
Posterbeitrag Themenkreis D: Qualitätsmanagement und Pflanzenanalytik

P 9 Polyphenol-Variabilität von zypriotischem *Cistus creticus* L.

Polyphenol-Variability of Cypriot Cistus creticus L.



Brigitte Lukas, Laura Bragagna, Katharina Starzyk, Klaudia Labedz, Klaus Stolze, Johannes Novak

Veterinärmedizinische Universität Wien, Institut für Tierernährung und Funktionelle Pflanzenstoffe,
Veterinärplatz 1, 1210 Wien

Brigitte.Lukas@vetmeduni.ac.at

DOI 10.5073/jka.2018.460.033

Zusammenfassung

30 Populationen (235 Einzelpflanzen) von zypriotischem *Cistus creticus* L. wurden hinsichtlich ihrer Polyphenol-Variabilität analysiert. Zu den wichtigsten identifizierten Verbindungen zählten Punicalagin und Punicalagingallat sowie verschiedene Glykoside von Myricetin (mit der Hauptverbindung Myricetin-3-O-Rhamnosid) und Quercetin (mit der Hauptverbindung Quercetin-3-O-Rhamnosid). Die Variabilität, sowohl zwischen als auch innerhalb der Populationen war erwartungsgemäß hoch. Die Summe des Gehaltes an Punicalagin und Punicalagingallat variierte zwischen 6,3 und 159,9 mg/g Trockenmasse. Der Gehalt an Myricetin Glykosiden lag zwischen 8,8 und 33,5 mg/g TM, bei den Quercetin Glykosiden lagen die summierten Werte zwischen 1,1 und 12,1 mg/g TM. Bezüglich der Myricetin und Quercetin Glykoside ließ sich ein leichter geografischer Gradient feststellen – mit vergleichsweise geringeren Gehalten in den nord-westlichen Populationen und höheren Werten in den eher östlich gelegenen Populationen des Sammelgebietes.

Stichwörter: *Cistus creticus* L., Polyphenole, Flavonole, Ellagitannine, intraspezifische Variabilität

Abstract

30 populations (235 individual plants) of Cypriot *Cistus creticus* L. were analysed to learn more about intra-specific polyphenol variability. The most important compounds were punicalagin and punicalagin gallate as well as myricetin glycosides (with myricetin-3-O-rhamnosid as main myricetin glycoside) and quercetin glycosides (with quercetin-3-O-rhamnosid as main quercetin glycoside). The variability observed was high between as well as within populations. The content of punicalagin and punicalagin gallate ranged between 6.3 and 159.9 mg/g dry mass. The content of the most important myricetin glycosides ranged between 8.8 and 33.5 mg/g dry mass and that of the quercetin glycosides was between 1.1 and 12.1 mg/g dry mass. Concerning myricetin and quercetin glycosides a geographical gradient was obvious, with slightly lesser contents of these compounds in the north-western populations and slightly higher amounts in more eastern populations of the sampled area.

Keywords: *Cistus creticus* L., polyphenols, flavonols, ellagitannins, intra-specific variability

Einleitung

Cistus creticus L. (syn. *C. incanus*, *C. villosus*) ist ein attraktiver, rosa blühender Strauch der im Mittelmeerraum weit verbreitet ist. Gemeinsam mit anderen *Cistus* Arten ist *C. creticus* ein wichtiger Bestandteil der Volksheilkunde im mediterranen Raum. Aktuelle Studien zeigen positive Effekte von *Cistus* Extrakten bei verschiedenen entzündlichen und infektiösen Erkrankungen. Antibakterielle, antivirale, antifungale, antioxidative und cytotoxische Aktivitäten verschiedener Extrakte wurden dokumentiert (e. g. DIMAS et al., 2006; HUTSCHENREUTHER et al., 2010; REBENBURG et al., 2016). Die verschiedenen Wirkungsweisen werden zum einen den Labdan-Diterpenen, zum anderen den Polyphenolen zugeschrieben. Über die innerartliche Variabilität dieser Inhaltsstoffe ist bisher nur wenig bekannt.

Ziel dieser Studie war die Analyse der intra-spezifischen Polyphenol-Variabilität von zypriotischem *C. creticus*. Blätter von 235 Pflanzen aus 30 Populationen wurden mit Wasser extrahiert und vergleichend via HPLC untersucht.

Material und Methoden

Das analysierte Pflanzenmaterial stammt von 235 Einzelpflanzen von *Cistus creticus* L. (30 Wildpopulationen, Abbildung 1), gesammelt zur Blütezeit im April 2017. Herbarbelege der einzelnen Populationen liegen im institutseigenen Herbar auf. Der kleinere Teil der Populationen (3, 4, 9, 10 und 12; in Richtung nord-westliche Grenze des Sammelgebietes) wurden der Varietät *C. creticus* var. *tauricus* zugeordnet, die anderen Populationen der Varietät *C. creticus* var. *creticus* (MEIKLE, 1977).



Abb. 1 Geographische Verteilung der 30 besammelten Wildpopulationen im griechischen Teil Zyperns. Ausgewählte Populationen sind mit entsprechender Nummer gekennzeichnet.

Fig. 1 Geographic localization of the 30 wild populations sampled. Selected populations are numbered accordingly.

Je etwa 0,15 g luft-getrocknetes, fein gemahlene Pflanzenmaterial wurden in 8 ml Milli-Q Wasser bei 60 °C für 120 min im Schüttelwasserbad extrahiert. Die filtrierten Extrakte wurden bis zur zeitnahen Analyse bei – 20 °C aufbewahrt.

Die filtrierten Extrakte wurden an der HPLC (Shimadzu Nexera XR, ausgestattet mit CBM-20A Steuereinheit, DGU-20A5R Entgaser, LC-20ADXR Pumpe, SIL-20AXR Autosampler, CTO-20AC Säulenofen und SPD-M20A UV-Detektor) vermessen. Die Datenaufnahme und –verarbeitung erfolgte mit dem Softwarepaket LabSolutions 5.82 (Shimadzu). Die Trennung der Komponenten erfolgte über eine XBridge™ Shield RP18 Säule (3,5 µm, 4,6 x 150 mm; Waters) mit vorgeschalteter C18 Vorsäule (ODS Octadecyl, 4 mm x 0,3 mm, Phenomenex), mit einem Gradient aus Acetonitril (LM A) und 2 %iger Essigsäure (LM B), beginnend mit 94 % LM B zu 83 % LM B (Minute 38), 80 % LM B (Minute 53), 0 % LM B (Minuten 53 – 58) und 94 % LM B (Minute 58 bis zum Laufende bei 65 Minuten). Die Flußrate betrug 1 mL/min bei einer Ofentemperatur von 25 °C.

Die Datenaufnahme erfolgte durchgehend bei 354 nm. Nach Durchsicht von ersten ausgewählten Chromatogrammen wurden insgesamt 40 Peaks definiert und in Folge ausgewertet. Die Peak-Identifizierung erfolgte zum Einen mittels Vergleich von Retentionszeiten bzw. UV-Spektren von Referenzsubstanzen (Punicalagin, M-3-O-Rhamnosid, Q-3-O-Rutinosid, Q-3-O-Galaktosid, Q-3-O-Glukosid Q-3-O-Rhamnosid) sowie mittels vergleichender Läufe ausgewählter Proben an der HPLC-MS (Elektrospray, negativer Modus).

Die Quantifizierung der Verbindungen der Punicalagin und Punicalagingallate, Myricetin- und Quercetinglykoside erfolgte mittels Referenzsubstanzen von Punicalagin (die Quantifizierung der Punicalagingallate erfolgte relativ zu Punicalagin), Myricetin-3-O-Rhamnosid (die Quantifizierung von Myricetin-3-O-Galactosid, Myricetin-3-O-Glukosid und Myricetin-O-Xylosid erfolgte dann relativ zu Myricetin-3-O-Rhamnosid) und Quercetin-3-O-Rhamnosid (die Quantifizierung von

Quercetin-3-O-Rutinosid, Quercetin-3-O-Galactosid, Quercetin-3-O-Glucosid und Quercetin-O-xylosid erfolgte dann relativ zu Quercetin-3-O-Rhamnosid).

Statistische Analysen wurden mit IBM SPSS Statistics 24 durchgeführt. Populationen 6, 12 und 24 werden durch Einzelindividuen repräsentiert und scheinen in der grafischen Analyse nicht auf.

Ergebnisse und Diskussion

Zweihundertfünfundreißig *C. creticus* Pflanzen aus 30 zyprischen Wild-Populationen (Abbildung 1) wurden hinsichtlich ihrer Polyphenol-Zusammensetzung untersucht. Zur Auswertung kamen insgesamt 40 Peaks (Abbildung 2.) deren Flächensummen je 94 bis 100 % der gesamten Peakfläche repräsentierten.

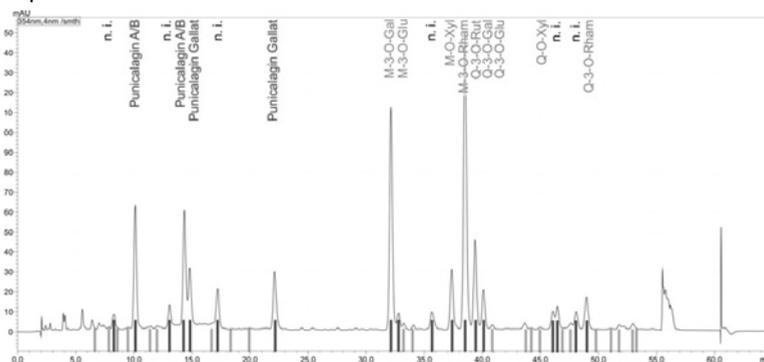


Abb. 2 Beispiel-Chromatogramm eines Individuums aus Population 2. Rote Markierungen verweisen auf die Retentionszeiten der 40 aufgenommenen Peaks (hellrote Markierungen beziehen sich auf Peaks mit geringem Flächen-Anteil, dunkelrote Markierungen beziehen sich auf die Haupt-Peaks).

Fig. 2 Example Chromatogramm of an individual plant sampled in population 2. Red marks refer to retention times of the 40 analyzed peaks (light red marks refer to peaks with small percentages, dark red marks refer to the main peaks).

Zu den bisher identifizierten Hauptverbindungen zählten Ellagitannine (jeweils zwei Punicalagin Isomere und Punicalagingallat Isomere) und verschiedene Flavonole (Myricetin- und Quercetinglykoside). In zyprischem *C. creticus* umfasste die Gruppe der Myricetinglykoside hauptsächlich Myricetin-3-O-Galactosid (ev. ein Myricetin-O-Rhamnosid-O-Hexosid überlagernd), Myricetin-3-O-Glucosid, Myricetin-O-Xylosid und Myricetin-3-O-Rhamnosid. Die wichtigsten Quercetinglykoside waren Quercetin-3-O-Rutinosid, Quercetin-3-O-Galactosid, Quercetin-3-O-Glucosid, Quercetin-O-xylosid und Quercetin-3-O-Rhamnosid (Abbildung 2). Einzelnen der noch nicht identifizierten Peaks bei längerer Retentionszeit könnten weitere Myricetin- und Quercetinglykoside sowie eventuell auch Kaempferglykoside zugrunde liegen (Absicherung der Identifizierung in Arbeit). Punicalagin (aber nicht Punicalagingallat) sowie diverse Myricetin- und Quercetinglykoside wurden auch von MAGGI et al. (2016) in italienischem *C. creticus* subsp. *eriocephalus* identifiziert. In einer Analyse von spanischem *C. incanus* fehlten die Ellagitannine Punicalagin und Punicalagingallat in einer ansonsten an Flavonolen (v. a. Myricetin- und Quercetinderivaten) reichen Probe (BARRAJÓN-CATALÁN, 2010). Die in zyprischem *C. creticus* identifizierten Myricetin- und Quercetinglykoside decken sich weitgehend mit jenen Flavonolderivaten die bei der Analyse diverser kommerzieller *C. incanus* Tees detektiert wurden (RIEHLE, 2014).

Abbildung 3 gibt einen Überblick über die Variabilität der drei hervorgehobenen Substanzgruppen innerhalb und zwischen den zyprischen *C. creticus* Populationen. Die Summe des Gehaltes an Punicalagin und Punicalagingallat variierte zwischen 6,3 und 159,9 mg/g

Trockenmasse. Die größte Variationsbreite ergab sich in Population 11 mit Werten zwischen 21,2 und 159,9 mg/g TM. Population 11 war auch jene mit dem höchsten aufgenommenen Gehalt an Punicalagin und Punicalagingallat. Der Gehalt an Myricetinglykosiden variierte zwischen 8,8 und 33,5 mg/g TM. Die größte Variationsbreite wurde in Population 30 mit Werten zwischen 14,2 und 33,5 mg/g TM detektiert, Population 30 war somit auch jene Population mit dem höchsten aufgenommenen Gehalt. Zu den bedeutendsten Myricetinglykosiden zählten durchgehend Myricetin-3-O-Galactosid und Myricetin-3-O-Rhamnosid (Abbildung 2). Bei den Quercetinglykosiden lagen die Werte zwischen 1,1 und 12,1 mg/g TM. Die höchste Variationsbreite ergab sich in Population 9 mit einem Gehalt an Quercetinglykosiden zwischen 1,2 und 9,7 mg/g TM, der höchste Wert wurde wieder in Population 30 gemessen. Die bedeutendsten Quercetinglykoside waren durchgehend Quercetin-3-O-Rutinosid und Quercetin-3-O-Rhamnosid.

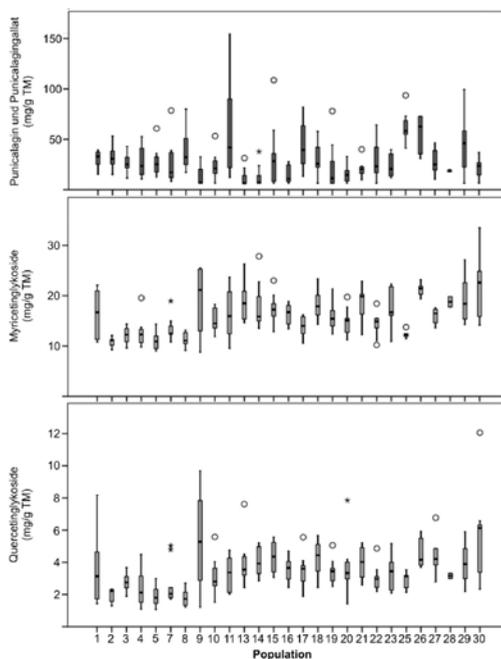


Abb. 3 Variabilität der Ellagitannine Punicalagin und Punicalagingallat sowie der wichtigsten Myricetinglykoside (Summe von M-3-O-Gal, M-3-O-glu, M-O-Xyl, M-3-O-Rham) und Quercetinglykoside (Summe von Q-3-O-Rut, Q-3-O-Gal, Q-3-O-Glu, Q-O-Xyl, Q-3-O-Rham) in den besammelten zypriotischen Populationen. Die nur durch ein Individuum repräsentierten Populationen 6, 12 und 24 scheinen in der Grafik nicht auf.

Fig. 3 Boxplots representing contents of punicalagin and punicalagin gallate as well as the most important myricetin glycosides (sum of M-3-O-gal, M-3-O-glu, M-O-xyl, M-3-O-rham) and quercetin glycosides (sum of Q-3-O-rut, Q-3-O-gal, Q-3-O-glu, Q-O-xyl, Q-3-O-rham) in the Cypriot populations sampled. Populations 6, 12 and 24 were excluded as they were represented by one individual plant only.

Bei den Myricetin- und Quercetinglykosiden lies sich ein klares geografisches Muster erkennen. Die vergleichsweise Flavonol-armen Populationen 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 stammten vom nord-westlichen Rand des besammelten Gebietes (Abbildung 1), in Richtung östliche Grenze des Sammelgebietes lies sich eine leichte Tendenz zu höheren Flavonol-Gehalten erkennen. Im Falle von Punicalagin und Punicalagingallat lies sich keine geografische Strukturierung erkennen. Ein Zusammenhang mit der Klassifizierung der taxonomischen Varietät war nicht festzustellen.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich herzlich für die Mithilfe von Dr. Corinna Schmiderer bei der Aufsammlung des Probenmaterials sowie für die Mithilfe von Ing. Martin Finsterböck bei der Extrakt-Analyse an der HPLC.

Literatur

- BARRAJÓN-CATALÁN, E., FERNÁNDEZ-ARROYO, S., ROLDÁN, C., GUILLÉN, E., SAURA, D., SUEGURA-CARRETERO, A. UND V. MICOL, 2011: A Systematic Study of the Polyphenolic Composition of Aqueous Extracts Deriving from Several *Cistus* Genus Species: Evolutionary Relationship. – *Phytochemical Analysis* **22**: 303–312.
- DIMAS, K., PAPADAKI, M., TSIMPLOULI, C., HATZIANTONIOU, S., ALEVIZOPOULOS, K., PANTAZIS, P. UND C. DEMETZOS, 2006: 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. – *Biomedicine & Pharmacotherapy* **60**: 127–133.
- HUTSCHENREUTHER, A., BIRKEMEYER, C., GRÖTZINGER, K., STRAUBINGER, R.K., UND H.W. RAUWALD, 2010: Growth inhibiting activity of volatile oil from *Cistus creticus* L. against *Borrelia burgdorferi* s.s. in vitro. – *Pharmazie* **65**: 290–295.
- MAGGI, F., LUCARINI, D., PAPA, F., PERON, G. UND S. DALL'ACQUA, 2016: Phytochemical analysis of the labdanum-poor *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* (Viv.) Greuter et Burdet growing in central Italy. – *Biochemical Systematics and Ecology* **66**: 50–57.
- MEIKLE, R. D., 1977: Flora of Cyprus, Volume 1. S 183–187. The Bentham-Moxon Trust, Royal Botanic Gardens, Kew.
- REBENBURG, S., HELFER, M., SCHNEIDER, M., KOPPENSTEINER, H., EBERLE, J., SCHINDLER, M., GÜRTLER, L., UND R. BRACK-WERNER, 2016: Potent in vitro antiviral activity of *Cistus incanus* extract against HIV and Filoviruses targets viral envelope proteins. – *Scientific Reports* **6**: 20394.
- RIEHLE, P., 2014: Phenolische Inhaltsstoffe in *C. incanus* Tee – Charakterisierung und Stabilität innerhalb der Teezubereitung. Dissertation Universität Hamburg