoksycznej i przeciwnowotworowej bioaktywnych, wysoce lipofilowych i naturalnie wytwarzanych diterpenów typu labdanu przeprowadzone zostały w zespole greckich i amerykańskich badaczy. Poddawane licznym testom diterpeny otrzymano z żywicy labdanum oraz z naziemnych części *C. incanus*. Większość badanych związków okazała się aktywna biologicznie [36], [94]–[103]. Do związków o największej i najbardziej zróżnicowanej aktywności przeciwnowotworowej zaliczyć można: sklareol, labd-7,13(E)-dien-15-ol, labd-13(E)-en-8 α ,15-diol oraz jego pochodną octanową (octan labd-13(E)-en-8 α -ol-15-yl). Jedno z pierwszych badań *in vitro*, prowadzone pod kątem hamowania proliferacji linii komórkowych KB, P-388; NSCLC-N6 ukazało wysoką aktywność cytotoksyczną octanu labd-13(E)-en-8 α -ol-15-ylu, sklareolu i 13-epi-sklareolu oraz umiarkowaną labd-7,13(E)-dien-15-olu, tlenku manoilu, tlenku 13-epi-manoilu [84]. Ocena cytotoksyczności wobec 3 innych hodowanych linii komórkowych (RAJI, MOLT3, H9) pokazała potencjał antynowotworowy pięciu z sześciu testowanych diterpenów wyizolowanych z czystka, w tym labd-7,13(E)-dien-15-olu, oraz labd-13(E)-en-8 α ,15-diolu. Jedyńm nieaktywnym związkiem w tym badaniu okazał się tlenek 13-epi-manoilu [100]. Czysty tlenek 13-epi-manoilu oraz mieszaniny izomerów tlenku manoilu powodowały natomiast zahamowanie wzrostu u kilku innych linii komórek białaczkowych. Najwyższe, 32% zahamowanie wzrostu komórek obserwowane było dla linii CCRF-CEM [94]. Wyraźny efekt hamujący wzrost i działanie cytotoksyczne labd-13(E)-en-8 α ,15-diolu oraz jego octanowej pochodnej został udowodniony w badaniach *in vitro* na licznej grupie linii komórkowych ludzkiej białaczki [96], [101]. Jedyną różnicą strukturalną między tymi związkami (obecność grupy acetylowej na

węgłu C-13) nie wpłynęła znacząco na aktywność tych związków, oba związki wykazywały podobną aktywność wobec testowanych linii [101]. W badaniach *in vitro* udowodniono również, że sklareol indukuje apoptozę linii komórek białaczkowych T [97]. Opisano wpływ sklareolu na ludzkie linie komórkowe raka piersi MN1 i MDD2. Analiza cyklu komórkowego i proliferacji komórkowej wykazały, że stosowanie sklareolu prowadzi do zahamowania wzrostu w fazie G1/S i późniejszej indukcji apoptozy komórek. Oba efekty były niezależne od p53. Ponadto sklareol zwiększył aktywność znanych leków przeciwnowotworowych (doksorubicyny, etopozydu i cisplatyny) przeciwko linii komórkowej raka piersi MDD2 [98].

Pomimo wykazanej znaczącej aktywności farmakologicznej diterpenów typu labdanu obserwowanej w testach *in vitro*, dalsze stosowanie *in vivo* było utrudnione ze względu na ich słabą rozpuszczalność w wodzie. W celu poprawienia ich rozpuszczalności w środowisku wodnym zostały zaprojektowane i opracowane preparaty liposomalne, umożliwiające przeprowadzenie testów *in vivo*. Porównano również aktywność cytotoksyczną/cytostatyczną wolnych związków i ich liposomalnych preparatów wobec różnych linii ludzkich komórek nowotworowych [36], [95], [102]. Po zamknięciu labd-7,13-dien-15-olu w liposomach stwierdzono, że otrzymany liposomalny preparat związku wykazuje identyczną aktywność wobec tych samych badanych komórek nowotworowych, co jego wolna postać. Aktywność ta była szczególnie widoczna w stosunku do komórek DMS114 [36]. Wyniki porównania wolnej i liposomalnej postaci labd-13(E)-en-8 α ,15-diolu, octanu labd-13(E)-en-8 α -ol-15-ylu oraz sklareolu wykazały zmiany aktywności przeciwnowotworowej dla większości testowanych linii. Mimo wszystko preparat liposomalny octanowej pochodnej i sklareolu zachował aktywność hamowania wzrostu (GI₅₀) wobec wszystkich testowanych linii komórkowych, w przeciwieństwie do preparatu liposomalnego labd-13(E)-en-8 α ,15-diolu, którego efekt był ograniczony do niektórych linii komórkowych [95], [102]. Porównując otrzymane wyniki można stwierdzić, że linia HC116 jest jedyną, dla której we wszystkich czterech przypadkach postać liposomalna poprawiała wartości parametrów opisujących właściwości przeciwnowotworowe związków.

Zdolność przeciwnowotworową sklareolu oceniano *in vivo* na mysim modelu heteroprzeszczepu raka jelita grubego. Wyniki *in vivo* były zgodne z badaniami na hodowlach komórkowych. Podawanie dootrzewnowe sklareolu otoczonego liposomami w maksymalnej tolerowanej dawce powodowało wyraźne zahamowanie wzrostu guzów HCT116 (p53^{-/-}), utworzonych jako heteroprzeszczepy u myszy NOD/SCID. Zwierzęta te

są pozbawione funkcjonalnych limfocytów T i B, co znacznie obniża ich możliwość reakcji immunologicznej. Pozwala to na wszczepianie komórek pochodzących od innych gatunków, bez ryzyka ich odrzucenia i zniszczenia przez układ odpornościowy. Ustalono, że cytotoksyczne działanie sklareolu oparte jest na indukowaniu zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1, po której następuje apoptoza, obejmująca aktywację kaspaz przez mechanizm niezależny od p53. Wyniki te sugerują, że sklareol w kapsułkach liposomowych ma potencjał chemioterapeutyczny w leczeniu raka jelita grubego i innych rodzajów raka u ludzi, niezależnie od statusu p53 [103].

Przeprowadzony przez inny zespół badawczy eksperyment pokazał, że liofilizowane ekstrakty wodne (teoretycznie nie zawierające lipofilowych diterpenów) otrzymane z naziemnych części roślin *Cistus incanus* wykazały właściwości cytotoksyczne względem komórek raka prostaty (PZ-HPV-7 i PNT1A) i linii komórkowej fibroblastów płuc (V79-4). W tym przypadku, właściwości te przypisane zostały zawartym w roślinie flawonoidom [104].

3.4 Inne właściwości

Oprócz wspomnianych wcześniej właściwości gatunku *C. incanus* udokumentowane zostały przez różne zespoły badawcze także inne właściwości lecznicze tej rośliny.

Wyciągi z czystka wykorzystywane było między innymi w tradycyjnej bliskowschodniej medycynie, jako środki spazmolytyczne w leczeniu biegunek i zaburzeń trawienia. Udowodniono, że wodne ekstrakty czystka w warunkach *in vitro* działają rozkurczająco na wyizolowane mięśnie gładkie jelit i aorty [105].

Testy na szczurach dowiodły, że wodny ekstrakt *C. incanus* chroni błonę śluzową żołądka przed zmianami wywołanymi przez różne środki uszkadzające śluzówkę żołądka. Zmiany patologiczne wywoływano przy użyciu związków takich jak: kwas solny, etanol, indometacyna, serotonina oraz rezerpina. W badaniu wykazano efekt gastroochronny dla wszystkich badanych modeli eksperymentalnych [106].

Wyniki innych badań wykazały, że olejki eteryczne z różnych gatunków *Cistus*, w tym *C. incanus* (autor podaje nazwy *C. villosus* i *C. creticus*), posiadają działanie hamujące aktywność acetylocholinoesterazy i/lub butyrylocholinesterazy. Hamowanie działania tych enzymów może być przydatne w zapobieganiu i leczeniu choroby Alzheimera [52].

Wodne ekstrakty podgatunku *Cistus incanus* L. *ssp. incanus* wykazują zależną od dawki regulację wzrostu, żywotności i uwalniania cytokin przez ludzkie leukocyty. Powodując normalizację ilości komórek układu odpornościowego oraz odpowiedzi immunologicznej, prowadzącą do zmniejszenia uszkodzeń wywołanych nadmierną odpowiedzią immunologiczną i przyspieszeniem proces leczenia. Może to wyjaśniać stosowanie w medycynie ludowej ekstraktów z czystka do leczenia różnych chorób zapalnych [107].

W badaniach z użyciem hodowli komórkowych oraz modelu zwierzęcego (myszy) wykazano, że handlowy preparat CYSTUS052 (Dr. Pandalis Urheimische Medizin GmbH & Co. KG, Niemcy) zawierający ekstrakt roślinny z specjalnie hodowanego podgatunku *C. incanus* wykazuje silną aktywność przeciw wirusom grypy A. Co ważne badane wirusy nie rozwinęły oporności na CYSTUS052 w przeciwieństwie do amantadyny, której stosowanie spowodowało wytworzenie odpornych mutantów zaledwie po kilku pasażach [108], [109]. Przeprowadzono również zrandomizowane i kontrolowane placebo badania kliniczne w których na grupie 160 pacjentów zbadano

wpływ preparatu CYSTUS052 na wspomaganie leczenia infekcji górnych dróg oddechowych. Dowiedziono, iż handlowy ekstrakt z *C. incanus* stanowi skuteczny czynnik redukujący średni czas trwania i poziom nasilenia objawów choroby. Ocena zaawansowania infekcji wynikała ze skali nasilenia objawów, takich jak: ból, kaszel (intensywność i częstotliwość), plwociny oraz katar. Czas, w którym w grupie stosującej lek następowała poprawa parametrów klinicznych był znacząco krótszy niż w grupie placebo [110].

W nowszych badaniach *in vitro* oceniano aktywność przeciwwirusową ekstraktów *Cistus incanus* przeciwko HIV i filowirusom. Udowodniono, że wykazują one szeroką aktywność hamującą wobec różnych izolatów HIV, w tym izolatu wirusa klinicznego z wieloma opornościami na konwencjonalne leki. Aktywność przeciwwirusowa ekstraktów czystka była widoczna również w stosunku do wirusa Ebola [111].

Ponadto przeprowadzono badania mające ocenić działanie przeciwprzywrotnikowe dziewiętnastu niepolarnych związków wyizolowanych z gatunku *Cistus monspeliensis* oraz *Cistus creticus* ssp. *creticus* oraz dwudziestu dziewięciu półsyntetycznych pochodnych tych naturalnych związków. Badane związki wykazały zróżnicowany potencjał w stosunku do *Leishmania donovani*. W przypadku związków wyizolowanych z *C. incanus* największym potencjałem przeciwprzywrotnikowym charakteryzowała się jedna z półsyntetycznych pochodnych labd-13(E)-ene-8 α ,15-diolu (wyniki porównywalne do otrzymanych dla pentamidyny) [112].

V. CEL PRACY

Celem niniejszej rozprawy było przeprowadzenie analizy składu chemicznego oraz ocena wybranych właściwości biologicznych handlowych próbek *Cistus incanus* L. różniących się pochodzeniem (Turcja, Albania, Grecja i nieznane położenie geograficzne) i sprzedawanych na Polskim rynku w formie suszu. Analiza składu obejmowała badania lotniej i nielotnej frakcji metabolitów wtórnych pochodzących z naziemnych części roślin *C. incanus* L. Ocena aktywności biologicznej skupiona była na właściwościach antyoksydacyjnych, przeciwbakteryjnych i przeciwnowotworowych frakcji fenolowej tej rośliny.

Kolejnym założeniem realizowanym w ramach celu pracy było opracowanie procedur analitycznych opartych o techniki chromatograficzne, służących do analiz składu chemicznego oraz oznaczania aktywności biologicznej (bioprofilowania) próbek handlowych *C. incanus*. Przy realizacji tego celu główna uwaga skoncentrowana była na zaproponowaniu kompleksowego podejścia bazującego na technice chromatografii cienkowarstwowej (TLC) połączonej z odpowiednimi testami aktywności biologicznej (antyoksydacyjnej i antybakteryjnej), służącego do szybkiego przesiewowego badania aktywnych składników obecnych w złożonej matrycy roślinnej oraz ich późniejszej identyfikacji.

VI. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. APARATURA I ODCZYNNIKI

Poniżej przedstawiono wykaz sprzętu użytego podczas przeprowadzonych w niniejszej pracy badań:

- aparat cyfrowy Cybershot DSC-HX60 (Sony, Neu-Isenburg, Niemcy);
- aparat Derynga do destylacji z parą wodną (ChemLand, Stargard Szczeciński);
- aparat Soxhleta z chłodnicą kulkową (ChemLand, Stargard Szczeciński);
- automatyczny aplikator do TLC Linomat IV (CAMAG, Muttenz, Szwajcaria);
- chromatograf cieczowy z detekcją masową z pojedynczym kwadrupolem (model LC-MS-2020, Shimadzu, Kyoto, Japonia) wyposażony w binarną pompę gradientową, odgazowywacz, autosampler, detektor spektrofotometryczny z matrycą diodową, analizator mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie (ESI ang. Electrospray ionization) oraz oprogramowanie LabSolutions 5.72v (Shimadzu, Kyoto, Japonia);
- chromatograf gazowy Trace 2000 (kolumna kapilarna TG-35MS 30 m x 0,35 mm x 0,25 μ m) sprzężony z detektorem mas MS Trace (Thermo Quest, Waltham, MA, USA), wyposażony w autosampler Combi PAL (CTC, Basel, Szwajcaria), który pracuje także w trybie *head-space*, z oprogramowaniem X-Calibur i biblioteką widm masowych NIST (ang. *National Institute of Standards and Technology*, Gaithersburg, MD, USA);
- ciśnieniowy ekstraktor rozpuszczalnikowy ASE 200 (Dionex, Sunnyvale, Kalifornia, USA);
- densytometr skaningowy C60 (Desaga, Heidelberg, Niemcy), wyposażony w program ProQuant (Desaga, Heidelberg, Niemcy);
- drobny sprzęt laboratoryjny;
- kalibrowane kapilary do nanoszenia próbek stosowane w chromatografii cienkowsarstwowej (CAMAG, Muttenz, Szwajcaria);
- kamera CCD IS-4000 (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA);
- komory chromatograficzne (CAMAG, Muttenz, Szwajcaria);
- koncentrator próżniowy SpeedVac ISS 100 (Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY, USA);
- lampa UV (CAMAG, Muttenz, Szwajcaria);
- magnetyczne mieszadło z funkcją grzania RCT basie (IKA, Staufen, Niemcy);

- mieszadło magnetyczne silnikowe MS11 (WIGO, Pruszków);
- pipety automatyczne od 10 do 1000 μl (Socorex, Ecublens, Szwajcaria);
- płaszcz grzewczy z regulacją mocy SXXW - 98IB (ChemLand, Stargard Szczeciński);
- rotacyjna wyparka próżniowa RV 10 digital V-C (IKA, Staufen, Niemcy);
- suszarka laboratoryjna model S-40 (Alpina, Polska);
- szklane fiołki z kapslami z membranami teflonowo - silikonowymi (Thermo Scientific, Waltham, MA);
- waga analityczna model SBC 31 (Scaltec, Heiligenstadt, Niemcy);
- waga laboratoryjna WXD 200/2000 (RADWAG, Radom);
- zestaw do oczyszczania wody Elix Advantage 3 System (Millipore, Molsheim, Francja).

Podczas przygotowywania i analizy próbek użyto następujących odczynników chemicznych o stopniu czystości cz.d.a., wyprodukowanych przez firmę POCH (Gliwice, Polska) lub Reanal (Budapeszt, Węgry):

- aceton ($\text{CO}(\text{CH}_3)_2$);
- bezwodny siarczan (VI) sodu (Na_2SO_4);
- borowodrek sodu (NaBH_4);
- chlorek glinu (AlCl_3);
- chlorek żelaza (III) (FeCl_3);
- chloroform (CHCl_3);
- dichlorometan (CH_2Cl_2);
- etanol (EtOH);
- eter dietylowy ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$);
- kwas mrówkowy (HCOOH);
- kwas octowy (CH_3COOH);
- kwas ortofosforowy (V) (H_3PO_4);
- kwas siarkowy (VI) (H_2SO_4);
- kwas solny (HCl);
- metanol (MeOH);
- *n*-butanol ($\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$);
- *n*-heksan (C_6H_{14});
- octan etylu (AcOEt);

- *o*-ksylen ($C_6H_4(CH_3)_2$);
- toluen ($C_6H_5CH_3$);
- węglan sodu (Na_2CO_3);
- wodorotlenek baru ($Ba(OH)_2$);
- wodorowęglan sodu ($NaHCO_3$).

Pozostałe odczynniki użyte do analizy:

- 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska);
- acetonitryl o czystości gradientowej (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA);
- anilina (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Niemcy);
- bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-1-tetrazoliowy (MTT) (Carl Roth, Karlsruhe, Niemcy);
- difenyloamina (DPA) (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Niemcy);
- kwas *p*-aminobenzoowy (PABA) (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Niemcy);
- boran 2-aminoetylodifenyloowy (NP, ang. *natural product reagent*) (Carl Roth, Karlsruhe, Niemcy);
- paraffina (zakupiona w aptece);
- poli(tlenek etylenu) 400 (PEG 400) (Carl Roth, Karlsruhe, Niemcy).

Jako substancje wzorcowe wykorzystano:

- apigenina ($\geq 97\%$, Sigma-Aldrich Budapeszt, Węgry);
- 1,8-cineol (eukaliptol) (99%, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Niemcy);
- eugenol (99%, Acros Organics, Geel, Belgia);
- (1R)-(-)-fenchon ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Niemcy);
- glukoza (cz.d.a., Reanal, Budapeszt, Węgry);
- kamfora (96%, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Niemcy);
- (R)-(-)-karwon (98%, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Niemcy);
- kemferol ($\geq 97\%$, Sigma-Aldrich Budapeszt, Węgry);
- kwas *p*-kumarowy ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich Budapeszt, Węgry);
- linalol (97%, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Niemcy);
- (R)-(+)-limonen (97%, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Niemcy);
- palmitynian metylu (cz.d.a., Poly-Science Corporation, Niles, USA);
- tetradekanonan metylu (cz.d.a., Poly-Science Corporation, Niles, USA);

- tymol (99%, Acros Organics, Geel, Belgia);
- γ -terpinen (97%, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Niemcy).

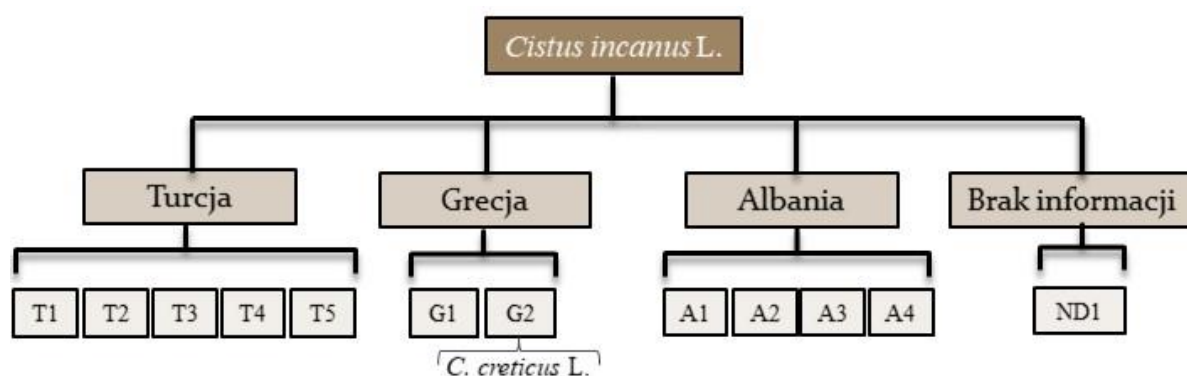
Woda stosowana do przygotowania ekstraktów roślinny i fazy ruchomej była podwójnie destylowana i dejonizowana w warunkach laboratoryjnych przy użyciu systemu Millipore Elix Advantage (Molsheim, Francja).

W niniejszej pracy wykorzystano płytki chromatograficzne firmy Merck (Darmstadt, Niemcy):

- Aluminiowe płytki HPTLC SiO₂ 60 (20 cm x 20 cm; nr. kat. 105547);
- Aluminiowe płytki TLC SiO₂ 60 F₂₅₄ (20 cm x 20 cm; nr. kat. 105554);
- Szklane płytki TLC SiO₂ 60 (20 cm x 20 cm; nr. kat. 105721);
- Szklane płytki HPTLC SiO₂ 60 NH₂ F_{254S} (20 cm x 10 cm; nr. kat. 113192).

2. MATERIAŁ ROŚLINNY

Przedmiot badań stanowiło 12 komercyjnie dostępnych (w sklepach stacjonarnych i internetowych) próbek zioła *Cistus incanus* L., uzyskanego od różnych producentów w postaci wysuszonych i rozdrobnionych części roślin z rozpoznawalnymi fragmentami liści, łodyg i kwiatów. Według informacji podanych przez producentów, próbki materiału roślinnego (sprzedawane w postaci herbaty ziołowej) pochodziły z Turcji (próbki T1÷T5), Albanii (próbki A1÷A4) i Grecji (próbki G1 i G2). W przypadku jednej z próbek (ND1) brak jest danych dotyczących pochodzenia surowca roślinnego. Jedenaście próbek określonych zostało przez producenta, jako *C. incanus* L. oraz jedna (G2), jako *C. creticus* L. (Rys. 14). Producenci nie podają żadnej informacji na temat konkretnego regionu kraju, czasu zbioru, metody suszenia, czy też sposobu przechowywania zioła. Dla większości próbek na opakowaniu nie występuje również informacja o tym, jaka część rośliny wchodzi w skład preparatu.



Rys. 14. Pochodzenie próbek handlowych *C. incanus*.

3. ANALIZA FRAKCJI LOTNEJ TECHNIKĄ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ

3.1 Izolacja, rozdział i identyfikacja – metodyka badań

3.1.1 Destylacja z parą wodną w aparacie Derynga

W kolbie okrągłodennej o pojemności 500 ml umieszczono 25 g materiału roślinnego, a następnie dodano 300 ml wody redestylowanej i 0,5 ml *o*-ksylenu. Proces destylacji z parą wodną prowadzono przez 4 godziny od momentu zaobserwowania wrzenia mieszaniny. Po zakończeniu destylacji ksylenowy roztwór olejka eterycznego (destylat barwy jasnożółtej) osuszono bezwodnym siarczanem (VI) sodu i przeniesiono do fiolki z ciemnego szkła. Zawartość olejków eterycznych mierzono zgodnie z procedurą opisaną w Farmakopei Polskiej X (2014) [113]. Uzyskane ilości olejków eterycznych mieściły się w zakresie od 0,04 do 0,12% olejku na kilogram suchej masy *C. incanus* L. Przygotowane w ten sposób olejki eteryczne przechowywano w szczelnie zamkniętych fiolkach w temperaturze -20°C , gotowe do dalszej analizy techniką GC-MS.

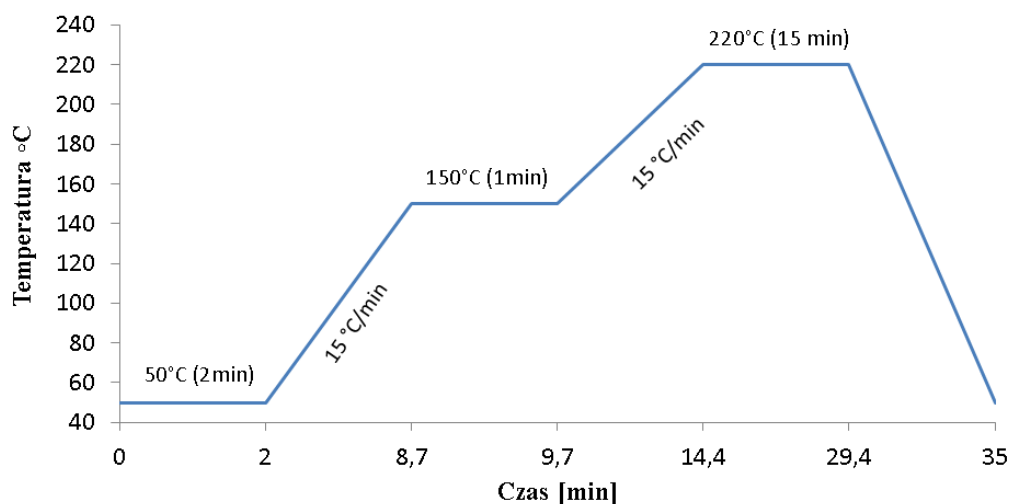
3.1.2 Analiza fazy nadpowierzchniowej

2 g badanego materiału roślinnego umieszczono w fiolce do analizy fazy nadpowierzchniowej o objętości 10 ml. Fiolkę zamknięto kapslem z membraną teflonowo-silikonową, umieszczono w termostacie automatycznego podajnika (autosamplera) chromatografu gazowego i wygrzewano przez 60 min w temperaturze 130°C . Następnie 750 μl próbki fazy gazowej pobranej bezpośrednio z powierzchni materiału roślinnego dozowano automatycznie do chromatografu gazowego sprzężonego z detektorem mas. Dobór parametrów pracy termostatu w analizie fazy nadpowierzchniowej prowadzono dla sześciu różnych czasów termostatowania próbek (15, 30, 45, 60, 75 i 90 minut) oraz w temperaturach w zakresie od 60°C do 150°C (przy interwale 10°C).

3.1.3 Analiza GC/MS

Analizę przeprowadzono przy użyciu chromatografu gazowego Trace 2000 sprzężonego ze spektrometrem mas MS Trace (ThermoQuest, Waltham, MA USA) i wyposażonego w automatyczny podajnik próbek typu Combi PAL. Próbki

nastrzykiwano w trybie *splitless*, stosując hel (ciśnienie 100 kPa) jako gaz nośny oraz temperaturę dozowania 220 °C. Do rozdzielania badanych związków zastosowano kolumnę kapilarną TG-35MS (30 m × 0,35 mm × 0,25 μm, Thermo Scientific™). Analizę przeprowadzono według programu temperaturowego przedstawionego na Rys. 15. Spektrometr masowy wyposażony był w źródło jonów z jonizacją elektronami EI o energii 70 eV. Dane uzyskane w trakcie analizy rejestrowano i opracowywano z użyciem programu X-Calibur.



Rys. 15. Schemat programu temperaturowego analizy techniką GC/MS substancji lotnych zawartych w badanych próbkach *C. incanus* L.

3.1.4 Identyfikacja związków

Identyfikacja poszczególnych związków lotnych zawartych w badanych próbkach *C. incanus* opierała się na porównaniu widm masowych zarejestrowanych dla poszczególnych pików chromatograficznych z widmami dostępnymi w bibliotece widm NIST. Dodatkowo tożsamość części związków lotnych została potwierdzona na podstawie porównania zgodności czasów retencji t_R i widm masowych z odpowiednimi wzorcami. oraz na podstawie analizy danych literaturowych [46], [52] dotyczących związków już zidentyfikowanych w gatunku *Cistus incanus* L.

3.2 Analiza chromatograficzna frakcji lotnej [114]

Celem tej części badań było porównanie składu chemicznego lotnych frakcji wyizolowanych z dwunastu próbek handlowych *C. incanus* L. pochodzących od różnych producentów i lokalizacji geograficznych. Oceniona została również skuteczność wyodrębniania związków lotnych z badanego materiału roślinnego przy użyciu dwóch technik izolacyjnych. Pierwszą z nich była analiza fazy nadpowierzchniowej (ang. *Head-Space*) polegająca na desorpcji termicznej substancji lotnych bezpośrednio z suszonego materiału roślinnego. Drugą metodę stanowiła destylacja z parą wodną w aparacie Derynga o zamkniętym obiegu wody, polecana przez Farmakopeę Polską [113], jako podstawowa metoda wyodrębniania substancji lotnych. Ocena skuteczności izolacji związków lotnych obu zastosowanych metod odbywała się przez porównanie profili chromatograficznych badanych próbek otrzymanych techniką GC/MS.

Wyniki ilościowej i jakościowej analizy frakcji lotnej badanych próbek *C. incanus* przedstawiono w Tab. 1 dla analizy olejków eterycznych otrzymanych w aparacie Derynga oraz w Tab. 2 dla danych otrzymanych techniką HS-GC/MS. Zidentyfikowane w próbkach związki przyporządkowano w tabelach do odpowiednich klas chemicznych, podano odpowiadające im czasy retencji t_R , metody identyfikacji oraz ich zawartość procentową w próbce (rozumianą, jako wkład procentowy poszczególnych wysokości pików do sumy wysokości wszystkich pików uzyskanych na danym chromatogramie). Do porównania i ilościowej oceny różnic w składzie i zawartości lotnych związków w badanych próbkach wykorzystano określoną w powyższy sposób zawartość procentową związków. Zastosowanie do oceny ilościowej rzeczywistych stężeń poszczególnych związków wiązałoby się z wieloma istotnymi problemami i nie było konieczne do zrealizowania celu badań.

Tab. 1. Skład chemiczny olejków eterycznych wyizolowanych z próbek *C. incanus* metodą destylacji z parą wodną w aparacie Derynga i analizowanych techniką GC / MS [114].

| t _R [min] | Związek | Zwartość względna [%] | | | | | | | | | | | | ID |
|-------------------------|--|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| | | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | A1 | A2 | A3 | A4 | G1 | G2 | ND1 | |
| | monoterpeny | 2.9 | - | 0.4 | 1.6 | 2.7 | - | 2.7 | 2.0 | 0.7 | 1.1 | - | 1.0 | |
| 4.6 | limonen | 0.5 | - | - | - | - | - | 2.0 | 0.8 | - | - | - | - | 1,2,3 |
| 4.9 | γ-terpinen | 2.4 | - | 0.4 | 1.6 | 2.7 | - | 0.7 | 1.1 | 0.7 | 1.1 | - | 1.0 | 1,2,3 |
| | pochodne tlenowe monoterpenów | 8,4 | 1,3 | 10,1 | 9,1 | 3,6 | 1,6 | 9,5 | 13,7 | 9,3 | 7,5 | 0,0 | 4,4 | |
| 4.7 | eukaliptol | 4.0 | - | 3.3 | 3.8 | - | 0.6 | 3.1 | 6.0 | 3.1 | 2.7 | - | 2.5 | 1,2,3 |
| 5.5 | α-linalol | 2.6 | - | 1.1 | 1.1 | 1.6 | - | 1.6 | 1.2 | 1.0 | 0.4 | - | - | 1,2,3 |
| 5.7 | fenchon | 0.5 | - | 1.9 | 0.6 | - | 0.3 | 1.3 | 1.1 | 1.1 | 0.5 | - | - | 1,2,3 |
| 6.6 | kamfora | 1.3 | 1.3 | 3.6 | 1.7 | 1.5 | 0.4 | 2.7 | 4.5 | 2.3 | 3.1 | - | 0.6 | 1,2,3 |
| 6.9 | α-terpineol | - | - | 0.3 | 0.6 | - | 0.2 | 0.9 | - | 1.2 | 0.4 | - | 0.8 | 1,3 |
| 7.2 | safranal | - | - | - | 1.1 | 0.5 | 0.1 | - | 0.9 | 0.6 | 0.3 | - | 0.5 | 1,3 |
| 7.9 | (-)-karwon | - | - | - | 0.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | 1,2 |
| | związki fenolowe | 14.0 | - | 7.4 | 8.7 | 11.3 | 3.9 | 10.2 | 10.6 | 11.0 | 8.4 | 5.5 | 13.7 | |
| 7.1 | estragol | - | - | 2.4 | 0.3 | - | - | 0.6 | - | - | 0.3 | 0.6 | - | 1 |
| 8.0 | tymol | 1.4 | - | 0.8 | 0.7 | 1.9 | 0.3 | 1.1 | 1.4 | 4.3 | 0.4 | 0.5 | 0.7 | 1,2,3 |
| 8.2 | karwakrol | 12.7 | - | 4.0 | 7.4 | 9.4 | 3.6 | 8.5 | 9.1 | 6.3 | 7.3 | 0.9 | 13.0 | 1,3 |
| 8.8 | eugenol | - | - | 0.3 | 0.2 | - | - | - | - | 0.4 | 0.4 | 3.5 | - | 1,2,3 |
| | pochodne tlenowe seskwiterpenów | 2.2 | - | 3.4 | 1.2 | 3.2 | 8.1 | 2.7 | 2.8 | 5.6 | 3.5 | 1.5 | 1.4 | |
| 11.2 | viridiflorol | 0.7 | - | 1.6 | 0.5 | 0.7 | 7.2 | 1.2 | - | 3.3 | 2.3 | 0.7 | - | 1,3 |
| 11.3 | ledol | - | - | 0.3 | - | - | 0.9 | 1.5 | 2.2 | 2.2 | 1.3 | - | 0.5 | 1,3 |
| 11.5 | kubenol | 1.4 | - | 1.3 | 0.7 | 2.0 | - | - | - | - | - | 0.5 | - | 1,3 |
| 11.7 | tlenek kariofilenu | - | - | 0.3 | - | 0.4 | - | - | 0.7 | - | - | 0.4 | 0.8 | 1,3 |
| | seskwiterpeny | 8.4 | 1.1 | 5.2 | 3.2 | 10.0 | 1.0 | 2.9 | 3.3 | 2.9 | 1.7 | 2.7 | 12.9 | |
| 7.8 | α-ylangen | 0.7 | - | 0.3 | 0.2 | 0.8 | 0.2 | - | 0.4 | - | 0.2 | - | 0.7 | 1,3 |
| 8.7 | kariofilen/ /aromadendren | 1.3 | 1.1 | - | 0.5 | 1.5 | 0.5 | 1.3 | 1.3 | 1.6 | 1.2 | 1.3 | 0.6 | 1,3 |
| 9.6 | α-selinen | 2.0 | - | 1.0 | 0.7 | 1.9 | 0.3 | 0.9 | 1.0 | 0.7 | - | 0.6 | 2.3 | 1,3 |
| 9.9 | δ-kadinen | 2.4 | - | 1.4 | 0.7 | 2.7 | - | 0.7 | 0.6 | 0.7 | 0.2 | - | 3.7 | 1,3 |
| 10.3 | kalamenen | 1.2 | - | 1.6 | 0.7 | 1.5 | - | - | - | - | - | - | 2.4 | 1,3 |
| 11.6 | himakalen | 0.7 | - | 0.5 | 0.3 | 1.0 | - | - | - | - | - | 0.4 | 2.6 | 1,3 |
| 12.1 | α-watiren | - | - | 0.4 | - | 0.6 | - | - | - | - | - | 0.3 | 0.7 | 1 |
| | kwasy tłuszczowe i ich pochodne | - | 8.1 | 9.6 | 13.0 | 0.6 | 10.6 | 0.6 | 0.3 | 6.1 | 11.8 | - | 0.4 | |
| 7.6 | kwask pelargonowy | - | - | 0.3 | 0.3 | - | - | - | 0.3 | - | - | - | - | 1,3 |
| 10.6 | kwask dekanowy | - | - | 1.1 | 1.0 | - | 0.2 | - | - | - | 0.5 | - | - | 1,3 |
| 12.6 | kwask tetradekanowy | - | 1.1 | 3.0 | 4.2 | - | 3.0 | - | - | 1.9 | 3.3 | - | 0.4 | 1,3 |
| 13.6 | palmitynian metylu | - | - | 0.4 | 0.5 | - | - | - | - | - | - | - | - | 1,2 |
| 14.2 | kwask heksadekanowy | - | 6.9 | 4.7 | 6.9 | 0.6 | 7.4 | 0.6 | - | 4.1 | 8.0 | - | - | 1,3 |
| | diterpeny i ich pochodne | 38.4 | 50.6 | 23.3 | 29.8 | 34.6 | 34.3 | 30.3 | 29.8 | 23.8 | 23.3 | 28.6 | 40.1 | |
| 13.9 | tlenek sklareolu | 4.4 | 5.2 | 3.1 | 0.8 | 4.8 | 3.5 | 1.9 | 3.5 | 1.2 | - | 4.1 | 2.7 | 1 |
| 14.0 | tlenek dihydromanoilu | - | - | 0.4 | 0.1 | - | - | - | - | - | - | 0.7 | - | 1 |
| 14.7 | tlenek manoilu | 15.0 | 16.8 | 7.2 | 8.6 | 12.2 | 8.9 | 10.4 | 10.6 | 4.4 | 6.5 | 8.9 | 13.6 | 1,3 |
| 14.9 | tlenek 13-epi-manoilu | 17.0 | 28.6 | 7.3 | 11.7 | 14.3 | 12.0 | 15.7 | 12.7 | 10.2 | 10.1 | 9.7 | 19.4 | 1,3 |
| 15.3 | sklareol | 2.0 | - | 2.4 | 0.7 | 3.2 | 10.0 | 2.3 | 3.0 | 8.1 | 6.7 | 5.2 | 2.8 | 1,3 |
| 15.5 | abietatrien | - | - | 2.9 | 7.8 | - | - | - | - | - | - | - | 1.6 | 1,3 |
| | związki karbonylowe | 0.6 | - | 6.6 | 5.8 | 1.5 | 2.6 | 1.9 | 1.8 | 1.8 | 3.8 | 1.9 | 1.0 | |
| 7.5 | 3,4,4a,5,6,7-hexahydro-1,1,4a-trimethyl-2(1H)-naftalenon | - | - | 0.5 | 0.8 | - | 0.1 | - | - | - | - | - | - | 1 |
| 12.9 | heksahydrofarenzyloacetone | 0.6 | - | 3.1 | 4.3 | 0.8 | 1.6 | 1.9 | 1.4 | 1.8 | 1.4 | 0.8 | 1.0 | 1,3 |
| 13.9 | farenzyloacetone | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1.9 | - | - | 1,3 |
| 17.1 | 2-(2-aceoksy-2,5,5,8a-tetramethyldecalin-1-yl)- kwask octowy | - | - | 1.1 | 0.3 | 0.6 | - | - | - | - | 0.2 | 1.1 | - | 1 |
| 19.4 | androsterone | - | - | 1.9 | 0.3 | - | 0.9 | - | 0.4 | - | 0.2 | - | - | 1 |
| | inne | 2.7 | 2.1 | 5.1 | 1.4 | 3.4 | 2.4 | - | 0.5 | - | 0.6 | - | 1.9 | |
| 17.1 | 1-heptatriakontanole | - | - | 0.4 | 0.2 | - | 0.1 | - | - | - | - | - | - | 1 |
| 21.2 | pregnan-3,17,20-triol (3r, 5a, 20S) | 2.7 | 2.1 | 4.7 | 1.3 | 3.4 | 2.3 | - | 0.5 | - | 0.6 | - | 1.9 | 1 |

Zwartość względna [%] liczona jako procent sumy wysokości wszystkich pików. Obliczona na podstawie trzech powtórzeń wartość RSD dla zawartości względnej nigdy nie przekroczyła poziomu ± 7,5%
ID: Identyfikacja związków:

1. bazująca na porównaniu widm masowych zarejestrowanych dla poszczególnych pików chromatograficznych z widmami dostępnymi w bibliotece widm NIST
2. na podstawie zgodności t_R i widm masowych z odpowiednimi substancjami wzorcowymi
3. na podstawie danych literaturowych [46], [52]

Tab. 2. Skład chemiczny frakcji lotnych wyizolowanych z próbek *C. incanus* analizowanych techniką HS-GC/MS [114].

| t_R [min] | Związek | Zwartość względna [%] | | | | | | | | | | | | ID |
|----------------|---|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| | | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | A1 | A2 | A3 | A4 | G1 | G2 | ND1 | |
| | pochodne tlenowe monoterpenów | 2.8 | 2.2 | 4.7 | 1.8 | 3.4 | 1.4 | - | 1.4 | 7.2 | - | - | 3.9 | |
| 4.7 | eukaliptol | - | - | - | - | 1.2 | - | - | - | - | - | - | 1.8 | 1,2,3 |
| 5.5 | α -linalol | - | - | 1.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1,2,3 |
| 6.6 | kamfora | 2.8 | 2.2 | 2.1 | 1.8 | 1.1 | 1.4 | - | 1.4 | 4.3 | - | - | 2.1 | 1,2,3 |
| 6.9 | α -terpineol | - | - | 1.3 | - | 1.1 | - | - | - | 2.9 | - | - | - | 1,3 |
| | związki karbonylowe | 5.6 | 3.1 | 7.9 | 3.1 | 2.7 | 5.7 | - | 3.3 | 10.0 | - | - | - | |
| 7.2 | 2-etylideno-6-metylo-3,5-heptadienal | 1.6 | - | 2.0 | - | 1.2 | 1.4 | - | 1.0 | 3.1 | - | - | - | 1 |
| 7.5 | 3,4,4a,5,6,7-heksahydro-1,1,4a-trimetylo-2(1H)-naftalenon | 2.3 | 1.8 | 3.3 | 0.7 | 1.6 | 1.9 | - | 1.1 | 5.0 | - | - | - | 1 |
| 12.9 | fiton | 1.7 | 1.3 | 2.6 | 2.4 | - | 2.4 | - | 1.2 | 1.8 | - | - | - | 1,3 |
| | związki fenolowe | 14.5 | 1.8 | 28.4 | 21.2 | 33.5 | 4.1 | 13.1 | 7.9 | 10.6 | 23.1 | 1.5 | 35.1 | |
| 8.0 | tymol | - | - | 1.0 | - | 1.8 | - | - | - | 4.1 | - | - | - | 1,2,3 |
| 8.1 | karwakrol | 9.3 | 1.8 | 25.0 | 21.2 | 31.7 | 2.5 | 13.1 | 7.9 | 6.5 | 23.1 | - | 35.1 | 1,3 |
| 8.9 | eugenol | 5.3 | - | 2.3 | - | - | 1.6 | - | - | - | - | 1.5 | - | 1,2,3 |
| | seskwiterpeny | 1.6 | 6.2 | 5.4 | 5.4 | 8.1 | 7.3 | - | 1.9 | 3.3 | - | - | - | |
| 9.7 | α -murolen | - | 1.8 | 1.2 | 0.7 | 1.4 | 4.3 | - | - | 1.7 | - | - | - | 1,3 |
| 10.0 | δ -kadinen | 1.6 | 2.1 | 1.9 | 1.7 | 3.5 | 1.9 | - | 0.9 | 1.6 | - | - | - | 1,3 |
| 10.1 | kalamenen | - | 2.3 | 1.5 | 2.1 | 2.0 | 1.2 | - | - | - | - | - | - | 1,3 |
| 10.7 | kalakoren | - | - | 0.8 | 0.9 | 1.2 | - | - | 1.0 | - | - | - | - | 1,3 |
| | kwasy tłuszczowe i ich pochodne | - | - | 1.9 | 17.4 | - | 2.4 | - | 14.9 | - | - | - | - | |
| 11.9 | tetradekanonan metylu | - | - | 0.8 | 5.1 | - | - | - | 3.0 | - | - | - | - | 1,2 |
| 13.6 | palmitynian metylu | - | - | 1.2 | 12.4 | - | 2.4 | - | 11.9 | - | - | - | - | 1,2 |
| | pochodne diterpenów | 12.7 | 53.7 | 17.1 | 26.6 | 30.8 | 32.9 | 8.1 | 32.0 | 22.9 | 13.1 | 33.5 | 20.9 | |
| 12.4 | fitol | 1.7 | 2.3 | 2.0 | 6.2 | 1.0 | 4.3 | - | 7.4 | 2.6 | - | - | - | 1,3 |
| 14.7 | tlenek manoilu | 4.3 | 15.4 | 6.2 | 6.2 | 12.8 | 10.2 | - | 7.5 | 7.3 | 4.8 | 11.7 | 7.7 | 1,3 |
| 14.9 | tlenek 13-epi-manoilu | 6.7 | 36.0 | 8.9 | 14.2 | 17.0 | 18.4 | 8.1 | 17.1 | 13.0 | 8.2 | 21.8 | 13.2 | 1,3 |
| | inne | 39.2 | 10.2 | 15.9 | 8.2 | 7.3 | 16.5 | 41.2 | 11.1 | 16.1 | 31.4 | 21.5 | 23.2 | |
| 3.3 | furfural | 22.0 | 4.6 | 8.0 | 2.3 | 3.6 | 8.1 | 18.3 | 4.6 | 8.1 | 14.2 | 11.7 | 13.6 | 1 |
| 4.9 | 5-metylofurfural | 15.5 | 3.6 | 5.9 | 4.4 | 2.5 | 5.7 | 23.0 | 4.5 | 5.4 | 17.2 | 9.8 | 9.6 | 1 |
| 8.6 | dehydro-ar-ionene | 1.8 | 1.9 | 2.1 | 1.5 | 1.2 | 2.6 | - | 2.0 | 2.7 | - | - | - | 1,3 |

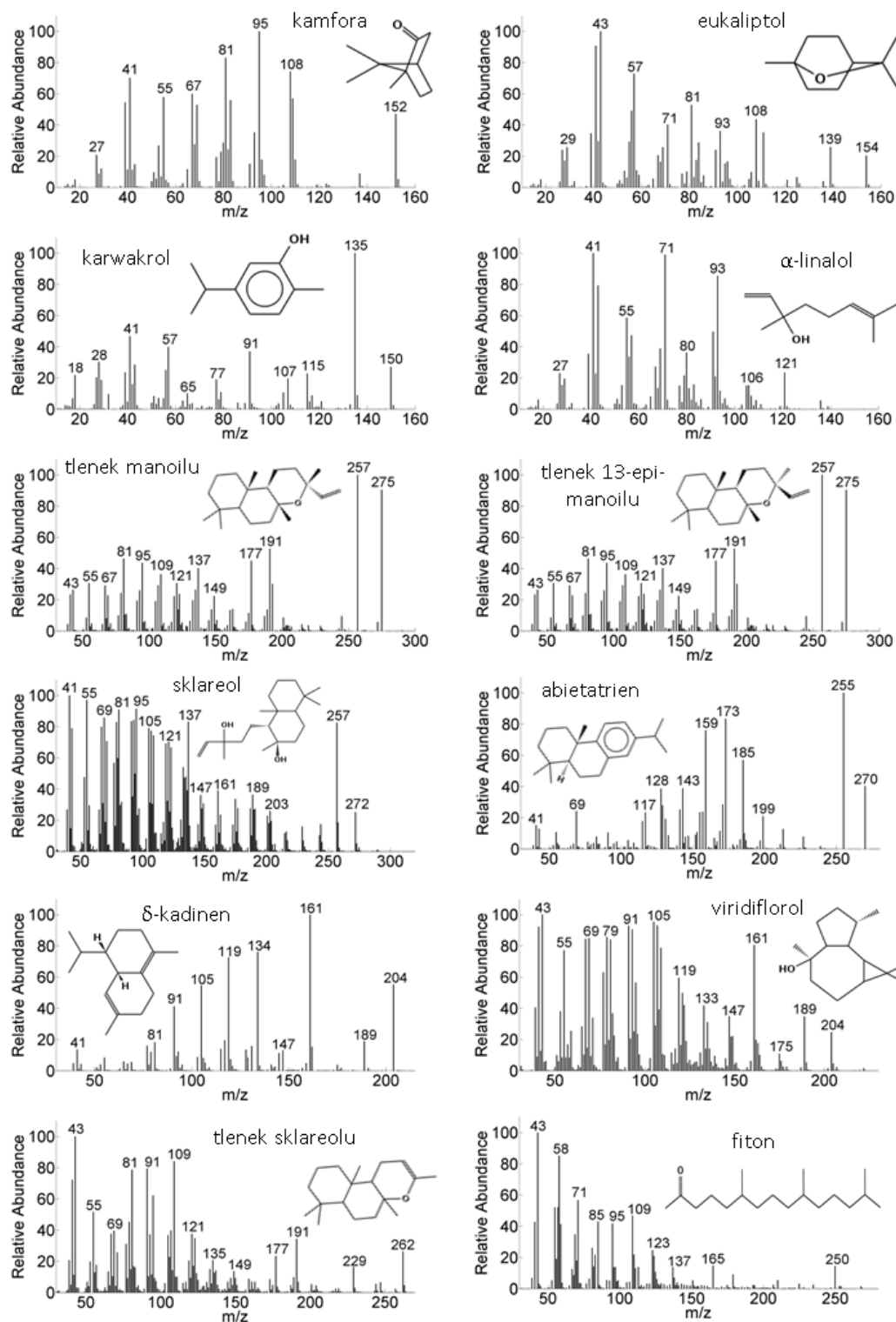
Zwartość względna [%] liczona jako procent sumy wysokości wszystkich pików. Obliczona na podstawie trzech powtórzeń wartość RSD dla zawartości względnej nigdy nie przekroczyła poziomu $\pm 7,5\%$

ID: Identyfikacja związków:

1. bazująca na porównaniu widm masowych zarejestrowanych dla poszczególnych pików chromatograficznych z widmami dostępnymi w bibliotece widm NIST
2. na podstawie zgodności t_R i widm masowych z odpowiednimi substancjami wzorcowymi
3. na podstawie danych literaturowych [46], [52]

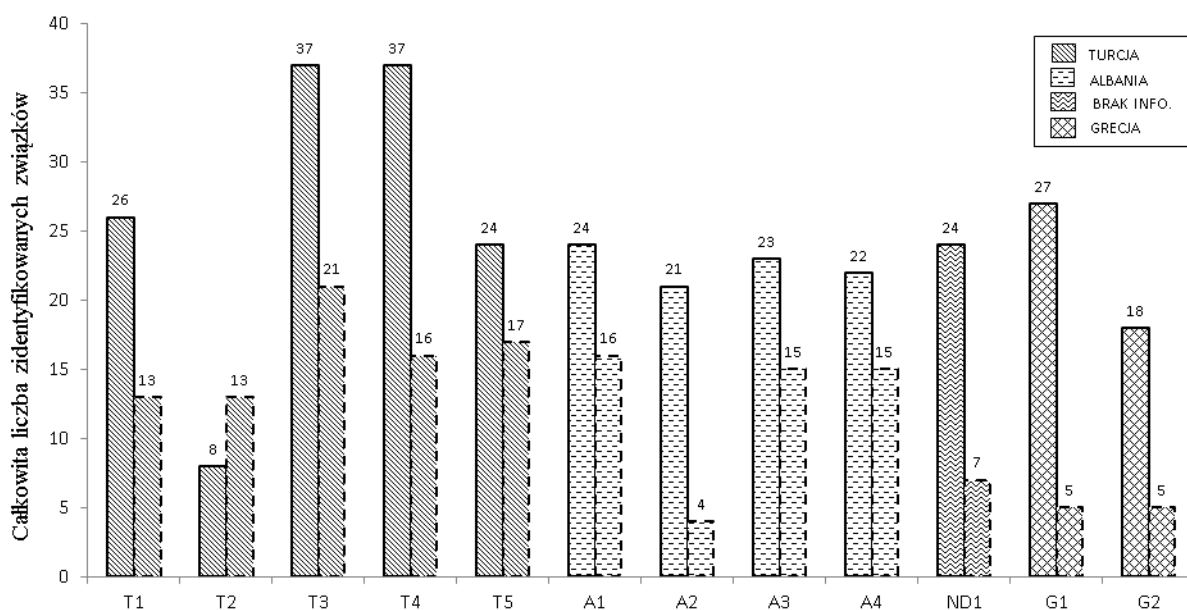
Analizując otrzymane dane, trudno znaleźć związek lub grupę związków, która byłaby charakterystyczna dla próbek pochodzących z jednego regionu. Można natomiast zauważyć, że niezależnie od użytej metody w każdej z dwunastu frakcji lotnych stwierdzono obecność dwóch związków: tlenek manoilu oraz tlenek 13-epi-manoilu. Są to pochodne naturalnego diterpenu należącego do labdanów, który jest głównym składnikiem żywicy labdanum, będącej charakterystyczną substancją wydzielaną przez rośliny należące do rodzaju *Cistus* L.. Warto również zauważyć, że zawartość ilościowa tych dwóch składników oraz pozostałych związków należących do grupy diterpenów stanowi średnio 1/3 zawartości całej frakcji lotnej wyizolowanej z próbek czystka. Kolejne wyróżniające się klasy związków tj. seskwiterpeny i pochodne tlenowe monoterpenów, są grupami liczniejszymi, jednakże ich wkład do całkowitej zawartości frakcji lotnej jest zdecydowanie niższy, niż diterpenów. Na chromatogramach większości przebadanych próbek obecne są także piki pochodzące odpowiednio od: eukaliptolu,

α -linalolu, kamfory, tymolu, karwakrolu, viridiflorolu, δ -kadinenu, sklareolu, tlenku sklareolu i fitonu. Na Rys. 16 przedstawiono widma masowe wyżej wymienionych. dwunastu lotnych związków wraz z ich strukturami chemicznymi.



Rys. 16. Dwanaście najczęściej występujących związków zidentyfikowanych w próbkach *C. incanus* wraz z ich wzorami strukturalnym i widmami mas [114].

Porównując efektywność dwóch metod zastosowanych do izolacji oraz identyfikacji związków (Rys. 17) zawartych we frakcji lotnej badanego materiału roślinnego, prostsza i szybsza analiza HS-GC/MS okazała się techniką mniej wydajną (pozwoliła wyizolować mniejszą liczbę lotnych związków) w porównaniu z metodą bazującą na olejkach eterycznych otrzymanych w aparacie Derynga i analizowanych techniką GC-MS. Niemniej jednak izolacja niektórych związków możliwa była tylko przy zastosowaniu jednej z wymienionych technik (Tab. 3). Za pomocą obu technik udało się zidentyfikować w sumie 51 związków, wśród których 8 zostało wyizolowanych tylko przy użyciu techniki analizy fazy nadpowierzchniowej, 29 zarejestrowano tylko drugą z technik, natomiast 14 związków udało się zarejestrować na chromatogramach uzyskanych obiema metodami. Część z tych związków jest zgodna z dotychczasowymi doniesieniami na temat składu lotnej frakcji otrzymanej z gatunków czystka. Zidentyfikowano również związki, dla których brak jest informacji literaturowych, potwierdzających ich wcześniejszą izolację z gatunku *Cistus incanus*.



Rys. 17. Liczba związków zidentyfikowanych w próbkach czystka. Wykres przedstawia ogólną liczbę zidentyfikowanych lotnych związków będących składnikami olejków eterycznych z dwunastu próbek *C. incanus* L. (lewy słupek) oraz otrzymanych techniką headspace bezpośrednio z materiału roślinnego (prawy słupek) [114].

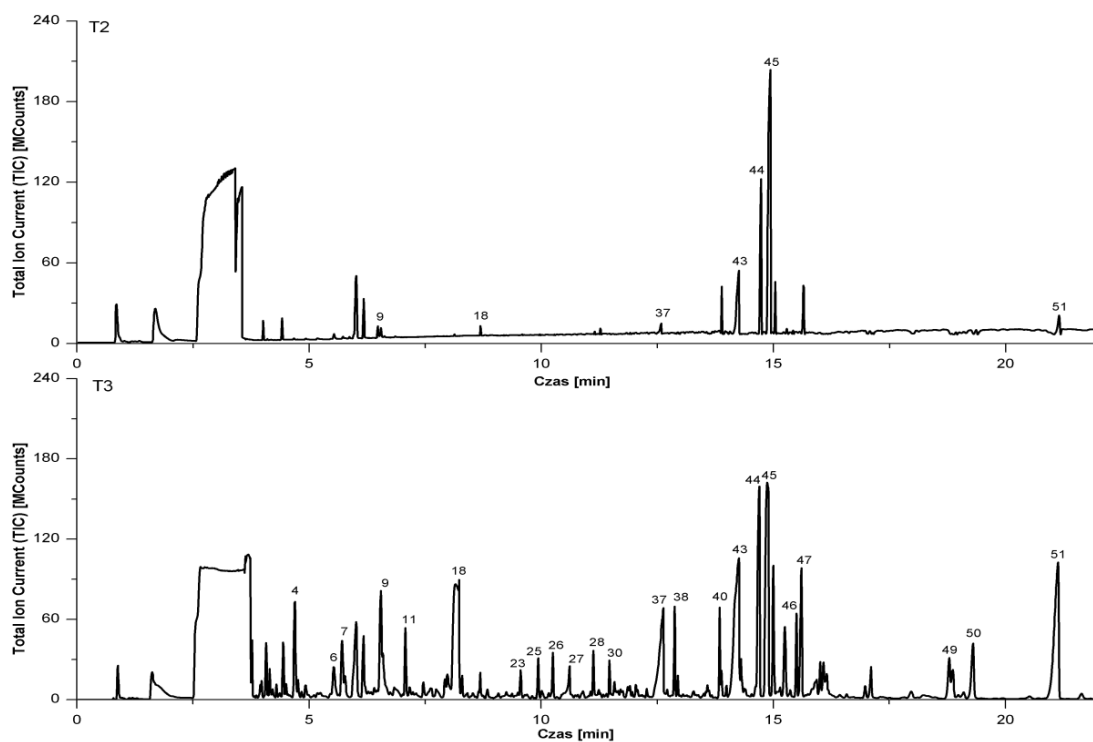
Tab. 3. Lista związków zidentyfikowanych za pomocą obu metod zastosowanych do analizy frakcji lotnej próbek handlowych czystka [114].

| Nr | t _R [min] | Związek | Wyodrębnienie | |
|---|-------------------------|--|---------------|-----------|
| | | | Deryng | Headspace |
| 1 | 3,3 | furfural | - | + |
| 2 | 4,6 | limonen | + | - |
| 3 | 4,7 | eukaliptol | + | + |
| 4 | 4,9 | γ-terpinen | + | - |
| 5 | 4,9 | 5-metylofurfural | - | + |
| 6 | 5,5 | α-linalol | + | + |
| 7 | 5,7 | fenchon | + | - |
| 8 | 6,6 | kamfora | + | + |
| 9 | 6,9 | α-terpineol | + | + |
| 10 | 7,1 | estragol | + | - |
| 11 | 7,2 | safranal | + | - |
| 12 | 7,2 | 2-ethylidene-6-methyl-3,5-heptadienal | - | + |
| 13 | 7,5 | 3,4,4a,5,6,7-hexahydro-1,1,4a-trimethyl-2(1H)-naphthalenon | + | + |
| 14 | 7,6 | kwas pelargonowy | + | - |
| 15 | 7,8 | α-ylangen | + | - |
| 16 | 7,9 | (-)-karwon | + | - |
| 17 | 8,0 | tymol | + | + |
| 18 | 8,2 | karwakrol | + | + |
| 19 | 8,6 | dehydro-ar-ionene | - | + |
| 20 | 8,7 | kariofilen | + | - |
| 21 | 8,7 | aromadendren | + | - |
| 22 | 8,8 | eugenol | + | + |
| 23 | 9,6 | α-selinen | + | - |
| 24 | 9,7 | α-murolen | - | + |
| 25 | 9,9 | δ-kadinen | + | + |
| 26 | 10,3 | kalamenen | + | + |
| 27 | 10,6 | kwas dekanowy | + | - |
| 28 | 10,7 | kalakoren | - | + |
| 29 | 11,2 | viridiflorol | + | - |
| 30 | 11,3 | ledol | + | - |
| 31 | 11,5 | kubenol | + | - |
| 32 | 11,6 | himakalen | + | - |
| 33 | 11,7 | tlenek kariofilenu | + | - |
| 34 | 11,9 | tetradekanonan metylu | - | + |
| 35 | 12,1 | α-watiren | + | - |
| 36 | 12,4 | fitol | - | + |
| 37 | 12,6 | kwas tetradekanowy | + | - |
| 38 | 12,9 | heksahydrofarenzyloaceton | + | + |
| 39 | 13,6 | palmitynian metylu | + | + |
| 40 | 13,9 | tlenek sklareolu | + | - |
| 41 | 13,9 | farenzyloaceton | + | - |
| 42 | 14,0 | tlenek dihydromanoilu | + | - |
| 43 | 14,2 | kwas heksadekanowy | + | - |
| 44 | 14,7 | tlenek manoilu | + | + |
| 45 | 14,9 | tlenek 13-epi-manoilu | + | + |
| 46 | 15,3 | sklareol | + | - |
| 47 | 15,5 | abietatrien | + | - |
| 48 | 17,1 | 2-(2-aceoksy- 2,5,5,8a-tetramethyldecalin-1-yl)- kwas octowy | + | - |
| 49 | 17,1 | 1-heptatriakontanol | + | - |
| 50 | 19,4 | androsteron | + | - |
| 51 | 21,2 | pregnan-3,17,20-triol (3r, 5a, 20S) | + | - |
| Suma zidentyfikowanych związków: | | | 43 | 22 |

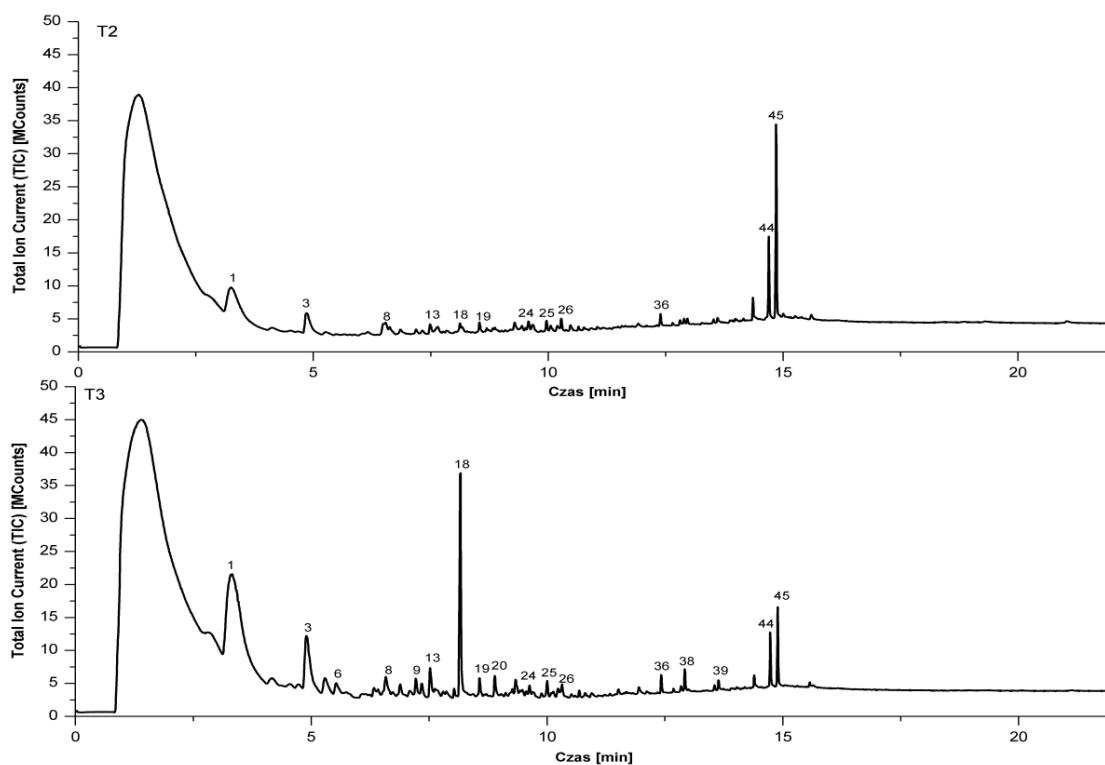
Różnica w wydajności obu metod analitycznych użytych w tym badaniu może w pewnym stopniu wynikać z niewielkiego dodatku *o*-ksylenu do wody w procesie hydrodestylacji. Mógł on ułatwić izolacje z próbki związków mniej lotnych (w szczególności diterpenów), jednakże nie pozwala on na identyfikację związków o czasach retencji znajdujących się w zakresie występowania jego sygnału chromatograficznego. Technika HS-GC/MS pozwoliła natomiast na identyfikację związków, których sygnały mogą być nałożone z pikiem *o*-ksylenu na chromatogramach olejków eterycznych.

Widoczna przewaga w ilości związków otrzymanych w wyniku destylacji w aparacie Derynga może być również związana z nieodpowiednim sposobem suszenia badanego materiału roślinnego. Nie posiadamy żadnych informacji o sposobie suszenia badanych próbek, a mógł on spowodować znaczną utratę najbardziej lotnej frakcji, przez co analiza olejków eterycznych (zdecydowanie bogatszych w składniki mniej lotne) umożliwiła identyfikację większej grupy związków. Jednakże mimo mniejszej wydajności HS-GC/MS, obie techniki uzupełniają się i dlatego warto wykonywać je łącznie, w celu uzyskania pełnej informacji dotyczącej składu chemicznego frakcji lotnej badanych ziół.

Z analizy otrzymanych danych wynika, że frakcje lotne uzyskane z handlowych próbek *C. incanus* wykazują znaczne różnice w składzie chemicznym. Spore różnice widoczne są już w obrębie próbek zgrupowanych ze względu na swój kraj pochodzenia (Turcja, Albania i Grecja). I tak na Rys. 18 i Rys. 19 przedstawiono przykładowe chromatogramy dwóch tureckich próbek czystka (T2 i T3) wyraźnie różniących się między sobą zawartością lotnych związków. W olejku eterycznym wyizolowanym z próbki T2 oznaczono tylko 8 związków, natomiast w przypadku olejku uzyskanego z próbki T3 wykryto 37 związków. Również przy zastosowaniu alternatywnej metody analitycznej (HS-GC/MS) liczba znalezionych związków w próbce T2 była dużo niższa, niż w T3. Biorąc pod uwagę tak duże rozbieżności w profilach chromatograficznych frakcji lotnej materiału roślinnego o tym samym pochodzeniu wydaje się oczywiste, że kraj zbioru próbek nie może być traktowany jako czynnik różnicujący skład chemiczny próbek czystka.



Rys. 18. Chromatogramy GC/MS otrzymane dla olejków eterycznych uzyskanych z próbek czystka T2 i T3. Numeracja związków zgodna z opisem z Tab. 3 [114].



Rys. 19. Chromatogramy HS-GC/MS otrzymane dla lotnych frakcji uzyskanych z próbek czystka T2 i T3. Numeracja związków zgodna z opisem z Tab. 3 [114].

Obserwowane dysproporcje w zawartości lotnych związków w próbkach *Cistus incanus* mogą wynikać z różnych sposobów suszenia oraz przechowywania materiału roślinnego. Czynniki te w sposób nadrzędny będą determinowały skład frakcji lotnej w handlowym materiale roślinnym. Brak informacji o sposobie suszenia i przechowywania oraz innych źródłach zmienności składu czystka (np. podgatunku, wieku rośliny, okresie zbiorów) powoduje, że możemy jedynie porównać poszczególne handlowe preparaty ziołowe różnych firm ze względu na liczbę i rodzaj zidentyfikowanych w nich lotnych związków chemicznych, co na pewno stanowi użyteczną informację, mówiącą nam jednak jedynie o składzie (jakości) danej partii materiału roślinnego.

4. ANALIZA FRAKCJI NIELOTNEJ - WŁAŚCIWOŚCI ANTYOKSYDACYJNE

4.1 Ekstrakcja i analiza chromatograficzna - metodyka badań

4.1.1 Przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem (ASE)

Przyspieszoną ekstrakcję rozpuszczalnikiem (ASE) przeprowadzono przy użyciu urządzenia Dionex ASE 200. Przed przystąpieniem do ekstrakcji pochodzący od producentów surowiec roślinny poddano wstępnemu przygotowaniu, mającemu za zadanie pozbycie się części chlorofilu oraz odtłuszczenie materiału roślinnego. W tym celu 10 g surowca roślinnego poddano 24 godzinnej maceracji *n*-heksanem, po której przeprowadzono wyczerpującą ekstrakcję w aparacie Soxhleta (około 80 h). Tak przygotowany materiał roślinny wysuszone, odważono w ilości 2,5 g, a następnie przeniesiono do celek celem przeprowadzenia przyspieszonej ekstrakcji rozpuszczalnikowej.

W procesie ekstrakcji zastosowano warunki dobrane wcześniej w oparciu o metody chemometryczne [115]. Warunki te wyznaczano podczas planowania eksperymentu stosując metody odpowiedzi powierzchni (RSM) przy zastosowaniu centralnego planu kompozycyjnego (CCD) i zestawiono je w Tab. 4.

Tab. 4. Warunki analizy dla przyspieszonej ekstrakcji rozpuszczalnikowej [116].

| | |
|----------------------------|------------------------------|
| Temperatura ekstrakcji | 130 °C |
| Rozpuszczalnik | metanol - woda, 27:73 (v/v). |
| Gaz | azot |
| Płukanie | 3-krotne |
| Ciśnienie | 100 atm |
| Czas ogrzewania | 5 min |
| Czas statyczny | 5 min |
| Ilość cykli | 5 |
| Ilość surowca | 2,5 g |
| Końcowa objętość ekstraktu | 37 ml |

Uzyskane ekstrakty przeniesiono do pojemników z ciemnego szkła i przechowywano w temp. -10 °C do czasu przeprowadzenia dalszej analizy. Dla każdej próbki czystka zostały wykonane dwa powtórzenia.

4.1.2 Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Analizę techniką chromatografii cienkowarstwowej (TLC) wodno-metanolowych ekstraktów czystka przeprowadzono stosując pionowe komory chromatograficzne wg Stahla. Przed przystąpieniem do analizy komorę nasycono przez 15 minut parami fazy ruchomej. Rozdział związków prowadzono na szklanych płytkach chromatograficznych pokrytych warstwą żelu krzemionkowego Si60 (20 cm × 20 cm; Merck, Darmstadt, Niemcy; nr kat. 1.05721), które uprzednio wstępnie rozwijano w metanolu oraz aktywowano w suszarce laboratoryjnej (model S-40; Alpina, Polska) w temperaturze 110 °C przez 15 minut. Ekstrakty nanoszono na płytki punktowo w objętości 4 µl. Jako fazę ruchomą użyto mieszaninę octan etylu - dichlorometan – kwas mrówkowy - kwas octowy - woda w stosunku objętościowym 100:10:10:10:11. Chromatogramy rozwijano na wysokość 16 cm, po czym suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej (21 ± 1 °C) przez 2 godziny.

Podczas opracowywania zastosowanej procedury analitycznej porównano sprawność rozdzielczą różnych układów chromatograficznych (Tab. 5), proponowanych w literaturze do rozdziału oraz identyfikacji związków fenolowych w materiale roślinnym [115], [117]–[122]. Zastosowana w analizie faza ruchoma stanowiła zmodyfikowaną fazę ruchomą, zaproponowaną przez Nicoletti i wsp. [117].

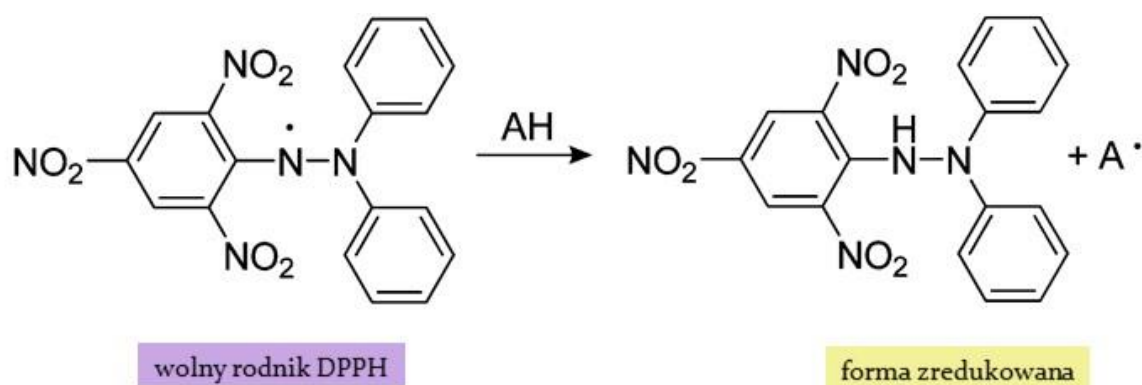
Tab. 5. Układy chromatograficzne zastosowane podczas analizy TLC ekstraktów czystka.

| Faza stacjonarna | Faza ruchoma |
|------------------|---|
| SiO ₂ | <u>AcOEt - H₂O - HCOOH - CH₃COOH</u> 100:26:11:11 (v/v) [118] 100:15:11:11(v/v) [115] |
| SiO ₂ | <u>AcOEt - CH₂Cl₂ - HCOOH - CH₃COOH - H₂O</u> 100:25:10:10:11 (v/v) [117] 100:10:10:10:11 (v/v) |
| SiO ₂ | <u>C₆H₅CH₃ - AcOEt - HCOOH</u> 70:30:1 (v/v) [119] 1 2 : 6 : 1 (v/v) [120] |
| RP-18 | <u>MeOH - H₂O - CH₃COOH</u> 78:25:3 (v/v) [121] 25:25:3 (v/v) [121] |
| RP-18 | <u>H₂O - MeOH</u> 6:4 (v/v) [122] |

Po rozwinięciu i wysuszeniu każdy chromatogram poddano analizie densytometrycznej w trybie fluorescencji przy długości fali $\lambda = 366$ nm (długość fali charakteryzująca się największą intensywnością responsu próbek oraz liczbą mierzonych sygnałów chromatograficznych w zakresie od 320 do 700 nm). Densytogramy rejestrowano stosując densytometr skaningowy Desaga model CD 60 z oprogramowaniem ProQuant (Desaga, Heidelberg, Niemcy). Ponadto, wszystkie płytki chromatograficzne fotografowano pod lampą UV przy długości fali $\lambda = 366$ nm.

4.1.3 Właściwości antyoksydacyjne

W celu określenia aktywności antyoksydacyjnej badanych ekstraktów, rozwinięte i wysuszone płytki chromatograficzne spryskano 0,2% metanolemowym roztworem DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) i pozostawiono w temperaturze pokojowej na okres 30 minut [115]. Zwizualizowane chromatogramy fotografowano w świetle widzialnym, a żółte zabarwienie pasm chromatograficznych powstałe w wyniku odbarwienia ciemnofioletowego koloru pochodzącego od stabilnego wolnego rodnika DPPH, zinterpretowano jako efekt aktywności antyoksydacyjnej. Rozwinięte i wysuszone chromatogramy skanowano densytometrycznie w trybie ekstynkcji przy długości fali $\lambda = 550$ nm (przy której występuje największa różnica pomiędzy absorbancją żółtej formy zredukowanej DPPH, a absorbancją wolnego rodnika DPPH o kolorze fioletowym) (Rys. 20).

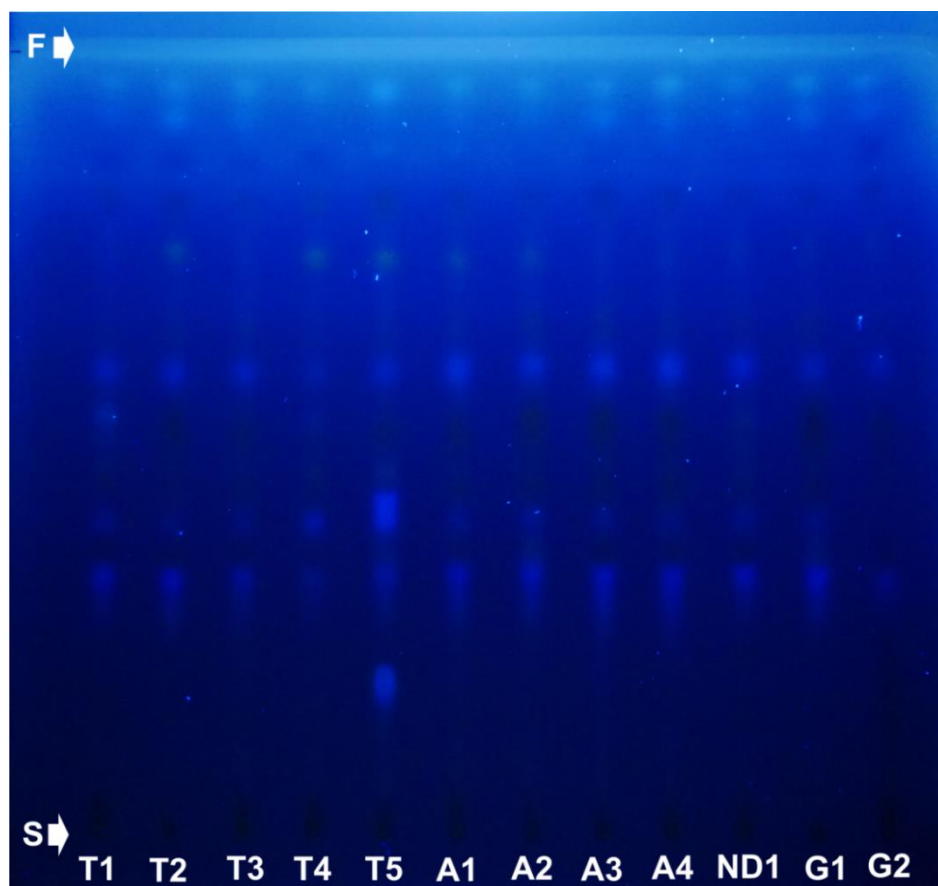


Rys. 20. Struktura chemiczna rodnika DPPH oraz jego reakcja z substancją przeciwutleniającą.

4.2 Analiza wodno-metanolowych ekstraktów techniką chromatografii cienkowarstwowej [116]

Celem niniejszego etapu badań było zastosowanie techniki chromatografii cienkowarstwowej do konstrukcji oraz porównania chromatograficznych odcisków palców wodno-metanolowych ekstraktów uzyskanych z próbek handlowych *C. incanus*.

Z analizy otrzymanych danych wynika, że wyciągi roślinne uzyskane z handlowych próbek czystka różnią się zarówno ilością, jak i intensywnością uzyskanych pików chromatograficznych. Pod względem jakościowym różnice te przedstawiono na Rys. 21, a także na Rys. 22 i w Tab. 6 porównano je ilościowo. Porównując otrzymane chromatogramy stwierdzono obecność co najmniej jedenastu związków. Przy analizie wyników brano pod uwagę intensywność, wartość liczbową współczynnika R_F , kolor oraz ilość wszystkich pasm występujących w każdym badanym ekstrakcie.



Rys. 21. Chromatograficzne odciski palca dwunastu ekstraktów *C. incanus* L.. Rejestracja zdjęć w świetle UV przy długości fali $\lambda = 366$ nm. Strzałkami zaznaczono linię startu (S) oraz czoło fazy ruchomej (F) [116].

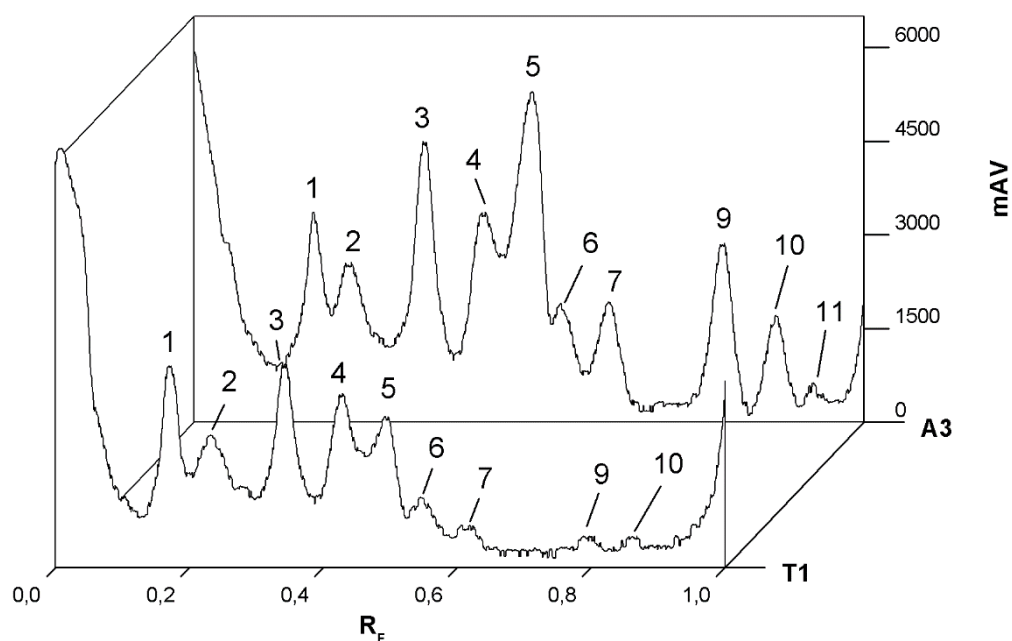
Tab. 6. Wyniki analizy densytometrycznej chromatogramów TLC otrzymanych dla dwunastu ekstraktów czystka. Przedstawione zostały: średnie współczynniki retardacji R_F rozdzielonych pików chromatograficznych, liczba oraz wysokości pików dla każdego indywidualnego fingerprintu [mAV] oraz suma wysokości wszystkich rozdzielonych pików [mAV] [116].

| Nr pików | R_F | Wysokość pików [mAV] | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|-------|----------------------|------|-------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| | | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | A1 | A2 | A3 | A4 | ND1 | G1 | G2 |
| 1 | 0,18 | 1774 | 1460 | 1724 | 1505 | 1370 | 1717 | 1581 | 1575 | 1556 | 1846 | 1437 | 1760 |
| 2 | 0,25 | 734 | 935 | 927 | 737 | 614 | 882 | 847 | 894 | 726 | 928 | 698 | 888 |
| 3 | 0,34 | 2022 | 2076 | 2356 | 1677 | 1152 | 2025 | 2357 | 3253 | 2701 | 2791 | 2656 | 1336 |
| 4 | 0,42 | 1231 | 606 | 1173 | 1354 | 878 | 1094 | 1189 | 1338 | 1744 | 1434 | 1078 | 431 |
| 5 | 0,49 | 940 | 2502 | 2021 | 959 | 1026 | 1734 | 3025 | 2999 | 2189 | 2582 | 3232 | 2145 |
| 6 | 0,55 | 372 | 282 | 458 | 557 | 376 | 547 | 441 | 591 | 713 | 426 | 357 | 270 |
| 7 | 0,62 | 260 | 679 | 673 | 254 | 286 | 569 | 1170 | 1281 | 723 | 948 | 1274 | 576 |
| 8 | 0,70 | - | - | - | - | - | 274 | 252 | - | 325 | - | - | - |
| 9 | 0,79 | 298 | 726 | 949 | 1239 | 1337 | 1439 | 1376 | 2356 | 1538 | 1377 | 765 | 740 |
| 10 | 0,87 | 334 | 701 | 1044 | 882 | 874 | 1150 | 1018 | 1368 | 1173 | 916 | 773 | 646 |
| 11 | 0,95 | - | - | - | - | - | 284 | 301 | 311 | 428 | 326 | 307 | - |
| Suma wysokości pików [mAV] | | 7965 | 9968 | 11325 | 9165 | 7914 | 11717 | 13556 | 15967 | 13816 | 13574 | 12577 | 8793 |
| Liczba rozdzielonych pików | | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 11 | 11 | 10 | 11 | 10 | 10 | 9 |

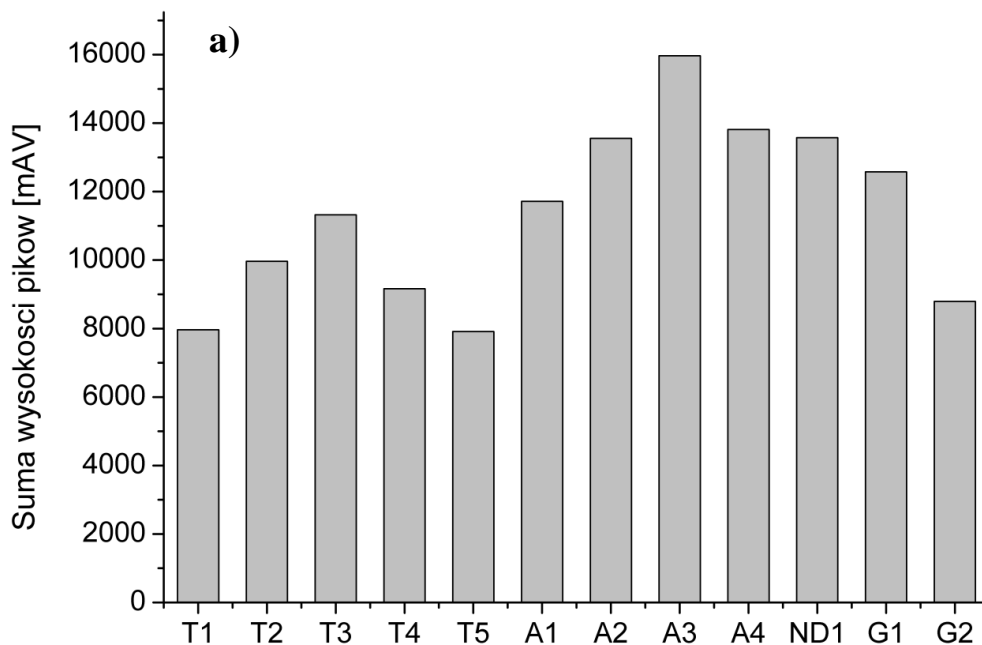
Każdy ekstrakt poddano analizie chromatograficznej w trzech powtórzeniach ($n = 3$), a przedstawione wartości stanowią uśrednione wyniki z wszystkich powtórzeń. Względne odchylenie standardowe (RSD) uzyskanych wartości sygnałów chromatograficznych ($n = 3$) nie przekroczyło $\pm 20\%$.

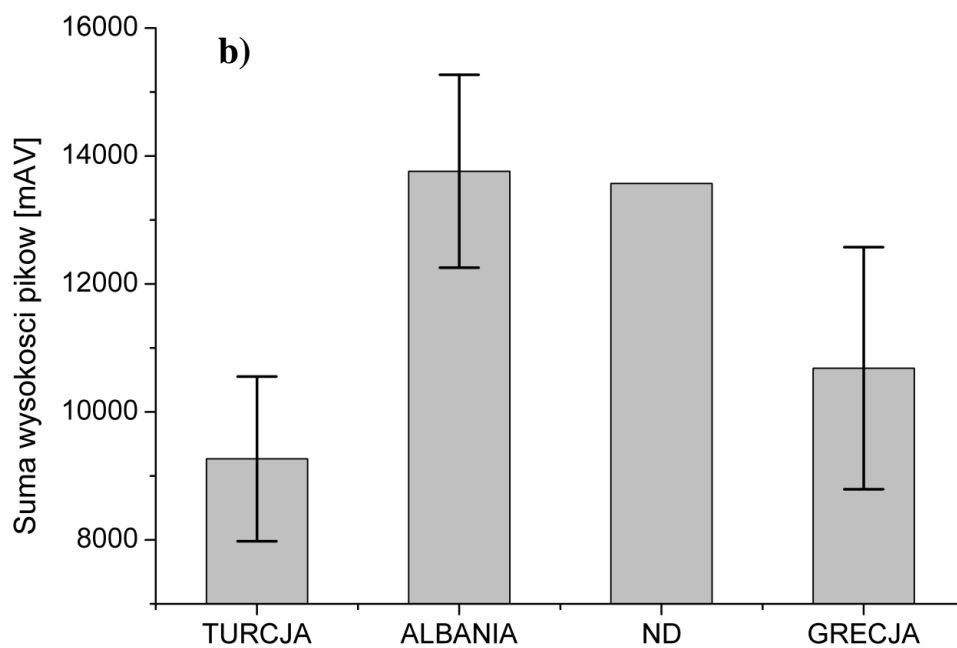
Największą liczbę rozdzielonych pasm chromatograficznych o największych intensywnościach zaobserwowano dla próbek A3 i A4 (odpowiednio 10 i 11 pasm). Próbki te posiadają również najwyższą sumę wysokości pików (odpowiednio 15967 i 13816 mAV). Próbka T1 należy natomiast do próbek, które charakteryzują się najmniejszą liczbą rozdzielonych pików (9 pasm) oraz najmniejszą sumą wysokości pików (7965 mAV). Suma wysokości pików dla T1 jest o ok. 50% niższa od tej, która charakteryzuje ekstrakt próbki A3. Profile stężeniowe pozostałych dziesięciu próbek *C. incanus* L. wahają się pomiędzy tymi dwoma skrajnymi przypadkami. Różnice w sumarycznych intensywnościach sygnałów poszczególnych próbek można powiązać z krajem pochodzenia surowca roślinnego (Rys. 23). Ekstrakty czystka pochodzące z Turcji (T1-T5) charakteryzują się mniejszą intensywnością sygnałów chromatograficznych względem próbek pochodzących z innych krajów. Największą

zawartość wszystkich związków wykazują ekstrakty czystka pochodzące z Albanii (A1-A4) oraz próbka o nieznanym pochodzeniu geograficznym (ND1).



Rys. 22. Porównanie densytogramów otrzymanych dla ekstraktów próbek T1 i A3. Densytogramy rejestrowano w trybie fluorescencji przy długości fali $\lambda = 366$ nm. Numeracja sygnałów na chromatogramach odpowiada pikom chromatograficznym przedstawionym w Tab. 6 [116].





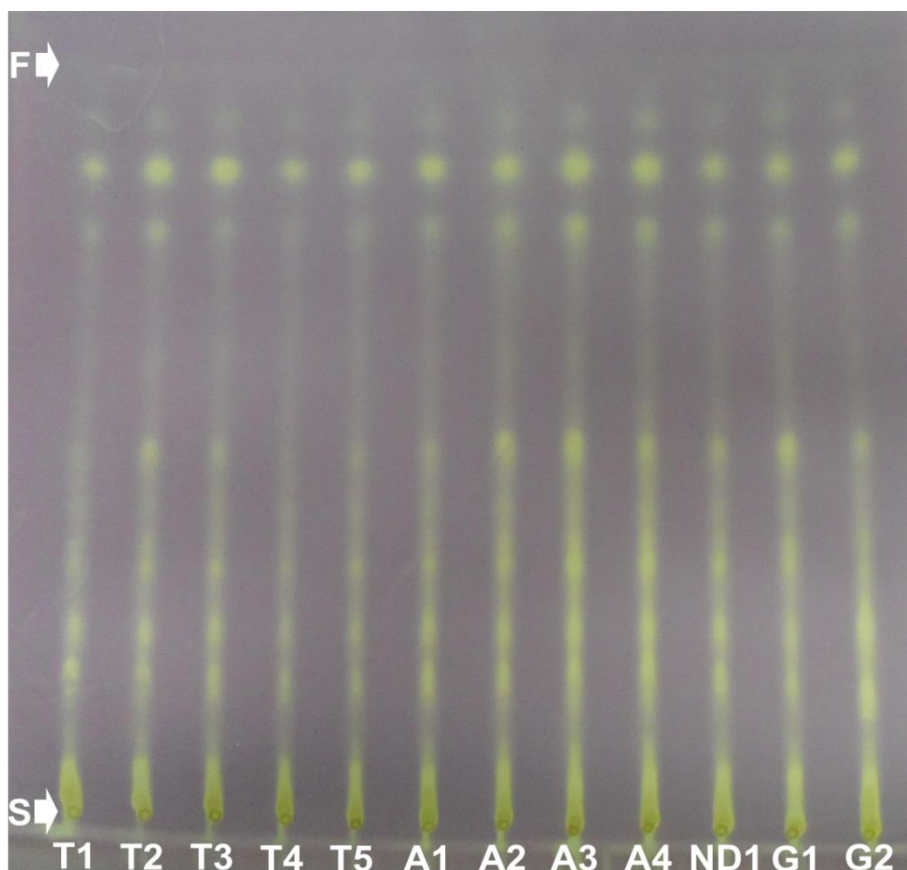
Rys. 23. Graficzne porównanie: **(a)** sumy wysokości pików chromatograficznych wszystkich dwunastu ekstraktów próbek *C. incanus* L.; **(b)** średniej sumy wysokości pików chromatograficznych dla próbek o tym samym pochodzeniu geograficznym [116].

4.3 Określenie aktywności antyoksydacyjnej wodno-metanolowych ekstraktów *C. incanus* L. [116]

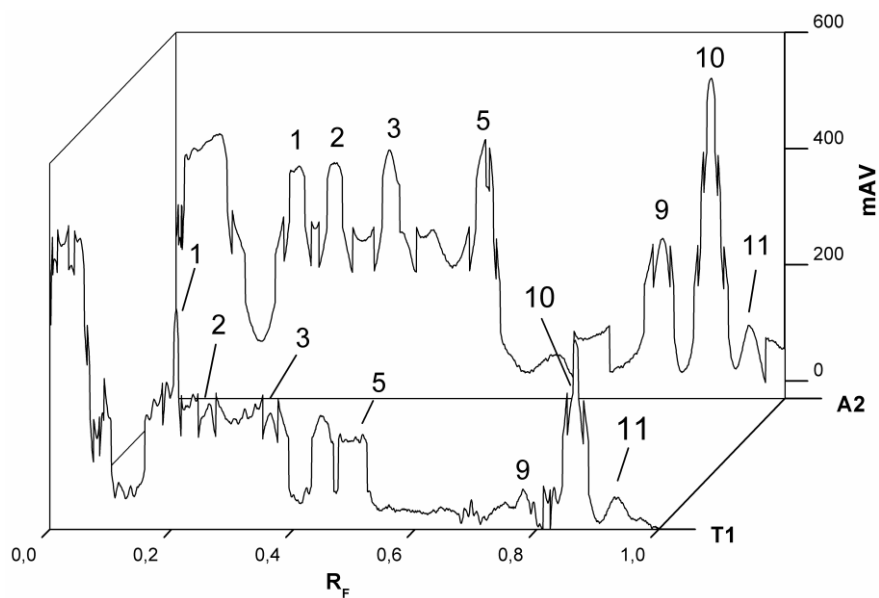
Ekstrakty roślin leczniczych są skomplikowanymi mieszaninami, składającymi się nawet z tysiąca różnych związków, z których nie wszystkie są równie aktywne pod względem biologicznym. W trakcie określania autentyczności i jakości fitofarmaceutyków w pierwszej kolejności brane są pod uwagę ich profile chromatograficzne oraz zawartość najbardziej aktywnych składników tych preparatów. Dlatego drugi etap badań dotyczył określenia zdolności do wymiatania wolnych rodników przez rozdzielone w pierwszym etapie frakcje uzyskane z wodno-metanolowych ekstraktów czystka. Aktywność antyoksydacyjna naparów *C. incanus* jest wymieniana i promowana przez firmy zajmujące się sprzedażą preparatów ziołowych czystka jako główna zaleta stosowania tej rośliny. Celem określenia właściwości antyoksydacyjnych badanych próbek czystka rozwinięte przy pomocy mieszaniny octanu etylu - dichlorometan - kwas mrówkowy - kwas octowy - woda, 100:10:10:10:11 (v/v/v/v/v) chromatogram wywoływano roztworem DPPH, którego zadaniem była wizualizacja pasm zawierających substancje o właściwościach antyoksydacyjnych.

Na wywołanych roztworem DPPH chromatogramach można wyróżnić 7 pasm chromatograficznych wykazujących właściwości antyoksydacyjne. Tak jak w przypadku chromatogramów przed wywołaniem roztworem DPPH, tak i po ich wywołaniu widać, że poszczególne ekstrakty czystka różnią się pod kątem zawartości związków o właściwościach antyoksydacyjnych. Pod względem jakościowym, obserwacje te przedstawiono na Rys. 24, a także zaprezentowano ilościowo na Rys. 25 i Tab. 7.

W Tab. 7 przedstawiono wyniki ilościowe ilustrujące zarówno właściwości antyoksydacyjne poszczególnych pasm chromatograficznych rozdzielonych techniką TLC, jak i ogólny efekt przeciwutleniający badanych próbek. Tak jak w poprzednim etapie, każdy ekstrakt poddano analizie chromatograficznej w trzech powtórzeniach ($n = 3$), a przedstawione wartości stanowią uśrednione wyniki ze wszystkich powtórzeń. Względne odchylenie standardowe (RSD) uzyskanych wartości sygnałów chromatograficznych ($n = 3$) nie przekroczyło $\pm 20\%$.



Rys. 24. Profile aktywności antyoksydacyjnej dwunastu ekstraktów *C. incanus* L.. Rejestracja zdjęć w świetle widzialnym po wizualizacji 0,20% roztworem DPPH. Strzałkami zaznaczono linię startu (S) oraz czoło fazy ruchomej (F) [116].



Rys. 25. Porównanie densytogramów ekstraktów próbek T1 i A3 otrzymanych po wizualizacji 0,20% roztworem DPPH. Numeracja sygnałów na chromatogramach odpowiada pikom chromatograficznym przedstawionym w Tab. 6 [116].

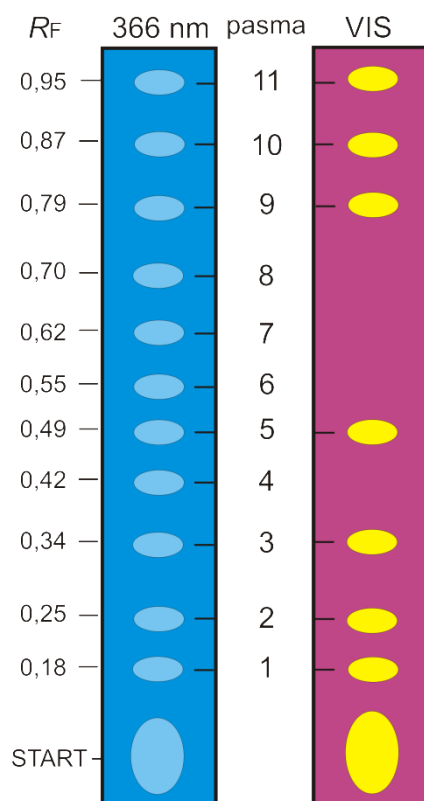
Tab. 7. Wyniki analizy densytometrycznej chromatogramów otrzymanych dla dwunastu ekstraktów czystka po wizualizacji 0,20% roztworem DPPH. Przedstawione zostały: średnie współczynniki retardacji R_F rozdzielonych pików chromatograficznych, wysokości pików dla każdego indywidualnego fingerprintu [mAV] oraz suma wysokości wszystkich rozdzielonych pików [mAV]. Numeracja sygnałów jest zgodna z Tab. 6 [116].

| Nr piku | R_F | Wysokość pików [mAV] | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|-------|----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| | | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | A1 | A2 | A3 | A4 | ND1 | G1 | G2 |
| 1 | 0,18 | 265 | 111 | 158 | 187 | 182 | 252 | 214 | 124 | 75 | 149 | 129 | 134 |
| 2 | 0,26 | 78 | 76 | 76 | 79 | 79 | 212 | 172 | 77 | 77 | 192 | 78 | 229 |
| 3 | 0,36 | 162 | 77 | 74 | 158 | 160 | 171 | 209 | 229 | 245 | 201 | 214 | 76 |
| 5 | 0,49 | 76 | 321 | 217 | - | 77 | 198 | 280 | 312 | 289 | 240 | 352 | 181 |
| 9 | 0,80 | 111 | 235 | 80 | 154 | 82 | 195 | 230 | 367 | 234 | 276 | 179 | 95 |
| 10 | 0,88 | 389 | 560 | 589 | 423 | 390 | 398 | 502 | 544 | 516 | 394 | 321 | 203 |
| 11 | 0,97 | 76 | 76 | 77 | - | 78 | 78 | 83 | 67 | 162 | 58 | - | - |
| Suma wysokości pików [mAV] | | 1157 | 1457 | 1272 | 1000 | 1048 | 1504 | 1691 | 1721 | 1599 | 1511 | 1273 | 919 |

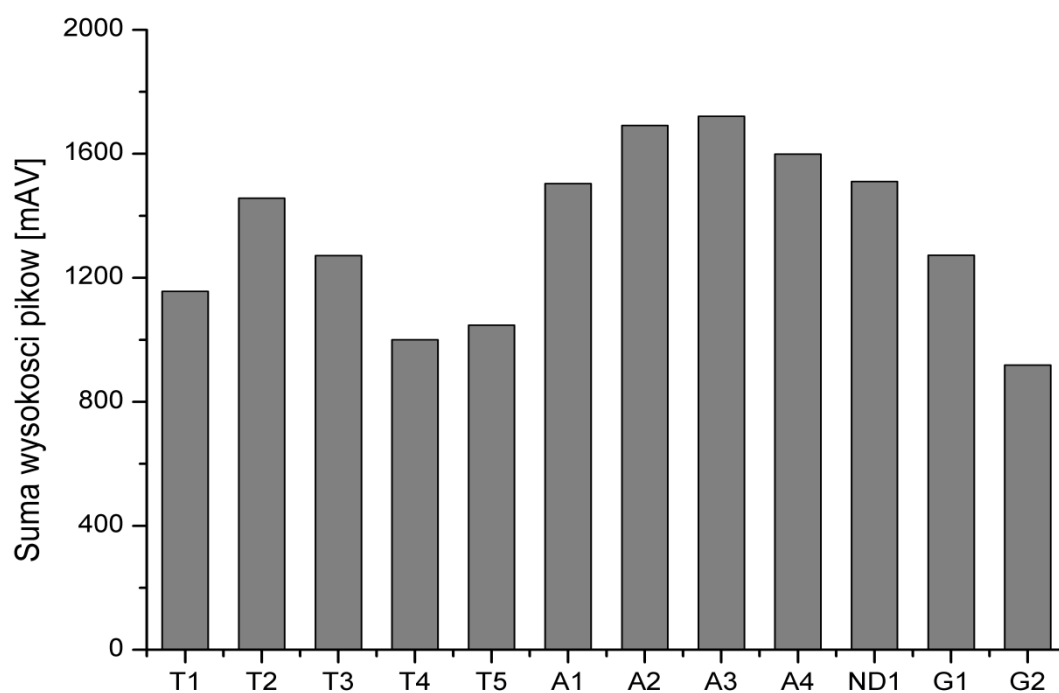
Analizując wyniki uzyskane metodą TLC-DPPH stwierdzono, że większość z nich wykazuje zdolność do wygaszania wolnych rodników. Rys. 26 stanowi schematyczne porównywanie chemicznych i biologicznych odcisków palca ekstraktu *C. incanus* L.. Na rysunku przedstawiona została maksymalna liczba 11 stref rozdzielonych techniką chromatografii cienkowsarstwowej oraz odpowiadająca im liczba 7 stref o właściwościach antyoksydacyjnych. Ze schematu wyraźnie wynika, że strefy 4 i 6-8 nie wykazują aktywności antyoksydacyjnej w teście DPPH.

Porównanie sumy wysokości pików dwunastu ekstraktów czystka, przed i po wywołaniu roztworem DPPH (odpowiednio Rys. 23 i Rys. 27) pokazuje, że próbki materiału roślinnego o dużej ilościowej zawartości wszystkich rozdzielonych pasm chromatograficznych wykazują też większą zawartość związków o właściwościach antyoksydacyjnych, natomiast próbki o mniejszej ilościowej zawartości wykazują odpowiednio mniejszy potencjał antyoksydacyjny.

Analizując otrzymane chromatogramy i densytogramy (Rys. 24 i Rys. 25), można zauważyć, że znaczna część związków o właściwościach antyoksydacyjnych wykazuje duże powinowactwo do fazy stacjonarnej i jest zatrzymywana na starcie płytki chromatograficznej. Ponieważ zastosowana w badaniu faza ruchoma charakteryzuje się stosunkowo wysoką mocą elucyjną, w związku z tym można wnioskować, że pozostające na stracie substancje należą do związków o względnie bardzo wysokiej polarności.



Rys. 26. Schematyczne porównanie chemicznych (jasnoniebieskie pasma na granatowym tle) i biologicznych (żółte pasma na fioletowym tle) odcisków palca ekstraktu z *C. incanus* [116].



Rys. 27. Graficzne porównanie sumy wysokości pików chromatograficznych dwunastu ekstraktów próbek *C. incanus* po wizualizacji 0,20% roztworem DPPH [116].

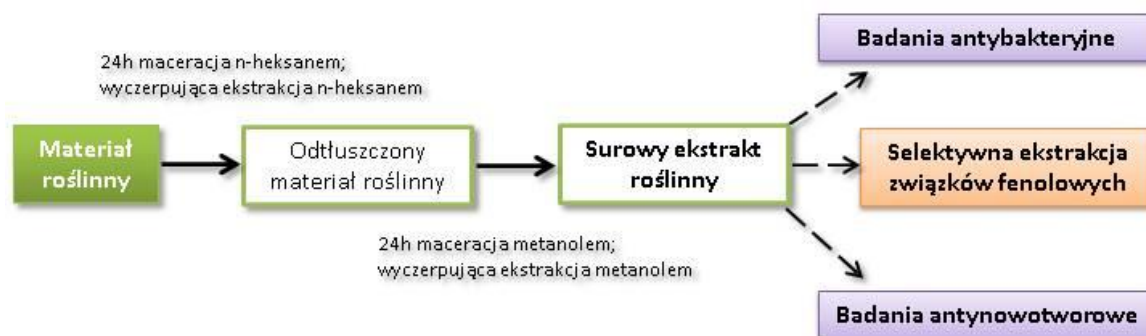
Ponadto można stwierdzić, że chromatograficzne „odciski palca” próbek *C. incanus* otrzymane w tym badaniu, charakteryzują się dobrze rozdzielonymi pikami, niskim poziomem szumów oraz powtarzalnością. W związku z tym proponowaną procedurę (w tym wstępne oczyszczanie (odtłuszczenie heksanem) próbek w aparacie Soxhleta, a następnie zastosowanie systemu ekstrakcji ASE z ustalonymi chemometrycznymi warunkami ekstrakcji (*rozdział 4.1.1*)) można zastosować jako modelowe podejście do szybkiego przesiewowego badania i kontroli jakości sprzedawanych próbek *Cistus incanus* L. pod względem liczby i zawartości poszczególnych oddzielonych frakcji oraz ich aktywności przeciwutleniającej.

5. ANALIZA FRAKCJI NIELOTNEJ - WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWBAKTERYJNE

5.1 Ekstrakcja i analiza chromatograficzna – metodyka badań

5.1.1 Wyczerpująca ekstrakcja w aparacie Soxhleta – surowy ekstrakt

10 g drobno sproszkowanych próbek handlowych czystka umieszczano w gilzie filtracyjnej w aparacie Soxhleta i poddawano 24-godzinnej maceracji, a następnie wyczerpującej ekstrakcji *n*-heksanem. Proces ten miał na celu usunięcie lipidów oraz barwników z materiału roślinnego. Ekstrakt *n*-heksanu odrzucano i po wysuszeniu (w temperaturze otoczenia) gilzy filtracyjnej z surowcem roślinnym, przeprowadzano 24-godzinną macerację metanolem. Po tym czasie wykonano wyczerpującą ekstrakcję w aparacie Soxhleta z użyciem metanolu otrzymując 10 ml surowego ekstraktu roślinnego. Proces ekstrakcji *n*-heksanem oraz metanolem prowadzono do momentu uzyskania bezbarwnego rozpuszczalnika w części ekstrakcyjnej aparatu Soxhleta. Otrzymane surowe metanolowe ekstrakty (SME) użyto do badań ich właściwości przeciwbakteryjnych i antynowotworowych (badania zostaną omówione w rozdziale 6) oraz poddano procedurze selektywnej wieloetapowej ekstrakcji związków fenolowych. Schemat otrzymywania surowego metanolowego ekstraktu wraz z wykazem prowadzonych przy jego użyciu badań przedstawiono na Rys. 28.



Rys. 28. Schemat otrzymywanie surowych metanolowych ekstraktów handlowych próbek *C. incanus*.

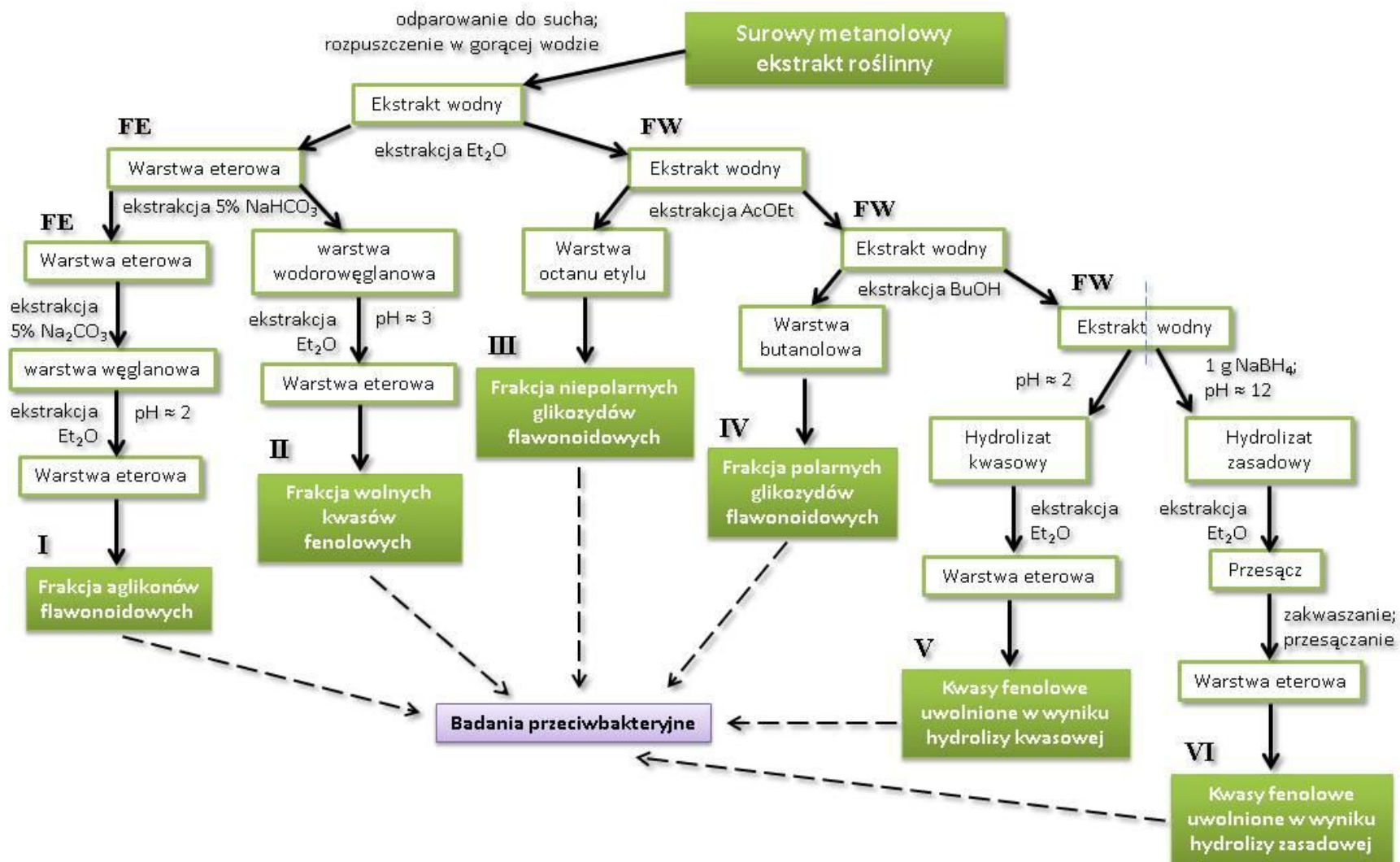
5.1.2 Wielostopniowa ekstrakcja związków fenolowych – frakcje fenolowe I-VI

Zastosowanie do procesu ekstrakcji silnych ekstrahentów (takich, jak metanol lub jego wodny roztwór) zapewnia wysoką wydajność wyodrębniania z materiału roślinnego związków fenolowych, takich, jak elagotanniny, flawanole i glikozylowane flawonole. Otrzymaną złożoną mieszaninę składników ziołowych z powodzeniem można podać analizie TLC połączonej z przesiewowymi testami biologicznymi. Informatywność takiego pojedynczego bioautogramu ma jednak swoje ograniczenia i zazwyczaj nie pozwala na identyfikację związków o poszukiwanych właściwościach biologicznych.

W celu uzyskania szczegółowych informacji o badanym metanolem ekstrakcie **SME** oraz zawartych w nim aktywnych biologicznie związkach wykorzystano selektywną, wieloetapową ekstrakcję materiału ziołowego, umożliwiającą rozdzielenie fenoli roślinnych na sześć różnych frakcji, w tym na aglikony flawonoidów (**I**), wolne kwasy fenolowe (**II**), niepolarne glikozydy flawonoidowe (**III**), polarne glikozydy flawonoidowe (**IV**) oraz kwasy fenolowe otrzymane w wyniku hydrolizy kwasowej (**V**) i zasadowej (**VI**). Szczegółową procedurę selektywnej wieloetapowej ekstrakcji kwasów fenolowych i flawonoidów opracowano na podstawie danych literaturowych [123]–[126]. Schemat procedury przedstawiono na Rys. 29.

Otrzymany w wyniku wyczerpującej ekstrakcji metanolem surowy ekstrakt roślinny (**SME**) odparowano do sucha w rotacyjnej wyparce próżniowej w temperaturze 50 °C. Suchą pozostałość przemyto czterokrotnie 25-ml porcjami gorącej wody, a następnie roztwory wodne połączono i pozostawiono w lodówce na 24 godziny. Po tym czasie roztwór wodny przesączono w celu oddzielenia osadu zawierającego materiały balastowe i ekstrahowano porcjami po 20 ml eteru dietylowego do momentu aż kolejna porcja eteru pozostawała bezbarwna. W ten sposób uzyskano frakcję eterową (**FE**) i pozostały ekstrakt wodny (**FW**), który pozostawiono do dalszych etapów ekstrakcji.

Następnie frakcję eterową (**FE**) ekstrahowano 20-ml porcjami 5% wodorowęglanu sodu w celu przekształcenia kwasów fenolowych w rozpuszczalne w wodzie sole. Ekstrakcję prowadzono do momentu aż kolejna użyta porcja ekstrahenta pozostawała bezbarwna. Pozostałą po ekstrakcji wodorowęglanem frakcję eterową **FE** ponownie ekstrahowano 20-ml porcjami 5% węglanu sodu do momentu, aż kolejna porcja węglanu pozostawała bezbarwna.



Rys. 29. Schemat procedury wieloetapowej ekstrakcji związków fenolowych (opracowanej na podstawie [123]–[126]).

Pozostałą po ekstrakcjach warstwę eterową odrzucono, a warstwę wodnego węglanu sodu zakwaszono 18% kwasem chlorowodorowym do $\text{pH} = 2$. Zakwaszony roztwór poddano ekstrakcji porcjami po 20 ml eteru dietylowego, do momentu zachowania barwy czystego ekstrahenta. Połączone ekstrakty eteru dietylowego osuszono bezwodnym siarczanem (VI) sodu, przesączono, a następnie odparowano do sucha w rotacyjnej wyparce próżniowej. Suchą pozostałość rozpuszczono w metanolu i przeniesiono ilościowo do kolby miarowej o pojemności 10 ml. W ten sposób uzyskano frakcję **I**, która powinna zawierać **aglikony flawonoidowe**.

Uzyskaną w poprzednim etapie warstwę roztworu wodorowęglanu zakwaszono 18% kwasem chlorowodorowym do $\text{pH} = 3$, celem uwolnienia kwasów fenolowych. Otrzymany roztwór ekstrahowano 20-ml porcjami eteru dietylowego, do momentu aż kolejna porcja eteru pozostawała bezbarwna. Połączone ekstrakty eteru dietylowego osuszono bezwodnym siarczanem (VI) sodu, poddano procesowi filtracji i odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Powstały po odparowaniu rozpuszczalnika osad rozpuszczono w metanolu i przeniesiono ilościowo do kolby miarowej o pojemności 10 ml. Wyodrębniona tym sposobem frakcja **II** zawiera mieszaninę **wolnych kwasów fenolowych**.

Pozostałą po pierwszej ekstrakcji z eterem dietylowym frakcję wodną (**FW**) poddano dalszemu procesowi ekstrakcji. Ekstrakcję prowadzono octanem etylu (20 ml porcja), do momentu aż kolejna porcja ekstrahenta pozostawała bezbarwna. Pozostałą po ekstrakcji z octanem etylu frakcję wodną (**FW**) poddano analogicznej ekstrakcji z wykorzystaniem 1-butanolu, jako ekstrahenta.

Otrzymane w wyniku tych ekstrakcji warstwy organiczne (octanu etylu i butanolowa) osuszono bezwodnym siarczanem (VI) sodu, przesączono i odparowano do sucha w wyparce próżniowej. Suche pozostałości rozpuszczono w metanolu i umieszczono w kolbach miarowych o pojemności 10 ml. Otrzymano w ten sposób frakcję **III** (warstwa octanu etylu) zawierającą głównie **niepolarne glikozydy flawonoidowe** oraz frakcję **IV** (warstwa butanolowa), której składnikami są **polarne glikozydy flawonoidowe**.

Pozostałą po ekstrakcjach frakcję wodną (**FW**) podzielono na dwie równe części, z których jedną poddano hydrolizie kwasowej w celu uwolnienia kwasów fenolowych związanych glikozydowo, a drugą hydrolizie zasadowej, w celu uwolnienia kwasów fenolowych związanych estrowo. Hydrolizę kwasową przeprowadzono w następujący sposób: frakcję wodną (**FW**) zakwaszono 36% kwasem chlorowodorowym do $\text{pH} = 2$

i ogrzewano w łaźni olejowej pod chłodnicą zwrotną. Całość utrzymywano w stanie wrzenia przez 1 godzinę. Po tym czasie hydrolizat ochłodzono, a następnie ekstrahowano 20-ml porcjami eteru dietylowego do momentu, aż kolejna zastosowana porcja eteru pozostawała bezbarwna. Połączone ekstrakty eteru dietylowego osuszono bezwodnym siarczanem (VI) sodu, poddano procesowi filtracji i odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchą pozostałość rozpuszczono w metanolu i przeniesiono ilościowo do kolby miarowej o pojemności 10 ml. Otrzymano w ten sposób frakcję **V** składającą się z **kwasów fenolowych, uwolnionych w wyniku hydrolizy kwasowej**.

Do drugiej części frakcji wodnej (**FW**) dodano 1 g borowodoru sodu (NaBH_4) celem ochrony kwasów fenolowych przed utlenianiem. Następnie roztwór zalkalizowano 10% wodorotlenkiem baru do $\text{pH} = 12$. Całość utrzymywano w stanie wrzenia na łaźni olejowej pod chłodnicą zwrotną przez 1 godzinę. Po ostudzeniu hydrolizat zobojętniono 10% wodnym roztworem kwasu siarkowego (VI), a w późniejszym etapie zakwaszono stężonym kwasem siarkowym (VI) do $\text{pH} = 1,5$. Wytrącony siarczan (VI) baru odsączono, a przesącz ekstrahowano 20-ml porcjami eteru dietylowego. Ekstrakcję prowadzono do momentu, aż kolejna porcja eteru zachowywała swoją pierwotną barwę. Połączone ekstrakty eteru dietylowego wysuszono bezwodnym siarczanem (VI) sodu i przepuszczono przez sączek. Rozpuszczalnik oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a suchą pozostałość rozpuszczono w metanolu i przeniesiono ilościowo do kolby miarowej o pojemności 10 ml. Wyodrębniono w ten sposób frakcję **VI** zawierającą **kwasy fenolowe uwolnione w wyniku hydrolizy zasadowej**.

Tab. 8. Charakterystyka frakcji otrzymanych w wyniku wielostopniowej ekstrakcji związków fenolowych.

| Fracja | Grupa związków | Charakterystyka |
|------------|----------------------------|---|
| I | aglikony flawonoidowe | wolna forma występująca w roślinach |
| II | wolne kwasy fenolowe | wolna forma występująca w roślinach |
| III | glikozydy flawonoidowe | mało polarne glikozydy flawonoidowe uzyskane w wyniku ekstrakcji za pomocą octanu etylu |
| IV | glikozydy flawonoidowe | polarne glikozydy flawonoidowe uzyskane w wyniku ekstrakcji za pomocą n-butanolu |
| V | związane kwasy fenolowe | kwasów fenolowych, uwolnionych w wyniku hydrolizy kwasowej |
| VI | związane kwasy fenolowe | kwasy fenolowe uwolnione w wyniku hydrolizy zasadowej |

5.1.3 Warunki analizy chromatograficznej zastosowanej do rozdzielenia surowych metanolowych ekstraktów *C. incanus* oraz sześciu frakcji (I-VI) uzyskanych metodą wielostopniowej ekstrakcji związków fenolowych

Analizę techniką chromatografii cienkowarstwowej przeprowadzono w komorach chromatograficznych typu Twin Trough Chamber 20 cm x 10 cm (CAMAG, Muttenz, Szwajcaria). Próbkę nanoszono aplikatorem próbek Linomat IV (CAMAG) w postaci 6 lub 7 mm pasm na płytkach chromatograficznych pokrytych żelazem krzemionkowym Si60 F₂₅₄ TLC (20 cm × 10 cm; Merck, Darmstadt, Niemcy) w odległości 8 mm od dolnej krawędzi płytki. Jako fazę ruchomą użyto mieszaninę chloroform - metanol - octan etylu (75:15:10, v/v/v). Przed przystąpieniem do analizy komorę chromatograficzną nasycano przez 10 minut parami fazy ruchomej. Chromatogramy rozwijano do wysokości 75 lub 80 mm, suszono przez 5 minut strumieniem zimnego powietrza i fotografowano pod lampą UV ($\lambda = 254$ lub 365 nm) (CAMAG).

5.1.4 Wywoływanie płytek TLC

Chromatogramy wizualizowano przez zanurzenie płytki chromatograficznej w roztworze odpowiedniego odczynnika derywatyżującego:

- chlorku glinu (1% metanolowy roztwór),
- chlorku żelaza (III) (0,5 g FeCl₃ w 2,5 ml wody i 47,5 ml etanolu),
- NP-PEG (0,5% metanolowy roztwór NP, a po wysuszeniu zanurzenie w 5% etanolowym roztworze PEG),
- PABA (0,5 g kwasu p-aminobenzoesowego w 18 ml lodowatego kwasu octowego rozcieńczonego w 20 ml wody, z dodatkiem 1 ml kwasu o-fosforowego i 60 ml acetonu). Po derywatyżacji odczynnikiem PABA następowało zanurzenie płytki w mieszaninie *n*-heksan-parafina (1:2, v/v),
- DPA (1 g aniliny i 1 g difenylaminy w 100 ml acetonu i 10 ml kwasu ortofosforowego, ogrzewano przez 5 minut w 110 °C).

Strefy fluorescencji uzyskane przy pomocy tych odczynników rejestrowano w świetle UV przy $\lambda = 365$ nm. Wyjątek stanowił roztwór chlorku żelaza (III) w przypadku którego efekt derywatywacji rejestrowano w zakresie światła widzialnego.

5.1.5 Bezpośrednia bioautografia - TLC

Do testów biologicznych prowadzonych bezpośrednio na płytkach TLC użyto:

- Gram-dodatniej bakterii glebowej *Bacillus subtilis* (F1276; dostarczona przez Józsefa Farkasa, Central Food Research Institute, Budapeszt, Węgry),
- Gram-ujemnej, naturalnie świecącej bakterii morskiej *Aliivibrio fischeri* (DSM-7151, Niemiecka kolekcja mikroorganizmów i kultur komórkowych, Berlin, Niemcy).

Testy mikrobiologiczne z użyciem bakterii *B. subtilis* i *A. fischeri*, przeprowadzono metodą TLC-DB opisaną odpowiednio w pracach [9], [19] oraz [127].

Test *B. subtilis*

Rozwinięte i wysuszone chromatogramy zanurzono w zawiesinie komórek bakteryjnych *B. subtilis* i inkubowano przez 2 godziny w komorze parowej (28 °C, 100% wilgotności). Bioautogramy wizualizowano przez zanurzenie ich w wodnym roztworze barwnika tetrazoliowego MTT (1 mg·ml⁻¹) oraz 0,5 godziną inkubację. Jedynie metabolicznie aktywne (żywe) komórki mogą zredukować żółty MTT do fioletowego formazanu MTT i dlatego związki hamujące wzrost bakterii pojawiają się jako jasne strefy na fioletowym tle. Bioautogramy dokumentowano aparatem cyfrowym Cybershot DSC-HX60.

Test *A. fischeri*

Rozwinięte i wysuszone płytki chromatograficzne z rozdzielonymi podczas analizy substancjami, zanurzono w zawiesinie komórek bakteryjnych *A. fischeri*. Następnie płytki zamykano w szklanej komorze o znacznej wilgotności powietrza i dokumentowano natychmiast przy pomocy schłodzonej kamery IS-4000 (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA) przy czasie ekspozycji 2 min. Ciemne strefy na jasnym tle wskazują na działanie przeciwbakteryjne związków zawartych w odpowiednich pasmach chromatograficznych.

5.2. Identyfikacja związków aktywnych biologicznie – metodyka badań

5.2.1 Izolacja związków o właściwościach przeciwbakteryjnych, występujących we frakcji I

W celu izolacji pasm chromatograficznych zawierających aktywne biologicznie związki, na płytki nanoszono 130- μ l porcje frakcji fenolowej I (w postaci 80 mm pasm; próbki A1 i T3). Po rozwinięciu, odpowiednie pasma (od c1 do c4 z próbki A1/I oraz c5 i c6 z T3/I) oraz próbkę tła (kontrola, #) zdrapano z powierzchni płytki i umieszczano w strzykawce. Substancje czynne ze zdrapanej fazy stacjonarnej eluowano 300- μ l porcją etanolu, który przepuszczono przez nylonowy filtr strzykawkowy (0,22 μ m, Phenomenex, Torrance, CA, USA).

Celem identyfikacji związków aktywnych biologicznie zawartych w pasmach od c1 - c4 część otrzymanego eluatu poddano procesowi kwasowej hydrolizy. Hydrolizę wyodrębnionych z płytki chromatograficznej związków przeprowadzono w probówkach Eppendorf przez zmieszanie 80 μ l eluatu, 20 μ l wody i 20 μ l 38% kwasu chlorowodorowego, a następnie ogrzewanie na łaźni wodnej przez 30 minut w temperaturze 80 ° C. Eluat oraz eluat po hydrolizie analizowano stosując odpowiednie techniki chromatograficzne (HPLC i HPTLC).

5.2.2 Analiza techniką HPLC-DAD-ESI-MS

Związki obecne w strefach bioaktywnych analizowano przy użyciu układu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją masową z pojedynczym kwadrupolem (model LC-MS-2020, Shimadzu, Kyoto, Japonia) wyposażonego w binarną pompę gradientową, odgazowywacz, automatyczny podajnik próbek, termostat kolumnowy, detektor z matrycą diodową oraz analizator mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie (ESI ang. Electrospray ionization). Dane uzyskane w trakcie analizy rejestrowano i opracowywano używając oprogramowania LabSolutions 5.72v (Shimadzu, Kyoto, Japonia). Rozdział prowadzono na kolumnie Kinetex C18 (100 mm \times 3 mm, 2,6 μ m) zabezpieczonej prekolumną Phenomenex C18 (4 mm \times 3 mm) w temperaturze 35 °C. Eluentem A był 5% roztwór acetonitrylu z 0,05% kwasem mrówkowym, eluent B stanowił acetonitryl z 0,05% kwasem mrówkowym. Natężenie przepływu eluentu wynosiło 0,8 ml \cdot min⁻¹ z następującym gradientem 0-2 min, 10-30% B; 2-10 min, 30-35% B; 10-11 min, 35-100% B; 11-14 min, 100% B i 14-17 min, 10% B. Objętość nastrzyku

mieściła się w przedziale od 1 do 5 μl . Warunki pracy źródła jonów ESI były następujące: temperatura 350 °C; napięcie 4,5 kV, temperatura linii desolvacyjnej 250 °C; temperatura bloku grzewczego 400 °C; natężenie przepływu gazu rozpylającego (N_2) 1,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, natężenie gazu suszącego 15 $\text{dm}^3\cdot\text{min}^{-1}$. Widma pełnego skanowania masy rejestrowano w trybach dodatniej i ujemnej jonizacji w zakresie m/z 100-2000.

5.2.3 Układy chromatograficzne HPTLC zastosowane do detekcji związków występujących w frakcji I w postaci koniugatów glukozy lub kemferolu

MD-HPTLC

Obecność koniugatów glukozy (glikozydów) w strefach przeciwbakteryjnych została potwierdzona przez rozwijanie izolowanych związków oraz wzorca glukozy na płytkach chromatograficznych HPTLC pokrytych żel krzemionkowym modyfikowanym aminą. Przed rozwinięciem, badane związki hydrolizowano *in situ* na powierzchni fazy stacjonarnej, a następnie rozwijano dwukrotnie, odpowiednio acetonitrylem i mieszaniną acetonitrylu z wodą. Sygnał fluorescencyjny uwolnionej w wyniku hydrolizy glukozy powstawał w wyniku reakcja Maillarda, zachodzącej pomiędzy cukrem a grupami NH_2 płytki HPTLC. Efekt fluorescencji wzmocniono parafiną [128]. Szczegółowe kroki tej procedury podano w Tab. 9.

Tab. 9. Kolejne etapy analizy HPTLC na żelu krzemionkowym modyfikowanym aminą 60 F_{254S} połączonej z hydrolizą kwasową *in situ* w celu potwierdzenia obecności glukozy w związkach aktywnych.

| | |
|-----|--|
| 1. | Nanoszenie na płytkę wyizolowanych związków |
| 2. | Inkubacja płytki w parach HCl przez 10 minut (hydroliza) |
| 2a. | Ogrzewanie przez 8 min w 100 °C (pod przykryciem) |
| 2b. | Ogrzewanie przez 2 min w 100 °C (bez przykrycia) |
| 3. | Rozwijanie wstępne acetonitrylem do 75 mm |
| 4. | Suszenie przez 5 minut strumieniem zimnego powietrza |
| 5. | Rozwijanie acetonitrylem z wodą (7:3, v/v) do 75 mm |
| 6. | Suszenie przez 5 minut strumieniem zimnego powietrza |
| 7. | Ogrzewanie przez 20 minut w 170 °C |
| 8. | Zanurzenie w mieszaninie parafina - <i>n</i> -heksan (1:2, v/v) i suszenie |

2D-HPTLC

Potwierdzenie obecności kemferolu i glukozy jako składników związków obecnych w pasmach chromatograficznych o właściwościach przeciwbakteryjnych odbywało się metodą 2D-HPTLC. Co ważne, metoda ta nie wymagała wcześniejszej izolacji związków z frakcji **I** i prowadzona była dla całego profilu chromatograficznego frakcji. W celu rozdziału związków wykorzystano płytki chromatograficzne HPTLC pokryte żelom krzemionkowym (10 cm x 10 cm). Do rozwinięcia frakcji flawonoidów **I** w pierwszym kierunku stosowano fazę ruchomą chloroform - metanol - octan etylu (75:15:10, v/v/v). Po tym rozwinięciu prowadzono hydrolizę kwasową *in situ* (w parach HCl) na powierzchni fazy stacjonarnej, a następnie chromatogram rozwijano w kierunku ortogonalnym do pierwszego stosując, jako fazę ruchomą: toluen - octan izopropylu - kwas mrówkowy (wykrywanie kemferolu Tab. 10b) lub acetonitryl, a następnie mieszaniny acetonitryl – woda (wykrywanie glukozy Tab. 10a). Wzorce kemferolu i glukozy nanoszono na wysokości płytki równej 80 mm, tuż powyżej ścieżki rozwijania frakcji **I**, aby umożliwić ich prawidłową elucję podczas drugiego rozwijania. Szczegółowe kroki tych procedur przedstawiono w Tab. 10.

Tab. 10. Kolejne etapy dwukierunkowej analizy HPTLC na żelu krzemionkowym 60 F_{254S} połączonej z hydrolizą kwasową *in situ* w celu potwierdzenia obecności koniugatów glukozy (a) i kemferolu (b) w związkach aktywnych.

| | (a) | (b) |
|----|---|--|
| 1. | Nanoszenie na płytkę frakcji fenolowej I | |
| 2. | Rozwijanie mieszaniną chloroform - metanol - octan etylu (75:15:10, v/v/v) na warstwie żelu krzemionkowego do 75 mm (pierwszy kierunek) | |
| 3. | Inkubacja płytki w parach HCl przez 10 minut | Inkubacja płytki w parach HCl przez 120 minut |
| 4. | Ogrzewanie: 8 min w 100 °C (pod przykryciem); 2 min w 100 °C (bez przykrycia) | Suszenie przez 5 minut strumieniem zimnego powietrza |
| 5. | Rozwijanie wstępne acetonitrylem do 85 mm w kierunku prostopadłym (drugi kierunek) | Rozwijanie mieszaniną toluen – octan izopropylu – kwas mrówkowy (3:2:0,5, v/v/v) do 75 mm w kierunku prostopadłym (drugi kierunek) |
| 6. | Rozwijanie acetonitrylem z wodą 35:10 (v/v) do 70 mm w kierunku prostopadłym (drugi kierunek) | Suszenie przez 5 minut strumieniem zimnego powietrza |
| 7. | Suszenie przez 5 minut strumieniem zimnego powietrza | Derywatywacja chlorkiem glinu |
| 8. | Derywatywacja: PABA (140 °C, 5 min), PABA (140 °C, 5 min)-parafina lub DPA (110 °C, 5 min) | |

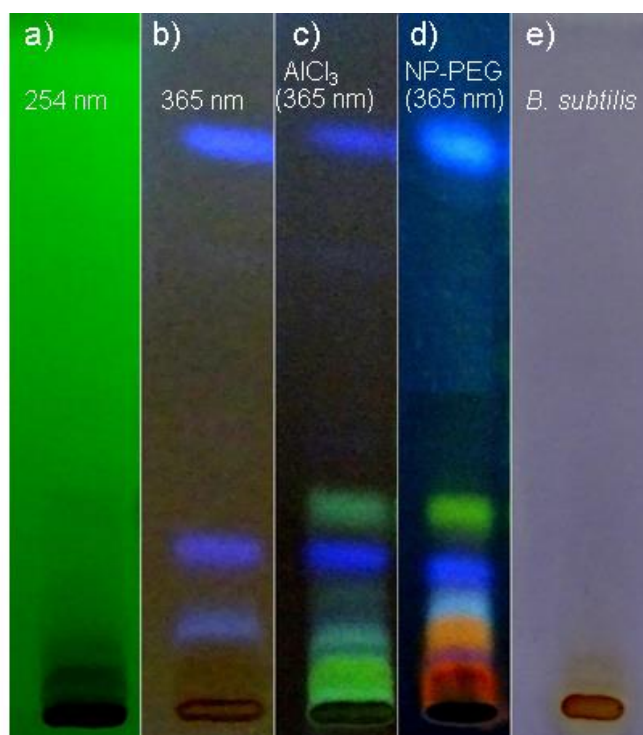
5.3 Analiza chromatograficzna surowych metanolowych ekstraktów *C. incanus* oraz ocena ich potencjału przeciwbakteryjnego [129].

Kolejny etap moich badań dotyczył analizy składu nietlotnej frakcji otrzymanej w wyniku wyczerpującej ekstrakcji metanolem z handlowych próbek *C. incanus* oraz oceny aktywności przeciwbakteryjnej wykazywanej przez tę frakcję.

Chromatograficzny rozdział związków pochodzących z surowych metanolowych ekstraktów **SME** prowadzono na płytkach chromatograficznych pokrytych żelem krzemionkowym, jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę: chloroform - metanol - octan etylu (75:15:10, v/v/v) (Rys. 30). Do tej części badań nie można było zastosować warunków chromatograficznych, opracowanych w analizie TLC-DPPH (rozdział 4). Zawarte w fazie ruchomej tego układu kwasy organiczne (kwas mrówkowy i kwas octowy) posiadają właściwości antybakteryjne, co wpływałoby na wyniki testów mikrobiologicznych.

Duży problem w analizie stanowiła również bogata matryca ekstraktu **SME** uzyskanego w wyniku wyczerpującej ekstrakcji metanolem. Ograniczała ona maksymalną aplikowaną ilość próbki do 5 μ l. Zwiększenie tej ilości powodowało zniekształcenie profili chromatograficznych próbek, co związane było najprawdopodobniej z przeładowaniem adsorbentu w strefie nakładania (zahamowanie zwilżalności strefy nakładania). W przypadku pozostawienia nanoszonej objętości ekstraktu w ilości 5 μ l, otrzymane chromatogramy nie wykazywały strefy zahamowania w teście z bakteriami *B. subtilis* (Rys. 30e). Brak widocznego efektu antybakteryjnego mógł być spowodowany nie przekroczeniem granicy wykrywalności powyższego testu mikrobiologicznego.

W celu rozwiązania tego problemu do dalszych badań przygotowano próbki o zmniejszonej zawartości matrycy, co umożliwiałało nanoszenie większej objętości próbki. Próbki te otrzymano przez odparowanie do sucha (koncentrator SpeedVac ISS 100, Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY, USA) 0,5 ml surowego metanolowego ekstraktu **SME** i następną ekstrakcję pozostałości 0,1 ml etanolu w łaźni ultradźwiękowej, powodując tym samym 5-krotne zagęszczenie wyjściowego ekstraktu. Zastosowanie do badań otrzymanych w ten sposób zagęszczonych ekstraktów *C. incanus* pozwoliło zwiększyć ilość nanoszonego ekstraktu, co przełożyło się na uzyskanie intensywniejszych oraz bogatszych w dodatkowe pasma chromatograficzne (Rys. 31).

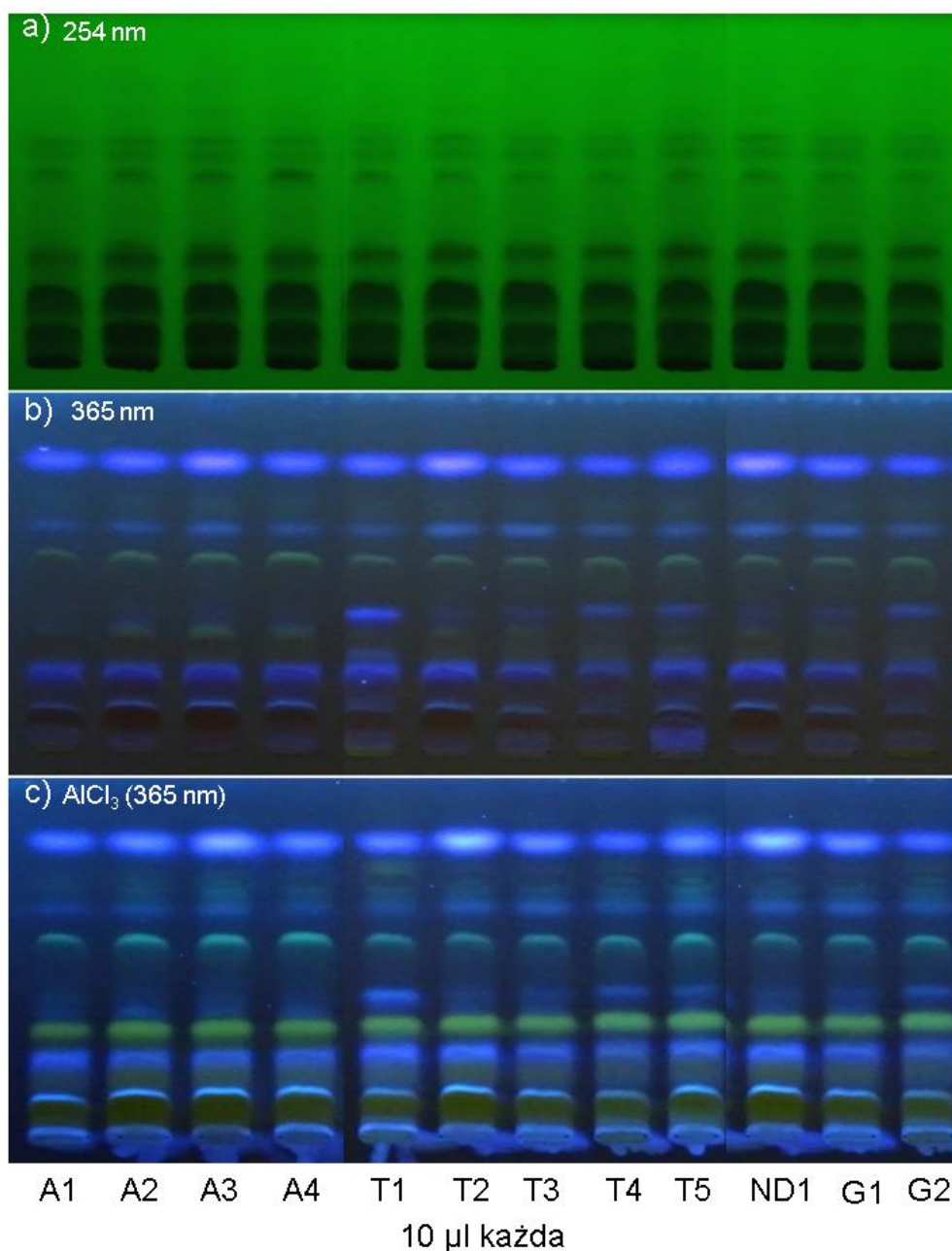


Rys. 30. Chromatogramy surowego metanolowego ekstraktu (SME) próbki A3 (5 μ l na pasmo). Rozdział przeprowadzono na płytkach chromatograficznych pokrytych żelazem krzemionkowym Si60 F₂₅₄, faza ruchoma: chloroform- metanol - octan etylu (75:15:10, v/v/v), wizualizacja: przy UV λ = 254 nm (**a**) i λ = 365 nm (**b**), po derywatywacji chlorkiem glinu przy UV λ = 365 nm (**c**) oraz z reagentem NP-PEG przy UV λ = 365 nm (**d**) test mikrobiologiczny z bakteriami *B. subtilis* (**e**) [129].

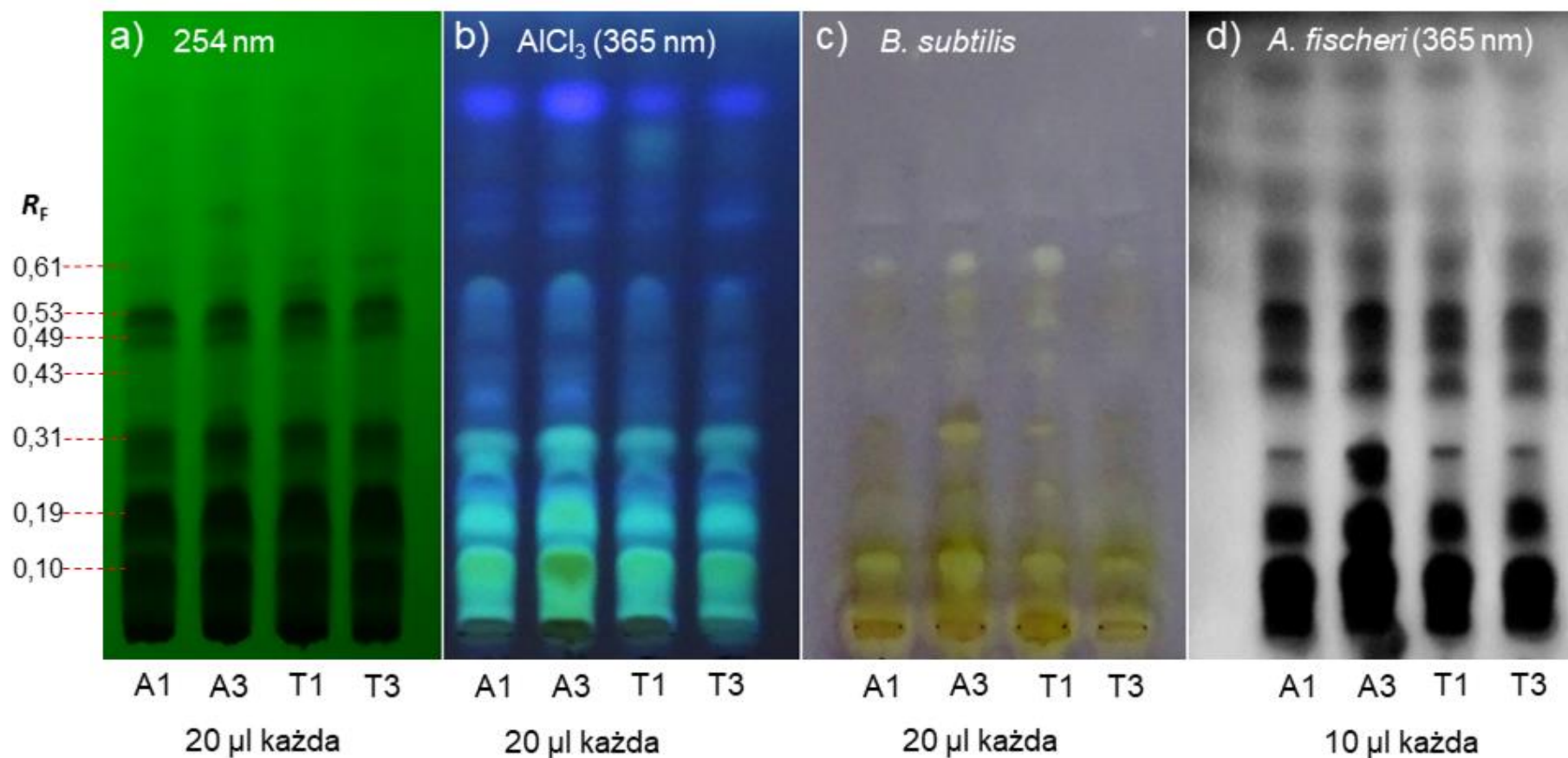
Porównanie chromatogramów 12 zagęszczonych metanolowych ekstraktów otrzymanych z handlowych próbek *C. incanus* wykazało ich duże podobieństwo. Otrzymane chromatogramy bogate były w związki wykazujące fluorescencję pod lampą UV (Rys. 31b), którą można zwiększyć przez spryskanie płytek roztworem chlorku glinu (Rys. 31c). Powstające po derywatywacji chlorkiem glinu żółte strefy odpowiadają najprawdopodobniej flawonoidom. [34].

Do przesiewowych badań metanolowych ekstraktów (odparowanych do sucha i ponownie rozpuszczonych w etanolu) *C. incanus* L., zastosowano połączenie chromatografii cienkowarstwowej z bezpośrednią bioautografią (TLC-DB), celem wykrycia związków wykazujących działanie przeciwbakteryjne wobec *B. subtilis* i/lub *A. fischeri*. Wyniki analizy TLC-DB pokazują że, nie tylko chromatograficzne profile chemiczne poszczególnych ekstraktów, ale także otrzymane bioautogramy (strefy zahamowania wzrostu bakterii w testach przeciwbakteryjnych) były do siebie zbliżone (Rys. 32). Najwięcej związków wykazywało aktywność przeciwbakteryjną wobec

Gram-dodatnim *B. subtilis* oraz Gram-ujemnemu *A. fischeri* w zakresie wartości R_F od 0,10 do 0,61 (Rys. 32c i d). Zastosowanie jako odczynnika derywatyzyjnego roztworu chlorku glinu pozwoliło na zidentyfikowanie w pasmach chromatograficznych o wartościach R_F równych 0,10, 0,19, 0,31 i 0,53 flawonoidów lub ich pochodne (Rys. 32b.).



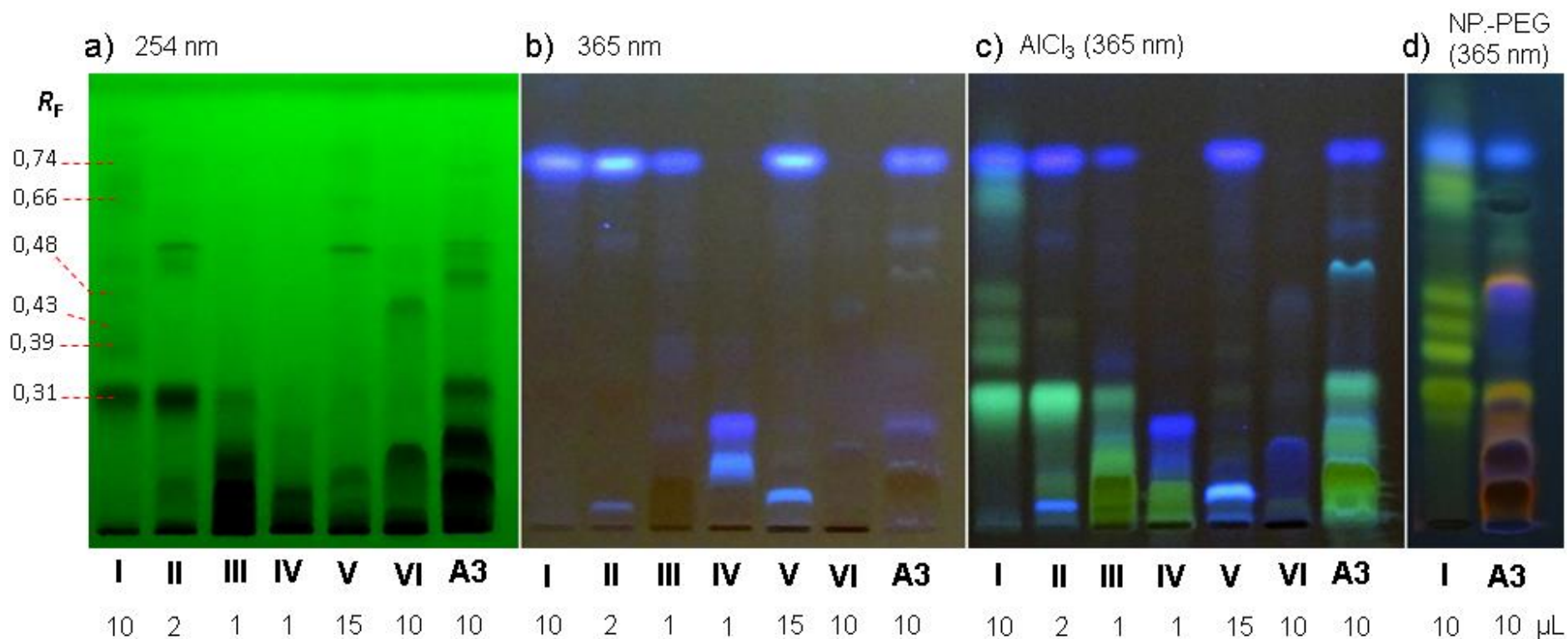
Rys. 31. Chromatogramy zagęszczonych surowych metanolowych ekstraktów *C. incanus*. Rozdział przeprowadzono na płytkach chromatograficznych pokrytych żel krzemionkowym Si60 F₂₅₄, faza ruchoma: chloroform - metanol - octan etylu (75:15:10, v/v/v), wizualizacja: przy UV $\lambda = 254$ nm (a) i $\lambda = 365$ nm (b), po derywatywacji $AlCl_3$ przy UV $\lambda = 365$ nm (c) [129].



Rys. 32. Wybrane chromatogramy TLC związków bioaktywnych, zawartych w zagęszczonych surowych metanolowych ekstraktach *C. incanus*. Rozdział przeprowadzono na płytkach chromatograficznych pokrytych żel krzemionkowy Si60 F₂₅₄, faza ruchoma: chloroform - metanol - octan etylu (75:15:10, v/v/v), wizualizacja chromatogramów przy UV $\lambda = 254$ nm (a) oraz po derywatywacji AlCl_3 przy UV $\lambda = 365$ nm (b). Bioautogramy otrzymane w biotestach *B. subtilis* (c) oraz *A. fischeri*. [129].

5.4 Analiza chromatograficzna frakcji fenolowych (I-VI) próbki A3 oraz ocena ich potencjału przeciwbakteryjnego [129]

Fakt, że *C. incanus* jest uważany za roślinę bogatą w fenole oraz występowanie w surowych metanolowych ekstraktach **SME** stref hamowania wzrostu bakterii odpowiadających flawonoidom, ukierunkował prowadzone badania na zawarte w *C. incanus*. związki fenolowe. Do dalszych badań wybrano próbkę A3, której surowy ekstrakt **SME** charakteryzował się największą zawartością składników przeciwbakteryjnych (szersze strefy hamowania wzrostu bakterii w dolnej części płytki) (Rys. 32). Próbka ta wykazywała również najwyższą aktywność przeciwutleniającą wśród ekstraktów próbek handlowych czystka (Tab. 7). Surowy metanolowy ekstrakt **SME** próbki A3 poddany został frakcjonowaniu przy pomocy selektywnej wieloetapowej ekstrakcji ciecz-ciecz (procedura opisana szczegółowo na stronach od 67-70 i przedstawiona na Rys. 29). Procedura ta umożliwiła rozdział fenoli zawartych w metanolowych ekstraktach *C. incanus* na poszczególne frakcje **I-VI** zawierające odpowiednio: aglikony flawonoidowe, wolne kwasy fenolowe, niepolarne glikozydy flawonoidowe, polarne glikozydy flawonoidowe oraz kwasy fenolowe uwolnione podczas kwasowej i zasadowej hydrolizy. Wykorzystując ten system separacji otrzymano sześć zróżnicowanych składem chemicznym frakcji fenolowych czystka (Rys. 33). Analizę otrzymanych frakcji fenolowych prowadzono w warunkach chromatograficznych zastosowanych do badań surowych metanolowych ekstraktów **SME**. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że frakcja **I** zawiera sześć pasm chromatograficznych (wartości R_F równe 0,31, 0,39, 0,43, 0,48, 0,66 i 0,74) ulegających charakterystycznemu żółtemu zabarwieniu zarówno po derywatywacji z użyciem chlorku glinu, jak i odczynnikiem NP-PEG. Przy R_F równym 0,31, podobne charakterystyczne żółte pasmo pojawiło się również dla zagęszczonego metanolowego ekstraktu **SME** oraz frakcji **II**. Co istotne, frakcja **II** zgodnie z zastosowaną procedurą frakcjonowania powinna być bogata w wolne kwasy fenolowe i nie powinna zawierać flawonoidów.



Rys. 33. Chromatogramy TLC zagęszczonego surowego metanolowego ekstraktu próbki A3 oraz jego frakcji od I do VI. Rozdział przeprowadzono na płytkach chromatograficznych pokrytych żelazem krzemionkowym Si60 F₂₅₄, faza ruchoma: chloroform - metanol - octan etylu (75:15:10, v/v/v), wizualizacja chromatogramów przy UV $\lambda = 254$ nm (a) i $\lambda = 365$ nm (b), po derywatywacji AlCl_3 przy UV $\lambda = 365$ nm (c) i NP-PEG przy UV $\lambda = 365$ nm (d) [129].

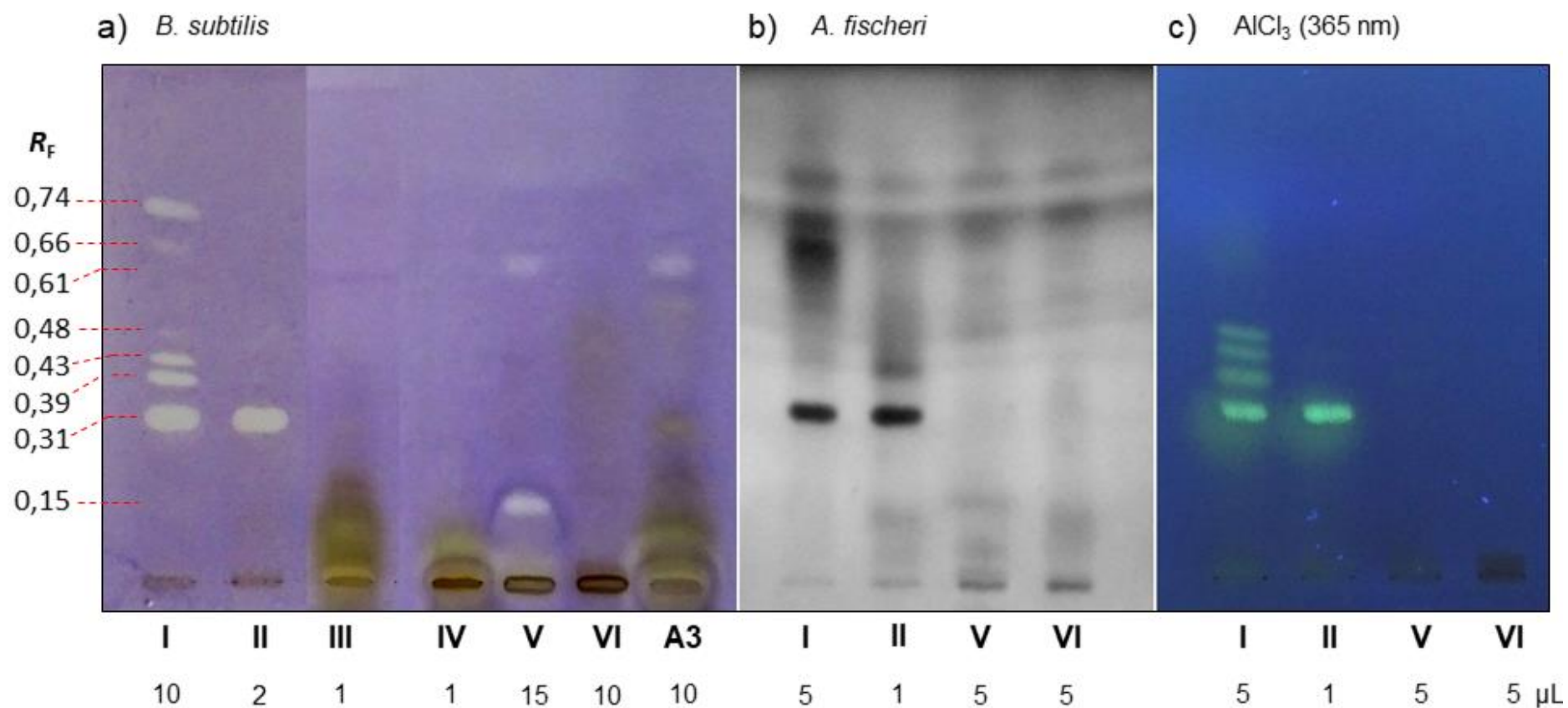
Można również zauważyć, że zawarte we frakcjach **III** i **IV** składniki charakteryzują się niskimi wartościami R_F ($R_F < 0,30$), co wskazuje na potrzebę zastosowania bardziej polarnej fazy ruchomej do rozdzielania występujących w nich glikozydów flawonoidowych.

W kolejnym etapie rozdzielone składniki poszczególnych frakcji próbki A3 badano pod kątem ich aktywności przeciwbakteryjnej (Rys. 34 i Rys. 35). Na podstawie przeprowadzonych analiz TLC-DB sześciu frakcji fenolowych stwierdzono, że charakteryzują się one większą skutecznością przeciwko Gram-dodatnim bakteriom *B. subtilis* niż Gram-ujemnym bakteriom *A. fischeri* (Rys. 34). Wyższa aktywność przeciwbakteryjna ekstraktów *C. incanus* w stosunku do bakterii Gram-dodatnich jest zgodna z dotychczasowymi doniesieniami literaturowymi [64], [90].

Wśród badanych ekstraktów frakcja **I** prezentowała najbardziej zróżnicowany zestaw składników o charakterze przeciwbakteryjnym. Profile przeciwbakteryjne frakcji **I** i **II** uzyskane w teście z bakteriami *B. subtilis* pokrywają się z odpowiadającymi im profilami flawonoidowymi (wykazującymi żółtą fluorescencję po zastosowaniu chlorku glinu jako odczynnika derywatyzującego). Część zawartych w tych dwóch frakcjach związków flawonoidowych wykazywała również aktywność antybakteryjną w badaniach z bakteriami *A. fischeri* (Rys. 34c). Ich wspólny składnik antybakteryjny o współczynniku $R_F = 0,31$, obok związków o $R_F = 0,66$ i $0,74$ (frakcji **I**), wykazywał najsilniejszy wpływ na bakterie *A. fischeri* (Rys. 34b).

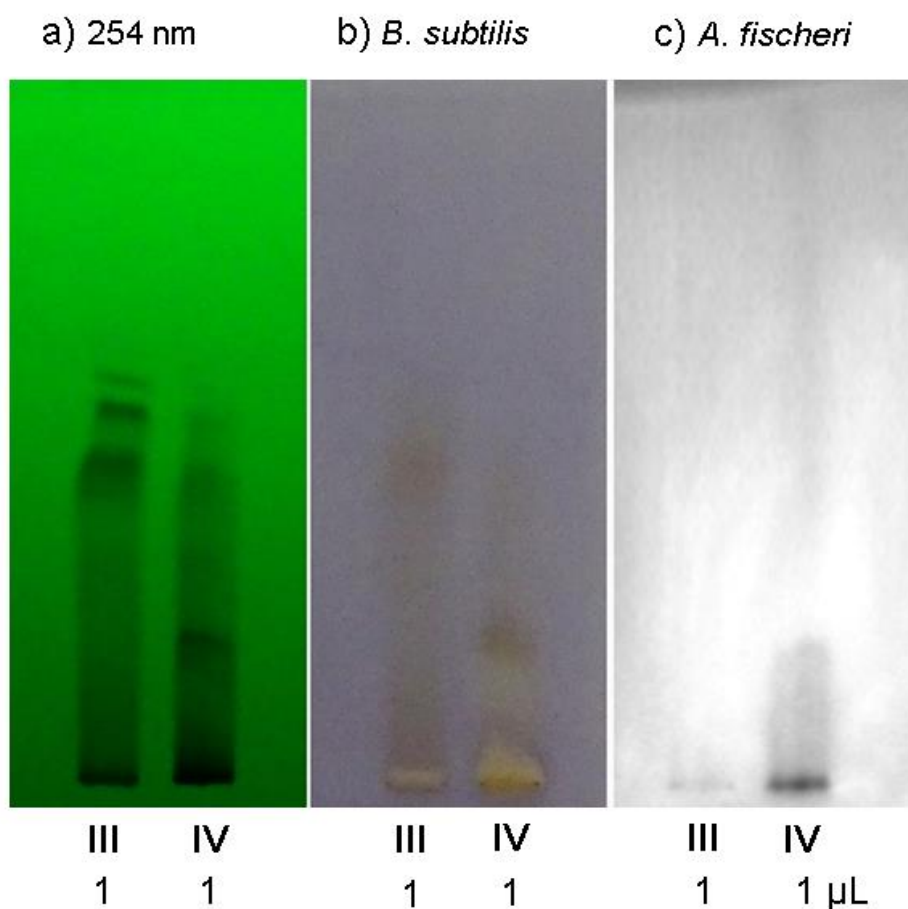
W teście *B. subtilis* dwie wyraźne strefy zahamowania wzrostu bakterii (wartość R_F równa $0,15$ i $0,61$) pojawiły się także we frakcji **V**. Zgodnie z założeniami wieloetapowej ekstrakcji związków fenolowych, można przypuszczać że związki te należą do grupy kwasów fenolowych, uwolnionych w wyniku hydrolizy kwasowej. Nie znaleziono natomiast związku wykazującego właściwości przeciwbakteryjne we frakcjach **III**, **IV** i **VI**.

Brak widocznych stref hamowania wzrostu bakterii w przypadku frakcji **III** i **IV** może być spowodowany naniesieniem na płytkę zbyt małej objętości próbki lub antagonizmem pomiędzy związkami zawartymi w nierozdzielonych pasmach chromatograficznych. Jednakże zwiększenie objętości próbki powodowało duże rozmycie otrzymywanych pasm chromatograficznych.



Rys. 34. Związki bioaktywne zawarte w zagęszczonym surowym metanолоwym ekstrakcie próbki A3 oraz jego frakcjach od I do VI. Rozdział przeprowadzono na płytkach chromatograficznych pokrytych żelazem krzemionkowym Si60 F₂₅₄, faza ruchoma: chloroform - metanol - octan etylu (75:15:10, v/v/v). Bioautogramy otrzymane w biotestach *B. subtilis* (a) oraz *A. fischeri*. (b). Wizualizacja chromatogramów po derywatywacji chlorkiem glinu przy UV λ = 365 nm (c). [129].

Aby umożliwić badanie poszczególnych składników frakcji **III** i **IV**, a tym samym, w celu wykluczenia możliwego antagonizmu, opracowano specjalny układ chromatograficzny. Różnica pomiędzy nowym układem a dotychczas stosowanym polegała na wykorzystaniu do analizy chromatograficznej bardziej polarnej fazy ruchomej. W nowym układzie chromatograficznym zastosowano fazę ruchomą zawierającą mieszaninę toluen – octan etylu – metanol, 5:2:3 (v/v/v). Zastosowany układ nieznacznie polepszył rozdział obu frakcji, jednakże nie pojawiła się żadna strefa o działaniu przeciwbakteryjnym (Rys. 35).

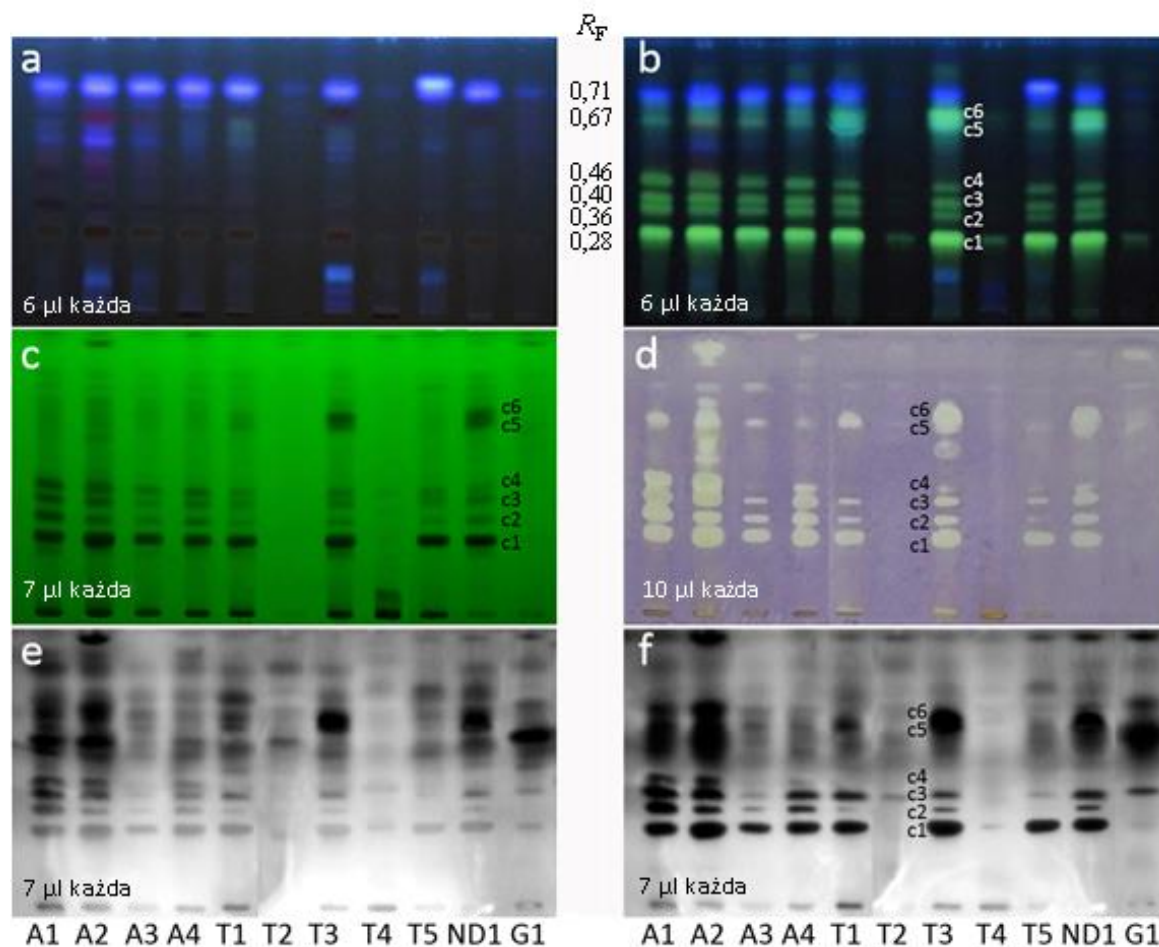


Rys. 35. Chromatogramy TLC frakcji III i IV otrzymanych z ekstraktu próbki A3. Rozdział przeprowadzono na płytkach chromatograficznych pokrytych żelem krzemionkowym Si60 F₂₅₄, faza ruchoma: toluen – octan etylu – metanol, 5:2:3 (v/v/v), wizualizacja chromatogramów przy UV $\lambda = 254$ nm (a). Bioautogramy otrzymane w biotestach *B. subtilis* (b) oraz *A. fischeri*. (c) [129].

5.5 Identyfikacja bioaktywnych składników frakcji fenolowej I [130]

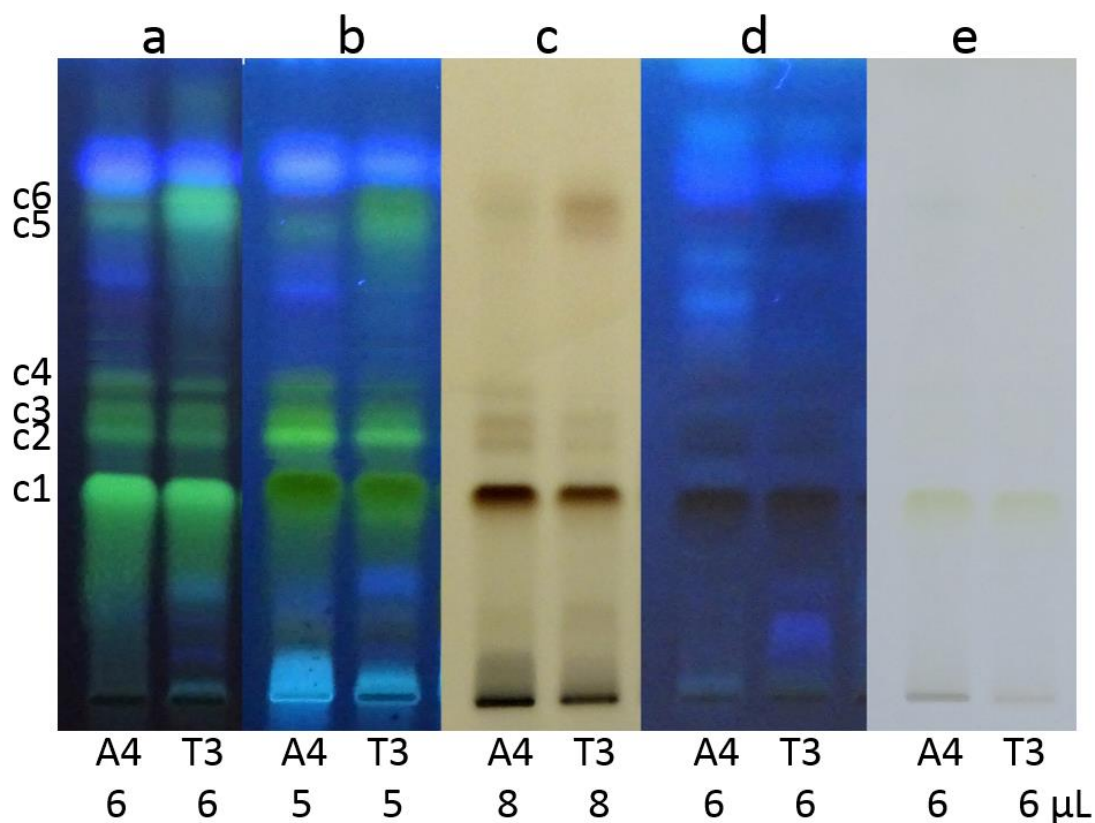
Zaobserwowany wyraźny profil antybakteryjny frakcji **I** sprawił, że głównym celem dalszej części badania było wykrycie i identyfikacja składników hamujących wzrost bakterii w tej frakcji. W poprzednim etapie badań do analizy sześciu frakcji fenolowych wytypowano próbkę A3. Wybór próbki podyktowany był między innymi wstępowaniem w jej surowym metanolowym ekstrakcie (**SME**) intensywniejszych strefy hamowania wzrostu bakterii, dla wartości R_F poniżej 0,31 (Rys. 32). W przypadku frakcji fenolowej **I** większość aktywnych biologicznie stref znajduje się powyżej tego zakresu. Dlatego na tym etapie badań dokonano analizy frakcji fenolowej **I** wszystkich próbek handlowych *C. incanus*, w celu dobrania obiektów (próbek) najlepszych do badań aktywnych składników tej frakcji. Chromatograficzne odciski palca frakcji **I** jedenastu handlowych próbek *C. incanus* otrzymano stosując fazę ruchomą chloroform - metanol - octan etylu, 75:15:10 (v/v/v). Większość otrzymanych profili chromatograficznych frakcji **I** czystka (z wyjątkiem tych pochodzących z próbek T2, T4 i G1) było zbliżonych do siebie pod kątem jakościowym, co widoczne było na chromatogramach przed i po derywatywacji chlorkiem glinu (Rys. 36a-c). Spryskanie płytek chlorkiem glinu wykazało sześć charakterystycznych żółtych pasm chromatograficznych odpowiadających flawonoidom. Oznaczono je jako **c1** do **c6**, odpowiednio o wartościach R_F równych 0,28, 0,36, 0,40, 0,46, 0,67 i 0,71 (Rys. 36b). W przypadku każdej próbki, chromatograficzny profil chemiczny frakcji **I** był zgodny z profilem przeciwbakteryjnym uzyskanym przy użyciu testów *B. subtilis* i *A. fischeri* (Rys. 36d-f). Początkowo ciemne strefy przeciwbakteryjne na bioautogramach *A. fischeri* były słabo widoczne, ale ich intensywność rosła w ciągu kolejnych 20 minut (Rys. 36f).

Do dalszych badań związanych z identyfikacją aktywnych biologicznie związków wybrano próbki A4 i T3. Chromatogramy otrzymane dla frakcji fenolowej **I** tych próbek charakteryzowały się dobrze rozdzielonymi i stosunkowo intensywnymi pasmami chromatograficznymi zawierającymi związki o właściwościach antybakteryjnych.



Rys. 36. Chromatogramy i bioautogramy TLC frakcji flawonoidowej I jedenastu próbek handlowych *C. incanus*. Rozdział przeprowadzono na płytkach chromatograficznych pokrytych żelazem krzemionkowym Si60 F₂₅₄, faza ruchoma: chloroform - metanol - octan etylu (75:15:10, v/v/v). Wizualizacja: UV $\lambda = 365$ nm (a), po derywatywacji chlorkiem glinu w UV $\lambda = 365$ nm (b), UV $\lambda = 254$ nm (c), testy przeciwbakteryjne przeciwko *B. subtilis* (d) i *A. fischeri* dokumentowane natychmiast (e) i po 20 min (f) [130].

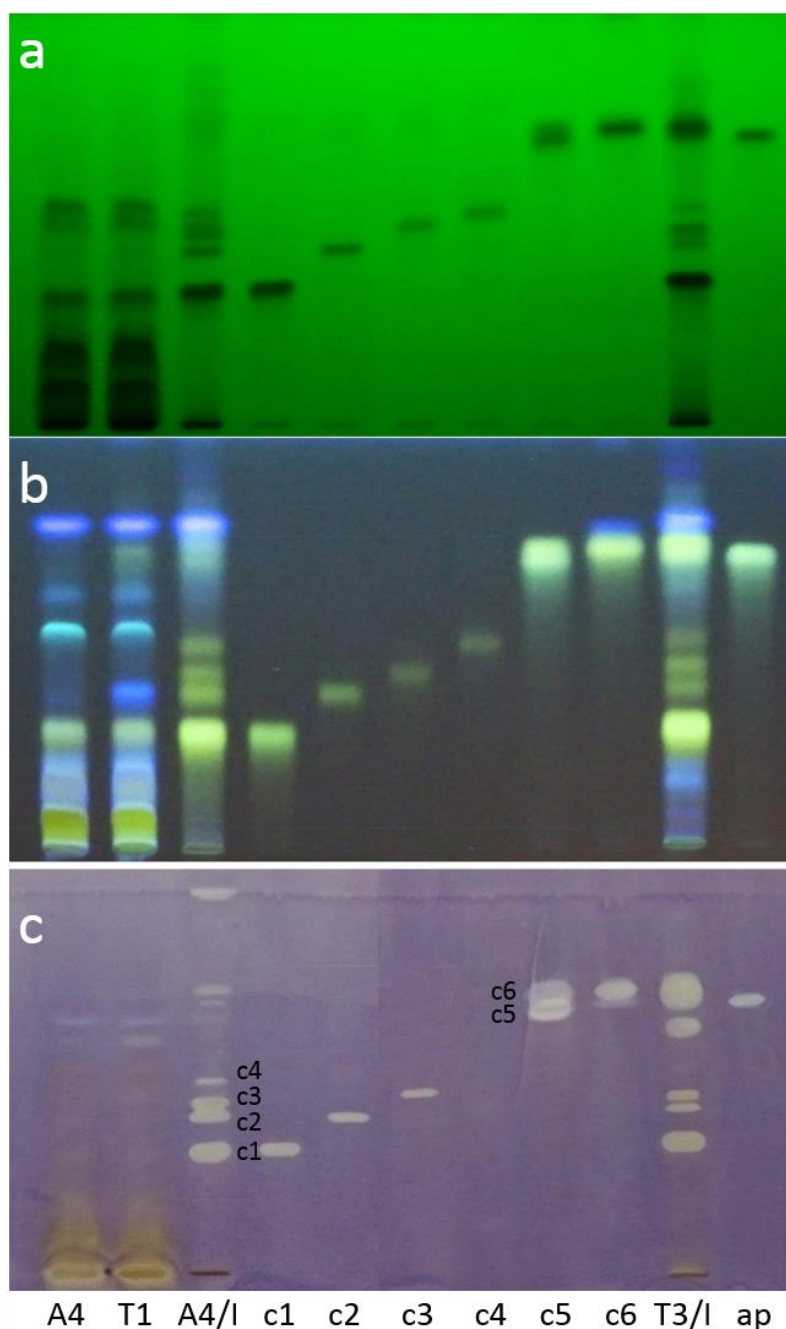
W pierwszym etapie identyfikacji dla potwierdzenia obecność aglikonów flawonoidów w strefach przeciwbakteryjnych frakcji I, oprócz chlorku glinu zastosowano także inne specyficzne odczynniki: NP-PEG, chlorek żelaza (III), PABA i DPA (Rys. 37). Po zastosowaniu dwóch pierwszych odczynników derywatyzujących uzyskano charakterystyczne dla flawonoidów żółte (NP-PEG) i brązowe (FeCl_3) zabarwienie pasm c1-c6 (Rys. 37b i c). Brak niebieskiej fluorescencji z PABA i widocznego niebieskiego koloru z DPA potwierdziło nasze wstępne założenie, że w pasmach c1-c6 nie występują koniugaty cukru, a jedynie aglikony (DPA i PABA stosuje się do derywatywacji cukrów i koniugatów cukrowych) (Rys. 37d i e).



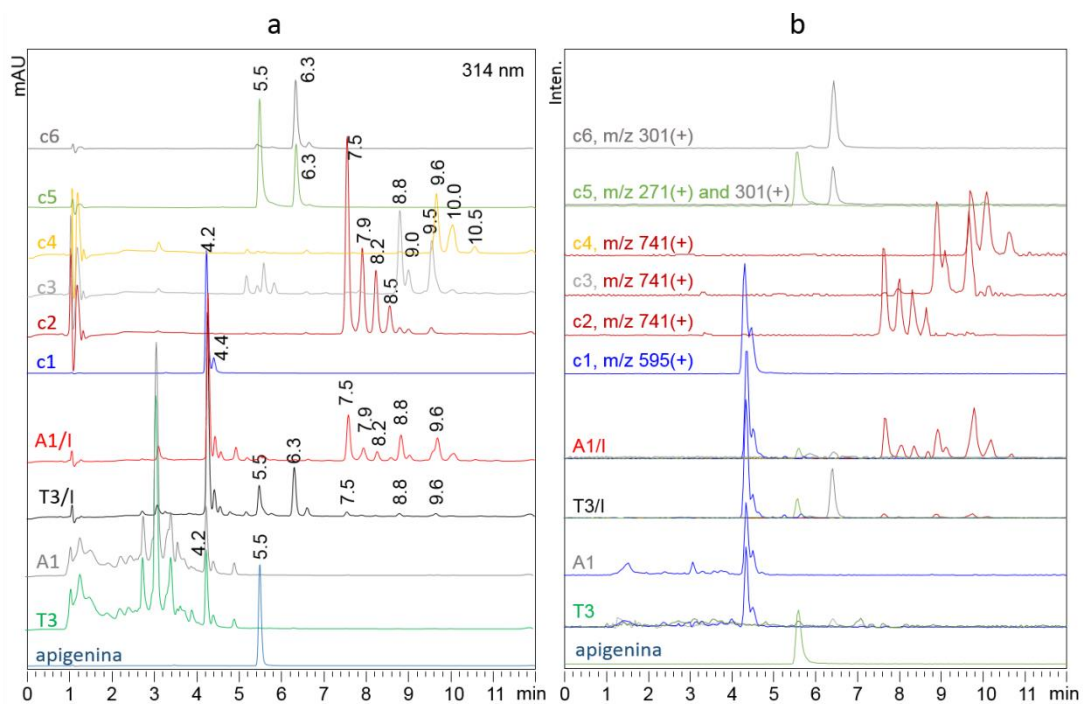
Rys. 37. Chemiczna charakterystyka składników bioaktywnych (od c1 do c6) frakcji flawonoidowej I próbek *C. incanus*. Rozdział przeprowadzono na płytkach chromatograficznych pokrytych żelazem krzemionkowym Si60 F₂₅₄, faza ruchoma: chloroform - metanol - octan etylu (75:15:10, v/v/v). Derywatyżacja: AlCl₃ (a, λ = 365 nm), NP-PEG (b, λ = 365 nm), FeCl₃ (c, światło białe), PABA (d, λ = 365 nm) i DPA (e, światło białe) [130].

Dalszą charakterystykę i identyfikację flawonoidów zawartych w pasmach o potwierdzonej aktywności przeciwbakteryjnej przeprowadzono stosując technikę HPLC-DAD-ESI-MS. W tym celu bioaktywne strefy c1 - c6 zdrapano z warstwy TLC i wmywano etanolem, według procedury opisanej w *podrozdziale 5.2.1*. Obecność substancji czynnych w próbkach (C1 – C6) otrzymanych w wyniku izolacji składników zawartych w odpowiednich pasmach chromatograficznych potwierdzono przy pomocy analizy TLC (Rys. 38a i b). Zaobserwowano, że próbka C5 zawierała również związek pochodzący z pasma c6, co wynikało prawdopodobnie z niewystarczającej rozdzielczości zastosowanego układu chromatograficznego. Wszystkie izolaty wykazywały aktywność przeciwbakteryjną w bioesie z *B. subtilis*. Dla próbki C4 efekt hamowania wzrostu bakterii nie był zauważalny (Rys. 38c), najprawdopodobniej z powodu zbyt małej ilości analitu nałożonego na warstwę TLC.

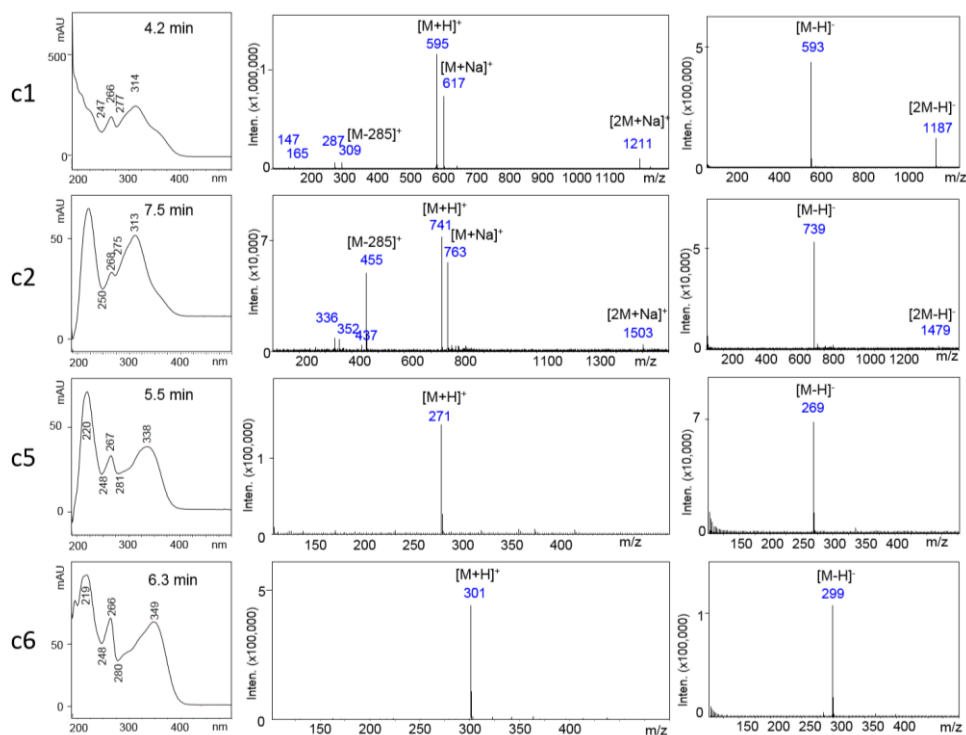
Następnie wykonano analizę HPLC-DAD-MS sześciu izolatów pochodzących z frakcji I dwóch surowych ekstraktów próbek, A1 i T3 (Rys. 39 i Rys. 40).



Rys. 38. Chromatogramy dwóch zagęszczonych ekstraktów *C. incanus* (A4 i T3), ich frakcji flawonoidowych I (A4/I i T3/I), składników antybakteryjnych wyizolowanych ze pasm c1 do c6 oraz wzorca apigeniny (ap). Rozdział przeprowadzono na płytkach chromatograficznych pokrytych żelalem krzemionkowym Si60 F₂₅₄, faza ruchoma: chloroform - metanol - octan etylu (75:15:10, v/v/v). Wizualizacja przy UV $\lambda = 254$ nm (a), po derywatywacji chlorkiem glinu w UV $\lambda = 365$ nm (b) i po zastosowaniu testu *B. subtilis* (c) [130].



Rys. 39. Chromatogramy HPLC-DAD zarejestrowane przy $\lambda = 314$ nm (a) i odpowiadające im chromatogramy uzyskane techniką HPLC-ESI-MS (b) dwóch zagęszczonych ekstraktów *C. incanus* (T3 i A1), ich frakcji flawonoidowych I (T3/I i A1/I), składników antybakteryjnych wyizolowanych z pasm c1 do c6 oraz wzorca apigeniny. Każda wartość m/z jest reprezentowana przez inny kolor [130].



Rys. 40. Widma UV (strona lewa), ESI + (pośrodku) i ESI - (strona prawa) głównych składników wchodzących w skład pasm chromatograficznych c1, c2, c5 i c6 [130].

Zastosowana technika jonizacji ESI pozwoliła zarejestrować widma masowe zarówno w trybie jonizacji dodatniej, jak i ujemnej. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że próbka izolatu **C1** zawierała dwa związki o tych samych widmach UV jak i MS (Rys. 40, c1), co wskazuje na występowanie w próbce dwóch form izomerycznych. W trybie jonizacji dodatniej na widmie masowym próbki **C1** dominowała protonowana cząsteczka przy m/z 595 $[M+H]^+$ oraz jon adduktu sodu przy m/z 617 $[M+Na]^+$. Został również wykryty addukt sodowy dimeru przy m/z 1211 $[2M+Na]^+$ oraz cztery mniejsze jony fragmentacyjne przy m/z 309 $[M-285]^+$, m/z 287, m/z 165 i m/z 147. W trybie jonizacji ujemnej zdeprotonowany jon cząsteczkowy i zdeprotonowany dimer dawały sygnały przy m/z 593 $[M-H]^-$ i m/z 1187 $[2M-H]^-$.

W pasmach TLC **c2**, **c3** i **c4**, niektóre związki również uległy wspólnej co-migracji (Rys. 34). Jednak w każdym indywidualnym przypadku napotkano związki o identycznych widmach zarówno UV jak i masowych, ponownie sugerując obecność form izomerycznych związków (Rys. 35, **c2**). W trybie jonizacji dodatniej zarejestrowano intensywne sygnały dla m/z 741 $[M+H]^+$, m/z 763 $[M+Na]^+$ i m/z 455 $[M-285]^+$. Na widmie masowym tych związków przy m/z 1503 $[2M+Na]^+$, m/z 336 i m/z 352 widoczne były również sygnały charakteryzujące się niższą intensywnością. Ponadto w trybie jonizacji ujemnej uzyskano dominujący sygnał masowy przy m/z 739 $[M-H]^-$ i sygnał o niskiej intensywności przy m/z 1187 $[2M-H]^-$.

Analiza HPLC potwierdziła również występowanie głównego fenolowego składnika wyizolowanego z pasma chromatograficznego **c6** w próbce otrzymanej z pasma **c5**. W trybie dodatniej jonizacji główne składniki pasm **c5** i **c6** dawały sygnały masowe przy m/z 271 i m/z 301, a w trybie ujemnym przy m/z 269 i m/z 299. Sygnały te przypisano odpowiednio protonowanym $[M+H]^+$ i zdeprotonowanym $[M-H]^-$ cząsteczkom (Rys. 35, c5 i c6).

Literatura dotycząca gatunków *Cistus* donosi o tym, iż z grupy aglikonów flawonoidów udało się dotychczas zidentyfikować apigeninę i 3-O-metylokemferol, odpowiednio o masach cząsteczkowych 270 i 300 $g \cdot mol^{-1}$. Apigenina została wykryta jako składnik dwunastu gatunków z rodzaju *Cistus*, w tym *C. incanus* [131]–[133]. 3-O-metylokemferol zidentyfikowano w przypadku trzech przedstawicieli rodzaju *Cistus*, a mianowicie: *C. ladanifer* [131], [133], *C. palhinhae* [131] i *C. incanus* [134]. Charakterystyka literaturowa tych dwóch aglikonów odpowiadała wynikom analizy głównych składników pasm **c5** i **c6**. Identyfikację apigeniny jako głównego składnika pasma **c5** przeprowadzono testem TLC-*B. subtilis* oraz analizą HPLC-MS.

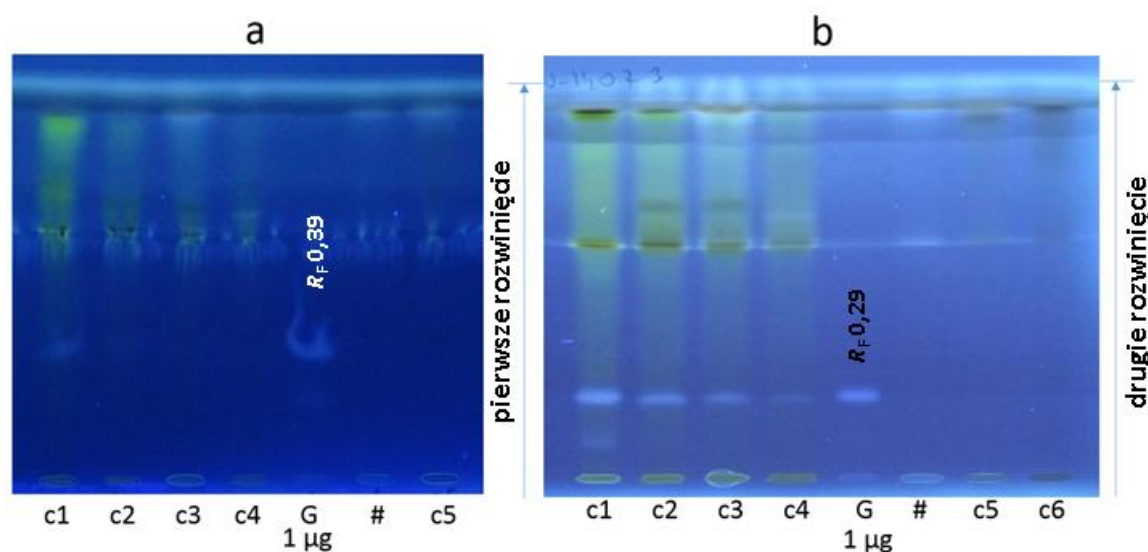
W teście TLC-DB wzorzec apigeniny wykazywał efekt hamowania wzrostu bakterii przy tej samej wartości $R_F = 0,67$, co związek z pasma **c5** (Rys. 38). Również stosując analizę HPLC-DAD-MS, dla związku wyizolowanego z pasma **c5**, zarejestrowano te same czasy retencji, widma UV i widma masowe, co dla wzorca apigeniny (Rys. 39). Wstępną identyfikację głównego składnika pasma **c6** jako 3-O-metylokemferolu potwierdzono przez porównywalne literaturowych widm UV ($\lambda_{\max} = 349$ nm) tego flawonoidu [133], [135] z widmami otrzymanymi dla próbki **C6**.

Istotnym problemem wymagającym rozwiązania był fakt, że sygnały masowe zarejestrowane dla związków obecnych w pasmach od **c1** do **c4** były zbyt wysokie jak na aglikony flawonoidowe i dlatego jako możliwe wyjaśnienie były brane pod uwagę kondensaty flawonoidów (dimery i trimery) lub glikozydy. Jednak negatywne wyniki uzyskane po zastosowaniu odczynników wizualizujących PABA i DPA wstępnie wykluczyły obecność form glikozydowych w badanych próbkach. Z analizy danych literaturowych wynika, że 3-O- β -D-(6''-O-(E)-p-kumaroilo)-glukopiranozyd kemferolu (Tylirozyd, 594 g mol⁻¹) i 3-(3'',6''-dikumaroilo)-glukopiranozyd kemferolu (740 g mol⁻¹) zostały zidentyfikowane przez Wittpahla i wsp. [72], jako składniki *C. incanus*. Ten drugi związek został również zidentyfikowany przez Goriego i wsp. [69]. Te dwie grupy badawcze umieściły w swoich pracach odpowiednie widma (UV i MS) omawianych związków, które okazały się identyczne z widmami zarejestrowanymi dla związków wyodrębnionych z pasm **c1-c4**. Budowa przestrzenna tych dwóch związków wyjaśnia negatywny wynik w reakcji z PABA. Kwas kumarowy związany z atomem C₆ glukozy prawdopodobnie blokuje otwarcie pierścienia cukru, co powoduje brak reakcji tych związków z PABA. W związku z powyższym w celu identyfikacji składników pasm **c1** do **c4** przeprowadzono dodatkowe badania techniką HPTLC, które koncentrowały się na wykryciu kemferolu i glukozy, jako potencjalnych elementów budulcowych badanych związków.

Glukoza nie posiada chromoforu UV i z tego powodu jej wykrywanie jest utrudnione. Jedną z możliwych opcji jej wykrycia jest użycie odczynnika chemicznego zdolnego do wytworzenia pochodnej glukozy zawierającej chromofor. Wykorzystanie chromatografii cienkowsarstwowej, w której mamy bezpośredni dostęp do składników rozdzielonych na powierzchni adsorbentu, ułatwia zastosowanie odpowiedniego odczynnika derywatyzującego. Zaleta ta posłużyła do opracowania dwóch procedur bazujących na technice HPTLC, łączących uwalnianie *in situ* glukozy z możliwego

koniugatu z jej separacją i detekcją. W obu opracowanych procedurach wszystkie etapy analizy przeprowadzono na tej samej płytce chromatograficznej.

W przypadku pierwszej procedury badane próbki rozwijane były na płytkach chromatograficznych pokrytych żelem krzemionkowym modyfikowanym aminą 60 F_{254S}. Przed rozwinięciem, próbki C1 do C4, próbkę kontrolną (eluat czystej warstwy TLC) i wzorzec glukozy poddano procesowi kwasowej hydrolizy *in situ*, stosując 10-minutową inkubację płytki chromatograficznej w oparach HCl (21°C), a następnie 10-minutowe ogrzewanie w temperaturze 100 °C (Tab. 9 Tab. 9). Początkowo uwolniona glukoza była rozdzielona w układzie zawierającym fazę ruchomą acetonitryl - woda, 7:3 (v/v), jednak otrzymane w ten sposób pasmo chromatograficzne było zniekształcone (Rys. 41a). Ten niepożądany efekt został wyeliminowany przez wprowadzenie natychmiast po etapie hydrolizy wstępnego rozwijania płytki acetonitrylem, który wymywa ze strefy nakładania większość hydrolizatów, ale nie uwolnioną glukozę. Następnie wysuszoną płytkę poddawano docelowemu rozwijaniu stosując fazę ruchomą: acetonitryl-woda, 7:3 (v/v) (Rys. 41b).

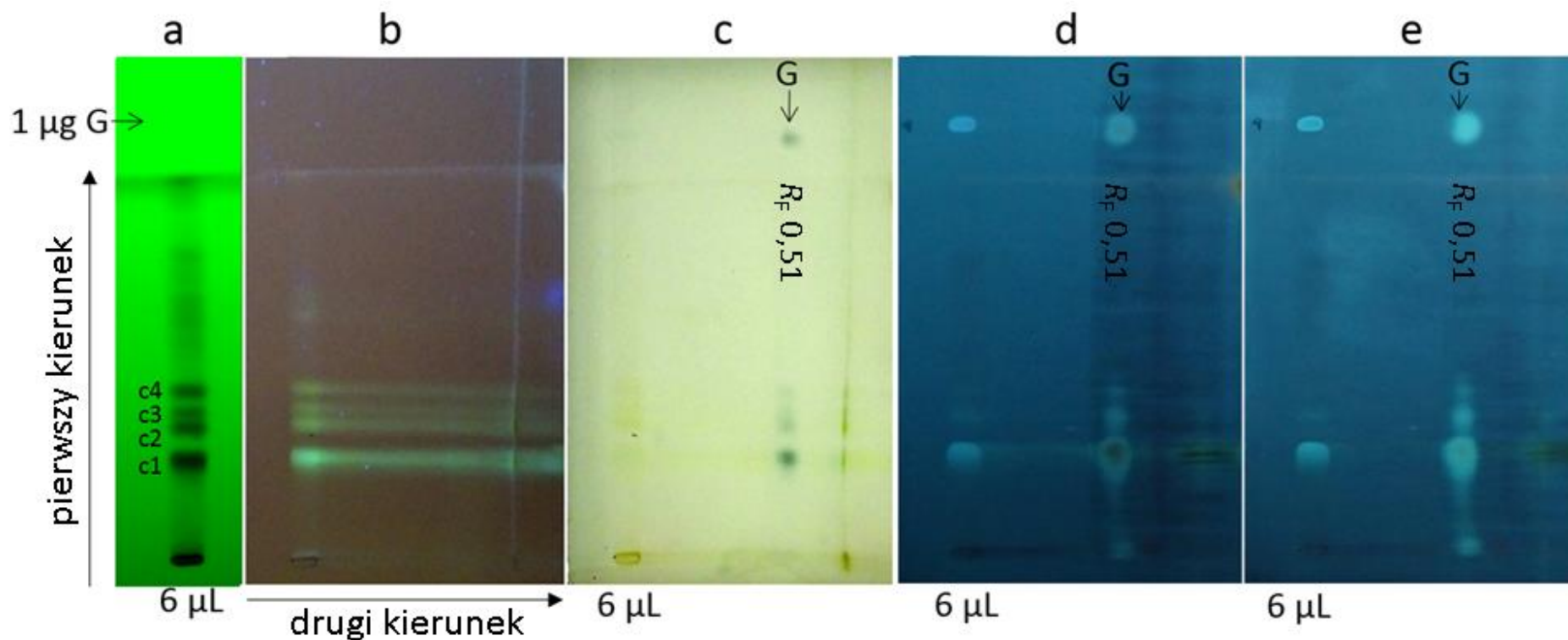


Rys. 41. Wykrywanie glukozy (G) uwolnionej z aktywnych biologicznie pasm fenolowej frakcji I czystka, połączonej z kwasową hydrolizą *in situ* na płytce HPTLC pokrytych żelem krzemionkowym modyfikowanym aminą. Pojedyncze rozwijanie – faza ruchoma: acetonitryl - woda, 7:3 (v/v) (a) i wstępne rozwijanie acetonitrylem, a po wysuszeniu właściwe rozwijanie fazą ruchomą acetonitryl - woda, 7: 3 (v/v) , jak podano w Tab. 9 (b). Pasma c1 do c6 (takie same, jak na Rys. 36) wyizolowano z warstwy TLC rozwiniętej frakcji I, # jest eluatem kontrolnym tła płytki [130].

Zarejestrowany sygnał fluorescencyjny umożliwiający wykrycie stref glukozy otrzymano przez reakcję między glukozą a grupami aminowymi fazy stacjonarnej. Reakcję tą

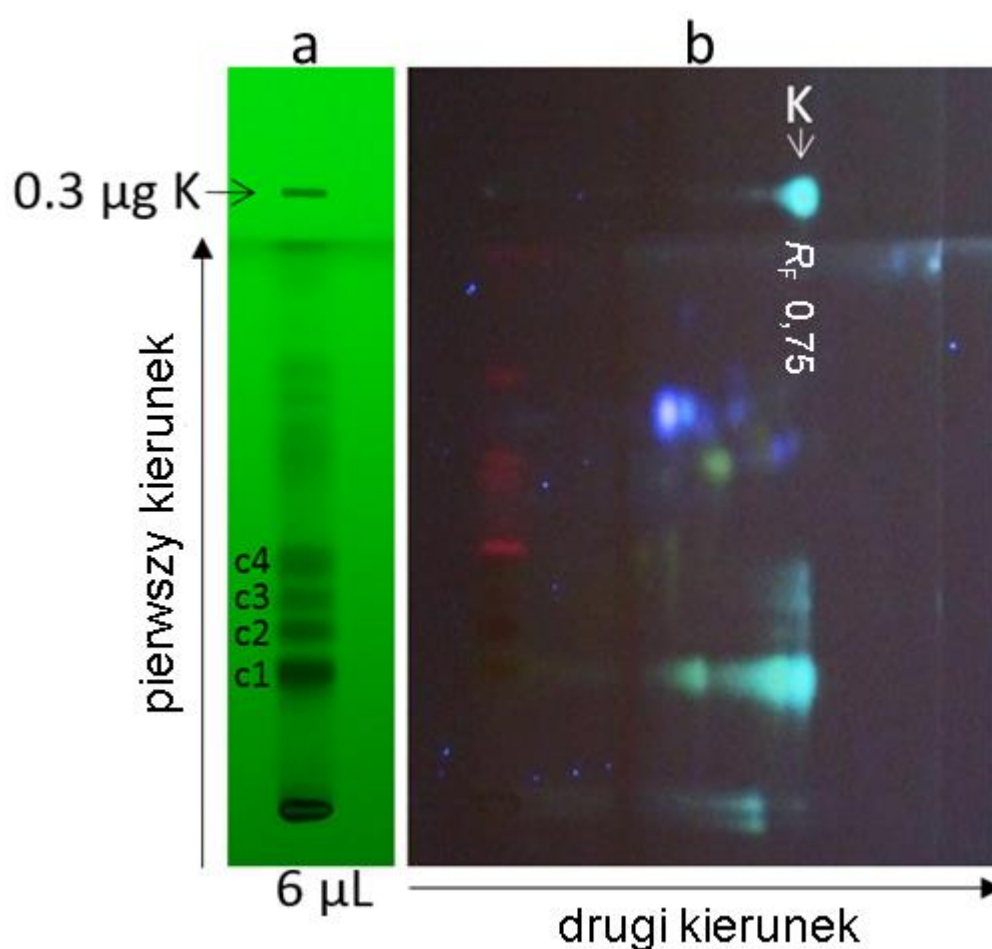
uzyskano poprzez ogrzewanie w 170 °C przez 20 minut rozwiniętej płytki. Na otrzymanych chromatogramach widzimy glukozę uwolnioną z próbek od **C1** do **C4** (Rys. 41b).

Aby uniknąć czasochłonnego izolowania z poszczególnych pasm ewentualnych związków glikozydowych o właściwościach przeciwbakteryjnych, opracowano alternatywną procedurę 2D-HPTLC do wykrywania uwalnianej z nich glukozy. W pierwszym etapie procedury płytkę rozwijano (w pierwszym kierunku) mieszaniną chloroform - metanol - octan etylu, 75:15:10 (v/v/v), w celu uzyskania odpowiedniego rozdziału chromatograficznego frakcji **I**. Po tym etapie nastąpiło hydrolytyczne uwolnienie glukozy w parach HCl, a następnie dokonano drugiego i trzeciego rozwinięcia w kierunku ortogonalnym do pierwszego. Drugie rozwinięcie prowadzono acetonitrylem (z powodów wyjaśnionych w poprzedniej procedurze), a trzecie mieszaniną acetonitryl-woda (efektem czego było rozdzielenie uwolnionej w wyniku hydrolizy glukozy) (Tab. 10a). Wizualizacja chromatogramów przy pomocy DPA i PABA spowodowała pojawienie się odpowiednio niebieskich i fluorescencyjne niebieskich stref w obecności wolnej glukozy (Rys. 42a-f). Porównując odczynniki derywatywizacyjne takie, jak kwas 2-naftolo sulfonowy, aldehyd o-ftalowy, DPA i PABA, ostatni (PABA) okazał się najbardziej czuły z nich wszystkich i zapewnił najlepszą wykrywalność glukozy [136]. Zanurzenie płytki chromatograficznej w mieszaninie parafina - *n*-heksan, 1:2 (v/v) po derywatywizacji PABA spowodowało powstanie bardziej jednorodnego tła, zwiększając czułość metody (Rys. 42e) w stosunku do użycia samego PABA (Rys. 42d). W oparciu o analizę wideodensytometryczną (stosując program ImageJ) oceniono, że wspomniane zanurzenie zwiększa intensywność sygnału fluorescencyjnego o ok. 50%. Uwolniona w wyniku kwaśniej hydrolizy glukoza widoczna była na otrzymanych chromatogramach (Rys. 42) w pasmach od **c1** do **c4** oraz w miejscach nakładania próbek. Wyniki tych analiz potwierdziły, że w badanych pasmach, wykazujących aktywność antybakteryjną, obecne są związki glikozydowe.



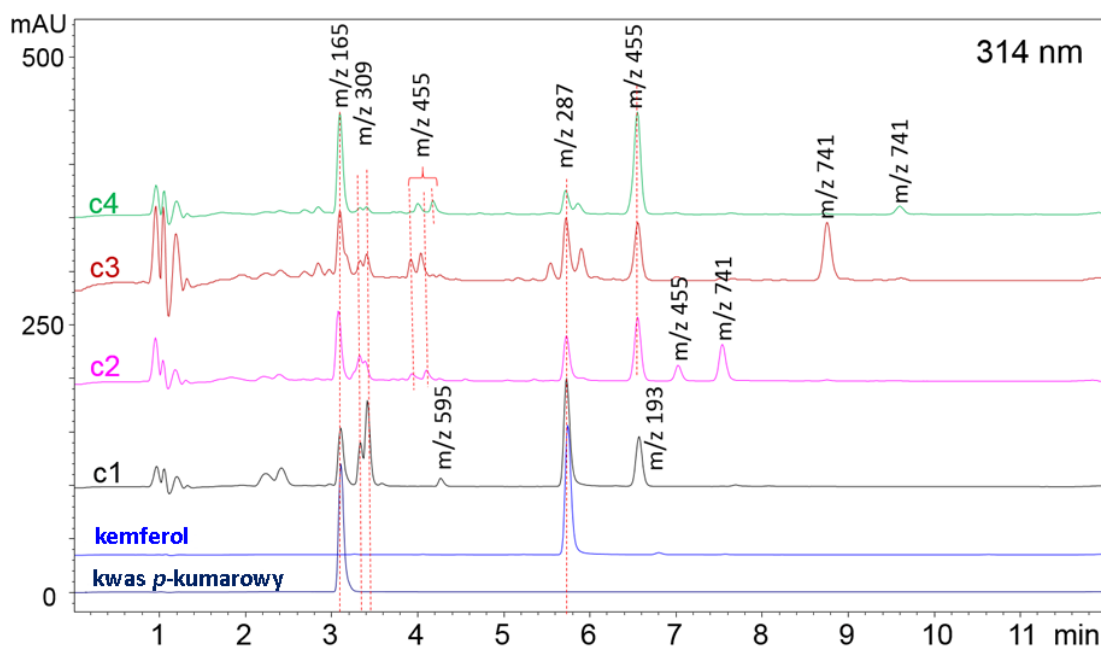
Rys. 42. Wykrywanie glukozy (G) uwolnionej ze związków obecnych w aktywnych strefach frakcji I *C. incanus* (próbka A1), przy pomocy 2D-HPTLC na warstwie żelu krzemionkowego, w połączeniu z kwasową hydrolizą *in situ* (kolejne kroki procedury podano w Tab. 10a). Pierwsze rozwijanie w pierwszym kierunku mieszaniną chloroform - octan etylu - metanol, 75:10:15 (v/v/v) (**a**; $\lambda = 254$ nm), drugie rozwinięcie w drugi kierunku (po kwasowej hydrolizie) acetonitrylem, a po wysuszeniu płytki mieszaniną acetonitryl – woda, 35:10 (v/v) (**b**; $\lambda = 365$ nm). Derywatywacja przy użyciu: DPA (**c**; światło białe), PABA (**d**; $\lambda = 365$ nm) i PABA-parafina (**e**; $\lambda = 365$ nm) [130].

W celu detekcji kemferolu jako potencjalnego składnika związków obecnych w badanych pasm chromatograficznych wykorzystano nieznacznie zmodyfikowaną procedurę 2D-HPTLC do wykrywania uwolnionej glukozy. W podejściu tym: wydłużono czas inkubacji w parach HCl, przy jednoczesnej rezygnacji z ogrzewania, które powoduje kondensację związków fenolowych. Rozwijanie chromatogramów w kierunku ortogonalnym do pierwotnego kierunku prowadzono fazą ruchomą toluen - octan izopropylu - kwas mrówkowy 3:2:0,5 (v/v/v), a wizualizacji dokonywano metanolemowym roztworem chlorku glinu. W wyniku przeprowadzonej analizy kemferol został zidentyfikowany jako składnik tych samych pasm, w których potwierdzono obecność glikozydów (c1-c4) (Rys. 43).



Rys. 43. Wykrywanie kemferolu (K) uwolnionego ze związków obecnych w aktywnych strefach frakcji I *C. incanus* (próbka A1), przy pomocy 2D-HPTLC na warstwie żelu krzemionkowego, w połączeniu z kwasową hydrolizą *in situ* (kolejne kroki procedury podano w Tab. 10b). Pierwsze rozwijanie w pierwszym kierunku mieszaniną chloroform - octan etylu - metanol, 75:10:15 (v/v/v) (a; $\lambda = 254$ nm), drugie rozwinięcie w drugi kierunek (po kwasowej hydrolizie) mieszaniną toluen – octan izopropylu – kwas mrówkowy 3:2:0,5 (v/v/v) i wizualizacji chlorkiem glinu (b; $\lambda = 365$ nm) [130].

W celu potwierdzenia wyników uzyskanych opracowanymi metodami HPTLC przeprowadzono kwasową hydrolizę bezpośrednio w roztworze próbek zawierających związki wyizolowane z pasm (**c1** - **c4**), a otrzymane hydrolizaty analizowano techniką HPLC-DAD-MS. W każdym przypadku otrzymano sygnały pochodzące od kemferolu i kwasu *p*-kumarowego (Rys. 38). Sygnały pochodzące z tych związków występowały wcześniej jako jony fragmentacyjne widm masowych substancji wykrywanych w pasmach **c1** do **c4** (Rys. 35). Sygnały uzyskane w trybie jonizacji dodatniej przy m/z 287 i m/z 165 odpowiadają odpowiednio masom protonowanych cząsteczek kemferolu i kwasu kumarowego. Analizując uzyskane dane można zauważyć, że jon fragmentacyjny obecny w pasmie **c1** przy m/z 309 i inny jon fragmentacyjny obecny w pasmach **c2** do **c4** przy m/z 455 uzyskujemy w wyniku oddzielenia jednostki kemferolu od jonu molekularnego odpowiedniego widma. Warto również zauważyć, że różnica między głównym składnikiem **c1** ($594 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) a **c2** (podobnie jak **c3** i **c4**, $740 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) jest równa jednostce kwasu kumarowego ($164 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) z oderwaną cząsteczką wody ($18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, która jest odszczepiana w trakcie reakcji kondensacji).



Rys. 44. Chromatogramy HPLC-DAD kemferolu, kwasu *p*-kumarowego i hydrolizowanych kwasem izolatów (**c1** do **c4**). Rejestracja przy $\lambda = 314 \text{ nm}$, wartości m/z odpowiadające poszczególnym pikom otrzymane metodą HPLC-DAD-ESI (+) [130].

Uzyskane technikami chromatograficznymi (HPTLC i HPLC) wyniki pokazują, że związki przeciwbakteryjne występujące w pasmach chromatograficznych **c1-c4** frakcji

fenolowej **I** nie są aglikonami flawonoidowymi, ale glikozydanmi złożonymi z jednostek glukozy, kemferolu i kwasu kumarowego. Związki obecne w pasmie **c1** zostały wstępnie zidentyfikowane jako *cis*- i *trans*- tylirozyd, a związki z pasm **c2-c4** jako izomery dikumaroilo-glukozydu kemferolu.

Warto podkreślić, że dla wszystkich zidentyfikowanych związków zawartych w frakcji fenolowej **I** próbek handlowych *C. incanus* opisane zostały w literaturze ich różne właściwości biologiczne. Apigenina wykazuje działanie przeciwbakteryjne przeciwko Gram-dodatnim bakteriom *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis*, bakteriom Gram-ujemnym *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*, a także wywiera działanie antyproliferacyjne na linie komórkowe ludzkiego raka [137]. Stwierdzono, że 3-O-metylokemferol hamuje wzrost *Bacillus cereus* [138] i proliferację pięciu ludzkich linii komórek nowotworowych [139], [140]. Tylirozyd wykazuje cytotoksyczność w stosunku do linii komórkowej ludzkiego raka płuca [141], działanie przeciwprzywrotniakowe przeciwko *Entamoeba histolytica* i *Giardia lamblia* [142] i jest z powodzeniem stosowany w leczeniu egzemy [143]. 3-(3'',6''-dikumaroilo)-glukopiranozyd kemferolu wykazuje działanie antyproliferacyjne i przeciwbakteryjne, odpowiednio, przeciwko kilku liniom komórek nowotworu ludzkiego [144] i Gram-dodatnim szczepom bakteryjnym (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* i *Micrococcus luteus*) [145]. Ponadto jego izomer, 3-(2'',6''-dikumaroilo)-glukopiranozyd kemferolu, okazał się skuteczny wobec ośmiu szczepów bakterii (w tym zarówno Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych) oraz czternastu szczepów grzybów [146].

6. ANALIZA FRAKCJI NIELOTNEJ - WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWE

6.1 Linie komórkowe

Badania eksperymentalne aktywności przeciwnowotworowej surowego metanolowego ekstraktu czystka (otrzymywanie omówione w *podrozdziale 5.1.1*) zostały przeprowadzone na dwóch liniach komórkowych raka jelita grubego różniących się stanem genu TP53: HCT116 p53^{+/+} z dziką formą genu TP53 oraz HCT116 p53^{-/-} pozbawionych obu alleli tego genu.

Linia komórkowa typu dzikiego (HCT116 p53^{+/+}) pochodziła z banku American Type Culture Collection (ATCC[®] CCL-247[™], Manassas, VA, USA). Jej pochodna z nokautem genu TP53 (p53^{-/-}) została dostarczona przez prof. M. Rusina z Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach. Jako model nowotworu komórki ludzkiego raka okrężnicy HCT116 są wystarczająco reprezentatywne dla interakcji ze składnikami diety [147], [148].

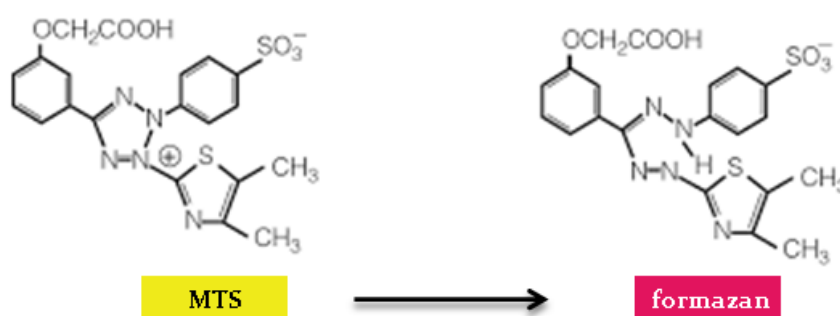
Pasażowane komórki nowotworowe hodowano w butelkach o pojemności 75 ml (Nunc, Roskilde, Dania) na zmodyfikowanej pożywce Eagle Dulbecco (DMEM) z dodatkiem antybiotyku gentamycyny (100 µg·ml⁻¹). Zadaniem antybiotyku była ochrona komórek przed zakażeniami. Pożywkę uzupełniono 12% inaktywowaną termicznie surowicą płodów wołowych (Gibco, Eggenstein, Niemcy). Proces inkubacji przebiegał w temperaturze 37 °C, wilgotność 95% oraz stężenie CO₂ 5%. Wszystkie etapy badania były prowadzone w sterylnych warunkach, w komorach z laminarnym przepływem powietrza.

6.2 Test cytotoksyczności - MTS

Ekstrakty próbek handlowych czystka otrzymane w wyniku wyczerpującej ekstrakcji metanolem przepuszczono przez membranowy filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,02 µm (*Anotop™. 25 Plus*). Przesączone ekstrakty roślinne liofilizowano a następnie rozcieńczono w pożywce hodowlanej w celu osiągnięcia wymaganego stężenia. Wykładniczo rosnące komórki HCT116 zbierano poprzez trypsynizację. Komórki wysiewano na 96 dołkowej płytce (Nunc, Roskilde, Dania) w stężeniu 5,0 x 10³ komórek na dołek i poddawano 24 godzinnej inkubacji. Po tym czasie medium wzrostowe wymieniano na pożywkę zawierającą ekstrakty czystka w zakresie stężeń od

0,1 do 2,0 mg·ml⁻¹. Komórki inkubowano z ekstraktami przez 72 godzin (temp. 37 °C). Następnie pożywkę zastępowano 100 µl DMEM bez czerwieni fenolowej.

Aktywność metaboliczną żywych komórek poddanych działaniu potencjalnie cytotoksycznych związków zawartych w ekstraktach określano testem MTS przez dodanie 20 µl CellTiter 96[®] AQueous One Solutions - MTS (Promega, Madison, WI, USA) do każdego dołka. Układ ten inkubowano przez 1 godzinę. Test MTS stanowi udoskonaloną wersję zastosowanego w badaniach antybakteryjnych (rozdział 5) testu MTT, w której produkt reakcji konwersji soli tetrazolowej powstaje w obecności metosiarczanu fenazyny (PMS, ang. phenazine methosulfate) i jest w rozpuszczalny w wodzie. Test metaboliczny MTS jest kolorymetryczną metodą oznaczania ilości żywych komórek, pozwalającą na ocenę ich przeżywalności, a tym samym na ocenę działania związków o potencjale cytotoksycznym. Polega on na pomiarze absorbancji formazanu powstałego w wyniku redukcji odczynnika MTS. Przekształcenie żółtego MTS do czerwono-purpurowego formazanu odbywa się przy udziale NADH lub NADPH produkowanych przez enzym dehydrogenazy w metabolicznie czynnych komórkach (Rys. 45).



Rys. 45. Żółty związek MTS przekształcony w czerwono-purpurowy formazan.

Ilość powstałego produktu jest proporcjonalna do liczby żywych i aktywnych metabolicznie komórek w próbie. W przypadku komórek uszkodzonych bądź martwych, formazan tworzy się w mniejszych ilościach, lub nie powstaje. Absorbancję zmierzono przy długości fali $\lambda = 490$ nm (maksimum absorbancji roztworu formazanu [149]), przy pomocy wielodetekcyjnego czytnika płytek Synergy[™] 4 (BioTek, Bad Friedrichshall, Niemcy). Do określenia absorbancji tła zastosowano standardowy roztwór zawierający 100 µl DMEM bez czerwieni fenolowej i 20 µl roztworu MTS. Próbie kontrolną stanowił układ ze wskazaną linią komórkową HCT116, niezawierający dodatku badanych ekstraktów roślinnych. Otrzymane wyniki absorbancji pozwoliły obliczyć wartości

udziału procentowego żywych komórek wstawionych na działanie badanych ekstraktów roślinnych według wzoru:

$$P\dot{Z}K = \frac{A}{A_K} * 100\%$$

P \dot{Z} ***K*** – procent żywych komórek;

A – wartość absorbancji dla badanych ekstraktów czystka;

A_K – wartość absorbancji dla próby kontrolnej;

Otrzymane wartości absorbancji zostały pomniejszone o wartość tła.

Ostatnim etapem eksperymentu było określenie wartości stężenia hamującego 50% (IC₅₀) wskazanej linii komórkowej, dla każdego poddanego eksperymentowi ekstraktu z czystka. IC₅₀ zdefiniowano, jako stężenie ekstraktu, przy którym proliferacja komórek zostaje zahamowana w 50%, w odniesieniu do komórek kontrolnych [150]. Absorbancję kontroli przyjmowano za 100%. Każdy pojedynczy ekstrakt z *Cistus incanus* L. testowano w trzech powtórzeniach w pojedynczym eksperymencie, przy czym każde doświadczenie powtarzano od 3 do 5 razy. Wartości IC₅₀ oraz błędy pomiarowe wyznaczono przy pomocy programu GraphPad Prism 5. Badania dotyczące aktywności przeciwnowotworowej metanolowych ekstraktów *C. incanus* L. przeprowadzono w Zakładzie Fizyki Ciała Stałego Instytutu Fizyki Uniwersytetu Śląskiego.

6.3 Analiza właściwości przeciwnowotworowych *C. incanus* L. przeciwko ludzkim liniom komórkowym raka jelita grubego (HCT116) [129]

Ekstrakty *C. incanus* badano pod kątem ich działania przeciwnowotworowego przeciwko dwóm ludzkim liniom komórkowym raka jelita grubego (HCT116): dzikiego typu z prawidłową ekspresją genu TP53 (p53^{+/+}) i jego pochodnej z nokautem genu TP53 (p53^{-/-}). Wyniki przedstawiono w Tab. 11. Testowane komórki zostały wybrane w celu zbadania wpływu białka p53 na mechanizm działania próbek. Powszechnie wiadomo, że p53 należy do białek supresorowych nowotworu, które chronią komórki przed mutacją. Kiedy komórka jest uszkodzona, ta cząsteczka inicjuje mechanizm naprawczy lub uruchamia apoptozę. Białko p53 jest uznawane za „główny regulator” komórkowych programów apoptotycznych. Prawie 50% typów nowotworów posiada zmutowany gen TP53. Komórki nowotworowe z inaktywowanym p53 wykazują większą odporność na środki cytotoksyczne [35], [151]. Co więcej, guzy ze zmutowanym p53 mogą być bardziej anaplastyczne, mają wyższy wskaźnik proliferacji i bardziej agresywny fenotyp, niż podobne nowotwory z p53 typu dzikiego, co skutkuje gorszym rokowaniem w ich leczeniu [152].

Tab. 11. Aktywność przeciwnowotworowa surowych ekstraktów *C. incanus* badana na dwóch ludzkich liniach komórek gruczolaka okrężnicy HCT116 (p53^{+/+} i p53^{-/-}) i wyrażana jako stężenie związku, powodujące spadek odsetka żywych komórek w hodowli *in vitro* o 50% (IC₅₀) ± SD [129].

| Próbka <i>C. incanus</i> | Aktywność przeciwnowotworowa IC ₅₀ ± SD [µg·ml ⁻¹] | |
|-----------------------------|---|------------------------------|
| | HCT116 (p53 ^{+/+}) | HCT116 (p53 ^{-/-}) |
| A1 | 249 ± 24 | 236 ± 38 |
| A3 | 286 ± 131 | 223 ± 105 |
| A5 | 199 ± 10 | 161 ± 62 |
| T1 | 258 ± 13 | 336 ± 184 |
| T2 | 221 ± 16 | 237 ± 23 |
| T3 | 168 ± 15 | 248 ± 143 |
| T4 | 231 ± 15 | 242 ± 11 |
| ND1 | 269 ± 111 | 182 ± 70 |
| G1 | 204 ± 12 | 247 ± 12 |
| G2 | 138 ± 59 | 268 ± 136 |

Indywidualna aktywność przeciwnowotworowa badanych próbek *C. incanus*, oceniana na podstawie parametru IC₅₀ nie przekraczała 340 µg·ml⁻¹. Najskuteczniejszym ekstraktem była próbka G2 o wartości IC₅₀ równej 138 µg·ml⁻¹ dla HCT116 (p53^{+/+}), a następnie próbki A5 (161 µg mL⁻¹ dla HCT116 (p53^{-/-})) i T3 (168 µg·ml⁻¹ dla HCT116 (p53^{+/+})). Najwyższą wartość IC₅₀, a zatem najniższą aktywność przeciwnowotworową, wykryto dla T1 (336 µg·ml⁻¹). Ogólnie rzecz biorąc, wszystkie testowane ekstrakty wykazały porównywalną aktywność przeciwnowotworową, co jest raczej zrozumiałe dla jednej i tej samej rośliny, chociaż pochodzi z różnych krajów śródziemnomorskich i z różnych komercyjnych źródeł. Co ważne, obserwowana aktywność przeciwnowotworowa ekstraktów była porównywalna i nie wykazywała istotnych różnic wobec obu testowanych linii komórkowych. Może to sugerować, że śmierć komórki następuje po szlaku niezależnym od obecności p53. Jest to szczególnie interesujące, ze względu na wspomnianą wyższą odporność mutantów p53 na leki.

Aktywność przeciwnowotworowa wodnych i etanolowych ekstraktów *C. incanus* została już wykazana przez inne grupy badawcze w badaniach *in vitro*, w stosunku do linii komórkowych: raka szyjki macicy (HeLa), raka piersi (MDA-MB-453) czerniaka (FemX) oraz raka prostaty (PZ-HPV-7 i PNT1A) [35], [104]. Wybrany do naszych badań model linii komórkowych HCT116 nie został jeszcze zbadany przy pomocy ekstraktów *C. incanus*. Udowodniono jednak, że część wyizolowanych z gatunku *C. incanus* diterpenów typu labdanum wykazuje silne działanie cytotoksyczne i hamujące proliferację różnych linii nowotworowych, w tym również HCT116 [36], [95], [99], [102], [103]. Jednakże wykazana przez nasz zespół badawczy aktywność przeciwnowotworowa nie była związana z tą grupą związków. Wprowadzenie do procedury przygotowania próbki etapu ekstrakcji heksanem powoduje usunięcie z próbki związków wykazujących charakter lipofilowy, w tym również diterpenów. O powinowactwie związków typu labdanum do niepolarnych rozpuszczalników świadczy fakt udokumentowania obecności tych, związków w heksanowych ekstraktach różnych gatunków rodzaju *Cistus*. Klasą związków których obecność w ekstraktach *C. incanus* można powiązać z obserwowanym potencjałem przeciwnowotworowym są polifenole (zastosowanie do ekstrakcji materiału roślinnego silnych ekstrahentów zapewnia wysoką wydajność procesu ekstrakcji tych związków). Za tą tezę przemawiają liczne doniesienia literaturowe o aktywności antynowotworowej tych związków, w tym również tych których występowanie potwierdzone zostało w gatunku *C. incanus* [139]–[141], [153].

VII. WNIOSKI

Analiza frakcji lotnej

Na podstawie analizy GC-MS stwierdzono, że skład lotnej frakcji wyodrębnionej z handlowych próbek *C. incanus* podczas destylacji z parą wodną w aparacie Derynga jest znacznie bogatszy, niż ten uzyskany techniką analizy fazy nadpowierzchniowej. Przy pomocy obu zastosowanych metod udało się wyizolować i zidentyfikować w sumie 51 związków, z których część została po raz pierwszy zidentyfikowana w gatunku *C. incanus* L.. Wśród wszystkich zidentyfikowanych związków, 8 zostało wyizolowanych tylko przy użyciu techniki HS-GC/MS, 29 zarejestrowano wyłącznie w olejkach eterycznych otrzymanych wyniku hydrodestylacji, natomiast 14 związków wspólnych udało się zaobserwować na chromatogramach uzyskanych obiema metodami. Mimo mniejszej wydajności HS-GC/MS, obie techniki uzupełniają się, dlatego warto wykonywać je łącznie, w celu uzyskania szerszych informacji dotyczących składu chemicznego frakcji lotnej badanych ziół.

Frakcje lotne uzyskane z handlowych próbek *C. incanus* L wykazują znaczące różnice w składzie chemicznym. Różnice te są niezależne od kraju pochodzenia danego materiału roślinnego, przez co kraj zbioru próbek nie może być traktowany jako czynnik różnicujący poszczególne profile lotnej frakcji próbek. W grupie lotnych metabolitów wtórnych wyizolowanych z badanego materiału nie występuje również żaden związek ani grupa związków, które byłyby charakterystyczne dla roślin pochodzących z jednego regionu. Niezależnie od użytej metody i pochodzenia materiału roślinnego w każdej z dwunastu frakcji lotnych stwierdzono obecność dwóch związków: tlenku manoilu oraz tlenku 13-epi-manoilu. Zawartość ilościowa tych dwóch składników oraz pozostałych związków należących do grupy diterpenów stanowi średnio 1/3 zawartości całej frakcji lotnej wyizolowanej z gatunku *C. incanus*. Na chromatogramach większości przebadanych próbek widoczne są także piki pochodzące odpowiednio od: eukaliptolu, α -linalolu, kamfory, tymolu, karwakrolu, viridiflorolu, δ -kadinenu, sklareolu, tlenku sklareolu i fitonu.

Analiza nielotnej frakcji

Zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej TLC umożliwiło konstrukcję chemicznych odcisków palca oraz porównanie aktywności antyoksydacyjnej poszczególnych składników wodno-metanolowych ekstraktów uzyskanych techniką ASE z próbek handlowych *C. incanus*. Otrzymane ekstrakty różnią się ilością i intensywnością uzyskanych sygnałów chromatograficznych oraz aktywnością przeciwutleniającą badaną metodą TLC-DPPH. Różnice te wyrażone m.in. w postaci sumarycznych intensywności sygnałów poszczególnych ekstraktów czystka wydają się być powiązane z krajem pochodzenia surowca roślinnego. Ekstrakty *C. incanus* pochodzące z Turcji (T1-T5) charakteryzowały się mniejszą intensywnością sygnałów chromatograficznych, natomiast ekstrakty pochodzące z Albanii (A1-A4) największą. Największą liczbę rozdzielonych pasm chromatograficznych o największych intensywnościach i najsilniejszych właściwościach antyoksydacyjnych zaobserwowano dla pochodzących z Albanii próbek A3 i A4. Zawartość wyekstrahowanych substancji fenolowych jest dobrze powiązana z obserwowaną zdolnością zmiatania rodników DPPH. Obserwacja ta jest zgodna z dotychczasowymi doniesieniami literaturowymi, w których wykazana została korelacja aktywności przeciwutleniającej polarnych ekstraktów czystka z ich profilem polifenolowym (rozdział 3.1 z Wstępu teoretycznego).

W przeprowadzonych badaniach wykazano również, że siedem z jedenastu pasm rozdzielonych techniką chromatografii cienkowarstwowej wykazuje właściwości przeciwutleniające w teście DPPH. Co potwierdza doniesienia literaturowe wskazujące na wysoki potencjał antyoksydacyjny tego gatunku.

Ponadto udowodniono, że chromatograficzne odciski palca próbek *C. incanus* otrzymane w tym badaniu, charakteryzują się dobrze rozdzielonymi pikami, stosunkowo niską linią bazową, a metoda ich otrzymywania jest powtarzalna. W związku z tym proponowaną procedurę (w tym wstępne oczyszczanie próbek w aparacie Soxhleta, a następnie zastosowanie systemu ekstrakcji ASE z ustalonymi chemometrycznie warunkami ekstrakcji) można zastosować jako modelowe podejście do szybkiego przesiewowego badania i kontroli jakości handlowych próbek *Cistus incanus* L. pod względem liczby i zawartości poszczególnych rozdzielonych frakcji oraz ich aktywności przeciwutleniającej (wymienianej i promowanej przez sprzedawców, jako główny profil aktywności biologicznej (farmakologicznej) preparatów handlowych czystka).

W wyniku przeprowadzonego testu cytotoksyczności dla metanolowych ekstraktów czystka wobec komórek nowotworu jelita grubego linii HCT116 w hodowlach *in vitro*, zaobserwowano umiarkowany, ale dobrze mierzalny efekt przeciwnowotworowy wykazywany przez wszystkie badane próbki *C. incanus*. Według naszej wiedzy, jest to pierwsze badanie przeprowadzone z użyciem metanolowych ekstraktów czystka szarego wobec tego typu raka. Co ważne, obserwowana aktywność przeciwnowotworowa ekstraktów była porównywalna i nie wykazywała istotnych różnic wobec obu testowanych linii komórkowych (HCT116 p53^{+/+} z dziką formą genu TP53 oraz HCT116 p53^{-/-} pozbawionych obu alleli tego genu). Otrzymane wyniki sugerują, że apoptoza komórki następuje po szlaku niezależnym od białka p53. Jest to szczególnie interesujące, ze względu na generalnie zwiększoną odporność na środki chemioterapeutyczne wykazywaną przez komórki ze zmutowanym białkiem p53.

Udowodniono działanie przeciwbakteryjne ekstraktów z dwunastu próbek *C. incanus* L. uzyskanych w wyniku wyczerpującej ekstrakcji metanolem w aparacie Soxhleta. Aktywność tę oceniano metodą chromatografii cienkowarstwowej - bioautografii bezpośredniej (TLC-DB) zastosowanej na surowych ekstraktach czystka przeciwko dwóm szczepom bakterii (Gram-ujemnej naturalnie świecącej *Aliivibrio fischeri* i Gram-dodatniej bakterii glebowej *Bacillus subtilis*) użytym, jako mikroorganizmy testowe. Ustalono, że pomimo różnego pochodzenia badanych próbek ziołowych, pod względem jakościowym ich aktywność przeciwbakteryjna była porównywalna i silniej zaznaczona w stosunku do bakterii Gram-dodatnich niż bakterii Gram-ujemnych.

Na podstawie analizy TLC-DB przeprowadzonej dla sześciu fenolowych frakcji (I do VI) otrzymanych w wyniku selektywnej wielostopniowej ekstrakcji surowego metanolowego ekstraktu próbki A3 wykazano również, że największym potencjałem przeciwbakteryjnym charakteryzuje się sześć pasm chromatograficznych obecnych we frakcji I. Stosując techniki chromatograficzne (TLC/HPTLC oraz HPLC) dokonano identyfikacji aktywnych biologicznie składników występujących w tych pasmach. Do zidentyfikowanych związków należały: apigenina, 3-O-metylokemferol, *cis*- i *trans*-tylirozyd oraz izomery tylirozydu sprzężonego z kwasem *p*-kumarowym (dikumaroiloglukozydy kemferolu), wszystkie z nich hamowały wzrost obu testowanych szczepów bakterii (*B. subtilis* i *A. fischeri*). Uzyskane rezultaty potwierdzają skuteczność i zasadność stosowania różnych wariantów techniki TLC/HPTLC (w szczególności połączenie z testami aktywności biologicznej (TLC-DB i TLC-DPPH)) jako przydatnego

narzędzia do szybkiego przesiewowego badania aktywności poszczególnych składników obecnych w złożonej matrycy roślinnej oraz ich późniejszej identyfikacji.

Otrzymane wyniki analiz chromatograficznych wskazują także na nieprawidłowości występujące w dobrze ugruntowanej i szeroko stosowanej procedurze selektywnej wielostopniowej ekstrakcji fenoli. Do głównych mankamentów zaliczyć trzeba występowanie w frakcji aglikonów flawonoidów (I) szeregu związków o strukturze glikozydów oraz fakt, że jeden z zidentyfikowanych glikozydów (tylirozyd) obecny był również w frakcji wolnych kwasów fenolowych (II).

Na potrzeby identyfikacji związków zawartych w fenolowej frakcji I, opracowano trzy niezależne metody HPTLC (wielokrotne rozwijanie na żelu krzemionkowym modyfikowanym aminą i dwie metody oparte o dwukierunkowe rozwijanie w żelu krzemionkowym) połączone z hydrolizą kwasową *in situ* służące do wykrywania w rozdzielonych pasmach chromatograficznych związków strukturalnie kemferolu i glukozy.

Podsumowując, opracowane procedury analityczne bazujące na technikach chromatograficznych z powodzeniem zastosowano do analizy i porównania składu chemicznego 12 próbek handlowych *C. incanus*. Przyjęta metodologia pozwoliła również na ocenę potencjału antyoksydacyjnego, antybakteryjnego i antynowotworowego tej rośliny. Uzyskane wyniki wskazują na wysoki potencjał farmakologiczny ekstraktów czystka oraz ich składników.

VIII. ZAŁĄCZNIKI

ANEKS 1. LISTA PRAC WŁASNYCH

Lista prac własnych tematycznie związanych z rozprawą doktorską:

1. **D. Szeremeta**, M. Knaś, E. Długosz, M. Sajewicz, “Qualitative evaluation of composition of the volatile fraction in commercial samples of *Cistus incanus* L.”, *Acta Chromatographica*, 29 (2017), DOI: 10.1556/1326.2017.29.3.13
2. **D. Szeremeta**, M. Knaś, E. Długosz, T. Kowalska, M. Sajewicz, „Thin-Layer Chromatographic Fingerprinting of the Non-Volatile Fraction Extracted from the Medicinal Herb *Cistus incanus* L.”, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 40 (2017), DOI: 10.1080/10826076.2017.1298033
3. **D. Szeremeta**, M. Knaś, E. Długosz, K. Krzykała, A. Mrozek-Wilczkiewicz, R. Musioł, T. Kowalska, P. G. Ott, M. Sajewicz, Á. M. Móricz, „Investigation of antibacterial and cytotoxic potential of phenolics derived from *Cistus incanus* L. by means of thin-layer chromatography-direct bioautography and cytotoxicity assay”, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 41 (2018), DOI: 10.1080/10826076.2018.1449056
4. Á. M. Móricz, **D. Szeremeta**, M. Knaś, E. Długosz, P. G. Ott, T. Kowalska, M. Sajewicz, „Antibacterial potential of the *Cistus incanus* L. phenolics as studied with use of thin-layer chromatography combined with direct bioautography and *in situ* hydrolysis”, *Journal of Chromatography A*, 1534 (2018), DOI: 10.1016/j.chroma.2017.12.056

Lista pozostałych prac własnych:

1. M. Knaś, **D. Szeremeta**, J. Polański, M. Sajewicz, T. Kowalska, “Specific mobility of selected phytochemicals in thin-layer chromatographic systems and its possible relevance to pharmacokinetics”, *Acta Chromatographica*, 25 (2013), DOI: 10.1556/AChrom.25.2013.4.14
2. P. Marczevska, M. Miszczyk, M. Płonka, D. Kronenbach-Dylong, **D. Szeremeta**, M. Sajewicz, “Application of different chromatographic techniques and chemometric analysis in authenticity testing of plant protection products containing azoxystrobin as an active substance”, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, (2019), DOI: 10.1080/03601234.2019.1610298

ANEKS 2. LISTA PUBLIKACJI KONFERENCYJNYCH

Wystąpienia ustne:

1. P. Marczevska, **D. Szeremeta**, M. Mucha, J. Rzepa, M. Sajewicz, *Determination of pesticides in herbs by gas chromatography*, XXXVIII Sympozjum pt. „Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds”, Katowice – Szczyrk, 26-29 maj 2015 r.
2. P. Marczevska, **D. Szeremeta**, M. Sajewicz, *Oznaczanie izomerów heksachlorocykloheksanu w próbkach środowiskowych techniką chromatografii gazowej*, I Forum Reeducacji, Rewitalizacji i Zielonej Energii (I FRRiZE), Katowice, 29 czerwiec 2015 r.
3. **D. Szeremeta**, M. Knaś, E. Długosz, M. Sajewicz, *The comparison of composition of the volatile fraction in commercial samples of Cistus incanus L.*, XXXIX Sympozjum pt. „Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds”, Szczyrk, 1-3 czerwiec 2016 r.

Postery:

1. M. Knaś, **D. Szeremeta**, J. Polański, M. Sajewicz, T. Kowalska, *Specyficzna mobilność wybranych fitochemikaliów w układach chromatografii cienkowarstwowej i jej potencjalne znaczenie w farmakokinytyce*, VII Seminarium Naukowe pt. „Aktualne Problemy Chemii Analitycznej, Katowice”, 17 maj 2013 r.
2. M. Knaś, **D. Szeremeta**, J. Polański, M. Sajewicz, T. Kowalska, *Specific mobility of selected phytochemicals in thin-layer chromatographic systems and its possible relevance to pharmacokinetics*, XXXVI Sympozjum pt. „Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds”, Katowice – Szczyrk, 5 -7 czerwiec 2014 r.
3. **D. Szeremeta**, M. Knaś, J. Polański, M. Sajewicz, T. Kowalska, *Specyficzna mobilność niektórych związków chemicznych w wybranych układach TLC*, II ogólnopolska konferencja naukowa pt. „Pomiędzy Naukami – zjazd fizyków i chemików”, Chorzów, 27 wrzesień 2013 r.
4. **D. Szeremeta**, M. Sajewicz, T. Kowalska, *Biologiczne metody remediacji terenów skażonych*, Zimowy Zjazd Sekcji Studenckiej PTChem, Łódź, 07 grudzień 2013 r.
5. **D. Szeremeta**, M. Knaś, M. Sajewicz, T. Kowalska, *Chromatograficzna ocena rozkładu HCH przez wybrane szczepy bakterii*, X Międzynarodowej Konferencji Naukowej pt. „Chromatografia Jonowa 2014”, Zabrze, 9-10 kwiecień 2014 r.

6. **D. Szeremeta**, M. Knaś, P. Marczevska, M. Kozuch, M. Sajewicz, T. Kowalska, *Oznaczanie zawartości izomerów heksachlorocykloheksanu (HCH) w próbkach wody metodą chromatografii gazowej*, VIII Seminarium Naukowe pt. „Aktualne Problemy Chemii Analitycznej”, Katowice, 16 maj 2014 r.
7. **D. Szeremeta**, M. Knaś, P. Marczevska, M. Sajewicz, T. Kowalska, *Determination of hexachlorocyclohexane (HCH) isomers in water samples by gas chromatography*, XXXVII Sympozjum pt. “Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds”, Katowice – Szczyrk, 11 -13 czerwiec 2014 r.
8. **D. Szeremeta**, M. Knaś, T. Kowalska, M. Sajewicz, *Determination of HCH isomers and chromatographic evaluation of bioremediation of water environments contaminated with pesticides*, 7th Central European Conference Chemistry towards Biology, Katowice, 9-12 wrzesień 2014 r.
9. **D. Szeremeta**, M. Knaś, P. Marczevska, T. Kowalska, M. Sajewicz, *Metody przygotowywania próbek wodnych do chromatograficznego oznaczania izomerów heksachlorocykloheksanu (HCH)*, III ogólnopolska konferencja naukowa pt. „Pomiędzy Naukami – zjazd fizyków i chemików”, Chorzów, 26 wrzesień 2014 r.
10. **D. Szeremeta**, P. Marczevska, T. Kowalska, M. Sajewicz, *Oznaczanie izomerów heksachlorocykloheksanu (HCH) techniką chromatografii gazowej w pożywkach stosowanych do hodowli bakterii*, Zimowy Zjazd Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Wrocław, 13 grudzień 2014 r.
11. P. Marczevska, **D. Szeremeta**, M. Sajewicz, *Zastosowanie chromatografii gazowej w oznaczaniu pestycydów*, Zimowy Zjazd Sekcji Studenckiej PTChem, Wrocław, 13 grudzień 2014 r.
12. **D. Szeremeta**, P. Marczevska, J. Rzepa, M. Sajewicz, *Identification of hexachlorocyclohexane biodegradation products by GC-MS*, 33rd Informal Meeting on Mass Spectrometry, Szczyrk, 10-13 maj 2015 r.
13. P. Marczevska, **D. Szeremeta**, J. Rzepa, M. Sajewicz, *GC-MS in analysis of lavender volatile components*, 33rd Informal Meeting on Mass Spectrometry, Szczyrk, 10-13 maj 2015 r.
14. **D. Szeremeta**, P. Marczevska, J. Rzepa, M. Sajewicz, *Oznaczanie izomerów heksachlorocykloheksanu (HCH) oraz produktów ich biodegradacji w próbkach środowiskowych*, IX Seminarium Naukowe pt. "Aktualne Problemy Chemii Analitycznej", Katowice, 15 maj 2015 r.
15. P. Marczevska, **D. Szeremeta**, J. Rzepa, M. Sajewicz, *Zastosowanie chromatografii gazowej w oznaczaniu pestycydów*, IX Seminarium Naukowe pt. "Aktualne Problemy Chemii Analitycznej", Katowice, 15 maj 2015 r.

16. **D. Szeremeta**, P. Marczevska, M. Knaś, J. Rzepa, M. Sajewicz, *Determination of hexachlorocyclohexane (HCH) isomers and their biodegradation products in environment samples by GC*, XXXVIII Sympozjum pt. „Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds”, Katowice – Szczyrk, 26-29 maj 2015 r.
17. **D. Szeremeta**, P. Marczevska, M. Sajewicz, *Chromatograficzna ocena skuteczności biodegradacji heksachlorocykloheksanu przez wybrane szczepy bakterii*, I Forum Remediacji, Rewitalizacji i Zielonej Energii (I FRRiZE), Katowice, 29 czerwiec 2015 r.
18. P. Marczevska, **D. Szeremeta**, M. Sajewicz, *Monitorowanie pozostałości HCH w próbkach środowiskowych techniką chromatografii gazowej*, IV ogólnopolska konferencja naukowa pt. „Pomiędzy Naukami – zjazd fizyków i chemików”, Chorzów, 18 wrzesień 2015 r.
19. **D. Szeremeta**, M. Knaś, E. Długosz, M. Sajewicz, *Chromatograficzna ocena składu olejków eterycznych zawartych w zieleu czystka*, X Sympozjum Naukowe pt. „Aktualne problemy Chemii Analitycznej”, Katowice, 13 maj 2016 r.
20. **D. Szeremeta**, M. Knaś, E. Długosz, M. Sajewicz, *Chromatographic evaluation of the essentials oils composition for the Cistus Incanus L. herb*, 10th International Symposium on Chromatography of Natural Products, Lublin, 6-9 czerwiec 2016 r.
21. E. Długosz, M. Knaś, **D. Szeremeta**, M. Sajewicz, *Prospects for the use of preparations of Cistus incanus L. in pharmacotherapy*, 16 Sejmik Zielarski pt. "Zielarstwo i Ziołolecznictwo w Polsce i na świecie", Trzebaw 17-18 czerwiec 2016 r.
22. E. Długosz, M. Knaś, **D. Szeremeta**, M. Sajewicz, *Possibilities of using techniques of hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of natural compounds*, VIII Konwersatorium Chemii Medycznej, Lublin, 15-17 wrzesień 2016 r.
23. M. Knaś, **D. Szeremeta**, E. Długosz, M. Sajewicz, *Oznaczanie związków polifenolowych zawartych w zieleu czystka (Cistus incanus L.) techniką TLC*, V ogólnopolska konferencja naukowa pt. „Pomiędzy Naukami – zjazd fizyków i chemików”, Chorzów, 16 wrzesień 2016 r.
24. E. Długosz, **D. Szeremeta**, M. Knaś, M. Sajewicz, *Badania porównawcze składu olejków eterycznych w zieleu czystka siwego Cistus incanus L. a potencjalny wpływ na bezpieczeństwo stosowania w farmakoterapii*, Kongres Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego - Farmacja 21 "Farmaceuci w ochronie zdrowia", Wrocław, 23-24 wrzesień 2016 r.
25. **D. Szeremeta**, M. Knaś, K. Męcik, A. Król, E. Długosz, P. Olczyk, T. Kowalska, M. Sajewicz, *Przygotowanie próbek materiału roślinnego do oznaczania związków*

polifenolowych, XI Sympozjum Naukowe pt. „Aktualne problemy Chemii Analitycznej”, Katowice, 12 maj 2017 r.

26. M. Knaś, **D. Szeremeta**, A. Król, K. Męcik, E. Długosz, P. Olczyk, T. Kowalska, M. Sajewicz, *Chromatographic determination of phenolic compounds in commercial samples of Cistus incanus L.*, XXXX Sympozjum pt. „Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds, Katowice – Szczyrk, 24-26 maj 2017 r.

27. M. Knaś, **D. Szeremeta**, E. Długosz, P. Olczyk, T. Kowalska, M. Sajewicz, *TLC determination and comparison of phenolic compounds in commercial samples of Cistus incanus L.*, The Conference on the 65th Anniversary of Faculty of Pharmacy, Comenius University in Bratislava - 46th EuroCongress on Drug Synthesis and Analysis, Bratislava, Słowacja, 5-8 wrzesień 2017

28. **D. Szeremeta**, M. Knaś, E. Długosz, P. Olczyk, M. Sajewicz, *Analiza składu chemicznego oraz właściwości antyoksydacyjnych próbek handlowych czystka (Cistus incanus L.)*, VI Ogólnopolska konferencja naukowa pt. „Pomiędzy Naukami”, Chorzów, 15 września 2017 r.

29. M. Knaś, **D. Szeremeta**, E. Długosz, P. Olczyk, T. Kowalska, M. Sajewicz, *Composition fluctuations of the phenolics in the Cistus incanus L. herbal material from the polish pharmaceutical and alimentary market*, 3rd International Conference on Natural Products Utilization: from Plant to Pharmacy Shelf (ICNPU-2017), Bańsko, Bułgaria, 18-21 październik 2017

ANEKS 3. SPIS RYSUNKÓW

- Rys. 1. *Cistus incanus* L. [25]..... - 12 -
- Rys. 2. Klasyfikacja taksonomiczna gatunku *C. incanus* L. (według Reveala). - 12 -
- Rys. 3. Mapa rozmieszczenia gatunków *Cistus*. Diagramy kołowe obrazują proporcje występowania w poszczególnych krajach gatunków o kwiatach białych (biały) i fioletowych (szary). Region Morza Śródziemnego pokazany na szaro [38]. - 13 -
- Rys. 4. Struktura izoprenu (2-metylo-1,3-butadienu). - 15 -
- Rys. 5. Wzory strukturalne wybranych monoterpenu i ich pochodnych obecnych w olejku eterycznym *C. incanus*. - 16 -
- Rys. 6. Wzory strukturalne wybranych seskwiterpenów i ich pochodnych obecnych w olejku eterycznym *C. incanus*. - 17 -
- Rys. 7. Wybrane diterpeny typu labdanu zidentyfikowane w ziele i żywicy *C. incanus*. (1) sklareol; (2) labd-13(E)-en-8 α -15-diol; (3) octan labd-13(E)-en-8 α -ol-15-yli; (4) labd-7,13(E)-dien-15-ol; (5) octan labd-7,13(E)-dien-15-yli; (6) tlenek 3 β -hydroksy-13-epi-manoilu; (7) tlenek 3 β -acetoksy-13-epi-manoilu; (8) izomery tlenku manoilu (tlenek 13-epi-manoil 8a; tlenek manoilu 8b; tlenek 8-epi-manoyl 8c). - 18 -
- Rys. 8. Podstawowe struktury kwasów fenolowych występujących w przyrodzie [67].- 20 -
- Rys. 9. Wybrane kwasy fenolowe i ich pochodne glikozydowe zidentyfikowane w *C. incanus*. - 21 -
- Rys. 10. Podstawowa struktura flawonoidu: A – pierścień benzenowy, B – pierścień fenylowy, C – pierścień piranowy. - 22 -
- Rys. 11. Podstawowe struktury flawonoidów..... - 23 -
- Rys. 12. Główne flawonole oraz ich wybrane formy glikozydowe występujące w *C. incanus*. - 24 -
- Rys. 13. Struktury chemiczne wybranych flawanoli zidentyfikowanych w *C. incanus*.- 25 -
- Rys. 14. Pochodzenie próbek handlowych *C. incanus*. - 42 -
- Rys. 15. Schemat programu temperaturowego analizy techniką GC/MS substancji lotnych zawartych w badanych próbkach *C. incanus* L. - 44 -
- Rys. 16. Dwanaście najczęściej występujących związków zidentyfikowanych w próbkach *C. incanus* wraz z ich wzorami strukturalnym i widmami mas [114]. - 48 -
- Rys. 17. Liczba związków zidentyfikowanych w próbkach czystka. Wykres przedstawia ogólną liczbę zidentyfikowanych lotnych związków będących składnikami olejków

- eterycznych z dwunastu próbek *C. incanus* L. (lewy słupek) oraz otrzymanych techniką headspace bezpośrednio z materiału roślinnego (prawy słupek) [114]. - 49 -
- Rys. 18. Chromatogramy GC/MS otrzymane dla olejków eterycznych uzyskanych z próbek czystka T2 i T3. Numeracja związków zgodna z opisem z Tab. 3 [114]. - 52 -
- Rys. 19. Chromatogramy HS-GC/MS otrzymane dla lotnych frakcji uzyskanych z próbek czystka T2 i T3. Numeracja związków zgodna z opisem z Tab. 3 [114]. - 52 -
- Rys. 20. Struktura chemiczna rodnika DPPH oraz jego reakcja z substancją przeciwutleniającą..... - 56 -
- Rys. 21. Chromatograficzne odciski palca dwunastu ekstraktów *C. incanus* L.. Rejestracja zdjęć w świetle UV przy długości fali $\lambda = 366$ nm. Strzałkami zaznaczono linię startu (S) oraz czoło fazy ruchomej (F) [116]. - 57 -
- Rys. 22. Porównanie densytogramów otrzymanych dla ekstraktów próbek T1 i A3. Densytogramy rejestrowano w trybie fluorescencji przy długości fali $\lambda = 366$ nm. Numeracja sygnałów na chromatogramach odpowiada pikom chromatograficznym przedstawionym w Tab. 6 [116]. - 59 -
- Rys. 23. Graficzne porównanie: (a) sumy wysokości pików chromatograficznych wszystkich dwunastu ekstraktów próbek *C. incanus* L.; (b) średniej sumy wysokości pików chromatograficznych dla próbek o tym samym pochodzeniu geograficznym [116].- 60 -
- Rys. 24. Profile aktywności antyoksydacyjnej dwunastu ekstraktów *C. incanus* L.. Rejestracja zdjęć w świetle widzialnym po wizualizacji 0,20% roztworem DPPH. Strzałkami zaznaczono linię startu (S) oraz czoło fazy ruchomej (F) [116]...... - 62 -
- Rys. 25. Porównanie densytogramów ekstraktów próbek T1 i A3 otrzymanych po wizualizacji 0,20% roztworem DPPH. Numeracja sygnałów na chromatogramach odpowiada pikom chromatograficznym przedstawionym w Tab. 6 [116]. - 62 -
- Rys. 26. Schematyczne porównanie chemicznych (jasnoniebieskie pasma na granatowym tle) i biologicznych (żółte pasma na fioletowym tle) odcisków palca ekstraktu z *C. incanus* [116]. - 64 -
- Rys. 27. Graficzne porównanie sumy wysokości pików chromatograficznych dwunastu ekstraktów próbek *C. incanus* po wizualizacji 0,20% roztworem DPPH [116]. - 64 -
- Rys. 28. Schemat otrzymywanie surowych metanolowych ekstraktów handlowych próbek *C. incanus*. - 66 -
- Rys. 29. Schemat procedury wieloetapowej ekstrakcji związków fenolowych (opracowanej na podstawie [123]–[126]). - 68 -
- Rys. 30. Chromatogramy surowego metanolowego ekstraktu (SME) próbki A3 (5 μ l na pasmo). Rozdział przeprowadzono na płytkach chromatograficznych pokrytych żelam krzemionkowym Si60 F₂₅₄, faza ruchoma: chloroform- metanol - octan etylu (75:15:10, v/v/v), wizualizacja: przy UV $\lambda = 254$ nm (a) i $\lambda = 365$ nm (b), po derywatywacji

chlorkiem glinu przy UV $\lambda = 365$ nm (c) oraz z reagentem NP-PEG przy UV $\lambda = 365$ nm (d) test mikrobiologiczny z bakteriami *B. subtilis* (e) [129]. - 77 -

Rys. 31. Chromatogramy zagęszczonych surowych metanolowych ekstraktów *C. incanus*. Rozdział przeprowadzono na płytkach chromatograficznych pokrytych żelem krzemionkowym Si60 F₂₅₄, faza ruchoma: chloroform - metanol - octan etylu (75:15:10, v/v/v), wizualizacja: przy UV $\lambda = 254$ nm (a) i $\lambda = 365$ nm (b), po derywatywacji AlCl₃ przy UV $\lambda = 365$ nm (c) [129]. - 78 -

Rys. 32. Wybrane chromatogramy TLC związków bioaktywnych, zawartych w zagęszczonych surowych metanolowych ekstraktach *C. incanus*. Rozdział przeprowadzono na płytkach chromatograficznych pokrytych żelem krzemionkowym Si60 F₂₅₄, faza ruchoma: chloroform - metanol - octan etylu (75:15:10, v/v/v), wizualizacja chromatogramów przy UV $\lambda = 254$ nm (a) oraz po derywatywacji AlCl₃ przy UV $\lambda = 365$ nm (b). Bioautogramy otrzymane w biotestach *B. subtilis* (c) oraz *A. fischeri*. [129]. - 79 -

Rys. 33. Chromatogramy TLC zagęszczonego surowego metanolowego ekstraktu próbki A3 oraz jego frakcji od I do VI. Rozdział przeprowadzono na płytkach chromatograficznych pokrytych żelem krzemionkowym Si60 F₂₅₄, faza ruchoma: chloroform - metanol - octan etylu (75:15:10, v/v/v), wizualizacja chromatogramów przy UV $\lambda = 254$ nm (a) i $\lambda = 365$ nm (b), po derywatywacji AlCl₃ przy UV $\lambda = 365$ nm (c) i NP-PEG przy UV $\lambda = 365$ nm (d) [129]. - 81 -

Rys. 34. Związki bioaktywne zawarte w zagęszczonym surowym metanolowym ekstrakcie próbki A3 oraz jego frakcjach od I do VI. Rozdział przeprowadzono na płytkach chromatograficznych pokrytych żelem krzemionkowym Si60 F₂₅₄, faza ruchoma: chloroform - metanol - octan etylu (75:15:10, v/v/v). Bioautogramy otrzymane w biotestach *B. subtilis* (a) oraz *A. fischeri*. (b). Wizualizacja chromatogramów po derywatywacji chlorkiem glinu przy UV $\lambda = 365$ nm (c). [129]. - 83 -

Rys. 35. Chromatogramy TLC frakcji III i IV otrzymanych z ekstraktu próbki A3. Rozdział przeprowadzono na płytkach chromatograficznych pokrytych żelem krzemionkowym Si60 F₂₅₄, faza ruchoma: toluen – octan etylu – metanol, 5:2:3 (v/v/v), wizualizacja chromatogramów przy UV $\lambda = 254$ nm (a). Bioautogramy otrzymane w biotestach *B. subtilis* (b) oraz *A. fischeri*. (c) [129]. - 84 -

Rys. 36. Chromatogramy i bioautogramy TLC frakcji flawonoidowej I jedenastu próbek handlowych *C. incanus*. Rozdział przeprowadzono na płytkach chromatograficznych pokrytych żelem krzemionkowym Si60 F₂₅₄, faza ruchoma: chloroform - metanol - octan etylu (75:15:10, v/v/v). Wizualizacja: UV $\lambda = 365$ nm (a), po derywatywacji chlorkiem glinu w UV $\lambda = 365$ nm (b), UV $\lambda = 254$ nm (c), testy przeciwbakteryjne przeciwko *B. subtilis* (d) i *A. fischeri* dokumentowane natychmiast (e) i po 20 min (f) [130]. - 86 -

Rys. 37. Chemiczna charakterystyka składników bioaktywnych (od c1 do c6) frakcji flawonoidowej I próbek *C. incanus*. Rozdział przeprowadzono na płytkach chromatograficznych pokrytych żelem krzemionkowym Si60 F₂₅₄, faza ruchoma: chloroform - metanol - octan etylu (75:15:10, v/v/v). Derywatywacja: AlCl₃ (a, $\lambda = 365$ nm), NP-PEG (b, $\lambda = 365$ nm), FeCl₃ (c, światło białe), PABA (d, $\lambda = 365$ nm) i DPA (e, światło białe) [130]. - 87 -

Rys. 38. Chromatogramy dwóch zagęszczonych ekstraktów *C. incanus* (A4 i T3), ich frakcji flawonoidowych I (A4/I i T3/I), składników antybakteryjnych wyizolowanych ze pasm c1 do c6 oraz wzorca apigeniny (ap). Rozdział przeprowadzono na płytkach chromatograficznych pokrytych żelom krzemionkowym Si60 F₂₅₄, faza ruchoma: chloroform - metanol - octan etylu (75:15:10, v/v/v). Wizualizacja przy UV $\lambda = 254$ nm (a), po derywatywacji chlorkiem glinu w UV $\lambda = 365$ nm (b) i po zastosowaniu testu *B. subtilis* (c) [130]. - 88 -

Rys. 39. Chromatogramy HPLC-DAD zarejestrowane przy $\lambda = 314$ nm (a) i odpowiadające im chromatogramy uzyskane techniką HPLC-ESI-MS (b) dwóch zagęszczonych ekstraktów *C. incanus* (T3 i A1), ich frakcji flawonoidowych I (T3/I i A1/I), składników antybakteryjnych wyizolowanych z pasm c1 do c6 oraz wzorca apigeniny. Każda wartość *m/z* jest reprezentowana przez inny kolor [130]...... - 89 -

Rys. 40. Widma UV (strona lewa), ESI + (pośrodku) i ESI - (strona prawa) głównych składników wchodzących w skład pasm chromatograficznych c1, c2, c5 i c6 [130]... - 89 -

Rys. 41. Wykrywanie glukozy (G) uwolnionej z aktywnych biologicznie pasm fenolowej frakcji I czystka, połączonej z kwasową hydrolizą *in situ* na płytka HPTLC pokrytych żelom krzemionkowym modyfikowanym aminą. Pojedyncze rozwijanie – faza ruchoma: acetonitryl - woda, 7:3 (v/v) (a) i wstępne rozwijanie acetonitrylem, a po wysuszeniu właściwe rozwijanie fazą ruchomą acetonitryl - woda, 7: 3 (v/v) , jak podano w Tab. 9 (b). Pasma c1 do c6 (takie same, jak na Rys. 36) wyizolowano z warstwy TLC rozwiniętej frakcji I, # jest eluatem kontrolnym tła płytki [130]...... - 92 -

Rys. 42. Wykrywanie glukozy (G) uwolnionej ze związków obecnych w aktywnych strefach frakcji I *C. incanus* (próbka A1), przy pomocy 2D-HPTLC na warstwie żelu krzemionkowego, w połączeniu z kwasową hydrolizą *in situ* (kolejne kroki procedury podano w Tab. 10a). Pierwsze rozwijanie w pierwszym kierunku mieszaniną chloroform - octan etylu - metanol, 75:10:15 (v/v/v) (a; $\lambda = 254$ nm), drugie rozwinięcie w drugi kierunku (po kwasowej hydrolizie) acetonitrylem, a po wysuszeniu płytki mieszaniną acetonitryl – woda, 35:10 (v/v) (b; $\lambda = 365$ nm). Derywatywacja przy użyciu: DPA (c; światło białe), PABA (d; $\lambda = 365$ nm) i PABA-parafina (e; $\lambda = 365$ nm) [130]. - 94 -

Rys. 43. Wykrywanie kemferolu (K) uwolnionego ze związków obecnych w aktywnych strefach frakcji I *C. incanus* (próbka A1), przy pomocy 2D-HPTLC na warstwie żelu krzemionkowego, w połączeniu z kwasową hydrolizą *in situ* (kolejne kroki procedury podano w Tab. 10b). Pierwsze rozwijanie w pierwszym kierunku mieszaniną chloroform - octan etylu - metanol, 75:10:15 (v/v/v) (a; $\lambda = 254$ nm), drugie rozwinięcie w drugi kierunku (po kwasowej hydrolizie) mieszaniną toluen – octan izopropylu – kwas mrówkowy 3:2:0,5 (v/v/v) i wizualizacji chlorkiem glinu (b; $\lambda = 365$ nm) [130]...... - 95 -

Rys. 44. Chromatogramy HPLC-DAD kemferolu, kwasu *p*-kumarowego i hydrolizowanych kwasem izolatów (c1 do c4). Rejestracja przy $\lambda = 314$ nm, wartości *m/z* odpowiadające poszczególnym pikom otrzymane metodą HPLC-DAD-ESI (+) [130]. - 96 -

Rys. 45. Żółty związek MTS przekształcony w czerwono-purpurowy formazan. - 99 -

ANEKS 5. SPIS TABEL

- Tab. 1. Skład chemiczny olejków eterycznych wyizolowanych z próbek *C. incanus* metodą destylacji z parą wodną w aparacie Derynga i analizowanych techniką GC / MS [114]. - 46 -
- Tab. 2. Skład chemiczny frakcji lotnych wyizolowanych z próbek *C. incanus* analizowanych techniką HS-GC/MS [114]. - 47 -
- Tab. 3. Lista związków zidentyfikowanych za pomocą obu metod zastosowanych do analizy frakcji lotnej próbek handlowych czystka [114]. - 50 -
- Tab. 4. Warunki analizy dla przyspieszonej ekstrakcji rozpuszczalnikowej [116]. - 54 -
- Tab. 5. Układy chromatograficzne zastosowane podczas analizy TLC ekstraktów czystka. - 55 -
- Tab. 6. Wyniki analizy densytometrycznej chromatogramów TLC otrzymanych dla dwunastu ekstraktów czystka. Przedstawione zostały: średnie współczynniki retardacji R_F rozdzielonych pików chromatograficznych, liczba oraz wysokości pików dla każdego indywidualnego fingerprintu [mAV] oraz suma wysokości wszystkich rozdzielonych pików [mAV] [116]. - 58 -
- Tab. 7. Wyniki analizy densytometrycznej chromatogramów otrzymanych dla dwunastu ekstraktów czystka po wizualizacji 0,20% roztworem DPPH. Przedstawione zostały: średnie współczynniki retardacji R_F rozdzielonych pików chromatograficznych, wysokości pików dla każdego indywidualnego fingerprintu [mAV] oraz suma wysokości wszystkich rozdzielonych pików [mAV]. Numeracja sygnałów jest zgodna z Tab. 6 [116]. - 63 -
- Tab. 8. Charakterystyka frakcji otrzymanych w wyniku wielostopniowej ekstrakcji związków fenolowych. - 70 -
- Tab. 9. Kolejne etapy analizy HPTLC na żelu krzemionkowym modyfikowanym aminą 60 F_{254S} połączonej z hydrolizą kwasową *in situ* w celu potwierdzenia obecności glukozy w związkach aktywnych. - 74 -
- Tab. 10. Kolejne etapy dwukierunkowej analizy HPTLC na żelu krzemionkowym 60 F_{254S} połączonej z hydrolizą kwasową *in situ* w celu potwierdzenia obecności koniugatów glukozy (a) i kemferolu (b) w związkach aktywnych. - 75 -
- Tab. 11. Aktywność przeciwnowotworowa surowych ekstraktów *C. incanus* badana na dwóch ludzkich liniach komórek gruczolaka okrężnicy HCT116 (p53^{+/+} i p53^{-/-}) i wyrażana jako stężenie związku, powodujące spadek odsetka żywych komórek w hodowli *in vitro* o 50% (IC₅₀) ± SD [129]. - 101 -

IX. BIBLIOGRAFIA

- [1] I. Juranović Cindrić, M. Zeiner, E. Glamuzina, i G. Stinger, „Elemental characterisation of the medical herbs *Salvia officinalis* L. and *Teucrium montanum* L. grown in Croatia”, *Microchem. J.*, t. 107, ss. 185–189, 2013.
- [2] E. Senderski, Mateusz, *Prawie wszystko o ziołach i ziołolecznictwie*. Podkowa Leśna: Mateusz E. Senderski, 2015.
- [3] K. Bone i S. Mills, *Principles and Practice of Phytotherapy*. Elsevier, 2013.
- [4] R. Tisserand i R. Young, *Essential Oil Safety*. Elsevier, 2014.
- [5] H. Wysokińska i A. Chmiel, „Produkcja roślinnych metabolitów wtórnych w kulturach organów transformowanych”, *Biotechnologia*, t. 4, ss. 124–135, 2006.
- [6] J. Lutomski, „Znaczenie ziół w terapii i dietetyce”, *Postępy Fitoter.*, t. 6, nr 2–3, ss. 3–8, 2001.
- [7] T. Wolski, A. Najda, B. Kędzia, i K. Wolska-Gawron, „Fitoterapia chorób dermatologicznych”, *Postępy Fitoter.*, t. 18, nr 4, ss. 298–308, 2017.
- [8] I. Choma i W. Jesionek, „TLC-Direct Bioautography as a High Throughput Method for Detection of Antimicrobials in Plants”, *Chromatography*, t. 2, nr 2, ss. 225–238, 2015.
- [9] Á. M. Móricz, T. T. Häbe, A. Böszörményi, P. G. Ott, i G. E. Morlock, „Tracking and identification of antibacterial components in the essential oil of *Tanacetum vulgare* L. by the combination of high-performance thin-layer chromatography with direct bioautography and mass spectrometry”, *J. Chromatogr. A*, t. 1422, ss. 310–317, 2015.
- [10] J. Sherma i B. Fried, *Handbook of thin layer chromatography*, 3. wyd. New York: Marcel Dekker, Inc., 2003.
- [11] J. C. Touchstone i M. F. Dobbins, *Practice of thin layer chromatography*, 3. wyd. New York: Wiley, 1992.
- [12] H. Jork, W. Funk, W. Fischer, i H. Wimmer, *Thin-layer chromatography - Reagents and detection methods*. Weinheim: VCH, 1990.
- [13] G. Morlock i W. Schwack, „Coupling of planar chromatography to mass spectrometry”, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, t. 29, nr 10, ss. 1157–1171, 2010.
- [14] G. E. Morlock, „Chromatography Combined with Bioassays and Other Hyphenations – The Direct Link to the Compound Indicating the Effect”, Washington: American Chemical Society, 2014, ss. 101–121.
- [15] Á. M. Móricz *i in.*, „Effect-Directed Discovery of Bioactive Compounds Followed by Highly Targeted Characterization, Isolation and Identification, Exemplarily Shown for *Solidago virgaurea*”, *Anal. Chem.*, t. 88, nr 16, ss. 8202–8209, 2016.
- [16] Á. M. Móricz i P. G. Ott, „Screening and Characterization of Antimicrobial Components of Natural Products Using Planar Chromatography Coupled with Direct Bioautography, Spectroscopy and Mass Spectrometry: A Review”, *Curr. Org. Chem.*, t. 21, nr 18, 2017.
- [17] M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, i T. Kowalska, *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. CRC Press, 2008.
- [18] C. T. Seanego i R. N. Ndip, „Identification and Antibacterial Evaluation of Bioactive Compounds from *Garcinia kola* (Heckel) Seeds”, *Molecules*, t. 17, nr 6,

- ss. 6569–6584, 2012.
- [19] Á. M. Mórnicz i P. G. Ott, „Direct Bioautography as a High-Throughput Screening Method for the Detection of Antibacterial Components from Plant Sources”, *J. AOAC Int.*, t. 98, nr 4, ss. 850–856, 2015.
- [20] S. M. Colegate i R. J. Molyneux, *Bioactive natural products – detection, isolation and structural determination*, 2. wyd. CRC Press, 2008.
- [21] P. Kubica, A. Szopa, R. J. Ekiert, i H. Ekiert, „Gatunki rodzaju *Cistus* sp. – taksonomia, występowanie, skład chemiczny, aplikacje terapeutyczne i badania biotechnologiczne”, *Postępy Fitoter.*, t. 17, nr 3, ss. 179–188, 2016.
- [22] P. Riehle, M. Vollmer, i S. Rohn, „Phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal infusions - Antioxidant capacity and thermal stability during the brewing process”, *Food Res. Int.*, t. 53, nr 2, ss. 891–899, 2013.
- [23] E. Barrajon-Catalán i in., *Rockroses (Cistus sp.) oils*. Elsevier Inc., 2015.
- [24] D. Papaefthimiou, A. Papanikolaou, V. Falara, S. Givanoudi, S. Kostas, i A. K. Kanellis, „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.*, t. 2, nr 35, ss. 1–19, 2014.
- [25] J. Harris, „Zdjęcie *C. incanus* L.”, 2019. [Online]. Dostępne na: <http://www.tropicos.org/Image/100473075>.
- [26] H. Coste, *Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse, et des contrées limitrophes*. Paris : Albert Blanchard, 1937.
- [27] A. Falchi, J. Paolini, J.-M. Desjobert, A. Melis, J. Costa, i L. Varesi, „Phylogeography of *Cistus creticus* L. on Corsica and Sardinia inferred by the TRNL-F and RPL32-TRNL sequences of cpDNA”, *Mol. Phylogenet. Evol.*, t. 52, nr 2, ss. 538–543, 2009.
- [28] A. Musielak, A. Arceusz, i M. Wesołowski, „Rośliny z gatunku *Cistus* bogatym źródłem polifenoli wykorzystywanych w lecznictwie”, *Farm. Pol.*, t. 71, nr 9, 2015.
- [29] L. Civeyrel i in., „Molecular systematics, character evolution, and pollen morphology of *Cistus* and *Halimium* (Cistaceae)”, *Plant Syst. Evol.*, t. 295, ss. 23–54, 2011.
- [30] H. Bouamama, T. Noël, J. Villard, A. Benharref, i M. Jana, „Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species”, *J. Ethnopharmacol.*, t. 104, nr 1–2, ss. 104–107, 2006.
- [31] M. Hocking, George, *A Dictionary of Natural Products*, 2. wyd. Plexus Publishing, Inc., 1997.
- [32] S. Fernández-Arroyo, E. Barrajon-Catalán, V. Micol, A. Seguera-Carretero, i A. Fernández-Gutiérrez, „High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a *Cistus ladanifer* aqueous extract”, *Phytochem. Anal.*, t. 21, nr 4, ss. 307–313, 2010.
- [33] C. Robles, A. Bousquet-Mélou, S. Garzino, i G. Bonin, „Comparison of essential oil composition of two varieties of *Cistus ladanifer*”, *Biochem. Syst. Ecol.*, t. 31, nr 3, ss. 339–343, 2003.
- [34] S. Maccioni, R. Baldini, P. L. Cioni, M. Tebano, i G. Flamini, „*In vivo* volatiles emission and essential oils from different organs and pollen of *Cistus albidus* from Caprione (Eastern Liguria, Italy)”, *Flavour Fragr. J.*, t. 22, nr 1, ss. 61–65, 2007.

- [35] M. Skorić *i in.*, „Cytotoxic activity of ethanol extracts of in vitro grown *Cistus creticus* subsp. *creticus* L. on human cancer cell lines”, *Ind. Crops Prod.*, t. 38, nr 1, ss. 153–159, 2012.
- [36] C. Matsingou, K. Dimas, i C. Demetzos, „Design and development of liposomes incorporating a bioactive labdane-type diterpene. In vitro growth inhibiting and cytotoxic activity against human cancer cell lines”, *Biomed. Pharmacother.*, t. 60, nr 4, ss. 191–199, 2006.
- [37] J. Duke, P.-A. Duke, i J. DuCellier, *Duke's Handbook of Medicinal Plants of the Bible*, 1. wyd. Boca Raton: CRC Press, 2007.
- [38] B. Guzmán i P. Vargas, „Systematics, character evolution, and biogeography of *Cistus* L. (Cistaceae) based on ITS, trnL-trnF, and matK sequences”, *Mol. Phylogenet. Evol.*, t. 37, nr 3, ss. 644–660, 2005.
- [39] B. Guzmán i P. Vargas, „Unexpected synchronous differentiation in Mediterranean and Canarian *Cistus* (Cistaceae)”, *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.*, t. 12, nr 3, ss. 163–174, 2010.
- [40] A. Čarni, V. Matevski, i U. Šilc, „Morphological, chorological and ecological plasticity of *Cistus incanus* in the southern balkans”, *Plant Biosyst.*, t. 144, nr 3, ss. 602–617, 2010.
- [41] R. Catoni, L. Gratani, i L. Varone, „Physiological, morphological and anatomical trait variations between winter and summer leaves of *Cistus* species”, *Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants*, t. 207, nr 6, ss. 442–449, 2012.
- [42] C. A. Thanos, K. Georghiou, C. Kadis, i C. Pantazi, „Cistaceae - A Plant Family with Hard Seeds”, *Isr. J. Bot.*, t. 41, nr 4–6, ss. 251–263, 1992.
- [43] P. Madesis, E. Konstantinidou, A. Tsaftaris, i I. Nianiou-Obeidat, „Micropropagation and shoot regeneration of *Cistus creticus* ssp. *creticus*”, *J. Appl. Pharm. Sci.*, t. 1, nr 8, ss. 54–58, 2011.
- [44] I. Pateraki i A. K. Kanellis, „Stress and developmental responses of terpenoid biosynthetic genes in *Cistus creticus* subsp. *creticus*”, *Plant Cell Rep.*, t. 29, nr 6, ss. 629–641, 2010.
- [45] G. Aronne i V. De Micco, „Seasonal dimorphism in the Mediterranean *Cistus incanus* L. subsp. *incanus*”, *Ann. Bot.*, t. 87, nr 6, ss. 789–794, 2001.
- [46] J. Paolini *i in.*, „Morphological, chemical and genetic differentiation of two subspecies of *Cistus creticus* L. (*C. creticus* subsp. *eriocephalus* and *C. creticus* subsp. *corsicus*)”, *Phytochemistry*, t. 70, nr 9, ss. 1146–1160, 2009.
- [47] P. Ellul, M. Boscaiu, O. Vicente, V. Moreno, i J. A. Rosello, „Intra- and Interspecific Variation in DNA Content in *Cistus* (Cistaceae)”, *Ann. Bot.*, t. 90, nr 3, ss. 345–351, 2002.
- [48] N. S. Christodoulakis, M. Georgoudi, i C. Fasseas, „Leaf structure of *Cistus creticus* L. (rock rose), a medicinal plant widely used in folk remedies since ancient times”, *J. Herbs, Spices Med. Plants*, t. 20, nr 2, ss. 103–114, 2014.
- [49] F. Maggi, D. Lucarini, F. Papa, G. Peron, i S. Dall'Acqua, „Phytochemical analysis of the labdanum-poor *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* (Viv.) Greuter et Burdet growing in central Italy”, *Biochem. Syst. Ecol.*, t. 66, ss. 50–57, 2016.
- [50] S. Kohlmünzer, *Farmakognozja*, 5. wyd. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2013.
- [51] A. Kołodziejczyk, *Naturalne związki organiczne*, 3. wyd. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2004.

- [52] M. R. Loizzo, M. Ben Jemia, F. Senatore, M. Bruno, F. Menichini, i R. Tundis, „Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils”, *Food Chem. Toxicol.*, t. 59, ss. 586–594, 2013.
- [53] C. Demetzos *i in.*, „Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*”, *Planta Med.*, t. 63, nr 05, ss. 477–479, 1997.
- [54] U. Wrzeciono i L. Zaprutko, *Chemia związków naturalnych*, 1. wyd. Poznań: Wyd. Naukowe Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 2001.
- [55] C. Demetzos, S. Mitaku, A. Loukis, C. Harvala, i A. Gaily, „A new drimane sesquiterpene, isomers of manoyl oxide and other volatile constituents from the resin “ladano” of *Cistus incanus* subsp. *creticus* (L.) Heywood”, *J. Essent. Oil Res.*, t. 6, nr 1, ss. 37–41, 1994.
- [56] C. Demetzos, S. Mitaku, A. L. Skaltsounis, M. C. Catherine Harvala, i F. Libot, „Diterpene esters of malonic acid from the resin ‘Ladano’ of *Cistus creticus*”, *Phytochemistry*, t. 35, nr 4, ss. 979–981, 1994.
- [57] C. Demetzos, B. Stahl, T. Anastasaki, M. Gazouli, L. S. Tzouvelekis, i M. Rallis, „Chemical analysis and antimicrobial activity of the resin Ladano, of its essential oil and of the isolated compounds”, *Planta Med.*, t. 65, nr 1, ss. 76–78, 1999.
- [58] C. Demetzos, T. Anastasaki, i D. Perdetzoglou, „A chemometric interpopulation study of the essential oils of *Cistus creticus* L. Growing in Crete (Greece)”, *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.*, t. 57, nr 1–2, ss. 89–94, 2002.
- [59] V. Falara, E. Pichersky, i A. K. Kanellis, „A Copal-8-ol Diphosphate Synthase from the Angiosperm *Cistus creticus* subsp. *creticus* Is a Putative Key Enzyme for the Formation of Pharmacologically Active ,Oxygen-Containing Labdane-Type Diterpenes”, *Plant Physiol.*, t. 154, ss. 301–310, 2010.
- [60] P. G. Pietta, „Flavonoids as antioxidants”, *J. Nat. Prod.*, t. 63, nr 7, ss. 1035–1042, 2000.
- [61] W. Grajek, *Przeciwutleniacze w żywności*. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, 2007.
- [62] Amy King i Gloria Younge, „Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals”, *Journal of the American Dietetic Association*, t. 99, nr 2. ss. 213–218, 1999.
- [63] V. Dimcheva i M. Karsheva, „*Cistus incanus* from Strandja Mountain as a Source of Bioactive Antioxidants”, *Plants*, t. 7, nr 1, s. 8, 2018.
- [64] A. Viapiana, A. Konopacka, K. Waleron, i M. Wesolowski, „*Cistus incanus* L. commercial products as a good source of polyphenols in human diet”, *Ind. Crops Prod.*, t. 107, ss. 297–304, 2017.
- [65] A. Parus, „Przeciwutleniające i farmakologiczne właściwości kwasów fenolowych”, *Postępy Fitoter.*, t. 1, ss. 48–53, 2013.
- [66] U. Gawlik-Dziki, „Fenolokwasy jako bioaktywne składniki żywności”, *Żywność. Nauk. Technol. Jakość*, t. 4, nr 41, ss. 29–40, 2004.
- [67] M. Jeszka, E. Flaczyk, J. Kobus-cisowska, i K. Dziedzic, „Związki fenolowe – Charakterystyka i znaczenie w technologii żywności”, *Nauk. Przyr. Technol.*, t. 4, nr 2, ss. 1–8, 2010.
- [68] E. Barrajon-Catalán *i in.*, „A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: Evolutionary relationship”, *Phytochem. Anal.*, t. 22, nr 4, ss. 303–312, 2011.

- [69] A. Gori *i in.*, „Characterisation and antioxidant activity of crude extract and polyphenolic rich fractions from *C. incanus* leaves”, *Int. J. Mol. Sci.*, t. 17, nr 8, ss. 1–13, 2016.
- [70] N. A. Santagati, L. Salerno, G. Attaguile, F. Savoca, i G. Ronsisvalle, „Simultaneous Determination of Catechins, Rutin, and Gallic Acid in *Cistus* Species Extracts by HPLC with Diode Array Detection”, *J. Chromatogr. Sci.*, t. 46, nr 2, ss. 150–156, 2008.
- [71] M. Jeszka-Skowron, A. Zgoła-Grześkowiak, i R. Frankowski, „*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.*, t. 74, ss. 71–81, 2018.
- [72] G. Wittpahl *i in.*, „The Polyphenolic Composition of *Cistus incanus* Herbal Tea and Its Antibacterial and Anti-adherent Activity against *Streptococcus mutans*”, *Planta Med.*, t. 81, nr 18, ss. 1727–1735, 2015.
- [73] D. Muth i P. Kachlicki, „Metody analizy flawonoidów w materiale roślinnym”, *Biotechnologia*, t. 2, nr 2, ss. 65–80, 2009.
- [74] M. Jasiński, E. Mazurkiewicz, P. Rodziewicz, i M. Figlerowicz, „Flawonoidy - budowa, właściwości i funkcja ze szczególnym uwzględnieniem roślin motylkowatych”, *Biotechnologia*, t. 2, nr 85, ss. 81–94, 2009.
- [75] M. Majewska i H. Czeczot, „Flawonoidy w profilaktyce i terapii”, *Farm. Pol.*, t. 65, nr 1, ss. 369–377, 2009.
- [76] B. Klimek, *Analiza fitochemiczna roślinnych substancji leczniczych*, 2. wyd. Łódź: Uniwersytet Medyczny w Łodzi, 2011.
- [77] J. Kreimeyer, F. Petereit, i A. Nahrstedt, „Separations of flavan-3-ols and dimeric proanthocyanidins by capillary electrophoresis”, *Planta Med.*, t. 64, nr 1, ss. 63–67, 1998.
- [78] F. Petereit, H. Kolodziej, i A. Nahrstedt, „Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*”, *Phytochemistry*, t. 30, nr 3, ss. 981–985, 1991.
- [79] F. Petereit, H. Kolodziej, i A. Nahrstedt, „Proanthocyanidins and biogenetically related dihydroflavonols from *Cistus incanus* L.”, *Plant Polyphenols*, ss. 729–737, 1992.
- [80] M. Karbarz, „Źródła Powstawania I Oddziaływanie Środowiskowe Wolnych Rodników”, *Zesz. Nauk. SGSP*, t. 40, nr 1, ss. 59–67, 2010.
- [81] M. Di Ferdinando, C. Brunetti, G. Agati, i M. Tattini, „Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean areas”, *Environ. Exp. Bot.*, t. 103, ss. 107–116, 2014.
- [82] E. Martinez-Ferri, L. Balaguer, F. Valladares, J. M. Chico, i E. Manrique, „Energy dissipation in drought-avoiding and drought-tolerant tree species at midday during the Mediterranean summer”, *Tree Physiol.*, t. 20, nr 2, ss. 131–138, 2000.
- [83] S. G. Alsabri *i in.*, „Study of eight medicinal plants for antioxidant activities”, *J. Chem. Pharm. Res.*, t. 4, nr 8, ss. 4028–4031, 2012.
- [84] I. Chinou, C. Demetzos, C. Harvala, C. Roussakis, i J. Verbist, „Cytotoxic and Antibacterial Labdane-Type Diterpenes from the Aerial Parts of *Cistus incanus* subsp. *creticus*”, *Planta Med.*, t. 60, nr 01, ss. 34–36, 1994.
- [85] C. Demetzos, A. Loukis, V. Spiliotis, N. Zoakis, N. Stratigakis, i H. E. Katerinopoulos, „Composition and antimicrobial activity of the essential oil of

- Cistus creticus* L.”, *J. Essent. Oil Res.*, t. 7, nr 4, ss. 407–410, 1995.
- [86] C. Demetzos, A. Kolocouris, i T. Anastasaki, „A simple and rapid method for the differentiation of C-13 manoyl oxide epimers in biologically important samples using GC-MS analysis supported with NMR spectroscopy and computational chemistry results”, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, t. 12, nr 24, ss. 3605–3609, 2002.
- [87] T. Anastasaki, C. Demetzos, D. Perdetzoglou, M. Gazouli, A. Loukis, i C. Harvala, „Analysis of Labdane-Type Diterpenes from *Cistus creticus* (subsp. *creticus* and subsp. *eriocephalus*), by GC and GC-MS”, *Planta Med.*, t. 65, nr 8, ss. 735–739, 1999.
- [88] E. Kalpoutzakis, I. Chinou, S. Mitaku, A. L. Skaltsounis, i C. Harvala, „Antibacterial Labdane-type Diterpenes from the Resin «Ladano» of *Cistus creticus* subsp. *creticus*”, *Nat. Prod. Lett.*, t. 11, nr 3, ss. 173–179, 1998.
- [89] E. Kalpoutzaki, N. Aligiannis, S. Mitaku, C. Harvala, i A.-L. Skaltsounis, „New Semisynthetic Antimicrobial Labdane-Type Diterpenoids Derived from the Resin “Ladano” of *Cistus creticus*”, *Zeitschrift für Naturforsch. C*, t. 56, nr 1–2, ss. 49–52, 2001.
- [90] A. Güvenç *i in.*, „Antimicrobiological Studies on Turkish *Cistus*. Species”, *Pharm. Biol.*, t. 43, nr 2, ss. 178–183, 2005.
- [91] A. Hutschenreuther, C. Birkemeyer, K. Grötzinger, R. K. Straubinger, i H. W. Rauwald, „Growth inhibiting activity of volatile oil from *Cistus creticus* L. against *Borrelia burgdorferi* s.s. *in vitro*”, *Pharmazie*, t. 65, nr 4, ss. 290–295, 2010.
- [92] C. Hannig, B. Spitzmüller, A. Al-Ahmad, i M. Hannig, „Effects of *Cistus*-tea on bacterial colonization and enzyme activities of the *in situ* pellicle”, *J. Dent.*, t. 36, nr 7, ss. 540–545, 2008.
- [93] C. Hannig, J. Sorg, B. Spitzmüller, M. Hannig, i A. Al-Ahmad, „Polyphenolic beverages reduce initial bacterial adherence to enamel *in situ*”, *J. Dent.*, t. 37, nr 7, ss. 560–566, 2009.
- [94] D. Angelopoulou, C. Demetzos, C. Dimas, D. Perdetzoglou, i A. Loukis, „Essential Oils and Hexane Extracts from Leaves and Fruits of *Cistus monspeliensis*. Cytotoxic Activity of ent-13-epi-Manoyl Oxide and its Isomers.”, *Planta Med.*, t. 67, nr 2, ss. 168–171, 2001.
- [95] C. Matsingou, S. Hatziantoniou, A. Georgopoulos, K. Dimas, A. Terzis, i C. Demetzos, „Labdane-type diterpenes: Thermal effects on phospholipid bilayers, incorporation into liposomes and biological activity”, *Chem. Phys. Lipids*, t. 138, nr 1–2, ss. 1–11, 2005.
- [96] K. Dimas, C. Demetzos, M. Marsellos, R. Sotiriadou, M. Malamas, i D. Kokkinopoulos, „Cytotoxic Activity of Labdane Type Diterpenes Against Human Leukemic Cell Lines *in vitro*”, *Planta Med.*, t. 64, nr 3, ss. 208–211, 1998.
- [97] K. Dimas, C. Demetzos, V. Vaos, P. Ioannidis, i T. Trangas, „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.*, t. 25, nr 6, ss. 449–454, 2001.
- [98] K. Dimas *i in.*, „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.*, t. 60, nr 3, ss. 127–133, 2006.
- [99] K. Dimas *i in.*, „Sclareol induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells *in vitro* and suppression of HCT116 tumor growth in immunodeficient mice”,

- Apoptosis.*, t. 12, nr 4, ss. 685–694, 2007.
- [100] C. Demetzos, S. Mitaku, M. Couladis, C. Harvala, i D. Kokkinopoulos, „Natural Metabolites of ent-13-epi-Manoyl Oxide and Other Cytotoxic Diterpenes from the Resin “LADANO” of *Cistus creticus*”, *Planta Med.*, t. 60, nr 06, ss. 590–591, 1994.
- [101] C. Demetzos, K. Dimas, i S. Hatziantoniou, „Cytotoxic and Anti-Inflammatory Activity of Labdane and cis-Clerodane Type Diterpenes”, *Planta Med.*, t. 67, ss. 1–5, 2001.
- [102] S. Hatziantoniou, K. Dimas, A. Georgopoulos, N. Sotiriadou, i C. Demetzos, „Cytotoxic and antitumor activity of liposome-incorporated sclareol against cancer cell lines and human colon cancer xenografts”, *Pharmacol. Res.*, t. 53, nr 1, ss. 80–87, 2006.
- [103] L. G. Mahaira *i in.*, „The labdane diterpene sclareol (labd-14-ene-8,13-diol) induces apoptosis in human tumor cell lines and suppression of tumor growth in vivo via a p53-independent mechanism of action”, *Eur. J. Pharmacol.*, t. 666, nr 1–3, ss. 173–182, 2011.
- [104] F. Vitali, G. Pennisi, G. Attaguile, F. Savoca, i B. Tita, „Antiproliferative and cytotoxic activity of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. on human prostate cell lines”, *Nat. Prod. Res.*, t. 25, nr 3, ss. 188–202, 2011.
- [105] G. Attaguile, G. Perticone, G. Mania, F. Savoca, G. Pennisi, i S. Salomone, „*Cistus incanus* and *Cistus monspeliensis* inhibit the contractile response in isolated rat smooth muscle”, *J. Ethnopharmacol.*, t. 92, ss. 245–250, 2004.
- [106] G. Attaguile, A. Caruso, G. Pennisi, i F. Savoca, „Gastroprotective effect of aqueous extract of *Cistus incanus* L. in rats”, *Pharmacol. Res.*, t. 31, nr 1, ss. 29–32, 1995.
- [107] U. Lendeckel, M. Arndt, C. Wolke, D. Reinhold, i T. Ka, „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.*, t. 79, ss. 221–227, 2002.
- [108] C. Ehrhardt *i in.*, „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.*, t. 76, ss. 38–47, 2007.
- [109] K. Droebner, C. Ehrhardt, A. Poetter, S. Ludwig, i O. Planz, „CYSTUS052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice”, *Antiviral Res.*, t. 76, ss. 1–10, 2007.
- [110] U. Kalus, A. Grigorov, O. Kadecki, J. Jansen, H. Kiesewetter, i H. Radtke, „*Cistus incanus* (CYSTUS052) for treating patients with infection of the upper respiratory tract A prospective , randomised , placebo-controlled clinical study”, *Antiviral Res.*, t. 84, ss. 267–271, 2009.
- [111] S. Rebensburg, M. Helfer, M. Schneider, i H. Koppensteiner, „Potent *in vitro* antiviral activity of *Cistus incanus* extract against HIV and Filoviruses targets viral envelope proteins”, *Sci. Rep.*, t. 6, nr 20394, ss. 1–15, 2016.
- [112] N. Fokialakis, E. Kalpoutzakis, B. L. Tekwani, A. L. Skaltsounis, i S. O. Duke, „Antileishmanial Activity of Natural Diterpenes from *Cistus* sp. and Semisynthetic Derivatives Thereof”, *Biol. Pharm. Bull.*, t. 29, nr 8, ss. 1775–1778, 2006.
- [113] *Farmakopea Polska X*. Warszawa: Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, 2014.
- [114] D. Szeremeta, M. Knaś, E. Długosz, i M. Sajewicz, „Qualitative evaluation of

- composition of the volatile fraction in commercial samples of *Cistus incanus* L.”, *Acta Chromatogr.*, t. 29, nr 3, ss. 427–442, 2017.
- [115] M. Orłowska, I. Stanimirova, D. Staszek, M. Sajewicz, T. Kowalska, i M. Waksmundzka-Hajnos, „Optimization of Extraction Based on the Thin-Layer Chromatographic Fingerprints of Common Thyme”, *J. AOAC Int.*, t. 97, nr 5, ss. 1274–1281, 2014.
- [116] D. Szeremeta, M. Knaś, E. Długosz, T. Kowalska, i M. Sajewicz, „Thin-layer chromatographic fingerprinting of the nonvolatile fraction extracted from the medicinal herb *Cistus incanus* L.”, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, t. 40, nr 5–6, ss. 304–310, 2017.
- [117] M. Nicoletti, C. Toniolo, A. Venditti, M. Bruno, i M. Ben Jemia, „Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters Antioxidant activity and chemical composition of three Tunisian *Cistus*: *Cistus monspeliensis*, *Cistus villosus* and *Cistus libanotis*”, *Nat. Prod. Res.*, ss. 37–41, 2014.
- [118] H. Wagner i S. Bladt, *Plant Drug Analysis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1996.
- [119] V. Vundać, Ž. Maleš, M. Plazibat, P. Golja, i B. Cetina-Čižmek, „HPTLC determination of flavonoids and phenolic acids in some Croatian *Stachys* taxa”, *J. Planar Chromatogr. – Mod. TLC*, t. 18, nr 104, ss. 269–273, 2005.
- [120] E. de Rijke, P. Out, W. M. A. Niessen, F. Ariese, C. Gooijer, i U. A. T. Brinkman, „Analytical separation and detection methods for flavonoids”, *J. Chromatogr. A*, t. 1112, nr 1–2, ss. 31–63, 2006.
- [121] A. Pieroni, D. Heimler, i Y. Huang, „A TLC method for separation and identification of flavones and flavone glycosides from biflavones in vegetable extract”, *J. planar Chromatogr.*, t. 11, nr 3, ss. 230–232, 1998.
- [122] M. Glensk, U. Sawicka, I. Mażol, i W. Cisowski, „2D TLC — Graft planar chromatography in the analysis of a mixture of phenolic acids”, *J. Planar Chromatogr. – Mod. TLC*, t. 15, nr 6, ss. 463–465, 2002.
- [123] M. Sajewicz, D. Staszek, M. Waksmundzka-Hajnos, i T. Kowalska, „Comparison of TLC and HPLC fingerprints of phenolic acids and flavonoids fractions derived from selected sage (*Salvia*) species”, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, t. 35, nr 10, ss. 1388–1403, 2012.
- [124] Z. Jerzmanowska, *Substancje roślinne: metody wyodrębniania*. Warszawa: Państwowe Wydaw. Naukowe, 1967.
- [125] R. K. Ibrahim i G. H. N. Towers, „The identification, by chromatography, of plant phenolic acids”, *Arch. Biochem. Biophys.*, t. 87, nr 1, ss. 125–128, 1960.
- [126] H. Schmidlein i K. Herrmann, „Quantitative analysis for phenolic acids by thin-layer chromatography”, *J. Chromatogr. A*, t. 115, nr 1, ss. 123–128, 1975.
- [127] S. Krüger, O. Urmann, i G. E. Morlock, „Development of a planar chromatographic method for quantitation of anthocyanes in pomace, feed, juice and wine”, *J. Chromatogr. A*, t. 1289, ss. 105–118, 2013.
- [128] I. Vovk, B. Simonovska, L. Kompan, i M. Prošek, „TLC determination of mannitol and lactulose on amino HPTLC plates”, *J. Planar Chromatogr. – Mod. TLC*, t. 16, nr 5, ss. 374–376, 2003.
- [129] D. Szeremeta *i in.*, „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.*,

- t. 41, nr 6, ss. 349–357, 2018.
- [130] Á. M. Mórica *i in.*, „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*, t. 1534, ss. 170–178, 2018.
- [131] P. Proksch i P.-G. Gülz, „Methylated flavonoids from *cistus ladanifer* and *cistuspalhinhae* and their taxonomic implications”, *Phytochemistry*, t. 23, nr 2, ss. 470–471, 1984.
- [132] T. Vogt, P. Proksch, i P.-G. Gülz, „Epicuticular Flavonoid Aglycones in the Genus *Cistus*, Cistaceae”, *J. Plant Physiol.*, t. 131, nr 1–2, ss. 25–36, 1987.
- [133] L. Barros *i in.*, „Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts”, *Ind. Crops Prod.*, t. 41, ss. 41–45, 2013.
- [134] C. Demetzos, C. Harvala, S. M. Philianos, i A. L. Skaltsounis, „A New Labdane-Type Diterpene and Other Compounds from the Leaves of *Cistus incanus* ssp. *creticus*”, *J. Nat. Prod.*, t. 53, nr 5, ss. 1365–1368, 1990.
- [135] S. Burapan, M. Kim, i J. Han, „Demethylation of Polymethoxyflavones by Human Gut Bacterium, *Blautia* sp. MRG-PMF1”, *J. Agric. Food Chem.*, t. 65, ss. 1620–1629, 2017.
- [136] G. E. Morlock, L. P. Morlock, i C. Lemo, „Streamlined analysis of lactose-free dairy products”, *J. Chromatogr. A*, t. 1324, ss. 215–223, 2014.
- [137] R. Liu *i in.*, „Synthesis and biological evaluation of apigenin derivatives as antibacterial and antiproliferative agents”, *Molecules*, t. 18, nr 9, ss. 11496–11511, 2013.
- [138] Y. Wang, M. Hamburger, J. Gueho, i K. Hostettmann, „Antimicrobial flavonoids from *Psiadia trinervia* and their methylated and acetylated derivatives”, *Phytochemistry*, t. 28, nr 9, ss. 2323–2327, 1989.
- [139] P. Forgo, I. Zupkó, J. Molnár, A. Vasas, G. Dombi, i J. Hohmann, „Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea jacea* L.”, *Fitoterapia*, t. 83, nr 5, ss. 921–925, 2012.
- [140] S. Rubio, J. Quintana, M. López, J. L. Eiroa, J. Triana, i F. Estévez, „Phenylbenzopyrones structure-activity studies identify betuletol derivatives as potential antitumoral agents”, *Eur. J. Pharmacol.*, t. 548, nr 1–3, ss. 9–20, 2006.
- [141] C. R. Liao *i in.*, „Studies on Cytotoxic Constituents from the Leaves of *Elaeagnus oldhamii* Maxim. in Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells”, *Molecules*, t. 19, nr 7, ss. 9515–9534, 2014.
- [142] F. Calzada, M. Meckes, i R. Cedillo-Rivera, „Antiamoebic and anti-giardial activity of plant flavonoids”, *Planta Med.*, t. 65, nr 1, ss. 78–80, 1999.
- [143] H. D. Buchholz i C. D. Wirth, „Use of flavonoid-derivatives for the treatment of atopic eczema”, EP 1 393 733 B1, 2006.
- [144] F. O. Abdullah, F. H. S. Hussain, M. Clericuzio, A. Porta, i G. Vidari, „A New Iridoid Dimer and Other Constituents from the Traditional Kurdish Plant *Pterocephalus nestorianus* Nábělek”, *Chem. Biodivers.*, t. 14, nr 3, 2017.
- [145] H. Liu, J. Orjala, O. Sticher, i T. Rali, „Acylated flavonol glycosides from leaves of *Stenochlaena palustris*”, *J. Nat. Prod.*, t. 62, nr 1, ss. 70–75, 1999.
- [146] A. Karioti, M. Sokovic, A. Ciric, C. Koukoulitsa, A. R. Bilia, i H. Skaltsa, „Antimicrobial properties of *Quercus ilex* L. Proanthocyanidin dimers and simple phenolics: Evaluation of their synergistic activity with conventional antimicrobials

- and prediction of their pharmacokinetic profile”, *J. Agric. Food Chem.*, t. 59, nr 12, ss. 6412–6422, 2011.
- [147] M. C. Boutron-Ruault, P. Senesse, J. Faivre, N. Chatelain, C. Belghiti, i S. Méance, „Foods as risk factors for colorectal cancer: a case-control study in Burgundy (France).”, *Eur. J. Cancer Prev.*, t. 8, nr 3, ss. 229–35, 1999.
- [148] C. Braga *i in.*, „Olive oil, other seasoning fats, and the risk of colorectal carcinoma.”, *Cancer*, t. 82, nr 3, ss. 448–53, 1998.
- [149] Promega Corporation, „CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay System Protocol”.
- [150] J. L. Sebaugh, „Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation”, *Pharm. Stat.*, t. 10, nr 2, ss. 128–134, 2011.
- [151] Z. Han *i in.*, „Role of p21 in Apoptosis and Senescence of Human Colon Cancer Cells Treated with Camptothecin”, *J. Biol. Chem.*, t. 277, nr 19, ss. 17154–17160, 2002.
- [152] J. M. Brown i B. G. Wouters, „Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents.”, *Cancer Res.*, t. 59, nr 7, ss. 1391–9, 1999.
- [153] C. T. Kumarappan, E. Thilagam, i S. C. Mandal, „Antioxidant activity of polyphenolic extracts of *Ichnocarpus frutescens*”, *Saudi J. Biol. Sci.*, t. 19, nr 3, ss. 349–355, 2012.