

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

GYÓGYNÖVÉNYEK ÉS NÖVÉNYI HATÓANYAGOK
BIZTONSÁGOSSÁGA ÉS HATÁSOSSÁGA
FITOKÉMLAI ÉS FARMAKOLÓGIAI
VIZSGÁLATOK TÜKRÉBEN

Csupor Dezső

Készült a Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Karának
Farmakognóziai Intézetében

Szeged

2020

dc_1800_20

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	1
2. Kutatási célok.....	5
3. Irodalmi áttekintés.....	6
3.1. Farmakológiai ígéretes növények és szekunder metabolitjaik	6
3.1.1. Terápiás és toxikológiai jelentőségű alkaloidok	6
3.1.2. Alkilamid-tartalmú növények	10
3.1.3. Mohák, mint bioaktív vegyületek feltáratlan forrásai	12
3.1.4. <i>Cyclopia genistoides</i> : egy kémiai kevéssé jellemzett dél-afrikai növény	14
3.1.5. A <i>Rhodiola rosea</i> és tartalomanyagai	16
3.1.6. Teaminták központi idegrendszeri hatásért felelős összetevői.....	17
3.1.7. A szója és fitoösztrogénjei	19
3.1.8. Római kamilla, egy hagyományos növényi görcsoldó	20
3.1.9. Imola fajok: népi gyógyászati háttérű, kevéssé vizsgált növények.....	20
3.2. Toxikológiai szempontból potenciálisan kockázatos növényi termékek és tartalomanyagaik ..	22
3.2.1. Élelmiszer- és gyógynövények furokumarintartalma	23
3.2.2. A máriatövis, mint rézkoncentrázó gyógynövény	25
3.2.3. Pirrolizidin-alkaloidok, mint potenciális májkárosító vegyületek.....	26
3.2.4. A <i>Hoodia gordonii</i> – fogyasztó hatással társuló kockázatok	27
3.2.5. A parlagfű, mint ismeretlen kockázatforrás	28
3.2.6. Növényi alapú termékek minőségvizsgálata	29
3.3. Növényi készítmények klinikai hatásosságának elemzése	33
4. Anyagok és módszerek	35
4.1. Preparatív fitokémiai vizsgálatok.....	35
4.1.1. <i>Aconitum</i> sp.	35
4.1.2. <i>Heliopsis helianthoides</i> var. <i>scabra</i>	36
4.1.3. <i>Lepidium meyenii</i>	36
4.1.4. <i>Paraleucobryum longifolium</i>	36
4.1.5. <i>Ducrosia anethifolia</i>	37
4.2. Kvalitatív és kvantitatív fitoanalitikai vizsgálatok	38
4.2.1. <i>Aconitum</i> drogok lipolkaloid-tartalmának vizsgálata	38
4.2.2. <i>Aconitum</i> drogok diterpénalkaloid-tartalmának kvalitatív vizsgálata	38
4.2.3. <i>Rhodiola rosea</i> markervegyületeinek vizsgálata	38
4.2.4. Teaminták analitikai vizsgálata	39
4.2.5. Szójakivonatok izoflavontartalmának vizsgálata	39
4.2.6. Édesköményminták furokumarintartalmának vizsgálata	39
4.2.7. Réztartalom mérése máriatövistartalmú termékekben	40
4.2.8. <i>Vitex agnus-castus</i> kivonatot tartalmazó termékek analitikai vizsgálata.....	40
4.2.9. Szintetikus vegyületek kimutatása növényi eredetű készítményekből	40
4.2.10. Római kamilla flavonoidtartalmának vizsgálata	41
4.2.11. Pirrolizidin-alkaloidok penetrációjának vizsgálata	41
4.3. Farmakológia és toxikológiai vizsgálatok.....	42
4.3.1. Antibakteriális hatás vizsgálata	42
4.3.2. In vitro antiproliferatív hatás vizsgálata	42
4.3.3. Antimetasztatikus hatás vizsgálata.....	42
4.3.4. Endogén kannabinoidrendszerre kifejtett hatás vizsgálata	43
4.3.5. Elektrofiziológiai vizsgálatok.....	43
4.3.6. Ösztrogénszerű hatás vizsgálata.....	44
4.3.7. In vitro adrenerg hatás vizsgálata.....	44

4.3.8. <i>In vitro</i> gyulladáscsökkentő hatás vizsgálata	44
4.3.9. <i>In vivo</i> gyulladáscsökkentő hatás vizsgálata	45
4.3.10. Simaizmokra kifejtett hatás vizsgálata	45
4.3.11. Toxikológiai vizsgálatok rotifer modellen	45
4.3.12. Sebgyógyulásra kifejtett hatás vizsgálata	46
4.4. Metaanalízisek	46
5. Eredmények.....	48
5.1. Preparatív fitokémiai vizsgálatok	48
5.1.1. Diterpén-alkaloidok izolálása <i>Aconitum</i> fajokból.....	48
5.1.2. Alkilamidok izolálása <i>Heliopsis helianthoides</i> ből és <i>Lepidium meyenii</i> ből	50
5.1.3. Fenantrén izolálása <i>Paraleucobryum longifolium</i> ből.....	53
5.1.4. Polifenolos vegyületek hatáskövetett izolálása <i>Cyclopia genistoides</i> ből.....	54
5.1.5. Furokumarinok izolálása <i>Ducrosia anethifoliaból</i>	56
5.2. Kvalitatív és kvantitatív fitoanalitikai vizsgálatok.....	58
5.2.1. Lipoalkaloidok kimutatása és szintézise.....	58
5.2.2. Sisakvirágdrogok alkaloidtartalmának vizsgálata	60
5.2.3. <i>Rhodiola</i> minták fenilpropenoid- és flavonoidtartalmának változékonysága	61
5.2.4. Teaminták teanin- és koffeintartalmának vizsgálata	69
5.2.5. Szójaminták izoflavontartalmának vizsgálatára alkalmas módszer optimalizálása	71
5.2.6. Édesköményminták furokumarintartalmának vizsgálata	74
5.2.7. Máriatöviskészítmények réztartalmának vizsgálata	75
5.2.8. Szintetikus vegyületek kimutatása növényi eredetű termékekben.....	76
5.2.9. Homeopátiás gyógyszerkészítmény aktívanyag-tartalmának mérése.....	79
5.3. <i>In vitro</i> farmakológiai és toxikológiai és biofarmáciai vizsgálatok	81
5.3.1. Pirrolizidin-alkaloidok felszívódásával kapcsolatos vizsgálatok	81
5.3.2. Mohaminták és vegyületeik antiproliferatív és antimikrobás hatásának szűrővizsgálata.....	82
5.3.3. Lignánok hatása a daganatos áttétképződésre.....	86
5.3.4. Lipoalkaloidok <i>in vitro</i> gyulladáscsökkentő hatása	88
5.3.5. Diterpén-alkaloidok és lipolalkaloidok ioncsatornákra kifejtett hatása	89
5.3.6. Benzil-izokinolin alkaloidok szív-érrendszeri hatásainak vizsgálata.....	93
5.3.7. <i>Cyclopia genistoides</i> polifenolok ösztrogénszerű és XO-gátló hatásának vizsgálata	94
5.3.8. <i>Hoodia gordonii</i> készítmény szimpatomimetikus hatásának vizsgálata	96
5.3.9. <i>N</i> -alkil-amidok hatása az endogén kannabinoidrendszerre.....	97
5.3.10. Római kamilla görcsoldó hatásának vizsgálata	98
5.4. <i>In vivo</i> farmakológiai és toxikológiai vizsgálatok.....	101
5.4.1. Diterpén-alkaloidok aktivitásvizsgálata bdelloid rotifer modellen	101
5.4.2. <i>Centaurea</i> fajok sebgyógyító és gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata.....	102
5.4.3. Parlagfű szubakut toxicitási vizsgálata	104
5.5. Növényi készítmények humán hatásosságának értékelése metaanalízisekkel	107
5.5.1. A barátcserje hatásossága premenstruációs szindrómában.....	107
5.5.2. A galagonya és a kámfor kombinációjának hatása a vérnyomásra	107
5.5.3. A sáfrány hatásossága enyhe és mérsékelt depresszióban	108
6. Megbeszélés.....	110
6.1. Gyulladáscsökkentő és ioncsatornákra ható alkaloidok	110
6.2. Kannabinoidrendszerre ható <i>N</i> -alkil-amidok és antimetasztatikus lignánok.....	113
6.3. Antiproliferatív és antimikrobás hatású mohafajok és rendhagyó szerkezetű pigmentjeik.....	115
6.4. Fitoösztrogének a <i>Cyclopia genistoides</i> ből	117
6.5. Daganatellenes hatású furokumarinok a <i>Ducrosia amethifoliaból</i>	118
6.6. <i>Rhodiola</i> drogok minőségbiztosításával kapcsolatos eredmények.....	119
6.7. Teaminták teanin- és koffeintartalmának szisztematikus vizsgálata	121
6.8. Szójakivonatok izoflavontartalmának vizsgálatára alkalmas módszer kidolgozása	122
6.9. Az édeskömény furokumarintartalmának biztonságossága	122
6.10. Máriatövistermékek réztartalma	123
6.11. Étrend-kiegészítők szennyezésvizsgálatának tapasztalatai.....	123

6.12. Homeopátiás készítmények hatóanyag-tartalmának vizsgálata	125
6.13. Pirrolizidin-alkaloidok felszívódása külsőleges alkalmazásnál	126
6.14. A <i>Hoodia gordonii</i> adrenerg hatása	127
6.15. A római kamilla hatása a simaizmokra	128
6.16. <i>Centaurea</i> fajok kivonatainak gyulladáscsökkentő és sebgyógyulást elősegítő hatása	130
6.17. A parlagfű potenciális vese- és májkárosító hatása.....	131
6.18. Növényi kivonatok hatásosságának elemzése metaanalízisekben.....	132
7. Az értekezés főbb megállapításai	134
8. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	137
9. Az értekezés témájához tartozó egyéb közlemények.....	140
10. Irodalomjegyzék.....	141

Rövidítésjegyzék

5-LOX	5-lipoxigenáz
5-HT	szerootonin (5-hidroxi-triptamin)
A2058	humán melanoma sejtvonala
A2780	humán petefészekdaganat sejtvonala
APD ₉₀	az akciós potenciál repolarizációjának 90%-os értékéhez tartozó időtartam
AEA	arachidonsav-etanolamid (anandamid)
ALP	alkalikus foszfatáz
ALT	alanin-aminotranszferáz
APCI	légköri nyomású kémiai ionizáció (atmospheric pressure chemical ionization)
AST	aszpartát-aminotranszferáz
BBB	vér–agy gát (blood–brain barrier)
BDI	Beck-féle Depresszió Skála (Beck Depression Inventory; IA: első revízió; II: második kiadás)
CB	kannabinoid
CC	légköri nyomású folyadékkromatográfia (column chromatography)
CHO-K1	kínai hörcsög petefészek sejtvonala
CI	konfidenciaintervallum (confidence interval)
CONSORT	klinikai vizsgálatokról történő beszámolás összesített standardja (Consolidated Standards of Reporting Trials)
COSY	korrelációs spektroszkópia (correlation spectroscopy)
COX	ciklooxygenáz
CPC	centrifugális megoszlásos kromatográfia (centrifugal partition chromatography)
D ₂	dopaminreceptor 2-es altípusa
DMSO	dimetil-szulfoxid
E ₂	ösztadiol
ECD	elektronikus cirkuláris dikroizmus
EIA	enzim immunoassay
ELISA	enzimkapcsolt immunoszorbens vizsgálat (enzyme linked immunosorbent assay)
ER	ösztrogénreceptor (estrogen receptor)
ESI	elektrospray ionizáció
FA	fahéjalkoholtartalom
FAAH	zsírsavamid-hidroláz (fatty acid amide hydrolase)
FP _{tot}	összfenilpropenoid-tartalom
GABA	gamma-aminovajsav (gamma amino butyric acid)
GFC	géliszűrési kromatográfia (gel filtration chromatography)
GGT	gamma-glutamiltanszferáz
GIRK	G-fehérjéhez kapcsolt befelé egyenirányító K ⁺ -csatorna (G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel)
GUS	β-glükuronidáz
HAM-D	Hamilton-féle Depresszió Skála (Hamilton Depression Rating Scale)
hCMEC/D3	immortalizált humán agyi mikroér endotélsejt D3 klonális populáció
HDL	nagy sűrűségű lipoprotein (high density lipoprotein)
hERG	feszültségfüggő humán káliumcsatornát kódoló gén (human ether-a-go-go-related gene)
HEK293	humán embrionális vesesejt sejtvonala
HeLa	humán immortalizált méhnyakrák-sejtvonala
HMBC	többszörös heteronukleáris korreláció (heteronuclear multiple-bond correlation)
HPLC-DAD	diódasoros detektorral csatolt nagyteljesítményű folyadékkromatográfia
HPLC-MS	tömegdetektorral csatolt nagyteljesítményű folyadékkromatográfia

HRMS	nagy felbontású tömegspektrometria (high resolution mass spectrometry)
HUVEC	humán köldökvéna-endotél sejtvonal (human umbilical vein endothelial cells)
i.v.	intravénás
ICAM	intercelluláris adhézíós molekula (intercellular adhesion molecule)
ICP-MS	induktív csatolású plazma tömegspektrometria (inductively coupled plasma mass spectrometry)
IR	infravörös (infra red)
JMOD	J-modulált spektrum
LC	folyadékkromatográfia (liquid chromatography)
LDL	alacsony sűrűségű lipoprotein (low density lipoprotein)
LOD	kimutatási határ (limit of detection)
LOQ	mérési határ (limit of quantification)
LTB ₄	leukotrién B ₄
MAC	minimálisan hatékony koncentráció (minimally active concentration)
MAGL	monoacilglicerol-lipáz
MCH	vörösvértestek átlagos hemoglobintartalma (mean corpuscular hemoglobin)
MCHC	vörösvértestek átlagos hemoglobinkoncentrációja (mean corpuscular hemoglobin concentration)
MCV	átlagos vörösvérsejt-térfogat (mean cellular volume)
MDA-MB-231	humán invazív duktális emlőkarcinóma sejtvonal
MPLC	közepes nyomású folyadékkromatográfia (medium pressure liquid chromatography)
MPV	vérlemezkek átlagos térfogata (mean platelet volume)
MRM	többszörös reakciómonitorozás (multiple reaction monitoring)
MS ⁿ	tandem tömegspektrometria
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid
Na _v	feszültségfüggő Na ⁺ -csatorna
NK-1	neurokinin-1
NF-κB	κB nukleáris faktor
NMR	mágneses magrezonancia spektroszkópia (nuclear magnetic resonance spectroscopy)
NOESY	mag-Overhauser-spektroszkópia (nuclear Overhauser effect spectroscopy)
p.o.	per os
PDA	fotódiodasoros (photo diode array)
PGE ₂	prosztaglandin E ₂
PICO	beteg, beavatkozás, komparátor, végpont (patient, intervention, comparator, outcome)
PLC	preparatív rétegekromatográfia (preparative layer chromatography)
PMS	premenstruációs szindróma
PONV	posztoperatív hányinger és hányás (postoperative nausea and vomiting)
PRISMA	módszertani ajánlás a szisztematikus áttekintések és metaanalízisek készítéséhez (Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses)
RBEC	patkány agyi endotélsejt (rat brain endothelial cell)
RDW-CW	vörösvértestek eloszlási szélessége (red blood cell distribution width)
ROZ _{tot}	összrozavintartalom
RPC	rotációs planárokromatográfia
RSD	relatív standard deviáció
RR	relatív kockázat (relative risk)
SiHa	humán méhnyakrák sejtvonal
sTDA	simplified Tamm-Dancoff approach
SEM	az átlag standard hibája (standard error of mean)
SOR	specifikus optikai rotáció
SRM	kiválasztott reakciómonitorozás (single reaction monitoring)

SZAL _{tot}	összszalidrozyd-tartalom
T47D	humán mell-daganat sejtvonala
TDDFT-SOR	time-dependent density functional theory
TEER	transzendenteliális elektromos ellenállás (transendothelial electrical resistance)
TNF- α	tumor nekrosis faktor α
U937	hisztocitás limfóma sejtvonala
VCAM	vaszkuláris adhéziós molekula (vascular cell adhesion molecule)
VEGF	vaszkuláris endotelialis növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)
VLC	vákuum-folyadékromatográfia
X-Gluc	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-glükuronsav
XO	xantin-oxidáz

dc_1800_20

1. Bevezetés

A természetes anyagok, köztük a növényi drogok, kivonatok és hatóanyagok a történelem kezdete óta részei változó formában a gyógyászatnak. A gyógynövényhasználat első dokumentált írásos bizonyítéka az a mintegy 5000 éves sumér kőtábla, amelyen 12 gyógynövényes recept található, olyan, ma is ismert gyógynövények alkalmazását részletezve, mint a mák vagy a bolondító beléndek.¹ A paleofarmakológiai kutatások még ennél is korábbi, 7–8000 évre visszamenő gyógynövényhasználatot igazoltak humán koprolitokból Dél-Amerikában.² Az ókor későbbi időszakaiból bőséges írásos bizonyíték áll rendelkezésre Kínából, Indiából, Egyiptomból (Kr. e. 2500–1500), majd a korszak máig ismert gyógyítóinak köszönhetően Európából is. *Hippokratész* és *Teofrasztosz* a Kr. e. 5–4. században több száz gyógynövény használatának módját és célját írták le. Ezek közül számos ma is a gyógynövénykincs része. Az ókorban és a középkorban a növényeket friss vagy szárított drogként vagy azok kivonataiként alkalmazták. Az alkalmazás célját és módját, korlátait a generációról generációra öröklődő tapasztalat alapozta meg.

A gyógynövényhasználat módja lényegileg évszázadokon át változatlan volt, az első jelentős nagy változást a szerves kémia elméleti hátterének és módszereinek kialakulása hozta a 18–19. században. Az első tiszta formában kinyert növényi hatóanyag a morfin volt (1805, *Friedrich Sertürner*), majd rövid időn belül egyre több növény másodlagos anyagcseretermékeit nyerték ki és azonosították.³ Az első félszintetikus származékok (pl. az 1874-ben *Charles Romley Alder Wright* által előállított heroin)⁴ között olyan vegyület is található, amely máig alapvető része a gyógyszerkincsnek. Ilyen vegyület az acetyl-szalicilsav, amelyet az eredetileg növényi forrásból származó szalicilsav félszintetikus átalakításával nyert *Felix Hoffmann* 1897-ben.⁵

A 20. század a szintetikus gyógyszergyártás módszereinek és ipari feltételeinek kialakulása révén gyökeres változást hozott a gyógynövények alkalmazásában. A korábban hagyományos drog- és gyógynövénykivonat alapú termékek jelentősége visszaszorult, a gyógyszerkincsben egyre nagyobb arányban jelentek meg a szintetikus vegyületek. Bár a genuin növényi hatóanyagok jelentősége is csökkent, helyesebb inkább hangsúlyváltozásról beszélni: az új gyógyszervegyületek között a növényi szekunder metabolitok aránya kicsi, jelentős részt tesznek ki azok a farmakonok, amelyek valamilyen módon összefüggésbe hozhatóak ilyen anyagokkal. Az 1981–2014 között engedélyezett 1562 új gyógyszer 1%-a növényi kivonatot tartalmaz, 4%-ának hatóanyaga genuin természetes vegyület, 21%-a természetes eredetű vegyület származéka, 14%-a természetes eredetű farmakofórt tartalmazó szintetikus vegyület.⁶ A természetes anyagok gyógyszerkutatásban máig tartó jelentősége azzal magyarázható, hogy ezen vegyületek között nagyon magas a bioaktív anyagok aránya. Ez elsősorban a növényvilág és az élő környezet koevolúciójával

magyarázható, ugyanis ennek során olyan szekunder metabolitok termelése számított evolúciós előnynek, amelyek révén a növény képes hatni a környezetére, kártevőire és kórokozóira. Ezen hatások egy része gyógyászati szempontból nem hasznosítható (az ilyen aktivitású növényeket tekintjük mérgezőnek), más hatások, megfelelő dózírozás és alkalmazás esetén gyógyhatásként hasznosulnak.

A gyógynövényekből kiinduló gyógyszerfejlesztés előnye, hogy a klinikai hatás általában ismert – ebből kiindulva halad a kutatás a hatóanyagok és hatásmechanizmusok feltárásáig. Számos sikeres példa támasztja alá ennek a megközelítésnek a létjogosultságát, az antidepresszáns hatású közönséges orbáncfűtől a májvédő máriatövisig. Előbbi a modern készítményekben is kivonatként van jelen, utóbbinak hatóanyagait, a flavonolignánokat dúsítva alkalmazzák. A hatás módja mindkét esetben részleteiben feltárt. Számos sikeres növényi hatóanyag esetén azonban ettől eltérő út vezetett a sikerig: a nagy áteresztőképességű farmakológiai vizsgálatok kifejlesztése tette lehetővé, hogy sok ezer extraktum szűrővizsgálata során kiemelkedő aktivitású kivonatokat azonosítsanak olyan növényekből is, amelyek gyógyászati alkalmazása korábban nem volt jellemző. Így vált gyógyszerré a *Taxus baccata* hatóanyaga, a paklitaxel és a *Galanthus nivalis* vegyülete, a galantamin.

A 20. század utolsó évtizedeiben megtörni látszott a gyógyszerkutatás új hatóanyagok számában mért lendülete, s ennek részeként az új növényi eredetű hatóanyagok száma is csökkent. Az okok többre tehetőek: bár bizonyos földrészek gyógynövénykincse tudományosan kevésbé vizsgált, Európában és egyéb fejlett országokban a népi gyógyászat, mint ötletforrás kimerülőben van; a növényi nyersanyagból kiinduló preparatív fitokémiai-farmakológiai megközelítés nagyon időigényes és alacsony termelékenységgű. Bár az utóbbi problémát részben orvosolta a nagy teljesítőképességű szűrővizsgálatok terjedése, gyakori jelenség, hogy az aktívnak talált kivonat frakcionálása, anyagainak dúsítása nem magasabb bioaktivitású frakciók, vegyületek előállításához, hanem az aktivitás elvesztéséhez vezet. Ez még olyan esetben is előfordul, amikor a frakcionálás, izolálás bioaktivitás-követett vagy -vezérelt módon zajlik. Ennek – legalábbis részben – az az oka, hogy a megfigyelt hatás sokszor több anyag szinergizmusának eredője, a vegyületek szeparációja az aktivitás csökkenését eredményezi.

Ezt felismerve újabb irányzatok nyertek teret a kutatásban: a tiszta hatóanyagok alkalmazására irányuló törekvés mellett új lendületet kapott a növényi kivonatok alkalmazása a több támadáspont elérése érdekében (ún. multi-target therapy),⁷ és több esetben igazolást nyert, hogy az összetett anyagkeverékek alkalmazása esetenként előnyösebb lehet a tiszta hatóanyagok használatánál. Az orbáncfű esetén bebizonyították, hogy a kivonat polifenolos vegyületei javítják a hipericin biohasznosulását,⁸ a páfrányfenyő esetén a ginkgolidok, a macskagyökér esetén pedig kémiaiailag különböző tartalomanyagok között figyeltek meg szinergizmust.⁹ Ezt a jelenséget használja

ki az ún. reverz farmakognózia, amely a tiszta vegyületek ismert bioaktivitásai és *in silico* modellezés irányából közelít a komplex vegyületkeverékek hasznosítása irányába.¹⁰ Mindemellett a növényekben kis koncentrációban megtalálható hatóanyagok ipari hasznosítása is új lehetőséget kapott azáltal, hogy biotechnológiai módszerekkel számos vegyület gazdaságosabb előállítására nyílik lehetőség (pl. digitaloidok,¹¹ paklitaxel¹²).

A természetes anyagokon nyugvó gyógyszerkutatás-fejlesztés csak egyik nagy kihívása a megfelelő gyógyszeralapanyag (hatóanyag) felfedezése, fejlesztése és ipari termeléshez szükséges mennyiségének biztosítása. Az ezzel kapcsolatos kutatások sikeressége, sebessége mellett az új gyógyszerek piacra kerülését alapvetően befolyásolja a gyógyszerengedélyezéssel kapcsolatos jogi környezet változása is. Napjainkban a biztonságosság priorizálása egyre hangsúlyosabb, ezért számos, egyébként hatásos molekula nem kerülhet gyógyszerként forgalomba. A mai gyógyszerengedélyezési szabályok mellett egy sor, évtizedek óta forgalomban lévő gyógyszermolekulát (pl. egyes benzodiazepineket nemkívánatos hatásai miatt) feltehetőleg nem engedélyeznék új gyógyszerként az Európai Unióban. A már forgalomban lévő gyógyszerek esetén is egyre szigorúbbak a szabályok, és ez tükröződik a farmakovigilancia térnyerésében. A nemkívánatos hatások dokumentálása, gyűjtése, hatósági értékelése döntő szerepet játszik a gyógyszerek alkalmazhatóságának, alkalmazási körének alakulásában. Mindez a gyógynövények esetén is érvényes: több növény, köztük az anxiolitikus gyógyszerként alkalmazott *Piper methysticum*¹³ a nemkívánatos hatások (ez esetben hepatotoxicitása) felderítése miatt tűnt el a gyógyszerkincsből, de arra is van példa hogy egy feltételezett, de nem bizonyított nemkívánatos hatás miatt egyes növények (pl. *Cimicifuga racemosa*) gyógyszereit csak fokozott elővigyázatosság mellett engednek alkalmazni.

A gyógynövények vizsgálata több szempontból is perspektivikus, akár a vizsgálat módszerei, akár célja felől közelítünk. Kevés olyan gyógynövény, van még a leginkább intenzíven vizsgáltakat figyelembe véve is, amely kémiai alaposan feltérképezett. A növények zöménél a hatóanyagok sem ismertek teljes körben, nem is beszélve a nemkívánatos hatásokért felelős, vagy az olyan, biológiailag jelentős aktivitással nem rendelkező anyagokról, amelyek valamelyest a kívánatos és nemkívánatos hatásokat is befolyásolhatják. Alapvető fontosságú olyan új vegyületek kinyerése és szerkezetazonosítása, amelyek a terápiás alkalmazhatóság vagy biztonság szempontjából jelentősek. A kvalitatív azonosításon túlmutató, kvantitatív adatokat szolgáltatató eredmények is hiányosak, jóllehet a növényi kivonatok hatásossága és mellékhatásprofil szempontjából ezek is jelentősek. Mivel a növényeket napjainkban döntően feldolgozott formában alkalmazzák, elengedhetetlen a gyakorlatban használt termékek vizsgálata is. A kémiai vizsgálatokat kiegészítő farmakológiai kutatások új hatások, hatóanyagok, nemkívánatos hatásokért felelős vegyületek azonosításához vezethetnek. A növényi kivonatok, vegyületek toxikológiai elemzése szintén fontos

feladat, mivel a legelterjedtebben alkalmazott növények zömének sem teljesen feltárt a toxikológiai profilja. A farmakológiai, toxikológia és klinikai vizsgálatok esetén egyre nagyobb hangsúly van azon, hogy jól definiált és kémiaiailag jól jellemzett kivonatokon alapuljanak a megállapítások, mivel a hatásossággal és biztonságossággal kapcsolatos kijelentések csak egy-egy konkrét kivonatra érvényesek, és nem általánosíthatóak a növényfaj szintjére.

2. Kutatási célok

A bevezetőben foglaltakat figyelembe véve az itt bemutatott munka fókuszában olyan fitokémiai, -farmakológiai és a hatásosság, biztonságosság értékelését célzó vizsgálatok voltak, amelyek

- preparatív kémiai kutatások eredményeként új szekunder metabolitok, közöttük új potenciális hatóanyagok azonosítása céljából,
- új bioaktivitások felderítését célozták,
- ismert vegyületek, köztük ható- és nemkívánatos hatásokért felelős anyagok kimutatására, mérésére, minőségvizsgálatra alkalmas módszerek kidolgozására irányultak, valamint
- gyógynövénykivonatok hatásosságának felmérésére és biztonságossági profiljuk kiegészítésére irányultak.

A **preparatív növénykémiai vizsgálatok** kiindulási alapja és célja eltérő volt az egyes növények esetén. Az *Aconitum* fajoknál a cél a nemzetségre jellemző diterpén-alkaloidok kinyerése volt a kémiai tér bővítése és **új, bioaktív vegyületek és aktivitások** megismerése érdekében. Hasonló motiváció indokolta a lipoalkaloidok félszintézisét, valamint a *Heliopsis helianthoides* és a *Lepidium meyenii* vizsgálatát. A *Paraleucobryum longifolium* tanulmányozásának kettős célja volt: szerettünk volna kémiai adatokat gyűjteni erről a korábban szinte egyáltalán nem tanulmányozott fajról, valamint megismerni az antiproliferatív és antibakteriális hatásért felelőssé tehető tartalomanyagokat. A *Cyclopia genistoides* vizsgálatánál a cél a fitoösztrogén hatású vegyületek azonosítása volt, vegyülettípustól függetlenül. A *Ducrosia anethifolia* vizsgálatának motivációja a növény kémiai feltérképezése volt, különös tekintettel a furokumarinokra, mivel erről a gyógyászatban és táplálkozásban is használt fajról ilyen tekintetben nem állnak rendelkezésre átfogó információk.

A **nemkívánatos hatású és hatóanyagok mérésének** első lépése a mérési módszer kidolgozása. A kvalitatív és kvantitatív analízis célja lehet élelmiszernövényként is használt gyógynövények (pl. *Camellia sinensis*, *Foeniculum vulgare*) összetételének pontosabb megismerése az élelmiszerbiztonság fokozásának céljából, vagy gyógyászati céllal alkalmazott kivonatok elemzése a biztonságosság és hatásosság jobb megismerése érdekében (*Rhodiola rosea*, *Vitex agnus-castus*, *Silybum marianum*).

A **hatásossági és biztonságossági vizsgálatok** a népi gyógyászatban alkalmazott fajok, a *Centaurea sadleriana* sebgyógyító és az *Anthemis nobilis* görcsoldó hatásának tanulmányozásától a *Symphytum officinale* toxikus alkaloidjainak bőrről való felszívódásának tanulmányozásán át az *Ambrosia artemisiifolia* szubakut toxicitásának elemzéséig terjedtek. *In vitro* módszerek segítségével elemeztük alkaloidok specifikus és nem-specifikus toxicitását. Elsőként végeztünk Magyarországon olyan kutatást, amely részeként klinikailag vizsgált növények (*Vitex agnus-castus*, *Crataegus* sp., *Crocus sativus*) hatásosságát elemeztük metaanalízisek segítségével.

3. Irodalmi áttekintés

A disszertáció alapját képező munka a preparatív növénykémiai vizsgálatoktól a kvalitatív és kvantitatív analízisen át növényi kivonatok és vegyületek farmakológiai-toxikológiai jellemzéséig több témakört ölel át. A következő áttekintésben a kísérletes munkát megalapozó, a munkát perspektívába helyező fontosabb szakirodalmi előzményeket és háttérrel mutatom be.

3.1. Farmakológiailag ígéretes növények és szekunder metabolitjaik

3.1.1. Terápiás és toxikológiai jelentőségű alkaloidok

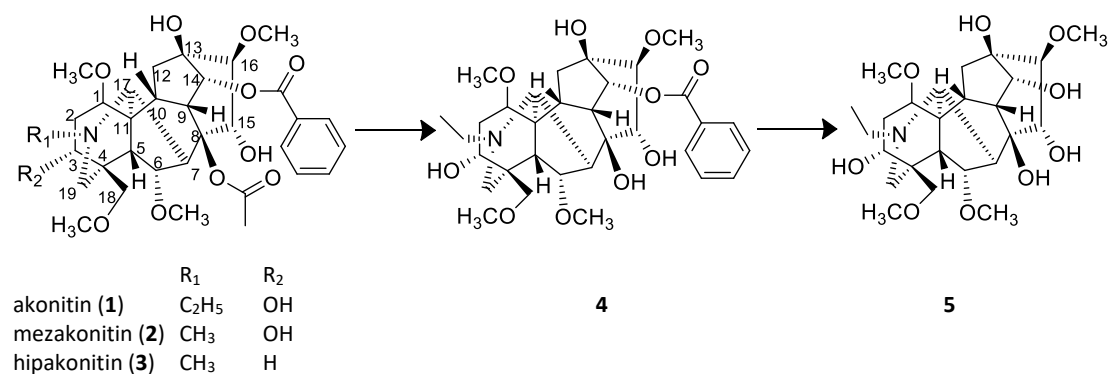
A gyógyászatban alkalmazott növényfajok között jelentős arányt képviselnek az alkaloidtartalmú növények. Az alkaloidok – döntően azért, mert a neurotranszmitterekhez hasonlóan nitrogénatomot tartalmaznak – erős fiziológiás hatással rendelkező vegyületek, amelyek vizsgálata toxikológiai szempontból is érdeklődésre tarthat számot.

A távol-keleti gyógyászat legfontosabb növényei közé tartozó, többek között fájdalomcsillapítóként használt *Aconitum* (sisakvirág, Ranunculaceae család) fajokra jellemző az alkaloidok felhalmozása, a nyers növények jelentős mennyiségben tartalmaznak C_{18} -, C_{19} - és C_{20} -diterpén-alkaloidokat. A C_{20} -diterpén-alkaloidok általában észterezetlenek, ritkán benzoésav vagy ecetsav monoésztereként fordulnak elő a természetben.¹⁴ A C_{19} -diterpén-alkaloidokat (norditerpén-alkaloidokat) az észterezettség alapján 5 csoportba lehet osztani: észterezetlen, mono-, di-, triészter és lipoalkaloid. Ezeknél a vegyületeknél az észterező sav általában aromás sav és ecetsav, a lipoalkaloidok viszont a C-8 szénatomon hosszabb szénláncú zsírsavval észterezettek.^{15,16} A C_{18} bisznorditerpén-alkaloidok észterezetlenek a C-4-en vagy egy észtercsoporttal szubsztituáltak.¹⁷

Az *Aconitum carmichaelii* és az *Aconitum kusnezoffii* távol-keleti hagyományos gyógyászatban elterjedten alkalmazott gyökérdrógiáit a Kínai Gyógyszerkönyv is tartalmazza: a Radix aconitit (az *A. carmichaelii* szárított anyaggyökérgumója), ennek feldolgozott formáját, a Radix aconiti lateralis praeparatát (az *A. carmichaelii* feldolgozott leánygumója), a Radix aconiti kusnezoffiit (az *A. kusnezoffii* szárított gyökérgumója), valamint ennek feldolgozott formáját. A Kínai Gyógyszerkönyv a Radix aconiti és a Radix aconiti kusnezoffii esetén nem korlátozza a diterpénalkaloid-tartalmat, és a Gyógyszerkönyvben található figyelmeztetés („be cautious about the unprocessed root taken orally”) nincs arányban a mérgezés lehetséges következményeivel. A Radix aconiti praeparata és a Radix aconiti kusnezoffii praeparata monográfiák esetén a diészteralkaloidok mérésére kolorimetriás (ezek mennyisége legfeljebb 0,15%), az összalkaloid-tartalom meghatározására titrimetriás módszert adnak meg (akonitinben (1) kifejezett mennyiség <0,20%). A feldolgozott drog Gyógyszerkönyv által ajánlott napi adagja 1,5-3 g, ami akár 4,5 mg

diészter-alkaloidot is tartalmazhat. A *Radix aconiti lateralis praeparata* esetén a mennyiségi vizsgálatra nem túlságosan megbízható rétegekromatográfiás vizsgálatot ajánlanak. Tekintettel a diészteralkaloidok toxicitására (az akonitin **(1)** minimális humán letális dózisa 3–6 mg),¹⁸ elengedhetetlen, hogy a gyógyszerkönyvi mennyiségi meghatározások biztosítsák a legtoxikusabb vegyületek megbízható meghatározását. Az Európai Gyógyszerkönyv *Aconiti carmichaelii radix*, *Aconiti radix praeparata*, *Aconiti radix lateralis praeparata* és *Aconiti kusnezoffii radix praeparata* monográfiái kidolgozás alatt vannak, célszerű lenne, hogy a közeljövőben hivatalossá váló előíratok a jelenlegi tudásunkkal harmonizáló analitikai módszereket tartalmazzanak.

A feldolgozatlan sisakvirág drogok toxicitását alkaloidtartalmukkal hozzák összefüggésbe, döntően Na^+ -ioncsatornákat aktiváló hatásuknak tulajdoníthatóan.¹⁹ Ilyen szempontból, a mennyiségi viszonyokat is figyelembe véve, a gyakran alkalmazott drogokban az akonitin **(1)**, a mezakonitin **(2)** és a hipakonitin **(3)** az elsődleges kockázati tényezők. Nem teljesen ismert, hogy a vegyületek kardiotoxicitásában a jelenleg elsődlegesnek tartott Na^+ -csatorna aktiválásán kívül mely támadáspontoknak van szerepe, mint ahogy az sem tisztázott, hogy a sisakvirágdrogok ismert fájdalomcsillapító hatásában mekkora szerepet játszanak ezek a vegyületek és ioncsatornákra kifejtett hatásaik. Az bizonyos, a feszültségfüggő Na^+ -csatornákat aktiváló alkaloidok a neuronok tartós depolarizációja és az idegi ingerületvezetés gátlása miatt antinociceptív hatásúak, de ez nem ad magyarázatot a drogok empirikusan alátámasztott gyulladáscsökkentő hatására.

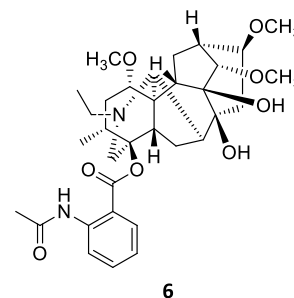


1. ábra Az akonitin **(1)** átalakulása a sisakvirágdrogok feldolgozása során benzoil-akoninná **(4)**, majd akoninná **(5)**

A sisakvirágdrogokat jellemzően vizes közegben hőkezeléssel járó feldolgozás után használják fel a keleti gyógyászatban. A feldolgozás során a diészter-alkaloidok észtercsoportjainak (első lépésben az acetil-, majd a benzoilészter) hidrolízise történik (**1. ábra**), azaz a diészterek koncentrációja csökken, az egyszeresen észterezett és észterezetlen származékok koncentrációja nő. Ha a feldolgozás nem eléggé kimerítő, a drogban maradhat di- vagy monoészter-alkaloid. A megfelelő feldolgozás szükségességét jól szemléltetik az alkaloidok egereken mért LD₅₀ értékei:

akonitin (**1**): 1,8 mg/kg p.o., 0,3 mg/kg i.p., 0,1 mg/kg i.v.; benzoil-akonin (**4**) 1500 mg/kg p.o., 70 mg/kg i.p., 23 mg/kg i.v.; akonin (**5**): 120 mg/kg i.v.²⁰

Nem megfelelő feldolgozás után a sisakvirággyökerek kivonatai mérgezőek, ezt számos mérgezési eset igazolja.²¹ A túlságosan nagy mennyiségű diészter-típusú alkaloidot tartalmazó drogok használatából bekövetkező mérgezések halálozási aránya még kórházi ellátás esetén is 5% fölött van.²² A kardiotoxicitás a QT időszak megnyúlásával és aritmiával jellemezhető, amit eredetileg a Na⁺-csatornák aktiválásával magyaráztak.²³ Ez az aktivitás elsősorban a C-8 és C-14 helyzetben észterezett diészter-C₁₉-alkaloidokra jellemző,²⁴ ezért tartják az akonitint (**1**), hipakonitint (**3**) és a mezakonitint (**2**) a sisakvirágok legmérgezőbb alkaloidjainak. A monoészter alkaloidok egy része gátolja a feszültségfüggő Na⁺-csatornát, ezért antiaritmiás és epilepsziaellenes hatásuk is lehet.²⁴ Ilyen szempontból a legperspektivikusabb vegyületek az antranilsavval vagy acetyl-antranilsavval C-4 helyzetben észterezett, C-1-en, C-14-en és C-16-on metoxycsoportot, C-8-on hidroxilcsoportot tartalmazó C₁₈-alkaloidok közé tartoznak.²⁵ Ezek egyike, az *Aconitum septentrionale*-ből származó lappakonitin (**6**) hidrobromidsója Allapinin néven az 1980-as években orálisan alkalmazható antiaritmiás gyógyszerként került forgalomba.²⁶ A lappakonitin tartósan és reverzibilisen gátolja a Na⁺-csatornákat, de hatásában az is szerepet játszik, hogy csökkenti bizonyos Na⁺- és K⁺-csatornák és membrán-transzporterek expressziójában szerepet játszó mRNS-ek szintjét.²⁷ Egy másik vegyület, az *Aconitum koreanumból* kinyert acehitizin 2005-ben került forgalomba antiaritmiás gyógyszerként Kínában. Ez a molekula nemcsak a gyors Na⁺-csatornát gátolja, hanem a késői egyenirányító K⁺-áramot és az L-típusú kalciumáramot is, ugyanakkor nem okoz QT-megnyúlást.²⁸



A szenzoros neuronokban található feszültségfüggő Na⁺-csatornák használatfüggő gátlóinak antikonvulzív, antiaritmiás és helyi érzéstelenítő hatását régóta kiaknázzák a gyógyászatban.^{29,30} A Na⁺-csatornák α -alegységeinek izoformái nagyon hasonló szerkezetűek, a β -alegységek eltérései azonban különböző funkciókat tesznek lehetővé.³¹ A fiziológiai szerepet betöltő csatornaaltípusokon (pl. Na_v1.5) inaktív, gyógyászati szempontból jelentős csatornákon (pl. Na_v1.2) szelektíven aktív vegyületek gyógyszerkutatási szempontból jelentősek lehetnek, ilyeneket azonban nem ismerünk a jelenleg alkalmazott gyógyszermolekulák körében.³²

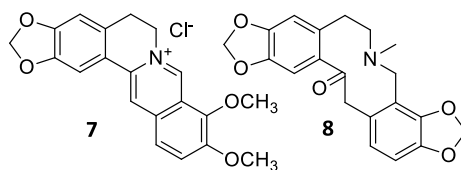
A diterpén-alkaloidok ioncsatornákra kifejtett hatásainak változatosságát felismerve és az újabb ioncsatornák felfedezésével felélénkült a vegyületek kardiovaszkuláris hasznosításával kapcsolatos kutatás. Potenciális támadáspontok lehetnek a G-protein által mediált befelé egyenirányító káliumcsatorna (GIRK), amelyek a pitvarban expresszálódnak. Krónikus pitvarfibrilláció esetén a pitvari szívizom elektromos újrendeződése során megnövekszik a

konstitutívan aktív GIRK csatornák száma, ami az aritmia egyik potenciális rizikófaktor, ³³ ezért a GIRK-gátló hatású anyagok perspektivikusak lehetnek a szívritmuszavarok terápiájában. ³⁴ Bár korábban kimutatták, hogy egyes alkaloidok hatásosan gátolják a GIRK-csatornákat, ³⁵ a diterpén-alkaloidok ilyen jellegű hatásait nem tanulmányozták. Mindezek a felismerések a preparatív fitokémiai munkát is ösztönzik, mivel a farmakológiai tesztekhez újabb vegyületekre van szükség.

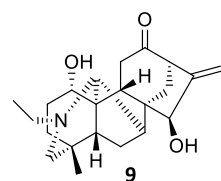
Ezzel párhuzamosan, a káliumcsatornák további altípusainak felfedezésével a diterpén-alkaloidok toxicitásának újabb lehetséges mechanizmusai tárultak fel. A diterpén-alkaloidok hERG-gátló hatására egy szűrővizsgálat hívta fel a figyelmet, amelyben az akonitin esetén mutattak ki a már ismert Na⁺-csatorna gátló hatást kiegészítő rizikótényezőt. ³⁶ A gyors késői egyenirányító K⁺-csatorna (Kv11.1, I_{Kr} vagy ún. human ether-à-go-go-related gene, hERG csatorna) fontos szerepet játszik a repolarizációban (főként annak 3. fázisában), gátlása olyan mértékben fokozza az aritmia rizikóját, hogy jelenleg a gyógyszerfejlesztés korai szakaszában vizsgálják a gyógyszerjelöltek hatását a csatornára a potenciálisan veszélyes molekulák kiszűrése érdekében. ³⁷ A hERG által kódolt feszültségfüggő K⁺-csatorna gátlása megnyújtja az akciós potenciált, a QT-időt, ami torsade de pointes aritmiához és hirtelen szívhalálhoz vezethet. ³⁸ A diterpén-alkaloidok közül az akonitin esetén figyeltek meg elsőként hERG ioncsatornagátló hatást, ³⁹ majd egy állatkísérlet kapcsán a hipakonitinről is leírták ugyanezt. ⁴⁰

A hERG ioncsatornákat gátló vegyületek között lehetnek olyanok is, amelyek terápiásan széles körben alkalmazott növények tartalomanyagai. Az egyik ilyen növény a *Chelidonium majus*, amelynek benzil-izokinolin alkaloidjai közül több esetén igazoltak hERG-gátló aktivitást. ^{41–44}

Amennyiben ezt a hatást nem ellensúlyozzák más (pl. ioncsatornákra kifejtett) hatások, a vérehulló fecskefű orális alkalmazása kockázatos lehet. A vegyületek hatása azonban többnyire nem írható le egyetlen ioncsatornahatással: míg például a berberin (**7**) ⁴³ esetén a hERG gátlásnak megfelelő akciós potenciál megnyúlást írtak le, a protopin (**8**) ezzel ellentétesen hatott az akciós potenciál hosszára. ⁴¹ Utóbbi vegyületről ismert, hogy az L-típusú Ca²⁺- (I_{Ca,L}) és Na⁺- (I_{Na}) csatornákat is gátolja, ⁴⁵ azonban a növény számos alkaloidjainak ioncsatornákra kifejtett hatásai nem ismertek.

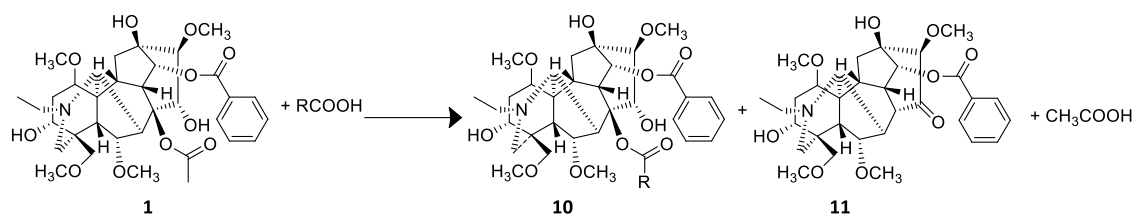


Az ioncsatornákon keresztül kifejtett hatást általában a szív-érrendszeri hatásokkal hozzák összefüggésbe. A diterpén-alkaloidok ezen kívül olyan bioaktivitásokat is kifejtenek, amelyekben az ioncsatornák befolyásolása nem, vagy nem ismert mértékben játszik szerepet. A közismerten toxikus akonitin (**1**) különböző daganatsejteken citotoxikus hatást fejt ki, ami részben a Na⁺-csatornák aktiválásával, részben pedig különböző proapoptotikus faktorok termelésének fokozásával és az NF-κB expressziójának gátlásával magyarázható. ^{46–48} A fájdalomcsillapító hatást is



sokáig elsősorban az ioncsatornákon keresztül kialakuló antinociceptív aktivitással magyarázták, de a szongorin (**9**) esetén igazolták, hogy az opioid rendszer is érintett.⁴⁹ Ez utóbbi vegyület *in vivo* a D₂- és a GABA_A-receptorok agonistája,^{50,51} ugyanakkor *in vitro* ezzel ellentétes hatást mutatott.⁵² Ez az ellentmondás rámutat arra, hogy a hatásmechanizmusok tisztázását célzó *in vitro* vizsgálatok mellett elengedhetetlenek az *in vivo* kísérletek, amelyekben a célfehérjéken kívül egyéb tényezők is befolyásolhatják a hatást.

A sisakvirágok a sokat tanulmányozott diterpén-alkaloidok csoportján belül egy speciális alcsoportba tartozó ún. lipoalkaloidokat is tartalmaznak. Ezek a hosszabb szénláncú zsírsavakkal észterezett vegyületek a friss és a feldolgozott drogokban is megtalálhatóak, ami hőstabilitásukra utal, valamint azt is kimutatták, hogy részben a feldolgozás során átészterezéssel képződnek.⁵³ Bár a lipoalkaloidok a human bélflórában is termelődnek akonitin-típusú vegyületekből,⁵⁴ farmakológiai jelentőségükkel sokig nem foglalkoztak. Ennek fő oka, hogy a növényi mátrixból a komplex, polaritásban és molekulaméretben kis különbségeket mutató lipoalkaloidok kromatográfiás elválasztása technikailag nehéz. Bár a lipoalkaloidok előállítás diészter-típusú vegyületek átészterezésével megoldható,⁵⁵ korábban nem szintetizáltak olyan mennyiségben ezekből a vegyületekből, hogy farmakológiai vizsgálatukra sor kerüljön.



2. ábra Az átészterezési reakció általános sémája (**10**: lipoalkaloid; **11**: piroakonitin)

3.1.2. Alkilamid-tartalmú növények

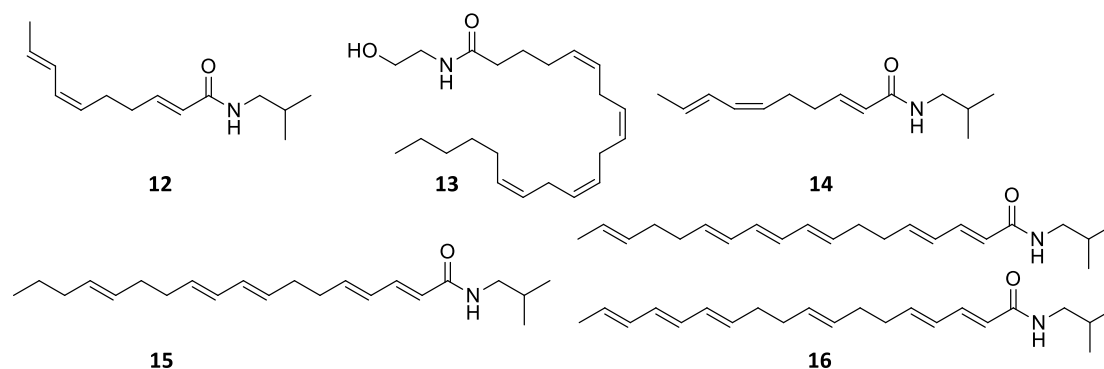
Az *N*-alkil-amidok a növényvilágban széles körben előforduló lipofil, kémiai heterogén vegyületek. A molekulák szerkezete többnyire egy többszörösen telítetlen zsírsavra és egy aminra vezethető vissza, amelyek különböző heteroatomokat (kén, oxigén, nitrogén) és gyűrűrendszert is tartalmazhatnak. Ez idáig több mint 20 növény családból mintegy 400 *N*-alkil-amidot mutattak ki, amelyek előfordulása jellegzetes az Asteraceae család *Achillea*, *Acmella*, *Echinacea*, *Heliopsis* és *Spilanthes* nemzetségeire, valamint a Brassicaceae, Piperaceae, Rutaceae és Solanaceae növény családok egyes fajaira.⁵⁶ A Helianthae nemzetségcsoport (Asteraceae) különösen gazdag *N*-alkil-amidokban, több mint 70 különböző vegyületet írtak le ebben a taxonban.^{57,58} Az *N*-alkil-amidok közé olyan közismert és farmakológiailag is alaposan tanulmányozott vegyületek is tartoznak, mint a kapszaicin, de ebbe a kémiai csoportba tartoznak az *Echinacea purpurea* anxiolitikus hatásában potenciálisan szerepet játszó vegyületek is.^{59,60}

Az *N*-alkil-amidok a növényekben jelen tudásunk szerint, az *N*-aciletanolaminokhoz hasonlóan növekedésszabályozó funkciókat töltenek be.⁶¹ Számos egyéb nitrogéntartalmú szekunder metabolithoz hasonlóan az állati szervezetekre is sokszínű és markáns hatásokat fejtenek ki. Ezek közül legintenzívebben az antimikrobás, a gyulladáscsökkentő, az immunmoduláns, valamint a központi idegrendszeri hatásokat tanulmányozzák.⁵⁷ Az aktivitást befolyásolja a savszubsztituens lánchossza és telítetlensége. A *Heliopsis longipes* és fő *N*-alkil-amidja, az affinin (**12**) antinociceptív, analgetikus hatását állatkísérletben igazolták, ez részben az opioiderg rendszerre való hatással magyarázható.^{62,63} A vegyületek gyulladáscsökkentő hatását *Spilanthes*, *Heliopsis*, *Piper* és *Achillea* fajok esetén is kutatták,⁵⁸ de legintenzívebben az *Echinacea* fajok vegyületeinél tanulmányozták, a klinikailag tapasztalt hatás mechanizmusainak felderítése részeként.^{57,64–67} A kasvirágkivonatok gyulladáscsökkentő hatása részben a COX-1, COX-2 és 5-LOX enzimek gátlásával van összefüggésben.^{68,69} A hatásban szerepe lehet a NF- κ B gátlásának⁵⁸ és a TNF- α génexpresszió modulálásának, utóbbi háttérben az endokannabinoid rendszerre kifejtett hatás állhat.⁶⁵

Elméleti alapon feltételezhető, hogy az endogén kannabinoidokkal (pl. anandamid, **13**) való szerkezeti hasonlóság miatt az *N*-alkil-amidok egy része hat a kannabinoidreceptorokon.⁵⁷ Az endokannabinoid rendszer és a növényi *N*-alkil-amidok interakciójának kísérletes igazolása új megvilágításba helyezte a vegyületek és az ezeket tartalmazó növények hatásainak értelmezését.^{65–67,70–72} Az emlős szervezetekben a már korábban leírt fájdalomcsillapító, antinociceptív, gyulladásgátló, immunmoduláns és különböző központi idegrendszeri hatások részben az *N*-alkil-amidok és a különböző endokannabinoidreceptor-altípusok kölcsönhatásának következményei lehetnek.^{64,73} A növényi metabolitok jelentőségét jól jelzi, hogy az immunmoduláns hatású dodeka-2*E*,4*E*,8*Z*,10*Z*-tetraénsav-izobutilamid és a dodeka-2*E*,4*E*-diénsav-izobutilamid nagyobb affinitással kapcsolódik a CB₂-receptorokhoz, mint az endogén kannabinoidok.⁶⁷ Az *Echinacea* *N*-alkil-amidok hatása a CB₂ receptorokon keresztül alakul ki, a CB₁ altípushoz affinitásuk nem jelentős.⁶⁶ Ezt követően egyre több növény, például a *Zanthoxylum bungeanum*, az *Otanthus maritimus* és a *Lepidium meyenii* *N*-alkil-amidjainak (ezeket makamidoknak is nevezik) hatására derült fény a kannabinoidreceptorokon.^{71,72,74,75} A vegyületek kannabimimetikus hatása közvetett módon is kialakulhat, amint azt az anandamid lebontásában szerepet játszó FAAH enzimet gátló *N*-3-metoxibenzil-linolsavamid esetén igazolták.⁷⁶ Ugyanilyen közvetett hatás a MAGL enzim gátlásával is kialakulhat.⁷⁷

Ezek a felismerések megélénkítették az *N*-alkil-amidokat tartalmazó növénytaxonok kémiai kutatását, különös hangsúllyal a korábban már terápiásan alkalmazott növényekre. Egy ilyen faj a dél-amerikai népi gyógyászatban alkalmazott *Lepidium meyenii* (Brassicaceae), amelyből kísérleteink megkezdésekor 19 *N*-alkil-amid volt ismert.^{78–81} A bennszülöttek által maca néven

ismert növény gumóját élelmiszerként és gyógyászati céllal (általános erősítő, termékenységfokozó állatokon és emberen) alkalmazzák.^{82,83,84} A perui őslakosok újabban a gyerekek szellemi teljesítményének fokozására (tanulás segítése) is használják.⁸³ Európában, étrend-kiegészítők alapanyagaként szintén teljesítményfokozóként, valamint a tradicionális alkalmazást némileg újraértelmezve szexuális teljesítményfokozóként, merevedési zavarok enyhítésére is használják.^{82,85} A klinikai hatásosságot több vizsgálatban tanulmányozták, ezeket szisztematikus áttekintő cikk is elemezte, kimutatva a szexuális vágyra és teljesítőképességre (férfiaknál) kifejtett hatást).⁸⁶



A *Helioscopia* nemzetség több fajt az észak-amerikai bennszülöttek használták gyógyászati céllal. A *H. longipes* drogját fájdalomcsillapítóként, a *H. helianthoides* gyökerét tüdőbetegségek esetén és a fizikai teljesítmény fokozására használták.⁸⁷ A nemzetség tagjai világszerte előforduló dísznövények, gyógyászati alkalmazásuk azonban a világ más részein nem jellemző. A hatásosságot human és preklinikai vizsgálatokban nem tanulmányozták, annál több adat áll rendelkezésre a növények *N*-alkil-amidjairól. A *H. longipes*, a *H. buphthalmoides*, a *H. scabra* és a *H. helianthoides* különböző drogaiból számos *N*-alkil-amidot izoláltak,^{62,88–90} köztük az egyéb nemzetségekben is kimutatott affinint és homospilantolt (**14**). A *H. helianthoides* var. *scabra*-ból korábban két vegyületet, a szkabrint (**15**) és a heliopszint (**16**, két, szerkezetileg rokon vegyület keveréke) állították elő.^{89,90}

3.1.3. Mohák, mint bioaktív vegyületek feltáratlan forrásai

A természetes anyag alapú gyógyszerkutatás egyik mozgatórugója, hogy napjainkban is számos, kémiai alig feltárt növénytaxont tartunk számon, amelyek újszerű szerkezetű és hatású anyagok potenciális forrásai. Az egyik ilyen feltáratlan terület a mohák törzse (Bryophyta). A mohákat a népi gyógyászatban nem alkalmazták elterjedten, ez lehet az egyik oka a fitokémiai (és -farmakológiai) érdeklődés viszonylagos hiányának. A másik ok pedig az, hogy egyes fajok nehezen gyűjthetőek be a tudományos vizsgálatokhoz szükséges mennyiségekben.

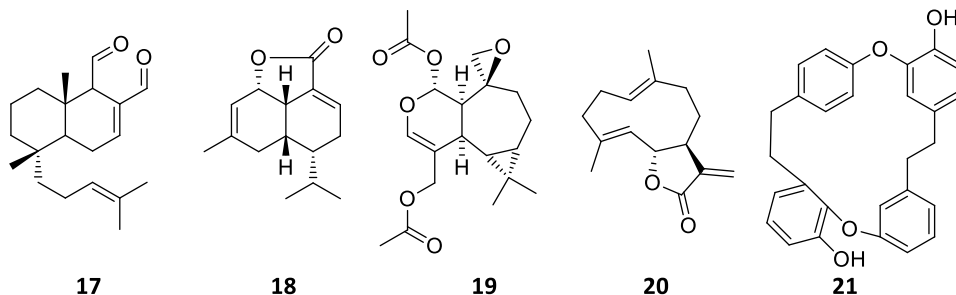
A mohák több mint 20 000 fajt számlálnak, ezek közül mintegy 6000 a májmohák (Marchantiophyta), 14 000 a lombosmohák (Bryophyta), valamint 300 a becősmohák

(Anthocerotophyta) törzsébe sorolható. Hazánkban 659 faj honos, többségük lombosmoha.⁹¹ A mohák tanulmányozására önmagában is elegendő indok lehetne, hogy ezeket a kis növényeket kórokozók és kártevők ritkán károsítják, amely védelmet nyújtó szekunder metabolitok jelenlétére utal.⁹² Kutatásuknak lendületet adhat a genetikai azonosítási és mikrotermesztési módszerek fejlődése.⁹³

A mohák népi gyógyászati felhasználása elsősorban Kínában volt jellemző,⁹⁴ napjainkban is 30–40 fajt alkalmaznak elterjedten.⁹⁵ Bizonyos fajokat a szignatúratan alapján alkalmaznak: a *Marchantia polymorpha* májhoz hasonlít, ezt a fajt ma is májbetegség, sárgaság kezelésére használják, hasonló okokból *Riccia* fajokat tinea kezelésére. Napjainkban az egyik legjelentősebb gyógymoha a *Rhodobryum giganteum*, amelyet kínai szerzetesek évszázadok óta használnak különböző szívbetegségekre, s amelynek antianginás hatását kísérletileg is igazolták.⁹⁶ A *Sphagnum*, *Bryum*, *Mnium*, *Philonotis* fajokat, a *Polytrichum juniperinum*ot észak-amerikai bennszülöttek, a *Haplocladium microphyllum*ot és a *Marchantia polymorpha*t Kínában használják fertőzések kezelésére.^{95,97–100} Az antimikrobás hatás kísérleti igazolásáról először az 1950-es években jelentek meg cikkek (a *Sphagnum portoricense*, *S. strictum*, *Conocephalum conicum*, *Dumortiera hirsuta*, *Anomodon rostratus*, *Orthotrichum rupestre* és a *Plagiomnium cuspidatum* kivonatairól),^{101,102} majd az 1960-as évektől hazánkban is megindultak a hasonló célú kutatások.¹⁰³ Ebben az időben jelent meg az első átfogó, 50 fajra kiterjedő szűrővizsgálatról beszámoló közlés.¹⁰⁴ Azóta számos moha kivonataról és tartalomanyairól igazoltak antibakteriális és antifungális hatást *in vitro*.⁹⁴ Legjelentősebb aktivitást a *Bazzania*, *Conocephalum*, *Diplophyllum*, *Dumortiera*, *Marchantia*, *Metzgeria*, *Lunularia*, *Pellia*, *Plagiochila*, *Porella*, *Radula* és *Riccardia* nemzetségek fajairól jelentettek^{105,106}. A bioaktivitás részben az illékony komponensekhez köthető,¹⁰⁷ többnyire azonban a nem illó vegyületek tehetők felelőssé. A *Pellia endiviifoliaból* izolált szakkulatal **(17)** diterpén,¹⁰⁸ a *Lepidozia fauriana* lepidozenolid **(18)** nevű szeszkviterpénje¹⁰⁹, és a *Marchantia* fajok marchantinjai számos patogén baktérium ellen hatásosnak mutatkoztak.^{110,111} Különleges vegyületek a *Riccardia marginata* klórtartalmú biszbenziljei, amelyek *Bacillus subtilis* ellen voltak hatásosak.¹⁰⁶

Számos mohafaj és vegyület *in vitro* antiproliferatív és citotoxikus hatásokkal jellemezhető. A mohákból izolált vegyületek közül a terpenoidok és a biszbenzil-származékok rendelkeznek a legmarkánsabb bioaktivitásokkal.¹¹² A szeszkviterpének (köztük laktonok), például a plagiochilin A **(19)** és származékai,^{110,113} a kosztunolid **(20)** és rokon vegyületei szubmikromoláris koncentrációban fejtettek ki daganatellenes hatást.¹¹⁴ Hasonló aktivitást mohákban előforduló kaurán,^{115,116} pimarán¹⁰⁵ és atizán típusú diterpénekről is leírtak.¹¹⁷ A biszbenzil-származékok antiproliferatív hatását számos vizsgálat alátámasztotta,^{111,118} aktivitásuk az apoptózis indukcióján alapul. Ezek a vegyületek a multidrog-rezisztencia ellen is hatásosak lehetnek, mivel gátolják a

permeabilitási glikoproteint.¹¹⁹ A diterpének hatása is részben az apoptózis indukcióján alapul,^{120,121} de szerepe lehet az NF- κ B gátlásának is.¹²² A marchantin C (**21**), amely szerkezetileg az összes többi hasonló hatású vegyülettől különbözik, a mikrotubulusok gátlásával fejt ki hatását.^{123,124}



A moha fajokkal kapcsolatban gyakran leírt citotoxikus és antimikróbás hatás jó kiindulópontja lehet a gyógyszerkutatási célú vizsgálatoknak, ugyanis a modern gyógyászat két nagy kihívása a daganatellenes és az antibakteriális terápiák hatásosságának növelése. A legfrissebb World Cancer Report szerint 2012-ben 14 millió új daganatos beteget diagnosztizáltak és 8,2 millió haláleset következett be rosszindulatú daganatok miatt.¹²⁵ Bár az utóbbi évek eredményei áttöréssel kecsegtetnek (elsősorban az immunterápiás megoldások), az új daganatellenes hatóanyagok kutatása továbbra is prioritás, és számos molekula van jelenleg is fejlesztési stádiumban.¹²⁶ A baktériumok által okozott súlyos betegségek ma már nemcsak a fejlődő országokat fenyegetik, hanem az antibiotikumrezisztencia terjedése miatt a nyugati országokat is. Figyelembe véve azt is, hogy az 1980–2010 között fogalomba került új antibiotikumok 65%-a és a daganatellenes szerek 35%-a természetes eredetű molekula, az élő szervezetek által termelt bioaktív vegyületek kutatása kifejezetten perspektivikus gyógyszerkutatási szempontból.

3.1.4. *Cyclopia genistoides*: egy kémiailag kevésbé jellemzett dél-afrikai növény

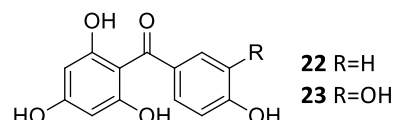
A mézbokor név több *Cyclopia* faj (Fabaceae) gyűjtőneve, amelyek mindegyike Dél-Afrikában honos, és levelüket, föld feletti részüket teakészítésre használják. A *Cyclopia* nemzetség 23 fajt foglal magába, amelyek a Dél-Afrikai Köztársaságban található Cape Tartomány mediterránhoz hasonló éghajlatú területen találhatók meg. A mézbokor kedveli a homokos, savas, kevésbé termékeny talajt, és a Fabaceae család egyéb tagjaihoz hasonlóan nitrogénkötő.¹²⁷

A *Cyclopia* fajok elágazó, fás, évelő, seprűszerű bokrok. A *C. genistoides* tűszerű leveleit és sárga, mézillatú virágait elsősorban élvezeti céllal, teaként fogyasztják. Több fajt hasznosítanak ily módon, ezek közül a *C. intermedia*, a *C. sessiliflora*, a *C. genistoides* és a *C. subternata* a kereskedelmileg legjelentősebbek.¹²⁸ Régebben a leveleket és virágokat napon történő szárítás után használták fel, napjainkban szárítás előtt fermentálják a leveleket, amelyeket még virágzás előtt gyűjtenek be. A mézbokor teáját a népi gyógyászatban elsősorban erősítőszerként,

köptetőként alkalmazzák, de anekdotikus beszámolók szerint tejelválasztást fokozó és menopauzás tüneteket mérséklő hatása is van.^{129,130}

A Dél-Afrikán kívüli népszerűségének egyik oka az, hogy a teacserjével ellentétben nem tartalmaz koffeint. Fitokémiai szempontból három, iparilag is jelentős faj (*C. intermedia*, *C. subternata* és *C. genistoides*) polifenoljait jellemezték legalaposabban. A föld feletti részek főleg flavonokat, flavanonokat, izoflavonokat, xantonokat, kumesztánokat, benzofenonokat és katechineket tartalmaznak.^{130–134}

A *C. genistoides*ből a benzofenon iriflofenon (**22**) és a maklurin (**23**) glükozidjain kívül^{135,136} flavonoid-glikozidok (mangiferin, izomangiferin, eriocitrin, narirutin, heszperidin, vicensin-2 és diozmin) jelenlétét igazolták, további 30 vegyület jelenlétét tömegspektrometriás vizsgálat alapján feltételezték.¹³⁷



A *C. genistoides*szel végzett farmakológiai vizsgálatok a növény pleiotróp hatásaira mutatnak rá (antioxidáns, kemopreventív, antimutagén és fitoösztrogén). Ezek egy része (antioxidáns, kemopreventív) egyértelmű kapcsolatba hozható a polifenoltartalommal, s ezek az aktivitások nem mutatnak specificitást a fajra.¹³⁸ Érdekeség, hogy míg általában a fermentáció csökkenti az antioxidáns kapacitást, a *C. genistoides* esetén ezzel ellentétes hatást figyeltek meg.¹³⁹ Az *in vitro* antimutagén hatás egyéb *Cyclopia* fajokkal együtt a *C. genistoides* esetén is igazolható volt.¹⁴⁰ A növény benzofenonjainak α -amilázgátló hatását mutatták ki.¹³⁶ A legnagyobb figyelmet a növény és vegyületeinek ösztrogénszerű hatása és az ezért felelős vegyületek váltják ki. A fitoösztrogének olyan, az ösztrogénekkel szerkezeti rokonságot mutató, növényi eredetű, nem szteroid szerkezetű vegyületek, amelyek az ösztrogénreceptorokhoz kis affinitással, kapcsolódnak, agonista és antagonistá hatást egyaránt kiválthatnak. Jelentőségüket az adja, hogy az endogén ösztrogénnel ellentétben receptoraltípus-szelektivitást mutatnak, általában nagyobb affinitással a β -ösztrogénreceptorok iránt.¹⁴¹ A vegyületek iránti érdeklődés az ösztrogénpótlás veszélyeivel kapcsolatos aggodalmak miatt, a csonttrikulás és a menopauzával kapcsolatos egyéb panaszok terápiája kapcsán élénkült meg.¹⁴² A *Cyclopia* fajok ösztrogénszerű hatásairól beszámoló első közlés szerint a *C. sessiliflora*, *C. subternata*, *C. intemerdia*, *C. genistoides* vizes és metanolos kivonatai közül a *C. subternata* és *genistoides* extraktumok hormonhatást mutattak, s ezek közül a nem fermentált drogok metanolos kivonatai voltak a legaktívabbak, s a β -receptorok iránt jellemzően markánsabb volt az affinitás.¹⁴³ Egy későbbi vizsgálat megerősítette a β -receptorok iránti affinitást.¹⁴⁴ *Mfenyana* és mtsai összefüggést mutattak ki a luteolintartalom és az ösztrogénszerű hatás között.¹⁴⁵ Egy vizsgálat mélyebb betekintést engedett a kivonatok hatásának összetettségébe: külön expresszált α - és β -receptorok esetén a *C. genistoides* kivonata előbbin antagonistá, utóbbin agonista hatásúnak bizonyult, együttes expresszió esetén azonban csak az

agonista hatás volt megfigyelhető. Emlőráksejteken a kivonat ösztrogén jelenlétében gátolta a sejtproliferációt, patkányokon pedig az uterotróp hatás kivédése utalt az α -receptor-antagonizmusra.¹⁴⁶

3.1.5. A *Rhodiola rosea* és tartalomanyagai

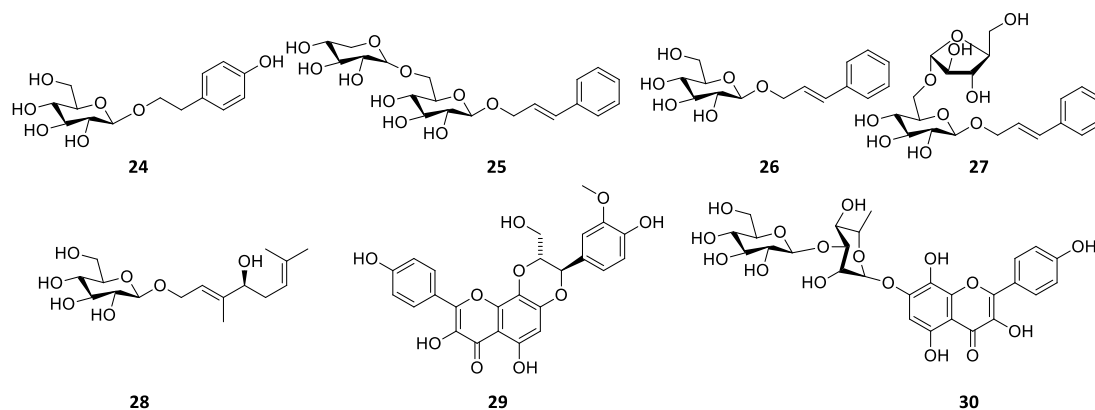
Az északi féltekén honos *Rhodiola* nemzetség több mint 100 faja közül gyógyászatilag a *Rhodiola rosea* L. (Crassulaceae) a legjelentősebb. A növény gyökerét és gyöktörzsét adaptogén hatás elérésének érdekében használják fel. A növényt eredetileg Skandinávia országaiban a népi gyógyászatban alkalmazták, ipari hasznosítása a Szovjetunióban kezdődött meg. Gyógyszerként először a Szovjetunióban, majd Svédországban került forgalomba. A hagyományos kínai orvoslásban is fontos gyógynövény, Európában és Ázsiában egyaránt stressz és fáradtság csökkentésére, a terhelhetőség fokozására használták és használják.¹⁴⁷ A *Rhodiola rosea* iparilag egyre jelentősebbé váló gyógynövény, ezért termesztése természetes elterjedési területén kívül is érdeklődésre tart számot.

Számos biológiai aktivitását igazolták különféle preklinikai modellekben,¹⁴⁸ ezek közül állatkísérletesen bizonyított anxiolitikus, antidepresszáns^{149,150} és fizikai terhelhetőséget fokozó hatása a leginkább jelentős.^{151,152} A hatásosságot humán vizsgálatok is alátámasztják. Több standardizált kivonat hatását igazolták a fizikai terheléssel vagy stresszel összefüggő kimerülés mérséklésében placebokontrollos, randomizált, kettős vak vizsgálatokban.^{153,154}

Bár az állatkísérletekben a hatások dózisfüggőnek bizonyultak, és a legtöbb esetben tartalomanyagokra standardizált kivonatokat alkalmaztak a kísérletekben, a növény hatásáért felelős vegyületek nem teljesen ismertek. A legtöbb vizsgálatban (beleértve a humán vizsgálatokat is) tanulmányozott kivonat (SHR-5) deklarálta 1,7% szalidroizidot (**24**) és 4,5% össz-rozavint tartalmaz.¹⁴⁸ A szakirodalomban a hatást általában a nemzetségben széles körben előforduló feniletanoidoknak [szalidroizid (**24**) és aglikonja, a tirozol] és az egyéb *Rhodiola* fajokra nem jellemző fenilpropenoidoknak [rozavin (**25**), rozin (**26**), rozarin (**27**) és aglikonjuk a fahéjalkohol] tulajdonítják. A növény hatásaival összefüggésbe hozzák monoterpén-glikozoidjait [pl. roziridin (**28**)],¹⁵⁵ egyes galluszsavszármazékokat,¹⁵⁶ a flavonolignánokat [pl. rodilin (**29**)] és a flavonoidok közé tartozó rodiozint (**30**).¹⁵⁷

A fenilpropenoid-glikozidokat összefoglaló néven rozavinoknak hívják, s a kevésbé specifikus szalidroizidon kívül ezek képezik a gyógyszerkönyvi standardizálás alapját.¹⁵⁸ A fahéjalkohol mennyiségét (glikozidjaival ellentétben) nem számítják bele az összrozavintartalomba, a tirozol- és fahéjalkoholtartalmat pedig nem hasznosítják a növény minőségi markereiként. A *Rhodiola* nemzetségben ez idáig azonosított, több mint 200 vegyület zöme (85) a flavonoidok közé sorolható, ezeket azonban nem használják fel a minőségellenőrzésben. A

nemzetségben más, kevésbé specifikus vegyületek is előfordulnak, ezeket sem használják fel markervegyületként.¹⁴⁸

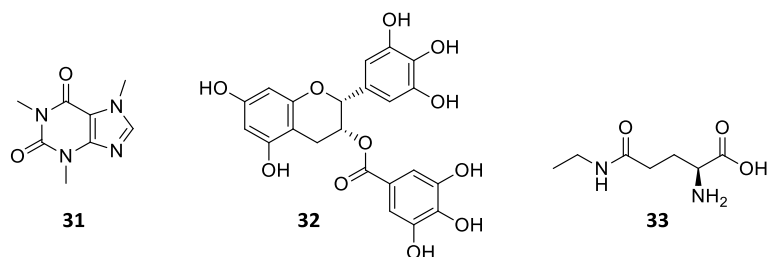


A *Rhodiola* fajokban azonosított flavonoidok jelentős része a herbacetin, a tricin és a gosszipetin glikozidjai közé sorolható.^{159–163} A *R. rosea*-ból leírt mintegy 20 flavonoid többségét a föld feletti részekből mutatták ki, herbacetint és flavonolignánokat viszont a föld alatti drogokból is.^{160,163} A herbacetin és a flavonoidok nagy része a növényvilág több családjában előfordul,^{164–168} a rodioz-szubsztituált (3-*O*- β -D-glükopiranozil-L-ramnopiranoz) származékok, például a rodiozin (**30**) a nemzetségre jellemzőek.^{159,160}

3.1.6. Teaminták központi idegrendszeri hatásért felelős összetevői

A tea a világon a legnagyobb mennyiségben fogyasztott ital. Az élvezeti, élénkítő célú teafogyasztás mellett egyre gyakrabban egészségmegőrzési céllal fogyasztják a zöldteából készült forrázatot.¹⁶⁹ A tealevél jellegzetes tartalomanyagai a metilxantin-származékok [koffein (**31**) 1–5%, teobromin 0,1–0,2%, teofilin 0,02–0,04%], a cserzőanyagok (5–20%), amelyeknek jellegzetes képviselői az epikatechin, az epigallokatechin és az epigallokatechin-gallát (**32**).¹⁷⁰ A tea (*Camellia sinensis* L.) levelében kb. 2%-os mennyiségben találhatóak aminosavak zömét az L-teanin (**33**, *N*-etil-glutamin) teszi ki. Ezt a vegyületet 1949-ben fedezték fel, és mindössze a *Camellia* nemzetség három fájában (*C. sinensis*, *C. japonica* and *C. sasanqua*) és egy gombában (*Xerocomus badius*) mutatták ki jelenlétét. A teanin (**33**) az étrendben csak a teában fordul elő jelentősebb mennyiségben.¹⁷¹

A koffein (**31**) jól ismert központi idegrendszeri stimuláns hatása az adenzinreceptor-antagonizmus eredménye.¹⁷¹ Az L-teanin (**33**) a koffeinnel ellentétes központi idegrendszeri hatásokat mutat, azt feltételezik, hogy ez a hatása a GABA-termelés fokozásával alakul ki. 100–200 mg-os dózisa humán vizsgálatokban szorongásoldó, nyugtató hatásának bizonyult humán vizsgálatokban, és ezt a hatást azoknál is megfigyelték, akik nagyobb mennyiségű (alacsony koffeintartalmú) zöld teát fogyasztottak.¹⁷¹



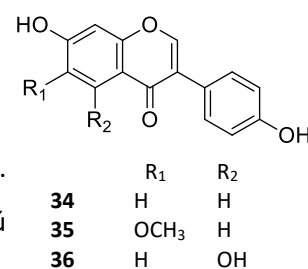
Kísérletes adatok igazolják, hogy magasabb teanin/koffein arány esetén az L-teanin (**33**) ellensúlyozza a koffein (**31**) élénkítő hatását, fokozza az α -agyhullámok képződését, ami nyugtató hatásának experimentális bizonyítéka.¹⁷² Ezen kívül ezt a vegyületet számos egyéb hatással (daganatellenes aktivitás, szív-érrendszeri betegségek megelőzése, súlycsökkentés, immunrendszer befolyásolása) is összefüggésbe hozták. Mindez hozzájárul ahhoz, hogy az L-teaninnal (**33**) kapcsolatos tudományos érdeklődés élénk és élelmiszeripari felhasználása is jelentős.¹⁷³

A teaitalok központi idegrendszeri hatása a bennük található teanin/koffein arány függvénye. A tealevelek teanintartalmát jelentősen befolyásolja a feldolgozás módja. Széles körben elfogadott nézet szerint a fermentálás (amely a feketetea-gyártás alapvető lépése) csökkenti a teanintartalmat, ezért a fermentálatlan zöld teák teanintartalma magasabb.¹⁷⁴ Az enyhén fermentált oolong teák teanintartalmát mérsékeltnek, a hosszasan fermentált puerh teákat pedig gyakorlatilag nullának feltételezik. A fermentálás nem hat a koffeintartalomra, így hipotetikusan a kevésbé fermentált teák magasabb teanin/koffein aránnyal és kevésbé élénkítő hatással jellemezhetőek. Ezen kívül természetesen más tényezők, például a teagyártás során alkalmazott gőzölés és a kiindulási nyersanyag natív teanintartalma is befolyásolja a végeredményt.^{174,175} Bár mindennek nagy ipari jelentősége van, a szakirodalomban a teák koffein- és teanintartalémának széles körű vizsgálatával kevesen foglalkoztak.

A koffein (**31**) mennyiségi mérésére számos (jellemzően HPLC alapú) módszer ismert a szakirodalomban, az L-teanin (**33**) analitikája kevésbé kutatott. Fordított fázisú oszlopon még magas víztartalmú eluensekkel is nagyon alacsony retenció idő jellemzi, UV-detektálását és PDA azonosítását a vegyület gyenge UV-elnyelése és nem jellegzetes UV-spektruma nehezíti meg.^{176,177} Származékképzéssel a mérés érzékenysége fokozható,^{178,179} a fenti nehézségek miatt azonban kevés olyan közlemény van, amely az L-teanin (**33**) és koffein (**31**) szimultán mérésével foglalkozna.

3.1.7. A szója és fitoösztrogénjei

A szója (*Glycine max* (L.) Merr.) az egyik legnagyobb mennyiségben termesztett haszonnövény. A szójabab magjai több, iparilag és táplálkozás-élettanilag értékes anyagot tartalmaznak. Ezek közé tartoznak a fehérjék (35–40%), a foszfolipidek (kb. 2–3%) és az olaj (kb. 20%). Farmakológiailag legmarkánsabb hatással az izoflavon típusú vegyületek rendelkeznek. A növényben található három fő aglikon a daidzein (**34**), glicitein (**35**) és genisztein (**36**). A szójababban azonban



ezek a vegyületek főként 7-*O*-glikozidként fordulnak elő, és a glikozidok acetyl- vagy malonilcsoporttal észtereződött származékai is megtalálhatóak a növényben. A bélrendszerben a glikozidok és származékaik aglikonná hidrolizálódnak enzimatis bomlás során, így a humán biológiai hatással rendelkező vegyületeknek az aglikonok tekinthetők.¹⁸⁰

A szója izoflavonjai a fitoösztrogének közé tartoznak, azaz olyan vegyületek, amelyek kapcsolódnak az ösztrogénreceptorokhoz. A fitoösztrogének az endogén ösztrogénnél kisebb affinitással kapcsolódnak az ösztrogénreceptorokhoz és az ösztrogénaktivitás mértéke is kisebb, ezért hormonstátusztól függően agonista vagy antagonist hatásúaknak tekinthetők. A legtöbb fitoösztrogén, így a szója vegyületei is nagyobb affinitással kapcsolódnak a β -ösztrogénreceptorokhoz.¹⁸¹ A 17- β -ösztadiol az α - és β -ösztrogénreceptorokhoz azonos affinitással kapcsolódik, ha ezt 100%-nak tekintjük, akkor a daidzein (**34**) és genisztein (**36**) affinitása ehhez a két receptoraltípushoz 18,13% és 3,10%, valamint 0,79% és 0,25%.¹⁸² A szója izoflavonok ösztrogénhiányos állapotban (pl. menopauzában), illetve olyan esetekben lehetnek előnyösen alkalmazhatóak, amikor a β -ösztrogénreceptorokon keresztüli hatás előnyben részesített. A vegyületek hatásával kapcsolatban számos, kedvező kimenetelű epidemiológiai vizsgálat ismert. Távol-keleti populáción végzett vizsgálatok az szójaizoflavon-bevitel mennyisége és a kardiovaszkuláris betegségek alacsonyabb száma közötti összefüggésre mutattak rá.¹⁸³ Számos Japánban, Kínában vagy az USA-ban végzett tanulmány amerikai vagy európai nőkhöz képest szignifikánsan kevesebb számban írta le az emlőrák előfordulását olyan távol-keleti ázsiai nőknél, akik elsődleges proteinforrása a szója, s a feltételezések szerint elsősorban a szójában található izoflavonok lehetnek felelősek a tapasztalt kedvező hatásokért.¹⁸⁴ A kedvező epidemiológiai adatok az Ázsia egyes részeire, így Japánra jellemző jelentős (legalább 20 mg/nap) izoflavonbevitellel társulnak – Európában ezzel szemben mintegy 0,5 mg, az USA-ban 3 mg az étrend átlagos napi izoflavontartalma.¹⁸⁵ Az európai piacon azonban egyre több olyan szójakoncentrátumot tartalmazó termék (étrend-kiegészítő) is megjelenik, amelyek esetenként több izoflavont tartalmaznak, mint a hagyományos ázsiai étrend.

A szójabab genuin módon megtalálható izoflavonok meghatározása a vegyületek egy részének, pl. a malonil-származékok bomlékonysága miatt nehéz feladat. Ezek a vegyületek ugyanis oldatban nem stabilak, mindössze néhány órán belül a kiindulási anyagok akár 10–15%-a is elbomolhat.^{186,187} Mivel a biológiai hatásért az izoflavon aglikonok felelősek (a bélrendszerben a vegyületek aglikonná bomlanak, s ezek szívódnak fel), célszerű az izoflavonok mennyiségét aglikonként kifejezni, ugyanakkor az eltérő bioaktivitások miatt az egyes aglikonokat is mennyiségileg meghatározni.¹⁸⁸

3.1.8. Római kamilla, egy hagyományos növényi görcsoldó

A római kamilla (*Chamaemelum nobile* (L.), Asteraceae) olyan növényfajra példa, amely bár évszázadok óta alkalmazott gyógynövény, hatásosságát kevés kísérletes bizonyíték támasztja alá. A faj Dél- és Nyugat-Európában őshonos, azonban a kontinens más részein is régóta termesztett növény. Európa különböző területein általában ugyanolyan célokra, elsősorban emésztési panaszok (görcsök, diszpepszia, flatulencia, hányinger, hányás) enyhítésére alkalmazták.^{189,190} Jelentőségét jelzi, hogy a 16. század óta termesztik is a gyógyászati igények kielégítésére.¹⁹¹ Virágzata hivatalos az Európai Gyógyszerkönyvben,¹⁹² a drog és 70%-os (v/v) etanollal készített kivonata az Európai Gyógyszerügynökség által görcsös emésztési panaszok, puffadás, flatulencia kezelésére elfogadott hagyományos növényi gyógyszerek alapanyaga.¹⁹³

Bár a felhasználás összefügg a növény feltételezett görcsoldó hatásával, ezt az aktivitást korábban sem állatkísérletesen, sem klinikai körülmények között nem vizsgálták. Humán vizsgálatokat csak külsőleges és aromaterápiás alkalmazás esetén végeztek.^{194,195} A növény jellegzetes tartalomanyagai közé tartoznak az illóolajkomponensek, a gyulladáscsökkentő szeszkviterpén-laktonok¹⁹⁶ és poliszacharidok,¹⁹⁷ görcsoldó hatása flavonoidtartalmával függhet össze.^{198,199} A római kamillából kimutatott apigenin és a luteolin állatkísérletesen igazolt jelentős spazmolitikus hatással rendelkezik.²⁰⁰

3.1.9. Imola fajok: népi gyógyászati háttérű, kevésbé vizsgált növények

Bár a népi gyógyászat számos értékes hatóanyagot és kiindulási nyersanyagot szolgáltatott a gyógyászat számára, az Európában alkalmazott hagyományos gyógynövények jelentős részét kémiai és farmakológiai alapon tanulmányozták, s meglehetősen ritka, hogy a XXI. században egy teljesen új, korábban a szakirodalomban nem közölt népi gyógynövény-alkalmazásra derüljön fény. A hazánkban őshonos *Centaurea sadleriana* a Kárpát-medencében endemikus faj, amelynek föld feletti részéből készített főzetét tradicionálisan alkalmazzák haszonállatok sebeinek gyógyítására a Dél-Alföldön.

A *Centaurea* genus 300–350 fajt foglal magába, ezek közül 22 honos Magyarországon.²⁰¹ Bár a *Centaurea* nemzetség fajai közül számosat alkalmaztak gyógynövényként is, ezek nem tartoznak az európai népi gyógyászat fontosabb növényei közé. A hazai népi gyógyászatban leggyakrabban használt faj a *C. cyanus*, valószínűleg a széleskörű elterjedése miatt. Az imola fajokat leggyakrabban sebek, bőrgyógyászati betegségek, szempanaszok, nőgyógyászati problémák kezelésére használták, Erdélyben a *C. cyanus* tizelethajtó teaként,²⁰² szemgyulladás és fertőzések kezelésére alkalmazták.²⁰³ Számos hazai faj gyógyászati felhasználását egyáltalán nem dokumentálták.

A *Centaurea* nemzetség jellegzetes vegyületei a szeszkviterpén-laktonok. Elsősorban a gvajanolid- és germakranolid típusú vegyületek előfordulása a jellemző, de elemanolidok és eudezmanolidok előfordulásáról is beszámoltak. További, farmakológiai jelentős és jellegzetes összetevők az acetilének, a flavonoidok és egyéb fenolos komponensek.²⁰⁴ A hazánkban honos *Centaurea* fajok zömét kémiai és hatástanilag kevésbé vizsgálták. Számos *Centaurea* faj (pl. a *C. cyanus*,²⁰⁵ *C. hierapolitana*, *C. calolepis*, *C. cadmea*²⁰⁶ és a *C. chilensis*²⁰⁷ gyulladáscsökkentő hatását dokumentálták, azonban a hatás mechanizmusa és az ezért felelős vegyületek nem ismertek. Feltételezhető, hogy a hatásban szerepe van a növények poliszacharid-tartalmának, szeszkviterpén-laktonjainak és poliacetilénjeinek.^{208,209}

3.2. Toxikológiai szempontból potenciálisan kockázatos növényi termékek és tartalomanyagaik

A gyógynövények biztonságosságával kapcsolatos adatok nagyon gyakran kizárólag a népi orvoslás tapasztalataiból származnak. Az akutan mérgező, markáns mellékhatásokat okozó növények egy részét tapasztalati úton azonosították. A modern gyógyszerkincs részévé vált növények esetén kémiaiailag jó jellemzett kivonatokra is rendelkezésre állnak kísérletes és humán adatok, a hatóanyagként azonosított vegyületek egy részénél pedig a szintetikus gyógyszerhatóanyagokhoz hasonló mennyiségű ismeretanyag halmozódott fel.

A növények toxikológiai profiljának megrajzolása nem képzelhető el a kísérletes megközelítés nélkül. Bár a markáns, akut mérgezésben megnyilvánuló hatások tapasztalati úton is azonosíthatóak, a krónikus alkalmazás esetén károsító növények, anyagok felismerése ilyen módon szinte lehetetlen, ugyanis a toxikus hatás és a következmény között, az időbeni egybeesés hiányában az összefüggés nem ismerhető fel. Erre példa a fekete nadálytő (*Symphytum officinale*), amelyet úgy használtak évszázadokon keresztül kedvező tapasztalatokkal, hogy nem ismerték fel ma már evidens májkárosító hatását.

A közismert vagy elméleti alapon feltételezhető veszélyforrások mellett a (gyógy)növények esetén speciális csoportot jelentenek azok a fajok, amelyekkel kapcsolatban nem léteznek nagy populáción, hosszabb időn át nyert tapasztalatok a biztonságosságra vonatkozóan. Ilyen növény a parlagfű (*Ambrosia artemisiifolia*): jóllehet Európában mintegy 100 éve megtalálható, az utóbbi néhány évet leszámítva nem alkalmazták a népi gyógyászatban, ráadásul származási helyén, Észak-Amerikában sem tartozik a kurrens gyógynövények közé, amelyek biztonságossága a népi gyógyászati tapasztalatok alapján megítélhető lenne.

A gyógynövények, komplex összetételüknek tulajdoníthatóan, a tiszta vegyületeket tartalmazó gyógyszerekhez viszonyítva nehezebben felmérhető előnyöket és kockázatokat jelentenek a terápiában. Az összetétel változékonyságától eltekintve is rendkívül összetett vegyületkeverékekről van szó, amelyekben azonos hatású, egymás hatását befolyásoló vagy antagonizáló anyagok egyaránt megtalálhatóak lehetnek. Éppen ezért lényeges a gyógynövények (és gyakorlatban alkalmazott készítményeik) kémiai összetételének és a komponensek hatásának, egymással kialakított interakcióinak minél alaposabb feltárása.

A toxikus hatás minősége szempontjából a legkönnyebben az akut szív-érrendszeri vagy idegrendszeri hatású növényi anyagok azonosíthatóak. Szoros értelemben véve nem toxikus hatás, de az allergizáló potenciállal rendelkező növények, növényi anyagok is könnyen azonosíthatóak. Kevésbé evidens és kísérletes igazolást igényel a mutagén, genotoxikus hatások igazolása, de esetenként a nefro- és hepatotoxikus aktivitások is csak ilyen módon igazolhatóak. A

kava (*Piper methysticum*) kavapironjainak²¹⁰ és a sarlós gamandor (*Teucrium chamaedrys*) diterpénjeinek hepatotoxikus hatásai,²¹¹ valamint az *Aristolochia fangchi* arisztolochiasav-tartalmának nefrotoxikus aktivitása esetleírásokból vált evidenssé,²¹¹ míg az amerikai lázfa (*Sassafras albidum*) szafroltartalmából adódó (nefrotoxikus)²¹² és a fekete nadálytő alkaloidjainak alkaloidtartalmából (hepatotoxikus)²¹³ következő veszélyt közvetett módon ismerték fel.

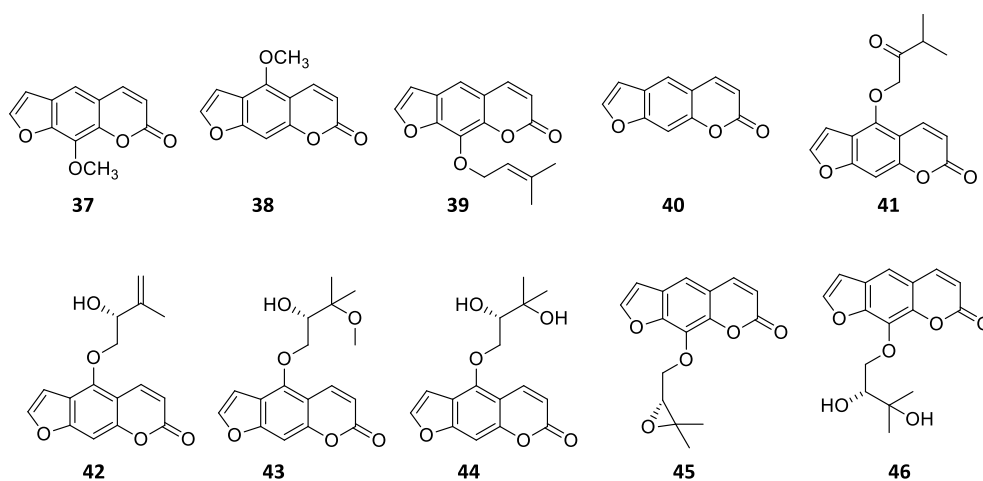
A toxikológiai vizsgálatok alapvető része a toxikus vegyületek azonosítása, kémiai jellemzése, kvantifikálása. A fitokémiai kutatásokon túl az experimentális farmakológia biztosít különböző szintű és relevanciájú adatokat. Gyakorlati szempontból a humán adatok a legjelentősebbek, azonban kis mennyiségben rendelkezésre álló és/vagy kevésbé vizsgált vegyületek esetén a humán vizsgálatok végzése nem reális. Az emlős állatfajokon végzendő vizsgálatok esetén a feltételek kevésbé szigorúak, azonban a vegyületek mennyisége ilyen esetekben is gyakran korlátozó tényező. A különböző sejtenyíratokon, valamint a célpontfehérjéken elvégzett *in vitro* vizsgálatok hasznos információkkal szolgálhatnak, azonban ezek humán relevanciája csekély. Az élő szervezeteken nyert információk, még ha egyszerűbb felépítésűek is, mint az emberi szervezetek, értékesebbek a toxikológiai jellemzés szempontjából. Ilyen célra gyakran alkalmazott modellfajok a *Drosophila melanogaster*, az *Artemia* sp. és a *Caenorhabditis elegans* nematóda, amely azonban filogenetikailag távol áll az emlősöktől. A Rotifera törzs fajai, a kerekesszékerek az említett fajokhoz hasonlóan könnyen tenyésztethetők, életműködéseik könnyen tanulmányozhatóak, ugyanakkor genetikai készletük 10%-a a gerincesekével homológ.²¹⁴ A kerekesszékerek olyan többsejtű, transzparens állatok, amelyeknek elkülönült szerveik és idegrendszerük van, képesek a taktilis és fényérzékelésre, széles tűrésűek a környezeti viszonyokra. Mindezek alapján a rotiferek kiválóan alkalmasak olyan toxikológiai vizsgálatok elvégzésére, amelyek során az állatok túléléséből, növekedéséből, szaporodásából és viselkedéséből vonhatóak le következtetések.²¹⁵

3.2.1. Élelmiszer- és gyógynövények furokumarintartalma

A furokumarinok a növényvilágban széles körben előforduló, feltehetőleg a kártevőkkel szembeni védelemben szerepet játszó vegyületek. Képviselőiket kimutatták a *Fabaceae*, *Pittosporaceae*, *Solanaceae*, *Amaranthaceae*, *Rosaceae*, *Cyperaceae* *Moraceae* családokban, de a humán alkalmazás szempontjából legjelentősebb, hogy relatíve nagy mennyiségben megtalálhatóak számos, élelmiszerként vagy gyógynövényként használt *Apiaceae* és *Rutaceae* fajban.²¹⁶ A zeller, pasztinák és petrezselyem különböző részeiben 10–100 µg/g mennyiségben mutathatóak ki, a citrusfélékben koncentrációjuk mintegy egy nagyságrenddel alacsonyabb.²¹⁷ Az *Apiaceae* család több képviselője gyógynövényként is használatos, több faj furokumarintartalmáról kvantitatív, másokról csak kvalitatív adatok állnak rendelkezésre. Az Európai Gyógyszerügynökség 2007-ben

publikált egy dokumentumot a furokumarinok toxikológiájáról az *A. archangelicáról* készülő közösségi gyógynövény-monográfia kapcsán.²¹⁸ A lehetséges problémák köre a fototoxicitás és a karcinogenitás köré csoportosítható. A furokumarinok UV-A sugárzás hatására kapcsolódnak a DNS-hez, kromoszómaaberrációt, testvérkromatid-kicserélődést és mutációt okoznak.²¹⁸ Akut bőrreakciót indukálnak, hosszabb távon a vegyületeknek való kitettség tartós pigmentációt és egyéb bőrelváltozásokat okozhat, valamint fokozzák a bőrdaganatok gyakoriságát.²¹⁹ A Nemzetközi Rákkutató Ügynökség állásfoglalása szerint a xantotoxin (**37**) UV fényexpozíció esetén humán karcinogén,²²⁰ a bergaptén (**38**) esetén az epidemiológiai adatok hiányoznak, ugyanakkor az állatkísérletek eredményei alapján a vegyületet a lehetséges karcinogének közé sorolták. A vegyületcsoport többi tagja esetén nincs megfelelő mennyiségű adat a kockázat meghatározásához, azonban a kémiai és bioaktivitásbeli hasonlóság alapján feltételezhető, hogy ezeknél is számolni kell kockázattal.

Figyelembe véve, hogy az élelmiszerek fogyasztásából adódó átlagos furokumarin-expozíció 1,5 mg, az Európai Gyógyszerügynökség az ennél nagyobb dózisú furokumarint tartalmazó növényi gyógyszereknél részletes kockázatelemzés elkészítését írja elő, 15 µg furokumarintartalom esetén azonban nem feltételezhető kockázat.²¹⁸ Bár a fentiek az *A. angelicára* vonatkoznak, egyéb furokumarintartalmú növények készítményei esetén is kiindulási alapul szolgálnak. A furokumarintartalommal kapcsolatos mennyiségi adatok gyakran használt gyógynövények esetén sem mindig állnak rendelkezésre. Ezek egyike az édeskömény (*Foeniculum vulgare*), amelyet gyermekek kezelésére is alkalmaznak. Az imperatorint (**39**), pszoralént (**40**) és bergaptén (**38**) jelenlétét preparatív növénykémiai vizsgálatok során igazolták a növény terméséből, kvantitatív adatok azonban nem állnak rendelkezésre, így az sem ismert, hogy a terápiás dózis furokumarintartalma jelent-e egészségi kockázatot.^{221–223}



A *Ducrosia* nemzetséget (Apiaceae) hat faj, a *Ducrosia ismaelis*, a *D. flabellifolia*, a *D. assadii*, a *D. areysiana*, a *D. inaccessa* és a *D. anethifolia* alkotja.^{224–226} A *D. anethifolia* a Közel-Keleten honos növény, amelynek föld feletti részét elterjedten alkalmazzák az iráni népi gyógyászatban fájdalom és álmatlanság, emésztési és menstruációval kapcsolatos panaszok kezelésére,^{227,228} valamint fűszerként.^{224,229} A növény fitokémiai profilja kevésbé ismert, és sokoldalú felhasználását tekintve hatóanyagainak megismerése a gyógyászatilag hasznos és kockázatot jelentő bioaktivitások szempontjából egyaránt célszerűnek tűnik, különös tekintettel arra, hogy a nemzetség más fajaival kapcsolatban is nagyon kevés ilyen jellegű adat áll rendelkezésre.

A növényből számos furokumarint [pszoralén (40), bergaptén (38), xantotoxin (37), imperatorin (39), izooxipeucedanin (41), pabulenol (42), oxipeucedanin-metanolát (43), oxipeucedanin-hidrát (44), heraklenin (45), heraklenol (46)] írtak le.^{227,230,231} A növény furokumarinprofiljának feltárása, a vegyületek azonosítása, izolálása és farmakológiai vizsgálata (az egyéb szekunder metabolitok mellett) azért fontos, mert ezek a vegyületek gyógyászatilag hasznosítható és humán egészségi kockázatot jelentő bioaktivitásokkal egyaránt jellemezhetőek. Egyes furokumarinok nemkívánatos fototoxikus és karcinogén hatásain túl daganatsejtellenes hatást is leírtak több vegyületről. A *D. anethifolia* kivonataival végzett kísérletek antidiabetikus,²²⁷ szorongásoldó^{232–234} fájdalomcsillapító²³⁵ hatásokat igazoltak. A növény vegyületei közül az imperatorin (39),²³⁶ a xantotoxin (37),²³⁷ az oxipeucedanin-hidrát (44)²³⁸ antiproliferatív hatású volt különböző sejtvonalakon, míg a heraklenin (45) apoptózist indukált daganatsejteken.²³⁹

3.2.2. A máriatövis, mint rézkoncentráló gyógynövény

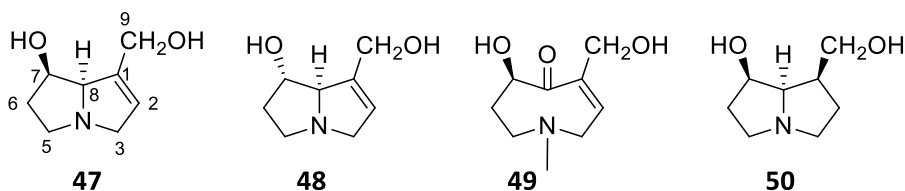
A májkárosodás speciális esete a rézfelhalmozódással függ össze. A Wilson-kór, más néven örökletes réztoxikózis a transzmembrán réztranszporter ATP-áz kódoló ATP7B gén mutációja miatt alakul ki, és a rézhomeosztázis zavara miatt fokozott rézakkumulációhoz vezet az agyban, a májban és más szövetekben, szervekben. A klinikai megjelenés és lefolyás főleg az agyi és májkárosodás mértékétől függ, de a progresszív, gyakran transzplantációhoz vezető májkárosodás a leggyakoribb jellemző. A kezelés alapja a fokozott cinkbevitel (amely különböző mechanizmusok révén mérsékeli a rézterhelést) és a rézkiürülést fokozó kelátképző vegyületekkel történő terápia.²⁴⁰ Kezeléstől függetlenül alapvetés, hogy a Wilson-kóros beteg rézbevitelét minden forrásból csökkenteni kell. A Wilson-kór hosszú távú kiegészítő kezelésében rutinszerűen alkalmaznak máriatövis-készítményeket, a növény termésében található flavonolignánkomplex, a szilimarín nem-specifikus májvédő (antioxidáns, gyulladáscsökkentő, antifibrotikus)²⁴¹ hatása miatt.

A máriatövis biztonságosságát számos klinikai vizsgálat és összefoglaló közlemény alátámasztja,²⁴² enyhe emésztési panaszokon és bőrkiütésen túl egyéb nemkívánatos hatást,

interakciót sem figyeltek meg, így még várandós nők kezelésében is alkalmazzák a belőle készült gyógyszereket. A máriatövis termése különböző feldolgozottsági fokú [egész vagy őrölt termés tea alkotórészeként, őrölt termés kapszulaként, termés kivonata, termés tisztított, dúsított, standardizált kivonata (szilimarin), termésből préselt olaj] formában kerül a betegekhez, s ezek minőségi és mennyiségi összetétele is igen eltérő. Wilson-kór esetén figyelmeztető az az irodalmi adat, miszerint a máriatövis a rézkoncentrááló növények közé tartozik, termése akár 17 µg rezet is tartalmazhat grammonként.²⁴³ A termékek réztartalma feldolgozottsági foktól függően változik, ugyanakkor nem ismert olyan vizsgálat, amelyben a feldolgozás réztartalomra kifejtett hatását és a terápiában alkalmazott termékek réztartalmát szisztematikusan vizsgálták volna.

3.2.3. Pirrolizidin-alkaloidok, mint potenciális májkárosító vegyületek

A növényvilág talán legismertebb és legtöbb gyakorlati problémát okozó hepatotoxinjai a pirrolizidin-alkaloidok. Ezek a vegyületek általában necinbázisok (aminoalkoholok) és necinsavak (alifás mono- vagy dikarbonsavak) mono-, di- vagy makrociklusos észtereként, tercier amin vagy *N*-oxid formájában fordulnak elő a természetben. A két öttagú gyűrűből felépülő, egy nitrogénatomot tartalmazó pirrolizidin alapváz gyakran telítetlen 1,2-helyzetben, ami fokozott toxicitással jár együtt. A monohidroxi-származékok C-9, a dihidroxi-származékok C-9 és C-7, a három hidroxilcsoportot tartalmazók pedig ezen kívül a C-2/C-6 helyzetben szubsztituáltak. A vegyületek a C-7 és/vagy C-9 helyzetben lehetnek észterezettek. A necinbázis alapján az alkaloidok a retronecin- (**47**), heliotridin- (**48**), otonecin- (**49**) és platinecin-típusú (**50**) vegyületek csoportjába sorolhatóak, ezek közül az utóbbiak, az alapváz telítettsége okán kevésbé toxikusak.²⁴⁴ A pirrolizidin-alkaloidok toxicitásának fő okát, a proteinadduktok képzését sok évtizede feltárták.²⁴⁵ Az adduktképzés legnagyobb mértékben a májsejtekben zajlik,²⁴⁶ de nagy érzékenységgű mérésekkel adduktokat a vérplazmából is ki lehet mutatni.²⁴⁷ Mindezen túl, a sejtmagba jutó alkaloidok DNS és DNS-protein keresztkötéseket is létrehozhatnak.²⁴⁶ A következmény, hosszabb távú bevitel esetén májkárosodás, veno-okkluzív betegség kialakulása és daganatrizikó növekedése.^{246,248}

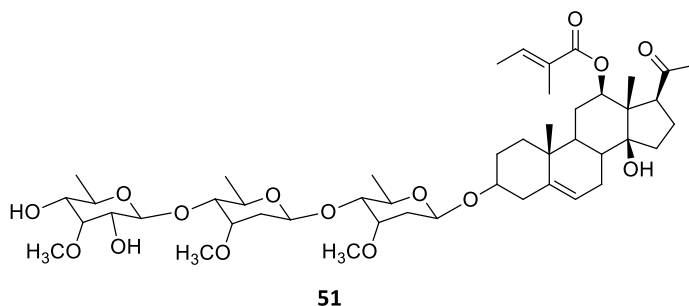


Ez idáig több száz pirrolizidin-alkaloidot azonosítottak mintegy 6000 növényfajban.²⁴⁹ A gyógyászatban is használt fajok zöme az Asteraceae, Boraginaceae és Fabaceae családokba tartozik, beleértve olyan, igen elterjedten használt növényeket is, mint a *Petasites hybridus*, a

Borago officinalis vagy a *Symphytum officinale*. A szabályozás szintjén a végtermékek pirrolizidinalkaloid-tartalmára (és az ilyen anyagokat tartalmazó készítmények alkalmazásának időtartamára) vannak előírások, kiemelten az iparilag legjelentősebb, 0,2–0,4% pirrolizidinalkaloidot tartalmazó fekete nadálytőre.²⁵⁰ A legkorábbi, és azóta európai szinten kiindulási alapnak tekintett német szabályozás szerint külsőleges, bőrön történő alkalmazás esetén a napi dózis pirrolizidinalkaloid-tartalma nem haladhatja meg a 100 µg-t, belsőlegesen alkalmazandó termékekénél a maximális dózis 1 µg lehet.²⁵¹ Kísérletes adatokon alapuló kockázatelemzéssel az 1,2 helyzetben telítetlen alkaloidok orálisan maximálisan alkalmazható dózisait az Európai Gyógyszerügynökség napi 0,007 µg/testtömegkilogrammban limitálta. Mivel a humán bőrön való felszívódás mértékére nem állnak rendelkezésre adatok (csak egy 1982-es, patkányokon végzett kísérlet²⁵²), a maximális biztonságosság elvét szem előtt tartva külsőleges alkalmazás esetén ugyanezt a határértéket határozták meg.²⁵³

3.2.4. A *Hoodia gordonii* – fogyasztó hatással társuló kockázatok

A *Hoodia gordonii* (Masson) Sweet ex Decne. (Apocynaceae) a dél-afrikai busmanok által hagyományosan étvágycsökkentésre használt szukkulens növény.²⁵⁴ Feltételezett hatóanyaga egy oxipregnán-glikozid, a P57 (**51**), amelynek hatásmechanizmusa még ismeretlen. Ugyan intracerebroventrikuláris bevitel esetén növelte az ATP-termelést a hipotalamuszban,²⁵⁵ ennek relevanciája erősen vitatható, mert egy másik kísérletben orális adagolás esetén a vegyület nem volt kimutatható az agyban.²⁵⁶ Egy másik elképzelés szerint a P57 hatását a keserű íz érzékeléséért felelős receptorokon keresztül, a kolecsiztokinin termelésének növelésével fejt ki.²⁵⁷



A *H. gordonii* a P57-en kívül más pregnán-glikozidokat^{258–260} és kalogenin-glikozidokat is tartalmaz^{258,261} kisebb mennyiségben, de részben fő komponens volta miatt, részben pedig szabadalmi okokból hosszú ideig a P57-re irányult a legtöbb figyelem. A legintenzívebben étvágycsökkentő hatását kutatták, tekintve, hogy ez alapja lehet a fogyasztószerként való alkalmazásnak. Mivel a hatás mechanizmusa nem tisztázott, előfordulhat, hogy a széles körű alkalmazásnál olyan szív-érrendszeri mellékhatásokra derül fény, amelyek számos, korábban fogyást támogató gyógyszerként forgalomban lévő hatóanyag forgalomból való kivonásához vezettek. Az étvágycsökkentő hatást különböző állatfajokon igazolták,^{262,263} a publikusan elérhető humán bizonyítékok hiányoznak. Két, túlsúlyos nők részvételével végzett, rövid távú (14 és 15 nap) humán vizsgálat nem talált összefüggést a *H. gordonii* fogyasztása és az energiabevitel, illetve a

testsúlyváltozás között,^{264,265} az egyik vizsgálatban azonban nemkívánatos hatásként vérnyomás- és pulzusszámemelkedést regisztráltak (kialakulásának mechanizmusa nem ismert).²⁶⁵ A hatásosságot és a biztonságosságot egyértelműen igazoló bizonyítékok hiányától függetlenül a *H. gordonii* világszerte népszerű fogyasztószer alapanyaga. Figyelembe véve, hogy ezen riasztó mellékhatások számos szimpatomimetikus szintetikus fogyasztószerre jellemzőek, és hogy a *Hoodia* fajok kémiai összetétele nem teljesen feltérképezett, lehetséges, hogy nem (csak) az oxipregnán-glikozidok felelősek a közölt mellékhatásokért, illetve a *H. gordonii* étvágycsökkentő hatásaért.

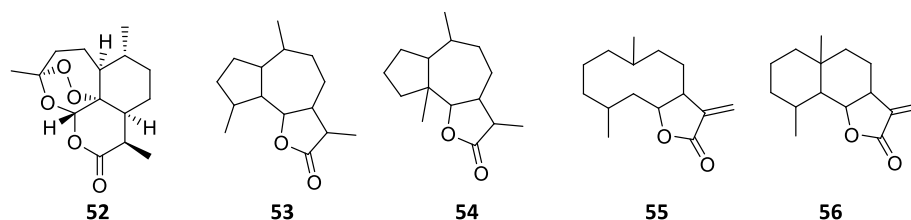
3.2.5. A parlagfű, mint ismeretlen kockázatforrás

Az ürömlevelű parlagfű (*Ambrosia artemisiifolia*) az egyik legismertebb, nagy allergizáló potenciálú növény. Ezt a tulajdonságát már a 20. század elején leírták,²⁶⁶ de a légúti tünetek kialakulásában szerepet játszó immunválaszt csak évtizedekkel később tárták fel részleteiben. A túlérzékenységi reakció kialakulásáért a pollen immunglobulin E-kötő képességgel rendelkező peptidjei (*Amb a 1* és *Amb a 2* endopeptidázok) a felelősek.²⁶⁷ Amennyiben a pollen a túlérzékeny egyének légutába jut, allergiás rinitisz alakul ki. A növény érintése kontakt dermatitist indukálhat, de ez a reakció nem a pollen fehérjéivel, hanem az Asteraceae családra jellemző szeszkviterpén-laktonokkal függ össze,²⁶⁸ és az immunreakció is eltér az allergiás rinitisz esetén kialakulótól.

A parlagfű őshazája Észak-Amerika, Európába feltehetőleg az 1860-as években jutott el vetőmag-szennyezésként.²⁶⁹ Napjainkban Európában Magyarországon, a délszláv államokban, Franciaországban, Németországban, Svájcban és Oroszországban a legelterjedtebb, népegészségügyi szempontból feltehetőleg hazánkban okoz legnagyobb arányú problémát az ország rendkívüli mértékű fertőzöttsége okán. A parlagfű világszerte a leginvazívabb növényfajok közé tartozik ökológiai és genetikai jellemzői miatt, terjedésének ütemét a globális felmelegedés is gyorsítja.²⁷⁰

Jóllehet a parlagfű népi gyógyászati alkalmazásáról az észak-amerikai bennszülöttek körében vannak szórványos adatok, ezek jellemzően néprajzi fókuszúak, a gyógyászati szempontok bemutatása nélkül. A szakirodalmi bizonyítékok nem támasztják alá a parlagfű széles körű felhasználását.²⁷¹ A növény elfogyasztásával járó kockázatok nem ismertek sem kísérletes, sem tapasztalati adatok alapján. Megjegyzendő, hogy a növény pollenjének allergénekre standardizált kivonata néhány éve forgalomban van gyógyszerként a parlagfűallergia orális kezelésére (deszenzibilizálás),²⁷² azonban a növény egyéb vegyületei fogyasztásának kockázatáról kevés információ áll rendelkezésre. A parlagfűvel kapcsolatos farmakológiai vizsgálatok a növény kivonataira és tiszta vegyületeire irányulnak. Ezek közül a fajra legjellemzőbbek és farmakológiai-toxikológiai szempontból is legjelentősebbek a szeszkviterpén-laktonok, amelyek vegyületcsoport

antimikrobás és gyulladáscsökkentő hatásai közismertek.^{273–275} A szeszkviterpén-laktonok egyik legmarkánsabb hatása az antiproliferatív aktivitás, ami az eredetileg maláriaellenes hatású artemizinin (**52**) származékai jelenleg is folyó klinikai vizsgálatainak fókuszában áll.²⁷⁶ A növényből izolált mintegy 30 szeszkviterpén-lakton gvajanolid- (**53**), pszeudogvajanolid- (**54**), germakranolid- (**55**) és eudezmanolidvázas (**56**) vegyület, amelyek közül számos antiproliferatív vagy citotoxikus hatást mutatott különböző daganatsejteken.^{277–279}



Az antiproliferatív és daganatellenes hatás összefügg a α,β -telítetlen kötéssel rendelkező γ -lakton szerkezettel, és bár pontos mechanizmusa nem ismert, a sejtciklus megállítása a G2/M döntési pontnál és az NF- κ B gátlása²⁸⁰ bizonyosan fontos elemei a hatásnak. A parlagfű szeszkviterpén-laktonjainak citotoxikus hatását nem vizsgálták átfogóan egészséges human sejteken. Amennyiben ilyen sejteken is kialakul a citotoxikus hatás, az szövet- és szervkárosodással is járhat.

3.2.6. Növényi alapú termékek minőségvizsgálata

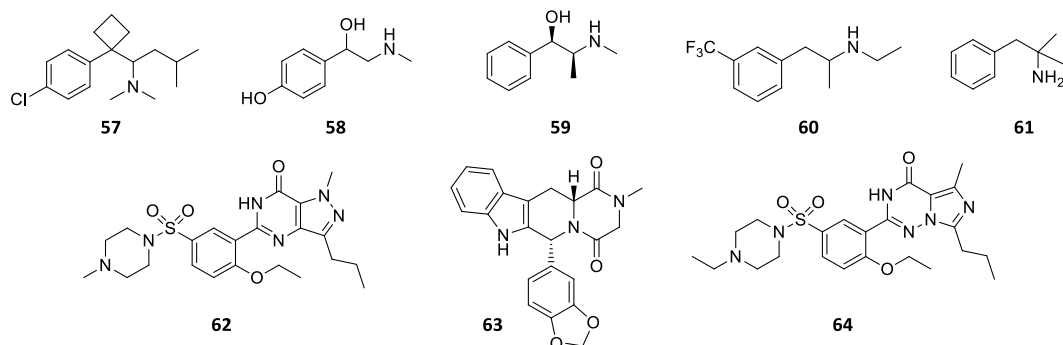
Hazánkban a növényi alapú, belsőlegesen alkalmazható készítmények több termék kategóriában kerülhetnek forgalomba. A készítmények értékét leginkább meghatározó jellemzők (minőség, hatásosság, biztonságosság) szempontjából a termékpiramis csúcsán a gyógyszerek vannak. Ezen belül speciális kategóriát képeznek a homeopátiás szerek, amelyek jogilag ugyan gyógyszerek, de a hatásosságot tekintve külön elbírálásban részesülnek az engedélyezési folyamatban, a termékminőség vizsgálata pedig speciális megközelítést igényel. Paradox módon a legtöbb gyógynövénykészítmény olyan termékcsoporthoz (étrend-kiegészítőként) kerül forgalomba, amely összetevőinek gyógyhatás nem tulajdonítható, s amely szabályozatlansága miatt az utóbbi években a legtöbbször volt forrása minőségi kifogásoknak.

Az étrend-kiegészítők, bár csomagolásukat és készítményformáikat tekintve a gyógyszerekhez hasonlítanak, jogilag az élelmiszerek közé tartoznak. Ezek a termékek gyógyászati céllal nem ajánlhatók, ami ellentétben áll a fogyasztói várakozásokkal (amit az is erősít, hogy összetevőik egy része gyógyszerként is forgalomban van). Az étrend-kiegészítőben felhasználható növényi anyagok felhasználását minőségileg és mennyiségileg sem szabályozza joganyag.²⁸¹ Ugyan létezik egy lista az étrend-kiegészítőben felhasználni nem ajánlott, egészségi kockázatot jelentő növényekről, ennek figyelembe vétele azonban jogilag nem kötelező.²⁸² A termékek piacra kerülését nem előzi meg engedélyezési folyamat, mindössze a fogalmazás tényét kell bejelenteni

a hatóságnak.²⁸¹ A termékek száma 2020 elején meghaladta a 23 000-et, és tekintettel arra is, hogy a forgalmazás részben nehezen ellenőrizhető csatornákon (pl. internet) zajlik, a készítmények rutinszerű és arányos minőségellenőrzése komoly kihívást jelent.

Mindez nem hazai sajátosság. Az USA-ban 1994-ben elfogadott Dietary Supplement Health and Education Act²⁸³ már magában foglalta az engedélyeztetés nélküli forgalomba hozatalból adódó veszélyeket, ami az Európai Unió, a tagállamokra kötelező szabályozásban is megjelent.²⁸⁴ Az ebből következő minőségi problémák mennyiségi (a deklaráltnál alacsonyabb/magasabb egyes összetevők mennyisége) és minőségi jellegűek (feltüntetett anyag hiánya/fel nem tüntetett anyag jelenléte) lehetnek. A legnagyobb veszélyt az utóbbi eshetőség jelenti, ami tulajdonképpen termékhamisításnak tekinthető: a hatás befolyásolására a csomagoláson fel nem tüntetett anyagot tartalmaz a készítmény. A hamisított növényi eredetű készítményekről már az 1990-es évek végén megjelentek a szakirodalomban. A kezdeti közlések elsősorban Ázsiából származó, a helyi piacon forgalmazott „hagyományos gyógynövénykészítményekről” szóltak. Egy 1997-es cikk szerint 2609, tajvani klinikákon begyűjtött kínai növényi készítmény 23,7%-ából mutattak ki a termék alkalmazási céljával összhangban lévő, de a csomagoláson nem deklarált szintetikus hatóanyagot.²⁸⁵ A hamisított termékek a kereskedelem globalizálódásával a világ bármely pontján megjelenhetnek, s tekintettel arra, hogy a hazánkban (és az EU-ban) forgalmazott étrend-kiegészítők jelentős része is távol-keleti eredetű, az ebből fakadó kockázat reális. Ezt támasztja alá az a nemrég publikált cikk, amely szerint francia kutatók 20 növényi étrend-kiegészítőből 16-ban mutattak ki a csomagoláson fel nem tüntetett szibutramint **(57)** vagy szinefrint **(58)**.²⁸⁶

A szakirodalomban megjelent cikkek alapján ma már elég jól körvonalazhatók a hamisítástól leginkább érintett termékcsoportok és a hamisításra felhasznált anyagok köre. A leggyakoribb, legjellegzetesebb példák a teljesítményfokozók, izomtömeg-növelők anabolikus szteroidokkal, efedrinnel **(59)**, koffeinnel **(31)**,^{287,288} fogyasztószerek pajzsmirigykivonattal, fenfluraminnal **(60)**, fenterminnel **(61)**, szibutraminnal **(57)** vagy származékaival, szinefrinnel **(57)**, történő szennyezése.^{286,289–293} A legtöbb hamisítási esetet a potenciafokozóként használt termékekkel kapcsolatban jelentették. A legkorábbi cikkek az ezredforduló táján jelentek meg, nem sokkal az első foszfodiészteráz-gátló, a szildenafil **(62)** 1998-as piacra kerülése után.²⁹⁴ Egy 2004-es amerikai közlemény szerint 40 vizsgált potenciafokozó étrend-kiegészítő fele tartalmazott szildenafil **(62)**, tadalafil **(63)** vagy vardenafil **(64)**. A vegyületek mennyisége számos esetben elérte, sőt meg is haladta a hatóanyagok terápiás dózisát.²⁹⁵ Egy holland vizsgálatba bevont 17 étrend-kiegészítőből 8 volt szennyezett különböző szintetikus foszfodiészteráz-gátlókkal.²⁹⁶ Eddig több, mint 80 foszfodiészteráz-gátló hatással rendelkező szintetikus analógot azonosítottak különböző étrend-kiegészítőkből, amelyek közül mindössze néhány olyan molekula van, amelynek hatásait ellenőrzött körülmények között tanulmányozták.²⁹⁴



Az analógok előállítását részben a hamisítási eseteket feltáró laboratóriumok dolgának megnehezítése ösztönzi – valószínűleg ugyanezen okból tűnt fel újra étrend-kiegészítőben a fogyasztó hatású, de gyógyszerként már az 1930-as években betiltott 2,4-dinitrofenol.²⁹⁴ A hamisítási esetekkel társuló kockázatot sokszor az szakemberek is alábecsülik. Ennek fő oka, hogy megfelelő mellékhatásfigyelő rendszerek híján az egészségkárosodási esetek zöme rejtve marad. A halálos áldozatokat követelő eseteken (pl. hepatotoxikus gyulladáscsökkentőt tartalmazó kurkumatermék)²⁹⁴ kívül a hamisítási ügyek nem kapnak igazán nagy visszhangot.

A fejlett országokban nagy igény van a testsúlycsökkenést támogató készítményekre, azonban a gyógyszerek körében nagyon kevés hatóanyag van forgalomban. Jóllehet az A08AA ATC csoport (központi módon ható elhízásellenes szerek) több mint 10 hatóanyagot tartalmaz,²⁹⁷ ezek nagy részét kivonták a forgalomból jellemzően szív-érrendszeri mellékhatásaikból fakadó kedvezőtlen haszon/kockázat hányadosuk miatt.²⁹⁸ Európában az egyik legutolsóként kivont hatóanyag a szibutramin (**57**) volt, amely először az USA piacáról tűnt el, mivel klinikai vizsgálatok fokozott sztrók- és szívroham-kockázattal hozták összefüggésbe alkalmazását, majd ezt követően, 2010-től az EU-ban is megtiltották forgalmazását gyógyszerként.²⁹⁹ A gyógyszerként való betiltással párhuzamosan a vegyület egyre nagyobb arányban jelent meg étrend-kiegészítő és illegálisan forgalmazott szerek (általában nem deklarált) összetevőjeként. Egy vizsgálat szerint, amelyben 105 „növényi” étrend-kiegészítőből 35-öt azonosítottak hamisítottként, a leggyakrabban kimutatott szintetikus vegyület a szibutramin (**57**) volt.³⁰⁰

A nem megfelelő szabályozásból adódó minőségi problémák feltárása a rutin analitikai feladatokon túlmutató problémákat vet fel. A hamisításra felhasznált anyagok változó körének nyomon követése, a megfigyelt mellékhatásokból következtetések levonása, a növényi kivonatok mátrixából való kvalitatív/kvantitatív kimutatás egyaránt speciális megközelítést igényel.

A növényi kivonatokat is tartalmazó termékek másik vitatott csoportja a homeopátiás szereké. A homeopátiás készítményekkel kapcsolatos szakmai vita általában a hatásossággal kapcsolatos. Ennek oka, hogy bár alig léteznek modern, megfelelően tervezett klinikai vizsgálatok homeopátiás szerekkel, jogilag mégis gyógyszernek minősülnek a (mérhető mennyiségű

hatóanyagot általában nem tartalmazó) készítmények. A termékminőséggel és biztonságossággal kapcsolatos polémia épp ezért kevésbé intenzív: a hazánkban forgalomban lévő homeopátiás szerek több mint 95%-a (az egyszerűsített eljárással forgalomba helyezett, gyógyászati indikációval nem rendelkező termékek) jogi előírás szerint legalább 10 000-szeres hígításban tartalmazza a kiindulási alapanyagot.³⁰¹ A gyógyszerek forgalmazására vonatkozó általános szabályokat kell alkalmazni azokra a homeopátiás gyógyszerekre, amelyeket terápiás javallattal hoznak forgalomba (azaz elvileg igazolni kell a hatásosságot)³⁰² – ezeknél azonban már nincs előírás a hígítás fokával kapcsolatban, mindössze az az elvárás, hogy a homeopátia szabályai szerint történjen a gyártás. Gyógynövények esetén előfordulhat, hogy a növény őstinktúráját (homeopátiás előírások szerint készülő, de valójában nyers növényi kivonatot) hígítatlan formában tartalmazza egy homeopátiás gyógyszer. A homeopátiás őstinktúrák hatóanyagainak kimutatásával több cikk foglalkozott,^{303,304} ezeknek a vizsgálatoknak a gyakorlati relevanciája kevésbé feltárt és ismert.

3.3. Növényi készítmények klinikai hatásosságának elemzése

A növényi eredetű készítmények hatásosságának és biztonságosságának igazolása a gyógyszerekével azonos módon történik, amennyiben a klasszikus értelemben vett gyógyszer kategóriában történik az engedélyeztetés. A preklinikai (*in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*) vizsgálatokon túl megfelelően tervezett, és pozitív hatást és relatív biztonságosságot igazoló humán vizsgálat szükséges az engedély kiadásához. A tradicionálisan alkalmazott gyógynövények esetén a klinikai vizsgálatok eredményeit kiegészítik az alkalmazás tapasztalatai, azonban ezek nem helyettesíthetik a vizsgálati adatokat az engedélyezési eljárásban. Egyetlen gyógyszercsoport esetén, a hagyományos növényi gyógyszerek esetén azonban elegendőek az empirikus adatok (legalább 30 éves időtartamon keresztüli gyógyászati használat, ebből legalább 15 év az Európai Gazdasági Térség területén).³⁰¹

A klinikai vizsgálatok számának növekedésével egyre nagyobb nehézséget jelent az adatmennyiség feldolgozása és integrálása a napi gyakorlatba. Ezt megkönnyítendő készülnek áttekintő közlemények és szakmai ajánlások, azonban ezek módszertana nem minden esetben felel meg a tudományosan elvártnak. Ha az áttekintés deklaráltan szisztematikus, akkor a feldolgozott irodalom szűréséből adódó torzítás kisebb. A szisztematikus áttekintések a szakirodalomból nyert információk kritikus elemzései, tudományos módszerekkel történő szintézisei, amelyek minőségileg új, megbízhatóbb eredményeket biztosítanak.³⁰⁵ Ennél magasabb bizonyítottsági szintet képvisel, amikor a jó minőségű (randomizált, kontrollált tanulmányok eredményei) evidenciák matematikai módszerrel történő összegzése, metaanalízise alapján vonnak le következtetéseket. A bizonyítékokon alapuló orvoslásban jelenleg a metaanalíziseket tekintik a legmagasabb szintű bizonyítéknak a hatásossággal és biztonságossággal kapcsolatban. Nem ritka, hogy egy gyógyszerhatóanyag sikeres klinikai vizsgálat(ok) eredményeként gyógyszerként forgalomba kerül, de a vizsgálatok egyesített eredményeinek metaanalitikus újraelemzése negatív következtetéseket eredményez. Arra is van példa, amikor a korábban alábecsült klinikai hatásra mutatnak rá metaanalízisek (így derült fény a trombolízis jelentőségére akut miokardiális infarktus esetén).³⁰⁵

Az elmúlt évtizedekben jelentős számban jelentek meg gyógyszerek hatásosságát és biztonságosságát elemző metaanalízisek, s ezek ma már alapvető fontosságúak a terápiás irányelvek készítésénél. A növényi eredetű termékekkel kapcsolatos metaanalízisek száma relatíve alacsony, ami a viszonylag kevés klinikai vizsgálatból magyarázható. A növényi termékeket érintő metaanalízisek zöme negatív következtetéseket fogalmaz meg a hatásosságot illetően, olyan növények esetén is, amelyek gyógyszerként vannak forgalomban. Ez önmagában nem kifogásolható, az azonban igen, hogy az eredményeket sokszor torzítja az, hogy a metaanalízisek

készítői nincsenek tekintettel a növényi készítmények sajátosságaira. Nem elég ugyanis, ha ugyanazt a fajt tanulmányozták a klinikai vizsgálatokban, az eredmények matematikai-statisztikai módszerekkel történő egyesítésének az is feltétele lenne, hogy az eredmények ugyanazon növényi rész ugyanolyan (vagy nagyon hasonló) módon készített és/vagy kémiaileg hasonló összetételű kivonatának vizsgálataiból származzanak. Míg ugyanis egy tiszta vegyület adott dózisa esetén tehető kijelentés a klinikai hatásosságra, ugyanez nem tehető meg egy növénynél, általánosító módon. Ahogyan a (növényi) gyógyszerengedélyezés során is egy konkrét kivonattal kapcsolatos bizonyítékokat vesznek figyelembe, úgy a metaanalíziseknél is így kellene eljárni. Az eltérő kivonatok különböző dózisaival nyert eredmények egybevonása nem eredményezhet a növényfajra általánosító következtetéseket, jóllehet erre számos példa van a szakirodalomban, például a páfrányfenyő (*Ginkgo biloba*) esetén, ahol standardizált kivonatok eredményeit vonták össze ismeretlen összetételű termékekével.³⁰⁶

4. Anyagok és módszerek

4.1. Preparatív fitokémiai vizsgálatok

ECD: JASCO J-810 spektropolariméter

HPLC I: Young-Lin 9100 HPLC rendszer (Young-Lin, Korea), UV detektor, oszloptermosztát és on-line gáztalanító, Autochro-3000 szoftver

HPLC II: Waters 600 HPLC rendszer (Waters Corporation, USA), UV detektor, on-line gáztalanító, oszloptermosztát, Empower Pro szoftver

CPC: Armen SCPC klészülék (Armen Instrument Sas, Franciaország) grádiens pumpa, 250 ml-s oszlop, UV detektor, automata frakciószedő, Armen Glider szoftver

HRMS: FTHRMS-Orbitrap (Thermo-Finnigan) tömegspektrométer, ESI ionforrás, pozitív ionizációs mód

MPLC: Büchi készülék (Büchi Labortechnik AG, Svájc)

NMR: Bruker Avance DRX 500 spektrométer, 500 MHz (^1H) és 125 MHz (^{13}C); Bruker Avance NEO 700 spektrométer, 700,25 MHz (^1H) és 176,08 MHz (^{13}C), Bruker TopSpin 4.0.5 és MestReNova v6.0.2e-5475 szoftver

RPC: Chromatotron 8924 készülék (Harrison Research, USA)

Megjegyzés: az eluensek esetén mindig térfogatarányok vannak feltüntetve.

4.1.1. *Aconitum* sp.

Aconitum anthora L.: teljes növény, Füzéri várhegy és Tar-kő, 2002 szeptember.

Aconitum napellus subsp. *firmum* (Reichenb.) Gáyer: gyökér és gumó, Retyezát (Románia), 2007 augusztus.

Aconitum toxicum Rchb.: gyökér, Maroshévíz (Románia), 2002 augusztus.

Aconitum moldavicum Hacq.: gyökér, Eger, 2006 október.

CC: poliamid (ICN polyamide for column chromatography), víz–metanol grádiens; alumínium-oxid (Al_2O_3 neutral, Brockmann I, Reanal), ciklohexán–kloroform–metanol, *n*-hexán–etil-acetát–metanol és ciklohexán–etil-acetát–metanol grádiens

RPC: 2 mm szilikagél (Kieselgel 60 GF₂₅₄, Merck) réteg, *n*-hexán–diklór-metán–metanol grádiens, toluol–aceton–etanol–cc. ammónia grádiens, ciklohexán–toluol–etil-acetát–metanol és ciklohexán–etil-acetát–etanol–metanol grádiens; alumínium-oxid (Al_2O_3 G Type E, Merck) réteg, ciklohexán–etil-acetát–etanol grádiens

VLC: alumínium-oxid (Al_2O_3 G Type E, Merck), *n*-hexán–etil-acetát–metanol és ciklohexán–kloroform–metanol grádiens

PLC: 20×20 cm szilikagél 60 F₂₅₄ (Merck), diklór-metán–metanol 1:1, toluol–aceton–etanol–cc. NH_3 80:20:7:3 és 70:50:16:4,5; 20×20 cm alumínium-oxid (Merck), ciklohexán–kloroform–metanol 50:30:1, toluol–aceton–etanol–cc. ammónia 40:40:10:3

GFC: Sephadex LH-20 (Pharmacia), metanol, aceton, kloroform–metanol 1:1, diklór-metán–metanol 1:1

4.1.2. *Heliopsis helianthoides* var. *scabra*

Heliopsis helianthoides var. *scabra* (Dunal) Fernald 'Asahi': gyökér, Hegede Kertészet, Kecskemét, 2009 szeptember.

VLC: szilikagél (SiO_2 60 GF₂₅₄, 15 μm , Merck), *n*-hexán–etil-acetát grádiens és RP szilikagél (LiChroprep RP-C₁₈, 40–63 μm , Merck), metanol–víz grádiens

MPLC: 40 × 75 mm (40–63 μm) RP18ec oszlop (Büchi), *n*-hexán–etil-acetát grádiens

PLC: 20×20 cm szilikagél 60 F₂₅₄ (0,25 mm, Merck), benzol–diklór-metán–dietil-éter 6:3:1; *n*-hexán–dietil-éter 6:4

RPC: szilikagél (60 GF₂₅₄, Merck), benzol–diklór-metán–dietil-éter, *n*-hexán–etil-acetát, benzol–aceton, *n*-hexán–aceton grádiensek

HPLC: HPLC II, Merck LiChroCART RP C₁₈ (250 × 4 mm, 5 μm , 100 Å), 25 °C, 210 nm, 1 ml/min, acetonitril–H₂O, 8:2 és Merck LiChrospher Si 60 (250 × 4 mm, 5 μm), 25 °C, 210 nm, 1 ml/min, *n*-hexán–etil-acetát 8:2

4.1.3. *Lepidium meyenii*

A Lepidium meyenii Walp szárított hipokotil őrlménye perui eredetű, kereskedelmi tétel [Raw Organic Maca Powder, EverTrust Ltd (sarzs: M-010177-11-220312)]

CPC 1: *n*-hexán–EtOAc–MeOH–H₂O 9:1:9:1, aszcendens mód

CPC 2: acetonitril–*n*-hexán, 1:1, deszcendens mód

HPLC 1: HPLC I, YMC-Pack ODS-A (250 × 4,6 mm, 5 μm , 120 Å), 30 °C, 210 nm, 1 ml/min, acetonitril–H₂O, 9:1

HPLC 2: HPLC II, Merck LiChroCART RP C₁₈ (250 × 4 mm, 5 μm , 100 Å), 25 °C, 210 nm, 1 ml/min, acetonitril–H₂O, 95:5

4.1.4. *Paraleucobryum longifolium*

Paraleucobryum longifolium (Ehrh. ex Hedw.) Loeske: Mátrafüred, 2016 június.

CC: poliamid (ICN polyamide for column chromatography), víz–metanol grádiens, szilikagél (SiO₂ 60 F₂₅₄, 45–63 µm, Merck), toluol–kloroform–metanol 4:12:3

VLC: szilikagél (SiO₂ 60 F₂₅₄, 45–63 µm, Merck), ciklohexán–kloroform–metanol és kloroform–metanol grádiens és RP SiO₂ (LiChroprep RP-C₁₈, 40–63 µm, Merck), metanol–víz grádiens

MPLC: 40 × 75 mm (40–63 µm), RP18ec oszlop (Büchi), víz–metanol grádiens

GFC: Sephadex LH-20 (Pharmacia), metanol

HPLC: HPLC II, Phenomenex Kinetex 5 µm XB-C18 (250 × 4,6 mm, 100 Å), 24 °C, 190–800 nm, 1–1,5 ml/min, víz–acetonitril grádiens és Phenomenex Kinetex 5 µm C-18 (150 × 4,6 mm, 100 Å), 24 °C, 190–800 nm, 1 ml/min, víz–izopropanol grádiens

4.1.5. *Ducrosia anethifolia*

Ducrosia anethifolia (DC.) Boiss: föld feletti rész, Irán (Fars, Neyriz), 2016 április.

CC: szilikagél (Molar 60, 0,063–0,2 mm), kloroform–metanol grádiens

MPLC: szilikagél (40 × 200 mm Merck 60, 0,045–0,063 mm), *n*-hexán–diklór-metán–metanol grádiens

GFC: Sephadex LH-20 (Pharmacia), metanol

PLC: 20 × 20 cm szilikagél 60 F₂₅₄ (Merck), toluol–etil-acetát 1:1, *n*-hexán–kloroform–metanol 5:5:1, ciklohexán–etil-acetát–metanol 4,75:4,75:0,5; 20 × 20 cm szilikagél 60 RP-18 F₂₅₄ (Merck), metanol–víz 1:1

RPC: szilikagél állófázis (60 GF₂₅₄, Merck), *n*-hexán–etil-acetát–metanol 10:3:1, toluol–etil-acetát grádiens, ciklohexán–etil-acetát–metanol grádiens, toluol–aceton–metanol grádiens

HPLC: HPLC II, Phenomenex Kinetex 5 µm C-18 (150 × 4,6 mm, 100Å), 24 °C, 190–800 nm, 1,2 ml/min, víz–metanol grádiens

4.2. Kvalitatív és kvantitatív fitoanalitikai vizsgálatok

HPLC III: Waters 600 HPLC rendszer: 2998 PDA detektor, on-line gáztalanító, oszloptermosztát és automata mintaadagoló, Empower Pro szoftver

HPLC IV: Shimadzu LC-20AD HPLC rendszer: SPD-M20A PDA detektor, CBM-20A kontroller, SIL-20AHT automata mintaadagoló, DGU-20A5R gáztalanító, CTO-20AC oszloptermosztát, LabSolutions szoftver

HPLC V: Thermo Finnigan Surveyor HPLC rendszer: UV-VIS Plus detektor, SRVYR-LPUMP, pumpa, SRVYR-AS automata mintaadagoló, on-line gáztalanító, oszloptermosztát, XCalibur szoftver

4.2.1. Aconitum drogok lipokaloid-tartalmának vizsgálata

HPLC-MS: HPLC V, Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8 (4,6 mm × 150 mm, 5 µm), 25 °C, 233 nm, 1 ml/min, 0 min: 10 mM ammónium-acetát puffer (pH 8,9) (A) és metanol (B) 6:4, 35 min: 5% A, 36 min: 5% A, 42 min: 60% A, 45 min: 60% A; a HPLC-vel kapcsolt LCQ™ Deca XP^{PLUS} MS, APCI pozitív mód

4.2.2. Aconitum drogok diterpénalkaloid-tartalmának kvalitatív vizsgálata

HPLC: HPLC III, Phenomenex Gemini (100 mm × 4,6 mm, 5 µm); 25 °C, 233 nm, 1 ml/min; 0 min: 70% 10 mM vizes NH₄HCO₃ puffer (pH 10) és acetonitril (B), 4 min: 60% A, 20 min: 55% A, 30 min: 20% A, 35 min: 70% A

Alkaloidtartalom meghatározása titrálással: a Német Homeopátiás Gyógyszerkönyv módszere szerint.³⁰⁷

4.2.3. Rhodiola rosea markervegyületeinek vizsgálata

Növényi nyersanyag: A kísérletekhez használt *Rhodiola rosea* L. minták egy része a következő helyekről beszerzett szaporítóanyagból Dél-Angliában (Reading, 61 m tengerszint feletti magasság) termesztett növényektől származtak: Izland (R2: 50 m tengerszint fölötti magasság), Feröer szigetek (R7: 30 m), Egyesült Királyság (R3, R9: 10–25 m), Finnország (R5: 140 m), Ausztria (R10: 1750 m), Svájc (R1: 1500 m), Spanyolország (R4: 2600 m), Franciaország (R8, 1800 m). A validáláshoz kereskedelmi mintákat használtunk. A többi minta a következő helyekről beszerzett szaporítóanyagból Ausztriában (Wölzer Tauern, 1580 m tengerszint feletti magasság) termesztett növényektől származott: Izland (p01: 50 m tengerszint fölötti magasság), Shetland (p02: 10 m), Spanyolország (p03: 2600 m), Oroszország (p04, p07, p08: nem ismert, p09: 30 m, p12: 2400–2500 m, p17: 2800 m, p18: 2500 m – ez utóbbi egy pontosan nem azonosított *Rhodiola* faj), Feröer-szigetek (p05:, 30 m, p15: 40 m), Ausztria (p06: 30 m, p19: 1450–1650 m, p20: 2100–2400 m),

Olaszország (p10: nem ismert), Franciaország (p11: 2300–2400 m), Szlovénia (p13: 1700–2200 m), Svájc (p14: 1200–1700 m), Finnország (p16: 20 m).

A flavonoidtartalomra irányuló kísérletekben 3 autentikus, Dél-Angliában termesztett 3 éves növényektől származó *R. rosea* mintát (RR-I, R-II és RR-III), valamint egy faj szinten nem azonosított *Rhodiola* mintát (R-IV) alkalmaztunk.

HPLC: HPLC III, Phenomenex Luna C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm), 40 °C, 254 és 275 nm, 1 ml/min; 0 min: 95 % A (víz) és 5% B (acetonitril); 25 min: 85% A; 32 min: 78% A; 35 min: metanol; 40 min: metanol; 47 min: 95% A

4.2.4. *Teaminták analitikai vizsgálata*

Koffein- és L-teanintartalom szimultán meghatározása: HPLC I, Phenomenex Kinetex XB-C18 (100 × 4,6 mm, 2,6 µm, 100 Å), 40 °C, 210 és 273 nm; 0–6 min: 100% A (víz + 0,05% foszforsav) 0,5 ml/min; 6–7 min: 0,8 ml/min; 7–25 min: 95% A és 5% B (acetonitril); 25–40 min: 80% A; 40–50 min: 80% A; 50–51 min: 100% A; 51–60 min: 100% A; 60–61 min: 0,5 ml/min

L-Teanintartalom meghatározása: HPLC I, Phenomenex Kinetex XB-C18 (100 × 4,6 mm, 2,6 µm, 100 Å), 25 °C, 210 nm; 0–4 min: 100% A (víz) 0,85 ml/min; 4–5 min: 100% B (acetonitril) 2 ml/min; 5–10 min: 100% B; 10–11 min: 100% A, 11–14 min: 100% A; 15 min: 100% A, 0,85 ml/min.

L-Teanintartalom denzitometriás meghatározása: 20×20 cm, 0,25 mm szilikagél réteg 60 F₂₅₄ (Merck), *n*-butanol–aceton–ecetsav–víz 7:7:2:4, majd ninhidrin reagensbe mártás, hevítés 105 °C, 5–15 perc; Fujifilm digitális kamera (Finepix J110w, Fujifilm, Japan). A zöld csatornát CP Atlas 2.0 szoftverrel (Lazarsoftware, Lázár István, Debrecen) „dark on light” módban elemeztük.

4.2.5. *Szójakivonatok izoflavontartalmának vizsgálata*

HPLC: HPLC III, Phenomenex Gemini C18 (100 × 4,6 mm, 5 µm, 100 Å) 25 °C, 254 nm, 1 ml/min; 52% 0,1% CH₃COOH-t tartalmazó víz és 48% metanol

4.2.6. *Édesköményminták furokumarintartalmának vizsgálata*

Növényi nyersanyag: *Foeniculum vulgare* Mill. subsp. *vulgare* var. *vulgare* 33 különböző minta érett termése (Szent István Egyetem, Gyógy- és Aromanövények Tanszék génbankja): 1–25 termesztett és vadon termő populációk, 26–30: eltérő nemesítési vonalból származó minták; 31–33: bejegyzett változatok (Berfena, Grossfrüchtig, Soroksári)

HPLC: HPLC IV., Phenomenex Kinetex C18 (100 × 2,1 mm, 2,6 µm, 100 Å), 40 °C, 0,5 ml/min; 0 min: 95% A (0,1% hangyasavat tartalmazó víz), 5% B (0,1% hangyasavat tartalmazó acetonitril); 5 min: 5% A; 7,5 min: 5% A; 10 min: 95% A

MS: AB Sciex API 2000 hármass kvadrupól tömegspektrométer (AB Sciex LLC, USA). Detektálás SRM módban, a pszoralén (**40**), bergaptén (**38**) és imperatorin (**39**) prekursor ionjai esetén 187,4, 217,3 és 271,2 m/z , míg a termékionoknál 131,2, 202,2 és 203,3 m/z értékeknél (ütközési energia: 36, 31 és 19 eV).

4.2.7. Réztartalom mérése máriatövistartalmú termékekben

Az ICP-MS vizsgálatokat dr. Galbács Gáborral és munkatársaival (SZTE TTIK, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék) kooperációban végeztük.

Réztartalom meghatározása: Agilent 7700x induktív csatolású plazma tömegspektrométer.

4.2.8. Vitex agnus-castus kivonatot tartalmazó termékek analitikai vizsgálata

Mastodynion tabletta és az Agnucaston bevont tabletta (mindkettő a Bionorica AG, Németország terméke).

HPLC: HPLC I, Phenomenex Gemini XB-C18 (100 × 4,6 mm, 5 μm, 110 Å), 25 °C, 254 nm, 1,3 ml/min; 0–6 min: 5% A (metanol) + 95% B (0,5% foszforsavas víz); 15 min: 27% A; 20 min: 35% A; 26 min: 52% A; 33 min: 80% A; 37 min: 100% A; 45 min: 100% A; 50 min: 5% A; 60 min: 5% A

4.2.9. Szintetikus vegyületek kimutatása növényi eredetű készítményekből

Szibutramin kimutatása

Színreakciók: az ENSZ Kábítószer-ellenőrzési és Bűnmegelőzési Hivatala módszere alapján, Marquis-, Simon- és Chen-tesztek alkalmazásával³⁰⁸

Rétegekromatográfia: 10 × 5 cm, 0,25 mm szilikagél réteg 60 F₂₅₄ (Merck), toluol–metanol 95:5; detektálás látható fényben Dragendorff-reagenssel. illetve savas kálium-jodoplatinát-reagenssel való előhívást követően

HPLC-DAD: HPLC III, Phenomenex Gemini NX C18 (100 × 4,6 mm, 5 μm, 110 Å), 25 °C, 220 nm, 1 ml/min, 55% acetonitril + 0,1% trifluoecetsav és 45% H₂O + 0,1% trifluoecetsav

Tömegspektrometria: API 2000 hármass kvadrupól tömegspektrométer, Applied Biosystems Analyst 1.4 szoftver (Applied Biosystems, Foster City, USA), pozitív turbo-ionspray mód, közvetlen injektálás

Grapefruitmag-kivonatok azonossági és kvaterner ammóniumsó-tartalomra történő vizsgálata

Rétegekromatográfia limonoidok kimutatására: 20×20 cm szilikagél réteg 60 F₂₅₄ (Merck), aceton–kloroform 2:8; detektálás: 254 nm; 366 nm; cc. kénsavval permetezés, 5 min hevítés 105 °C-on, majd látható fény

Rétegekromatográfia kumarinok kimutatására: 20×20 cm szilikagél réteg 60 F₂₅₄ (Merck), toluol – dietil-éter 12%-os ecetsavval telítve 1:1, 366 nm

Rétegekromatográfia kvaterner ammóniumsók kimutatására: 20×20 cm szilikagél réteg 60 F₂₅₄ (Merck), metanol–kloroform–aceton 75:15:1,5, Dragendorff-reagens, majd látható fény

Limonoidok kimutatása HPLC-vel: HPLC III, Merck LiChroCart RP₁₈ (250 × 4 mm, 110 Å), 40 °C, 210 nm, 1 ml/min; 0 min: 85% A (30 mM H₃PO₄ vízben) + 15% B (acetonitril); 5 min: 77% A; 25 min: 74% A; 30 min: 60% A; 45 min: 54% A; 55 min: 54% A; 60 min: 85% A

Benzetónium izolálása: a rétegekromatográfiás vizsgálat során Dragendorff-pozitív anyagot legnagyobb mennyiségben tartalmazó készítmény 5 milliliterét 5 ml vízzel elegyítettük és választótölcsérben 3 × 10 ml kloroformmal extraháltuk, a két fázist centrifugálással (5 min, 3500 rpm) elválasztottuk, a Dragendorff-pozitív anyag a kloroformos fázisban dúsult fel.

4.2.10. Római kamilla flavonoidtartalmának vizsgálata

Chamaemelum nobile (L.) All.: virágzat (*Chamomillae romanae flos*) magyarországi termesztés (Bobvos Pál), VIII. Magyar Gyógyszerkönyv előírásainak megfelelő minőség; illóolaj (Aromax Zrt.).

Flavonoidtartalom vizsgálata: HPLC IV, Phenomenex Kinetex C-18 (150 × 4,6 mm, 5 µm, 100 Å), 55 °C, 344 nm, 1,2 ml/min. 0 min: 75% A (0,01% trifluor-ecetsav vízben) + 25% B (acetonitril); 5 min: 75% A; 14 min: 72% A; 15 min: 30% A; 16 min: 30% A; 16,5 min: 75% A; 25 min: 75% A

4.2.11. Pirrolizidin-alkaloidok penetrációjának vizsgálata

A diffúzió vizsgálatát dr. Csányi Erzsébettel és munkatársaival (SZTE GYTK Gyógyszertechnológiai és Gyógyszerfelügyeleti Intézet) kooperálva végeztük.

Diffúzió vizsgálata: Franz-féle diffúziós cella (Hanson Microette TM Topical & Transdermal Diffusion Cell System, Hanson Research Corporation), szintetikus membránon és humán epidermiszen

HPLC-MS: HPLC IV, Phenomenex Gemini C18 (100 × 4,6 mm, 5 µm, 100 Å), 25 °C, 0,4 ml/min; 50% acetonitril és 50%, 0,1% ecetsavat tartalmazó víz. API 2000 MS/MS tömegspektrométer, ESI ionizáció, MRM detektálás

4.3. Farmakológia és toxikológiai vizsgálatok

Az állatkísérleteket a megfelelő etikai engedélyek birtokában a nemzetközi ajánlások betartásával végeztük. A humán eredetű mintát felhasználó vizsgálatokat a Helsinki Nyilatkozat és a hazai ajánlások figyelembe vételével, az Egészségügyi Tudományos Tanács engedélyének birtokában végeztük.

4.3.1. Antibakteriális hatás vizsgálata

Az antibakteriális hatást korongdiffúziós módszerrel a gátlási zóna mérésével 24 órás inkubációval, három párhuzamos méréssel határoztuk meg.³⁰⁹ A vizsgálatot 11 standard Gram-pozitív [*Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615) és meticillinrezisztens *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300)] és Gram-negatív [*Escherichia coli* (ATCC 35218), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) és *Moraxella catarrhalis* (ATCC 43617)] baktériumtörzsön végeztük. Negatív kontrollként DMSO-t, pozitív kontrollként antibiotikumokat (ampicillin, eritromicin, imipenem, cefuroxim és vankomicin) alkalmaztunk.

4.3.2. In vitro antiproliferatív hatás vizsgálata

Az antiproliferatív hatásra irányuló vizsgálatokat dr. Zupkó Istvánnal és munkatársaival (SZTE GYTK Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet) kooperálva végeztük.

A növényi extraktumok antiproliferatív hatását MTT-teszt segítségével, nőgyógyászati eredetű adherens daganatsejteken (A2780, HeLa, és T47D; European Collection of Authenticated Cell Cultures, Egyesült Királyság) mértük.³¹⁰ A sejteket 96 üregű mikrotitráló lemezre vittük, ehhez másnap adtuk hozzá a növényi kivonatokat 10, illetve 30 µg/ml-es koncentrációban. Az üregek abszorbanciáját ELISA-leolvasó segítségével határoztuk meg 545 nm-en. A médium legfeljebb 0,3% DMSO-t tartalmazott, ami nem gyakorol jelentős háttérhatást a sejtek proliferációjára. Negatív kontrollként kezeletlen sejteket alkalmaztunk, referenciavegyületként ciszplatint használtunk. Minden kivonatot két lemezen és legalább 5 párhuzamos méréssel vizsgáltunk.

4.3.3 Antimetasztatikus hatás vizsgálata

Az antimetasztatikus hatásra irányuló vizsgálatokat dr. Krizbai Istvánnal és munkatársaival (MTA SZBK Biofizika Intézet, Molekuláris Neurobiológia Kutatóegység) kooperálva végeztük.

A vizsgálatok során humán agyi mikrovaskuláris endotélsejteket (hCMEC/D3, rövidítve: D3, Lonza, Svájc), A2058 humán melanómasejteket (European Collection of Cell Cultures, Egyesült Királyság), primer patkány agyi endotélsejteket (RBEC)³¹¹ alkalmaztunk. A sejtviabilitási vizsgálatot A2058, D3

és RBEC sejteken a mitokondriális dehidrogenáz aktivitásának mérésén alapuló EZ4U teszttel (Biomedica, Ausztria)³¹² végeztük a lignánok 1,25-10 μ M koncentrációjával.

Adhéziógátlás vizsgálata: Konfluens D3 sejtréteget előkezeltünk a lignánokkal 3 órán át. A2058 melanómasejteket előkezelés után fluoreszcens jelzéssel láttunk el, majd a melanómasejteket az endotélsejt-rétegre juttattuk, inkubálás után lemostuk, fixáltuk és fényképezés után Image-Pro Plus szoftver segítségével (Media Cybernetics, Rockville, USA) számoltuk az adherens sejteket.

Transzendoteliális elektromos ellenállás (TEER) mérése: RBE sejtek konfluens egyrétegű szövetkultúráját a megfelelő közegben a TEER platójának elérése után lignánokkal kezeltünk, majd a TEER-t CellZscope műszer (nanoAnalytics, Németország) segítségével újra leolvastuk.

Sebgyógyulási teszt: D3 sejtek konfluens egyrétegű szövetkultúráját pipettaheggyel sértettük meg, majd a lignánokkal történő kezelést követően 24 órán át egy kamerával ellátott Nikon Eclipse Ti-E inverz mikroszkóp (Nikon Instruments, Japán) segítségével kvantifikáltuk a migráló sejtek számát öt sebzési területen, majd ezek átlagát számítottuk.

4.3.4. Endogén kannabinoidrendszerre kifejtett hatás vizsgálata

Az endogén kannabinoidrendszerre kifejtett hatás vizsgálatát dr. Jürg Gertsch-csel és munkatársaival (Institute of Biochemistry and Molecular Medicine, University of Bern, Svájc) kooperációban végeztük.

[³H]AEA-felvétel gátlása: U937 sejteken, [etanolamin-1-³H]AEA és nem jelölt AEA jelenlétében történő inkubáció, radioaktivitás mérése PerkinElmer Wallac Trilux MicroBeta 1450 műszer alkalmazásával.³¹³

FAAH és MAGL aktivitás mérése: jelölt AEA hidrolízise FAAH-val és [³H]-2-OG hidrolízise MAGL-lal U937 sejt, illetve egéragy-homogenizátum segítségével, szcintilláció mérése Tri-Carb 2100 TR készülékkel.³¹³

Kannabinoidreceptor-kötődés mérése: CHO-K1 *hCB₁* és *hCB₂* membránpreparátumokon, radioligandkiszorítás meghatározása PerkinElmer 1450 Microbeta Trilux műszerrel.³¹³

4.3.5. Elektrofiziológiai vizsgálatok

Az elektrofiziológiai vizsgálatokat dr. Tálosi Lászlóval és munkatársaival (Rytmion Kft., Szeged.) kooperálva végeztük.

Az automata patch-clamp kísérleteket planáris technikával négy csatornás, közepes áteresztőképességű, beépített hőmérséklet-szabályozással rendelkező automatizált patch-clamp készülékkel (Patchliner Quattro, Nanion Technologies) hajtottuk végre stabilan transzfektált HEK293 (HEK-GIRK és HEK-hERG, UCL Business Plv, Egyesült Királyság és Cell Culture Service, Németország) sejtvonalakon, korábbi kísérleti módszerek^{314,315} adatálásával.

4.3.6. Ösztrogénszerű hatás vizsgálata

Az ösztrogén/antiösztrogén hatást egy transzgenikus növényi modell, az *Arabidopsis thaliana* pER8:GUS-al vizsgáltunk.^{316,317} A kísérlet során az előcsíráztatott magokat mikrotiter lemezre vittük, majd a vizsgálandó anyagok és X-Gluc oldatának jelenlétében inkubáltuk. Pozitív kontrollként 17- β -ösztradiolt használtunk. A minimálisan aktív koncentrációt (színdetektálás alapján) mikroszkóp segítségével határoztuk meg.

4.3.7. In vitro adrenerg hatás vizsgálata

Az adrenerg hatás vizsgálatát dr. Zupkó Istvánnal és munkatársaival együttműködésben végeztük (SZTE GYTK Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet).

A vizsgálatok nőstény Sprague-Dawley patkányokon történtek, amelyek egy részét ellenőrzött körülmények között pároztattuk. A nem vemhes állatok méhét ösztruszfázisban, a vemhes állatokét a vemhesség 22. napján eltávolítottuk, majd a méhkürtből 5 mm hosszú izomgyűrűket metszve ezeket vertikálisan szervfürdőben rögzítettük de Jongh oldatban. A Hoodia spray (Fytofontana Dietceutical Hoodia spray, Herb-Pharma Hu Kft., Budapest) uterusrelaxáló hatását spontán és 25 mM KCl-dal indukált kontrakciókon, 10 μ M propranolol adagolásával vagy anélkül vizsgáltuk. A nagy mennyiségű alkohol jelenlétéből adódó oldószerhatást kiküszöbölendő a Hoodia sprayt bepároltuk, majd fiziológiás sóoldat-DMSO 95:5 arányú elegyével visszaoldva végeztük a vizsgálatokat. A kivonatot kumulatív módon adagoltuk (50 μ L, 50 μ L, 100 μ L, 200 μ L and 400 μ L) a szervfürdőbe, minden koncentráció esetén 5 perces inkubálást alkalmazva. Az izomgyűrűk tenzióját jelátalakítóval (SG-02; Experimetria Ltd., Budapest) mértük és SPEL Advanced ISOSYS Data Acquisition System (Experimetria Ltd., Budapest) segítségével rögzítettük.³¹⁸ Az 5 perces időszakok görbe alatti területeit rögzítettük, a Hoodia preparátum hatását a vizsgált anyag beadása előtti spontán és KCl-indukált kontrakciók százalékában kifejezve.

4.3.8. In vitro gyulladáscsökkentő hatás vizsgálata

A gyulladáscsökkentő hatás vizsgálatát dr. Rudolf Bauerrel és munkatársaival kooperációban végeztük (University of Graz, Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Ausztria)

Az *in vitro* gyulladáscsökkentő hatást a leukotriénképződés és a COX-1 és -2 enzimek gátlásának mérésével határoztuk meg. Előbbi teszt esetében leukocitákat inkubáltunk a vizsgált anyagok és CaCl₂, Calcimycin A23187 és arachidonsav oldatával, majd az inkubáció leállítása után a centrifugált felülúszó LTB₄-tartalmát kompetitív EIA kit (Enzo Life Sciences, Svájc) segítségével mértük. Pozitív kontrollként zileutont alkalmaztunk.³¹⁹ A COX-1 és COX-2 gátlás vizsgálata esetén a feloldott mintákat a preinkubált enzimhez adva a reakciót arachidonsav hozzáadásával indítottuk el, majd a reakció fő metabolitjának, a PGE₂-nek szintjét EIA kit (Enzo Life Sciences,

Svájc) segítségével mértük. Pozitív kontrollként indometacint és NS-398-at használtunk.³²⁰ A kiértékelést ELISA mikrolemez-leolvasóval végeztük.

4.3.9. In vivo gyulladáscsökkentő hatás vizsgálata

Az *in vivo* gyulladáscsökkentő hatásra irányuló vizsgálatokat dr. Blaszó Gáborral és munkatársaival (SZTE GYTK Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet) kooperációban végeztük.

Sprague-Dawley patkányok jobb hátsó lábában 0,1 ml 0,5%-os karragénoldat beinjektálásával keltettünk gyulladást, az ellentétes lábba izotóniás sóoldatot fecskendeztünk. A vizsgált kivonatot és a pozitív kontrollt (diklofenák) intraperitoneálisan vagy orálisan (gyomorszonda segítségével) adagoltuk, a karragénbevitel előtt és után. A gyulladás mértékét a lábak térfogatának pletizmométeres (Hugo Sachs Elektronik, Németország) meghatározásával kvantifikáltuk, a sóoldattal injektált láb térfogatához képest.

4.3.10. Simaizmokra kifejtett hatás vizsgálata

A simaizmokra kifejtett hatásra irányuló vizsgálatokat dr. Barthó Loránddal és munkatársaival (PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet) kooperációban végeztük.

A farmakológiai vizsgálatokhoz a Chamomilae romanae flosból az Európai Gyógyszerügynökség monográfiájának megfelelő kivonatot készítettünk 70%-os (v/v) etanollal.³²¹ A kivonat egy részét liofileztük és poliamid (ICN polyamide for column chromatography) szorbensen metanol-víz különböző arányú elegyeivel (20:80, 40:60, 60:40, 80:20, 100:0) frakcionáltuk, így nyerve a F20, F40, F60, F80 és F100 frakciókat.

A simaizmokra kifejtett hatást tengerimalac és patlány ileum és disztális colon, valamint humán jejunum preparátumokon végeztük. A kísérleteket szervfürdőben végeztük (Krebs-Henseleit oldatban), az izommozgást transzducer (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus, March, Németország) segítségével rögzítettük. A kísérletek egy részében a növényi kivonatok, frakciók, vegyületek és az illóolaj hisztaminnal kiváltott spazmusra kifejtett hatását tanulmányoztuk. A maximális longitudinális spazmust 10 μ M, a maximális kontrakció felét 0,5 μ M hisztamin hozzáadásával érték el. A hatás módjának vizsgálatához a muszkarinreceptor-antagonista atropinnal, az idegi ingerületvezetést a feszültségfüggő Na^+ -csatornákat gátló tetrodotoxinnal való előkezelést alkalmaztunk. A vizsgált anyagokat egyszeri adagolással (nem kumulatív módon) tanulmányoztuk.

4.3.11. Toxikológiai vizsgálatok rotifer modellen

A rotifereken végzett vizsgálatokat dr. Datki Zsolttal és munkatársaival (SZTE ÁOK Pszichiátriai Klinika) kooperálva végeztük.

A vizsgálatokat *Philodina acuticornis odiosa* kerekeshéreg fajon végeztük. A kísérleteket 5 napos állatokkal, non-invazív és invazív módszerekkel végeztük.²¹⁵

A kerekeshéregket 384-lyukú lemezen a vizsgált vegyületek 100 µM koncentrációjú, 0,1% DMSO-t tartalmazó oldatával kezeltük. Egy csoport nem kapott kezelést (kezeletlen kontroll), egyet pedig 0,1% DMSO-t tartalmazó közegben tartottunk (kontroll). A kezelési időszak 72 óráig tartott az állatok táplálása nélkül. A kerekeshéreg megfigyelését a 4. naptól folytattuk, korlátozott táplálás (100 µg/ml élesztőszuszpenzió) mellett. A viabilitást digitális kamerával készített felvételeken tanulmányoztuk. Non-invazív módon határoztuk meg a túlélési időt, a testméretindexet, a mastaxfrekvenciát, invazív módon mértük a redukciós kapacitást [utóbbit EZ4U Cell Proliferation Assay (Biomedica, Magyarország) és mikrolemez-olvasó (Spectramax 384, Molecular Science, Magyarország) segítségével)].²¹⁵

4.3.12. Sebgyógyulásra kifejtett hatás vizsgálata

A sebgyógyító hatásra irányuló vizsgálatokat dr. Blazsó Gáborral és munkatársaival (SZTE GYTK Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet) kooperációban végeztük.

A *Centaurea sadleriana* herbáját forró vízzel kivontuk (a népi felhasználással azonos módon), majd liofilezve készült a CSE-1 jelzésű kivonat. Egy következő kivonatot metanollal történő perkolálással nyertünk. Ennek egy részét vákuum alatt bepároltuk (CSE-2). A maradék metanolos kivonatot vízzel kiegészítettük, majd *n*-hexánnal (CSE-3), ezt követően kloroformmal (CSE-4) extraháltuk. A kirázás után visszamaradó metanolos extraktum a CSE-5 jelzést kapta.

A sebgyógyulásra kifejtett hatást Sprague-Dawley patkányokon vizsgáltuk, amelyek hátát epilátor krémmel kezeltük, majd izoflurán narkózisban 100 °C-os fémeszközzel ($r = 45$ mm, 5 s) égési sebeket ejtettünk rajtuk (csoportonként 6 állat). Ezt követően a sebeket a CSE-1–5 kivonatokat 2,5%-os koncentrációban tartalmazó (Carbomer 934 P alapú) géllal, hatóanyagot nem tartalmazó géllal (placebo) és 1% szalicilsavat tartalmazó géllal (pozitív kontroll) kezeltük, egy csoport sebeit nem kezeltük (abszolút kontroll). A végpont az állatok hátán található sebek 50%-ának leeséséhez szükséges idő (sebgyógyulási idő) volt.

4.4. Metaanalízisek

A metaanalízisek elkészítése során előre meghatározott protokoll alapján jártunk el. A tervezés során a PICO modell alapján, strukturáltan, a betegek (*patients*), a beavatkozás (*intervention*), az összehasonlítás (*control*) és a kimenetel (*outcome*) meghatározásával végeztük az adatok gyűjtését tudományos adatbázisokból (Embase, SciFinder, Web of Knowledge, Cochrane Central, PubMed). Az információkeresést a PRISMA módszertani ajánlás figyelembe vételével végeztük.³²² Csak azokat a randomizált, kettős vak, placebokontrollos vizsgálatokat vontuk be az elemzésbe,

amelyek teljesítették a CONSORT növényi kivonatok jellemzésével kapcsolatos ajánlásait.³²³ A heterogenitást Cochran Q-próbával és a Higgins I^2 teszttel vizsgáltuk. A vizsgált paraméterek eltérését a véletlenhatás- és fixhatás-modell segítségével számítottuk ki. A statisztikai elemzéshez a Comprehensive Meta-Analysis (Biostat Inc.), a Review Manager (version 5.3, The Cochrane Collaboration) szoftvereket használtuk.

5. Eredmények

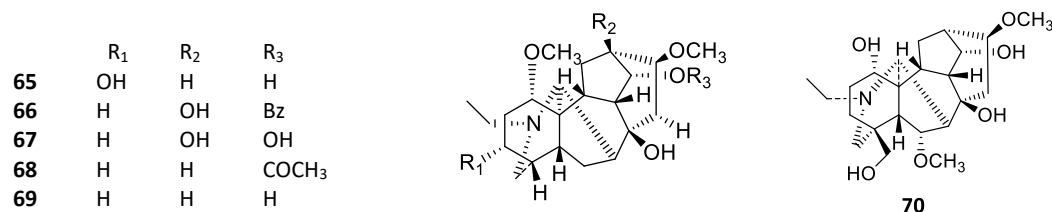
5.1. Preparatív fitokémiai vizsgálatok

5.1.1. Diterpén-alkaloidok izolálása *Aconitum* fajokból

A diterpén-alkaloidok izolálásánál két, alapjaiban eltérő stratégiát követtünk. Az *A. anthoránál* az alkaloidok elválasztására klasszikusan alkalmazott fáziscserés eljárást alkalmaztuk. A növény nyers kivonatát először híg kénsavval elegyítettük, majd ezt kloroformmal extraháltuk a semleges, relatíve apoláros anyagok eltávolítása érdekében (savas közegben az alkaloidok sóként vízdoldékonyak), majd a pH 9-re állítása után kloroformmal extraháltuk az ebben az oldószerben oldékony alkaloidbázisokat (a poláros vegyületek visszamaradtak). Az *A. napellus* subsp. *firmum* föld alatti részeinél ezt a módszert annyival egyszerűsítettük, hogy a kivonást eleve híg savval végeztük. Ezt az eljárást az is indokolta, hogy az előkísérletek során előállított metanolos, híg lúggal, illetve savval előállított kivonatok közül utóbbi alkaloidtartalma bizonyult a legmagasabbnak HPLC vizsgálat során. A fáziscserés eljárás különösen előnyösen alkalmazható olyan esetekben, amikor a feldolgozott növényi rész magas klorofilltartalmát akarjuk elválasztani az alkaloidoktól (pl. az *A. anthora* esetén). A másik két faj (*A. toxicum* és *A. moldavicum*) esetén a pH-változtatással járó fáziscserétől eltekintettünk az izolálási folyamat leegyszerűsítése és az észter típusú vegyületek savas vagy lúgos közegben történő esetleges bomlásának megakadályozása céljából. Ezeknél a növényeknél durva elválasztásra légköri nyomású oszlopkromatográfiát alkalmaztunk (poliamid vagy alumínium-oxid állófázissal), az ezt követő lépésekben vákuum-folyadékkromatográfia, rotációs planárokromatográfia és preparatív rétegekromatográfia használatával, szilikagél és alumínium-oxid állófázison végeztük a tisztítást. Ennek eredményességét rétegekromatográfiával ellenőriztük, kihasználva azt, hogy a szerves vegyületek általában detektálhatóak cc. kénsavas permetezést követő hevítéssel, míg az alkaloidok szelektíven reagálnak Dragendorff-reagenssel.

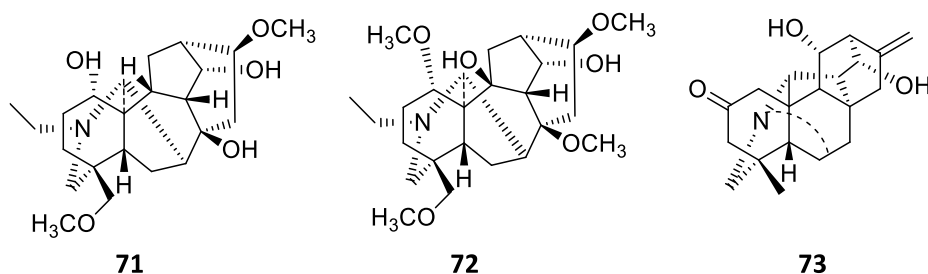
Az *A. toxicum* gyökerének metanolos-alkoholos kivonatából többlépéses kromatográfiás frakcionálással 5 vegyületet nyertünk ki tiszta formában, amelyek szerkezetét NMR spektroszkópiai módszerekkel határoztuk meg.^{1*} A **65** vegyület ¹H-NMR spektrumában egy *N*-etil- és két metoxicsoport szignáljait azonosítottuk. A ¹³C NMR spektrum vizsgálata megerősítette ezen szubsztituensek jelenlétét, valamint a jelek száma alapján az is megállapítható volt, hogy az alapváz 18 szénatomot tartalmaz. A HSQC spektrum segítségével asszignáltuk a protonált szénatomokat, így 4 metilén-, 4 *O*-szubsztituált és 7 alkilszubsztituált, valamint 2 kvaterner szénatomot azonosítottunk. Az ¹H-¹H COSY spektrumban a proton-proton kölcsönhatások alapján meghatározott részszerkezeteket a távolható, HMBC spektrumban megfigyelhető kölcsönhatások

segítségével kapcsoltuk össze egy bisznorditerpénvázzá, továbbá a metoxisubsztituensek és az *N*-etilcsoport helyzetét is azonosítottuk. A vázhoz kapcsolódó hidroxilcsoportok elhelyezkedését a kapcsolódó szénatomok eltolódásértékei alapján határoztuk meg. A relatív konfiguráció NOESY spektrumokon alapuló vizsgálatánál a H-5 konfigurációját β -nak tekintettük, mivel C₁₈ és C₁₉ alkaloidokra ez jellemző.³²⁴ Az itt bemutatott módszerrel meghatároztuk a **65** vegyület szerkezetét, amely korábban nem ismert bisznorditerpén-alkaloidként az akotoxin nevet kapta.

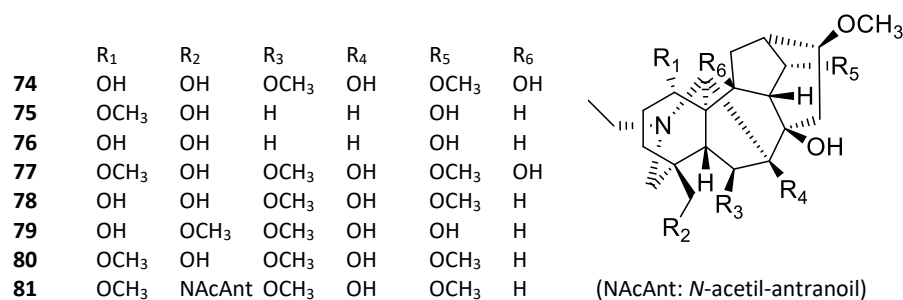


A növényből ezen kívül még 4 bisznorditerpén-alkaloidot [delavakonitin (**66**), delavakonin (**67**), dolakonin (**68**) és akonozin (**69**)], valamint egy észterezetlen nortriterpén-alkaloidot, a neolinint (**70**) nyertük ki tiszta formában.^{1*}

Az *Aconitum anthora* gyökeréből kromatográfiai módszerekkel 2 nortriterpénalkaloidot [10-hidroxi-8-*O*-metiltalitzamint (**71**) és izotalitzidint (**72**)] és a hetizinon C₂₀-alkaloidot (**73**) izoláltuk.^{2*} A 10-hidroxi-8-*O*-metiltalitzamin (**71**) szerkezetét 1D és 2D NMR vizsgálatok segítségével vezettük le, a másik két vegyületet a mért és a szakirodalomban közölt adatok összehasonlításával azonosítottuk.^{325–327}

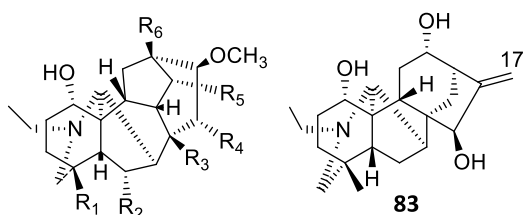


Az *Aconitum moldavicum* gyökeréből egy új akonitánvázas alkaloidot, az 1-*O*-dezmetil-szvatint (**74**), továbbá a már korábban ismert kammakonint (**75**), kolumbianint (**76**), szvatint (**77**), gigaktonint (**78**), delkozint (**79**), likoktonint (**80**) és ajacint (**81**) izoláltuk.^{3*}



Az *A. napellus* subsp. *firmum* Rchb. gyökeréből 6 alkaloidot [neolin (**82**), napellin (**83**), izotalatizidin (**84**), karakolin (**85**), szenbuzin A (**86**), szenbuzin C (**87**)] izoláltunk, további kettőt [akonitin (**1**), taurenin (**88**)] pedig kimutattunk LC-MS módszerrel.^{4*}

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
82	COCH ₃	OCH ₃	OH	H	OH	H
84	COCH ₃	H	OH	H	OH	H
85	CH ₃	H	H	H	OH	H
86	COCH ₃	OH	OH	H	OH	H
87	COCH ₃	OCH ₃	OH	OH	OH	H
88	COCH ₃	OCH ₃	OAc	OH	OBz	OH

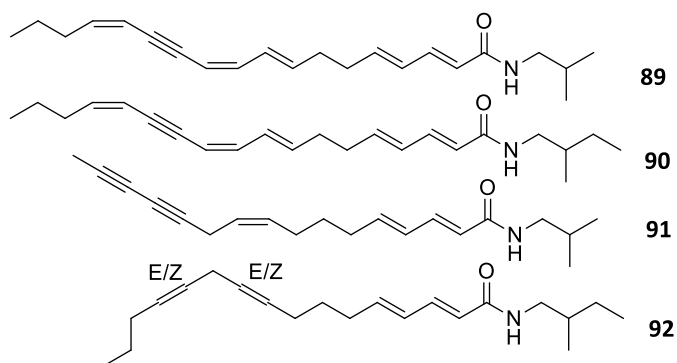


5.1.2. Alkilamidok izolálása *Heliopsis helianthoides*ből és *Lepidium meyenii*ből

Heliopsis helianthoides var. *scabra*

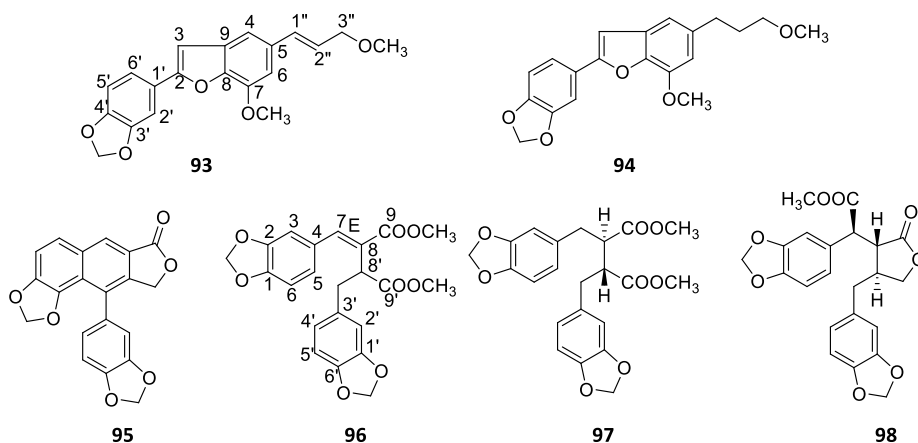
A *Heliopsis helianthoides* var. *scabra* friss gyökerét az *N*-alkil-amidokra kevésbé szelektív metanollal vontuk ki, majd a kivonatot kloroformmal extraháltuk az apoláris összetevők elválasztása céljából. A tisztítást ezután szelektívebb módszerekkel folytattuk. VLC és MPLC segítségével végeztük el a komponensek durva elválasztását. A kisebb tömegű frakciók tisztítására az RPC, PLC és HPLC módszerek voltak a leghatékonyabb és legszelektívebb módszerek. Végző tisztításra általában normál és fordított fázisú HPLC-t és PLC-t alkalmaztunk. Összesen tíz tiszta vegyületet nyertünk ki (**89-98**).^{5*}

A vegyületek szerkezetét 1D- és 2D-NMR mérésekkel és nagy felbontású tömegspektrometriás módszerekkel azonosítottuk. A **89** szerkezetét a mért és a szakirodalomban közölt ¹H-NMR adatok egyezése alapján⁸⁸ határoztuk meg. Az **90** APCI-MS spektrumában az *m/z* 340 [M+H]⁺ kvázimolekula-iont azonosítottuk, amelynek fragmentálódása az *m/z* 253 [(M+H)-C₅H₁₃N]⁺, 235 [(M+H)-C₅H₁₃N-H₂O]⁺, 225 [(M+H)-C₅H₁₃N-CO]⁺, 211 [(M+H)-C₅H₁₃N-CH₂CO]⁺ fragmensionokat eredményezett, amiből egy metilbutilamid molekularész jelenlétére következtettünk. Az ¹H-NMR vizsgálat megerősítette, hogy ez a vegyület a **89** homológia, amely izobutilamid helyett metilbutilamid szubsztituenst tartalmaz. A **91** és **92** vegyületek szerkezetét 1D- és 2D-NMR mérések alapján, MSⁿ mérések eredményeivel megerősítve határoztuk meg.



A növényből kinyert többi vegyület nem *N*-alkil-amid szerkezetű volt. A **93** vegyület HRMS elemzése $C_{20}H_{18}O_5$ összegképletet igazolt. Az 1H NMR és JMOD spektrumokban 2 metoxi- (δ_H 4,05 s, 3,41 s, δ_C 56,1, 56,9) és 1 metiléndioxicsoportot (δ_H 6,01 s, δ_C 101,3) lehetett azonosítani a 17 szénatomból álló, 8 kvaterner szénatomot, 8 metin- és 1 metilén csoportot tartalmazó alapvázon kívül. Az 1H - 1H COSY spektrum elemzésével 2 aromás gyűrű jelenlétére következtettünk, amelyek közül az egyik egy tetra-(a δ_H 7,14 (H-4) és 6,87 (H-6) protonok csatolási állandója alapján), a másik pedig triszubsztituált (az ABX spinrendszer δ_H 7,32 d (0,7) (H-2'), 6,87 d (8,1) (H-5') és 7,40 brd (8,1) (H-6') korrelációi alapján). Ennek a spektrumnak az elemzésével ezen kívül egy telítetlen C_3 molekularészletet is azonosítottunk. Ezeket a szerkezeti részleteket, valamint a kvaterner szenet (δ_C 156,3) és az izolált metint (δ_H 6,82 s, δ_C 100,5) a HMBC spektrumban megfigyelhető távolható C–H kölcsönhatások alapján kapcsoltuk össze. A kvaterner C-2 szénatom és a H-3 and H-2', valamint a H-3 metinproton és a C-9 és C-8 közötti, 2 és 3 kötéson keresztüli kölcsönhatások arra utaltak, hogy a két aromás gyűrű egy furángyűrűn keresztül kapcsolódik, ami egy norneolignán alapváz levezetéséhez vezetett. A metoxicsoportok, valamint a metoxipropenil csoport, továbbá a metiléndioxiszubsztituens helyét HMBC kölcsönhatások segítségével határoztuk meg, a térszerkezetet pedig NOESY kölcsönhatások elemzésével. Mindezek alapján a **93** vegyület szerkezetét 1"-dehidroegonol-3"-metiléterként írtuk le.

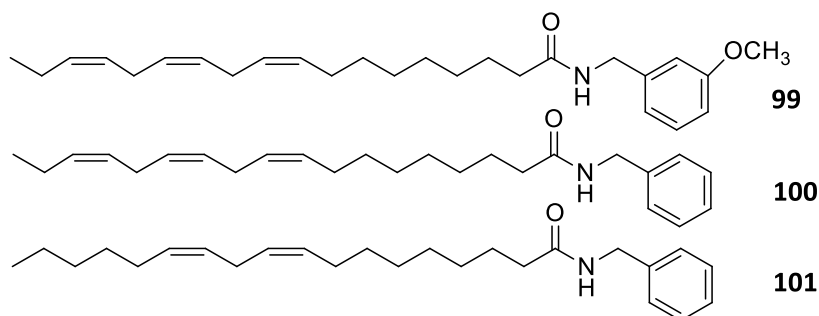
Az 1H - 1H COSY, HSQC és HMBC spektrumok alapján megállapítottuk, hogy a **93** és **94** vegyület ugyanazon alapvázat tartalmazza, s csupán a C_3 oldalláncban különböznek. A diszubsztituált olefinekre jellemző ^{13}C szignálok hiánya és az oldallánc protonjainak szignáljai alapján a **94** vegyületet egonol-3"-metiléterként azonosítottuk. MS mérések és a mért és szakirodalmi NMR adatok alapján a **95** vegyületet helioxantinként, a **96**-ot (7*E*)-7,8-dehidro-heliobuftalminként,³²⁸ a **97**-et heliobuftalminként,³²⁹ a **98** vegyületet 7-acetoxi-hinokininként azonosítottuk.³³⁰



Összesen négy *N*-alkil-amid [oktadeka-2*E*,4*E*,8*E*,10*Z*,14*Z*-pentaén-12-yinsav-izobutilamid, (**89**) oktadeka-2*E*,4*E*,8*E*,10*Z*,14*Z*-pentaén-12-insav-2'-metilbutilamid (**90**), hexadeka-2*E*,4*E*,9*Z*-trién-12,14-diinsav-izobutilamid (**91**), hexadeka-2*E*,4*E*,9,12-tetraénsav-2'-metilbutilamid (**92**)] mellett 5 lignán [1"-dehidroegonol-3"-metiléter (**93**), egonol-3"-etiléter (**94**), helioxantin (**95**), (7*E*)-7,8-dehidroheliobuftalmin (**96**), heliobuftalmin (**97**) és az 7-acetoxihinokinin (**98**)] jelenlétét igazoltuk a növényben.

Lepidium meyenii

A *Lepidium meyenii* Walp. szárított hipokotil őrleményének kivonására a lipofil *N*-alkil-amidok jó oldószerének számító *n*-hexánt alkalmaztunk. A további tisztítást kombinált CPC és HPLC módszerekkel végeztük. A CPC-t elsőként használtuk alkilamidok elválasztására, a módszer alkalmasnak bizonyult az instabil *N*-alkil-amidok kinyerésére. A durva elválasztás során nyert kilenc fő frakcióból két *N*-alkil-amidokat tartalmazó frakciót tisztítottunk tovább, a végső tisztítást HPLC-vel végeztük. Ily módon három vegyületet nyertünk ki (**99-101**).^{6*} A vegyületek szerkezetét ¹H NMR spektrumaik irodalmi adatokkal való összehasonlítása révén *N*-(3-metoxibenzil)-(9*Z*,12*Z*,15*Z*)-oktadekatrienamidnak (**99**), *N*-benzil-(9*Z*,12*Z*,15*Z*)-oktadekatrienamidnak (**100**) és *N*-benzil-(9*Z*,12*Z*)-oktadekadienamidnak (**101**) határoztuk meg.⁸¹

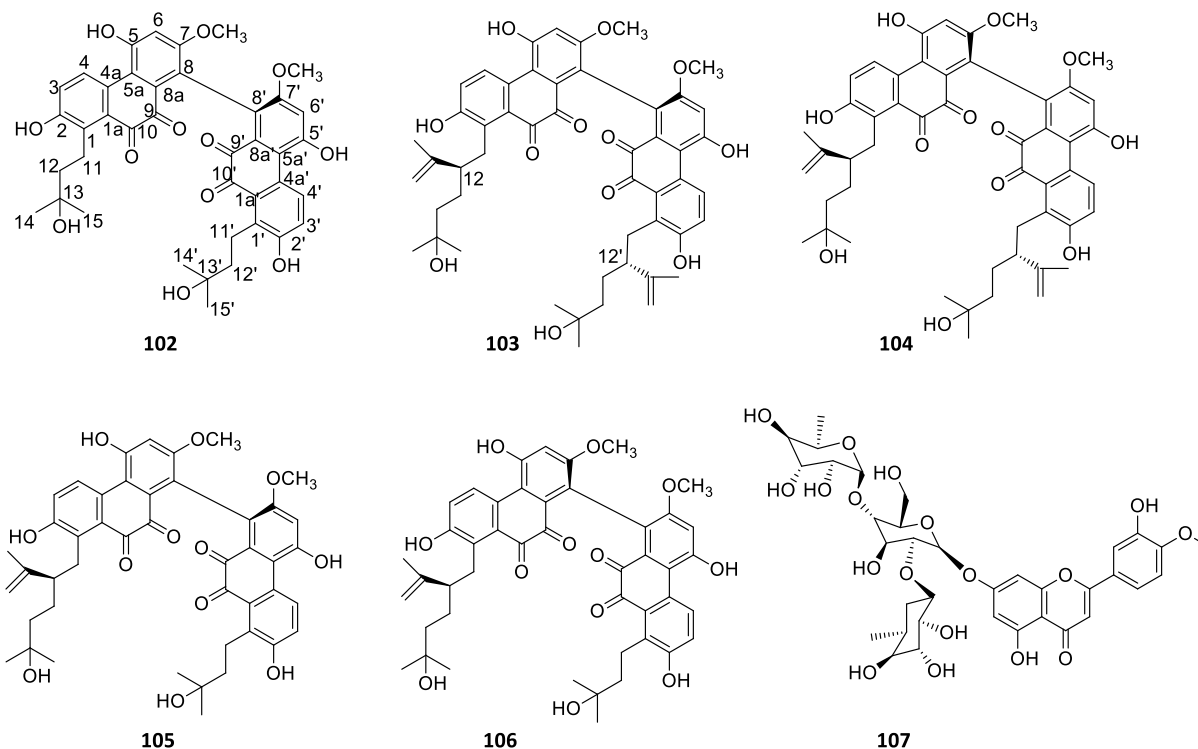


5.1.3. Fenantrének izolálása *Paraleucobryum longifolium*ból

A *P. leucobryum* metanolos kivonatából többlépéses kromatográfiás tisztítással összesen hat vegyületet (**102-107**) nyertünk ki. A kivonatot első lépésben poliamid állófázison metanol-víz növekvő polaritású elegyeivel választottuk el durva frakcionálás és a klorofill eltávolítása céljával. A metanol-víz 4:1 eleggyel nyert frakció ibolyás-fekete színű volt, ennek további elválasztása során a színes alfrakciók tisztításával nyertük ki az öt bíborszínű tiszta vegyületet (**102-106**).^{7*} A tisztítás során légköri nyomású oszlopkromatográfiát és flash kromatográfiát alkalmaztunk frakcionálásra. A géliszűrési kromatográfia és a fordított fázisú HPLC elválasztások bizonyultak a legcélszerűbbnek az anyagok végső tisztítására. A poliamidon történő frakcionálás során metanol-víz 3:2 eleggyel nyert frakció hasonló módszerekkel történő elválasztása egy fehér színű anyag (**107**) kinyeréséhez vezetett.

A vegyületek szerkezetmeghatározásában a HRMS méréseket 1D és 2D NMR vizsgálatok követték, amit az axiális kiralitás vizsgálatánál ECD mérések és sTDA ECD számítások, a centrális kiralitás esetén TDDFT-SOR számítások egészítettek ki. Az **102** vegyület UV spektrumában 542,5, 370, 305, 272 és 213,5 nm-nél jelentkeztek maximumok. HRMS mérések alapján az összegképletet $C_{40}H_{38}O_{12}$ -nek határoztuk meg. A JMOD spektrumban detektálható 20 szignál jelenléte arra utalt, hogy a vegyület szimmetrikus dimer. A monomerben 10 nemprotonált szénatom, 2 ketocsoport, 3 metin, 2 metilén, 1 metoxi és 2 meticsoport ^{13}C NMR szignáljait azonosítottuk. Az 1D 1H és 2D 1H - 1H COSY adatok alapján 1 *orto*-dublett, 1 izolált aromás proton, 1 etiléncsoport, 2 metil- és egy metoxisubsztituens jelenlétét igazoltuk a monomerben. HMBC korrelációk alapján a szén-proton kölcsönhatások vizsgálatával megállapítottuk, hogy a vegyület *O*-(C-2, C-5, C-7 helyzetben) és *C*-szubsztituált (C-1 és C-8 helyzetben) 9,10-fenantréndion alapvázat tartalmaz. A szubsztituenseket és elhelyezkedésüket HMBC és NOESY kölcsönhatások, HRMS adatok és a ^{13}C szignálok alapján határoztuk meg. A vegyület egy új, korábban nem ismert C-8 szénatomokon keresztül kapcsolódó homodimer, amelynek a leukobrin A nevet adtuk. Hasonló módon a **103** vegyület szerkezetét egy olyan szimmetrikus dimernek határoztuk meg, amelyik a C_5 prenilszubsztituensek helyett C_{10} szubsztituenseket tartalmaz. Ez a vegyület a leukobrin B nevet kapta. A **104** vegyületet ugyanazon alfrakció HPLC-s tisztításával nyertük, mint a **103**-t, és nemcsak polarításban hasonlítottak nagyon egymásra. HRMS vizsgálatuk azonos tömeget igazolt, 1H és ^{13}C NMR adataik is jól egyeztek néhány szén- és hidrogénatom kivételével. A **104** vegyület (leukobrin C) esetén azt feltételeztük, hogy mindössze sztereokémiaiilag különbözik a 2-től. A **105** vegyület (leukobrin D) a HRMS mérés, valamint az NMR adatok alapján az **102** és **103** vegyületek monomerjeiből álló heterodimerként azonosítottuk. A **106** vegyület ugyanazon végső HPLC elválasztásból származik, mint **105**, a HRMS és NMR adatok jó egyezése alapján ezt a vegyületet a **105** ellentétes kiralitású molekulapárjaként

azonosítottuk (leukobrin E). Ezeken kívül a növényből kinyertük és azonosítottuk a diozmetin 7-*O*-[2,4-di-*O*-(α -L-ramnopiranozil)]- β -D-glükopiranozidot (**107**).



A fenantrének abszolút konfigurációjának meghatározására axiális kiralitás esetén sTDA módszert alkalmaztunk. Ezt a módszert nagymolekulák vagy nagyszámú ECD átmenettel jellemezhető molekulák vizsgálatára fejlesztették ki, ugyanakkor természetes vegyületeken való alkalmazására kevés példa van. **103** és **104** vegyületeket a kiralitásközpontjaikat tekintve azonos abszolút konfigurációjú atropodiasztereomerekként azonosítottuk. A centrális kiralitásközpontok abszolút konfigurációját SOR számításokkal határoztuk meg. Az **102**, **105** és **106** ECD spektrumait a **103** és **104**-éhoz hasonlítva határoztuk meg az **102** és **105** (*aS*), valamint az **106** (*aR*) abszolút konfigurációját.

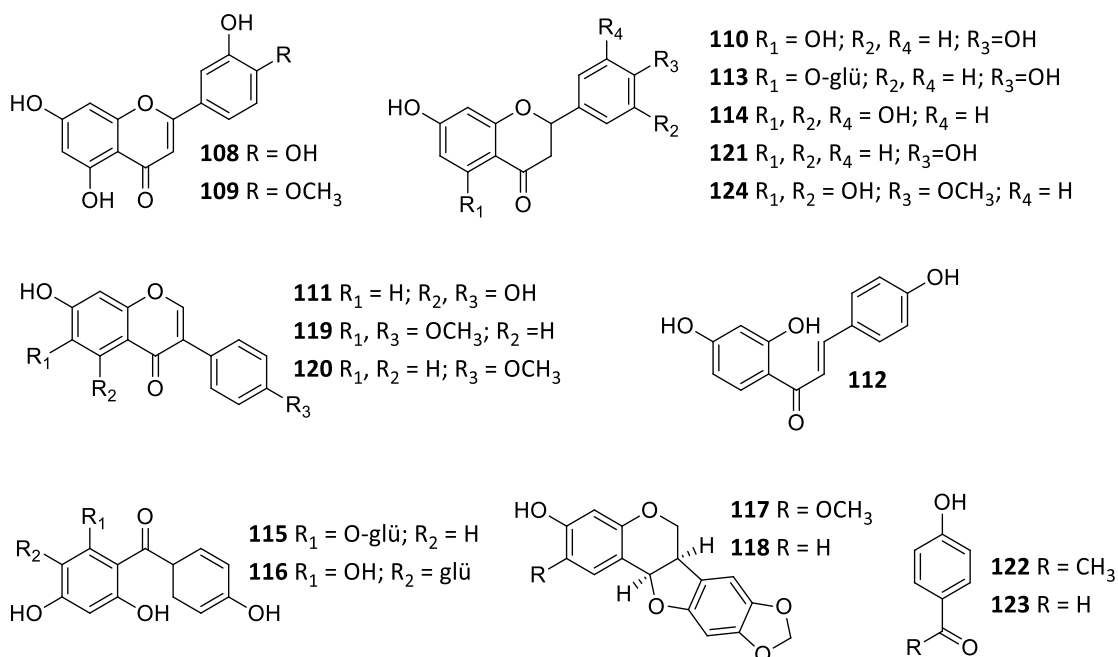
5.1.4. Polifenolos vegyületek hatáskövetett izolálása *Cyclopia genistoides*ből

A *C. genistoides* fermentált és nem fermentált herbájának metanolos kivonataiból folyadék-folyadék megosztással nyertünk diklór-metános és etil-acetátos fázisokat. Mindkét diklór-metános és etil-acetátos frakció gátolta *in vitro* az XO enzimet és *in vitro* ösztrogénszerű hatást mutattak, ezért preparatív feldolgozásuk mellett döntöttünk.

A fermentált, illetve a nem fermentált minták metanolos kivonataiból származó diklórmetános frakciókat légköri nyomású folyadékkromatográfiával, poliamid állófázison választottuk szét, az etil-acetátos frakciók közül a nem fermentált kivonatét dolgoztuk fel (a két növényi minta etil-acetátos kivonatai $^1\text{H-NMR}$ vizsgálattal azonos mintázatot mutattak). Az XO-

teszten a legerősebb gátló hatást mutató fermentált és nem fermentált frakciók további tisztítása vezetett el a **108** és a **109** vegyület izolálásához. Az ösztrogénaktivásra irányuló tesztben legaktívabb frakciók tisztítása a **108** és a **110–114** kinyerését eredményezte tiszta formában. Többlépéses kromatográfiás eljárások (VLC, RPC, MPLC, PLC, HPLC, CC) alkalmazásával a növény kivonataiból összesen 17 tiszta vegyületet izoláltunk, amelyek szerkezetét NMR és tömegspektrometriás mérések segítségével határoztuk meg.^{8,9*}

A **115**-öt és a **116**-at spektrális jellemzőik alapján benzofenon-származékokként azonosítottuk. A spektrális adatok irodalomban közölt adatokkal való összehasonlítása alapján a **115** az iriflofenon-2-*O*- β -glükopiranoziddal, míg a **116** az iriflofenon-3-*C*- β -glükopiranoziddal azonosnak bizonyult. A **117** és **118** esetében egy metiléndioxi-, hidroxil- és metoxicsoporttal szubsztituált pterokarpán alapvázat azonosítottunk. Részletes MS és NMR vizsgálatok után a **118**-at (6*aR*,11*aR*)-(-)-maackiainként, a **117**-et (6*aR*,11*aR*)-(-)-2-metoximaackiainként azonosítottuk. Mindkét vegyület esetén még nem publikált ¹H és ¹³C adatokat nyertünk. A két vegyületet elsőként izoláltuk a *Cyclopia* nemzetségből, korábban ezeket *Ulex* és más Fabaceae fajokból írták le.



A további vegyületeket az irodalomban közölt spektroszkópai és fizikai jellemzők alapján azonosítottuk: luteolin (**108**), diozmetin (**109**), naringenin (**110**), genisztein (**111**), izolikviritigenin (**112**), naringenin 5-*O*- β -glükozid (= helikrizin B, **113**), 5,7,3',5'-tetrahidroxiflavánon (**114**), afrormozin (**119**), formononetin (**120**) és likviritigenin (**121**). A **122**-t piceolként (= 4-hidroxiacetofenon) és a **123**-at 4-hidroxibenzaldehidként határoztuk meg, ¹H-, ¹³C-NMR és MS méréseink alapján. A heszperetin (**124**) ¹H- és ¹³C-NMR adatai jó egyezést mutattak az irodalommal, de DMSO-*d*₆-ban mért adatokat elsőként közöltünk.

Hat, általunk igazoltan ösztrogénszerű aktivitással rendelkező vegyület [luteolin (**108**), naringenin (**110**), genisztein (**111**), izolikviritigenin (**112**), helikrizin B (**113**) és 5,7,3',5'-tetrahydroxiflavanon (**114**)] kvantitatív összehasonlítását elvégeztük a fermentált és nem fermentált *C. genistoides* kivonatokban HPLC alkalmazásával (**1. táblázat**). A fermentált és nem fermentált növény hasonló mennyiségű luteoint (**108**) és izolikviritigenint (**112**) tartalmazott, a fermentált mézbokor naringenin- (**110**) és 5,7,3',5'-tetrahydroxiflavanon-tartalma (**114**) 30-szoros, illetve 10-szeres volt. A nem fermentált *Cyclopia* a hat aktív vegyület közül a helikrizin B-t (**113**) tartalmazta nagyobb mennyiségben. A preparatív fitokémiai munkához használt metanolos és a hagyományosan használt forró vizes kivonat („tea”) kvantitatív összehasonlítását is elvégeztünk. Az izolikviritigenin (**112**) a kimutatási határ alatt volt a vizes kivonatokban, míg a 5,7,3',5'-tetrahydroxiflavanon (**114**) csak a nem fermentált növény vizes kivonatában nem volt észlelhető. A genisztein (**111**) sem a metanolos, sem a vizes mintákban nem volt kimutatható.

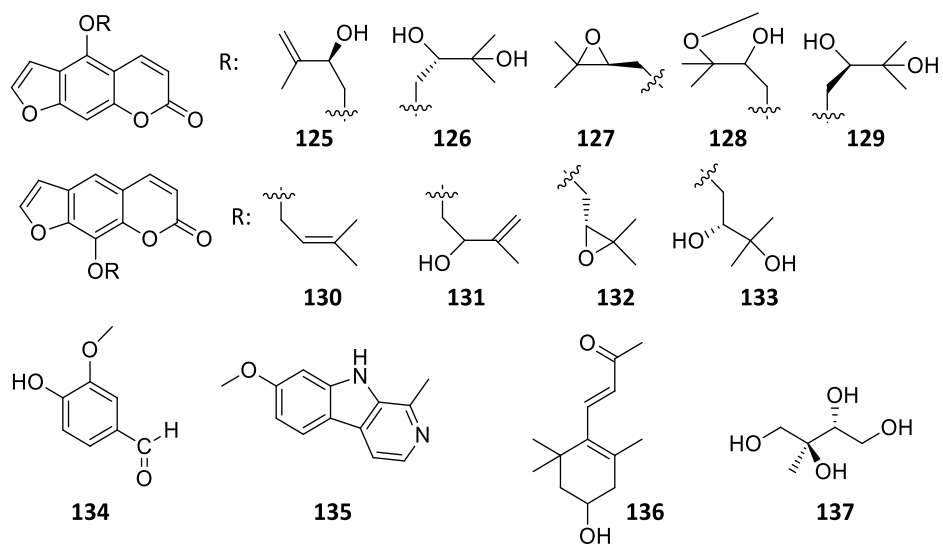
1. táblázat Ösztrogénszerű aktivitással rendelkező flavonoidok mennyisége (nk: nem kimutatható)

Vegyület	Metanolos kivonat		Vizes kivonat	
	Fermentált (mg/g drog)	Nem fermentált (mg/g drogl)	Fermentált (mg/g drog)	Nem fermentált (mg/g drog)
Luteolin (108)	0,0439 ± 0,0062	0,0511 ± 0,0144	0,0152 ± 0,0012	0,0174 ± 0,0062
Naringenin (110)	0,1334 ± 0,0122	0,0037 ± 0,0005	0,0391 ± 0,0016	0,0027 ± 0,00003
Genisztein (111)	nk	nk	nk	nk
Izolikviritigenin (112)	0,0038 ± 0,0006	0,0026 ± 0,0001	nk	nk
5,7,3',5'-Tetrahydroxiflavanon (114)	0,0842 ± 0,0301	0,0079 ± 0,0024	0,0489 ± 0,0076	nk
Helikrizin B (113)	0,1623 ± 0,0463	0,2375 ± 0,0930	0,3279 ± 0,0261	0,3376 ± 0,0540

5.1.5. Furokumarinok izolálása *Ducrosia anethifolia*ból

A *D. anethifolia* herbájának metanolos kivonatából többlépéses kromatográfiás elválasztással 12 vegyületet nyertünk ki tiszta formában. Ezek szerkezetét 1- és 2-dimenziós NMR vizsgálatokkal, a spektrumok kiértékelésével, valamint az ^1H és ^{13}C NMR spektrumok adatai és az irodalmi adatok összevetésével határoztuk meg.^{10*}

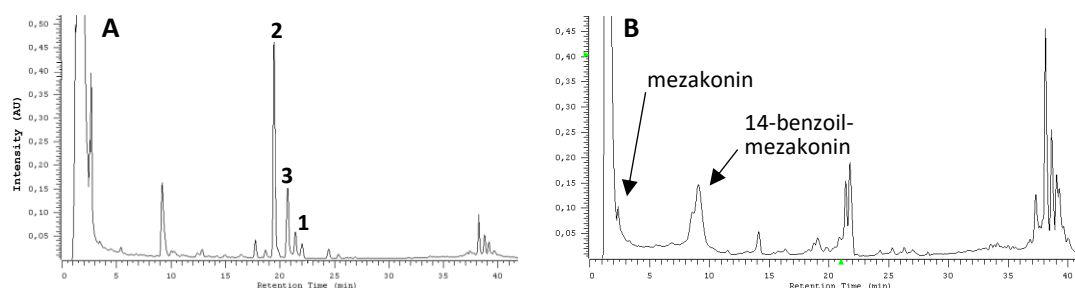
Kilenc lineáris furokumarint, a pabulenolt (**125**),³³¹ a (+)-oxipeucedanin hidrátot (aviprin) (**126**),³³¹ az oxipeucedanint (**127**),³³¹ az oxipeucedanin-metanolátot (**128**),³³² az (-)-oxipeucedanin-hidrátot (prangol) (**129**),³³³ az imperatorint (**130**),³³⁴ az izogoszferolt (**131**),³³⁵ a heraklenint (**132**)³³⁶ és a heraklenolt (**133**)³³⁷ nyertük ki és azonosítottuk a növényből. Ezen kívül egyéb szekunder metabolitokat, így vanillil-aldehidet (**134**)³³⁸, harmint (**135**), 3-hidroxi- α -ionont (**136**) és 2-C-metil-eritritolt (**137**) is izoláltunk a *D. anethifolia* herbájából. Az aviprin (**126**) és prangol (**129**) diasztereomereket eltérő optikai aktivitásuk alapján különböztettük meg.³³⁹



5.2. Kvalitatív és kvantitatív fitoanalitikai vizsgálatok

5.2.1. Lipoalkaloidok kimutatása és szintézise

Lipoalkaloidokkal kapcsolatos vizsgálataink kiindulópontja a Távol-Keleten legszélesebb körben alkalmazott drog, az *Aconitum carmichaelii* gyökere volt. A vizsgálat keretében meghatároztuk a nyers drog fő diterpén-alkaloidjait LC-APCI-MSⁿ módszerrel [akonitin (**1**), hipakonitin (**3**) és mezakonitin (**2**)], az $[M+H]^+$ értékek és a jellegzetes fragmentációs profil alapján. A gyökér Kínai Gyógyszerkönyv szerint feldolgozása³⁴⁰ (ennek keretében 5 órán át tartó főzés) eredményeként a fő alkaloid, a mezakonitin (**3**) nem volt kimutatható a végtermékből, viszont részben vagy teljesen észterezetlen származékai (14-benzoilmezakonin és mezakonin) megjelentek (**3. ábra**).



3. ábra. Feldolgozatlan (I) és feldolgozott *Aconitum carmichaelii* gyökér kivonatának HPLC-profilja

A kromatogramon 35-40 perc retenciós időnél megtalálható csúcsok intenzitása a feldolgozás hatására nőtt. Ezek m/z értékeit a 800-900-as tartományba tartozónak határoztuk meg, részletes LC-MSⁿ vizsgálattal összesen 26 vegyületet azonosítottunk (**2. táblázat**).^{11*} A vegyületek MS vizsgálata során a hosszú szénláncú zsírsavak relatíve könnyen lehasadnak az elektropray vagy a kémiai ionizáció eredményeként a C-8-ról, ezért az MS² spektrumban a fő fragmensionok a vegyületek $[M+H-RCOOH]^+$ leányionjai voltak.³⁴¹ Az észterező savakat a neutrális tömegvesztés alapján azonosítottuk, a m/z 556, 570, 572, 586, 588 és 602 szignálú leányionok további, MS³ analízisével a vegyületek alapvázaként a 14-benzoil-hipakonint, a 14-benzoil-dezoxiakonint, a 14-benzoil-mezakonint, a 14-benzoilakonint, a 10-hidroxi-14-benzoilmezakonint és a 10-hidroxi-14-benzoilakonint azonosítottuk.^{53,341} Bár kvantitatív analízist nem végeztünk, a feldolgozatlan és feldolgozott drogok kivonatai HPLC kromatogramjainak elemzése megerősíti, hogy a feldolgozás a lipoalkaloidok mennyiségének növekedését eredményezi, mindezen túl 8 lipoalkaloid csak a feldolgozott termékekből volt kimutatható, ami az átészterezés jelentőségére mutat rá.

2. táblázat *Aconitum carmichaelii* gyökérmintákban azonosított lipoalkaloidok

Vegyület	Fragmens (m/z)	Neutrális tömegvesztés (Da)	Prekurzor ion	Feldolgozatlan gyökér	Feldolgozott gyökér
14-benzoilhipakonin- -8- <i>O</i> -palmitát (138)	556	256	812	+	
-8- <i>O</i> -linolenát (139)		278	834	+	+
-8- <i>O</i> -linoleát (140)		280	836	+	+
-8- <i>O</i> -oleát (141)		282	838	+	
-8- <i>O</i> -nonadecenoát (142)		296	852	+	+
14-benzoildezoxiakonin -8- <i>O</i> -palmitát (143)	570	256	826	+	
-9- <i>O</i> -linoleát (144)		280	850	+	
14-benzoilmezakonin -8- <i>O</i> -pentadecenoát (145)	572	240	812	+	
-8- <i>O</i> -pentadekanoát (146)		242	814		+
-8- <i>O</i> -palmitoleát (147)		254	826	+	+
-8- <i>O</i> -palmitát (148)		256	828		+
-8- <i>O</i> -linolenát (149)		278	850	+	+
-8- <i>O</i> -linoleát (150)		280	852	+	+
-8- <i>O</i> -oleát (151)		282	854		+
-8- <i>O</i> -szteárat (152)		284	856	+	
-8- <i>O</i> -nonadekadienoát (153)		294	866	+	
-8- <i>O</i> -nonadecenoát (154)		296	868	+	+
-8- <i>O</i> -eikozenoát (155)		310	882	+	
-8- <i>O</i> -eikozanoát (156)		312	884	+	
14-benzoilakonin -8- <i>O</i> -linolenát (157)	586	278	864		+
-8- <i>O</i> -linoleát (158)		280	866		+
-8- <i>O</i> -oleát (159)		282	868	+	
10-hidroxi-14-benzoilmezakonin -8- <i>O</i> -linolenát (160)	588	278	866		+
-8- <i>O</i> -linoleát (161)		280	868		+
-8- <i>O</i> -oleát (162)		282	870		+
10-hidroxi-14-benzoilakonin-8- <i>O</i> -linoleát (163)	602	280	882		+

Egy további kísérletben az *A. toxicum* gyökeréből elsőként mutattunk ki lipoalkaloidokat [14-benzoilmezakonin-8-linolenát (149), -linoleát (150), -palmitát (148), -pentadecenoát (145), -mirisztát (164); 14-benzoilakonin-8-nonadecenoát (165), -linoleát (158); 10-hidroxi-14-benzoilmezakonin-8-linoleát (161)]. A detektált lipoalkaloidok zöme (6/8) az izolált C₁₈- és C₁₉-alkaloidokkal ellentétben nem *N*-etil, hanem *N*-metilszubsztituenst tartalmazott.^{1*}

A lipoalkaloidok további vizsgálatához a vegyületeket nem a rendkívül összetett keverék elválasztásával nyertük, hanem egy, a szakirodalomban közölt félszintetikus módszert adaptáltunk.⁵⁵ Diészter C₁₉-diterpén-alkaloid és legalább négyszeres mennyiségű zsírsav elegyét olajfürdőn melegítve (90-110 °C, 3 óra, 10 mbar) végeztük a reakciót, amelyben átészterezéssel a C-8 helyzetben található ecetsavészter helyett a hozzáadott savval képzett észterét (10) nyertük [és melléktermékként ecetsavat és piroakonitint (11), 2. ábra]. A termék tisztítását többlépéses gélkromatográfia, centrifugális planárokromatográfia és preparatív rétegekromatográfia alkalmazásával végeztük. Az így előállított vegyületeket (14-benzoilakonin-8-*O*-laurát (166), -mirisztát (167), -szteárat (168), -palmitát (169), -palmitoleát (170), -oleát (159), -linoleát (158), -

linolenát (**157**), - γ -linolenát (**171**), -eikozapentaenoát (**172**) és -dokozaheptaenoát (**173**),^{11*,12*} korábban nem izolálták *Aconitum* fajokból, és 4 alkaloidot elsőként állítottunk elő félszintetikusán (14-benzoilakonin-8-O-eikoz-11Z-enoát (**174**), -eikoz-11Z,14Z-dienoát (**175**), -eikoz-8Z,11Z,14Z-trienoát (**176**), -eikoz-11Z,14Z,17Z-trienoát (**177**)).^{13*}

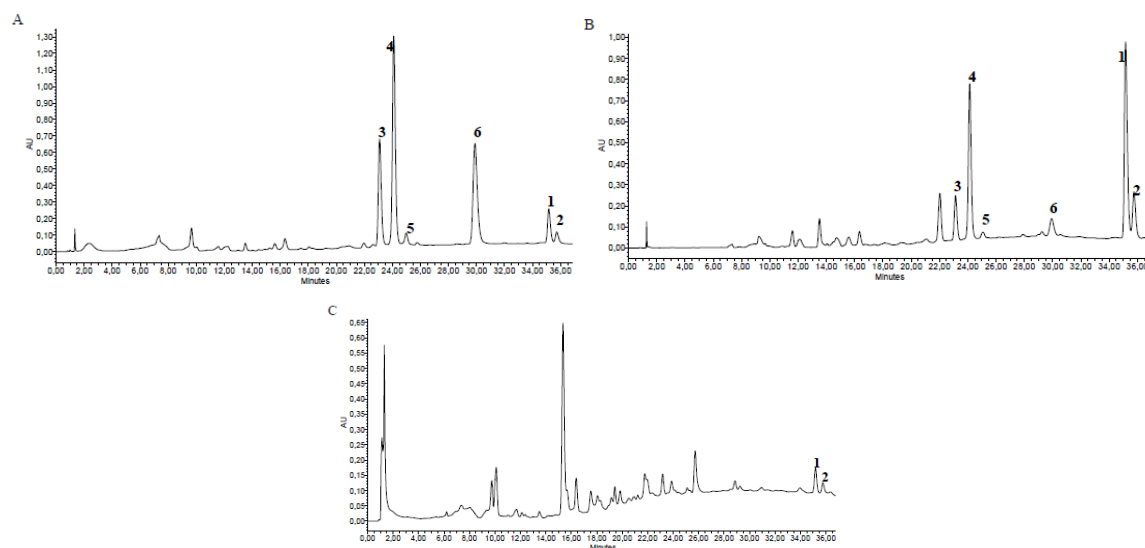
5.2.2. *Sisakvirágdrogok alkaloidtartalmának vizsgálata*

16 kereskedelmi feldolgozott sisakvirággyökérminta (köztük az *A. carmichaelii* és az *A. kusnezoffi*) HPLC analízisére olyan RP-HPLC analitikai módszert dolgoztunk ki, amely lehetővé tette a fő diészteralkaloidok [akonitin (**1**), hipakonitin (**3**) és mezakonitin (**2**)] megbízható kimutatását és mennyiségi meghatározását. A módszer lényege, hogy széles körben elérhető állófázis (C₁₈) és detektálási mód (DAD) alkalmazásán alapul, továbbá, hogy a mintaelőkészítés hatékonysága és robusztussága megbízható meghatározást tesz lehetővé. A kivonás optimalizálására az általánosan alkalmazott metanolon kívül neutrális oldószerkeverégeket (MeOH–H₂O 3:2, 3:1, 9:1, 1:0 és MeOH–CHCl₃ 3:1,1:1, 1:3), valamint savas (1% HCl) és lúgos közegben történő extrakciót (cc. NH₃-val történő nedvesítést követően dietil-éterrel) alkalmaztunk, a hatékonyság növelésére ultrahangos fürdőben. A leghatékonyabb kivonószernak az 1% sósav bizonyult.^{1*} A kivonatok analízisére centrifugálás majd szűrést követően került sor. Az egyszerű, kevés lépésből álló (darálás, kivonás, centrifugálás, szűrés – bepárlás, hőkezelés nélkül) és gyors mintaelőkészítés biztosította a reprodukálhatóságot és megbízhatóságot.

A 3 alkaloid összmennyiségi adatait összevetettük az indirekt titrálással meghatározható alkaloidmennyiséggel. A minták zömében HPLC módszerrel legfeljebb nyomnyi mennyiségű alkaloid volt kimutatható, azonban 4 minta alkaloidtartalma >0,04% volt, ezek közül az egyiké 0,16%. 7 olyan minta volt, amelynél a HPLC módszerrel nem volt mérhető mennyiségű akonitin (**1**), hipakonitin (**3**) és mezakonitin (**2**) kimutatható, azonban titrimetriásan akár 0,2% alkaloidtartalom volt meghatározható. Ezek az eredmények rámutatnak arra, hogy a titrimetriás meghatározás nem specifikus, mivel a toxikológiai szempontból kevésbé jelentős alkaloidok (monoészter, észterezetlen és lipoalkaloidok) és a kvantifikálás szempontjából releváns fő diészteralkaloidok mennyiségét együttesen határozza meg. Ha csak azokat a mintákat (n = 9) tekintjük, amelyeknél HPLC-vel is mérhető volt az alkaloidok mennyisége, R² = 0,91 mértékű korreláció van a két módszer között, ugyanakkor a nem specifikus titrálasos módszerrel mért érték minden esetben magasabb volt. Az általunk kidolgozott módszer, további mintákkal történő validálást követően alkalmas lehet gyógyszerkönyvi minőségvizsgálatra.^{14*}

5.2.3. *Rhodiola* minták fenilpropenoid- és flavonoidtartalmának változékonysága

Kísérleteinkben dél-angliai és alpesi körülmények között termesztett növények kémiai összetételét és az ezeket befolyásoló tényezőket vizsgáltuk. A kísérlet elsődleges célja a növényi rész, a begyűjtési idő és a növények kora, valamint az összrozavin- (ROZ_{tot}), össz-fenilpropenoid- (FP_{tot}), össz-szalidrozyd- (SZAL_{tot}) és fahéjalkoholtartalom (FA) közötti összefüggés vizsgálata volt Európa különböző részeiről származó szaporítóanyagból termesztett mintákon. A dél-angliai növényi mintákat évente háromszor, 3-5 éves növényekről gyűjtöttük. A 70% etanollal nyert extraktumok szalidrozyd-, tirozol-, rozavin- és fahéjalkoholtartalmát egy adaptált³⁴² és validált HPLC módszerrel határoztuk meg. A ROZ_{tot}-ot a rozavin (**25**), valamint a rozavinban kifejezett rozarin (**27**) és rozintartalom (**26**) összegeként, az össz-szalidrozyd tartalmat (SZAL_{tot}) pedig a szalidrozyd- (**24**) és tirozoltartalom összegeként definiáltuk.



4. ábra Autentikus *R. rosea* gyöktörzs (A), gyökér (B) és egyéb, nem azonosított *Rhodiola* sp. gyökér (C) HPLC kromatogramja (254 nm, 1: rodiozin (**30**), 2: herbacetin, 3: rozarin (**27**), 4: rozavin (**25**), 5: rozin (**26**), 6: fahéjalkohol)

A validálás részeként vizsgáltuk a növényi rész (gyökér, gyöktörzs), a szárítási hőmérséklet (45 °C és 65 °C), a kivonószer (30%, 50%, 70% és 90%-os etanol), az intragenetikus változékonyság (ugyanazon helyről származó minta 5 egyedének összehasonlítása), a növények nemének hatását a markeranyagtartalomra. A fő kísérlet során a növények korának, a begyűjtés idejének és a minták származási helyének hatását tanulmányoztuk.

A HPLC módszer alkalmas volt az elsődlegesen kvantifikálni kívánt vegyületek, a rozarin (**27**), rozavin (**25**), rozin (**26**) és fahéjalkohol mérésére. A négy vegyületre meghatározott LOD és LOQ értékek kellően alacsonyak voltak (2,6–27,1 µg/ml, illetve 6,1–42,7 µg/ml) az alacsony

markeranyag-tartalmú minták méréséhez is. A módszer napok közötti precizitása mindegyik mért anyag esetén megfelelő volt ($RSD\% = 3,1\text{--}5,2$). A kalibrációs egyenes lineáris tartományán belül ($2,5\text{--}5000\text{ }\mu\text{g/ml}$) az R^2 $0,9915\text{--}0,9994$ közötti volt.

A fenilpropenoidok és feniletanoidok vizsgálata során a kromatogramokon markáns csúcsként (1 és 2 az **4. ábrán**) detektált két, az UV-spektrumok alapján (UV λ_{max} 274, 328. 380 nm és 274, 328. 380 nm) flavonoidnak feltételezett vegyület izolálását végeztük el az analitikai célra használt HPLC módszerrel. A két tiszta vegyület azonosítását a mért ^1H és ^{13}C spektrális adatok és az irodalomban közölt NMR adatok^{343,344} összehasonlításával végeztük el, és ezeket rodiozinként (1. csúcs, **30**) és herbacetinként (2. csúcs) azonosítottuk. A korábbi vizsgálatokban elemzett növényi minták markervegyületeiként tanulmányoztuk mennyiségük változásait és ennek összefüggéseit. A HPLC módszert a két flavonoid mérésére is validáltuk. A rodiozin (**30**) és a herbacetin a $6,16\text{--}308\text{ }\mu\text{g/ml}$, illetve a $3,44\text{--}172\text{ }\mu\text{g/ml}$ tartományban lineáris kalibrációs egyenesek ($R^2 = 0,9989$ és $0,9958$) segítségével határozható meg, LOD/LOQ értékeik $47,02/146,72\text{ }\mu\text{g/ml}$ és $7,60/25,25\text{ }\mu\text{g/ml}$. A napon belüli precizitás $0,28$ és $1,38\text{ RSD}\%$, a napok közötti precizitás $0,41$ és $2,47\text{ RSD}\%$ volt.

Dél-Angliában termesztett minták vizsgálata

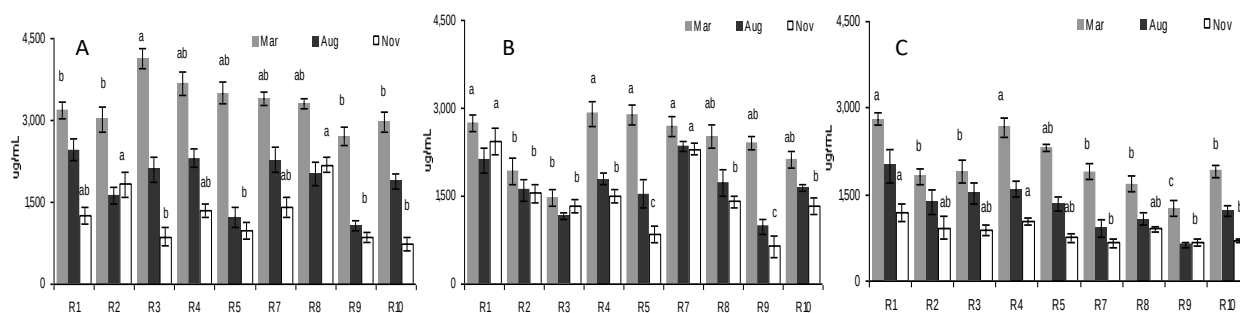
Megállapítottuk, hogy a gyökér esetén a ROZ_{tot} értéke 2–3-szor kisebb, mint a gyöktörzsé. A föld feletti rész rozavint (**25**) egyáltalán nem tartalmazott, fahéjalkoholt és szalidroizidot (**24**) is csak nagyon kis koncentrációban. A rozavin (**25**) volt a fő felnilpropenoid az összes gyöktörzsmintában. A szárítási hőmérséklet növelése némileg csökkentette a ROZ_{tot} értékét, a $SZAL_{\text{tot}}$ mérsékelten emelkedett, az FA nem változott. A kivonószerek közül a rozavin (**25**) extrakciója szempontjából a 70–90%-os etanol, a FA szempontjából pedig az 50–70%-os etanol volt az optimális. A $SZAL_{\text{tot}}$ értékét a kivonószer kevésbé befolyásolta. Az intragenetikus változékonyság a ROZ_{tot} esetén magasabb volt, mint a FA-nál, a növények neme viszont nem volt befolyással a vizsgált kémiai összetételre.

A minták ROZ_{tot} értéke minden esetben a márciusi begyűjtésnél volt a legmagasabb, és a növények életkorával csökkent (**3. táblázat**). Ez a megállapítás begyűjtési helytől függetlenül érvényes. A begyűjtési idő hatása azonos korú növények esetén és a növény korának hatása azonos begyűjtési időszak esetén szignifikáns hatással volt a ROZ_{tot} -ra. Mindez kisebb mértékben, de az FA esetén is érvényes. A márciusi szüret eredményezte a legmagasabb FA-t, azonban az augusztus-november különbség a 4 és 5 éves növények esetén nem mutatott szignifikáns eltérést. Az azonos begyűjtési időpontokat tekintve a növények kora sem minden esetben volt szignifikáns hatással az FA-ra. A ROZ_{tot} /FA arány 7–10 között változott. A FP_{tot} érték a 3 éves növények márciusi adatától az 5 éves növények novemberi adatáig folyamatos csökkenést mutatott.

3. táblázat 3–5 éves *R. rosea* gyöktörzsminták 70%-os etanollal (v/v) készült kivonatainak ROZ_{tot}, FA és FP_{tot} értékei (mind µg/ml, átlag ± SEM), valamint a ROZ_{tot}/FA arány (piros vonal: p < 0,05 kéttényezős varianciaanalízis a származási hely figyelembe vételével; kék vonal: p < 0,05 egytényezős varianciaanalízis a származási hely figyelembevétele nélkül)

	ROZ _{tot}		FA		ROZ _{tot} – FA arány		FP _{tot}	
	Átlag (± SEM)	Tartomány	Átlag (± SEM)	Tartomány	x:1	Tartomány	Átlag	Tartomány (min–max)
3 éves								
Márc.	3320 (±76)	2399–4424	372 (±31,4)	77–664	8,9	4,6–29,0	3692	2903–4951
Aug.	1883 (±84,5)	951–2736	233 (±19,5)	69–521	8,1	2,2–28,6	2116	1114–2942
Nov.	1275 (±80,8)	597–2334	177 (±20,6)	56–493	7,2	2,6–22,0	1452	671–2551
4 éves								
Márc.	2407 (±81,4)	1257–3204	247 (±19,4)	96–412	9,7	4,0–27,7	2654	1521–3368
Aug.	1656 (±73,1)	782–2485	185 (±15,2)	19–389	9,0	4,2–29,5	1841	995–2768
Nov.	1481 (±95,9)	455–2674	186 (±16,6)	15–405	7,9	2,6–27,9	1667	631–2851
5 éves								
Márc.	2024 (±80,8)	1070–2928	224 (±15,4)	123–446	9,1	4,0–29,4	2248	1335–3181
Aug.	1292 (±72,1)	565–2413	163 (±17,4)	31–408	7,9	2,8–31,8	1456	682–2630
Nov.	855 (±36,8)	499–1454	137 (±16,6)	23–355	6,3	2,3–28,7	990	570–1511

A 9 vizsgált dél-angliai élőhelyről származó minták mindegyikénél hasonló mintázat volt megfigyelhető a ROZ_{tot} begyűjtési időszaktól és kortól való függését tekintve (maximumérték: márciusi szüret és 3 éves kor (**5. ábra**)).

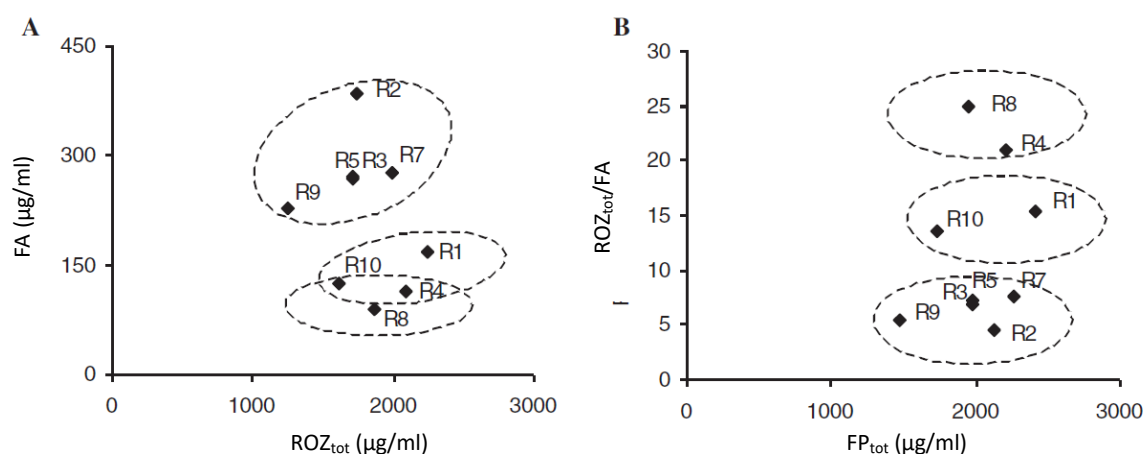


5 ábra 3–5 éves, márciusban (A), augusztusban (B) és novemberben (C) begyűjtött *R. rosea* gyöktörzsminták 70%-os etanollal készült kivonatainak ROZ_{tot} értékei (p<0,05 különböző betűkkel jelölve egytényezős varianciaanalízis és Tukey-féle post hoc teszt)

Kísérleteink arra utalnak, hogy a növény kora és a szezonális hatások nagyobb hatással vannak a növényi gyöktörzs összetételére, mint a genetikai háttér. Háromtényezős varianciaanalízissel

megállapítható, hogy az R1, R4 és R7 minták esetén szignifikánsan magasabb a ROZ_{tot} érték (a begyűjtési időszak és a növény korának hatását is tekintve).

A ROZ_{tot} –FA arány szempontjából három csoport különíthető el (6. ábra). Az R2, R3, R5, R7 és R9 minták mind északi származásúak (Izland, Shetland, Feröer-szigetek, Finnország; ROZ_{tot} –FA arány: 4-8). Az alpesi származású R1 és R10 (Svájc, Ausztria; 13-16) és a pireneusi eredetű R4 és R8 (Franciaország, Spanyolország; 18-21) minták magasabb ROZ_{tot} –FA aránnyal jellemezhetők. A ROZ_{tot} –FA arány vélhetőleg genetikailag jobban determinált, mint a szezonálisan jobban befolyásolt ROZ_{tot} , és FA abszolút értékek.



6. ábra 3-5 éves, márciusban, augusztusban és novemberben begyűjtött *R. rosea* gyöktörzsminták 70%-os etanollal (v/v) készült kivonatainak FA- ROZ_{tot} (A) és ROZ_{tot}/FA - FP_{tot} (B) arányai. A szignifikánsan különböző csoportok (A esetén FA szempontjából, B esetén ROZ_{tot}/FA szempontjából) szaggatott körrel jelölve

A biomasszatermelést tekintve a gyöktörzsek tömege jellemzően a gyökerek tömegének kétszerese volt.

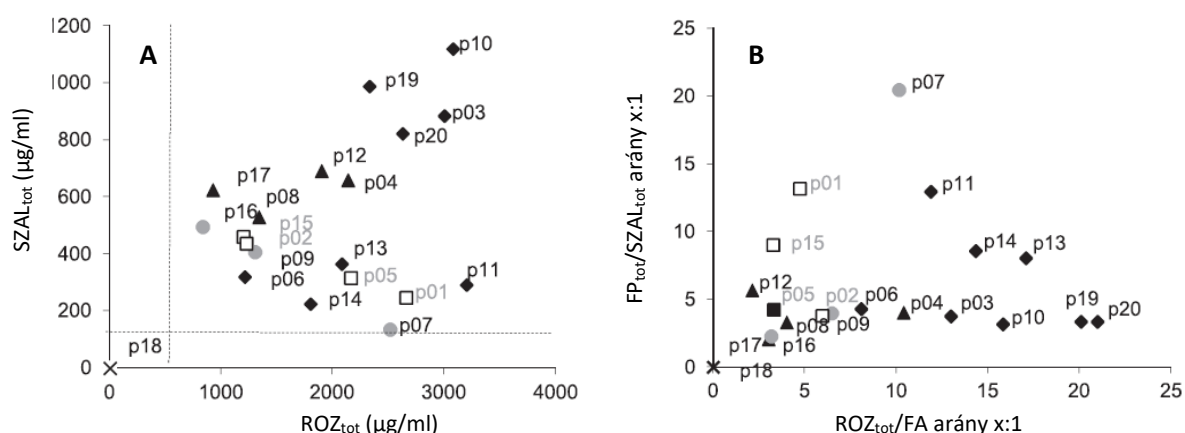
Alpesi természetű minták vizsgálata

A vizsgálatok egyik célja az iparilag hasznosított növényi részek (gyökér és gyöktörzs) markeranyag-tartalmának jellemzése volt (17 minta, p01–P17 alapján). A gyöktörzsminták ROZ_{tot} -tartalma 1,8 mg/ml volt, míg a gyökérmintáké ennek mintegy fele. A ROZ_{tot} és az aglikon FA mennyiségi aránya gyöktörzs esetén magasabb ($8,1 \pm 1,5:1$), mint a gyökérben ($6,2 \pm 1,1:1$). A fenilpropenoid-feniletanolid arány ($FP_{tot}/SZAL_{tot}$), amelynek a *R. rosea* és a nemzetség más fajainak elkülönítése szempontjából van jelentősége, a két növényi rész esetén 6,4, illetve 5,5 volt. A gyöktörzseknek nemcsak a hatóanyag-, hanem a biomasszatermelése is jobb, mint a gyökereké ($1,7:1$) (4. táblázat).

4. táblázat Ausztriai termesztésből származó *R. rosea* gyöktörzs és gyökér minták (9 éves növények, májusi begyűjtés) 70% etanollal (v/v) készített kivonatainak jellemzői

	Gyöktörzs		Gyökér	
	Átlag ($\pm$ SEM)	Tartomány	Átlag ($\pm$ SEM)	Tartomány
ROZ _{tot} (μ g/ml)	1842 ($\pm$ 207)	530–4273	980 ($\pm$ 118)	361–2494
FA (μ g/ml)	346 ($\pm$ 77)	59–1567	257 ($\pm$ 58)	29–1165
ROZ _{tot} –FA arány (x:1)	8,1 ($\pm$ 1,5)	1,2–34,3	6,2 ($\pm$ 1,1)	0,8–18,8
FP _{tot} (μ g/ml)	2189 ($\pm$ 239)	729–5460	1236 ($\pm$ 140)	390–2844
SZAL _{tot} (μ g/ml)	547 ($\pm$ 123)	112–3079	332 ($\pm$ 75)	54–1503
ROZ _{tot} /SZAL _{tot} arány (x:1)	5,4 ($\pm$ 1,1)	1,8–19,5	4,3 ($\pm$ 0,8)	1,4–19,5
PP _{tot} /SZAL _{tot} arány (x:1)	6,4 ($\pm$ 1,3)	2,1–21,1	5,5 ($\pm$ 1,1)	1,7–24,8
Száraz tömeg (g)	75,9 ($\pm$ 11,6)	7,9–246,0	48,4 ($\pm$ 7,0)	9,9–136,5
Friss/száraz tömeg aránya (x:1)	4,3 ($\pm$ 0,2)	2,8–5,7	4,2 ($\pm$ 0,2)	2,7–7,3
Gyöktörzs/gyökér arány (x:1)	1,7 ($\pm$ 0,2)	0,2–2,8	–	–

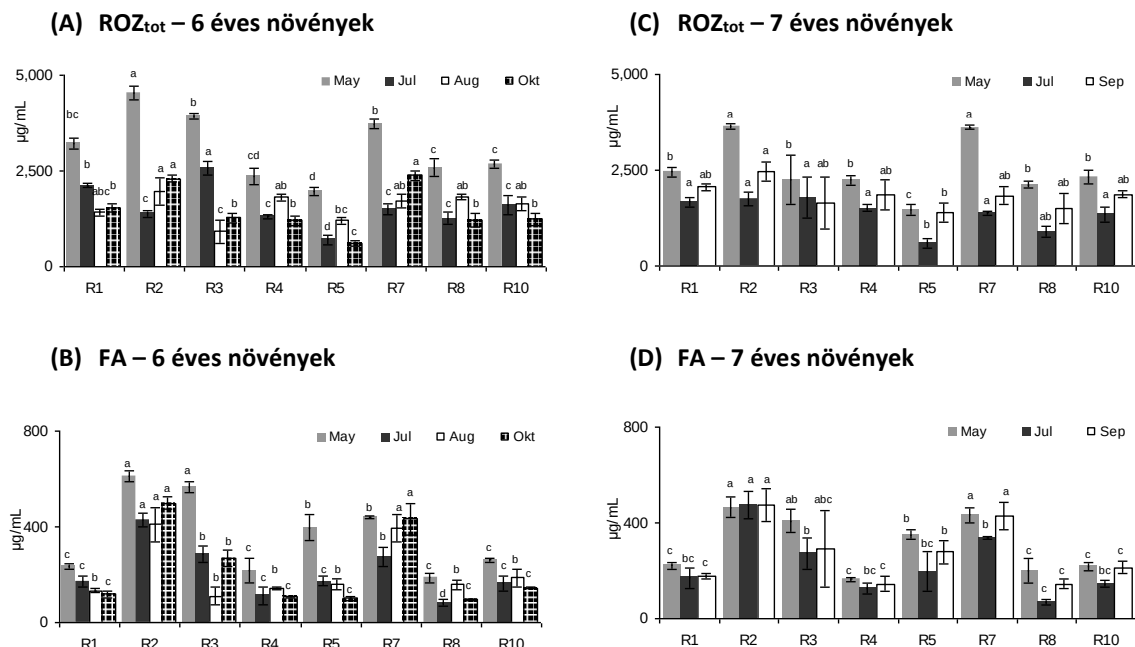
A vizsgálat következő lépésébe a termesztésből származó, taxonómiaiilag pontosan azonosított 17, 9 éves növényekből származó mintán kívül egy nem azonosított *Rhodiola* fajt (p18), és két vadon begyűjtött, ismeretlen korú *R. rosea* mintáját (p19 és p20) is bevontuk (**7. ábra**). Az autentikus *R. rosea* gyöktörzsminták minden esetben megfeleltek a gyógyszerkönyvi követelményeknek az össz-szalidrozyd- és összrozavin-tartalmat illetően.¹⁵⁸ Kimagasló ROZ_{tot} és SZAL_{tot} értékek jellemezték két termesztett (p03 és p10), valamint két vadon növény (p19 és p20) mintát. Az altáji mintákat (p04, p08, p12 és p17) mind magas szalidrozyd-tartalom jellemezte, míg az alpesi minták jellemzően magasabb rozavintartalmúak voltak, mint az észak-európaiak és a szibériaiak [**7. ábra (A)**]. A Pireneusokból és Alpokból származó minták ROZ_{tot}–FA arányai 8–21:1 közöttiek voltak, míg az Észak-Európai mintákban 1–7:1 közötti volt. FP_{tot}–SZAL_{tot} arány szempontjából nem volt különbség az észak- és dél-európai minták között. Az FP_{tot}–SZAL_{tot} arány minden esetben >2 volt, egyetlen kivétellel (az azonosítatlan *Rhodiola* faj, a p18 kivételével) [**7. ábra (B)**].



7. ábra (A): SZAL_{tot} vs. ROZ_{tot} (μ g/ml; p01–p20 gyöktörzs minták 70% etanolos kivonatai); a szaggatott vonalak a gyógyszerkönyvi minimumkövetelményeket jelölik. (B): FP_{tot}/SZAL_{tot} versus ROZ_{tot}/FA (fehér kocka: északnyugat-európai szigetek; szürke kör: Északkelet-Európa; fekete háromszög: Altáj; fekete rombusz: Alpok és Pireneusok)

A fenilpropenoid-profil szezonális változását alpesi termesztésű mintákon tanulmányoztuk (R1–R5, R7, R8, R10). A májusi begyűjtés minden esetben magasabb ROZ_{tot} értéket eredményezett. Az

FA esetén ez elsősorban a 6 éves növényeknél volt érvényes. Ha az egyes genotípusokat külön elemezzük, a fenilpropenoidszint csökkenése júliusi minimum után enyhe növekedést mutat (8. ábra)



8. ábra Alpesi termesztésű minták ROZ_{tot} és CA értékei (70% etanosos kivonat). Az ugyanabban a hónapban begyűjtött minták közötti szignifikáns ($p < 0,05$) különbségeket betűk jelzik (egytényezős varianciaanalízis és Tukey-féle post hoc teszt)

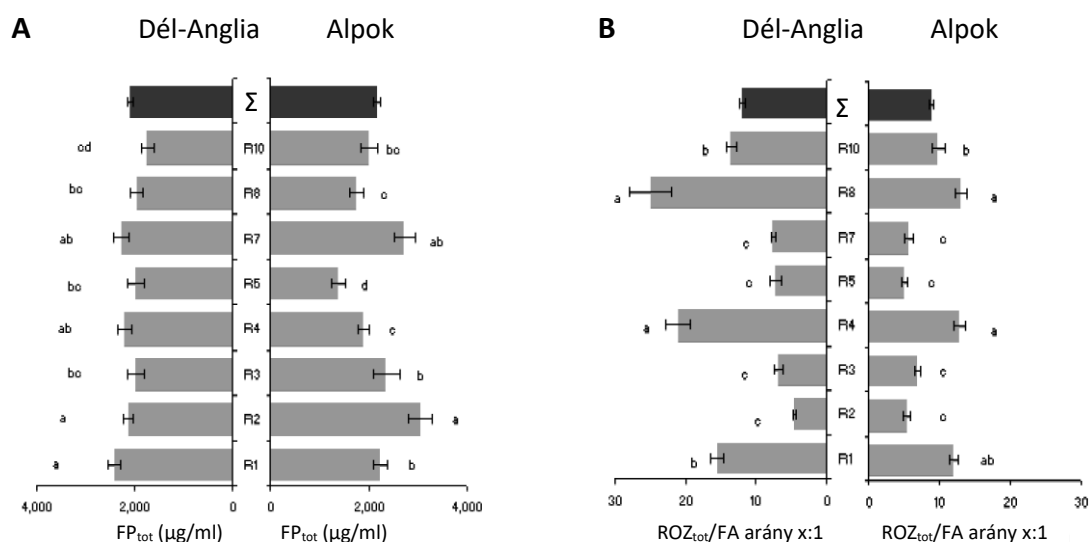
A 6. év tavaszától a 7. év szeptemberéig a termelt biomassa több mint duplájára nőtt. A drog víztartalma tavasszal magasabb volt, mint nyáron és ősszel. A gyöktörzsek tömege minden vizsgált időpontban magasabb volt a gyökereknél (5. táblázat). Az optimális begyűjtési időszak kiválasztásánál a biomassa-produkció és a markeranyag-koncentráció változásai egyaránt figyelembe veendő. Ilyen szempontból a 7 éves növények májusi és szeptemberi szüretei a legideálisabbak.

5. táblázat Alpesi termesztésű (R1–R5, R7, R8, R10) minták biomassa-produkciós adatai

	Szárak tömeg (g/növény)		Friss/szárak tömeg		Gyöktörzs/gyökér tömeg	
	Átlag ($\pm$ SEM)	Tartomány (g)	Átlag (x:1)	Tartomány	Átlag (1:x)	Tartomány
6 éves növények						
Május	87,0 ($\pm 11,0$)	35,3–156,1	5,03 ($\pm 0,10$)	4,41–5,76	0,72 ($\pm 0,09$)	0,33–1,39
Július	131,3 ($\pm 15,6$)	59,6–303,3	3,26 ($\pm 0,06$)	2,80–3,59	0,74 ($\pm 0,06$)	0,57–1,20
Augusztus	153,8 ($\pm 20,1$)	63,8–426,7	2,95 ($\pm 0,11$)	2,47–3,51	0,74 ($\pm 0,12$)	0,22–1,68
Október	173,3 ($\pm 30,6$)	60,0–368,9	3,18 ($\pm 0,20$)	2,53–4,63	0,84 ($\pm 0,12$)	0,19–1,41
7 éves növények						
Május	167,3 ($\pm 26,2$)	49,9–343,0	3,97 ($\pm 0,18$)	2,63–4,58	0,82 ($\pm 0,09$)	0,19–1,33
Július	171,3 ($\pm 19,6$)	91,2–305,4	3,26 ($\pm 0,07$)	2,87–3,59	0,64 ($\pm 0,08$)	0,29–1,01
Szeptember	194,5 ($\pm 16,2$)	62,3–272,1	3,21 ($\pm 0,08$)	2,76–3,46	0,75 ($\pm 0,06$)	0,11–1,50

Alpesi és dél-angliai termesztésű minták összehasonlító vizsgálata

Összehasonlítottuk 8, Dél-Angliában és a Ausztriában egyaránt termesztésbe vont szaporítóanyag (R1-R5, R7, R8, R10) mintáinak markeranyagprodukciónak annak érdekében, hogy tanulmányozzuk a termesztési hely hatását a kémiai összetételre. Az angliai mintákat 3–5 éves növényekről, az ausztriaiakat 6–7 éves növényekről, évi 3 begyűjtéssel nyertük. A termesztési hely nem befolyásolta szignifikánsan az FP_{tot} értékét. A magasabb tengerszint feletti termesztés két esetben (R2 és R7) magasabb összfenilpropenoid-tartalmat eredményezett, egy esetben ezzel ellentétes trend volt megfigyelhető (R5). A rozavin/fahéjalkohol arány szempontjából két nagy csoportot lehetett megkülönböztetni: az északi eredetű mintáknál ez az arány 5–7 között volt (R2, R3, R5, R7), míg az alpesi R1 és R10, valamint a Pireneusokból származó R4 és R8 esetén 10–13. Bár ezek az arányok a termesztés helyétől függetlenül érvényesek voltak, a dél-angliai mintákra konzekvensen magasabb ROZ_{tot}/FA arány volt jellemző. A növények szekundermetabolit-termelése genetikailag erősen determinált, mert bár a termesztési hely hatással van az anyagcseretermékek abszolút értékeire, az alacsony ROZ_{tot}/FA arány termőhelytől függetlenül jellemző bizonyos mintákra (R2, R3, R5, R7) (9. ábra).

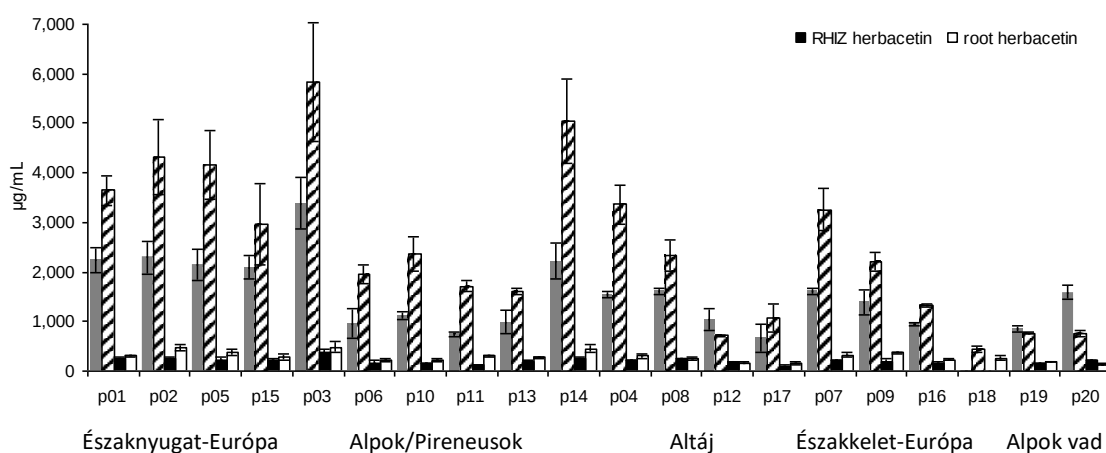


9. ábra Dél-Angliában és az Alpokban termesztett (3-5 és 6-7 éves növények) szaporítóanyagból származó minták összehasonlító vizsgálata. A különböző szaporítóanyagból származó minták szignifikáns eltéréseit ($p < 0,05$) termőhely szerint különböző betűkkel jelöltük (kéttényezős varianciaanalízis és Tukey-féle post hoc teszt)

Rhodiola minták flavonoidtartalmának vizsgálata

A *R. rosea* kivonatában a herbacetin és rodiozin (**30**) azonosítása után vizsgáltuk a két vegyület kinyerhetőségét különböző oldószerekkel. Az extrakcióra felhasznált oldószerek [30%, 50%, 70% és 90% etanol (v/v)] közül 70–90% etanollal volt elérhető maximális hatékonyság. Tiszta vízzel

nyert kivonatokban a flavonoidok szintje a mérési határ alatt volt. A részletes vizsgálatokra a fenilpropenoidokra is optimális 70% etanolt használtunk extraktánsként. A gyökerek fenilpropenoidtartalma magasabb volt, mint a gyöktörzseké, ami a fenilpropenoidokkal ellentétes feldúsulásra utal. A föld fölötti rész flavonoidtartalma nagyon alacsony (<400 µg/ml) volt a föld alatti részekhez viszonyítva (1800–2400 µg/ml). Növényi résztől függetlenül a rodiozin (30) koncentrációja 5–10-szer magasabb volt a herbacetinénál. A herbacetin és rodiozin (30) mennyiségét a szárítás körülményei nem befolyásolták, a két anyag aránya a különböző oldószerekkel készült kivonatokban is állandó volt (1:10), ami arra utal, hogy ezek a feldolgozás körülményei között stabil, a minőségellenőrzés során hasznosítható markeranyagnak alkalmas vegyületek.



10. ábra Rodiozin (30) és herbacetin koncentrációja (átlag ± SEM) Európa és Ázsia különböző területeiről származó szaporítóanyagokból az Alpokban termesztett növények gyökereiből és gyöktörzseiből készített 70% etanolos kivonatokban. A p01–p17 minták 9 ves növényektől származnak, a p18 faj szinten meg nem határozott *Rhodiola* taxon, a p19–p20 vadon begyűjtött, ismeretlen korú *R. rosea*.

Az Alpokban termesztett, 9 éves növényekről származó 17 minta gyöktörzsei átlagosan 1,8 mg/ml (0,76–3,8 mg/ml), gyökerei 3,1 mg/ml (0,88–6,3 mg/ml) flavonoidot tartalmaztak (rodiozin+herbacetin). A ROZ_{tot}-flavonoid aránya az extraktumokban gyöktörzsek és gyökerek esetén átlagosan 1,4, illetve 0,4 volt. A két flavonoid aránya a termesztett és a vadon begyűjtött mintákban is állandó volt. A legmagasabb flavonoidtartalmú minták szaporítóanyagai Európa különböző helyeiről származtak, a Pireneusoktól (p03) az Alpokon (p14) át Oroszorszáig (p04 és p07), de ugyanez érvényes az alacsony flavonoidtartalmú mintákra is.

Az összes régiót tekintve a gyöktörzsekben a FP_{tot}/FLAV_{tot} arány 0,9–1,8 közötti volt, míg a gyökerekben, a magasabb flavonoidtartalomtól adódóan 0,3–1,2. A vizsgált minták flavonoidtartalmát figyelembe véve megállapítható, hogy a <0,5 mg/ml FP_{tot} érték 70% etanollal készült kivonatokban arra utalhat, hogy a minta nem *R. rosea*-tól származik.

5.2.4. Teaminták teanin- és koffeintartalmának vizsgálata

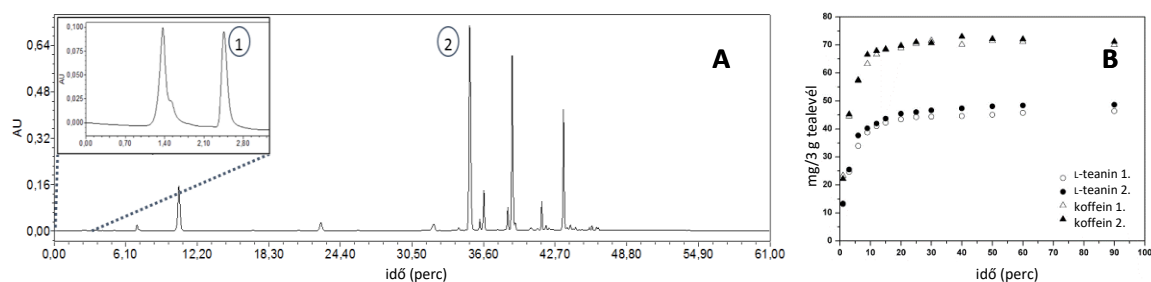
A teaminták L-teanintartalmának mérésére validált denzitometriás^{18*} és HPLC-DAD módszert^{19*} dolgoztunk ki. Előbbit egy elsősorban polifenolos vegyületek analitikájára fókuszáló szakirodalmi módszer³⁴⁵ átdolgozásával, a rutin ipari alkalmazás igényeit figyelembe véve fejlesztettük ki. Előnye, hogy a denzitometriás méréshez nem szükséges speciális műszer, a kromatogramokról készült digitális fényképek kiértékelése egy ingyenes szoftverrel (CP Atlas 2.0) elvégezhető. Az L-teanin (**33**) detektálását ninhidrin reagenssel, majd hevítéssel tettük lehetővé látható fényen. Az L-teaninhoz hasonlóan vöröses színnel reagáló egyéb aminosavaktól és a neutrális vegyületektől megfelelő elválasztást eredményezett a kromatográfiás módszer (SiO₂ állófázis, *n*-butanol–aceton–ecetsav–víz 7:7:2:4). Optimalizáltuk a fényképezés körülményeit (távolság, felbontás, nagyítás), valamint megállapítottuk, hogy a szoftveres elemzés a zöld színcsatorna kiértékelésével biztosít legnagyobb érzékenységet. A visszanyerést az eredeti teanintartalom 50, illetve 150%-ának hozzáadásával, a napok közötti precizitást 3 egymást követő napon történő méréssel, a napon belüli precizitást 3 különböző koncentrációjú oldat 3 kromatogramjának kiértékelésével végeztük. A robusztusságot különböző analitikusok által végzett mérésekkel vizsgáltuk. A műszerprecizitást 3 koncentrációsinten, kromatogramok többszöri lefényképezésével teszteltük. A validálási jellemzők (6. táblázat) a módszer megbízhatóságát igazolják

6. táblázat L-Teanin denzitometriás mérésének validációs paraméterei

Visszanyerés [%]	
50%/150% teanin hozzáadásával	95,71/102,5
Napok közötti precizitás [RSD%]	0,18
Egy napon belüli precizitás [RSD%]	
2,8/5,6/11,2 µg teanin/folt	0,42/0,44/0,68
Precizitás 3 analitikus esetén [RSD%]	0,43
Műszerprecizitás [RSD%]	
1,4/4,2/7,0 µg teanin/folt	2,89/2,61/3,13
Ismételhetőség [RSD%]	0,42
Lineáris tartomány	1,4–14 µg/folt
Korrelációs együttható (R²)	> 0,96

Az L-teanin (**33**) mérésére validált HPLC-DAD módszert is kidolgoztunk. Ezt a módszert 0,5–45 µg/injekt között lineáris kalibrációs egyenes ($R^2 = 1,00$), 0,09–2,13 RSD% napon belüli és 0,48 RSD% napok közötti precizitás, 96,13-100% közötti visszanyerési arány jellemzi. A detektálás 210 nm-en történt, elúcióra 100% vizet, az oszlop mosására víz-acetonitril grádienszt használtunk. A módszer érzékenységét jellemzi az 5,70 ng/injekt LOD és 19,01 ng/injekt LOQ értékek.

Az L-teanin (**33**) és koffein (**31**) szimultán mérésére fordított fázisú állófázist alkalmazó, származékképzés nélküli, egyszerű és gyors módszert dolgoztunk ki. A mennyiségi analízist megelőzően tanulmányoztuk, hogy a hagyományos teakészítést imitáló módszerrel (kivonószer 80 °C-os víz, keverés nélkül) a kivonási idő hogyan befolyásolja a kivonási hatékonyságot.



11. ábra Az L-teanin és koffein mérésre kidolgozott HPLC módszerrel nyert kromatogram (1: L-teanin, 210 nm, 2: koffein, 273 nm) (A) és az L-teanin/koffein kioldódási vizsgálat eredményei [2 párhuzamos (B)]

100%-ot megközelítő hatékonyság kb. 20 perc után érhető el, de annak érdekében, hogy reális teaminták eredményeivel rendelkezünk, a különböző teaminták összehasonlítását célzó vizsgálat során a kivonást 3 percig folytattuk.

7. táblázat Kereskedelmi teaminták L-teanin- és koffeintartalma

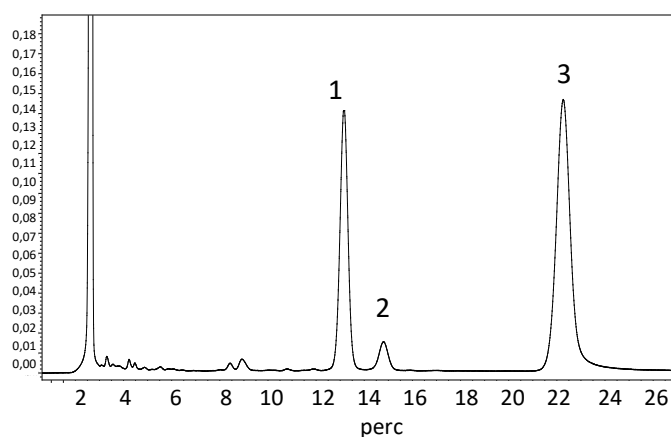
	Kereskedelmi név	típus	$m_{\text{L-teanin}} \text{ (mg)}$ / 1 g tealevél	$m_{\text{koffein}} \text{ (mg)}$ / 1 g tealevél	$m_{\text{koffein}}/m_{\text{L-teanin}}$
1	Mao Feng White	fehér	9,11	15,38	1,69
2	Pickwick White		7,00	17,94	2,56
3	China Pai Mu Tan		5,67	18,22	3,21
4	China Yunnan White		3,24	15,62	4,82
5	Tanzania Black	fekete	6,75	13,48	2,00
6	English Morning		5,09	19,44	3,82
7	Assam Harmutty		5,69	19,93	3,50
8	Russian Samovar		3,80	16,13	4,24
9	Ceylon OP Highrown		4,33	14,61	3,37
10	Earl Grey		2,70	16,48	6,10
11	Twinings Earl Grey		2,47	16,61	6,72
12	Lord Nelson Earl Grey		10,85	23,44	2,16
13	Lipton Earl Grey		5,65	21,44	3,79
14	Lipton Earl Grey Lemon		7,83	23,22	2,97
15	Darjeeling First Flush Leaf Blend	zöld	4,25	14,10	3,32
16	Darjeeling Happy Valley		2,09	14,40	6,89
17	Korean Green		10,93	17,36	1,59
18	China Yunnan FOP		10,88	17,05	1,57
19	Mao Feng Green		8,53	13,48	1,58
20	Vietnamese Green		10,11	16,95	1,68
21	China-Chun Me		6,11	14,97	2,45
22	Japanese Kokaicha		4,70	11,47	2,44
23	China Gunpowder		3,83	13,07	3,41
24	China OP Sencha		2,92	11,32	3,88
25	Green Earl Gray		2,65	10,23	3,86
26	Pickwick Green Cranberry		4,40	14,89	3,38
27	Pickwick Green Melon		4,76	20,11	4,22
28	Mr Perkins Green Peach		7,79	19,72	2,53
29	H Green Mint		6,71	21,97	3,27
30	H Green Lemongrass		6,76	22,75	3,37
31	Lipton Green Nature		7,30	18,85	2,58
32	Japanese Bancha		2,81	11,82	4,21
33	Oolong	oolong	0,90	8,01	8,90
34	Tradition		9,78	26,15	2,67
35	HWA Gung		12,37	39,71	3,21
36	Alishan		3,18	10,96	3,45
37	King's		4,21	11,72	2,78
38	China Yunnan Pu-Erh	pu-erh	0,00	12,59	-

Módszerünkkel 38 kereskedelmi tea minta L-teanin- **(33)** és koffeintartalmát **(31)** határoztuk meg.^{20*} A fehértea-minták esetén az L-teanintartalom átlagosan 6,26 mg/g volt, míg a koffeinkoncentráció 16,79 mg/g (koffein/L-teanin arány 3,07). A fekete teák kisebb mennyiségű L-teanint (5,13 mg/g) és valamivel több koffeint (17,77 mg/g) tartalmaztak, így a koffein/L-teanin arány valamivel magasabb volt (4,07). A zöld teák tartalmazták a legtöbb L-teanint (6,56 mg/g), és mivel koffeintartalmuk az előzőekhez hasonló volt (16,28 mg/g), a koffein/L-teanin arány ez esetben jelentősen alacsonyabb volt (2,79). Az oolong teák L-teanintartalma 6,09 mg/g volt 19,31 mg/g koffeintartalom mellett (koffein/L-teanin arány 4,20). A pu-erh teában nem volt kimutatható L-teanin. A zöld, fehér és fekete teák L-teanin- és koffeintartalmának standard deviációi viszonylag magasak voltak (2,45–2,79, illetve 1,50–3,95), az oolong minták esetén az eredmények nagyon tág tartományban szórtak (0,90–12,37 mg/g L-teanin és 10,96–39,71 mg koffein).

5.2.5. Szójaminták izoflavontartalmának vizsgálatára alkalmas módszer optimálása

A szójaizoflavonokat tartalmazó készítmények kvantitatív jellemzése során döntő fontosságú a mintaelőkészítés. Rutinszerűen általában az aglikonokat (esetleg az aglikonokat és a glikozidokat) mérik, azonban a növény extraktumai ezeken kívül acetyl- és malonil-glikozidokat is tartalmaznak. Tekintettel arra, hogy az acetyl- és malonil-glikozidok a kereskedelemben nem elérhetőek, tiszta formában bomlékonyak, valamint hogy a bioaktivitást a bélrendszerben történő átalakulás eredményeként képződő aglikonok fejtik ki, olyan mintaelőkészítési módszert dolgoztunk ki, amely során a származékok legnagyobb arányban aglikonná alakulnak.^{21*}

Az izoflavonok [genisztein **(36)**, daidzein **(34)**, glicitein **(35)**] analízisére egy HPLC módszert adaptáltunk és validáltunk **(12. ábra)**. A kalibrációs egyenesek együtthatói 0,9957–1,0000 közöttiek voltak, a lineáris összefüggés daidzeinre a 0,035–1,463 µg/injekt, gliciteinre a 0,002–0,061 µg/injekt és geniszteinre a 0,04235–0,42350 µg/injekt tartományban áll fenn. A daidzein-glicitein, illetve a glicitein-genisztein csúcspárokra vonatkozó felbontási értékeket rendre 1,89-nek és 6,17-nek, azaz megfelelőnek találtuk. Módszerünk precizitásának jellemzésére a három aglikonra vonatkozó relatív standard deviációkat határoztunk meg: 0,48% (daidzein, **34**), 0,46% (glicitein, **35**) és 0,57% (genisztein, **36**). A pontosságot visszanyerési vizsgálatokkal ellenőriztük. A daidzeinre, gliciteinre és geniszteinre vonatkozó visszanyerési értékek rendre a következők: 97,70% (RSD = 0,84%), 98,01% (RSD = 0,26%) and 102,32% (RSD = 1,25%).



12. ábra 80 °C-on, 100 percig 4,5 N HCl-lel hidrolizált száraz szójakivonat kromatogramja. A jelölt csúcsok rendre: (1) daidzein, (2) glicitein, (3) genisztein.

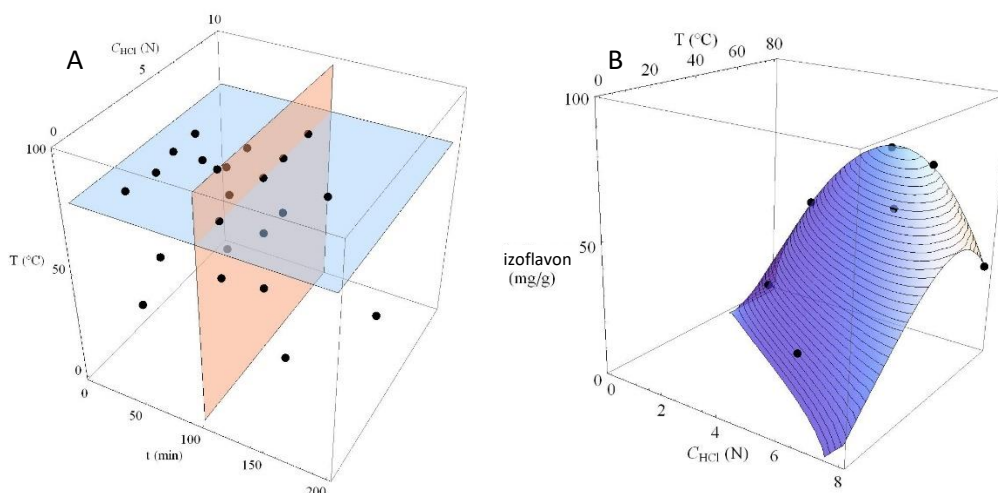
A glikozidok és egyéb származékok aglikonná alakításához savas hidrolízist alkalmaztunk. A folyamatra leginkább a sav koncentrációja, a hőmérséklet és az idő van befolyással, ezért ezek hatásait vizsgáltuk az összizoflavon-tartalomra. Előzetes vizsgálataink során a legnagyobb mennyiségű izoflavont a 4,5 N HCl koncentrációval 80 °C-on 100 percig tartó hidrolízissel nyertük ki. (**8. táblázat**).

8. táblázat A savkoncentráció, hidrolízis idő és a hőmérséklet hatása az izoflavonaglikon-tartalomra

Hidrolízis idő (min)	c _{HCl} (N)	Hőmérséklet (°C)	Daidzein (mg/g)	Glicitein (mg/g)	Genisztein (mg/g)	Összesen (mg/g)
25	1,5	80	11,81	2,12	21,08	35,00
25	4,5	80	22,82	2,30	40,28	65,41
25	6	80	25,95	2,30	43,65	71,91
30	1,5	30	3,04	0,32	2,57	5,93
30	3	80	12,07	1,50	22,58	36,15
50	6	30	4,00	0,70	4,60	9,30
50	1,5	56	4,79	1,11	6,92	12,83
50	4,5	80	23,49	2,27	43,07	68,84
70	4,5	80	20,10	1,95	34,80	56,85
70	6	80	22,80	2,39	41,29	66,48
90	3	80	20,43	1,79	41,31	63,53
100	4,5	30	4,29	0,70	5,06	10,06
100	1,5	56	6,30	1,43	8,77	16,50
100	4,5	56	11,48	2,14	19,71	33,33
100	6	56	22,52	2,24	35,11	59,87
100	1,5	80	14,33	1,83	27,57	43,73
100	3,5	80	17,14	1,70	25,04	43,88
100	4	80	18,21	1,94	28,92	49,07
100	4,5	80	26,24	2,37	44,66	73,28
100	6	80	26,15	2,48	41,06	69,69
100	8	80	14,61	1,28	19,01	34,90
100	1,5	100	16,77	1,62	27,82	46,21
150	1,5	30	2,97	0,39	3,15	6,51
150	4,5	80	20,98	1,80	33,60	56,38
200	3,42	45	7,71	1,87	11,59	21,17
210	1,5	80	17,75	1,11	35,06	53,93

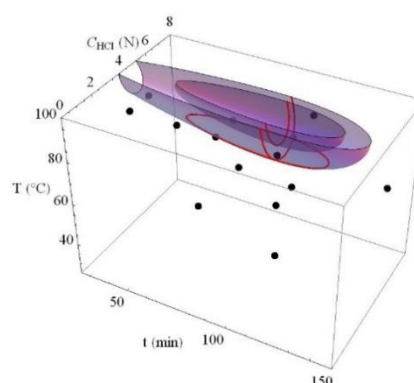
Mérési eredményeinket térbeli koordináta-rendszerben ábrázoltuk a savkoncentráció, a hidrolízisidő és a hőmérséklet függvényében. Mivel általános modell a folyamatra nem ismert,

ezért az adatokhoz az előzetes empirikus elemzések alapján kiválasztott polinomokat lokálisan illesztettük. A mérések eredményei arra utaltak, hogy magas hőmérsékleten (80 °C) vagy kb. 100 percig történő hidrolízissel nyerhető ki nagy mennyiségű izoflavon, ezért előzetes számításaink során ezen két értéket rögzítettük (**13 (A). ábra**). A 100 percig tartó hidrolízisek eredményeit a savkoncentráció és hőmérséklet függvényében és az adatokhoz illesztett felületet együttesen ábrázolva a **13 (B). ábra** mutatja. A függvény rögzített hőmérséklet mellett a savkoncentráció növelésével jól lokalizálható maximumot ad. A jelenség magyarázata valószínűleg az aglikonok adott hőmérsékleten és savkoncentráción túl bekövetkező bomlása. Az illesztett polinom maximum értékét (74,47 mg/g) $T = 82,94$ °C-on és $c_{HCl} = 4,60$ N-on veszi fel, azonban a hőmérsékletet gyakorlati megfontolások miatt (az ultrahangos fürdőkön beállítható hőmérséklettartomány) további részletes vizsgálatot 80 °C-on végeztünk.



13. ábra Rögzített változók (80 °C, 100 perc) kijelölése (A) és 100 percig tartó hidrolízis során nyert izoflavonmennyiségek a savkoncentráció és a hőmérséklet függvényében (B)

80 °C-on rögzített hőmérséklet esetén a rögzített időtartamhoz tartozó maximumok, lényegében azonosak. A maximálisan kinyerhető izoflavonmennyiség széles tartományban (30–120 perc) igen jó közelítéssel konstansnak (71–72,94 mg/g) mondható. A vizsgált időintervallumban a 80 °C-on a savkoncentráció és hidrolízis idő széles tartományban változtatható úgy, hogy a kinyert izoflavon maximális mennyiségű marad. A technológiai igények figyelembe vételével eldönthető, hogy – a lényegében lineáris görbe mentén megválasztott paraméterekkel – hosszú ideig,



14. ábra Illesztés a teljes adathalmazra – a szintfelületek a 71 és 76 mg/g koncentrációhoz tartozó értékeket foglalják össze, a vonalak pedig a 80 °C-on és 100 °C-on, illetve 100 percig mért eredményeket jelölik.

alacsony savkoncentráció mellett, vagy fordítva, rövid ideig nagy koncentrációjú sósavval végezzük a hidrolízist.

Az előzetes illesztések alapján a teljes adathalmazra c^{d1} ($a_0+a_1 c+b_1 c^2+a_2 t+c_1 t+b_2 t^6+a_3 T+c_2 T+b_3 T^4$) alakú négyváltozós függvényt illesztettünk. Ezen az látható, hogy a függvényérték a savkoncentrációhoz és a hőmérsékletéhez képest kevésbé függ az időtől. Az illeszthető függvény tehát a következőképpen írható le: $C^{0,999829}$ ($-37,8368+6,3603 c-0,1845 c^2+0,0780 t-0,0110 c t-4,7876 \times 10^{-13} t^6+0,7408 T-0,0785 c T-1,0342 \times 10^{-7} T^4$) (a mért és jósolt értékek korrelációja: 0,974; R^2 : 0,993, a mért és jósolt értékek átlagos különbsége: 3,486). A maximálisan kinyerhető izoflavonmennyiség 80,30 mg/g ($t = 100,34$ min, $c_{HCl} = 4,4245$, $T = 98,34$ °C).

A számítások alapján maximális izoflavonkoncentráció 98,34 °C-on nyerhető ki, azonban figyelembe véve, hogy a kereskedelembe elérhető ultrahangos kádak többsége 80°C felett nem alkalmazható megbízhatóan, a 80 fokos illesztés eredményei (4,9 N-os sósavval, 96 percig) jelentősek gyakorlati szempontból. A számított eredmény validálására az optimális körülmények (4,9 N HCl, 96 min, 80 °C) között előkészített mintával végzett mérések igazolták, hogy a modellünk által jósolt maximális értékek a valóságban is kinyerhetők. A kvantitatív módon meghatározott összizoflavonmennyiség 73,85 mg/g volt, amely jól összevethető az adott paraméterekhez tartozó jósolt értékkel (72,94 mg/g).

5.2.6. Édesköményminták furokumarintartalmának vizsgálata

Különbféle oldószerekkel (metanol, etanol, petroléter, kloroform, acetonitril, acetone, toluol és etil-acetát) készült extraktumok vizsgálatával megállapítottuk, hogy a furokumarinok leghatékonyabb kivonószere (a vizsgálatba vont oldószerek közül) az acetonitril. Az általunk kidolgozott LC-MS módszer alkalmas volt a három vizsgált vegyület [pszoralén (**40**), bergaptén (**38**) és imperatorin (**39**)] elválasztására, kimutatására és mérésére.^{22*}

A módszer 8,8–10,1 nM és 28,7–31,3 nM kimutatási, illetve mérési határokkal volt jellemezhető. A kalibrációs egyenesek 10–1000 nM között lineárisak voltak (R^2 : 0,9960–0,9997). A visszanyerési vizsgálat 80,17%–133,44% visszanyerési arányt igazolt. A napon belüli precizitás 0,67–1,81% volt.

Az imperatorin (**39**) mennyisége mindegyik mintában kimutatási határ alatt volt, 7 mintában egyik vegyületet sem detektáltuk. A pszoralén (**40**) 19, a bergaptén (**38**) 7 mintában nem volt kimutatható. Utóbbi vegyület mintegy egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációban fordult elő a mintákban, mint a pszoralén (**40**). Ennek a két vegyületnek a mennyiségét az Európai Gyógyszerügynökség által javasolt legnagyobb napi adagban (7,5 g) 0,0099–1,2209 µg/7,5 g-nak mértük (9. táblázat).

9. táblázat Édesköményminták furokumarintartalma

Minta	$\mu\text{g} / 7,5 \text{ g minta } (\pm\text{SD})$		összesen
	pszoralén	bergaptén	
1	0,0551 $\pm$ 0,0015	0,6829 $\pm$ 0,0311	0,7380
2	0,0431 $\pm$ 0,0017	0,4830 $\pm$ 0,0172	0,5261
3	0,0504 $\pm$ 0,0011	0,6192 $\pm$ 0,0256	0,6696
4	0,0561 $\pm$ 0,0019	0,6419 $\pm$ 0,0301	0,6980
5	0,0646 $\pm$ 0,0031	0,6684 $\pm$ 0,0219	0,7330
6	0,0449 $\pm$ 0,0011	0,5239 $\pm$ 0,0092	0,5688
7	0,1072 $\pm$ 0,0050	1,1137 $\pm$ 0,0112	1,2209
8	0,0886 $\pm$ 0,0039	1,1052 $\pm$ 0,0216	1,1938
9	0,0938 $\pm$ 0,0045	1,0114 $\pm$ 0,0328	1,1052
10	0,0710 $\pm$ 0,0018	0,8730 $\pm$ 0,0178	0,9440
11	0,0175 $\pm$ 0,0006	0,1165 $\pm$ 0,0033	0,1340
12	*	0,0220 $\pm$ 0,0007	0,0220
13	*	0,0236 $\pm$ 0,0009	0,0236
14	*	*	*
15	*	0,0183 $\pm$ 0,0008	0,0183
16	0,0142 $\pm$ 0,0002	0,0618 $\pm$ 0,0021	0,0760
17	*	*	*
18	*	*	*
19	*	*	*
20	0,0193 $\pm$ 0,0007	0,2360 $\pm$ 0,0072	0,2553
21	*	*	*
22	*	0,0116 $\pm$ 0,0003	0,0116
23	*	*	*
24	*	*	*
25	0,0133 $\pm$ 0,0005	0,1184 $\pm$ 0,0039	0,1317
26	0,0078 $\pm$ 0,0002	0,0321 $\pm$ 0,0007	0,0399
27	*	0,0188 $\pm$ 0,0006	0,0188
28	*	0,0426 $\pm$ 0,0018	0,0426
29	*	0,0111 $\pm$ 0,0003	0,0111
30	*	0,1045 $\pm$ 0,0061	0,1045
Berfena	*	0,0634 $\pm$ 0,0028	0,0634
Großfrüchtig	*	0,0099 $\pm$ 0,0002	0,0099
Soroksár'	*	0,0745 $\pm$ 0,0011	0,0745

*kimutatási határ alatt

5.2.7. Máriatöviskészítmények réztartalmának vizsgálata

Tekintettel arra, hogy a máriatövis bizonyítottan a rézkoncentráló növények közé tartozik,²⁴³ ugyanakkor a feldolgozás réztartalomra kifejtett hatását és a terápiában alkalmazott termékek réztartalmát nem tanulmányozták korábban, célul tűztük ki ennek vizsgálatát.

A vizsgálatba összesen 15, kereskedelmi forgalomban elérhető terméket vontunk be, köztük 4 gyógyszert, 9 étrend-kiegészítőt és 2 gyógyszernek nem minősülő gyógyhatású készítményt. A gyógyszerek szilimarinra standardizált kivonatot, a gyógytermékek (teakeverék részeként) őrölt termést, az étrend-kiegészítők szilimarinra standardizált kivonatot, őrölt termést vagy annak olaját tartalmazták. A teák mintaelőkészítésére, a teakészítés reprodukálására vizes forralást, a többi termék esetén 1 M HCl-t tartalmazó vízzel való extrakciót alkalmaztunk. A kivonatok réztartalmát induktív csatolású plazma tömegspektrométer (ICP-MS) segítségével határoztuk meg. A mérési módszer validálására autentikus máriatövistermés réztartalmát is

meghatároztuk, ami 18,43 µg/g-nak adódva, a korábbi mérési eredményekkel (17 µg/g)²⁴³ jó egyezést mutatva alátámasztotta eredményeink érvényességét.^{23*}

A vizsgált termékek napi adagjainak réztartalma 0,01–114,18 µg között változott (**10. táblázat**). A deklarált szilimarintartalmú minták (S1-8 és S15) réztartalma viszonylag alacsony volt (0,01–3,51 µg a napi dózisban), azonban a részletesebben nem jellemzett, feltehetőleg nyers kivonatot tartalmazó minta (S13), valamint az őrölt termést tartalmazó termékek (S9, 10, 12, 14) nagyságrendekkel magasabb réztartalommal voltak jellemezhetőek (36,04, illetve 12,04–114,18 µg). A máriatövisolajat tartalmazó készítmény réztartalma nagyon alacsony volt.

10. táblázat Máriatövis-termékek réztartalma (GYSZ: gyógyszer; ÉK: étrend-kiegészítő; GYT: gyógytermék)

Minta	Kategória	Összetétel	µg Cu a napi dózisban	µg Cu/mg szilimarin
S1	GYSZ	máriatöviskivonat deklarált szilimarin- és szilibinintartalommal	3,51	0,02 ^a
S2	GYSZ	máriatöviskivonat deklarált szilimarin- és szilibinintartalommal	0,10	≈0 ^a
S3	GYSZ	máriatöviskivonat deklarált szilimarin- és szilibinintartalommal	0,01	≈0 ^a
S4	GYSZ	máriatöviskivonat deklarált szilimarin- és szilibinintartalommal	0,04	≈0 ^a
S5	ÉK	máriatöviskivonat deklarált szilimarin- és szilibinintartalommal	0,39	≈0 ^a
S6	ÉK	máriatöviskivonat deklarált szilimarin- és szilibinintartalommal	2,41	0,01 ^a
S7	ÉK	máriatöviskivonat deklarált szilimarin- és szilibinintartalommal	0,70	0,01 ^a
S8	ÉK	máriatöviskivonat deklarált szilimarin- és szilibinintartalommal	0,52	≈0 ^a
S13	ÉK	őrölt máriatövistermés	36,04	n, d,
S15	ÉK	őrölt máriatövistermés	1,67	0,56 ^a
S9	ÉK	máriatövismag-olaj	21,62	1,23 ^b
S10	ÉK	őrölt máriatövistermés	12,04	1,6 ^b
S12	É	máriatövismag-kivonat	20,44	1,51 ^b
S14	GYT	őrölt máriatövistermés	96,50	2,68 ^b
S11	ÉK	máriatöviskivonat deklarált szilimarin- és szilibinintartalommal	0,11	n,d,

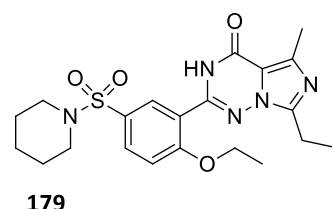
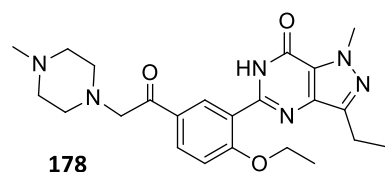
5.2.8. Szintetikus vegyületek kimutatása növényi eredetű termékekben

Az étrend-kiegészítők (köztük a növényi eredetűek) száma a hazai piacon évente sok százal gyarapszik. A nemzetközi szakirodalmi adatok figyelembe vétele alapján feltételezhető volt, hogy a magyar piacon is jelentős számban lehetnek hamisított készítmények. Vizsgálatainkat a szakirodalom alapján leginkább érintettnek tűnő termékcsoporthoz, a növényi potenciafokozók vizsgálatával kezdtük. Bár egyetlen növény markáns potenciafokozó hatását sem támasztják alá tudományos adatok, az internetes térben elérhető fogyasztói beszámolók több készítménynél jelentős hatást írtak le, ami erősítette a foszfodiészteráz-gátlókkal való hamisítás gyanúját.

Vizsgálatainkhoz 10 készítményt szereztünk be kereskedelmi forgalomból, majd rétegekromatográfiás, HPLC és GC-MS módszerekkel ezek közül 6 termékből szildenafililt (**62**), tadalafilt (**63**), vagy ezek analógját azonosítottuk. A vizsgált termékek közül 4-ben volt kimutatható szildenafil (**62**) és/vagy tadalafil (**63**) vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel. Az ennél érzékenyebb HPLC-DAD és GC-MS módszerekkel 4 termékben azonosítottunk szildenafililt/tadalafilt, valamint 4 termékben foszfodiészterázgátló analógot [nor-acetildenafililt (**178**), piperidenafililt (**179**) (**11. táblázat**). A legtöbb készítményből kromatográfiás vizsgálattal nem volt kimutatható a növényi kivonatokra jellemző sokkomponensű vegyületkeverék.^{24*}

11. táblázat Potenciafokozó étrend-kiegészítők szintetikus foszfodiészteráz-gátló szennyezésre történő vizsgálatának eredményei

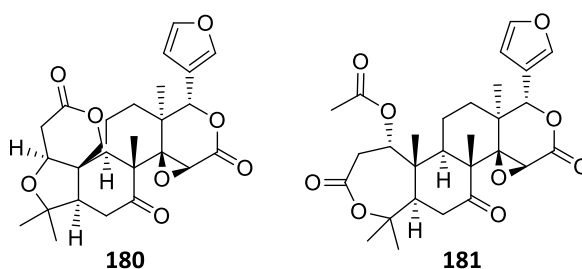
Termék	Szildenafil	Tadalafil	Foszfodiészteráz-gátló analóg
1	•		
2	•	•	•
3	•		
4			•
5	•	•	•
6			•



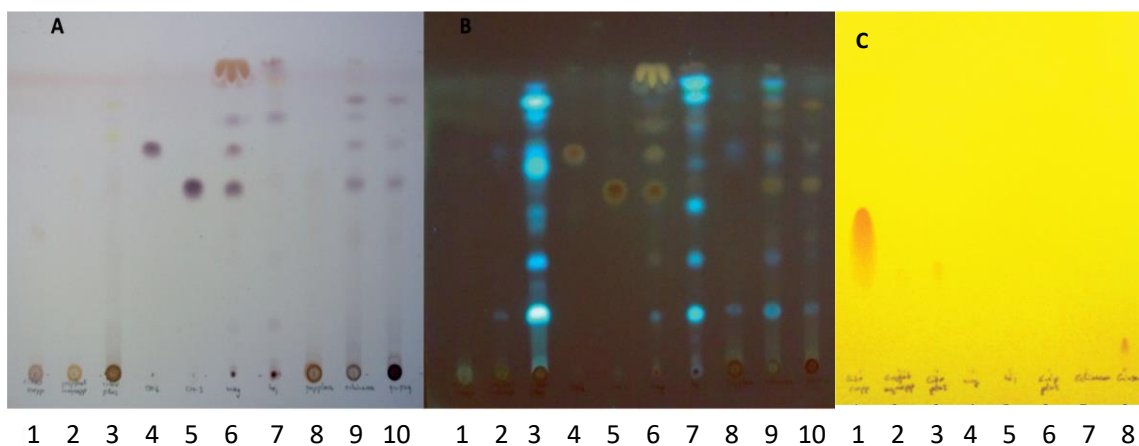
A testsúlycsökkentő hatás érdekében alkalmazott étrend-kiegészítők szibutramintartalomra való szűrésére többlépcsős vizsgálatot dolgoztunk ki.^{25*} Ennek első lépése a szilárd fázisú extrakciós tisztítás C18 állófázison. Ennek során a kloroformmal eluált szibutramin (**57**) elválasztható a növényi mátrix metanollal eluálódó komponenseitől. Az azonosítási vizsgálat első lépései a színreakciók. A Simon-teszt, amelyet szekunder aminok kimutatására használnak, a szibutramin (**57**) esetén bíbor színreakciót ad. A Chen-tesztben, amelyet az efedrin (**59**) amfetaminszármazékoktól való elkülönítését szolgálja, a szibutramin az utóbbiakhoz hasonlóan nem adott színreakciót. A Marquis-teszt, amely az amfetamin és gyűrűben szubsztituált analógjainak elkülönítését szolgálja, halványsárga színt eredményezett. A színreakciók a tiszta referenciavegyület és a szilárd fázisú extrakcióval előkészített minta esetén egyformák voltak, ami a mintaelőkészítés megfelelőségét igazolta. A szűrővizsgálat második lépése a rétegekromatográfiás vizsgálat. Erre a célra olyan rendszert dolgoztunk ki, amelyben a szibutramin (**57**) 0,53-as R_f-fel detektálható, és jól elválasztható az alacsonyabb R_f-el jellemezhető amfetaminszármazékoktól és neutrális növényi vegyületektől. Vizualizálásra a legalkalmasabb az intenzív narancssárga színreakciót adó Dragendorff-reagens és a szibutramint (**57**) sötétkék színnel kimutató savas kálium-jodoplatinát. Magasabb bizonyítottsági szintet és kvantifikálási lehetőséget is biztosít a HPLC-DAD vizsgálat, amelyben a szibutramint (**57**) retenciós ideje és UV-spektruma jellemzi. A módszer validálásának részeként meghatároztuk, hogy az 5,06–45,54 µg/injekt tartományban R² = 1,0000 mellett a kalibrációs egyenes lineáris. A precizitást az

ismételhetőséggel jellemeztük (RSD = 0,39), a pontosságot a 0,41-es RSD érték igazolta. A kimutatási vizsgálat következő lépcsőfoka a tömegspektrometriás azonosítás volt, amely során a szibutramin a m/z 280 $[M + H]^+$ és a fragmensionok jellegzetes m/z értékei³⁴⁶ alapján azonosítható. Amennyiben a termékből kimutatott szibutramin (**57**) izolálására is sor kerül, a legmagasabb szintű bizonyítást az NMR-vizsgálat és az adatoknak az általunk közölt teljes 1H és ^{13}C asszignációval való összehasonlítása és egyezése jelenti.

A grapefruitmag-kivonatot tartalmazó készítmények vizsgálatára kidolgozott módszer elsődleges célja a deklarált növényi anyag kimutatása volt, amely grapefruitmagra jellemző limonoidok kimutatásán (rétegekromatográfia, HPLC) alapult.^{26*} Hat kereskedelmi minta analízise során mindössze két (V, VI) termékből tudtuk

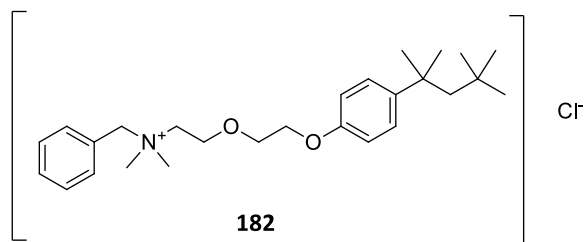


kimutatni a grapefruit fő limonoidjait [limonin (**180**), nomilin (**181**)] (**15. ábra**). Kénsavas előhívás után a limonoidok látható fényben kéesszürke, 366 nm-en barnás színűek. A rétegekromatográfiás eredményeket a HPLC-vizsgálat is megerősítette. További cél volt a szennyezésként vagy hamisítási céllal felhasznált grapefruithéj kimutatása a kumarintartalom rétegekromatográfiás szűrésével. Ezek a vegyületek, amelyek 366 nm-en kékes színűek, a III-V termékekben találhatóak meg, a II-ban fő komponensekként. A vizsgálat harmadik lépcsője az esetleges szintetikus tartósítószer-tartalom (kvaterner ammóniumsó) meghatározása volt.



15. ábra Rétegekromatográfiás vizsgálat limonoidok kimutatására. **A:** detektálás látható fényben cc. H_2SO_4 -vel való lepermetezést és hevítést követően; **B:** detektálás 366 nm-en cc. H_2SO_4 -vel való lepermetezést és hevítést követően; **C:** detektálás látható fényben Dragendorff-reagenssel való lepermetezést követően. **A–B:** 1–3: termékek (I–III); 4: nomilin; 5: limonin; 6: autentikus grapefruitmagkivonat; 7: grapefruithéjkivonat; 8–10: termékek (IV–VI); **C:** 1–3: termékek (I–III); 4: autentikus grapefruitmagkivonat; 5: grapefruithéjkivonat; 6–8: termékek (IV–VI).

Egyetlen (I) termék esetén detektáltunk markáns Dragendorff-pozitív összetevőt, ami kvaterner ammóniumsó jelenlétére is utalhatott. Ez esetben, autentikus standard híján a rétegekromatográfiásan kimutatott, Dragendorff-pozitív anyag izolálása és NMR

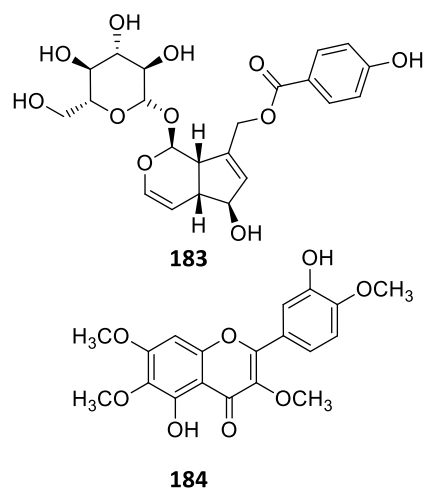


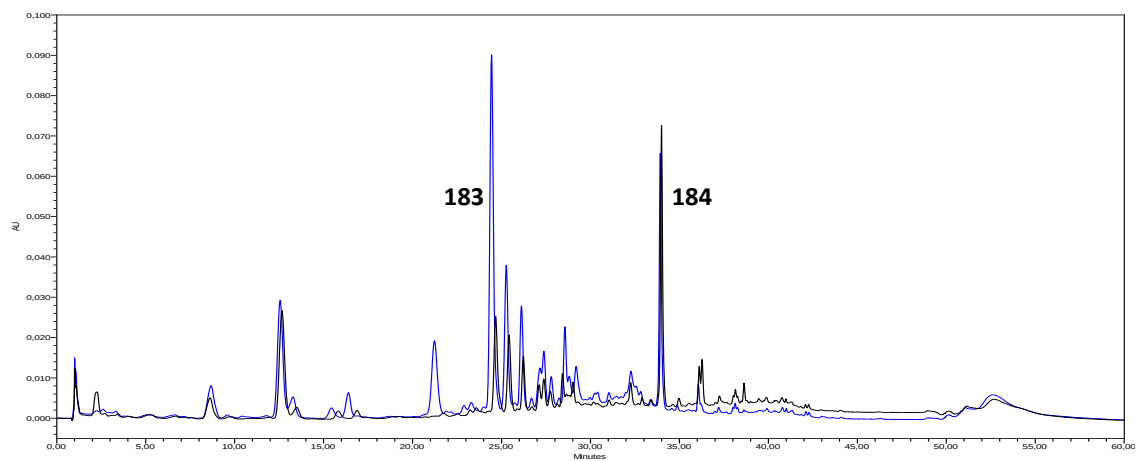
spektrális adatok alapján benzetónium-kloridként történő azonosítását végeztük el.³⁴⁷

5.2.9. Homeopátiás gyógyszerkészítmény aktívanyag-tartalmának mérése

Bár a homeopátiás gyógyszereket szabályozó joganyag nem zárja ki annak lehetőségét, hogy a homeopátiás készítmény jelentős, farmakológiai hatás kifejtésére is alkalmas hatóanyagot, adott esetben növényi kivonatot tartalmazzon, ennek gyakorlati relevanciájával nem foglalkoztak tudományos módszerekkel. Munkánk keretében két, barátcserje (*Vitex-agnus castus*) alapú gyógyszert hasonlítottunk össze analitikailag. Az egyik termék allopatíás, a másik homeopátiás gyógyszer volt. A termékek vizsgálatára HPLC módszert dolgoztunk ki, amely két markervegyület, az agnuzid (**183**) és a kaszticin (**184**) azonosításán és mérésén alapult. Lineáris kalibrációs egyeneseket határoztunk meg az agnuzid (**183**) (0,05–1 µg/injekt, $R^2 = 0.9994$) és a kaszticin (**184**) esetén (0,058–0,58 µg/injekt, $R^2 = 0.9996$). A módszer (napon belüli) precizitása 2,41, illetve 1,26 RSD%-kal volt jellemezhető a két vegyület esetén, az ismételhetség esetén az RSD 2,11–5,11 közötti volt. A csúcstisztaságot mindkét vegyület esetén mindkét termék esetén igazoltuk.^{27*}

A két termék ujjlenyomat-kromatogramja (**16. ábra**) nagyon hasonló volt. Az allopatíás termék és a homeopátiás termék napi dózisának átlagos agnuzid-tartalma 100,82 µg illetőleg 25,19 µg, míg a napi dózisok átlagos kaszticin-tartalma 42,95 µg és 47,03 µg volt. Utóbbi vegyület, amelynek szerepe lehet a klinikai hatásban, a két készítmény napi adagjában hasonló mennyiségben volt jelen. A kromatográfiás profilok alapján nehéz lenne különbséget tenni az allopatíás és a homeopátiás készítmény között, azonban az kimutatható, hogy a két termék némileg különböző barátcserje kivonatot tartalmaz, hiszen az agnuzid-kaszticin arány különbözik.





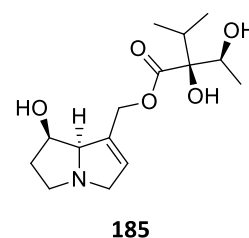
16. ábra Allopátiás (kék) és homeopátiás (fekete) *Vitex agnus-castus* tartalmazó termékek HPLC-kromatogramja (254 nm)

5.3. *In vitro* farmakológiai és toxikológiai és biofarmáciai vizsgálatok

5.3.1. Pirrolizidin-alkaloidok felszívódásával kapcsolatos vizsgálatok

A közismert májkárosító hatással rendelkező pirrolizidin-alkaloidokat tartalmazó fekete nadálytő biztonságos alkalmazásának reális értékeléséhez elengedhetetlenül szükségesek a külsőleges alkalmazással kapcsolatosan releváns farmakokinetikai vizsgálatok. Munkánk keretében humán epidermiszen tanulmányoztuk a fekete nadálytő egyik fő alkaloidjának, a likopszaminnak (**185**) a felszívódását.

A likopszamin (**185**) a felszívódási vizsgálatok során modell-vegyületként alkalmaztuk, mérésére validált LC-MS módszert dolgoztunk ki.^{28*} Állófázisként C-18 töltetű oszlopot alkalmaztunk, 0,1% ecetsavat tartalmazó acetonitril és víz 1:1 arányú elegyével, izokratikus elúció mellett. A detektálást ESI pozitív módban, a likopszaminra jellemző m/z

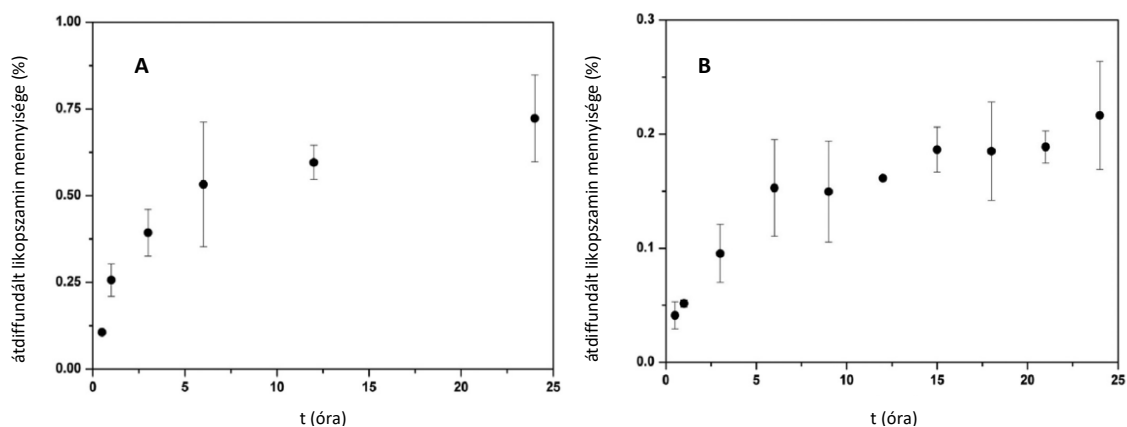


300→156 átmenetet MRM módban regisztrálva végeztük. Meghatároztuk a kalibrációs egyenes linearitási tartományát (1,32–3960 ng/injekt tartományon belül 1,32–440 ng/ injekt, $R^2 = 0,9999$ mellett), amely a biológiai minták esetén várható kis anyagmennyiségek mérését is lehetővé tette, viszonylag tág koncentrációtartományban, 0,014 ng-s kimutatási és 0,070 ng meghatározási határokkal. Az egy napon belüli (0,57–2,48 RSD%) és napok közötti precízió (1,70–1,95 RSD%) értékei a módszer megbízhatóságát támasztják alá. A pontosságot igazolja a likopszamin 97,7–104,3%-os visszanyerési aránya.

Az analitikai módszer birtokában célunk az volt, hogy egy standard készítmény alkalmazásával tanulmányozzuk a fekete nadálytő egyik fő alkaloidjának, a likopszaminnak (**185**) a penetrációját humán epidermiszen. A vizsgálat folyamán a legrosszabb forgatókönyv elvét követve több növényi minta alkaloidtartalmát megvizsgáltuk, majd a legmagasabb alkaloidtartalmú drog (101 µg/g) felhasználásával készítettük el kísérleti készítményünket, amely minőségileg megfelelt az Európai Gyógyszerügynökség monográfiájában leírt egyik külsőlegesen alkalmazható referenciakészítménynek (10%, 65%-os etanollal készített, 1:1 DER-rel jellemezhető kivonatot tartalmazó kenőcs).³⁴⁸ A penetrációs vizsgálatot vertikális Franz diffúziós cella alkalmazásával, szintetikus membránon és humán hasi bőrről (2 páciens) eltávolított epidermiszen végeztük. Az akceptor fázisban a likopszamin (**185**) mennyiségét (időben) többszöri mintavétel után mértük.^{29*}

A szintetikus membránon és a humán epidermiszen átdiffundált likopszamin (**185**) mennyiségi adatai a **17. ábrán** láthatóak (utóbbi esetben a 2 páciensből származó mintákon, mérési pontonként 5–5 párhuzamos cella adatai). A likopszamin átdiffundált mennyisége telítési

görbével jellemezhető, a szintetikus membrán esetén valamivel magasabb értékekkel (a felületre felvitt össz mennyiség 0,11–0,72% versus 0,04%–0,22%-a).



17. ábra Szintetikus membránon (A) és humán epidermiszen átdiffundált liposzamin kumulatív mennyisége

Az általunk nyert eredmények az első humán vonatkozású adatok a külsőlegesen alkalmazott, pirrolizidinalkaloid-tartalmú készítményekkel kapcsolatban, s ezek hozzájárulhatnak ahhoz, hogy a biztonságossági elemzések a jelenleginél racionálisabb alapon történjenek meg.

5.3.2. Mohaminták és vegyületeik antiproliferatív és antimikróbás hatásának szűrővizsgálata

A kutatás során 42 hazai moha faj 168 kivonatának tanulmányoztuk antiproliferatív (MTT-teszt) és antibakteriális (korondiffúziós teszt) hatását.^{30*} Az antiproliferatív hatást humán cervikális (HeLa), petefészek (A2780) és emlődaganat (T47D) sejtvonalakon, két koncentrációban (10 és 30 µg/ml) tanulmányoztuk (**12. táblázat**). Minden faj esetén vizsgáltuk az *n*-hexánnal (A), kloroformmal (B), metanollal (C) és vízzel (D) készült kivonataik hatását. 41 faj 98 kivonata mutatott legalább 25% mértékű antiproliferatív hatást legalább egy sejtvonalon 10 µg/ml koncentrációban. Az A/B/C/D kivonatok között az aktívak aránya 24/38/20/16 volt, azaz a kloroformos kivonatok között volt a legtöbb hatásos. 17 faj 25 kivonata esetén a gátló hatás elérte az 50%-ot. Ilyen mértékű aktivitás elsősorban a B (13) és A (7) kivonatokra volt jellemző. Hat faj, a *Brachythecium rutabulum*, *Climacium dendroides*, *Encalypta streptocarpa*, *Pleurozium schreberi* (A és B), *Neckera bessi* és *Pseudoleskeella nervosa* (A, B és C) esetén legalább két kivonat volt aktív. 30 µg/ml koncentrációban 25 faj 36 mintája volt inaktív, ezek zöme (25) D kivonat volt. A legmagasabb aktivitást (HeLa sejtek 78,54%-os gátlása 10 µg/ml-ben) a *Paraleucobryum longifolium* B kivonata esetén mértük, a növény egyéb extraktumai ugyanakkor nem rendelkeztek jelentős aktivitással.

12. táblázat Mohakivonatok antiproliferatív hatása különböző sejtvonalakon 72 óra expozíciót követően (az >25% gátlást sárga-zöld szín jelöli, az inaktivitást piros)

Faj	A kivonat						B kivonat					
	HeLa		A2780		T47D		HeLa		A2780		T47D	
	10	30	10	30	10	30	10	30	10	30	10	30
	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
<i>Abietinella abietina</i>	<25	<25	<25	<25	<25	32,26	30,00	38,62	<25	<25	42,99	48,97
<i>Amblystegium serpens</i>	<25	46,13	29,58	49,94	49,15	70,15	61,93	70,78	53,46	65,35	70,15	74,76
<i>Anomodon viticulosus</i>	26,96	50,72	<25	<25	<25	27,81	27,04	49,35	32,35	53,87	<25	36,32
<i>Atrichum undulatum</i>	<25	<25	<25	<25	<25	41,66	59,93	76,26	37,78	64,28	64,11	65,26
<i>Barbula unguiculata</i>	45,74	63,27	<25	<25	<25	34,14	65,46	75,11	<25	47,47	44,20	53,16
<i>Brachytheciastrum velutinum</i>	31,92	64,96	<25	35,58	<25	41,01	34,43	55,09	<25	61,29	34,43	51,51
<i>Brachythecium rutabulum</i>	53,49	61,64	25,04	34,93	45,40	55,36	51,95	53,89	<25	35,30	46,79	54,92
<i>Bryum argenteum</i>	47,79	80,09	<25	<25	<25	<25	36,11	54,52	<25	<25	35,95	41,26
<i>Bryum caespitium</i>	30,37	57,84	<25	<25	<25	48,80	48,64	59,57	<25	<25	28,58	48,17
<i>Bryum moravicum</i>	<25	38,27	<25	<25	<25	29,73	46,72	62,09	27,34	48,22	40,64	59,69
<i>Calliergonella cuspidata</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	32,79	<25	<25	39,02	49,49
<i>Ceratodon purpureus</i>	<25	26,67	<25	32,49	<25	28,88	30,67	42,00	<25	35,18	<25	28,48
<i>Cirriphyllum piliferum</i>	51,34	67,39	<25	42,24	<25	31,19	<25	28,32	<25	<25	<25	<25
<i>Climacium dendroides</i>	52,79	63,79	<25	32,63	<25	<25	56,79	64,89	<25	<25	55,46	57,16
<i>Dicranum tauricum</i>	<25	<25	<25	28,55	<25	31,60	33,14	51,60	<25	48,94	35,38	54,93
<i>Encalypta streptocarpa</i>	76,66	61,32	34,04	87,90	25,72	44,08	54,46	72,90	73,72	80,12	33,22	33,27
<i>Funaria hygrometrica</i>	<25	39,84	<25	<25	<25	36,21	48,44	62,88	25,66	51,06	46,44	53,18
<i>Homalothecium lutescens</i>	<25	37,79	<25	31,59	<25	30,29	<25	<25	<25	<25	28,74	30,64
<i>Homalothecium philippeanum</i>	38,34	63,66	<25	40,77	37,39	48,19	46,93	73,77	33,60	74,93	63,90	62,51
<i>Hygroamblystegium tenax</i>	<25	51,08	<25	26,53	28,34	43,75	36,99	43,86	<25	<25	49,19	55,28
<i>Leskea polycarpa</i>	<25	29,00	<25	37,18	<25	25,71	<25	31,32	<25	35,02	<25	37,07
<i>Leucodon sciurioides</i>	26,00	43,88	<25	<25	<25	34,43	42,48	61,74	<25	<25	28,88	39,63
<i>Neckera bessi</i>	54,29	68,98	<25	<25	33,72	38,33	69,13	83,28	<25	76,48	50,07	68,26
<i>Orthotrichum diaphanum</i>	<25	28,22	<25	<25	<25	<25	40,19	51,75	25,04	50,65	35,43	40,61
<i>Oxyrrhynchium hians</i>	<25	50,41	<25	42,22	26,03	46,46	25,65	39,79	<25	28,61	34,01	46,64
<i>Paraleucobryum longifolium</i>	<25	27,34	<25	<25	<25	<25	78,54	83,93	63,23	78,03	46,84	56,87
<i>Plagiomnium affine</i>	<25	41,79	<25	<25	<25	<25	42,41	55,53	<25	42,11	42,49	56,05
<i>Plagiomnium cuspidatum</i>	39,13	39,44	26,49	97,60	<25	86,33	<25	<25	<25	56,15	<25	36,11
<i>Plagiomnium rostratum</i>	26,01	60,72	<25	44,99	28,68	36,26	46,52	60,22	43,23	67,06	45,56	54,59
<i>Plagiomnium undulatum</i>	35,77	33,42	<25	26,07	29,36	43,49	<25	<25	<25	33,21	<25	32,10
<i>Pleurozium schreberi</i>	61,85	93,41	41,15	37,25	<25	31,65	60,49	74,30	<25	36,89	29,26	43,95
<i>Pohlia nutans</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	29,51	49,60	<25	<25	<25	<25
<i>Polytrichastrum formosum</i>	<25	34,69	<25	<25	<25	28,85	<25	34,18	<25	<25	<25	<25
<i>Porella platyphylla</i>	31,89	79,22	48,22	83,33	48,94	64,37	35,69	47,36	<25	41,93	29,33	47,86
<i>Pseudoleskeella nervosa</i>	68,43	75,64	<25	<25	38,94	43,69	61,71	71,88	<25	36,28	42,77	45,50
<i>Pseudoscleropodium purum</i>	<25	34,16	<25	<25	<25	<25	62,06	70,27	<25	28,01	53,88	54,58
<i>Rhytidiadelphus squarrosus</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	43,99	53,66	<25	<25	40,31	51,65
<i>Rhytidium rugosum</i>	32,34	56,50	<25	36,29	<25	25,80	30,20	39,48	<25	<25	<25	27,52
<i>Schistidium crassipilum</i>	<25	33,32	<25	<25	<25	<25	27,52	53,09	<25	72,36	<25	38,36
<i>Syntrichia ruralis</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	27,05	33,02	<25	<25	30,49	39,25
<i>Thamnobryum alopecurum</i>	29,98	57,12	<25	26,75	<25	<25	34,35	53,87	<25	51,91	<25	<25
<i>Thuidium assimile</i>	<25	<25	<25	29,18	<25	<25	43,36	57,09	34,62	58,86	65,70	56,12
Faj	C kivonat						D kivonat					

	HeLa		A2780		T47D		HeLa		A2780		T47D	
	10	30	10	30	10	30	10	30	10	30	10	30
	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
<i>Abietinella abietina</i>	35,25	52,48	<25	<25	38,22	49,01	<25	<25	<25	<25	<25	30,04
<i>Amblystegium serpens</i>	33,19	44,83	<25	26,71	48,58	58,34	<25	<25	<25	<25	27,91	35,73
<i>Anomodon viticulosus</i>	<25	34,02	<25	<25	<25	27,47	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Atrichum undulatum</i>	29,14	41,65	<25	46,14	<25	37,95	33,37	36,14	<25	<25	<25	<25
<i>Barbula unguiculata</i>	29,68	35,91	<25	<25	<25	27,68	27,92	27,4	<25	<25	<25	<25
<i>Brachytheciastrum velutinum</i>	<25	32,09	<25	<25	27,26	34,7	34,9	34,68	<25	<25	38,53	38,46
<i>Brachythecium rutabulum</i>	<25	34,26	<25	<25	<25	34,81	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Bryum argenteum</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Bryum caespiticium</i>	<25	35,57	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Bryum moravicum</i>	<25	37,94	<25	<25	<25	26,51	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Calliergonella cuspidata</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Ceratodon purpureus</i>	<25	<25	<25	<25	<25	31,86	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Cirriphyllum piliferum</i>	28,18	42,07	<25	<25	<25	26,85	<25	32,27	<25	<25	<25	<25
<i>Climacium dendroides</i>	<25	<25	<25	<25	<25	27,68	<25	27,42	<25	<25	27,38	37,52
<i>Dicranum tauricum</i>	<25	28,29	<25	<25	33,52	49,97	29,75	37,11	<25	<25	45,31	47,21
<i>Encalypta streptocarpa</i>	28,01	39,61	<25	<25	<25	32,5	27,05	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Funaria hygrometrica</i>	<25	<25	<25	<25	42,27	48,22	25,11	38,47	<25	<25	35,4	45,16
<i>Homalothecium lutescens</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	27,6
<i>Homalothecium philippeanum</i>	<25	33,51	<25	28,04	43,32	51	<25	<25	<25	<25	33,68	41,04
<i>Hygroamblystegium tenax</i>	26,66	38,22	<25	<25	52,69	55,03	<25	31,71	<25	<25	37,34	40,38
<i>Leskea polycarpa</i>	25,62	31,09	<25	<25	<25	34,12	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Leucodon sciurioides</i>	<25	29,98	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Neckera besseri</i>	37,13	41,25	<25	<25	54,5	55,63	<25	<25	<25	<25	32,28	43,28
<i>Orthotrichum diaphanum</i>	<25	40,79	<25	<25	<25	28,2	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Oxyrrhynchium hians</i>	<25	<25	<25	<25	<25	29,53	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Paraleucobryum longifolium</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Plagiomnium affine</i>	42,04	50,67	<25	26,86	53,3	57,53	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Plagiomnium cuspidatum</i>	35,49	46,35	<25	<25	33,53	45,9	<25	<25	<25	<25	<25	27,79
<i>Plagiomnium rostratum</i>	40,44	51,65	<25	42,42	33,23	45,84	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Plagiomnium undulatum</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Pleurozium schreberi</i>	<25	32,99	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Pohlia nutans</i>	<25	32,63	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Polytrichastrum formosum</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Porella platyphylla</i>	<25	41,69	<25	<25	<25	27,66	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Pseudoleskeella nervosa</i>	60,51	65,03	<25	26,27	49,89	54,5	<25	<25	<25	<25	<25	25,43
<i>Pseudoscleropodium purum</i>	<25	28,06	<25	<25	<25	31,29	<25	29,89	<25	<25	32,22	40,05
<i>Rhytidiadelphus squarrosus</i>	<25	26,56	<25	<25	<25	33,78	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Rhytidium rugosum</i>	<25	33,67	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Schistidium crassipilum</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
<i>Syntrichia ruralis</i>	<25	<25	<25	<25	<25	<25	30,83	41,17	<25	<25	57,42	59,35
<i>Thamnobryum alopecurum</i>	<25	31,9	<25	<25	<25	<25	26,26	40,68	<25	<25	<25	<25
<i>Thuidium assimile</i>	<25	<25	<25	34,23	29,78	43,24	<25	<25	<25	<25	32,28	44,58

Ez a kivonat mindegyik sejtvonalon hatásos volt ebben a koncentrációban, ráadásul a 10 és 30 µg/ml esetén mért aktivitások nem tértek el nagyon (46,84–78,54% vs 56,87–83,93%). A daganatsejtek kivonatokkal szembeni érzékenységét tekintve megállapítható, hogy HeLa (16 kivonat >50% gátlás) és T47D (10) esetén gyakoribb volt a gátlás, mint A2780 (3) ellen. HeLa-n 16, T47D-n 10, A2780-on mindössze 3 kivonat fejtett ki >50% gátlást 10 µg/ml-ben. A vizsgált családok közül a Brachytheciaceae (*Brachythecium rutabulum*, *Homalothecium philippeanum* és *Pseudoscleropodium purum*) és az Amblystegiaceae (*Amblystegium serpens* és *Hygroamblystegium tenax*) szolgáltatta a legtöbb aktív kivonatot.

A mohakivonatok 11 baktériumtörzsön vizsgált antibakteriális hatása gyenge volt és sporadikus. A 42 fajból mindössze 15 taxon 19 mintája esetén mutattunk ki mérsékelt antibakteriális hatást (**13. táblázat**). Egyetlen kivonat sem volt aktív *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 35218 és *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 ellen, viszont a meticillinrezisztens *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 és a *S. aureus* ATCC 29213 viszonylag érzékeny volt az extraktumokra. A legaktívabb (8 törzsön) a *Plagiomnium cuspidatum* volt.

13. táblázat A vizsgált kivonatok antibakteriális hatásai (a gátlási zónák milliméterben kifejezve)

Faj	Kivonat	MRSA	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>M. catarrhalis</i>
		ATCC 43300	ATCC 29213	ATCC 12228	ATCC 6633	ATCC 19615	ATCC 49619	ATCC 13813	ATCC 43617
<i>Amblystegium serpens</i>	B	—	—	—	—	—	—	—	9,0
<i>Brachythecium rutabulum</i>	B	9,0	9,0	—	—	—	—	—	—
<i>Calliigonella cuspidata</i>	A	—	7,3	—	—	—	—	—	—
	B	—	7,0	—	—	—	—	—	—
<i>Cirriphyllum piliferum</i>	B	—	—	—	—	—	7,0	—	—
<i>Climacium dendroides</i>	A	—	7,3	—	—	—	—	—	—
<i>Dicranum tauricum</i>	B	—	—	—	—	—	8,0	—	—
<i>Oxyrrhynchium hians</i>	A	8,6	8,6	—	—	—	—	—	—
	B	—	8,0	—	—	—	—	—	—
<i>Paraleucobryum longifolium</i>	B	9,6	9,6	—	—	11,6	—	—	—
<i>Plagiomnium affine</i>	B	—	—	—	8,0	—	8,5	—	—
<i>Plagiomnium cuspidatum</i>	A	11,3	10,7	9,0	9,0	10,0	12,0	10,0	10,0
	B	7,6	7,6	—	—	—	—	—	—
<i>Plagiomnium undulatum</i>	A	7,0	8,0	—	—	—	—	—	—
	B	—	8,0	—	—	—	—	—	—
<i>Pseudoscleropodium purum</i>	A	—	7,3	—	—	—	—	—	—
<i>Rhytidium rugosum</i>	B	—	—	—	7,5	—	8,0	—	7,5
<i>Schistidium crassipilum</i>	B	8,0	7,0	—	9,0	—	11,5	—	7,7

A szűrővizsgálat során perspektivikus bioaktivitásokat mutató *Paraleucobryum longifolium*ból kinyert 5 fenatrénszármazék, a leukobrin A–E (**102–106**) esetén antiproliferatív hatásra irányuló vizsgálatot végeztünk. A vegyületek hatását 30 és 60 μM koncentrációban nőgyógyászati eredetű daganatsejteken (SiHa, HeLa, A2780 és MDA-MB-231) tanulmányoztuk. A leukobrin A (**102**) közel 70%-os és azt meghaladó mértékben gátolta a sejtproliferációt a magasabb koncentrációban (IC_{50} = 40,4–50,8 μM). A leukobrin B (**103**) és C (**104**) esetén ebben a koncentrációban legfeljebb 60%-os aktivitás volt kimutatható (mind a négy sejtvonalon csak a leukobrin B (**103**) hatott a két vegyület közül), a leukobrin D (**105**) és E (**106**) elhanyagolható hatású volt. A ciszplatin 30 μM koncentrációja esetén kimutatott 90%-os és azt meghaladó proliferációgátlást és 1,3–12,4 μM IC_{50} értékeket tekintve ezek az aktivitások **102** és **103** vegyületek esetében mérsékeltnek tekinthetők, a többi vegyületnél elhanyagolhatóak.

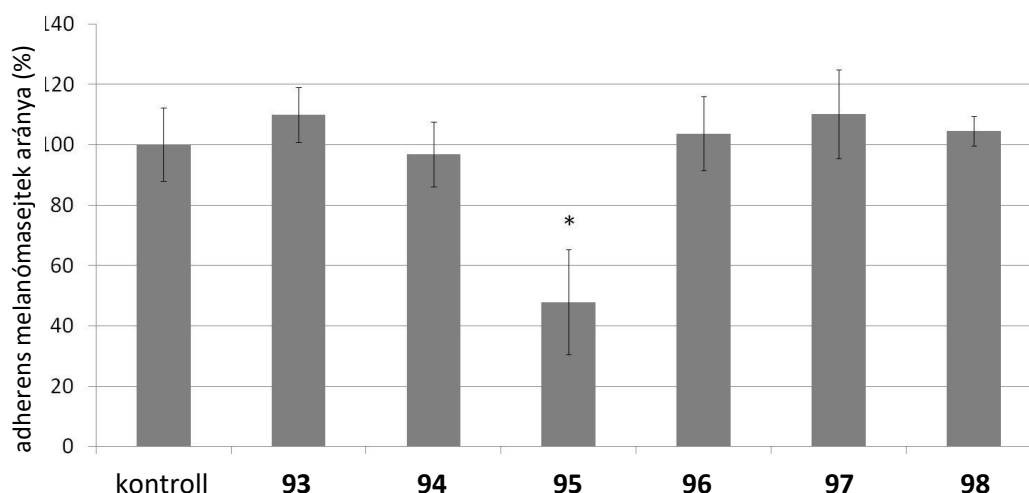
14. táblázat A *P. longifolium*ból izolált fenatrének *in vitro* antiproliferatív hatása nőgyógyászati daganatos sejtvonalakon

Vegyület	koncentráció	Gátlás (%) $\pm$ SEM			
		SiHa	HeLa	A2780	MDA-MB-231
102	60 μM	69,34 $\pm$ 1,14	80,41 $\pm$ 2,20	86,43 $\pm$ 0,46	76,04 $\pm$ 0,61
103	60 μM	22,44 $\pm$ 0,69	37,48 $\pm$ 2,03	16,38 $\pm$ 2,44	59,80 $\pm$ 0,71
104	60 μM	–	31,63 $\pm$ 1,36	–	–
ciszplatin	30 μM	90,18 $\pm$ 7,78	99,93 $\pm$ 0,26	95,02 $\pm$ 0,28	87,75 $\pm$ 1,10

5.3.3. Lignánok hatása a daganatos áttétképződésre

A *Heliopsis helianthoides* var *scabrá*ból izolált lignánok (**93–98**) áttétképződést gátló hatását *in vitro* melanoma agyi metasztázis modellen vizsgáltuk.^{5*} Elsőként azt igazoltuk, hogy az elemzés alá vont vegyületek nem befolyásolják a sejt életképességét, azaz az eredményeket nem torzítja citotoxikus hatás. Egy sebgyógyulási tesztben kimutattuk, hogy **95** és **96** lignán gátolja a daganatsejtek migrációját. Mindkét vegyület, 2, 5 és 10 μM koncentrációban egyaránt szignifikáns gátló hatást fejtett ki a lignánokat nem tartalmazó kontrollhoz viszonyítva.

Egy következő kísérletben a A2058 humán melanómasejtek D3 humán agyi endotélsejtekhez való adhézíóját vizsgáltuk a tanulmányozott vegyületek jelenlétében. A sejteket előkezeltük a lignánokkal (3 óra), majd a vegyületek az adhézíós vizsgálat teljes időtartama (80 min) alatt jelen voltak a közegben (**18 ábra**). A **95** vegyület már 2 μM koncentrációban szignifikánsan csökkentette a melanómasejtek adhézíóját az endotélréteghez, míg a többi vegyület nem mutatott ilyen hatást. A további vizsgálatokat a fent bemutatott két kísérletben aktív **95** és **96** vegyületekkel végeztük.

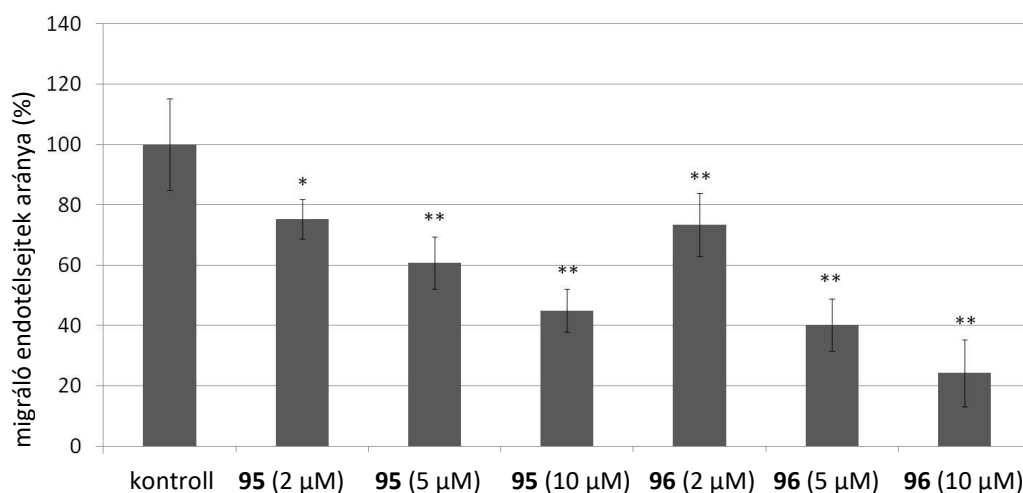


18 ábra Melanómasejtek agyi endotélsejtekhez való adhézioja lignánok (10 µM) jelenlétében (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, varianciaanalízis és Bonferroni post hoc teszt)

A **95** vegyület hatásának részletesebb vizsgálatának részeként a melanóma sejteket 5 µM, a D3 sejteket 2 µM koncentrációjú oldattal kezeltük elő, majd a vizsgálat során a lignánt 2 µM koncentrációban alkalmaztuk. Amennyiben csak a daganatsejt volt előkezelve, az adhézio nem csökkent jelentősen, azonban az agyi endotélsejtek ($p < 0,05$), vagy az endotélsejtek és melanómasejtek együttes előkezelése, továbbá a kettős előkezeléssel párosított kísérlet alatti kezelés szignifikáns gátlást ($p < 0,01$) eredményezett a kezeletlen kontrollhoz képest.

A megfelelően működő agyi endotélsejtek jelentik a vér-agy gát (BBB) alapját, ezért a lignánok antimetasztatikus hatásának feltárása érdekében endotélrétegre kifejtett hatását külön tanulmányoztuk. A BBB integritását a transzendentaliális elektromos ellenállás (TEER) mérésével határoztuk meg, amit elterjedten használnak a paracelluláris sejtilleszkedés jellemzésére. Patkány agyi endotélsejtréteg (RBEC) **95**-tel (5 µM) való 2 órán át tartó előkezelése után a TEER 15-20%-kal nőtt ($p < 0,01$) a kontrollhoz képest. A **96** esetén is szignifikáns, de enyhébb ($p < 0,05$) hatás volt tapasztalható. A szoros sejtkapcsolatok egyik fontos része a ZO-1 fehérje, amelynek fokozott jelenlétét mutattuk ki immunfluoreszcens vizsgálatokkal a szomszédos endotélsejtek sejt-sejt kapcsolataiban 5 µM **95**-tel vagy **96**-tal végzett kezelés esetén, mint a kezelést nem kapott sejteknél. **95** már 2 µM koncentrációban ugyanilyen hatást fejtett ki humán D3 sejteken is.

A metasztázis kialakulásának fontos lépése a tumor vaszkularizációja. Ennek folyamata az endotélsejtek migrációjának gátlásával gátolható/lassítható, ezért a két, korábbi tesztekben perspektivikus hatású lignán (**95** és **96**) migrációgátló hatását 24 órás sebgyógyulási tesztben elemeztük. Mindkét vegyület szignifikánsan és koncentrációfüggő módon (a 2–5–10 µM tartományban) gátolta a D3 agyi endotélsejtek migrációját (**19. ábra**).



19. ábra A 95 és 96 lignánok hatása az endotélsejtek migrációjára, a lignánnal nem kezelt kontrollhoz viszonyítva (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, varianciaanalízis és Bonferroni post hoc teszt)

5.3.4. Lipoalkaloidok *in vitro* gyulladáscsökkentő hatása

Az általunk előállított lipoalkaloidok COX-1-, COX-2- és 5-LOX-gátló hatását *in vitro* tesztendszerekben tanulmányoztuk a metabolitok (PGE_2 és LTB_4) mérésével. Összehasonlításként a diészter-típusú akonitin (1), valamint annak feldolgozása során képződő származékok, a 14-benzoilakonin (4) és az akonin (5), továbbá feldolgozott és feldolgozatlan sisakvirágyökök extraktumainak bioaktivitását is vizsgáltuk. A növényi kivonatok viszonylag jelentős COX-2 gátló hatást mutattak, ami a feldolgozás hatására fokozódott (csakúgy, mint a kivonat kezdetben jelentéktelen COX-1 gátló aktivitása). Az akonitin (1), valamint a 14-benzoilakonin (4) és az akonin (5) gátló aktivitásai igen mérsékeltek voltak, ezeknek a vegyületeknek nincs jelentős szerepe az esetleges gyulladáscsökkentő hatásban.^{11*}

A lipoalkaloidok közül a COX-1-gátlást vizsgáló tesztben a 14-benzoilakonin-8-*O*-eikozapentaenoát (172) fejtette ki a legnagyobb, a feldolgozott sisakvirágyökérét meghaladó gátló hatást, a többi vegyület hatása. lánchosszúságtól és telítetlenségtől függetlenül elhanyagolható volt (15. táblázat). A COX-2 tesztben a 14-benzoilakonin-8-*O*-eikozapentaenoáton (172) kívül a 14-benzoilakonin-8-*O*-linoleát (158) mutatott kimagasló aktivitást, ezeket a dokozaheptaenoát-származék (173) követte. Az 1-3-szorosan telítetlen zsírsavakat tartalmazó vegyületek mérsékelt aktivitásúak voltak, míg a telített acilsubstituenst tartalmazók inaktívak voltak. Az LTB_4 -képződést vizsgáló tesztben mindegyik lipoalkaloid mutatott aktivitást. Legaktívabbnak a 14-benzoilakonin-8-*O*-dokozaheptaenoát (173) bizonyult, az észterező zsírsav lánchossza és a gátló aktivitás között gyenge korreláció volt megfigyelhető.^{12*}

Eredményeink rámutatnak arra, hogy a lipoalkaloidoknak szerepe lehet a sisakvirágyökér tradicionális gyógyászatban hasznosított gyulladáscsökkentő hatásában, ugyanakkor az észterező savnak kulcsjelentősége van az aktivitásban.³⁴⁹ Az eredmények relevanciáját az is alátámasztja,

hogy az általunk egereken meghatározott akut toxicitás a lipoalkaloidok esetén több nagyságrenddel alacsonyabb, mint az akonitiné **(1)** (iv. letális egyszeri dózis >10 mg/kg vs. 0,3 mg/kg). Mivel a feldolgozás során nő a nem toxikus, ugyanakkor a potenciálisan gyulladáscsökkentő lipoalkaloidok mennyisége, a toxicitásért felelős diészter-alkaloidoké pedig csökken, a Távol-Keleten alkalmazott feldolgozási módszerek alkalmazása ilyen szempontból racionálisnak tekinthető.^{11*}

15. táblázat *Aconitum carmichaelii* gyökérkivonatok (50 µg/ml) és alkaloidok (50 µM) COX-1-, COX-2- és 5-LOX- gátló hatásai

Minta	COX-1 gátlás (%±SD)	COX-2 gátlás (%±SD)	5-LOX gátlás (%±SD)
Feldolgozatlan sisakvirággyökér-kivonat	7,21±7,64	47,86±2,60	35,79±6,85
Feldolgozott sisakvirággyökér-kivonat	24,42±2,47	65,45±3,26	35,38±5,96
Akonitin (1)	-4,25±4,64	9,96±8,31	-0,39±6,97
14-Benzoilakonin (4)	-2,53±6,21	14,77±5,30	-6,03±6,52
Akonin (5)	2,92±7,81	12,27±4,16	-5,57±9,55
14-Benzoilakonin-8-O-laurát (166)	-29,8±5,7	-8,0±5,6	33,5±11,2
14-Benzoilakonin-8-O-mirisztát (167)	-25,3±21,6	-4,0±15,1	35,9±9,8
14-Benzoilakonin-8-O-sztearát (168)	-33,5±39,3	-3,5±10,2	52,5±5,9
14-Benzoilakonin-8-O-palmitát (169)	1,6±2,8	4,2±4,9	25,8±5,8
14-Benzoilakonin-8-O-palmitoleát (170)	-18,8±8,7	17,1±9,0	34,5±6,5
14-Benzoilakonin-8-O-oleát (159)	-24,3±17,0	15,3±28,9	45,5±4,6
14-Benzoilakonin-8-O-linoleát (158)	2,6±6,7	72,2±3,2	19,6±6,8
14-Benzoilakonin-8-O-α-linolenát (157)	-5,9±20,7	22,0±7,8	48,0±1,9
14-Benzoilakonin-8-O-γ-linolenát (171)	-11,8±22,8	12,7±4,9	34,7±1,7
14-Benzoilakonin-8-O-eikoza-5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-pentaenoát (172)	54,5±24,4	66,1±3,5	46,0±3,3
14-Benzoilakonin-8-O-dokoza-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-hexaenoát (173)	15,1±24,2	40,2±8,8	61,0±7,9

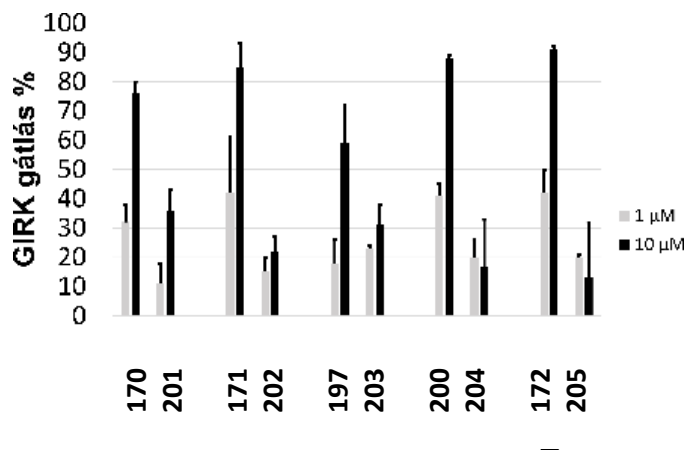
5.3.5. Diterpén-alkaloidok és lipolalkaloidok ioncsatornákra kifejtett hatása

Az általunk növényi mintából kinyert vagy előállított alkaloidok bioaktivitását a kardiotoxicitás szempontjából jelentős hERG-, az antiaritmiás felhasználás szempontjából perspektivikus GIRK-káliumioncsatornákon, valamint a Nav1.2 nátriumioncsatornán tanulmányoztuk. A hERG ioncsatorna esetén >40% mértékű gátlás a genuin alkaloidok közül csak az akonitin **(1)** esetén volt megfigyelhető. Ez utóbbi megfigyelés egy adalék ahhoz, hogy miért tartják az akonitint a legtoxikusabb diterpén-alkaloidnak. A sisakvirágdrogok feldolgozása során potenciálisan képződő lipoalkaloidok (pontosabban azok általunk félszintetikus előállított képviselői) és az akonitin **(1)** hőkezelésével keletkező piroakonitin **(11)** is alacsonyabb hERG-csatornagátló aktivitást mutattak (a lipoalkaloidok közül 3 kivétellel), ami a hagyományos keleti gyógyászatban alkalmazott feldolgozás eredményességét támasztja alá. A monoészter szeptentriodin **(7)**, ajacin **(81)**, akotoxinin **(186)** és dolakonin **(68)** szintén mérsékelten gátolta ezt az ioncsatornát.^{2*}

16. táblázat. Alkaloidok GIRK and hERG ioncsatornákat gátló hatása

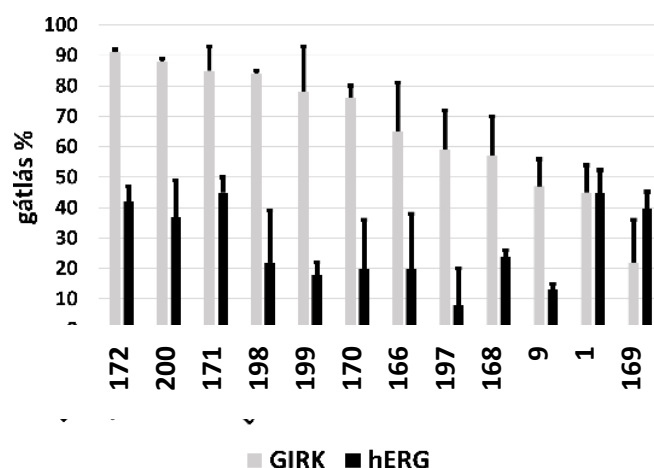
Vegyület	GIRK gátlás (%)		hERG gátlás (%)			Na _v 1.2 gátlás (%)
	1 μ M	10 μ M	1 μ M	10 μ M	30 μ M	10 μ M
akonitin (1)	15 $\pm$ 9	45 $\pm$ 9	-	45 $\pm$ 7	-	25 $\pm$ 3
szeptentriodin (7)	23 $\pm$ 10	37 $\pm$ 13	-	21 $\pm$ 1 ^a	-	43 $\pm$ 6
szongorin (9)	9 $\pm$ 8	31 $\pm$ 16	-	13 $\pm$ 2 ^a	-	18 $\pm$ 6
piroakonitin (11)	-	-	-	19 $\pm$ 2	-	57 $\pm$ 2
akotoxinin (65)	13 $\pm$ 6	28 $\pm$ 6	-	17 $\pm$ 3 ^a	-	28 $\pm$ 3
delavakonitin (66)	16 $\pm$ 4	32 $\pm$ 9	-	-	-	-
dolakonin (68)	13 $\pm$ 20	18 $\pm$ 17	-	8 $\pm$ 1 ^a	-	6 $\pm$ 5
akozonin (69)	14 $\pm$ 5	24 $\pm$ 6	-	15 $\pm$ 4 ^a	-	18 $\pm$ 6
neolinin (70)	13 $\pm$ 2	25 $\pm$ 4	-	36 $\pm$ 5 ^a	-	16 $\pm$ 6
10-hidroxi-8- <i>O</i> -metiltalatizamin (71)	-3 $\pm$ 6	-5 $\pm$ 58	-	16 $\pm$ 1 ^a	-	16 $\pm$ 7
izotalazidin (72)	21 $\pm$ 0	30 $\pm$ 1	-	19 $\pm$ 3 ^a	-	18 $\pm$ 5
hetizinon (73)	11 $\pm$ 8	25 $\pm$ 12	-	14 $\pm$ 4 ^a	-	28 $\pm$ 3
szvatinin (77)	28 $\pm$ 5	37 $\pm$ 1	-	9 $\pm$ 2 ^a	-	10 $\pm$ 4
gigaktonin (78)	13 $\pm$ 3	27 $\pm$ 4	-	38 $\pm$ 7 ^a	-	2 $\pm$ 4
delkozoin (79)	23 $\pm$ 18	45 $\pm$ 1	-	18 $\pm$ 2 ^a	-	13 $\pm$ 4
likoktonin (80)	0 $\pm$ 4	11 $\pm$ 26	-	14 $\pm$ 3 ^a	-	22 $\pm$ 5
ajacin (81)	25 $\pm$ 8	33 $\pm$ 3	-	13 $\pm$ 2 ^a	-	44 $\pm$ 5
napellin (83)	15 $\pm$ 4	28 $\pm$ 13	0 $\pm$ 6	10 $\pm$ 8	-	-
karakolin (85)	10 $\pm$ 1	16 $\pm$ 1	3 $\pm$ 7	16 $\pm$ 10	-	-
szenbuzin A (86)	17 $\pm$ 4	26 $\pm$ 6	4 $\pm$ 1	11 $\pm$ 0	-	-
szenbuzin C (87)	10 $\pm$ 12	11 $\pm$ 17	-1 $\pm$ 10	3 $\pm$ 19	-	-
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -oleát (159)	14 $\pm$ 14	35 $\pm$ 3	-	-	-	-
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -laurát (166)	17 $\pm$ 13	65 $\pm$ 16	-	20 $\pm$ 18	52 $\pm$ 25	-
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -mirisztát (167)	12 $\pm$ 5	25 $\pm$ 9	-	-	-	-
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -sztearát (168)	31 $\pm$ 12	57 $\pm$ 13	-	24 $\pm$ 2	43 $\pm$ 13	-
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -palmitát (169)	11 $\pm$ 9	22 $\pm$ 14	-	40 $\pm$ 6 ^a	-	27 $\pm$ 2
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -palmitoleát (170)	32 $\pm$ 6	76 $\pm$ 4	-	20 $\pm$ 16	60 $\pm$ 6	-
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> - γ -linolenát (171)	42 $\pm$ 19	85 $\pm$ 8	-	45 $\pm$ 5	92 $\pm$ 3	-
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -eikoza-5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-pentaenoát (172)	42 $\pm$ 8	91 $\pm$ 1	-	42 $\pm$ 5	82 $\pm$ 3	-
akotoxinin (186)	12 $\pm$ 6	35 $\pm$ 2	-	7 $\pm$ 2 ^a	-	14 $\pm$ 4
delektinin (187)	16 $\pm$ 9	30 $\pm$ 8	-	8 $\pm$ 2 ^a	-	42 $\pm$ 5
takaózsamin (190)	3 $\pm$ 26	20 $\pm$ 5	-	13 $\pm$ 3 ^a	-	3 $\pm$ 2
14-dezacetil-18-dezmetilpubeszcenin (191)	14 $\pm$ 6	29 $\pm$ 10	-	7 $\pm$ 2 ^a	-	19 $\pm$ 3
akovulparin (192)	12 $\pm$ 9	26 $\pm$ 6	-	11 $\pm$ 2 ^a	-	30 $\pm$ 4
finetiadin (193)	9 $\pm$ 11	0 $\pm$ 8	-	-	-	-
szongoramin (194)	-	-	-	36 $\pm$ 5 ^a	-	15 $\pm$ 3
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -eikozanoát (195)	21 $\pm$ 4	47 $\pm$ 6	-	-	-	-
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -eikoza-11Z-enoát (196)	8 $\pm$ 0	17 $\pm$ 9	-	-	-	-
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -eikoza-11Z,14Z-dienoát (197)	18 $\pm$ 8	59 $\pm$ 13	-	8 $\pm$ 12	33 $\pm$ 2	-
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -eikoza-8Z,11Z,14Z-trienoát (198)	36 $\pm$ 14	84 $\pm$ 1	-	22 $\pm$ 17	46 $\pm$ 19	-
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -eikoza-11Z,14Z,17Z-trienoát (199)	22 $\pm$ 21	78 $\pm$ 15	-	18 $\pm$ 4	50 $\pm$ 4	-
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -eikoza-5Z,8Z,11Z,14Z-tetraenoát (200)	41 $\pm$ 4	88 $\pm$ 1	-	37 $\pm$ 12	75 $\pm$ 8	-
palmitoleinsav (201)	11 $\pm$ 7	36 $\pm$ 7	-	-	-	-
γ -linolénsav (202)	15 $\pm$ 5	22 $\pm$ 5	-	-	-	-
eikoza-11Z,14Z-diénsav (203)	23 $\pm$ 1	31 $\pm$ 7	-	-	-	-
eikoza-5Z,8Z,11Z,14Z-tetraénsav (204)	20 $\pm$ 6	17 $\pm$ 16	-	-	-	-
eikoza-5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-pentaénsav (205)	20 $\pm$ 1	13 $\pm$ 19	-	-	-	-
haloperidol (1 μ M)	-	-	-	95 $\pm$ 1	-	-
propafenon	71 $\pm$ 10	-	-	-	-	-

A Na⁺-ioncsatornákra való hatás esetén alapfeltételnek tartják a két észtercsoport jelenlétét az alkaloidmolekulákban, ezzel összhangban a legerősebb hatású akonitin (**1**) is ilyen szerkezetű, azonban a két észtercsoport önmagában nem garancia az erős gátló aktivitásra. Az arilészter-szubsztituens ugyancsak nem garancia a hatássóságra, ennek bizonyítékai az ajacin (**81**) és az akotoxinin (**186**) alacsony aktivitása. Az aktivitás és az alapváz minősége között nem volt azonosítható összefüggés.^{2*}



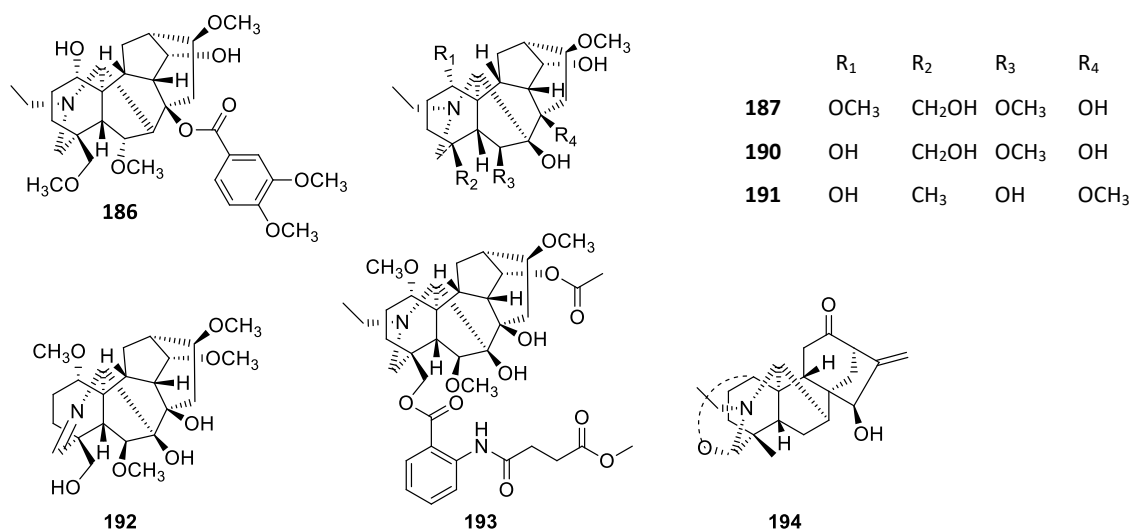
20. ábra Lipoalkaloidok és az átészterezésre használt zsírsavak (±SD) (GIRK-gátló aktivitásának összehasonlítása (± SEM))

A diterpén-alkaloidok mérsékelten gátolták a GIRK csatornákat. A vizsgált alacsonyabb koncentrációban egyik vegyület sem volt aktív, nagyobb koncentrációban is csak a delavakonitin (**66**), delkozin (**79**), delektinin (**187**), akonitin (**1**) és szongorin (**9**) gátló hatása haladta meg a 40%-ot. A félszintézissel előállított lipoalkaloidok átlagos GIRK-gátló hatása szignifikánsan jelentősebb volt, mint a diterpén-alkaloidoké ($p < 0,01$). A kisebb koncentrációban 3, a nagyobbban 10 vegyület esetén volt >40%-os a gátlás, amelynek mértéke igen tág hatások között mozgott (17-91%), ez a zsírsavszubsztituens meghatározó jelentőségére utal. A zsírsavszubsztituens telítetlensége (és annak mértéke) döntő tényező az aktivitás szempontjából, legmagasabb aktivitás az eikozánsavészterek esetén volt mérhető. Annak eldöntésére, hogy a hatás kiváltható-e tiszta zsírsavakkal, 5, a félszintézisben is alkalmazott zsírsav aktivitását is megvizsgáltuk (**201–205**), ezek hatása azonos koncentráció esetén szignifikánsan ($p < 0,05$) gyengébb volt, mint a megfelelő lipoalkaloidoké (**20. ábra**). A legmarkánsabb GIRK-gátló hatással a 14-benzoilakonin-8-*O*- γ -linolenát (**171**) és a **172** rendelkezett, ezek azonban a hERG-ioncsatornákat is gátolták. Két vegyület, a 14-benzoilakonin-8-*O*-eikoz-8 Z ,11 Z ,14 Z -trienoát (**198**) és a 14-benzoilakonin-8-*O*-eikoz-11 Z ,14 Z ,17 Z -trienoát (**199**) igen jelentős GIRK-gátló hatással rendelkezett gyenge hERG-inhibícióval párosulva, ezért ezek további farmakológiai vizsgálatra érdemesek potenciális kardiovaszkuláris felhasználás reményével (**21. ábra**).^{2*}A lipoalkaloidok GIRK/hERG szelektivitása szignifikánsan nagyobb volt, mint a diterpén-alkaloidoké ($p < 0,0001$).^{31*}



21. ábra Diterpén- és lipo-alkaloidok GIRK/hERG szelektivitása ($\pm$ SD)

A $\text{Na}_v1.2$ csatornára kifejtett hatás vizsgálata során a piroakonitin (**11**) bizonyult a legmarkánsabb inhibítornak, a további vegyületek közül az ajacin (**81**), a szeptentriodin (**7**) és a delektinin (**187**) fejtett ki $>40\%$ gátlást. A C_{19} alkaloidok közül a C-1 helyzetben metoxiszubsztituens-, C-8 helyzetben oxigéntartalmú szubsztituens, C-14/C-18 helyzetben pedig aroilszubsztituens tartalmazó, és összesen legalább 4 oxigéntartalmú szubsztituens tartalmazó vegyületek voltak hatásosak. A C-1 helyzetű metoxicsoport hidroxilra cserélése az aktivitás jelentős csökkenésével járhat [delektinin (**187**) – takaózsamin (**190**)]. Az aroilszubsztituens helyének fontosságát támasztja alá, hogy az aroilszubsztituált akotoxinin (**186**) inaktív – ez összhangban van korábbi állatkísérletes eredményekkel, amelyek a C-14 szubsztituáció jelentőségét támasztották alá.³⁵⁰ A C_{20} alkaloidokra vonatkozóan a jelentősen aktív anyagok hiánya miatt nem vonhatóak le hasonló következtetések. A szongorin (**9**) esetén az inaktivitás összhangban van korábbi eredményekkel, amelyek nem definiált altípusú Na^+ -csatornák esetén írták le a vegyület hatástalanságát.¹⁹

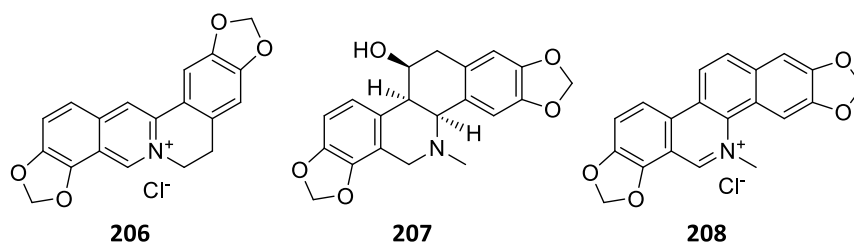


A vizsgált vegyületek közül azok érdekesek további vizsgálatra, amelyek $\text{Na}_v1.2$ csatornákat gátló hatásuk mellett nem hatnak jelentősebb mértékben a hERG csatornákra [ajacin (**81**), delektinin

(187)]. Eredményeink jelentőségét azonban elsősorban az adja, hogy elsőként vizsgáltuk diterpén-alkaloidokat ezen a csatornaaltípuson, rámutatva arra, hogy a szív-érrendszeri aktivitásukról ismert vegyületek farmakológiai profiljának mélyebb feltárásához és kiaknázásához fontos adalékkal szolgálhatnak a hasonló vizsgálatok.^{3*}

5.3.6. Benzil-izokinolin alkaloidok szív-érrendszeri hatásainak vizsgálata

A benzil-izokinolin alkaloidokat tartalmazó növények közül a *Chelidonium majus* alkalmazták legelterjedtebben a gyógyászatban. A növény kivonatainak és alkaloidjainak szív-érrendszeri hatásait komplex módon vizsgáltuk patch-clamp és konvencionális mikroelektrod technika alkalmazásával. A herbából etanol-víz 25:75 és 45:55 arányú elegyeivel készült extraktumokat tanulmányoztuk, ugyanis az Európai Gyógyszerügynökség értékelő jelentése szerint ezeket belsőleg számos indikációval alkalmazták tradicionálisan.³⁵¹ Mindezen túl a növény alkaloidjai közül a protoberberin típusú berberin (7) és koptizin (206), valamint a benzofenantridin típusú kelidonin (207) és szangvinarin (208) hatásait is tanulmányoztuk.^{32*}



LC-MS és HPLC-DAD módszerekkel azonosítottuk és kvantifikáltuk a kivonatokban található fő alkaloidokat. A 25%-os etanolos kivonatban a berberin (7), koptizin (206), kelidonin (207) és szangvinarin (208) alkaloidok mennyisége 0,11, 6,42, 0,06, 1,75 és 0,22 mg/g volt szárazanyagra vonatkoztatva, ugyanezek az anyagok a 45%-os etanolos kivonatban 0,23, 34,77, 0,13, 3,19 és 0,41 mg/g mennyiségben voltak megtalálhatóak.

A *Chelidonium majus* 25%-os, illetve a 45%-os etanollal készített kivonatainak hERG-gátló hatása 8,30, illetve 5,09 µg/ml IC₅₀ értékekkel volt jellemezhető. Az értékek eltérése összhangban van az alkaloidtartalommal, ez arra utalhat, hogy az ioncsatornagátló hatásban az általunk mért alkaloidoknak is szerepe van (17. táblázat).

17. táblázat *Chelidonium majus* kivonatok és alkaloidok hERG ioncsatornagátló IC₅₀ értékei

Minta	IC ₅₀ ± SEM (µg/ml)	IC ₅₀ ± SEM (µM)
25%-os etanolos kivonat	8,30 ± 0,69	-
25%-os etanolos kivonat	5,09 ± 0,49	-
berberin (7)	2,17 ± 0,18	6,46 ± 0,54
koptizin (206)	28,86 ± 0,92	90,08 ± 2,88
kelidonin (207)	0,35 ± 0,04	1,00 ± 0,10
szangvinarin (208)	0,29 ± 0,03	0,88 ± 0,08

A leggyengébb gátló hatást a legnagyobb mennyiségben jelen lévő koptizin (**206**) mutatta, míg a kelidonin (**207**) és a szangvinarin (**208**) kifejezetten markáns gátló aktivitással jellemezhető. A vizsgált alkaloidok közül a benzofenantridin típusúak aktivitása kifejezettebb volt, mint a protoberberin típusúaké.

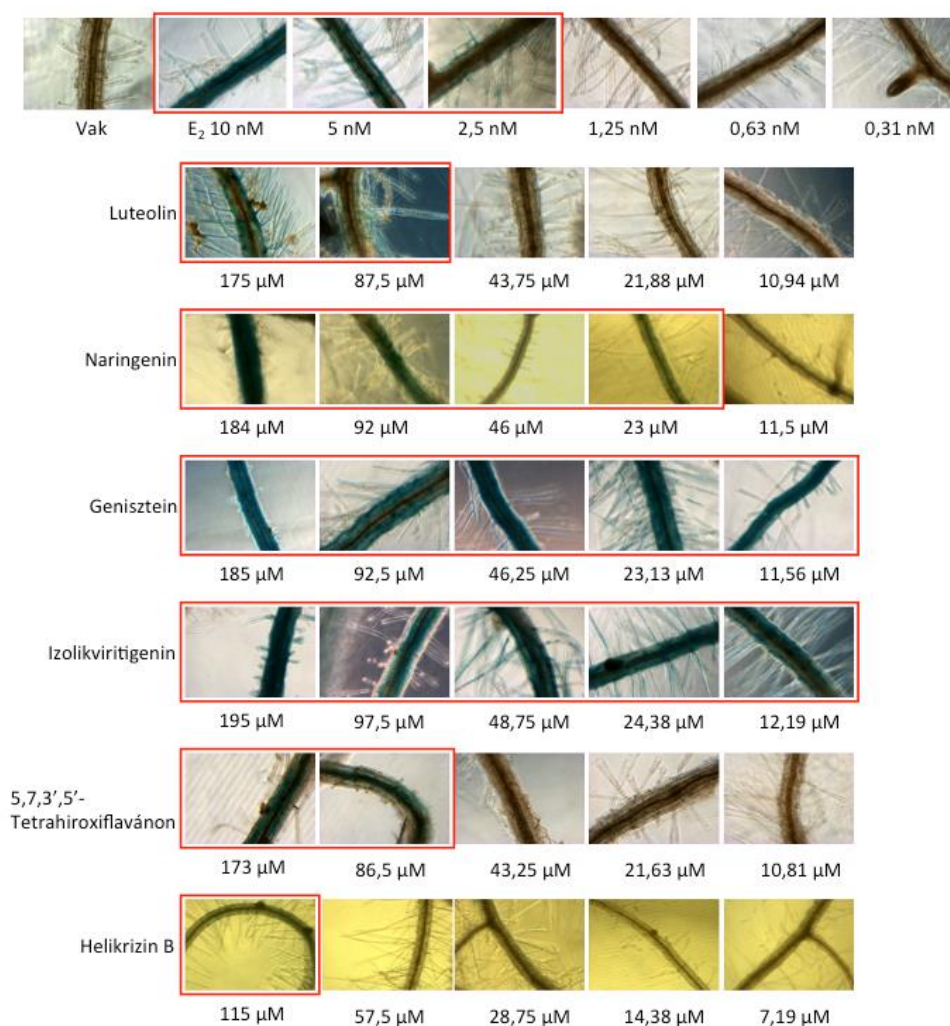
A kivonatok akciós potenciálra kifejtett hatását jobb kamrai kutyaszívizomból készült preparátumon tanulmányoztuk. Mindkét kivonat szignifikánsan megnyújtotta az akciós potenciált 5 µg/ml koncentrációban, 1000 ms ciklushosszúságú ingerlés esetén. Az akciós potenciál repolarizációjának 90%-os értékéhez tartozó időtartam (APD₉₀) megnyúlása a 25%-os alkoholos kivonat esetén 10,5%, míg a 45%-os alkoholos kivonat esetén 6,7% volt. A depolarizáció maximális sebességét (V_{max}) nem befolyásolták a kivonatok. Az APD₉₀-re kifejtett hatás frekvenciafüggésének tanulmányozása érdekében 300–5000 ms-os ciklushosszúságú ingerléseket alkalmazva megállapítottuk, hogy a kivonatok, különösen a 45%-os alkoholos mérsékeltén, a frekvenciával fordítottan arányosan nyújtják meg a repolarizációhoz szükséges időt. A berberin (**7**), kelidonin (**207**) és szangvinarin (**208**) 1000 ms ciklushosszúságú ingerlés esetén sztatistikailag szignifikánsan növelte az APD₉₀-et (1 µM koncentráció esetén 4,6%, 6,1% and 6,3%, 10 µM koncentrációnál 18,4%, 18,3% és 16,0% mértékben), és ez az aktivitás a frekvenciával fordítottan arányos volt. Munkánk eredményeként elsőként számoltunk be a *C. majus* kivonatok és két tartalomanyag, a kelidonin (**207**) és szangvinarin (**208**) hERG ioncsatornagátló és akciós potenciálra kifejtett hatásáról.

5.3.7. *Cyclopia genistoides* polifenolok ösztrogénszerű és XO-gátló hatásának vizsgálata

A *Cyclopia genistoides* fermentált és nem fermentált föld feletti részének metanolos kivonataiból folyadék-folyadék megosztással nyert *n*-hexános, etil-acetátos, diklór-metános és vizes metanolos frakciókat transzgenikus növényi pER8:GUS rendszerben mértük, 100 és 200 µg/ml-es koncentrációban.^{9*} A kivonatok ösztrogénszerű hatását hisztokémiai vizsgálattal (GUS-aktivitás mérése) detektáltuk. A fermentált és nem fermentált *C. genistoides* CH₂Cl₂-os és etil-acetátos fázisai bizonyultak aktívnak, így ezeket fitokémiai feldolgozását végeztük el. A fermentált növényi anyag CH₂Cl₂ frakciójának tizennégy, poliamid oszlopkromatográfiás tisztítás útján nyert alfrakciója közül négy mutatott ösztrogénszerű hatást (MAC ≤ 200 µg/ml), ezekből a luteolin (**108**) naringenin (**110**), 5,7,3',5'-tetrahidroxiflavanon (**114**), genisztein (**111**) és izolikviritigenin (**112**) aktív vegyületeket nyertük. A nem fermentált *C. genistoides* EtOAc frakciójának tizenkét VLC szubfrakciójából négy mutatkozott aktívnak a pER8:GUS rendszerben. A biológiai aktivitásméréssel követett kromatográfiás tisztítás összesen hat, ösztrogénaktivitással rendelkező

flavonoid izolálásához vezetett: [luteolin (**108**), helikrizin B (**113**), naringenin (**110**), 5,7,3',5'-tetrahydroxiflavánon (**114**), genisztein (**111**) és izolikviritigenin (**112**)].

A *C. genistoides*ből korábban még nem azonosított két vegyület, a genisztein (**111**) és az izolikviritigenin (**112**) is jelentős hatást mutatott (MAC <11,56 illetve 12,19 μM). A luteolin (**108**, MAC = 87,5 μM), naringenin (**110**, MAC = 23 μM) és 5,7,3',5'-tetrahydroxiflavánon (**114**, MAC = 86,5 μM) szintén rendelkezett ösztrogénszerű hatással. A legkevésbé hatásos vegyület a helikrizin B volt (**113**, MAC = 115 μM). A referenciaként használt ösztradiol (E_2) MAC-értéke 2,5 nM volt (**22. ábra**).



22. ábra Az izolált vegyületek minimálisan hatékony koncentrációi a hisztokémiai tesztben. Azon koncentrációk ahol a kék szín detektálható volt, pirossal be vannak keretezve, mutatva az ösztrogénszerű aktivitást. Azt a koncentrációt tekintettük minimálisan aktív koncentrációnak, ahol a kék szín még látszott.

A fermentált és a nem fermentált növényi anyag metanolos kivonatainak XO-gátlás szempontjából legaktívabb frakcióinak tisztítása vezetett a luteolin és diozmetin (**108** és **109**) izolálásához, amely vegyületek figyelemreméltó XO-gátló hatást mutattak: a luteolin (**108**) IC_{50} 0,84 μM (95% CI 0,80–0,91 μM), a diozmetin (**109**) pedig IC_{50} 0,53 μM (95% CI 0,40–0,80 μM) értékekkel volt

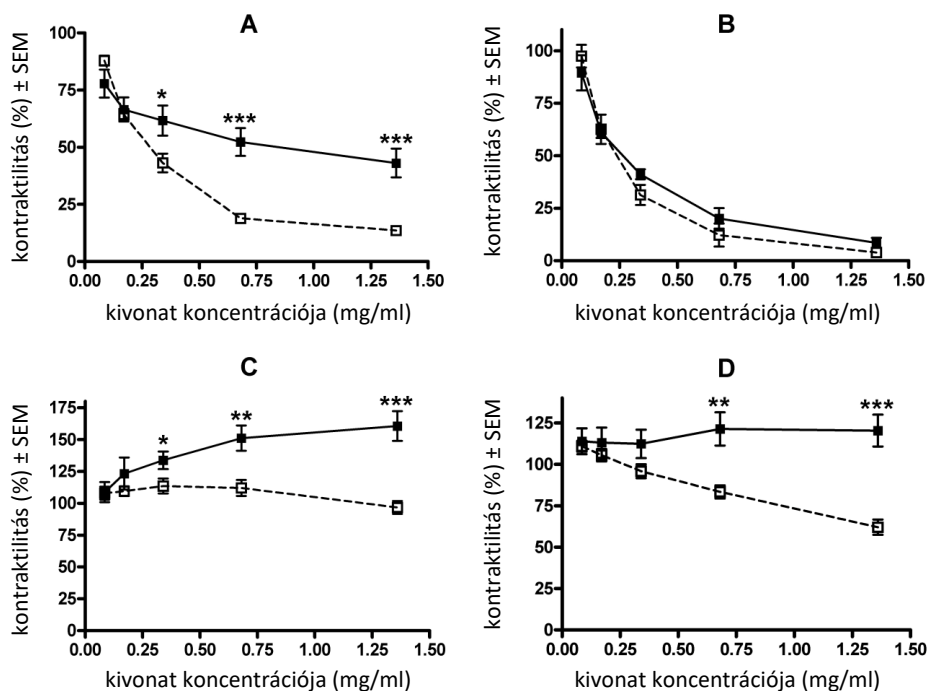
jellemezhető. A hatástanilag követett izolálás mellett izolált többi vegyület bioaktivitását is megmértük. A 15 metabolit közül csak két, szerkezetileg egymáshoz közel álló flavánon, a heszperetin (**124**) és az 5,7,3',5'-tetrahydroxiflavánon (**114**) mutatott gyenge gátlást ($IC_{50} = 55,20$ nM 95% CI 41,40–73,51 μ M) és 120,55 μ M (95% CI 101,71–142,86 μ M). A többi izolált vegyület nem fejtett ki xantin-oxidáz gátló hatást ($IC_{50} > 150$ μ M).

5.3.8. *Hoodia gordonii* készítmény szimpatomimetikus hatásának vizsgálata

A *Hoodia gordini*val kapcsolatos kutatásainkat egy fogyasztói mellékhatásbejelentés kapcsán kezdtük el. Egy szublinguálisan alkalmazandó, fő összetevőként deklaráltan *H. gordonii* kivonatot tartalmazó spray használata esetén egy fogyasztó a klinikai vizsgálatban²⁶⁵ leírthoz hasonló panaszokat tapasztalt (szívdobogásérzés, vérnyomásemelkedés). Megvizsgáltuk a hatás mechanizmusát, valamint azt, hogy az valóban a *H. gordinii*hoz köthető-e, vagy valamely, illegálisan hozzáadott vegyülethez.^{33*}

A termék kémiai vizsgálata során tömegspektrometriás vizsgálattal igazoltuk a növény markeranyaga, a P57 oxipregnán-glikozid jelenlétét (MRM monitorozással, a prekursor és a termékionok, valamint az aglikon termékionjai), valamint autentikus *H. gordonii* kivonattal való összehasonlítással megerősítettük, hogy a termék valóban tartalmazza a növény kivonatát. Szibutramin (**57**), amfetamin, metamfetamin vagy efedrin (**59**) szennyezettség nem volt kimutatható a termékben.

A humán alkalmazás során tapasztalt mellékhatás vizsgálatára *in vitro*, szervfürdőben végzett kísérletek során a termék méhizomzatra kifejtett hatását vizsgáltuk spontán és KCl-stimulált kontrakciók esetén. A kísérlethez nem vemhes és késői vemhes (22. nap) patkányból preparált izomgyűrűket használtunk. A termék jelentős és koncentrációfüggő relaxációt váltott ki spontán és a stimulált összehúzódások esetén is. A spontán kontraktilitás gátlása szignifikánsan csökkent a nem szelektív β -antagonista propranolol jelenlétében, KCl-indukált relaxáció esetén azonban ez nem volt megfigyelhető. A termék méhizomzaton kifejtett relaxáló hatása lényegesen kisebb volt késői vemhes állatok esetén, de a propranolol jelentősen módosította azt (**23. ábra**).



23. ábra *H. gordonii* kivonatot tartalmazó termék hatása spontán (A és C) és KCl-stimulált (B és D) nem vemhes (A és B) és késői vemhes (C és D) patkányok uterusizomzatának kontraktilitására *in vitro*. A kísérleteket propranolol jelenlétében (■) és hiányában (□) végeztük. *, ** és *** $p < 0,05$, $p < 0,01$ és $p < 0,001$ szignifikanciaszinteket jelölnek.

5.3.9. N-alkil-amidok hatása az endogén kannabinoidrendszerre

A *L. meyenii*ből és a *H. helianthoides* var. *scabrából* izolált N-alkil-amidok endogén kannabinoidrendszerre kifejtett hatását a CB₁ és CB₂ receptorokra, a FAAH és MAGL enzimekre, valamint az anandamidfelvételre való aktivitásával jellemeztük.^{6*} A vegyületek egyike sem gátolta a MAGL enzimet (IC₅₀>100 μM), ugyanakkor az összes N-alkil-amid mikromoláris koncentrációban – közülük legintenzívebben a **101** – gátolta a FAAH-t. Utóbbi vegyület szubmikromoláris koncentrációban, a referenciaként használt OMDM-2 és UCM707 vegyületeknél markánsabban gátolta az anandamid visszavételét. A **101** vegyület nagy affinitással kapcsolódott a CB receptorokhoz, nagy (9-szeres) szelektivitást mutatva a CB₁ iránt. A *H. helianthoides* var. *scabra* vegyületei közül a **92** CB₁-en kifejtett aktivitása figyelemre méltó leginkább.

18. táblázat Az izolált alkilamidok hatásai az endokannabinoid rendszerre^a

Vegyület	Anandamid-visszavétel gátlása IC ₅₀ (μM) (95% CI)	FAAH IC ₅₀ (μM) (95% CI)	CB ₁ K _i (μM) (95% CI)	CB ₂ K _i (μM) (95% CI)
89	2,5 (1,28–4,70)	17,8 (13,18–25,70)	8,6 (2,39–10,92)	9,2 (5,41–9,84)
91	4,3 (2,69–6,97)	12,3	>20 (6,28–>20)	22,6 (12,68–25,30)
92	2,2 (0,87–5,31)	20,0 (12,59–33,11)	0,31 (0,18–0,59)	1,2 (0,90–1,71)
99	>100	19,1 (13,8–28,18)	8,7 (4,66–13,75)	>50
100	84,4 (72,44–>100)	11,5 (6,81–18,78)	8,9 (3,79–10,19)	44,0 (24,16–>50)
101	0,7 (0,47–0,97)	4,1 (2,95–5,62)	0,5 (0,33–0,67)	4,1 (3,11–5,66)
OMDM-2	4,12 (2,01–12,19)	23,29 (10,72–48,98)	n,d,	n,d,
UCM707	1,46 (1,18–1,80)	7,24 (6,03–13,18)	n,d,	n,d,

^a OMDM-2 és UCM-707 pozitív kontrollok. n.d., nem meghatározott.

5.3.10. Római kamilla görcsoldó hatásának vizsgálata

A római kamilla népi gyógyászatban megfigyelt görcsoldó hatását *in vitro* vizsgálatokban tanulmányoztuk, figyelemmel az ezért felelős vegyületekre és mechanizmusokra is.^{34*} A vizsgálatok alapjául szolgáló, az Európai Gyógyszerügynökség monográfiájában megtalálható kivonat flavonoidtartalmát jellemeztük, és összehasonlítottuk az ennek frakcionálásával nyert frakciókéval. A nyers kivonatban az eupafolin (**209**) koncentrációja volt a legmagasabb, ezt követte a luteolin (**108**), hiszpidulin (**9**) és apigenin (**11**). A poliamid állófázison való tisztítás során a metanol eluensen belüli arányának növelésével a frakciók flavonoidtartalma nőtt. A 100% metanollal eluált frakcióban volt a legmagasabb a luteolin (**108**) és az apigenin (**11**) mennyisége, azonban az összflavonoidtartalom a P80 (80%-os metanollal eluált) frakcióban volt a legmagasabb (19. táblázat).

19. táblázat A római kamilla 70%-os etanollal nyert kivonatának és frakcióinak flavonoidtartalma

Minta	Luteolin (mg/g kivonat)	Eupafolin (mg/g kivonat)	Apigenin (mg/g kivonat)	Hiszpidulin (mg/g kivonat)
Nyers kivonat	4,617±0,616	18,756±2,121	0,298±0,027	1,584±0,181
P20	nem kimutatható	nem kimutatható	nem kimutatható	nem kimutatható
P40	0,578±0,001	1,800±0,001	0,179±0,001	0,231±<0,001
P60	1,904±0,001	62,591±0,025	0,151±<0,001	5,951±0,004
P80	22,605±0,001	223,488±0,036	0,859±<0,001	17,060±0,006
P100	55,305±0,002	150,206±0,005	2,055±<0,001	4,983±<0,001

A nyers kivonat tengerimalac ileumon átmeneti hosszanti kontrakciót okozott. Ez a jelenség a legalacsonyabb tesztelt koncentráció (20 µg/ml) esetén is megfigyelhető volt, a hatás maximuma 60 és 200 µg/ml-nél alakult ki. A kontrakció maximuma a hisztaminnal elérhető maximális kontrakció 40%-a körüli volt ($40,1 \pm 3,3\%$ és $36,3 \pm 4,9\%$). Az oldószerként felhasznált DMSO a kísérletben használt koncentrációban nem volt hatással a simaizmok működésére. 60 µg/ml koncentrációjú kivonat használatával tanulmányoztuk a kontrakció kialakulásának mechanizmusát. Atropin- és tetrodotoxin-előkezeléssel (0,5 µM mindkettő) a kontrakció mérsékelhető volt, azonban a purinoceptor antagonistá PPADS (50 mM), szerotoninreceptor-antagonisták kombinációja (0,3 µM metiszergid, 1 µM SB204070, 1 µM Y25130), valamint a kapszaicinszenzitív neuronok funkcionális gátlása nem befolyásolta a kontrakciót kiváltó hatást, az indometacin (3 µM) mérsékelten, de szignifikánsan gátolta a nyers kivonat hatását. Az P20 frakció esetén a hisztaminnal maximálisan elérhető kontrakció mintegy 20%-ának megfelelő hatást lehetett elérni, a többinél (P40-100) hasonló mértékű, de a flavonoidtartalom növekedésével enyhén csökkenő intenzitású hatást lehetett kimutatni.

A kísérletek fókuszában a feltételezett spazmolitikus hatás állt. Ilyen szempontból nemcsak a nyers kivonatot és frakcióit, hanem a növény illóolaját és fő flavonoidjait is tanulmányoztuk tengerimalac ileumon. 0,5 µM hisztaminnal, atropinnal és tetrodotoxinnal előkezelt

preparátumokon a nyers kivonat koncentrációfüggő relaxációt okozott az átmeneti kontrakciót követően. 20 µg/ml koncentráció esetén $18,0 \pm 5,2\%$, 60 µg/ml mellett $76,2 \pm 8,5\%$, míg 200 µg/ml esetén 100%-os relaxáció volt tapasztalható. A relaxációt nem befolyásolta a β -receptorantagonista propranolol (1 µM) és az NO-szintázgátló N^G -nitro-L-arginin (100 µM) adagolása. A nyers kivonat frakciói esetén különböző mértékű hatás volt mérhető. A P40 és P60 frakciók nem fejtettek ki relaxáló hatást, a P60–100 frakciók azonban dóziszfüggően, a teljest megközelítő, illetve elérő simaizom-elernyesztő hatással rendelkeztek (**20. táblázat**). A római kamillából általunk kimutatott flavonoidok átmeneti, mérsékelt kontrakciót fokozó hatást követően tartós, dóziszfüggő relaxáló hatást mutattak (**21. táblázat**).

20. táblázat Római kamilla kivonatfrakciók relaxáló hatása prekontrahált tengerimalac ileumon (átlag $\pm$ SEM)

Frakció és koncentráció	Relaxáció	N
P60		
20 µg/ml	$18,7 \pm 5,7\%$	5
60 µg/ml	$96,0 \pm 3,0\%$	6
200 µg/ml	$93,5 \pm 4,9\%$	6
P80		
20 µg/ml	$47,2 \pm 7,7\%$	5
60 µg/ml	$93,0 \pm 5,9\%$	6
200 µg/ml	100%	4
P100		
6 µg/ml	12,5%	4
20 µg/ml	$61 \pm 13,7\%$	5
60 µg/ml	$69,4 \pm 7,5\%$	6
200 µg/ml	100%	4

21. táblázat Flavonoidok relaxáló hatása prekontrahált tengerimalac ileumon (átlag $\pm$ SEM)

Vegyület és koncentráció	Relaxáció %	N
Hiszpidulin (9)		
2 µM	$19,4 \pm 3,5\%$	5
20 µM	$64,5 \pm 4,1\%$	6
Luteolin (108)		
2 µM	$19,6 \pm 1,6\%$	5
20 µM	$80,0 \pm 4,5\%$	6
Eupafolin (209)		
2 µM	$18,2 \pm 5,4\%$	5
20 µM	$68,7 \pm 6,8\%$	6
Apigenin (11)		
2 µM	$24,2 \pm 3,7\%$	5
20 µM	$81,9 \pm 5,3\%$	6

A növény illóolaja nem fejtett ki kontraháló hatást, relaxáló aktivitással azonban rendelkezett az előkezelt tengerimalac ileumon (0,1 mg/ml: $12,8 \pm 3,5\%$; 1 mg/ml $30,8 \pm 5,9\%$; 10 mg/ml $69,7 \pm 5,6\%$).

Tengerimalac húgyhólyag preparátumokon hasonló megfigyeléseket tettünk. A nyers kivonat átmeneti, enyhe kontrakciót okozott, a korábban bemutatott módon előkezelt (a hólyag purinerg beidegzése miatt α, β -metilén ATP-vel deszenzitizált) preparátumokon 20 µg/ml esetén nem volt megfigyelhető hatás, 200 µg/ml koncentrációnál $58,3 \pm 4,6\%$ mértékű relaxációt mértünk. Ezen a preparátumon az illóolaj relaxáló hatása is mérsékeltebb volt: $17,9 \pm 6,1\%$ és $34,1 \pm 5,8\%$ 1, illetve 10 µg/ml esetén. Az illóolaj relaxáló hatását patkány ileum és disztális kolonpreparátumokon is igazoltuk (10 µg/ml esetén $41,4 \pm 7,4\%$, illetve $21,8 \pm 3,7\%$).

Előkezeletlen longitudinális humán jejunum preparátumokon a nyers kivonat 20 és 200 µg/ml koncentrációkban $12,4 \pm 3,5\%$, illetve $30,5 \pm 0,6\%$ mértékű átmeneti kontrakciót okozott. Cirkuláris preparátumokon a hatás a kisebb koncentrációnál elhanyagolható volt, 200 µg/ml esetén $43,4 \pm 10\%$. Atropinnal és tetrodotoxinnal előkezelt, $\text{PGF}_{2\alpha}$ -val kontrahált longitudinális

preparátumokon a nyers kivonat koncentrációfüggő relaxáló hatást fejtett ki (20 µg/ml: $25,8 \pm 4,3\%$; 60 µg/ml: $68,5 \pm 8,5\%$; 200 µg/ml: $50,8 \pm 3,7\%$). Cirkuláris preparátumokon, ugyanilyen előkezeléssel 60 µg/ml-rel 45%-os, míg 200 µg/ml alkalmazásával teljes relaxáció volt elérhető. A longitudinális humán jejunum preparátumon az illóolaj 1 µg/ml koncentrációban $26,9 \pm 5,2\%$, 10 µg/ml esetén $81,4 \pm 8,2\%$ relaxációt idézett elő.

5.4. *In vivo* farmakológiai és toxikológiai vizsgálatok

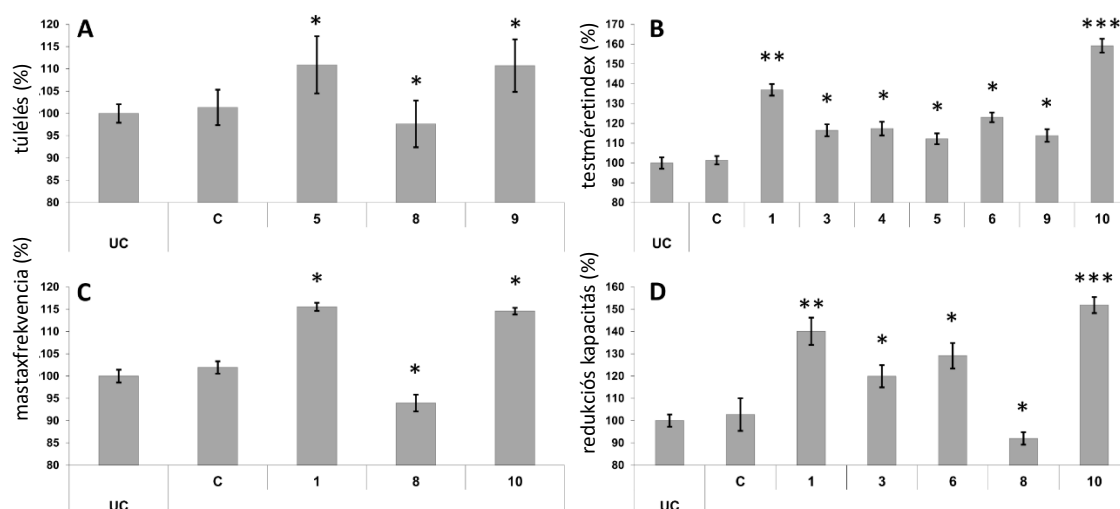
5.4.1. Diterpén-alkaloidok aktivitásvizsgálata *bdelloid rotifer* modellen

Összesen 10 alkaloid, köztük 2 bisznorditerpén- (**66**, **69**), 6 norditerpén- (**1**, **7**, **82**, **83**, **86**, **87**) és 2 diterpén-alkaloid (**9**, **73**) hatását vizsgáltuk kerekeshéreg viabilitási teszt segítségével.^{35*}

22. táblázat Kerekeshéreg viabilitási paramétereinek százalékban kifejezett változása a kontrollhoz képest (átlag $\pm$ SEM, N = 32)

Vegyület	Túlélési idő	Testméretindex	Mastaxfrekvencia	Redukciós kapacitás
akonozin (69)	107,1 $\pm$ 5,14	136,9 $\pm$ 2,92	115,5 $\pm$ 0,91	140,1 $\pm$ 6,09
delavakonitin (66)	109,8 $\pm$ 6,64	113,9 $\pm$ 3,19	102,6 $\pm$ 1,68	115,9 $\pm$ 6,57
akonitin (1)	108,5 $\pm$ 5,18	116,5 $\pm$ 3,00	101,7 $\pm$ 1,78	119,9 $\pm$ 4,96
neolin (82)	109,3 $\pm$ 7,04	117,4 $\pm$ 3,45	102,0 $\pm$ 2,05	116,7 $\pm$ 3,96
szenbuzin A (86)	110,9 $\pm$ 6,41	112,2 $\pm$ 2,73	98,9 $\pm$ 2,18	115,5 $\pm$ 5,54
szenbuzin C (87)	107,1 $\pm$ 5,42	123,1 $\pm$ 2,43	101,4 $\pm$ 2,03	129,1 $\pm$ 5,74
septentriodin (7)	109,6 $\pm$ 6,12	114,5 $\pm$ 3,05	102,9 $\pm$ 1,79	111,1 $\pm$ 4,79
napellin (83)	97,6 $\pm$ 5,24	98,7 $\pm$ 2,76	93,9 $\pm$ 1,87	92,0 $\pm$ 2,78
hetizinon (73)	110,7 $\pm$ 5,90	113,9 $\pm$ 3,00	103,9 $\pm$ 1,78	116,4 $\pm$ 6,35
szongorin (9)	108,4 $\pm$ 6,28	159,2 $\pm$ 3,49	114,6 $\pm$ 0,74	151,8 $\pm$ 3,61

A napellint (**83**) kivéve mindegyik vegyület növelte a túlélési időt (**22. táblázat**). A szenbuzin A (**86**) és a hetizinon (**73**) szignifikánsan pozitív hatással volt erre a mutatóra (**24/A ábra**).



24. ábra Alkaloidok szignifikáns hatásai kerekeshéreg túlélésére (A), testméretindexére (B), mastaxfrekvenciájára (C) és redukciós kapacitására (D) a kontrollhoz viszonyítva (átlag $\pm$ SEM; *p < 0,05, **p < 0,01; ***p < 0,001)

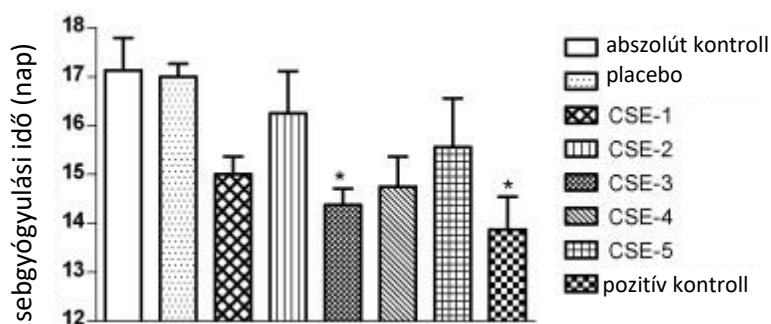
A legtöbb vegyület szignifikánsan növelte a testméretindexet (testhossz/szélesség) a kontrollcsoportéhoz viszonyítva (**24/B ábra**), egyedül a napellin esetén volt megfigyelhető negatív irányú változás. A mastaxfrekvencia, amely az állatok rágókészülékének összehúzóási frekvenciáját adja meg (kontrakció/másodperc), szignifikánsan csökkent a napellin (**83**) és nőtt az akonozin (**69**) és szongorin (**9**) esetén (**24/C ábra**). A redukciós kapacitás, amely az élő állatok redukáló kapacitásáról és a kezelés hatására kialakuló oxidatív stresszről ad információt,

szignifikánsan nőtt akonozin (**69**), akonitin (**1**), szenbuzin C (**87**) és szongorin (**9**) hatására, míg napellin (**83**) alkalmazása esetén csökkent (**24/D ábra**).

5.4.2. *Centaurea* fajok sebgyógyító és gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata

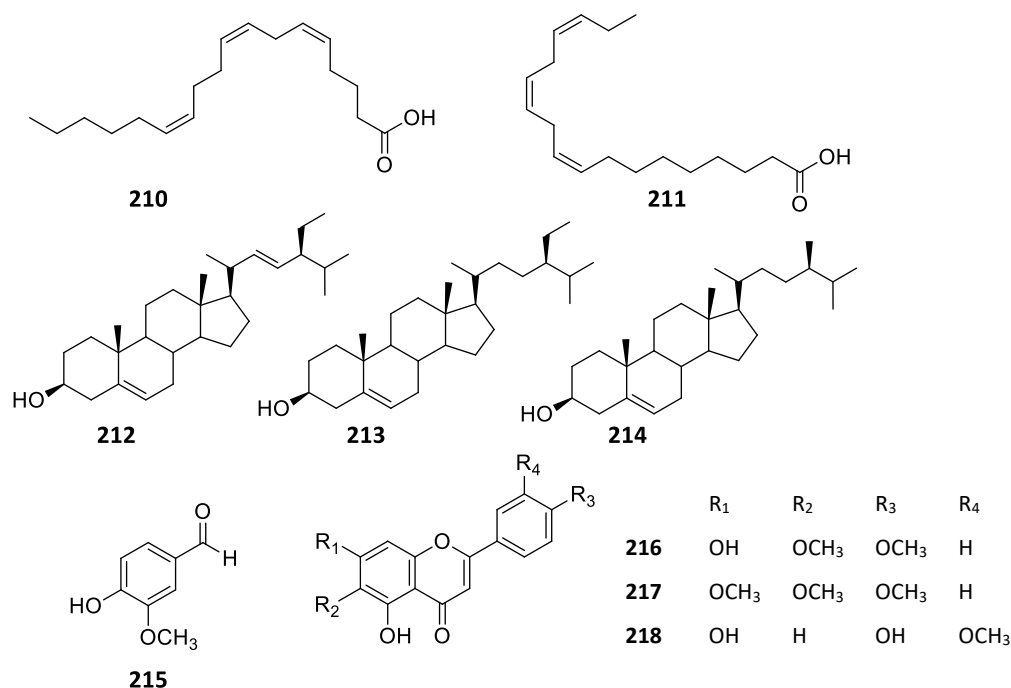
A *Centaurea sadleriana* föld feletti részének főzetét juhok sebeinek gyógyítására alkalmazták és alkalmazzák napjainkban is Jakabszállás (Bács-Kiskun megye, Magyarország) környékén. Valószínűleg ezzel függhet össze a növény népies neve (jajkóró). Ezt a tradicionális gyógynövényi felhasználást kutatócsoportunk dokumentálta először.^{36*}

A népi gyógyászati felhasználás racionalitását vizsgálva a *C. sadleriana* sebgyógyulásra kifejtett hatását állatkísérletben tanulmányoztuk. A vizsgálathoz a növény föld feletti részének különböző polaritású kivonatait készítettük el. A sebgyógyulásra kifejtett hatást patkányokon égetéssel előidézett seben tanulmányoztuk.³⁵² Kezelés nélkül a sebgyógyulás átlagos ideje 17,1 nap volt, placebokezelés esetén 17,0 nap, pozitív kontroll esetén 13,9 nap (**25. ábra**). A CSE-3 (hexános) frakció szignifikánsan rövidítette a sebgyógyulás idejét (14,4 nap) a placebohoz képest. A többi vizsgált frakció esetén mérsékelt, statisztikailag nem szignifikáns kedvező hatás (átlagos sebgyógyulási idő 14,8-16,3 nap) volt tapasztalható. A növényi kivonatok pozitív hatása a vizsgálat teljes időtartama alatt megfigyelhető volt.



25. ábra A *Centaurea* kivonatok (CSE 1-5) hatása a sebgyógyulásra ($p < 0,05$ a placebohoz viszonyítva)

A leghatásosabbnak bizonyult CSE-3 frakció többlépéses kromatográfiás tisztításával 7 tiszta vegyületet nyertünk ki, amelyek szerkezetét spektroszkópiás módszerekkel γ -linolénsavként (**210**), α -linolénsavként (**211**), sztigmaszterinként (**212**), β -szitoszterinként (**213**), kampezsterolként (**214**), pektolarigeninként (**216**) és szalvigeninként (**217**) azonosítottuk. A CSE-4 (kloroformos) frakcióból további 4 vegyületet [vanillin (**215**), hiszpidulin (**9**), krizoeriol (**218**) és apigenin (**11**)] izoláltunk és azonosítottunk.

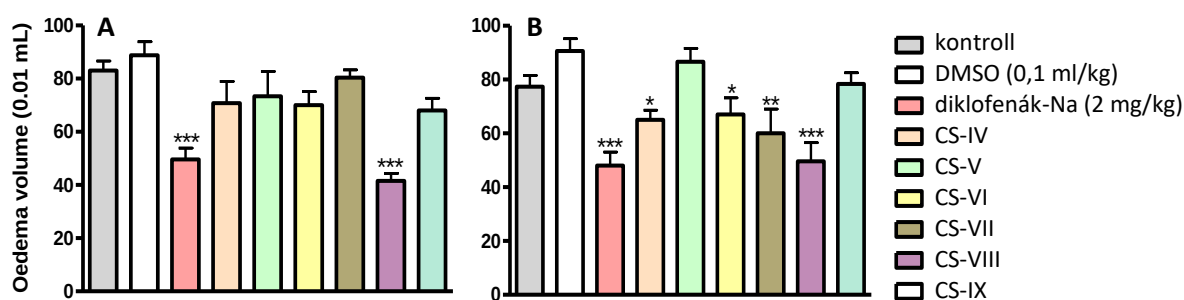


A növényen végzett kísérletek során különböző polaritású kivonatok COX-1, COX-2 és 5-LOX gátló aktivitásait teszteltük *in vitro* tesztrendszerben (**23. táblázat**). Míg a vizes és metanolos kivonat (CSE-1 és CSE-2) nem mutatott aktivitást, a kloroformmal és a hexánnal készült extraktum (CSE-3 és CSE-4) mindhárom tesztben jelentős gyulladáscsökkentő hatást fejtett ki.

23. táblázat *C. sadleriana* kivonatok (50 µg/ml) *in vitro* gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata

Kivonat	COX-1 gátlás (%)	COX-2 gátlás (%)	5-LOX gátlás (%)
CSE-1	-40,33±5,65	-23,58±11,97	-29,21±10,38
CSE-2	-5,43±11,73	25,11±3,45	-10,99±14,27
CSE-3	80,71±4,56	90,39±2,94	53,23±6,29
CSE-4	76,09±6,65	86,92±5,66	47,49±9,30

Az *in vitro* legmarkánsabb hatású CSE-3 kivonatot kromatográfiásan frakcionáltuk, majd a nyert CSE-I-XIII frakciók hatását is teszteltük. A CSE-IV-IX frakciók jelentős aktivitást mutattak mindhárom tesztrendszerben (59,61%±9,44 a COX-1, 79,53%±8,09 a COX-2, 70,16%±7,43 az 5-LOX tesztben), ezért ezek gyulladáscsökkentő hatásukat *in vivo*, karragén-indukált patkánylábödémát mérséklő hatásuk mérésével határoztuk meg. Orális adagolás esetén a CSE-VIII frakció, intraperitoneális bevitel esetén pedig ezen kívül a CSE-IV, -VI, és -VII is jelentős aktivitást mutatott. A CSE-VIII frakcióból rétegekromatográfiás módszerrel fő komponensekként a stigmaszterint (**212**) és a β-szitoszterint (**213**) azonosítottuk.



26. ábra Per os (A) (25 mg/kg) és intraperitoneálisan (B) (5 mg/kg) adagolt *C. sadleriana* kivonatfrakciók gyulladáscsökkentő hatása karragén-indukált patkánylábödématesztben (* p<0,05, a kontrollhoz képest)

A *C. sadleriana*hoz hasonlóan ígéretes fajok azonosításának céljával vontunk vizsgálat alá 10 további fajt.^{37*} Ezek metanolos kivonatát vízzel elegyítés után *n*-hexánnal (A frakció), kloroformmal (B frakció) extraháltuk, ezen kívül pedig a visszamaradó vizes-metanolos C frakciót, valamint a visszamaradó drog forró vizes kivonatát (D frakció) is vizsgáltuk. Az A frakciók esetén markáns enzimgátló hatás volt tapasztalható (>60%), a többi frakció esetén mérsékelt hatást vagy inaktivitást tapasztaltunk (24. táblázat).

24. táblázat *Centaurea* fajok kivonatainak (50 µg/ml) *in vitro* gyulladáscsökkentő hatása

Faj		A frakció		B frakció		C frakció		D frakció		SD
		Gátlás (%)	SD	Gátlás (%)	SD	Gátlás (%)	SD	Gátlás (%)	SD	
<i>C. adjarica</i>	COX-1	68,76	5,53	27,06	10,11	-23,82	22,79	-17,52	15,60	
	COX-2	71,00	2,14	35,34	4,54	-4,21	10,64	6,91	13,99	
<i>C. bracteata</i>	COX-1	67,81	5,78	24,52	11,20	-7,42	11,37	-17,53	12,39	
	COX-2	60,79	18,69	21,61	19,14	-28,41	23,09	-25,36	26,19	
<i>C. cataonica</i>	COX-1	65,72	11,05	-0,28	28,17	-2,70	6,46	-24,26	20,07	
	COX-2	68,49	11,35	10,82	14,43	6,53	6,08	0,76	10,96	
<i>C. cynaroides</i>	COX-1	66,01	3,13	10,71	16,27	-21,06	12,56	-18,27	8,72	
	COX-2	68,68	2,91	17,97	8,71	0,66	5,98	2,44	8,38	
<i>C. dealbata</i>	COX-1	69,39	8,58	22,15	9,34	-27,41	20,55	-54,99	24,09	
	COX-2	61,63	7,01	24,69	8,86	3,30	12,61	-6,13	11,23	
<i>C. indurata</i>	COX-1	71,84	7,31	23,36	5,81	-20,86	22,27	-5,90	8,29	
	COX-2	71,10	3,22	38,87	13,23	-13,11	7,87	10,66	7,55	
<i>C. macrocephala</i>	COX-1	74,73	5,71	25,60	14,61	-23,39	8,05	-26,57	15,86	
	COX-2	77,00	3,18	22,87	6,58	6,40	10,66	-0,28	10,37	
<i>C. melitensis</i>	COX-1	53,50	10,49	5,88	6,72	-8,81	11,29	-10,48	6,83	
	COX-2	71,82	11,53	18,78	8,25	0,83	7,61	-0,51	6,00	
<i>C. nigrescens</i>	COX-1	72,77	7,54	24,17	16,44	-2,17	10,25	5,90	6,85	
	COX-2	78,51	6,66	44,77	10,02	4,05	10,28	9,12	7,37	
<i>C. ruthenica</i>	COX-1	69,34	5,33	9,74	5,75	3,08	6,83	-5,71	9,67	
	COX-2	78,27	7,47	18,37	6,90	6,53	6,08	4,24	6,34	

5.4.3. Parlagfű szubakut toxicitási vizsgálata

Szakirodalmi adatok hiányában munkánk célja a parlagfű szubakut toxicitási vizsgálatának elvégzése volt. A kísérleteket patkányokon végeztük, egy olyan készítménnyel, amely aktív összetevőként csak nyersen aprított parlagfűvet tartalmazott. A termék azonosságát a növényre jellemző szeszkviterpén-laktonok^{353–356} LC-MS-sel történő kimutatásával igazoltuk.^{38*}

A vizsgálatba bevont 170–200 g tömegű hím SPF Wistar patkányokat 3 csoportra osztottuk, a kontrollcsoporton kívül egy kisebb (KD) és egy nagyobb (ND) dózisú parlagfüvet kapó csoportot képeztünk (8–8 állat). A kezelésben részesült állatok 28 napon át naponta 500 mg/ttkg (KD) vagy 1000 mg/ttkg (ND) parlagfűkészítményt kaptak tésztagolyóba gyúrva, a kontroll csoport üres tésztagolyót kapott. Az alkalmazott dózist a humán medián hatásos dózisból (ED₅₀, az adagolási javaslat alapján) kalkuláltuk, a human-állat extrapolálásánál 10-szeres szorzót alkalmazva (ND). A KD-t az OECD ajánlásainak megfelelően ennek felében határoztuk meg.³⁵⁷

A vizsgálat fő végpontjai a klinikai tünetek, a testtömeg és a szervek tömegeinek változásai, valamint a laborparaméter-változások voltak. Az állatokat folyamatosan figyeltük az abnormális jelek, tünetek, a morbiditás és a mortalitás rögzítésének érdekében. A kísérlet végén az állatokat elaltattuk, szerveik (agy, máj, tüdő, szív, vese, lép, thymus és mellékvese) tömegét megmértük. Az ugyanekkor levett vérminták laboratóriumi vizsgálata során a koleszterin, triglicerid, HDL, LDL, ALT, AST, ALP, GGT, bilirubin, karbamid, kreatinin koncentrációját, a leukocitaszámot, a neutrofilek számát és arányát, a limfociták, monociták, eozinofilek, bazofilek, eritrociták, trombociták számát, a hemoglobint, hematokritot, MCV-t, MCH-t, MCHC-t, RDW-CV-t és MPV-t határoztuk meg. A klinikai megfigyelések során nem észleltünk szignifikáns különbséget a csoportok között. A biokémiai paraméterek közül a májműködéssel összefüggő enzimek (AST, ALT) aktivitásában, a triglicerid, a karbamid és a kreatinin plazmakoncentrációjában figyeltünk meg szignifikáns eltéréseket a kezelt állatokban.

25. táblázat A parlagfűvel kezelt csoportokban szignifikáns eltérést mutató biokémia paraméterek (*: p<0,05; **: p<0,01)

Biokémiai paraméter plazmaszint	Kontroll	KD (500 mg/ttkg)	ND (1000 mg/ttkg)	kontroll vs. KD	kontroll vs. ND	KD vs. ND
triglicerid (mmol/l)	1,16 (0,32)	0,75 (0,19)	0,95 (0,27)	**	-	-
AST (IU/l)	182,13 (51,94)	106,75 (11,37)	142,50 (36,68)	**	*	-
ALT (IU/l)	61,25 (17,37)	42,38 (5,93)	53,25 (14,31)	*	-	-
karbamid (mmol/l)	9,23 (0,76)	9,91 (1,45)	10,96 (1,29)	-	*	-
kreatinin (μmol/l)	34,00 (6,32)	31,13 (4,88)	41,38 (5,97)	-	-	**

Az állatok tömegnövekedésében nem volt szignifikáns eltérés. A relatív szervtömegek közül a máj teljes testtömeghez viszonyított tömege dóziszfüggően és szignifikánsan csökkent (kontroll: 3,9091 ± 0,1221; KD: 3,5440* ± 0,1192; ND: 3,4527** ± 0,3694; *: p < 0,05; **: p < 0,01), míg az agy relatív tömege mindkét csoportban szignifikánsan nőtt a kontroll csoporthoz képest (kontroll: 0,5381 ± 0,0206; KD: 0,5950* ± 0,0464; ND: 0,5928* ± 0,0289; *: p < 0,05). A szervek hisztopatológiai vizsgálata során két, az ND csoportba tartozó állatnál policisztás vesebetegséget diagnosztizáltunk (az eltérés makroszkóposan is megfigyelhető volt). Mivel ezt a betegséget genetikai mutáció okozhatja,³⁵⁸ megvizsgáltuk, hogy az érintett állatok adatainak kizárása megváltoztatja-e a

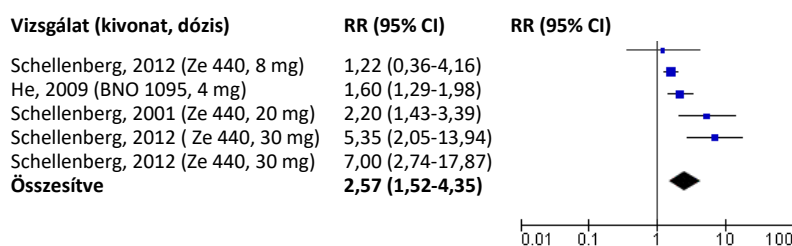
karbamid- és kreatininszinttel kapcsolatban tett megállapításainkat, de a szignifikanciában nem történt változás a kizárást követően.

5.5. Növényi készítmények humán hatásosságának értékelése metaanalízisekkel

5.5.1. A barátcserje hatásossága premenstruációs szindrómában

A barátcserjét Európa több országában, így Magyarországon is a PMS terápiájában alkalmazzák gyógyszerként. Alkalmazását indokolja, hogy a PMS specifikus farmakoterápiája nem megoldott. A növényvel végzett ilyen irányú vizsgálatok eredményeinek kritikus újraértékelése során a metaanalízisbe olyan vizsgálatokat vontunk be, amelyekben megfelelően jellemzett *V. agnus-castus* termékek hatásosságát placebohoz viszonyították PMS-ben.^{39*} A hatásosságot a kezelésre reagálók arányával mértük, a tüneti összpontszám csökkenése alapján a PMS-naplóban. 21 klinikai vizsgálatból 3 (520 résztvevő) felelt meg a bevonási kritériumoknak, ezekben a Ze 440 (60%-os etanollal nyert)^{359,360} és a BNO 1095 jelzésű (70%-os etanollal extrahált)³⁶¹ speciális kivonatokat tanulmányozták.

A kezelést az egyes vizsgálatokat végzők akkor ítélték hatásosnak, ha a Total Symptom Score (TSS), illetve a Premenstrual Syndrome Diary (PMSD) skálákon mért javulás elérte az 50, illetve a 60%-ot. A vizsgálatok eredményeinek metaanalízisére a nagyfokú heterogenitás ($Q = 15,32$; $df = 4$; $p = 0,004$; $I^2 = 74\%$) miatt a véletlenhatás modellt alkalmaztuk. A teljes betegcsoportban a növényi kivonat alkalmazása esetén szignifikánsan nagyobb esély volt a tünetek enyhülésére [RR 2,57, 95% CI (1,25–4,35)] (**27. ábra**), és az alcsoport-analízisek is ugyanezt az eredményt hozták. A magasabb dózisú (20–30 mg) kezelés hatásosabb volt, mint az alacsonyabb (4–8 mg) (RR 3,96 vs RR 1,58) és a Ze 440 kivonat hatásosabb, mint a BNO 1095 (RR 3,19 vs RR 1,60).



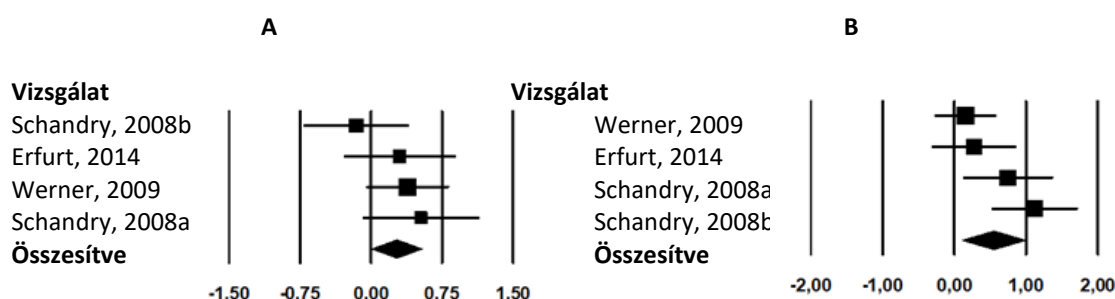
27. ábra Barátcserjekivonatok hatásossága a placebohoz viszonyítva (1-nél nagyobb RR az aktív kezelés hatásosságát igazolja)

5.5.2. A galagonya és a kámfor kombinációjának hatása a vérnyomásra

A galagonya és kámfor fix kombinációja (Korodin) évtizedek óta használatban van a hipotenzió kezelésében Európa több országában. A termék D-kámfor és friss galagonyatermés folyékony kivonatát (DER: 1:1,3–1,5; 93%-os etanollal kivonva) tartalmazza fix kombinációban (100 g készítményben 2,5 g D-kámfor és 97,3 g galagonyatermés-kivonat). Az életminőséget és -kilátásokat egyaránt rontó hipotenzió kezelésére nem állnak rendelkezésre modern, kedvező

hatás-mellékhatás profilú szerek, így máig létjogosultsága van az általunk is tanulmányozott kombinációnak, amely hatásosságát kezdetben a tapasztalat, később klinikai vizsgálatok is alátámasztották. Célunk a klinikai vizsgálatok első metaanalízisének elkészítése volt.^{40*} Összesen négy randomizált vizsgálat 221 alanyának adatait vetettük statisztikai vizsgálat alá, amelyekben a galagonya és kámfor kombinációjának hipotenziós és normotenziós betegek vérnyomására és mentális teljesítményére gyakorolt hatását vizsgálták.

A diasztolés vérnyomásadatok kvantitatív metaanalízisére az adatok homogenitása ($Q = 3,192$, $df = 3$, $p = 0,363$, $I^2 = 6,009\%$) miatt a fixhatás modellt alkalmaztuk. Az elemzés azt bizonyította, hogy az aktív kezelés hatásosabb volt, mint a placebo (Hedges-g-érték = 0,269, 95% CI: 0,001–0,538, $p = 0,049$) (**28. ábra**). A szisztolés vérnyomásra gyakorolt hatás statisztikai analízisére a jelentős heterogenitás ($Q = 7,691$, $df = 3$, $p = 0,053$, $I^2 = 60,995\%$) miatt a véletlenhatás modellt alkalmaztunk. A metaanalízisünk eredménye alátámasztja a feltevést, hogy a Korodin emeli a szisztolés vérnyomást (Hedge-g érték = 0,546, 95% CI: 0,099–0,992, $p = 0,017$).



28. ábra A diasztolés (A) és szisztolés (B) vérnyomásra gyakorolt hatás statisztikai analízise (Hedges g-értékek és 95%-os konfidenciaintervallumok; a 0-nál nagyobb Hedge-g érték az aktív kezelés hatásosságára utal)

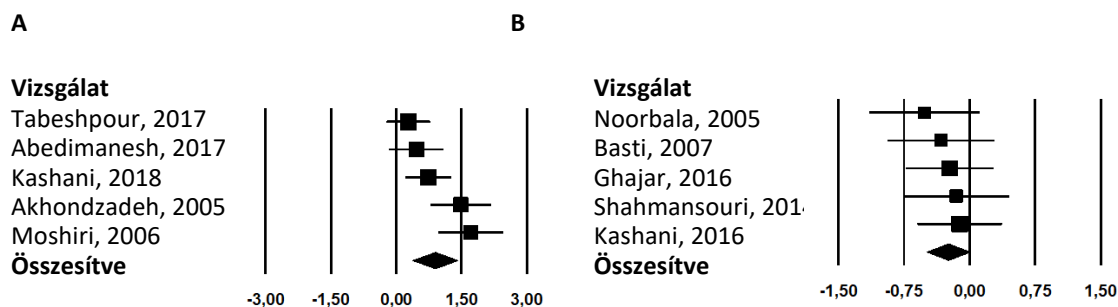
A bevont vizsgálatok közül három közölt adatokat a kognitív teljesítményt mérő (számösszekötős) tesztről, ezen adatok metaanalízise fixhatás modell alkalmazásával ($Q = 0,072$, $df = 2$, $p = 0,965$, $I^2 = 0\%$) arra utalt, hogy a Korodin nem szignifikánsan javítja a kezelt alanyok mentális teljesítményét (Hedge-g érték = 0,276, 95% CI: 0,024–0,576, $p = 0,071$).

5.5.3. A sáfrány hatásossága enyhe és mérsékelt depresszióban

A depresszió világszerte 300 millió embert érintő betegség, amelynek farmakoterápiája nem tökéletesen megoldott, ugyanis a szintetikus szerekre reagálók aránya sokszor nem haladja meg jelentősen a reagálókét,³⁶² és előfordul, hogy a kezelés egy idő után hatástalanná válik. A fitoterápia eszközei közül a *Hypericum perforatum* bizonyított hatásosságú gyógyszerek előállításra használatos, azonban sokrétű interakciós potenciálja korlátozza alkalmazását.³⁶³ A jőféle sáfrány (*Crocus sativus*) újabban nemcsak fűszerként elismert, hanem klinikai vizsgálatok rámutattak antidepresszáns hatására. A metaanalízisbe összesen 10 (2005–2018 között publikált)

klinikai vizsgálatot vontunk be.^{41*} A munka indokát a témában zajló kutatások intenzitása adja, ugyanis az utolsó metaanalízis óta 7 új klinikai vizsgálat jelent meg. A vizsgálatok 6–12 hétig tartottak, enyhe és közepesen súlyos depresszióban szenvedők részesültek különböző, jól jellemzett safránykészítményekkel végzett terápiában. Komparátorként placebót,^{364–368} aktív komparátorként egy vizsgálat kivételével (citalopram)³⁶⁹ fluoxetint^{370–373} alkalmaztak. A hatásosságot a HAM-D és BDI skálák segítségével mérték.

Az eredmények metaanalízise alapján megállapítható, hogy a sáfrány szignifikánsabban hatásosabban enyhíti az enyhe és mérsékelt depresszió tüneteit a placebohoz viszonyítva (véletlenhatás modell, ($Q = 14,490$, $df = 4$, $p = 0,006$, $I^2 = 72,4\%$; $g = 0,891$; CI 95%: $0,369–1,412$, $p = 0,001$) (**29. ábra**). A szintetikus antidepresszáns fluoxetin és citalopram hatásosabbnak bizonyult, azonban a különbség nem volt szignifikáns (fixhatás modell ($Q = 1,149$, $df = 4$, $p = 0,886$, $I^2 = 0\%$; $g = -0,246$; CI 95%: $-0,495–0,004$, $p = 0,053$).



29. ábra A sáfrány antidepresszáns hatása placebohoz (A) és aktív komparátorokhoz (B) viszonyítva (Hedges g-értékek és 95%-os konfidenciaintervallumok; a 0-nál nagyobb Hedge-g érték az aktív kezelés hatásosságára utal)

6. Megbeszélés

6.1. Gyulladáscsökkentő és ioncsatornákra ható alkaloidok

Az *Aconitum vulparia* Rchb.^{374,375} és az *A. toxicum* Rchb.³⁷⁶ gyökerével végzett fitokémiai vizsgálatot folytatva az *A. toxicum*, *A. anthora*, *A. moldavicum*, és az *A. napellus* subsp. *firmum* fajokból összesen 22 diterpén-alkaloidot izoláltunk többlépéses kromatográfiás tisztítással és azonosítottunk spektrometriás (döntően NMR) módszerekkel. A kromatográfiás tisztítás során alkalmazott módszerek hasonlóak voltak az egyes fajok esetén, azonban a kivonás és az első (durva) elválasztások során elérő stratégiákat alkalmaztunk. Az *A. anthoránál* az alkaloidok elválasztására klasszikusan alkalmazott fáziscserés eljárást használtunk, az *A. napellus* subsp. *firmumnál* is ugyanezt a módszert alkalmaztuk, viszont a hatékonyság növelését célozva híg savval végeztük a kivonást. A másik két faj (*A. toxicum* és *A. moldavicum*) esetén a pH-változtatással járó fáziscserét nem alkalmaztuk az izolálási folyamat egyszerűsítésére (további indok volt, hogy föld alatti részekről lévén szó nem volt szükséges a nagy mennyiségű klorofill eltávolítása).

Az *A. toxicumból* kinyert akotoxinin (**65**) elsőként általunk leírt, új természetes anyag. A delavakonin (**67**), a dolakonin (**68**), az akonozin (**69**) és a neolinin (**70**) teljes ¹H és ¹³C NMR jelasszignációját elsőként végeztük el, kiegészítve és korrigálva a korábban közölt adatokat.^{377,378} A kinyert vegyületek közül 4 [(akotoxinin (**65**), delavakonin (**67**), akonozin (**69**) és neolinin (**70**)] észterezetlen, feltehetőleg a biogenetikai folyamatok korai stádiumának képviselői. A dolakonin (**68**) és az akonozin (**69**) mindössze 4 oxigénfunkciót tartalmaz, ami a C₁₈ alkaloidok körében ritka. Mivel a C₁₈-alkaloidok az *Aconitum* fajokban viszonylag ritkák, az általunk izolált vegyületek kemotaxonómiai jelentőséggel is bírnak. Az *A. toxicumból* eddig mindössze 11 alkaloid ismert, a korábban szintén általunk kinyert vegyületek közül 3 C₁₉-, 2 pedig C₂₀-alkaloid volt.³⁷⁶

Az *Aconitum anthora* gyökeréből elsőként írtuk le a 10-hidroxi-8-O-metiltalizamin (**71**) jelenlétét, ezen kívül izoláltuk az izotalatizidint (**72**) és a hetizinon C₂₀-alkaloidot (**73**). A szakirodalom ezt megelőzően 6 alkaloid jelenlétéről számolt be a fajban, köztük az általunk is leírt izotalatizidinéről.³²⁵ Az izotalatizidin (**72**) néhány ¹³C NMR szignáljának asszignációját korrigáltuk, és elsőként közöltünk teljes ¹H NMR jelasszignációt.

Az *Aconitum moldavicum* gyökeréből egy új akonitánvázas alkaloidot, az 1-O-dezmetil-szvinint (**74**), a már ismert kammakonint (**75**), kolumbianint (**76**), szvinint (**77**), gigaktonint (**78**), delkozint (**79**), likoktonint (**80**) és ajacint (**81**) izoláltuk. A kolumbianint (**76**) és a szvinint (**77**) már leírták más fajokból (*A. laeve*, *A. ferox* és *A. lamarckii*),^{379–381} de a két vegyület teljes ¹H jelasszignációját mi végeztük el elsőként 2D NMR vizsgálatok alapján.

Az *A. napellus* subsp. *firmum* Rchb. gyökeréből 6 alkaloidot [neolin (**82**), napellin (**83**), izotalatizidin (**84**), karakolin (**85**), szenbuzin A (**86**), szenbuzin C (**87**)] izoláltunk, további kettőt [akonitin (**1**), taurenin (**88**)] pedig kimutattunk LC-MS módszerrel. A napellin (**83**) és a szenbuzin C (**87**) esetén 2D NMR mérések segítségével elsőként közöltük a vegyületek teljes ^1H NMR asszignációját, valamint a napellin (**83**) több szénatomja ^{13}C NMR szignáljának korábban közölt jelhozzárendelését³⁸² korrigáltuk. A napellint (**83**), izotalatizidint (**84**), karakolint (**85**) és szenbuzin C-t (**87**) mi írtuk le először ebből a taxonból.

Az *Aconitum* fajok kémiai vizsgálata a növények bioszintetikus útjainak alaposabb feltárására ad lehetőséget, ezen kívül bővíti azt a kémiai teret, amelynek farmakológiai vizsgálata humán terápiás szempontból is jelentős. Ugyanilyen motiváció alapján kezdtük meg a lipoalkaloidok tanulmányozását. Ez a munka az *Aconitum* fajok hagyományos kínai gyógyászatban való feldolgozásának vizsgálatából indult. Megfigyeltük, hogy bár az *Aconitum carmichaelii* nyers gyökerében a diészter-típusú diterpén-alkaloidok [akonitin (**1**), hipakonitin (**3**), mezakonitin (**2**)] a domináns összetevők, ezek a feldolgozás (hőkezelés vizes közegben) során elbomlanak, és ezzel egyidejűleg jelentősen nő bizonyos apoláros vegyületekhez tartozó HPLC csúcsok intenzitása a kromatogramokon. Ezek részletes LC-MSⁿ vizsgálatával összesen 26 vegyületet azonosítottunk. Az azonosított vegyületek lipoalkaloidok, amelyek a genuin alkaloidok átészterezésével keletkeznek. Ezek alapvázaként a 14-benzoil-hipakonint, a 14-benzoil-dezoxiakonint, a 14-benzoil-mezakonint, a 14-benzoilakonint, a 10-hidroxi-14-benzoilmezakonint és a 10-hidroxi-14-benzoilakonint azonosítottuk.^{53,341} Négy lipoalkaloid 4 jelenlétéről [14-benzoilhipakonin-8-nonadecenoát (**142**); 14-benzoilmezakonin-8-sztearát (**152**), -8-eikozanoát (**156**) és 10-hidroxi-14-benzoilmezakonin-8-linolenát (**160**)] elsőként számoltunk be. Ezt követően az *A. toxicum* gyökeréből is kimutattunk lipoalkaloidokat, de a vegyületek relatív kis mennyisége és hasonló polaritása nem tette lehetővé a tiszta formában való kinyerést. Mivel célunk volt a lipoalkaloidok farmakológiai vizsgálata, módszert adaptáltunk félszintetikus előállításukra, amely segítségével összesen 15 vegyületet állítottunk elő, tisztítottunk meg és azonosítottunk további kísérletek céljára. Elsődleges cél volt a gyulladáscsökkentő hatás vizsgálata, hiszen a feldolgozott drogokat legjellemzőbben ilyen céllal alkalmazzák. A lipoalkaloidok lehetséges szerepére a gyulladáscsökkentő hatásban az is utalt, hogy a feldolgozott növényi kivonat COX-1 és -2 enzimet gátló hatása jelentősebb volt, mint a nyers kivonaté, a diészter-típusú az akonitin (**1**) viszont igen mérsékelt hatást mutatott. A COX-1 és -2, valamint az LTB₄-képződés gátlásának tanulmányozására irányuló tesztekben a lipoalkaloidok eltérő aktivitást mutattak. Az COX-teszteken a 14-benzoilakonin-8-O-eikozapentaenoát (**172**) volt a legaktívabb, az 5-LOX gátlása szempontjából az 14-benzoilakonin-8-O-dokozahexaenoát (**173**) bizonyult a leghatékonyabbnak. A gyulladáscsökkentő lipoalkaloidok toxicitása ráadásul

nagyságrendekkel elmarad az anyavegyületekétől, ami humán gyógyászati szempontból is perspektivikussá teszi tanulmányozásukat.

Az ioncsatornákra kifejtett hatásokat vizsgálva eredményeink rámutattak arra, hogy a hERG-csatornagátló aktivitás és a szerkezet között a diterpén-alkaloidok között nem állapítható meg egyértelmű összefüggés, ezért ezek a vegyületek a szívizomsejtek K⁺-ioncsatornáira kifejtett potenciális hatásuk miatt mindaddig QT-idő megnyúlást, fatális kamrai aritmiát előidéző kockázati tényezőnek tekinthetők, amíg hERG-csatornagátló hatásuk kísérletes alapon ki nem zárható. A legjelentősebb hatású akonitin toxikus plazmakoncentrációja 30–1000-szer alacsonyabb, mint IC₅₀ értéke hERG-csatornagátlóként,^{383,384} azonban más alkaloidok esetén a két érték közötti különbség megfelelően alacsony lehet ahhoz, hogy sisakvirágdrogok alkalmazása során ilyen esetén nemkívánatos hatásuk érvényesüljön. Terápiás szempontból azok a vegyületek lehetnek perspektivikusak, amelyek elhanyagolható hERG-inhibíció mellett szelektíven gátolják a GIRK káliumioncsatornát, vagy farmakológiai támadáspontként számításba vehető nátriumioncsatornát (pl. Na_v1.2). Kísérleteink során azonosítottunk ilyen vegyületeket, például a 14-benzoilakonin-8-*O*-eikoz-8Z,11Z,14Z-trienoátot (**188**) és a 14-benzoilakonin-8-*O*-eikoz-11Z,14Z,17Z-trienoátot (**189**), illetve az ajacint (**81**) és a delektinint (**187**).

A humán toxicitás szempontjából jelentős *in vitro* vizsgálatokat jól kiegészítik olyan fajokon végzett kísérletek, amelyek további adalékokkal szolgálhatnak az alkaloidok toxikológiai profiljához. A *Philodina acuticornis odiosa* kerekesféreg fajon végzett vizsgálat célja kettős volt: egyrészt a vizsgálati módszerek kipróbálása ezen a vegyületcsoporton, mivel korábban diterpén-alkaloidokat nem vizsgáltak rotifereken, másrészt pedig az alkaloidok túlélésre, fejlődésre és viselkedésre kifejtett hatásának tanulmányozása. Érdekes módon a tesztelt vegyületek nem bizonyultak toxikusnak a napellin (**83**) kivételével, mely vegyület rontotta a viabilitási paramétereket. A többi vegyület esetén változatlan vagy megnyúlt túlélési időt és testméretindexet figyeltünk meg a kontrollhoz képest. A mastaxfrekvencia esetén statisztikailag szignifikáns, toxicitásra utaló csökkenést figyeltünk meg napellin (**83**) esetén, míg az akonozin (**69**) és a szongorin (**9**) fokozta a frekvenciát, ami a rotiferek aktivitásának fokozására utal. A redukciós kapacitás minden esetben nőtt, kivéve a napellint (**83**), ami megerősíti ezen vegyület toxikus hatását az állatokon.

Az általunk vizsgált vegyületek zömének toxicitását kevésbé tanulmányozták szisztematikusan. Az akonitin (**1**) közismert mérge, hatását elsősorban a Na⁺-csatornák aktiválásával hozzák összefüggésbe.¹⁹ Ennek a vegyületnek az LD₅₀ értéke intravénás adagolás esetén egereken 0,1–1 mg/kg,³⁸⁵ míg ugyanez az érték szongorinnál (**9**) 142,5 mg/kg,³⁸⁶ napellinnél (**83**) 88 mg/kg.³⁸⁷ A szenbuzin A (**86**), szenbuzin C (**87**), szeptentrioidin (**7**) és a hetizinon (**73**) esetén elsőként közöltünk állatkísérletes toxikológiai adatokat. Vizsgálataink igazolták a szongorin (**9**)

alacsony toxicitását, azonban az általunk alkalmazott tesztrendszerben, szemben az emlős sejtekkel, a napellin (**83**) toxikusabb volt, mint az akonitin (**1**). Kísérleteink nem voltak alkalmasak ennek a jelenségnek mélyebb feltárására, azonban további kutatásokra érdemes kérdéseket vetnek fel. A kerekeshégek ioncsatornáinak szerkezete, szelektivitása egyáltalán nem ismert; elképzelhető, hogy a humán sejteken toxikus anyagok ezeken a csatornákon kevésbé aktívak. Az is elképzelhető, hogy a kerekeshégeken a napellin (**83**) más támadásponton keresztül is kifejtett toxikus hatást, így bizonyult mérgezőbbnek az akonitinnél.

6.2. Kannabinoidrendszerre ható *N*-alkil-amidok és antimetasztatikus lignánok

A kutatás keretében két faj, a *Lepidium meyenii* és a *Heliopsis helianthoides* var. *scabra* *N*-alkil-amidjainak izolálását tűztük ki célul. A *L. meyenii* esetén az apoláros *N*-alkil-amidokat szelektíven extraháló *n*-hexánnal végeztük a kivonást, majd az ilyen típusú vegyületek izolálására korábban nem alkalmazott CPC (és HPLC) alkalmazásával viszonylag kevés lépésben jutottunk el a tiszta vegyületek kinyeréséig. A *H. helianthoides* var. *scabra* esetén az extrakciót metanollal végeztük, amely szélesebb polaritási tartományban hatékony kivonószer. Ennek eredményeként az extraktum többlépéses, klasszikus kromatográfiás módszerekkel (VLC, MPLC, RPC, PLC, HPLC) végzett tisztításával az *N*-alkil-amidokon kívül más kémiai csoportba tartozó vegyületeket is kinyertünk.

A *L. meyenii*-ből izolált három vegyület mindegyike aromás szubsztituenst és többszörösen telítetlen (dién vagy trién) 18 szénatomos alifás láncot tartalmazó ismert makamid: *N*-(3-metoxibenzil)-(9*Z*,12*Z*,15*Z*)-oktadekatriénsavamid (**99**), *N*-benzil-(9*Z*,12*Z*,15*Z*)-oktadekatriénsavamid (**100**) és *N*-benzil-(9*Z*,12*Z*)-oktadekadiénsavamid (**101**).⁸¹

A *Heliopsis helianthoides* var. *scabra*-ból egy ismert (**89**) és három új (**90-92**) 16, ill. 18 szénatomos, 3-6 kettős, illetve acetilénkötést tartalmazó zsírsavon alapuló izobutil- és metilbutilamidot nyertünk ki. Az új vegyületek teljes ¹H és ¹³C jelhozzárendelését elvégeztük (az **90** esetén csak ¹H jelhozzárendelés történt), a szerkezetazonosítást 2D NMR és HR-MS mérések is megerősítették. A oktadeka-2*E*,4*E*,8*E*,10*Z*,14*Z*-pentaén-12-insav izobutilamid (**89**) jelenlétét elsőként írtuk le ebből a taxonból. Korábban a *H. buphthalmoides*-ből már kimutatták,^{88,328} de ¹³C NMR adatait elsőként közöltük. Ebből a taxonból korábban két izobutil-amidot mutattak ki, a szkabrint (**15**) és a heliopszint (**16**).^{89,90} A *H. longipes*^{388,62} *N*-alkil-amidjai 1-3 kettős kötést, míg a *H. buphthalmoides* és a *H. helianthoides* vegyületei pentaén- és hexaén zsírsavakat tartalmaznak. Az általunk izolált három új természetes vegyület [oktadeka-2*E*,4*E*,8*E*,10*Z*,14*Z*-pentaén-12-insav-2'-metilbutilamid (**90**), hexadeka-2*E*,4*E*,9*Z*-trién-12,14-diinsav-izobutilamid (**91**) és hexadeka-2*E*,4*E*,9,12-tetraénsav-2'-metilbutilamid (**92**)] közül kettő acetilénszármazék, egy pentaén, egy

tetraén és egy trién vegyület. A *Heliantheae* tribusban mindössze hat nemzetségben (*Acmella*, *Echinacea*, *Heliopsis*, *Salmea*, *Sanvitalia* és *Wedelia*) mutattak ki olefin típusú *N*-alkil-amidokat,³⁸⁹ ezért a 7 vegyület kemotaxonómiai szempontból is értékes vegyület.

A lignánok – az *N*-alkil-amidok mellett – a *Heliopsis* nemzetség jellegzetes vegyületei. A taxonból korábban dibenzilbután és dibenzil-butirolakton típusú vegyületeket írtak le.^{62,88,328,390} A *H. helianthoides* var. *scabrá*ból egy dibenzilbutirolakton (heliantoidin) és az arilnaftalin helioxantint (95) mutatták ki.^{391,392} A *H. helianthoides* var. *scabrá*ból két új arilbenzofurán neolignánt, az 1"-dehidroegonol-3"-metilétert (93) és az egonol-3"-metilétert (94), valamint további négy ismert lignánt (95–98) is kinyertünk és azonosítottunk a növényből. Az helioxantint (95) korábban már leírták a *H. helianthoides* var. *scabra* gyökeréből³⁹¹ és több más fajból is.^{393,394,403–405,395–402} A dibenzilbután (7*E*)-7,8-dehidroheliobuftalmint (96) és heliobuftalmint (97) korábban már izolálták a *H. buphthalmoides*ből, de elsőként mutattuk ki ebből a fajból.³⁹⁰ A dibenzilbutirolakton 7-acetoxihinokinint (98) szintén elsőként azonosítottuk a növény családban, korábban egy *Ruta* fajból írták le.⁴⁰⁶

Az izolált *N*-alkil-amidok farmakológiai vizsgálata során nem azonosítottunk MAGL-gátló hatással rendelkező vegyületeket. Leginkább figyelemre méltó aktivitással a 89 és 92 vegyületek rendelkeztek. A 92 anandamidvisszavétel-gátló hatása jelentősebb volt, mint FAAH-gátló aktivitása. A CB-receptorszelektivitásra több tényező, így az alkilánc hossza, telítetlensége, valamint a fejcsoport minősége egyaránt befolyással lehet.⁴⁰⁷ Az általunk azonosított, potens CB₁-receptorligand 89 vegyület metilbutil-amid fejcsoportot tartalmaz, valamint egy négy kettős kötést tartalmazó alkiláncból épül fel. Korábbi vizsgálatok alapján a 2*E* kettős kötést a CB₁-affinitás alapfeltételének tartják,⁴⁰⁷ azonban a 92 esetén hasonló aktivitás és szelektivitás volt megfigyelhető. Utóbbi vegyület jelentőségét az adja, hogy szubmikromoláris koncentrációban hatásos az endokannabinoid rendszer több támadáspontján (CB₁ receptor, anandamidvisszavétel gátlása – utóbbi esetén hatásosabb, mint a számos kutatásban referenciaként használt ODMD-2). Ennek oka az a hasonlóság is lehet, amely a vegyület 9*Z*,12*Z*-oktadekadién alkilánca és az endokannabinoidokban található arachidonoillánc között fennáll. A potens 92, és az anandamidvisszavétel gátlása és CB₁-affinitás szempontjából is gyengébb hatású 90 és 91 vegyületek közötti alapvető eltérés egy további kettős kötés (15*Z*) utóbbiak alkiláncában.

Az *L. meyenii*ből izolált 7 vegyület általunk leírt hatása és az etnofarmakológiai megfigyelések közötti összefüggés felderítése további kutatást igényel. Bár a receptoraffinitás bizonyított, a hatás agonista/antagonista jellegének tisztázása alapvető jelentőségű. Az is kérdéses, hogy a népi gyógyászatban termékenységfokozóként használt, és a spermatogenezist állatkísérletben bizonyítottan fokozó⁴⁰⁸ hatásában van-e szerepe a kannabinoidrendszer befolyásolásának, ugyanis a CB₁ receptorok spermiumokban is expresszálódnak.⁴⁰⁹

A lignánok szerteágazó biológiai aktivitásai között kiemelt helyen említhető antineopláziás aktivitásuk. Az enterolignánok,⁴¹⁰ valamint egyéb lignánok, állatkísérletesen kimutatott daganatellenes hatással jellemezhetőek, az *in vitro* bizonyítékok száma még bőségebb. A vegyületcsoportból kiemelkednek a podofillotoxin és származékai, amelyek a daganatellenes gyógyszerek fejlesztésében modellvegyületnek számítanak.⁴¹¹ A vegyületek áttétképződést gátló, ezen belül pedig az endoteliális barrieréken keresztüli átjutást befolyásoló hatását nem tanulmányozták. Ennek ugyanakkor nagy jelentősége van, mivel bizonyos daganattípusokban nem a primer daganat, hanem az áttétek (pl. a melanómára jellemző agyáttét) kezelése jelent komolyabb kihívást.⁴¹² Az áttétképzés főbb lépései a daganatsejtek intravazációja, terjedése a vérkeringéssel, endotéliumhoz való adhéziójuk, extravazációjuk és az áttétképződés helyén történő daganatnövekedés. Egyes lignánokról leírtak olyan aktivitásokat, amelyek befolyásolhatják az áttétképződést az adhézió gátlásával. Mivel a *Heliopsis* nemzetség lignánjait az áttétképződés befolyásolása szempontjából nem vizsgálták korábban, perspektivikusnak találtuk ilyen célú tanulmányozásukat.

Kísérleteink során elsőként igazoltuk a TEER mérésével lignánok (**95** és **96**) barrierfunkciót javító hatását. Eredményeink arra utalnak, hogy a két vegyület a BBB-funkció javításával mérsékelheti a metasztázis kialakulásának kockázatát, de ennek a hatásnak egyéb patológikus állapotokban is jelentőség elehet. Több lignánról leírták korábban, hogy gátolják a metasztatikus potenciálú daganatsejtek migrációját,^{413,414} ami az áttétképződésre kifejtett befolyásoló hatást is feltételezhet. Az általunk a **95** és **96** lignánnál kimutatott migrációgátló hatást korábban egyéb lignánoknál is igazolták, sőt egyes esetekben az áttétképződés gátlását *in vivo* is bizonyították.^{413,415} A migrációt gátló hatás az endotélsejtek esetén is előnyös lehet, ugyanis a tumor angiogenezis megakadályozásának ez lehet az egyik útja. Ilyen hatást egy lignánról, a szeizoizolaricirezinol-diglükozidról már leírtak.³¹¹

6.3. Antiproliferatív és antimikróbás hatású mohafajok és rendhagyó szerkezetű pigmentjeik

A mohafajokkal végzett vizsgálat alapja a növényi kivonatok antiproliferatív és antimikróbás hatásra való szűrése volt. A biológiai tesztek valamelyikében aktívnak bizonyult 14 hazai mohafajról (*Amblystegium serpens* (Hedw.) Schimp., *Barbula unguiculata* Hedw., *Bryum caespitium* Hedw., *Cirriphyllum piliferum* (Hedw.) Grout, *Dicranum tauricum* Sapjegin, *Encalypta streptocarpa* Hedw., *Hygroamblystegium tenax* (Hedw.) Jenn., *Neckera bessi* (Lobarz.) Jur., *Oxyrrhynchium hians* (Hedw.) Loeske, *Paraleucobryum longifolium* (Hedw.) Loeske, *Pseudoleskeella nervosa* (Brid.) Nyholm, *Schistidium crassipilum* H. H. Blom, *Syntrichia ruralis* (Hedw.) F. Weber & D. Mohr és *Thuidium assimile* (Mitt.) A. Jaeger) egyáltalán nem érhető el farmakológiai adat a

szakirodalomban. Az etnofarmakológiai adatok is szórványosak: a *Barbula unguiculatát* láz- és fájdalomcsillapítóként, a *Bryum argenteumot* ezen kívül gombás fertőzésekre is használták a népi gyógyászatban.⁴¹⁶ Amennyiben vannak irodalmi előzmények, azok nem támasztják alá közvetlenül megállapításainkat. Kivételt képez az *Atrichum undulatum*, amelynek vizes és DMSO-s kivonata korábbi vizsgálatok szerint antibakteriális hatással rendelkezik, de ezt a mi vizsgálataink nem igazolták.^{417,418} A *Brachythecium rutabulum*-ról markáns antibakteriális hatást írtak le,⁴¹⁹ amit mi is megerősítettünk. A *Bryum argenteum*, korábbi adatokkal ellentétben^{102,420,421} nem mutatott antibakteriális hatást. A *Climacium dendroides* általunk is megfigyelt antiproliferatív és antimikróbás hatását korábban is leírták.⁴²² A *Rhytidium rugosum* antibakteriális hatásról már korábban is beszámoltak.⁴²³

Mindkét (antiproliferatív és antimikróbás hatásra irányuló) tesztben az apolárosabb kivonatok (*n*-hexános és kloroformos) voltak aktívabbak, a poláros kivonószerezellel készült extraktumok kevésbé, vagy egyáltalán nem voltak hatásosak. Az antiproliferatív és antimikróbás hatás között nem volt összefüggés: az antimikróbás hatású 14 fajból 7 gátolta a daganatsejtek növekedését, míg az antiproliferatív aktivitású (>50% gátlás 10 µg/ml-ban bármelyik sejtvonalon) 15 fajból 7 mutatott antimikróbás hatást. Az *Amblystegium serpens*, *Brachythecium rutabulum*, *Cirriphyllum piliferum*, *Climacium dendroides*, *Paraleucobryum longifolium*, *Plagiomnium affine* és a *Pseudoscleropodium purum* fajok kivonatai mindkét vizsgálatban aktívak voltak. Az antibakteriális és antiproliferatív hatásra irányuló szűrővizsgálatok korábban le nem írt bioaktivitásokra derítettek fényt. Az eredmények kiindulási alapul szolgálnak a szekunder metabolitok vizsgálatára, amelyek jelenlétére visszavezethetőek lehetnek az általunk megfigyelt hatások.

A szűrővizsgálat eredményei alapján további vizsgálatra kiválasztott egyik mohafaj a *Paraleucobryum longifolium* volt. A növény a Dicranaceae család tagja, Észak-Amerikában és Európában széles körben elterjedt, sziklákon, fatörzseken él 400-2900 m tengerszint feletti magasságon. A fajból korábban lipideket, szénhidrogéneket és szteril-észtereket írtak le.⁴²⁴ A *P. longifoliumból* elsőként írtuk le komplex szerkezetű szekunder metabolitok jelenlétét. Öt, korábban nem ismert fenantrén (leukobrin A–E, **102–105**), valamint a diozmetin 7-*O*-[2,4-di-*O*-(α -L-ramnopiranozil)]- β -D-glükopiranozidot (**107**) izoláltuk és azonosítottuk (ez utóbbi vegyületet már kimutatták egy mohafajból, a *Dicranum scopariumból*).⁴²⁵ A fenantrének színük alapján növényi pigmentnek tekinthetőek. A fenantrének a mohák jellegzetes szekunder metabolitjai, elsőként azonosított képviselőjük a 2-hidroxi-3,7-dimetoxifenantrén volt.⁴²⁶ Az azóta elmúlt több mint 30 évben mintegy két tucat vegyületet (fenantréneket, 9,10-dihidrofenantréneket, biszfenantréneket, biszbibenzil-fenantréneket) izoláltak különböző mohataxonokból.^{427–435} A leukobrinek (**102–105**) az első természetes 9,10-fenantrénkinon dimerek, amelyek monomerjei a

C-8 szénatomjaikon keresztül kapcsolódnak. A leukobrin B–E (**103–106**) rendhagyó C₁₀ monoterpén oldalláncot tartalmaz, amelyekben az izoprénegységek 3,4 kapcsolódásúak. A monomer 9,10-fenantrakinonok is nagyon ritkák a természetben, a mikroorganizmusokból kimutatott ilyen vegyületek erős antimikrobás és vírusellenes hatásúak.^{436,437} Az általunk izolált fenantrének antiproliferatív hatását nőgyógyászati sejtvonalakon vizsgálva megállapítottuk, hogy a leukobrin A (**102**) és B (**103**) mérsékelt, a többi vegyület elhanyagolható aktivitású. A vegyületek nagyobb mennyiségének előállítása esetén perspektivikusnak tűnik mikroba- vagy vírusellenes hatásuk vizsgálata.

6.4. Fitoösztrogének a *Cyclopia genistoides*ből

A *Cyclopia genistoides* herbájának fitokémiai vizsgálata 17 vegyület izolálását eredményezte. Tizennégy vegyületet először izoláltuk a fajból [(iriflofenon 2-O-β-glükopiranozid (**115**), helikrizin B (**113**), piceol (**122**), 4-hidroxibenzaldehid (**123**), (–)-2-metoximaackiain (**117**), (–)-maackiain (**118**), afrormozin (**119**), formononetin (**120**), likviritigenin (**121**), naringenin (**110**), 5,7,3',5'-tetrahidroxiflavánon (**114**), genisztein (**111**), izolikviritigenin (**112**), diozmetin (**109**)] és tíz komponenst pedig a *Cyclopia* nemzetségből (**111–115**, **117**, **118**, **121–123**). A **116** (iriflofenon 3-C-β-glükopiranozid) jelenlétét már korábban kimutatták *C. genistoides*ből¹³⁵ és a *C. subternataból*,⁴³⁸ a luteolin (**108**) és a heszperetin (**124**) a növényvilágban elterjedten előforduló flavonoidok. Érdekes, hogy a naringenin (**110**) nagy mennyiségben volt jelen a növényben, annak ellenére, hogy korábbi vizsgálatokban HPLC-vel nem tudták kimutatni jelenlétét.^{143,144}

Az általunk alkalmazott transzgenikus növényi modell az ER-agonista és -antagonista hatás kimutatására egyaránt alkalmas, és az ösztrogénszerű hatással rendelkező anyagok, így a fitoösztrogének bioaktivitásának kvantitatív meghatározására is lehet használni. A pER8:GUS módszer fő előnye a költséghatékonyság, valamint az, hogy az eredményeket nem hamisítja meg a citotoxikus anyagok jelenléte. Korábban a növény vizsgálatára konvencionális módszereket alkalmaztak, s jellemzően a nyers kivonatokat vizsgálták.^{144,145} Az általunk alkalmazott módszerrel a növény metanolos kivonatának diklór-metános és etil-acetátos frakciói bizonyultak aktívnak, ezekből 6 ösztrogénaktivitású vegyületet (**108**, **110–114**) nyertünk ki. A luteolin (**108**), genisztein (**111**), izolikviritigenin (**112**) és naringenin (**110**) széles körben ismert fitoösztrogének.¹⁴³ Az izolikviritigenin (**112**) is ígéretesnek bizonyult csontleépüléssel járó betegségek esetén.⁴³⁹ Mindezen túl, ezek a vegyületek egyéb módon is előnyösek lehetnek posztmenopauzában. A genisztein (**111**) és luteolin (**108**) elnyomta a környezeti ösztrogének proliferációstimulációt indukáló hatását *in vitro*, ami arra utalhat, hogy antiösztrogén és daganatellenes hatással rendelkezhetnek.⁴⁴⁰ A genisztein (**111**) kedvezően hatott posztmenopauzában a szív-érrendszeri

rizikófaktorokra és a glikémiás kontrollra.⁴⁴¹ A későbbi preparatív fitokémiai munka során további jól ismert fitoösztrogéneket izoláltunk a fermentált növényi anyag metanolos kivonatából: diozmetint (**109**), afrormozint (**119**), likviritigenint (**121**) és formononetint (**120**). A heszperetint (**124**), az egyik leghatásosabb természetes aromatazgatólót¹⁶⁹ is kinyertük a növényből.

A fitoösztrogének jelenléte tudományos alátámasztást ad a mézbokortea hagyományos használatára klimaxos tünetek esetén. A fermentálás csökkenti a *Cyclopia* spp. fenolosanyagtartalmát, hagyományosan azonban a fermentált teát fogyasztják. A nem fermentált *Cyclopia* a hat aktív vegyület közül a legkisebb ösztrogénszerű hatással rendelkező helikrizin B-t (**113**) tartalmazta nagyobb mennyiségben. A forró csapvízzel készített kivonat sokkal kisebb koncentrációban tartalmazta az aktív vegyületeket, mint a szerves oldószeres extraktum. Mindez arra utal, hogy a vegyület esetleges terápiás alkalmazására nem a vizes kivonat a legalkalmasabb.

A növényből kinyert luteolin (**108**) és diozmetin (**109**) figyelemreméltó XO-gátló hatást fejtett ki (IC_{50} 0,84 μ M, illetve 0,53 μ M). Jóllehet mindkét vegyület jelentősen meghaladta az allopurinol által kifejtett gátlást (IC_{50} = 11,50 μ M, 95% CI 11,40–11,60 μ M), amelyet pozitív kontrollként alkalmaztunk, a flavonoidok közismerten rossz biohasznosulása levon az eredmények értékéből.

6.5. Daganatellenes hatású furokumarinok a *Ducrosia amethifoliaból*

A *D. anethifolia* herbájából kinyert 9 lineáris furokumarin közül négyet [(+)-oxipeucedanin hidrát (aviprin, **126**), oxipeucedanin (**127**), (-)-oxipeucedanin-hidrát (prangol, **129**), izogoszferol (**131**)] elsőként írtunk le ebben a fajban. A furokumarinokon kívül izolált vegyületek vanillil-aldehid (**134**), harmin (**135**), 3-hidroxi- α -ionon (**136**) és 2-C-metil-eritritol (**137**) mindegyikéről elsőként számolunk be a növényben. Utóbbi vegyületeket a növényvilág számos taxonjában leírták.

A furokumarinok jelenléte az Apiaceae család számos nemzetsége esetén (így a *Ducrosiánál* is) kemotaxonómiai bélyeg. A fajok furokumarinprofilja, különösen az iparilag nem jelentős drogok esetén, kevésbé feltárt. A furokumarinösszetétel minél mélyebb ismerete nemcsak kemotaxonómiai szempontból fontos, hanem azért is, mert ezek a vegyületek markáns biológiai hatásokkal bírnak. Fényérzékenyítő hatásuk ismert (ezen alapul bizonyos származékok alkalmazása bőrgyógyászati kezelésekben),⁴⁴² ugyanakkor egyes vegyületek genotoxikus, karcinogén hatást is leírták. A fotoaktivált molekulák a DNS-hez kapcsolódnak, ezzel magyarázható a rákkeltő hatás, de ez a mechanizmus citotoxikus, antiproliferatív hatás alapja is lehet.⁴⁴³ Ezt több, a növényből korábban leírt vegyület esetén bizonyították is. Az imperatorin (**39**) antiproliferatív hatású volt humán hepatoma sejteken,²³⁶ az imperatorin (**39**), az oxipeucedanin (**127**) és az oxipeucedanin-hidrát (**126/129**) kolonkarcinóma sejteken,²³⁸ továbbá az imperatorin (**39**),

herakleninhez (**132**) hasonlóan apoptózist indukált Jurkat leukémia sejteken.²³⁹ A xantotoxin (**37**) nemcsak antiproliferatív hatású neuroblasztóma és kolonkarcinóma sejteken, hanem apoptózist is indukált.²³⁷ Mindezen túl, bizonyos furokumarinok multidrog-rezisztenciát csökkentő hatását is leírták.⁴⁴⁴

Az általunk izolált furokumarinokkal végzett, a potenciális daganatellenes alkalmazásra induló komplex kísérletsorozatban az oxipeucedanin (**127**) fejtette ki a legmarkánsabb *in vitro* antiproliferatív és citotoxikus hatást PAR ($IC_{50} = 25,98 \pm 1,27$; $40,33 \pm 0,63 \mu M$) és MDR sejteken ($IC_{50} = 28,89 \pm 0,73$; $66,68 \pm 0,00 \mu M$), és ez a vegyület mérsékelt multidrogrezisztencia-csökkentő hatást is mutatott az ABCB1 gátlásával. Az oxipeucedanin (**127**) és a heraklenin (**132**) szinergista módon fokozták a doxorubicin daganatsejtellenes hatását.⁴⁴⁵ Mindez azt jelzi, hogy a vegyületcsoport perspektivikus lehet a kemoterápiás kezelések kiegészítőjeként.

6.6. *Rhodiola* drogok minőségbiztosításával kapcsolatos eredmények

Elsőként mutattunk rá szisztematikus vizsgálatok eredményeként arra, hogy a begyűjtés ideje szignifikáns hatással van a *R. rosea* fenilpropenoid-tartalmára, és ez mindkét vizsgált élőhelyen (Dél-Anglia, 65 m tengerszint feletti magasság és Ausztria, 1580 m) érvényes volt. Bár voltak korábbi adatok arra, hogy a rozavintartalom (**25**) májustól szeptemberig csökken,⁴⁴⁶ a mi kísérleteink különböző helyekről származó szaporítóanyagok mintáinak több éves vizsgálati eredményein alapulnak. Mindennek azért van különös gyakorlati jelentősége, mert ipari célra a gyökérdrogokat általában őszelel gyűjtik be, ami ebben az esetben nem eredményez maximális hatóanyagtartalmat. A *R. rosea* esetén a gyöktörzs tavaszi, sarjadás előtti vagy alatti begyűjtése tűnik optimálisnak. A növények korával fordítottan arányos a ROZ_{tot} , ami összhangban van korábbi eredményekkel.^{447–449} Az 5 évnél hosszabb termesztési periódus az állományok általánosan tapasztalt leromlása (biomasszatermelés csökkenése, száradás során fokozott rothadási hajlam) miatt kedvezőtlen, ezért ilyen korú növényeket nem is vizsgáltunk a dél-angliai mintákban. Ugyanakkor a gyöktörzsek minőségromlása nagyobb tengerszint feletti magasságon való termesztés esetén későbbi életkorban következik be. Az alpesi minták esetén azért vizsgáltunk idősebb növényeket (6–7 év szemben az angliai 3–5 évvel), mert a magasabb tengerszint feletti magasságon a biomaszprodukció ugyanazon életkorban alacsonyabb volt (a mintagyűjtés kritériumaként a kb. 50 g-os növényenkénti száraz drogtömeg elérését szabtuk meg).

A *Rhodiola rosea* gyöktörzs gyökérhez viszonyított magasabb fenilpropenoid-tartalmát első alkalommal igazolta szisztematikus vizsgálat. A két drog közötti különbség a szaporítóanyag származási helyétől függetlenül érvényes volt az alpesi mintákban. Ennek fényében célszerűbb lenne, ha a termékgyártásban a két növényi részt elkülönítve, vagy ismert arányban dolgoznák fel.

Fahéjalkoholtartalom szempontjából korábban nem végeztek szisztematikus vizsgálatot. Megállapítottuk, hogy a fahéjalkohol-tartalom a rozavintartalommal párhuzamosan változik a begyűjtési időt és a növények korát tekintve. Az észak-európai minták fahéjalkohol-tartalma magasabb volt, mint a közép- és dél-európaiaké, ami genetikai determináltságra utalhat. Ezt a vegyületet jellemzően nem alkalmazzák a növényi minták minősítésére, ugyanakkor mivel biogenetikai szempontból is jelentősége van, továbbá mivel a növény hatásában betöltött szerepe ismeretlen, indokolt lenne változtatni ezen a gyakorlaton. Mivel a fahéjalkohol a tárolás, feldolgozás során bomlástermékként is keletkezhet, stabilitási, tárolási vizsgálatokban is jelentősége lehet a vegyületnek. Megfontolandó az összrozavin-tartalomba ezt az aglikont is bevonni, mivel a bélrendszerben a glikozidok hidrolízise eredményeként a rozavintartalom egy részének is ez az aktív, felszívódó formája.

Az egyes tartalomanyagok abszolút értéke begyűjtési időtől és a növény korától, valamint egyéb tényezőktől is függ, azonban az összes minta vizsgálatával megállapítottuk, hogy a *R. rosea* gyöktörzsére jellemző a $> 2:1$ FP_{tot} – $SZAL_{tot}$ arány. Ennek meghatározásával azonosíthatóak azok a minták, amelyek a nemzetség más fajaitól származnak, de azok a termékek is, amelyek különböző *Rhodiola* fajok mintáinak keverékét tartalmazzák.^{450,451} A gyöktörzs kb. 1,5–3-szor magasabb ROZ_{tot} -tal jellemezhető, FA esetén ez az arány $\sim 2:1$. A föld feletti részben a vizsgált anyagok szintje nagyon alacsony, vagy a kimutatási határ alatti.

Elsőként végeztünk szisztematikus vizsgálatot *Rhodiola* minták flavonoidtartalmára vonatkozóan. A fenilpropenoidok és feniletanoidok analitikai vizsgálata során azonosított két flavonoid, a rodiozin (**30**) és herbacetin mennyiségi arányait különböző helyről származó mintákban elemeztük, illetve vizsgáltuk a kivonás és szárítás hatását is az extraktumok flavonoidtartalmára. A magas etanoltartalmú kivonószerek alkalmasak a flavonoidok extrahálására, a szárítási hőmérséklet (a vizsgált tartományban) nem volt befolyással a kinyerhető mennyiségre, ami a vegyületek jó kémiai stabilitására utal. Megállapítottuk, hogy a gyökerek flavonoidtartalma magasabb a gyöktörzsekénél, és azt is, hogy bár az abszolút mennyiségek széles tartományban mozoghatnak, a két vizsgált flavonoid egymáshoz viszonyított aránya meglehetősen állandó.

A *R. rosea* összflavonoid-tartalmával kapcsolatos első közlések Finnországból származtak, és a mi megállapításainkkal összhangban magasabb flavonoidtartalomra utaltak a gyökerekben, a flavonoidok azonosítása nélkül.⁴⁵² A flavonoidok izolálásáról beszámoló cikkekben leggyakrabban leírt flavonoid a rodiozin (**30**), a herbacetin, a kempferol és a rodionin. *R. rosea* gyökeréből Kwon és mtsai rodiozint (19 mg/g), rodionint (17 mg/g),⁴⁵³ Ma és mtsai rodiozint (1,7–2,5 mg/g), rodionint (0,14–0,3 mg/g), herbacetint (0,51–1,5 mg/g) és kempferolt (0,78–1,5 mg/g),⁴⁵⁴ egy másik tanulmányban pedig rodiozint (22,9 mg/g), herbacetint (5,5 mg/g) és kempferolt (6,9 mg/g)

nyertek ki.⁴⁵⁵ A *R. sachalinensis* gyökeréből is kimutatták a rodiozint (7,13 mg/g) egyéb flavonoidok mellett.⁴⁵⁶ Az általunk alkalmazott analitikai módszerrel egyéb flavonoidok nem voltak kimutathatóak, azok feltehetően a HPLC módszer mosási fázisában eluálódtak. Bár az általunk vizsgált flavonoidok nem unikálisak a *R. rosea* fajra vagy növényi részre, kémiai stabilitásuk és egymáshoz viszonyított arányuk állandósága révén megfelelő kiegészítő minőségi markerei lehetnek a *R. rosea* drogok vizsgálatának.

6.7. Teaminták teanin- és koffeintartalmának szisztematikus vizsgálata

A különböző fermentáltsági fokú teaminták L-teanintartalmának **(33)** korábban ismert legátfogóbb elemzése 17 mintára terjedt ki.⁴⁵⁷ Ebben a vizsgálatban a fekete, zöld és oolong teák teanintartalma 1,40%, 1,42% és 1,16% volt, a legnagyobb szórás (0,60–1,72%) az oolong mintáknál volt tapasztalható. Egy másik átfogó vizsgálat a különböző teaminták L-teanintartalmának nagy változékonyságát igazolta (3,97–14,47 mg/g az oolong, 0,89–17,27 mg/g a fekete, 3,07–21,18 mg/g a zöld és 2,23–14,21 mg/g a fehér teákban), míg a pu-erh teákban a vegyület mennyisége nagyon alacsony volt (0,07–0,26 mg/g).⁴⁵⁸ A mi eredményeink (0,90–12,37 mg/g az oolong, 2,09–10,85 mg/g a fekete, 2,65–10,93 mg/g a zöld és 3,24–9,11 mg/g a fehér tea mintákban) jó összhangban voltak ezzel a közléssel,⁴⁵⁸ azonban jelentősen alacsonyabbak *Ekborg* és *mtsainak* eredményeinél.⁴⁵⁷ Ennek az oka az eltérő kivonat- és mintaelőkészítés lehet, amiről utóbbi csoport nem közöl részleteket. Bár eredményeink szerint a különböző teafajták L-teanintartalma nagyon változékonny, a feldolgozás hatása jól kimutatható. Az átlagos teanintartalom a fermentálatlan zöld és fehér teákban a legmagasabb, ezt követi az oolong és fekete tea, valamint az L-teaninmentes pu-erh. A minták koffeintartalma **(31)** kevésbé volt változékonny, mint L-teanintartalmuk (RSD% 33,04 vs. 49,50), ami a két vegyület stabilitásának különbségére is utalhat a feldolgozási folyamat során. Ugyanakkor megjegyzendő, hogy a kiindulási nyersanyagok összetétele is eltérő lehetett, valamint hogy a két analit kioldódását befolyásolhatja a teaminták cserzőanyag-tartalma, amit szintén befolyásol (mérsékel) a fermentálás. Eredményeink azt támasztják alá, hogy pusztán az L-teanin és a koffein koncentrációja, ezek aránya alapján az egyes teatípusok (a pu-erh kivételével) nem különböztethetőek meg, azonban a fermentálás kétségtelenül hatással van (csökkenti) a teanintartalomra. A két vegyület arányának ismerete ugyanakkor fontos információt nyújt a tea központi idegrendszeri hatásának jellegéről. Erre alkalmazható az általunk kidolgozott, az L-teaninszint gyors, műszer használatát nem igénylő mérését, illetve az L-teanin HPLC-s mérését lehetővé tévő validált módszer, valamint az aminosav és a koffein szimultán mérését biztosító eljárás.

6.8. Szójakivonatok izoflavontartalmának vizsgálatára alkalmas módszer kidolgozása

A szójakivonatok izoflavontartalmát tanulmányozó vizsgálatok zöme az aglikonok mérésén alapul. A közölt módszerek egy része kifejezetten a kivonás,^{187,459,460} illetve a hidrolízis körülményeinek optimalizására irányul, többek között a folyamatokat befolyásoló tényezők minél pontosabb azonosítása révén (pl. oldószer, savkoncentráció, hidrolízis idő, hőmérséklet).^{461–464} A kivonható izoflavon-aglikonok hidrolíziskörülményeinek matematikai módszer segítségével történő optimalizálásával azonban nagyon kevés kutatás foglalkozott.¹⁸⁶ Tekintettel arra, hogy az izoflavonok biológiailag hasznosuló formái a bélrendszerben a β -glükozidáz enzimek segítségével képződő aglikonok,⁴⁶⁵ az izoflavonszármazékok hidrolízise és az aglikonok mérése pragmatikus megközelítés, amely az eredmények összehasonlíthatóságát is segíti.

Az enzimatisz hidrolízishez⁴⁶⁵ viszonyítva a savas hidrolízis költségkímélőbb, egyszerűbb módszer. Egy vizsgálatban, amelyben a hőmérséklet hidrolízisre kifejtett hatását nem tanulmányozták, megállapították, hogy a genisztein (**111**) hidrolízise 3 M HCl jelenlétében teljesen végbemegy 40 perc alatt (feltehetőleg szobahőmérsékleten).⁴⁶⁶ Chiang és mtsai eredményei szerint, akik válaszfelület modellezéssel optimalizálták a hidrolízis körülményeit, az összisizoflavon-meghatározáshoz az aglikonná alakítás optimális körülményei: 3,42 N HCl, 205,5 min és 44,6 °C.¹⁸⁶ Ehhez viszonyítva az általunk közölt, validált módszer gyors (hidrolízisidő 96 perc) meghatározási lehetőséget biztosít. Módszerünkkel a szója bioaktív hatása szempontjából releváns izoflavon-aglikonjai mérhetőek.

6.9. Az édeskömény furokumarintartalmának biztonságossága

Az édeskömény termés furokumarintartalmára vonatkozóan elsőként végeztünk szisztematikus vizsgálatokat az általunk kidolgozott LC-MS módszerrel, amelynek eredményeként megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált 33 minta egyikében sem haladja meg a maximális napi dózis furokumarintartalma az 1,23 μg -t. Európában az átlagos étrendi furokumarinbevitel ennél 3 nagyságrenddel magasabb (1,45 mg), és ez nem jár kimutatható kockázattal.²¹⁸ A potenciális karcinogén és genotoxikus vegyületekre, amennyiben gyógyszerek szennyezőiként vannak jelen, 1 hónapot meg nem haladó kezelés esetén napi maximum 120 μg , tartós kezelés esetén pedig napi 1,5 μg felső limitet javasolnak.⁴⁶⁷ Az Európai Gyógyszerügynökség szerint a 15 μg -ot meg nem haladó furokumarint tartalmazó gyógynövénykészítmény nem jelent kockázatot a fogyasztó számára, de még a 1,5 mg-s dózis sem okoz jelentős kockáztnövekedést.²¹⁸ A vizsgált minták furokumarintartalma egy esetben sem érte el a meghatározott legalacsonyabb biztonságossági

limitet, így kutatásaink arra utalnak, hogy az édeskömény terápiás alkalmazása a furokumarintartalmat tekintve biztonságos.

6.10. Máriatövistermékek réztartalma

A Wilson-kór célzott gyógyszeres kezelése mellett, a rézfelhalmozódással összefüggő májkárosodás nem-specifikus prevenciójára gyakran alkalmaznak máriatövis-készítményeket. Eredményeink rámutattak arra, hogy alapvető jelentőségű, hogy a növény termését milyen feldolgozottsági szintű és milyen jogi kategóriába sorolható készítmény formájában alkalmazzák. A termékek réztartalma tág határokon belül (0,01–114,8 µg a napi adagban) mozog. Mivel egyértelműnek tűnik, hogy a termékgyártás során alkalmazott extrakció és a tisztítási lépések hatással vannak a réztartalomra, Wilson-kórosoknak előnyben részesítendő a magas feldolgozottsági fokú, szilimarinra dúsított és standardizált készítmények (ezek napi dózisa 0,01–3,51 µg rezet tartalmazott). Ezen belül is előnyt élveznek a gyógyszerek, amelyek esetén a gyártási folyamat standardizáltsága is garancia arra, hogy a réztartalomban sem lehetnek nagy ingadozások. Terápiás aspektusból lényeges a Wilson-kór szempontjából nemkívánatos réz és a hatóanyag (szilimarin) aránya: ez a szilimarinra standardizált termékeknél gyakorlatilag nulla, míg őrölt termést tartalmazó terméknel a 2,58 µg réz/ 1 mg szilimarin értéket is elérhet. Megfontolandó lehet a máriatövist tartalmazó termékeknél feltüntetni a réztartalmat a gyógyszerek és étrend-kiegészítők (beteg)tájékoztatóiban, mivel a Wilson-kórosoknál ezek a termékek élethosszig használva nemcsak védelmet, hanem reális kockázatot is jelenthetnek. Az átlagos európai étrend réztartalma férfiak esetén 1,0–2,3 mg/nap, nőknél 0,9–1,8 mg/nap.⁴⁶⁸ Wilson-kórosoknál nem ismertek a beviteli értékek, de a rézszegény diéta miatt feltehetőleg jelentősen alacsonyabbak, amelyekhez képest az akár 100 µg-os nagyságrendű mennyiségű rezet tartalmazó, preventív céllal fogyasztott máriatövis-készítmények védelem helyett reális kockázatfokozódást jelenthetnek.

6.11. Étrend-kiegészítők szennyezésvizsgálatának tapasztalatai

Az étrend-kiegészítőkkel kapcsolatos jogi szabályozás jellegzeteségei (elsősorban a piacra kerülést megelőző engedélyezés hiánya) miatt a nemzetközi szakirodalom tanúsága szerint viszonylag gyakran fordulnak elő a termékcsoporthal kapcsolatban szabálytalanságok, hamisítások. Az elméleti megfontolások alapján elkezdett vizsgálatsorozatunk első lépésében 10, potenciafokozó hatás érdekében fogyasztott étrend-kiegészítőt vizsgáltunk meg, amelyek közül hatnál szintetikus gyógyszeranyaggal való hamisítást igazoltunk. Ilyen jellegű vizsgálatot kutatóként elsőként végeztünk Magyarországon. Vizsgálati eredményeink felhívták a figyelmet arra, hogy a hatályos

jogi szabályozás nem garantálja, hogy a fogyasztókhöz csak megbízható minőségű termékek jussanak el. Az étrend-kiegészítők szintetikus gyógyszervegyületekkel történő hamisítása a nem várt mellékhatások és interakciók miatt egyaránt veszélyes lehet. Külön veszélyforrást jelentenek a szintetikus vegyületek előállítása során képződő, el nem távolított szennyezések és a korábban toxikológiai és humán kipróbáláson át nem esett analógok [pl. nor-acetildenafil (178), piperildenafil (179)], valamint az a tény, hogy a hatóanyagok akár nagyobb mennyiségben is előfordulhatnak, mint az ellenőrzött körülmények között alkalmazott gyógyszerekben. A foszfodiészteráz-gátlókkal történő hamisítás azért jelent különös veszélyt, mert ezek a hatóanyagok fokozhatják a kardiovaszkuláris események rizikóját, szív-érrendszeri panaszok (vérnyomásingadozás, szélütés, szabálytalan szívverés, szívroham vagy az agyi vérellátás csökkenése) kialakulásához vezethetnek. A hatóanyagcsoport mindegyike vényköteles, ugyanis a kardiológiai kivizsgálás nélküli alkalmazás veszélyekkel járhat. Azok, akik étrend-kiegészítő részeként fogyasztják ezeket a vegyületeket, ezzel a kockázattal nem számolnak. Ha pedig a potenciazavar hátterében szív-érrendszeri kórkép áll, akkor a merevedési zavar tüneti kezelése elfedheti a valódi okot és késleltetheti a szakemberhez való fordulást.

A szibutramin étrend-kiegészítő készítményekből való kimutatására a szakirodalomban számos szofisztikált (HPLC-DAD, HPLC-MS, IR spektroszkópiás, kapillár-elektroforézisen alapuló) módszer ismert,^{469–472} azonban a gyors szűrővizsgálatra és az alacsonyan műszerezett környezetben való detektálásra nincsenek elfogadott módszerek. Olyan, többlépéses analitikai módszert dolgoztunk ki, amellyel az elérhető műszerezettségnek megfelelő módon megbízhatóan kimutatható a termékek szibutraminszennyezése. Az általunk alkalmazott, színreakciókat, rétegekromatográfiás, HPLC-DAD és -MS, valamint NMR vizsgálatot magában foglaló módszer a rendelkezésre álló műszerezettséghez idomulva alkalmas a szennyezés/hamisítás kimutatására. Az egyes vizsgálati lépések eredményei egymást erősíthetik, mivel a detektálás eltérő elveken történik. A fogyasztószerek szibutramintartalomra való vizsgálata azért lenne elengedhetetlen, mert ez a vegyület jelentős kardiovaszkuláris rizikót jelent (ez vezetett a hatóanyag gyógyszerként való alkalmazásának megszüntetéséhez).

Hat grapefruitmag-kivonatot tartalmazó készítményt vizsgáltunk vékonyréteg-kromatográfiás és HPLC módszerek segítségével. Mindössze két készítmény esetében voltak kimutathatók limonoidok, ami igazolta, hogy ezek kiindulási nyersanyagául a növény magja szolgálhatott (ugyanakkor megjegyzendő, hogy egyéb citrusfélék magja is tartalmaz fő komponensként limonint (180) és nomilint (181), így a termékek más fajból is készülhetnek). A többi készítményről ugyanez nem állapítható meg: három termékben kumarinokat detektáltunk, amelyek a citrusfélék héjára jellemző anyagok, egy készítményben pedig nagy mennyiségű benzetónium-kloridot azonosítottunk.

A grapefruitmag-kivonatokat hazánkban elsősorban megfázásos betegségek esteén, valamint „immunerősítőként” alkalmazzák. A hatásossággal kapcsolatban ugyanakkor nincsenek kísérletes bizonyítékok. Egy vizsgálat szerzői azt állapították meg, hogy a grapefruitmagkivonat *in vitro* antibakteriális hatása a kivonatban jelen lévő, a növény bioflavonoidjaiból képződő kvaterner ammóniumvegyülettel (benzalkónium-klorid) van összefüggésben.⁴⁷³ Ez a magyarázat kétségtelenül minden alapot nélkülöz, ilyen átalakulás kémiaiailag reálisan nem képzelhető el. Egy másik vizsgálatban hatból öt grapefruitkivonat mutatott antibakteriális hatást, ezek mindegyikéből benzetónium-klorid jelenlétét mutatták ki.⁴⁷⁴ A grapefruitmag-készítmények haszon-kockázat hányadosa a jótékony hatás bizonyíthatatlansága miatt eleve kedvezőtlen, a legnagyobb kockázat azonban a szintetikus szennyezőként jelen lévő benzetónium-kloriddal kapcsolatos. Ezt a vegyületet felületi fertőtlenítésre, injekciók és egyéb (fül-orr-gégészeti, szemészeti) gyógyszerkészítmények tartósítására is használják, 0,01–0,1% koncentrációban, orális alkalmazása nem jellemző.⁴⁷⁵ Az általunk szennyezettnek talált termékben mennyisége mintegy 10%, ami, figyelembe véve a benzetónium toxikológiai jellemzőit, ez a fogyasztó megtévesztésén túl egészségi kockázatokat is hordoz. Állatkísérletekben növekedési rendellenességet, vakbél-duzzanatot, májkárosodás jeleit észlelték és fokozott mortalitást nagy dózisu adagolása során.⁴⁷⁶ Bár ezek a hatások extrém nagy dózisonál várhatóak embereknél, a benzetóniumot tartalmazó termékek veszélyeit eseteleírások támasztják alá. Egy svédországi eseteleírás szerint jól beállított warfarin terápia alatt álló házaspár három napon át szedett grépfrútmagkivonatot tartalmazó cseppet, ami INR-emelkedéssel, hematóma kialakulásával párosult. Az alkalmazott termék benzetónium-kloridot tartalmazott, s bár az interakció mechanizmusa nem teljesen feltárt, abban szerepet játszhat a vegyület CYP2C9 enzimgátló hatása (a warfarin a citokróom P450 2C9 enzim által metabolizálódik).⁴⁷⁷

6.12. Homeopátiás készítmények hatóanyag-tartalmának vizsgálata

Az általunk vizsgált két barátcserejetermék indikációja nagyon hasonló (a homeopátiás terméknel premenstruális tünetek és szabálytalan menstruációs ciklus, az allopatíás gyógyszernel menstruációs zavarok, mastodynia és premenstruális szindróma).^{478,479} Az allopatíás termék premenstruális szindrómában való hatásosságát több placebokontrollos, kettős vak, randomizált vizsgálat igazolja,^{360,361,480} de a hasonló kimenetelű vizsgálatot a homeopátiás gyógyszerrel is végeztek.^{481,482} A premenstruális tünetek, különösen a mastodynia, gyakran látens hiperprolaktinémiával társulnak. A *Vitex agnus-castus* D₂-receptor agonista tulajdonságát bizonyították, továbbá azt is, hogy agonistaként viselkedik μ -opioid receptorokon.⁴⁸³ A növény számos flavonoidja dóziszfüggő módon kötődik mind a μ -, mind a δ -opioid receptorokhoz, de csak

a kaszticinnek (**184**) [amelyet az agnuziddal (**183**) együtt gyakran alkalmaznak markerként] van szelektív agonista aktivitása a δ -receptorokon.⁴⁸⁴

A homeopátiás és az allopatíás termék egyaránt *Vitex agnus-castus* terméséből készült kivonatot tartalmazott. A Mastodynon napi dózisa 324,0 mg *Vitex agnus-castus* őstinktúrájából nyert száraz kivonatot tartalmaz (valamint még 5 növény kivonatát 100–1 000 000-szoros hígításban), míg az Agnucaston napi dózisa 3,2–4,8 mg kivonatot (drog–extraktum arány 8,3–12,51:1; kivonószer 70% (v/v) etanol). Mindkét termék fő alkotórésze a barátcserje, de míg az allopatíás termék esetén megállapítható, hogy a napi adag ~27–60 mg drognak felel meg, a homeopátiás esetén ez a megfelelő adatok (drog–extraktum arány) hiányában nem kalkulálható, így pusztán a termékleírásokban található adatok alapján a készítmények barátcserjekivonat-tartalma nem vethető össze.

Vizsgálatainkban az említett két markervegyületet [az agnuzid (**183**) és kaszticin (**184**)] mennyiségét határoztuk meg egy allopatíás és egy homeopátiás gyógyszerben, s elsőként mutattunk rá, hogy a két, fő hatóanyagként barátcserjekivonatot tartalmazó készítmény markeranyagai azonos nagyságrendben mutathatóak ki a termékekben. Ezek az eredmények is rámutatnak arra, hogy a homeopátia nem egy egységes gyógyászati rendszer, és az alacsony potenciájú összetevőket vagy az őstinktúrát tartalmazó szerekben található dózisok közel azonosak vagy egyenlőek lehetnek az allopatíás dózisokkal. Mindennek a biztonságosság szempontjából is vannak következményei, ugyanis a farmakológiai hatást kiváltó termékek esetén a mellékhatások kialakulásának esélye is reális.

6.13. Pirrolizidin-alkaloidok felszívódása külsőleges alkalmazásnál

Mivel a pirrolizidin-alkaloidok növényekben is viszonylag alacsony mennyiségben fordulnak elő, s ennek a mennyiségnek a korábbi állatkísérletes adatok alapján feltételezhetően csak töredéke szívódik fel epidermiszen történő alkalmazás esetén,²⁵² olyan analitikai módszerre volt szükség a farmakokinetikai vizsgálatokhoz, amely kis mennyiségben jelen lévő alkaloid kimutatására is alkalmas. Ilyen célokra legáltalánosabban gáz- vagy folyadékkromatográfiával csatolt tömegspektrometriás módszereket alkalmaznak. A pirrolizidin-alkaloidok mennyiségi meghatározásával kapcsolatos cikkek nagy része a mézek analízisével foglalkozik. Az ilyen célra kifejlesztett GC-MS és LC-MS módszerek kritikus összefoglalása szerint mindkét mérési mód megbízhatóan használható,⁴⁸⁵ jelen munka esetén a folyadékkromatográfiás elválasztás alkalmazása a minta jellegéből adódóan célszerűbbnek tűnt. Az LC-MS vizsgálatokra jellemző meghatározási határ a $\mu\text{g/kg}$ -s tartományban van,⁴⁸⁶ ELISA alapú vizsgálattal hasonló érzékenység érhető el.⁴⁸⁷ GC-MS módszerrel az érzékenység ettől elmarad (LOD 100 $\mu\text{g/kg}$).⁴⁸⁸

A humán epidermiszen, Franz-cella alkalmazásával nyert eredmények rámutatnak arra, hogy az orális és a külsőleges alkalmazás biohasznosulása között egyenlőséget tenni feltehetőleg túlzott óvatosság. A humán epidermiszen kísérleti körülmények között 24 óra alatt megfigyelt 0,22%-os penetrációs arány meglehetősen alacsony, ráadásul az intakt bőrön való felszívódás ennél alacsonyabb lehet (tekintettel arra, hogy az epidermisz csak a bőr egyik rétege, ráadásul reálsan humán alkalmazás esetén 24 óránál rövidebb idő alatt lemossák, eltávolítják a bőrrel a kezelésre alkalmazott krémet).⁴⁸⁹ Az általunk nyert, a humán alkalmazás esetén reális arányt meghaladó felszívódás esetén, a növényre jellemző maximális, 0,4%-os pirrolizidinalkaloid-tartalom²⁵⁰ és annak 100%-os hatékonyságú extrakciójával nyert, az Európai Gyógyszerügynökség monográfiájának megfelelő termék alkalmazása mellett a maximálisan felszívódó alkaloidmennyiség 17,6 µg. Az általunk mért felszívódási arány összhangban van azzal, amelyet korábban egy *in vivo* kísérletben patkányokon, az alkaloidmetabolitok meghatározásával mértek (0,1–0,4%),²⁵² ugyanakkor az eredmények limitációja, hogy csak egyetlen (ugyan fő) alkaloid mérésén alapulnak. A kalkulálhatóan felszívódó mennyiség meghaladja azt a limitet, amelyet az Európai Gyógyszerügynökség állásfoglalása meghatározott külsőleges alkalmazású gyógyszerkészítmények napi dózisában a telítetlen pirrolizidin-alkaloidokra.²⁵³ Megjegyzendő ugyanakkor, hogy a növényben található alkaloidoknak csupán egy része telítetlen (ezek arányáról nincsenek szisztematikus mérések), így a maximálisan felszívódó vegyületeknek csak egy része toxikus, továbbá az is alappal feltételezhető, hogy a kivonatkészítés során nem nyerhető ki az alkaloidok teljes mennyisége. Jóllehet az említett állásfoglalás is megemlíti, hogy a korábbi állatkísérletes adatok arra utalnak, hogy dermális alkalmazás esetén a felszívódás aránya legalább 20–50-szer rosszabb, mint orális bevitelnél,²⁵² humán adatok híján, a legrosszabb forgatókönyv elve alapján a jelenleg is érvényes limitet határozták meg. Az általunk nyert, humán relevanciájú adatok hozzájárulhatnak ahhoz, hogy az állásfoglalás megújításánál reálisabb limitet határozzanak meg, és további, *in vivo* vizsgálatok elvégzését is ösztönözhetik.

6.14. A *Hoodia gordonii* adrenerg hatása

Analitikai vizsgálattal igazoltuk, hogy a *Hoodia gordonii*t tartalmazó termékkel kapcsolatban megfigyelt kardiovaszkuláris nemkívánatos hatás valóban a növény extraktumához köthető. Az elvégzett *in vitro* vizsgálat a *H. gordonii* adrenerg aktivitását igazolta. A termék méhre kifejtett hatásának propranolol-érzékenysége alapján a szimpatomimetikus hatás jelentős részben β-receptor által mediált hatásnak tekinthető. Az általunk kimutatott, javarészt β-receptor által mediált szimpatomimetikus hatás és az ebből eredő mellékhatások mechanizmusa hasonló több, ma már a forgalomból kivont fogyasztószeréhez. A β-adrenerg receptoragonisták étvágycsökkentő

hatással is rendelkezhetnek,⁴⁹⁰ de a β -adrenoceptorok stimulálása különböző szív- és érrendszeri panaszokat is okozhat. Eredményeink információt adnak a *Hoodia* lehetséges hatásmódjáról és a megfigyelt mellékhatások hátteréről. Eredményeink a növény alkalmazásának (dózisfüggő) kockázatára utalnak, de ennek humán relevanciájának vizsgálatához, csakúgy mint a hatásosság igazolásához, jól tervezett klinikai vizsgálatok szükségesek.

A terhesség alatti receptorfunkció-változás magyarázatul szolgálhat a szimpatomimetikus vegyületek gesztációfüggő méhizomzat-relaxáló hatására (gyengébb méhrelaxáló hatás késői vemhes állatok esetén). A nem vemhes patkány méhe korlátozottan húzódik össze α -adrenerg hatásra, de jelentősen elernyed β -adrenerg stimuláció esetén. A késői vemhes miometrium érzékeny mind α - és β -adrenerg ingerlésre, ezért a méhizomzat válaszreakcióját a vizsgált anyag receptorpreferenciája határozza meg.⁴⁹⁰ Valószínűsíthető, hogy a termék által kiváltott korlátozott relaxáció késői vemhes miometrium esetén egyidejű α - és β -adrenerg stimuláció következménye, amely a β -receptorokon keresztül kiváltott hatás blokkolásával a fokozott kontraktilitás irányába tolható.

Eredményeink magyarázatot nyújthatnak a klinikai vizsgálatban közölt szív- és érrendszeri mellékhatásokra (vérnyomás és pulzusszám-emelkedés)²⁶⁵ és a munkánk kiindulási alapját jelentő esetleírásra, egyúttal felhívják a figyelmet a növény kontroll nélküli alkalmazásának veszélyeire is.

6.15. A római kamilla hatása a simaizmokra

Vizsgálataink során elsőként szolgáltatunk kvantitatív adatokat a római kamilla tradicionális gyógyszerek előállítására alkalmazható kivonatának flavonoidösszetételéről. Az általunk vizsgált, 70%-os alkohollal készített kivonat fő flavonoidja az eupafolin (**209**), a további mérhető vegyületek a luteolin (**108**), hiszpidulin (**9**) és apigenin (**11**) voltak.

A munka célja a fent említett nyers kivonat, valamint azok frakcióinak vizsgálata volt. A frakciók simaizmokra kifejtett hatásával párhuzamosan flavonoidtartalmukat is mértük, annak érdekében, hogy felmérjük a vegyületek spazmolitikus aktivitásban betöltött szerepét. A nyers kivonat frakcionálására a flavonoidok egyéb szekunder metabolitoktól való elválasztására elterjedten alkalmazott poliamidot alkalmaztuk állófázisként. A magas víztartalmú eluensekkel nyert frakciók flavonoidmentesek (P20) vagy alacsony flavonoidtartalmúak (P40) voltak. Az eluens metanoltartalmának növelésével a flavonoidtartalom nőtt, azonban a tiszta metanollal nyert P100-ban két flavonoid, az eupafolin (**209**) és a hiszpidulin (**9**) mennyisége elmaradt a P80-étól, sőt, az összflavonoidtartalom is utóbbi frakcióban volt magasabb.

A farmakológiai vizsgálatok zömét tengerimalac ileumon végeztük, ezen a preparátumon a kivonat, annak frakciói, a flavonoidok és az illóolaj hatását egyaránt vizsgáltuk. A nyers kivonat

ezen a preparátumon korábban még le nem írt átmeneti kontraháló hatást fejtett ki, amely feltehetőleg a kolinerg neuronok aktiválása révén alakul ki (mivel atropinnal és tetrodotoxinnal gátolható volt). A kontraktilis hatást mérsékelten, de szignifikáns mértékben gátolta a ciklooxygenáz enzimet gátló indometacin, ami az endogén prosztanoidok moduláló hatásának szerepére utal. Egyéb, együttesen adott vegyületek a hatást nem befolyásolták, így a szerotonerg és purinerg hatások szerepe nem valószínű a kontraháló aktivitásban.

Az átmeneti, mérsékelt stimuláló aktivitást követően a nyers kivonat tartós relaxáló hatást mutatott tengerimalac ileumon. Ez a hatás atropin és tetrodotoxin jelenlétében és hiányában egyaránt kialakult, azonban a részletes vizsgálatokban a két vegyülettel előkezeltük a preparátumot a neuronálisan mediált hatások kizárása érdekében. A relaxáns hatást a β -adrenerg receptorokon antagonistá hatású propranolol, valamint a NO-szintázt gátló N^G -nitro-L-arginin sem gátolta, mindez arra utal, hogy a spazmolitikus hatás közvetlenül a simaizmon alakul ki. A közvetlen relaxáns hatást más preparátumokon (humán longitudinális és cirkuláris jejunum, patkány ileum és disztális colon, tengerimalac húgyhólyag) is kimutattuk. A magas intrinzik tónusú preparátumokon (patkány ileum és colon) nem volt szükség prekontrakció előidézésére, és ezeken a modelleken a vizsgált anyagok átmeneti kontraháló hatása sem volt megfigyelhető.

A kivonat kémiai összetétele és a hatás összefüggéseinek vizsgálatára tengerimalac ileumon kerül sor. A frakciók flavonoidtartalma és a relaxáns hatás között egyértelmű összefüggést figyeltünk meg (a flavonoidokat nem, vagy csak kis koncentrációban tartalmazó frakciók gyenge, a flavonoidokban dús frakciók markáns hatást mutattak), míg az átmeneti kontraháló hatás esetén ilyen asszociáció nem volt kimutatható. A tiszta flavonoidok mindegyike kettős (átmeneti kontrakciót követő tartós relaxáció) hatással jellemezhető, hatáserősségük hasonló. Ez arra utal, hogy a flavonoidoknak kulcsszerepe van a hatásban, ugyanakkor mivel a flavonoidmentes kivonatnak is volt mérsékelt relaxáló hatása, egyéb vegyületek is szerepet játszanak a bioaktivitásban. Ezt alátámasztja az illóolaj esetén kimutatott relaxáló hatás, amit nem előzött meg kontrakció.

Eredményeink kísérletes bizonyítékokat szolgáltatnak a római kamilla tapasztalati alapon feltételezett simaizomgörcs-oldó hatásához. A különböző simaizom-preparátumokon (köztük humán jejunumon) megfigyelt közvetlen relaxáló hatás magyarázatot adhat az emésztési panaszok esetén tapasztalt hatásosságra. Igazoltuk, hogy a hagyományos növényi gyógyszerek alapanyagául használható 70%-os etanolos kivonat ellazítja a simaizmokat és ez a hatás összefügg flavonoidtartalmával. Rámutattunk a kivonatok és a flavonoidok kettős (átmeneti kontrakciót követő tartós relaxáció) hatására a simaizmokon, s igazoltuk, hogy az összhatásban az illóolaj relaxáló hatása is szerepet játszik.

6.16. *Centaurea* fajok kivonatainak gyulladáscsökkentő és sebgyógyulást elősegítő hatása

A sebgyógyulás komplex folyamat, befolyásolására elvileg több támadásponton is lehetséges. A bőr sérülése esetén a dermális és epidermális szövetek regenerációja gyulladásos fázissal kezdődik, melyet egy proliferatív és remodelling fázis követ.⁴⁹¹ A sebgyógyítás elősegítésére használt gyógynövények egy része (pl. a török népi gyógyászatban alkalmazott *Centaurea iberica*) gyulladásgátló aktivitással is rendelkezik,⁴⁹² azonban nem ismert részleteiben, hogy ezek a növények mely mechanizmusok eredményeként fejtik ki hatásukat.

Vizsgálataink keretében igazoltuk, hogy egy, a népi gyógyászatban sebkezelésre használt növény kivonata hatékonyan elősegítette a sebgyógyulást egy állatkísérletes modellben. A *Centaurea sadleriana* népi gyógyászati felhasználását elsőként dokumentáltuk a szakirodalomban, egyúttal vizsgálataink a felhasználás racionalitásával kapcsolatban is információt adtak. Mindegyik kivonat kedvezően befolyásolta a sebgyógyulást, a legapolárosabb kivonat esetén ez a hatás a placebohoz viszonyítva szignifikáns volt, ami a hatóanyagok polaritásáról ad információt. A népi gyógyászatban használt vizes kivonat is mérsékelt hatásosságot mutatott. A kísérleti modell, a seb típusa és a hatás kialakulásának időtartama alapján feltételezhető, hogy az extraktum a gyulladásos és proliferatív fázisra fejt ki hatást. A hexános és kloroformos frakciók *in vitro* meghatározott markáns gyulladásgátló aktivitása szerepet játszhat sebgyógyító hatásban.

A *C. sadleriana* tartalomanyagait vizsgálva 11 vegyületet nyertünk ki és azonosítottunk a növényből [γ -linolénsav (**210**), sztigmaszterin (**212**), β -szitoszterin (**213**), α -linolénsav (**211**), pektolinarigenin (**216**), szalvigenin (**217**) és kampeszterol (**214**), vanillin (**215**), hiszpidulin (**9**), krizoeriol (**218**) és apigenin (**11**)]. Ezek mindegyike ismert vegyület a nemzetség más fajaiban, de ebből a taxonból elsőként írtuk le. Az **210–214**, **216** és **217** vegyületek a sebgyógyulás szempontjából legmarkánsabb hatású frakcióból származtak.

A növény kivonatának különböző polaritású frakcióit vizsgálva megállapítottuk, hogy a legnagyobb *in vitro* gyulladáscsökkentő aktivitás a *n*-hexános, majd a kloroformos extraktumok esetén tapasztalható, a polárosabb kivonószerekkel nyert extraktumok hatástalanok voltak. Az *n*-hexános kivonat további frakcionálásával számos hatásos frakció volt nyerhető, amelyek közül a legaktívabbak esetén *in vivo* gyulladáscsökkentő hatás is igazolható volt karragén-indukált patkánylábödéma-teszten. Tíz további *Centaurea* faj COX-1 és -2 enzimeket gátló hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy az *n*-hexános frakciók mindegyike aktív, a kloroformos extraktumok esetén mérsékeltebb aktivitás jelentkezett, a polárosabb frakciók pedig inaktívak voltak. Mindez megerősíti, hogy a gyulladáscsökkentő hatás, amely a *C. sadleriana* sebgyógyító hatásában is szerepet játszhat, elsősorban az apoláros vegyületekhez köthető.

6.17. A parlagfű potenciális vese- és májkárosító hatása

A parlagfűkivonatokkal általunk elvégzett 4 hetes szubakut toxikológiai vizsgálat során patkányokon klinikai tüneteket nem lehetett megfigyelni, azonban a biokémiai paraméterekben és a szervtömegekben eltérés volt kimutatható a kontrollcsoporthoz képest. A trigliceridszint csökkentésének mechanizmusában nem ismert, ugyanakkor nem új megfigyelés: *Parkhomenko* és mtsai. kísérletesen előidézett hiperlipidémia esetén patkányokon a parlagfű kivonatának polifenolos vegyületekben dús frakciójának lipidszintet csökkentő hatását igazolták.⁴⁹³

Az AST és ALT növekedése a KD csoportban májkárosodásra utalhat.⁴⁹⁴ Ezzel összhangban a szerv relatív tömege is csökkent ebben a csoportban, de még nagyobb mértékben az ND csoportban, amelyben viszont a két májenzim esetén nem volt eltérés. Ez a jelenség, egyéb kísérleti (pl. hisztológiai) bizonyíték híján azzal magyarázható, hogy a májkárosodás előrehaladása során az AST, ALT értéke visszatérhet a normál tartományba, még akkor is, ha egyébként a progresszió más módon igazolható.⁴⁹⁵

A karbamid- és kreatininszint növekedése vesekárosodásra utalhat. Hasonló hatást parlagfű esetén nem írtak le, azonban egyéb, a parlagfűvel rokon faj, így az *Artemisia deserti* Krasch. esetén igen: a karbamidszint emelkedés mellett a vese hisztopatológiai eltérését is leírták patkányokon.^{496,497} A kreatininszint növekedését elsőként dokumentáltuk, ez az eltérés az ND csoportban a KD csoporthoz képest volt szignifikáns.

A parlagfű fitokémiai profilja nem teljesen feltárt, a jelenleg ismert vegyületei közül a szeszkviterpén-laktonok feltételezhetőek a toxikus hatások hátterében. Egyes szeszkviterpén-laktonok citotoxikus hatása közismert, azonban az erre az aktivitásra vonatkozó vizsgálatokat a terápiás hasznosíthatóságot szem előtt tartva, általában daganatos sejtvonalakon végzik. Ugyanakkor ismert, hogy egyes, az Asteraceae családba tartozó, szeszkviterpén-laktonokat tartalmazó növények kifejtnek speciális citotoxikus, így nefrotoxikus hatást, és a partenin (*Parthenium* fajok jellemző szeszkviterpén laktonja) esetén ezt *in vitro* is leírták.⁴⁹⁸ A *Hymenoxys odorata* glomerulonefrózist és májkárosodást okozó hatását birkákon és kecskéken figyelték meg.⁴⁹⁹ A *Smallanthus sonchifolius* ismételt adagolása patkányokon a kreatinin- és az albuminszintben okozott eltéréseket, a hisztológiai vizsgálat glomerulonefrózist igazolt.⁵⁰⁰

A szeszkviterpén-laktonok központi idegrendszert károsító hatása (amit mi az agy tömegnövekedéséből következtettünk) nem új megfigyelés. Bizonyos imola fajok, így a *Centaurea solstitialis* és a *C. repens* tartós fogyasztása lovaknál a Parkinson-kórhoz hasonlóan manifesztálódó, agyi nekrozissal járó betegséget, amit a növényekben található citotoxikus repinnek tulajdonítanak.⁵⁰¹ Mivel a szervtömegek változása gyakran megelőzi a morfológiai

elváltozások kialakulását,⁵⁰² eredményeink felhívhatják a figyelmet a korai agyszövetkárosodás esélyére, ezt azonban további vizsgálatokkal szükséges megerősíteni.

Eredményeink rámutatnak arra, hogy a (gyógy)növények toxikológia profiljának megrajzolásához elengedhetetlenek a kísérletes bizonyítékok, különösen olyan növények esetén, amelyeket korábban széles körben nem alkalmaztak gyógynövényként, így empirikus alapú ismeretek sem támasztják alá a biztonságosságot. Emellett szükséges a növény részletes kémiai vizsgálata és vegyületeinek farmakológiai jellemzése, hiszen a szeszkviterpén-laktonok között számos antiproliferatív, gyulladáscsökkentő hatású ismert, amelyek növényi kivonat részeként vagy tiszta formában egyaránt gyógyászati hasznosítást nyerhetnek.

6.18. Növényi kivonatok hatásosságának elemzése metaanalízisekben

A növényi kivonatokkal végzett klinikai vizsgálatok metaanalíziseinek készítését az a felismerés ösztönözte, hogy a növényi termékekkel végzett ilyen jellegű vizsgálatok száma alacsony, és azok egy része is módszertani hibákkal terhelt. A leggyakoribb hiba az, hogy a vizsgálatokban alkalmazott faj azonosságán túl a metaanalízisek szerzői nincsenek tekintettel arra, hogy az egyes vizsgálatokban gyakran egészen eltérő módon készített, ebből következően eltérő összetételű kivonatokat alkalmaztak. Ezek eredményeinek kritikátlan összevonása szakmailag téves következtetésekhez vezethet.

A barátcserje Európa-szerte gyógyszerként (is) forgalomban lévő növény. Két kivonatával a Ze 440 és a BNO 1095 jelzésűekkel számos preklinikai és klinikai vizsgálatot végeztek, amelyek alapján ezeket gyógyszerként engedélyezték. Ennek a növénynek számos más terméke (klinikailag igazolt hatás nélkül) hagyományos növényi gyógyszerként vagy étrend-kiegészítőként van jelen. A növény megtalálható a PMS kezelésével kapcsolatos szakmai ajánlásokban,^{503–505} azonban a brit Royal College of Obstetricians and Gynaecologists szerint a termékek minőségi és mennyiségi változékonysága miatt az adagolás nem állapítható meg.⁵⁰⁶ Más ajánlások hasonló konklúzióval zárulnak,⁵⁰⁷ vagy a bizonyítékok hiányára hivatkozva nem ajánlják a növény készítményeit.⁵⁰⁸ Mindez nem meglepő a korábbi metaanalízisek gyengeségeinek ismeretében. Az egyik korábbi metaanalízis számos, nem megfelelően jellemzett (pl. pontos növényfaj, kivonósz, drog – kivonat arány nem ismert) vizsgálaton alapult,⁵⁰⁹ egy másik mindössze 2 vizsgálaton (amelyek közül egyet a mi analízisünkben a vizsgált termék elégtelen jellemzése miatt kizártunk).⁵¹⁰ Az általunk végzett metaanalízis volt az első, amelyben megfelelő hangsúlyt kaptak a növényi kivonatokkal elemzésének sajátosságai. Ez a vizsgálat igazolta az érintett termékek hatásosságát placebohoz viszonyítva egy olyan tünetegyüttesben, amelyre nem áll rendelkezésre specifikus farmakoterápia. A limitációk közé tartozik az alapul szolgáló vizsgálatok alacsony száma, a

hatásosság értékelésére használt skálák eltérő pontozása, és az, hogy a két különböző kivonatot különböző országokban (Ze 440 – Németország; BNO 1095 – Kína) tanulmányozták.

Jóllehet a hipotónia szív-érrendszeri morbiditás és mortalitás szempontjából egyaránt jelentős kockázati tényező, kezelési lehetőségei sokkal szűkebbek, mint a magas vérnyomásé. Néhány szintetikus hatóanyagot leszámítva a galagonya kivonat-kámfor fix kombináció érhető el gyógyszerként. A Korodin nevű készítmény 1927 óta van forgalomban gyógyszerként, a metaanalízbe is vont 4 modern klinikai vizsgálatot 2008–2014 között végezték. A szisztolés és diasztolés vérnyomásértékek alapján a kombináció igazoltan enyhíti a hipotenziót, viszont a mentális teljesítményre gyakorolt hatása nem szignifikáns. Metaanalízisünk gyengesége, hogy minden bevont vizsgálat Németországban zajlott, és a publikációk szerzői között átfedés figyelhető meg, továbbá az is, hogy a résztvevők alacsony száma miatt a normotenzív és hipotenzív alanyok adatait együtt analizáltuk, ami rontotta a homogenitást. Az általunk készített metaanalízis az elérhető klinikai adatok első független elemzése, amely a fontos szerepet kaphat a kombináció klinikai hatásának értékelésében, terápiában betöltött helyének meghatározásában.

A sáfrány antidepresszáns hatását vizsgáló metaanalízisünk következtetése, hogy a növény vizsgált készítményeinek adatai alapján a placebónál jelentősebb, két szintetikus hatóanyagnál nem elmaradó hatásosság állapítható meg. Míg a *Hypericum perforatum* több terápiás irányelvben megtalálható, az antidepresszáns hatásra vonatkozóan klinikailag csak 15 éve vizsgált sáfrány nem része az európai terápiás gyakorlatnak. Az általunk elvégzett metaanalízis eredményei hozzájárulhatnak a növény terápiás értékének meghatározásához. Munkánk limitációja, hogy a klinikai vizsgálatok mindegyike Iránban zajlott, a klinikai vizsgálatok szerzői között átfedés volt, valamint hatásosság mérésre alkalmazott skálák és a betegcsoportok is heterogének voltak. Előnynek tekinthető a vizsgálatok és a bevont betegek viszonylag magas száma.

7. Az értekezés főbb megállapításai

Doktori értekezésemben bemutatott munkám tematikailag és metodikailag szerteágazó, az egyes kísérleteket az a szándék fűzi egybe, hogy eredményeik hozzájáruljanak a gyógynövények és vegyületeik racionális gyógyászati alkalmazásához. Az értekezésben bemutatott eredményekkel kapcsolatos főbb eredeti megállapításokat az alábbiakban foglalom össze.

A preparatív fitokémiai munka során a vizsgált *Aconitum* fajokból 22 diterpén-alkaloidot izoláltunk (kettő jelenlétét kimutattuk), ezek közül kettő, az akotoxicin (**65**) és 1-*O*-dezmetil-szvinin (74) új természetes anyag. Ezen kívül a *L. meyenii*-ből és a *H. helianthoides* var. *scabrá*-ból összesen 7 *N*-alkil-amidot nyertünk ki, amelyek közül hármat (**90-92**) új természetes anyagként azonosítottunk. Utóbbi fajból ezen kívül 6 lignánt is izoláltunk, ezek között a két új arilbenzofurán neolignánt, az 1"-dehidroegonol-3"-metilétert (**93**) és az egonol-3"-metilétert (**94**). A *D. anethifoliá*-ból 13 vegyületet, köztük 9 lineáris furokumarint nyertünk ki. Farmakológiai szűrővizsgálat eredményei alapján kiválasztott fajoként a *P. longifolium* mohafajból 6 vegyületet izoláltunk, köztük az első öt természetes 9,10-fenantrénkinon dimert (**102-106**). Hatáskövetett izolálás eredményeként a *C. genistoides*-ből 17 vegyületet nyertünk ki, közülük több jelentős ösztrogénszerű hatással rendelkezett. Több vegyület ¹H és ¹³C NMR adatait, teljes jelhozzárendelését először közöltük vagy a korábbi adatokat korrigáltuk, számos vegyületet elsőként írtunk le az adott taxonban.

Elsőként mutattunk rá a sisakvirág fajok tradicionális feldolgozása során feldúsuló lipoalkaloidok gyulladáscsökkentő hatásban betöltött potenciális szerepére. Félszintetikus módszerrel előállítottunk 15 lipoalkaloidot (ezek közül 4 korábban le nem írt vegyület), ezek gyulladáscsökkentő hatását *in vitro* tanulmányoztuk, és a vegyületsorozatból több gyulladáscsökkentő vegyületet azonosítottunk, így igazolva feltételezésünket. Az izolált diterpén-alkaloidokkal és az előállított lipoalkaloidokkal szisztematikus vizsgálatot végeztünk a vegyületek káliumcsatornákra való hatásának feltérképezése érdekében, a GIRK és hERG gátló hatást tanulmányozva. Ennek során olyan vegyületeket azonosítottunk a lipoalkaloidok között, amelyek GIRK/hERG aktivitásának szelektivitása perspektivikussá teszi a további terápiás fókuszú vizsgálatokat. Ugyanezen *in vitro* tesztrendszerben a humán gyógyászatban alkalmazott vérehulló fecskefű alkaloidjai között olyan hERG-gátló vegyületeket [kelidonin (**207**) és a szangvinarin (**208**)] azonosítottunk, amelyek jelenléte kétséggé teszi az orális felhasználás biztonságosságát.

Az *N*-alkil-amidok között az endokannabinoid rendszer több támadáspontján (CB receptorok, anandamidvisszavétel gátlása, FAAH gátlása) mikromoláris-szubmikromoláris koncentrációban hatásos vegyületeket azonosítottunk. Több vegyület mutatott jelentős

szelektivitást a CB₁ iránt a CB₂ ellenében (**92, 99, 100, 101**), utóbbi vegyület affinitása a CB₁-hez és FAAH-gátló hatása kimagasló.

A farmakológiai vizsgálatok egyik fókusza a daganatellenes hatás volt. Legmarkánsabb aktivitást a *D. anethifolia* furokumarinainál mutattunk ki, ezek közül az oxipeucedanin (**127**) és heraklenin (**132**) szinergista módon fokozták a doxorubicin daganatsejtellenes hatását is. A *H. helianthoides* var *scabra* lignánjairól (**95** és **96**) barrierfunkciót javító hatást igazoltunk, ami arra utal, hogy ezek a vegyületek a BBB-funkció javításával mérsékelhetik az agyi a metasztázisok kialakulásának kockázatát.

Az analitikai vizsgálatok egyik célja az volt, hogy szisztematikus adatokat gyűjtsünk néhány iparilag is fontos gyógynövényről. Ennek keretében szisztematikusan vizsgáltuk különböző fermentáltsági fokú teaminták koffein- és L-teanintartalmát, valamint az *Rhodiola rosea* konvencionális (és általunk javasolt) markeranyagainak mennyiségeit eltérő helyekről származó és egyéb szempontok szerint különböző mintákból. Ezek a vizsgálatok a termékek és nyersanyagok minőségbiztosításához szolgáltathatnak hasznos adalékot. Hasonló megközelítésű vizsgálatban rámutattunk arra, hogy az édeskömény furokumarintartalma minden valószínűség szerint nem jelent humán egészségi kockázatot.

Kifejezetten biztonságossági szempontú vizsgálat keretében elsőként mutattuk ki, hogy a máriatövis feldolgozási módja döntő befolyással van a termékek réztartalmára, ami egyes szenzitív betegcsoportok számára reális kockázat lehet. A fekete nadálytő esetén eredményeink viszont arra utalnak, hogy külsőleges alkalmazásnál a pirrolizidin-alkaloidok jelenlétével összefüggő kockázat jóval elmarad attól, amit kísérleti adatok híján, elméleti megfontolások alapján feltételeztünk. Étrend-kiegészítők vizsgálata során nyert tapasztalataink alapján analitikai módszereket dolgoztunk ki a hamisítások kimutatására, valamint allopatias és homeopatiás gyógyszerek összehasonlító vizsgálatával rámutattunk arra, hogy utóbbiak esetében is számolni kell a mérhető mennyiségű hatóanyagok jelenlétével és ennek következményeivel.

Több növény kivonataival farmakológiai és toxikológiai vizsgálatokat végeztünk. A *Hoodia gordonii* esetén kimutattuk, hogy a növény adrenerg aktivitása a fogyasztó számára kardiovaszkuláris kockázatot jelenthet. A parlagfű *in vivo* vizsgálatánál a növény lehetséges vese- és májkárosító hatására hívtuk fel a figyelmet. A népi gyógyászatban régóta görcsoldóként használt római kamilla kivonatával elsőként végeztünk a hatás módjának és az azért felelős vegyületek felderítésével kapcsolatos kísérleteket. A szakirodalomban elsőként dokumentáltuk egy endemikus faj, a *C. sadleriana* etnomedicinális alkalmazását és igazoltuk sebgyógyító hatását.

A gyógynövények humán hatásossága klinikai vizsgálatokban állapítható meg. Ezek eredményeinek független, kritikus statisztikai újraelemzése az egyes vizsgálatok eredményeinél megbízhatóbb következtetésekhez vezet. Három növényi termék, a barátcserje, a sáfrány és a

galagonya-kámfor kombináció esetén metaanalízisekben vizsgáltuk meg a hatásossággal kapcsolatos adatokat és szolgáltatunk a bizonyítékokon alapuló orvoslás számára is használható evidenciákat.

8. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- 1* Csupor, D.; Forgo, P.; Wenzig, E. M.; Bauer, R.; Hohmann, J. Bisnorditerpene, norditerpene, and lipo-alkaloids from *Aconitum toxicum*. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1779-1782.
- 2* Forgo, P.; Borcsa, B.; Csupor, D.; Fodor, L.; Berkecz, R.; Molnár V., A.; Hohmann, J. Diterpene alkaloids from *Aconitum anthora* and assessment of the hERG-inhibiting ability of aconitum alkaloids. *Planta Med.* **2011**, *77*, 368-373.
- 3* Borcsa, B.; Fodor, L.; Csupor, D.; Forgo, P.; Molnár, A.; Hohmann, J. Diterpene alkaloids from the roots of *Aconitum moldavicum* and assessment of Na_v1.2 sodium channel activity of *Aconitum* alkaloids. *Planta Med.* **2014**, *80*, 231-236.
- 4* Kiss, T.; Orvos, P.; Bánsághi, S.; Forgo, P.; Jedlinszki, N.; Tálosi, L.; Hohmann, J.; Csupor, D. Identification of diterpene alkaloids from *Aconitum napellus* subsp. *firmum* and GIRK channel activities of some *Aconitum* alkaloids. *Fitoterapia* **2013**, *90*, 85-93.
- 5* Hajdu, Zs.; Haskó, J.; Krizbai, I. A.; Wilhelm, I.; Jedlinszki, N.; Fazakas, C.; Molnár, J.; Forgo, P.; Hohmann, J.; Csupor, D. Evaluation of lignans from *Heliopsis helianthoides* var. *scabra* for their potential antimetastatic effects in the brain. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 2641-2650.
- 6* Hajdu, Zs.; Nicolussi, S.; Rau, M.; Lorántfy, L.; Forgo, P.; Hohmann, J.; Csupor, D.; Gertsch, J. Identification of endocannabinoid system-modulating *N*-alkylamides from *Heliopsis helianthoides* var. *scabra* and *Lepidium meyenii*. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1663-1669.
- 7* Csupor, D.; Vollár, M.; Kúsz, N.; Kövér, E. K.; Mándi, A.; Kurtán, T.; Szűcs, P.; Marschall, M.; Senobar Tahaei, S. A.; Zupkó, I.; Hohmann, J. Pigments of the Moss *Paraleucobryum longifolium*: Isolation and Structure Elucidation of Prenyl-substituted 8,8'-linked 9,10-Phenanthrenequinone Dimers. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 268-276.
- 8* Roza, O.; Lai, W.-C.; Zupkó, I.; Hohmann, J.; Jedlinszki, N.; Chang, F.-R.; Csupor, D.; Eloff, J. N. Bioactivity guided isolation of phytoestrogenic compounds from *Cyclopia genistoides* by the pER8:GUS reporter system. *South African J. Bot.* **2017**, *110*, 201-207.
- 9* Roza, O.; Martins, A.; Hohmann, J.; Lai, W.-C.; Eloff, J.; Chang, F.-R.; Csupor, D. Flavonoids from *Cyclopia genistoides* and their xanthine oxidase inhibitory activity. *Planta Med.* **2016**, *82*, 1274-1278.
- 10* Mottaghipisheh, J.; Nové, M.; Spengler, G.; Kúsz, N.; Hohmann, J.; Csupor, D. Antiproliferative and cytotoxic activities of furocoumarins of *Ducrosia anethifolia*. *Pharm. Biol.* **2018**, *56*, 658-664.
- 11* Csupor, D.; Wenzig, E. M.; Zupkó, I.; Wölkart, K.; Hohmann, J.; Bauer, R. Qualitative and quantitative analysis of aconitine-type and lipo-alkaloids of *Aconitum carmichaelii* roots. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 2079-2086.
- 12* Borcsa, B.; Widowitz, U.; Csupor, D.; Forgo, P.; Bauer, R.; Hohmann, J. Semisynthesis and pharmacological investigation of lipo-alkaloids prepared from aconitine. *Fitoterapia* **2011**, *82*, 365-368.
- 13* Kiss, T.; Borcsa, B.; Orvos, P.; Tálosi, L.; Hohmann, J.; Csupor, D. Diterpene Lipo-Alkaloids with Selective Activities on Cardiac K⁺ Channels. *Planta Med.* **2017**, *83*, 1321-1328.
- 14* Csupor, D.; Borcsa, B.; Heydel, B.; Hohmann, J.; Zupkó, I.; Ma, Y.; Widowitz, U.; Bauer, R. Comparison of a specific HPLC determination of toxic aconite alkaloids in processed *Radix aconiti* with a titration method of total alkaloids. *Pharm. Biol.* **2011**, *49*, 1097-1101.
- 15* Peschel, W.; Kump, A.; Horváth, A.; Csupor, D. Age and harvest season affect the phenylpropanoid content in cultivated European *Rhodiola rosea* L. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *83*, 787-802.
- 16* Peschel, W.; Kump, A.; Zomborszki, Z. P.; Pfosser, M.; Kainz, W.; Csupor, D. Phenylpropanoid content in high-altitude cultivated *Rhodiola rosea* L. provenances according to plant part, harvest season and age. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *111*, 446-456.
- 17* Péter Zomborszki, Z.; Kúsz, N.; Csupor, D.; Peschel, W. Rhodiosin and herbacetin in *Rhodiola rosea* preparations: additional markers for quality control? *Pharm. Biol.* **2019**, *57*,

- 295–305.
- 18* Csupor, D.; Boros, K.; Hunyadi, A.; Veres, K.; Hohmann, J. Validation of a densitometric method for the determination of theanine in tea extracts using CP atlas software. *JPC - J. Planar Chromat.* **2012**, *25*, 571–574.
 - 19* Csupor, D.; Boros, K.; Jedlinszki, N.; Hohmann, J. A Validated RP-HPLC-DAD Method for the Determination of L-Theanine in Tea. *Food Anal. Methods* **2014**, *7*, 591–596.
 - 20* Boros, K.; Jedlinszki, N.; Csupor, D. Theanine and Caffeine content of infusions prepared from commercial tea samples. *Pharmacogn. Mag.* **2016**, *12*, 75–78.
 - 21* Csupor, D.; Bognár, J.; Karsai, J. An Optimized Method for the Quantification of Isoflavones in Dry Soy Extract Containing Products. *Food Anal. Methods* **2015**, *8*, 2515–2523.
 - 22* Kerekes, D.; Csorba, A.; Gosztola, B.; Németh-Zámbori, É.; Kiss, T.; Csupor, D. Furocoumarin Content of Fennel—Below the Safety Threshold. *Molecules* **2019**, *24*, 2844.
 - 23* Jedlinszki, N.; Kálomista, I.; Galbács, G.; Csupor, D. *Silybum marianum* (milk thistle) products in Wilson’s disease: a treatment or a threat? *J. Herb. Med.* **2016**, *6*, 157–159.
 - 24* Csupor, D.; Szekeres, A.; Kecskeméti, A.; Vékes, E.; Veres, K.; Micsinay, Á.; Szendrei, K.; Hohmann, J. Szildenafilfillal és tadalafillal hamisított étrend-kiegészítők a hazai piacon. *Orv. Hetil.* **2010**, *151*, 1783–1789.
 - 25* Csupor, D.; Boros, K.; Dankó, B.; Veres, K.; Szendrei, K.; Hohmann, J. Rapid identification of sibutramine in dietary supplements using a stepwise approach. *Pharmazie* **2013**, *68*, 15–18.
 - 26* Csupor, D.; Micsinay, Á.; Máthé, I.; Horváth-Boros, K.; Kiss, T.; Hohmann, J. Planar chromatography in the quality control of adulterated *Citrus paradisi* seed extract-containing products. *JPC - J. Planar Chromatogr.* **2018**, *31*, 23–27.
 - 27* Csupor, D.; Boros, K.; Hohmann, J. Low Potency Homeopathic Remedies and Allopathic Herbal Medicines: Is There an Overlap? *PLoS One* **2013**, *8*, e74181.
 - 28* Jedlinszki, N.; Csupor, D. A validated, rapid HPLC-ESI-MS/MS method for the determination of lycopsamine. *Nat. Prod. Commun.* **2015**, *10*, 1181–1182.
 - 29* Jedlinszki, N.; Balázs, B.; Csányi, E.; Csupor, D. Penetration of lycopsamine from a comfrey ointment through human epidermis. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2017**, *83*, 1–4.
 - 30.* Vollár, M.; Gyovai, A.; Szucs, P.; Zupkó, I.; Marschall, M.; Csupor-Löffler, B.; Bérdi, P.; Vecsernyés, A.; Csorba, A.; Liktó-Busa, E.; Urbán, E.; Csupor, D. Antiproliferative and antimicrobial activities of selected bryophytes. *Molecules* **2018**, *23*, 1520.
 - 31* Kiss, T.; Borcsa, B.; Orvos, P.; Tálosi, L.; Hohmann, J.; Csupor, D. Diterpene Lipo-Alkaloids with Selective Activities on Cardiac K⁺ Channels. *Planta Med.* **2017**, *83*, 1321–1328.
 - 32* Orvos, P.; Virág, L.; Tálosi, L.; Hajdú, Z.; Csupor, D.; Jedlinszki, N.; Szél, T.; Varró, A.; Hohmann, J. Effects of *Chelidonium majus* extracts and major alkaloids on hERG potassium channels and on dog cardiac action potential – A safety approach. *Fitoterapia* **2015**, *100*, 156–165.
 - 33* Roza, O.; Lovász, N.; Zupkó, I.; Hohmann, J.; Csupor, D. Sympathomimetic activity of a *Hoodia gordonii* product: A possible mechanism of cardiovascular side effects. *Biomed Res. Int.* **2013**, 171059 .
 - 34* Sándor, Zs.; Mottaghipisheh, J.; Veres, K.; Hohmann, J.; Bencsik, T.; Horváth, A.; Kelemen, D.; Papp, R.; Barthó, L.; Csupor, D. Evidence supports tradition: The *in vitro* effects of Roman Chamomile on smooth muscles. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 323.
 - 35* Kiss, T.; Mácsai, L.; Csupor, D.; Datki, Zs. L. *In vivo* screening of diterpene alkaloids using bdelloid rotifer assays. *Acta Biol. Hung.* **2017**, *68*, 443–452.
 - 36* Csupor, D.; Blazsó, G.; Balogh, A.; Hohmann, J. The traditional Hungarian medicinal plant *Centaurea sadleriana* Janka accelerates wound healing in rats. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *127*, 193–195.
 - 37* Csupor, D.; Widowitz, U.; Blazsó, G.; Laczkó-Zöld, E.; Tatsimo, J. S. N.; Balogh, A.; Boros, K.; Dankó, B.; Bauer, R.; Hohmann, J. Anti-inflammatory activities of eleven *Centaurea* species occurring in the Carpathian basin. *Phyther. Res.* **2013**, *27*, 540–544.

- 38* Kiss, T.; Szabó, A.; Oszlanczi, G.; Lukács, A.; Tímár, Z.; Tiszlavicz, L.; Csupor, D. Repeated-dose toxicity of common ragweed on rats. *PLoS One* **2017**, *12*, e0176818 .
- 39* Csupor, D.; Lantos, T.; Hegyi, P.; Benkő, R.; Viola, R.; Gyöngyi, Z.; Csécsei, P.; Tóth, B.; Vasas, A.; Márta, K.; Rostás, I.; Szentesi, A.; Matuz, M. Vitex agnus-castus in premenstrual syndrome: A meta-analysis of double-blind randomised controlled trials. *Complement. Ther. Med.* **2019**, *47*, 102190.
- 40* Csupor, D.; Viczián, R.; Lantos, T.; Kiss, T.; Hegyi, P.; Tenk, J.; Czumbel, L. M.; Thanyaporn, S. Ngoen; Gyöngyi, Z.; Varga, G.; Gerber, G.; Pétervári, E.; Tóth, B. The combination of hawthorn extract and camphor significantly increases blood pressure: A meta-analysis and systematic review. *Phytomedicine* **2019**, *63*, 152984.
- 41* Tóth, B.; Hegyi, P.; Lantos, T.; Szakács, Z.; Kerémi, B.; Varga, G.; Tenk, J.; Pétervári, E.; Balaskó, M.; Rumbus, Z.; Rakonczay, Z.; Bálint, E. R.; Kiss, T.; Csupor, D. The Efficacy of Saffron in the Treatment of Mild to Moderate Depression: A Meta-analysis. *Planta Med.* **2019**, *85*, 24–31.

9. Az értekezés témájához tartozó egyéb közlemények

Borcsa, B.; Csupor, D.; Forgo, P.; Widowitz, U.; Bauer, R.; Hohmann, J. *Aconitum* lipo-alkaloids – semisynthetic products of the traditional medicine. *Nat. Prod. Commun.* **2011**, *6*, 527–36.

Hajdu, Zs.; Lorántfy, L.; Jedlinszki, N.; Boros, K.; Hohmann, J.; Csupor, D. Quality control of maca-containing (*Lepidium meyenii* Walp.) dietary supplements. *Acta Aliment.* **2015**, *44*, 461–467.

Tai, C. J.; El-Shazly, M.; Wu, T. Y.; Lee, K. T.; Csupor, D.; Hohmann, J.; Chang, F. R.; Wu, Y. C. Clinical Aspects of *Aconitum* Preparations. *Planta Med.* **2015**, *81*, 1017–1028.

El-Shazly, M.; Tai, C. J.; Wu, T. Y.; Csupor, D.; Hohmann, J.; Chang, F. R.; Wu, Y. C. Use, history, and liquid chromatography/mass spectrometry chemical analysis of *Aconitum*. *J. Food Drug Anal.* **2016**, *24*, 29–45.

Tóth, B.; Lantos, T.; Hegyi, P.; Viola, R.; Vasas, A.; Benkő, R.; Gyöngyi, Z.; Vincze, Á.; Csécsei, P.; Mikó, A.; Hegyi, D.; Szentesi, A.; Matuz, M.; Csupor, D. Ginger (*Zingiber officinale*): An alternative for the prevention of postoperative nausea and vomiting. A meta-analysis. *Phytomedicine* **2018**, *50*, 8–18.

Piri, E.; Sourestani, M. M.; Khaleghi, E.; Mottaghipisheh, J.; Zomborszki, Z. P.; Hohmann, J.; Csupor, D. Chemo-diversity and antiradical potential of twelve *Matricaria chamomilla* L. Populations from Iran: Proof of ecological effects. *Molecules* **2019**, *24*, 1315.

Kiss, T.; Timár, Z.; Szabó, A.; Lukács, A.; Velky, V.; Oszlanczi, G.; Horváth, E.; Takács, I.; Zupkó, I.; Csupor, D. Effect of green tea on the gastrointestinal absorption of amoxicillin in rats. *BMC Pharmacol. Toxicol.* **2019**, *20*, 54.

Tóth, B.; Németh, D.; Soós, A.; Hegyi, P.; Pham-Dobor, G.; Varga, O.; Varga, V.; Kiss, T.; Sarlós, P.; Erőss, B.; Csupor, D. The Effects of a Fixed Combination of *Berberis aristata* and *Silybum marianum* on Dyslipidaemia – A Meta-analysis and Systematic Review. *Planta Med.* **2020**, *86*, 132–143.

Mottaghipisheh, J.; Mahmoodi Sourestani, M.; Kiss, T.; Horváth, A.; Tóth, B.; Ayanmanesh, M.; Khamushi, A.; Csupor, D. Comprehensive chemotaxonomic analysis of saffron crocus tepal and stamen samples, as raw materials with potential antidepressant activity. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, 113183.

10. Irodalomjegyzék

1. Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev.* **2012**; 6: 1-5.
2. Chaves SA de M, Reinhard KJ. Paleopharmacology and pollen: theory, method, and application. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **2003**; 98: 207-211.
3. Krishnamurti C, Rao SC. The isolation of morphine by Serturmer. *Indian J Anaesth.* **2016**; 60: 861-862.
4. Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites.* **2012**; 2: 303-336.
5. Sneader W. The discovery of aspirin: a reappraisal. *BMJ.* **2000**; 321: 1591-1594.
6. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod.* **2016**; 79: 629-661.
7. Wagner H. Multitarget therapy – The future of treatment for more than just functional dyspepsia. *Phytomedicine.* **2006**; 13: 122-129.
8. Verjee S, Kelber O, Kolb C, Abdel-Aziz H, Butterweck V. Permeation characteristics of hypericin across Caco-2 monolayers in the presence of single flavonoids, defined flavonoid mixtures or *Hypericum* extract matrix. *J Pharm Pharmacol.* **2019**; 71: 58-69. .
9. Williamson EM. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine.* **2001**; 8: 401-409.
10. Blondeau S, Do QT, Scior T, Bernard P, Morin-Allory L. Reverse pharmacognosy: another way to harness the generosity of nature. *Curr Pharm Des.* **2010**; 16: 1682-1696.
11. Pérez-Alonso N, Chong-Pérez B, Capote A, et al. Biotechnological Approaches for Biomass and Cardenolide Production in *Digitalis purpurea* L. In: *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. **2016**: 1391: 81-102.
12. Expósito O, Bonfill M, Moyano E, et al. Biotechnological production of taxol and related taxoids: current state and prospects. *Anticancer Agents Med Chem.* **2009**; 9: 109-121.
13. Teschke R, Schwarzenboeck A, Akinci A. Kava hepatotoxicity: a European view. *N Z Med J.* **2008**; 121: 90-98. Accessed May 11, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18841189>
14. F.P. W, X.T. L. C20-diterpenoid alkaloids. *Alkaloids Chem Biol.* **2002**; 59: 1-280.
15. Pelletier SW, Mody N V., Joshy BS, Schramm LC. No Title. In: Pelletier SW, ed. *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. John Wiley & Sons; **1984**: 205-462.
16. Kitagawa I, Yoshikawa M, Chen ZL, Kobayashi K. Four new lipo-alkaloids from aconiti tuber. *Chem Pharm Bulletin.* **1982**; 30: 758-761.
17. Sultankhodzhaev MN, Nlshanov AA. Proposed biogenesis of diterpenoid alkaloids. *Chem Nat Compd.* **1996**; 31: 283-298.
18. Caravati EM, McCowan CL, Marshall SW. Plants. In: *Medical Toxicology*. Lippincott Williams & Wilkins; **2004**: 1701.
19. Friese J, Gleitz J, Gutser UT, et al. Aconitum sp. alkaloids: the modulation of voltage-dependent Na⁺ channels, toxicity and antinociceptive properties. *Eur J Pharmacol.* **1997**; 337: 165-174.
20. Wada K, Nihira M, Ohno Y. Effects of chronic administrations of aconitine on body weight and rectal temperature in mice. *J Ethnopharmacol.* **2006**; 105: 89-94.
21. Li H, Liu L, Zhu S, Liu Q. Case reports of aconite poisoning in mainland China from 2004 to 2015: A retrospective analysis. *J Forensic Leg Med.* **2016**; 42: 68-73.
22. Chan TYK. Aconite poisoning. *Clin Toxicol (Phila)*. **2009**; 47: 279-285.
23. Karturi SP, Gudmundsson H, Akhtar M, Jahangir A, Choudhuri I. Spectrum of cardiac manifestations from aconitine poisoning. *Hear Case Reports.* **2016**; 2: 415-420.
24. Ameri. A. The effects of Aconitum alkaloids on the central nervous system. *Prog Neurobiol.* **1998**; 56: 211-235.
25. Dzhakhangirov FN, Sultankhodzhaev MN, Tashkhodzhaev B, Salimov BT. Diterpenoid alkaloids as a new class of antiarrhythmic agents. Structure-activity relationship. *Chem Nat Compd.* **1997**; 33: 190-202.
26. Yunusov MS. Antiarrhythmic agents based on diterpenoid alkaloids. *Russ Chem Bull.* **2011**; 60: 633-638.
27. Vakhitova Y V., Farafontova EI, Khisamutdinova RY, Yunusov VM, Tsypysheva IP, Yunusov MS. A study of the mechanism of the antiarrhythmic action of Allapinin. *Russ J Bioorganic Chem.* **2013**; 39: 92-101.
28. Huang X, Yang Y, Zhu J, Dai Y, Pu J. The effects of a novel anti-arrhythmic drug, acehytisine hydrochloride, on the human ether-a-go-go related gene K channel and its trafficking. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **2009**; 104: 145-154.
29. Tarnawa I, Bölskei H, Kocsis P. Blockers of voltage-gated sodium channels for the treatment of central nervous system diseases. *Recent Pat CNS Drug Discov.* **2007**; 2: 57-78.
30. Lai J, Hunter JC, Porreca F. The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain. *Curr Opin Neurobiol.* **2003**; 13: 291-297.
31. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. *Pharmacol Rev.* **2005**; 57: 397-409.
32. Liang J, Brochu RM, Cohen CJ, et al. Discovery of potent and use-dependent sodium channel blockers for treatment of chronic pain. *Bioorg Med Chem Lett.* **2005**; 15: 2943-2947.
33. Dobrev D, Friedrich A, Voigt N, et al. The G protein-gated potassium current I(K,ACh) is constitutively active in

- patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation*. **2005**; *112*: 3697-3706.
34. Walsh KB. Targeting GIRK Channels for the Development of New Therapeutic Agents. *Front Pharmacol*. **2011**; *2*: 64.
 35. Ikeda K, Kobayashi T, Kumanishi T, Niki H, Yano R. Involvement of G-protein-activated inwardly rectifying K (GIRK) channels in opioid-induced analgesia. *Neurosci Res*. **2000**; *38*: 113-116.
 36. Guo L, Dong Z, Guthrie H. Validation of a guinea pig Langendorff heart model for assessing potential cardiovascular liability of drug candidates. *J Pharmacol Toxicol Methods*. **2009**; *60*: 130-151.
 37. Priest BT, Bell IM, Garcia ML. Role of hERG potassium channel assays in drug development. *Channels (Austin)*. **2008**; *2*: 87-93.
 38. De Bruin ML, Pettersson M, Meyboom RHB, Hoes AW, Leufkens HGM. Anti-HERG activity and the risk of drug-induced arrhythmias and sudden death. *Eur Heart J*. **2005**; *26*: 590-597.
 39. Li Y, Tu D, Xiao H, et al. Aconitine blocks HERG and Kv_{1.5} potassium channels. *J Ethnopharmacol*. **2010**; *131*: 187-195.
 40. Xie S, Jia Y, Liu A, Dai R, Huang L. Hypaconitine-induced QT prolongation mediated through inhibition of KCNH2 (hERG) potassium channels in conscious dogs. *J Ethnopharmacol*. **2015**; *166*: 375-379.
 41. Schramm A, Saxena P, Chlebek J, et al. Natural Products as Potential Human Ether-A-Go-Go-Related Gene Channel Inhibitors – Screening of Plant-Derived Alkaloids. *Planta Med*. **2014**; *80*: 740-746.
 42. Harmati G, Papp F, Szentandrassy N, et al. Effects of the PKC inhibitors chelerythrine and bisindolylmaleimide I (GF 109203X) on delayed rectifier K⁺ currents. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. **2011**; *383*: 141-148.
 43. Li BX, Yang BF, Zhou J, Xu CQ, Li YR. Inhibitory effects of berberine on IK₁, IK, and HERG channels of cardiac myocytes. *Acta Pharmacol Sin*. **2001**; *22*: 125-131.
 44. Sánchez-Chapula J. Increase in action potential duration and inhibition of the delayed rectifier outward current IK by berberine in cat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol*. **1996**; *117*: 1427-1434.
 45. Song L-S, Ren G-J, Chen Z-L, Chen Z-H, Zhou Z-N, Cheng H. Electrophysiological effects of protopine in cardiac myocytes: inhibition of multiple cation channel currents. *Br J Pharmacol*. **2000**; *129*: 893-900.
 46. Ji B-L, Xia L-P, Zhou F-X, Mao G-Z, Xu L-X. Aconitine induces cell apoptosis in human pancreatic cancer via NF- κ B signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. **2016**; *20*: 4955-4964.
 47. Guo B, Liu S, Ye Y, Han X. Inhibitory effects of osthole, psoralen and aconitine on invasive activities of breast cancer MDA-MB-231BO cell line and the mechanisms. *J Chinese Integr Med*. **2011**; *9*: 1110-1117.
 48. Du J, Lu X, Long Z, et al. In Vitro and in Vivo Anticancer Activity of Aconitine on Melanoma Cell Line B16. *Molecules*. **2013**; *18*: 757-767.
 49. de Inés C, Reina M, Gavín JA, González-Coloma A. *In vitro* cytotoxicity of norditerpenoid alkaloids. *Z Naturforsch C*. **2006**; *61*: 11-18.
 50. Kőszegi Z, Atlasz T, Csupor D, Szabadfi K, Hohmann J, Hernádi I. Aconitum Alkaloid Songorine Acts as a Potent GABA(A) Receptor Agonist in the Rat Brain in Vivo. *Acta Physiol. Hung*. **2007**; *94*: 367-368.
 51. Ameri A. Effects of the Aconitum alkaloid songorine on synaptic transmission and paired-pulse facilitation of CA1 pyramidal cells in rat hippocampal slices. *Br J Pharmacol*. **1998**; *125*: 461-468.
 52. Zhao X-Y, Wang Y, Li Y, et al. Songorine, a diterpenoid alkaloid of the genus Aconitum, is a novel GABA_A receptor antagonist in rat brain. *Neurosci Lett*. **2003**; *337*: 33-36.
 53. Wang Y, Shi L, Song F, Liu Z, Liu S. Exploring the ester-exchange reactions of diester-diterpenoid alkaloids in the aconite decoction process by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. **2003**; *17*: 279-284.
 54. Zhang M, Peng C-S, Li X-B. In vivo and in vitro metabolites from the main diester and monoester diterpenoid alkaloids in a traditional chinese herb, the aconitum species. *Evid Based Complement Alternat Med*. **2015**; *2015*: 252434.
 55. Y. B, H.K. D, S.W. P. Long-chain fatty acid esters of some norditerpenoid alkaloids. *J Nat Prod*. **1994**; *57*: 963-970.
 56. Rios M. Natural Alkamides: Pharmacology, Chemistry and Distribution. *InTech*. Published online **2003**.
 57. Boonen J, Bronselaer A, Nielandt J, Veryser L, Tre G De. Alkamid database : Chemistry , occurrence and functionality of plant N- alkylamides. *J Ethnopharmacol*. **2012**; *142*: 563-590.
 58. Hernández I, Márquez L, Martínez I, et al. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkamides-derived from Heliopsis longipes roots. *J Ethnopharmacol*. **2009**; *124*: 649-652.
 59. Schulthess BH, Giger E, Baumann TW. Echinacea: anatomy, phytochemical pattern, and germination of the achene. *Planta Med*. **1991**; *57*: 384-388.
 60. Haller J, Freund TF, Pelczar KG, Füredi J, Krecsak L, Zámboi J. The Anxiolytic Potential and Psychotropic Side Effects of an Echinacea Preparation in Laboratory Animals and Healthy Volunteers. *Phyther Res*. **2013**; *27*: 54-61.
 61. Blancaflor EB, Kilaru A, Keereetawee J, Khan BR, Faure L, Chapman KD. N-Acylethanolamines: lipid metabolites with functions in plant growth and development. *Plant J cell Mol Biol*. **2014**; *79*: 568-583.
 62. Rios MY, Aguilar-Guadarrama AB, Gutiérrez MDC. Analgesic activity of affinin, an alkamide from Heliopsis longipes (Compositae). *J Ethnopharmacol*. **2007**; *110*: 364-367.
 63. Déciga-Campos M, Rios MY, Aguilar-Guadarrama AB. Antinociceptive effect of Heliopsis longipes extract and affinin in mice. *Planta Med*. **2010**; *76*: 665-670.

64. Woelkart K, Bauer R. The role of alkamides as an active principle of echinacea. *Planta Med.* **2007**; *73*: 615-623.
65. Gertsch J, Schoop R, Kuenzle U, Suter A. *Echinacea* alkylamides modulate TNF- α gene expression via cannabinoid receptor CB2 and multiple signal transduction pathways. *FEBS Lett.* **2004**; *577*: 563-569.
66. Woelkart K, Xu W, Pei Y, Makriyannis A, Picone RP, Bauer R. The endocannabinoid system as a target for alkamides from *Echinacea angustifolia* roots. *Planta Med.* **2005**; *71*: 701-705.
67. Raduner S, Majewska A, Chen J, et al. Alkylamides from *Echinacea* Are a New Class of Cannabinomimetics. *J Biol Chem.* **2006**; *281*: 14192-14206.
68. Clifford LJ, Nair MG, Rana J, Dewitt DL. Bioactivity of alkamides isolated from *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *Phytomedicine.* **2002**; *9*: 249-253.
69. Müller-Jakic B, Breu W, Pröbstle A, Redl K, Greger H, Bauer R. *In Vitro* Inhibition of Cyclooxygenase and 5-Lipoxygenase by Alkamides from *Echinacea* and *Achillea* Species. *Planta Med.* **1994**; *60*: 37-40.
70. Gertsch J. Immunomodulatory lipids in plants: plant fatty acid amides and the human endocannabinoid system. *Planta Med.* **2008**; *74*: 638-650.
71. Ruiu S, Anzani N, Orrù A, et al. N-Alkyl dien- and trienamides from the roots of *Otanthus maritimus* with binding affinity for opioid and cannabinoid receptors. *Bioorg Med Chem.* **2013**; *21*: 7074-7082.
72. Dossou KSS, Devkota KP, Morton C, et al. Identification of CB1/CB2 ligands from *Zanthoxylum bungeanum*. *J Nat Prod.* **2013**; *76*: 2060-2064.
73. Chicca A, Raduner S, Pellati F, et al. Synergistic immunopharmacological effects of N-alkylamides in *Echinacea purpurea* herbal extracts. *Int Immunopharmacol.* **2009**; *9*: 850-858.
74. Almukadi H, Wu H, Böhlke M, Kelley CJ, Maher TJ, Pino-Figueroa A. The macamide N-3-methoxybenzyl-linoleamide is a time-dependent fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitor. *Mol Neurobiol.* **2013**; *48*: 333-339.
75. Wu H, Kelley CJ, Pino-figueroa A, Vu HD, Maher TJ. Macamides and their synthetic analogs: Evaluation of *in vitro* FAAH inhibition. *Bioorg Med Chem.* **2013**; *21*: 5188-5197.
76. Almukadi H, Wu H, Böhlke M, Kelley CJ, Maher TJ, Pino-Figueroa A. The macamide N-3-methoxybenzyl-linoleamide is a time-dependent fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitor. *Mol Neurobiol.* **2013**; *48*: 333-339.
77. Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, et al. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002**; *99*: 10819-10824.
78. Muhammad I, Zhao J, Dunbar DC, Khan I a. Constituents of *Lepidium meyenii* "maca". *Phytochemistry.* **2002**; *59*: 105-110.
79. Zheng BL, He K, Shao Y, Zheng QY. Isolated n-benzyl-9-oxo-16-hydroxy-octadeca-10,12,14-triene amide; treating and preventing cancer and sexual dysfunction. **2003**: US6552206 B1.
80. Zhao J, Muhammad I, Dunbar DC, Mustafa J, Khan IA. New alkamides from maca (*Lepidium meyenii*). *J Agric Food Chem.* **2005**; *53*: 690-693.
81. McCollom MM, Villinski JR, McPhail KL, Craker LE, Gafner S. Analysis of macamides in samples of Maca (*Lepidium meyenii*) by HPLC-UV-MS/MS. *Phytochem Anal.* **2005**; *16*: 463-469.
82. Quirós C, Aliaga R. Maca (*Lepidium meyenii* Walp.). In: Hermann M, Heller J, eds. *Andean Roots and Tubers: Ahipa, Arracacha, Maca and Yacon*. International Plant Genetic Resources Institute; **1997**:173-198.
83. Gonzales GF. Ethnobiology and Ethnopharmacology of *Lepidium meyenii* (Maca), a Plant from the Peruvian Highlands. *Evid Based Complement Alternat Med.* **2012**: 193496.
84. Wang Y, Wang Y, McNeil B, Harvey LM. Maca: An Andean crop with multi-pharmacological functions. *Food Res Int.* **2007**; *40*: 783-792.
85. Hajdu Zs, Lorántfy L, Jedlinski N, Boros K, Csutor D, Hohmann J. Quality Control of Maca-Containing (*Lepidium meyenii* Walp) Dietary Supplements. *Acta Aliment.* **2015**; *44*: 461-467.
86. Shin B-C, Lee MS, Yang EJ, Lim H-S, Ernst E. Maca (*L. meyenii*) for improving sexual function: a systematic review. *BMC Complement Altern Med.* **2010**; *10*: 44.
87. Shemluck M. Medicinal and other uses of Compositae. *J Ethnopharmacol.* **1982**; *5*: 303-358.
88. Bohlmann F, Gerke T, Ahmed M, King RM, Robinson H. Polyacetylenverbindungen, 269 Neue Isobutylamide aus *Heliopsis*-Arten. *Liebigs Ann der Chemie.* **1983**; *7*: 1202-1206.
89. Jacobson M. Constituents of *Heliopsis* Species. I. Scabrin, an Insecticidal Amide from the Roots of *H. scabra* Dunal. *J Am Chem Soc.* **1951**; *73*: 100-103.
90. Jacobson M. Constituents of *Heliopsis* Species. V. Heliopsin, a Second Insecticidal Amide from the Roots of *H. helianthoides* var. *scabra*. *J Am Chem Soc.* **1957**; *79*: 356-358.
91. Papp B, Erzberger P, Ódor P, Hock ZS, Szövényi P, Szurdoki E. TZ. Updated Checklist And Red List Of Hungarian Bryophytes – 2010 Regional Red List. *Stud Bot Hungarica.* **2010**; *41*: 31-59.
92. Asakawa Y. Liverworts-Potential Source of Medicinal Compounds. *Med Aromat Plants.* **2012**; *1*: 1-3.
93. Goffinet B, Shaw AJ (Arthur J. *Bryophyte Biology*. Cambridge University Press; 2009.
94. Asakawa Y, Ludwiczuk A, Nagashima F. Phytochemical and biological studies of bryophytes. *Phytochemistry.* **2013**; *91*: 52-80.
95. Glime JM. Bryophyte Ecology. Volume 5: Uses. *Michigan Technol Univ Int Assoc Bryol.* **2007**; *15*: 2011.
96. Wu PC. Some uses of mosses in China. *Bryol Times.* **1982**; *13*: 5.

97. Turner RG. Peat and people: a review. *Adv Bryol.* **1993**; 5: 315-328.
98. Pant G, Tewari SD. Various human uses of bryophytes in the Kumaun region of Northwest Himalaya. *Bryologist*. Published online 1989: 120-122.
99. Flowers S. Ethnobotany of the gosiute Indians of Utah. *Bryologist.* **1957**; 60: 11-14.
100. Hart JA. The ethnobotany of the northern Cheyenne Indians of Montana. *J Ethnopharmacol.* **1981**; 4: 1-55.
101. Madsen GC, Pates AL. Occurrence of antimicrobial substances in chlorophyllose plants growing in Florida. *Bot Gaz.* **1952**; 113: 293-300.
102. McCleary JA, Sypherd PS, Walkington DL. Mosses as Possible Sources of Antibiotics. *Science.* **1960**; 131: 108.
103. Suba J. A mohák antibiotikus anyagainak kimutatása. *Acta Acad Paedagog Agriensis.* **1967**; 5: 427-443.
104. McCleary JA, Walkington DL. Mosses and Antibiosis. **1966**; 34: 309-314.
105. Kim S-J, Park H-R, Park E, Lee S-C. Cytotoxic and Antitumor Activity of Momilactone B from Rice Hulls. *J Agric Food Chem.* **2007**; 55: 1702-1706.
106. Baek S-H, Phipps RK, Perry NB. Antimicrobial Chlorinated Bibenzyls from the Liverwort *Riccardia marginata*. *J Nat Prod.* **2004**; 67: 718-720.
107. Figueiredo AC, Sim-Sim M, Barroso JG, et al. Composition of the Essential Oil From the Liverwort *Marchesinia mackaii* (Hook.) S. F. Gray Grown in Portugal. *J Essent Oil Res.* **2002**; 14: 439-442.
108. Asakawa Y, Ludwiczuk A, Nagashima F, et al. Bryophytes: Bio- and Chemical Diversity, Bioactivity and Chemosystematics. *Heterocycles.* **2009**; 77: 99.
109. Shu Y-F, Wei H-C, Wu C-L. Sesquiterpenoids from liverworts *Lepidozia vitrea* and *L. Fauriana*. *Phytochemistry.* **1994**; 37: 773-776.
110. Asakawa Y. Bryophyte Development: Physiology and Biochemistry. In: Chopra RN, Bhatla SC, eds. CRC Press; **1990**: 259-287.
111. Scher JM, Burgess EJ, Lorimer SD, Perry NB. A cytotoxic sesquiterpene and unprecedented sesquiterpene-bisbibenzyl compounds from the liverwort *Schistochila glaucescens*. *Tetrahedron.* **2002**; 58: 7875-7882.
112. Dey A, Mukherjee A. Therapeutic potential of bryophytes and derived compounds against cancer. *J Acute Dis.* **2015**; 4: 236-248.
113. Toyota M, Tanimura K, Asakawa Y. Cytotoxic 2,3-Secoaromadendrane-Type Sesquiterpenoids from the Liverwort *Plagiochila ovalifolia*. *Planta Med.* **1998**; 64: 462-464.
114. Kim Y, da S. Bolzani V, Baj N, Gunatilaka A, Kingston D. A DNA-Damaging Sesquiterpene and Other Constituents from *Frullania nissquallensis*. *Planta Med.* **1996**; 62: 61-63.
115. Lorimer SD, Perry NB, Burgess EJ, Foster LM. 1-Hydroxyditerpenes from Two New Zealand Liverworts, *Paraschistochila pinnatifolia* and *Trichocolea mollissima*. *J. Nat. Prod.* **1997**; 60, 421-424.
116. Perry NB, Burgess EJ, Tangney RS. Cytotoxic 8,9-secokaurane diterpenes from a New Zealand liverwort, *Lepidolaena taylorii*. *Tetrahedron Lett.* **1996**; 37: 9387-9390.
117. Neves M, Morais R, Gafner S, Hostettmann K. Three triterpenoids and one flavonoid from the liverwort *Asterella blumeana* grown in vitro. *Phyther Res.* **1998**; 12: S21-S24.
118. Huang W-J, Wu C-L, Lin C-W, et al. Marchantin A, a cyclic bis(bibenzyl ether), isolated from the liverwort *Marchantia emarginata* subsp. *tosana* induces apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Lett.* **2010**; 291: 108-119.
119. Shi Y, Qu X, Liao Y, et al. Reversal effect of a macrocyclic bisbibenzyl plagiochin E on multidrug resistance in adriamycin-resistant K562/A02 cells. *Eur J Pharmacol.* **2008**; 584: 66-71.
120. Nagashima F, Kondoh M, Uematsu T, et al. Cytotoxic and apoptosis-inducing ent-kaurane-type diterpenoids from the Japanese liverwort *Jungermannia truncata* Nees. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* **2002**; 50: 808-813.
121. Nagashima F, Kondoh M, Kawase M, et al. Apoptosis-Inducing Properties of ent-Kaurene-Type Diterpenoids from the Liverwort *Jungermannia truncata*. *Planta Med.* **2003**; 69: 377-379.
122. Kondoh M, Nagashima F, Suzuki I, et al. Induction of Apoptosis by New ent-Kaurene-Type Diterpenoids Isolated from the New Zealand Liverwort *Jungermannia* Species. *Planta Med.* **2005**; 71: 1005-1009.
123. Shi Y, Zhu C, Yuan H, et al. Marchantin C, a novel microtubule inhibitor from liverwort with anti-tumor activity both *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Lett.* **2009**; 276: 160-170.
124. Shi Y-Q, Liao Y-X, Qu X-J, et al. Marchantin C, a macrocyclic bisbibenzyl, induces apoptosis of human glioma A172 cells. *Cancer Lett.* **2008**; 262: 173-182.
125. Stewart BW, Wild CP. *World Cancer Report*, World Health Organization, Geneva, **2014**.
126. G. Grothaus P, M. Cragg G, J. Newman D. Plant Natural Products in Anticancer Drug Discovery. *Curr Org Chem.* **2010**; 14: 1781-1791.
127. Maeda-Yamamoto M, Tachibana H, Sameshima Y, Kuriyama S. *Tea in Health and Disease Prevention*. Elsevier, **2013**.
128. Manning JC. *Field Guide to Fynbos*. Struik; 2007.
129. Watt JM, Breyer-Brandwijk MG. *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa Being an Account of Their Medicinal and Other Uses, Chemical Composition, Pharmacological Effects and Toxicology in Man and Animal*. E. & S. Livingstone Ltd., **1962**.
130. Joubert E, Gelderblom WCA, Louw A, de Beer D. South African herbal teas: *Aspalathus linearis*, *Cyclopia* spp. and *Athrixia phylicoides*—A review. *J Ethnopharmacol.* **2008**; 119: 376-412.
131. Sprent JJ, Odee DW, Dakora FD. African legumes: a vital but under-utilized resource. *J Exp Bot.* **2010**; 61:

- 1257-1265.
132. Kamara BI, Brandt DJ, Brandt EV, Joubert E. Phenolic Metabolites from Honeybush Tea (*Cyclopia subternata*). *J Agric Food Chem*. **2004**; 52: 5391-5395.
 133. Joubert E, Joubert ME, Bester C, De Beer D, De Lange JH. Honeybush (*Cyclopia* spp.): From local cottage industry to global markets — The catalytic and supporting role of research. *South African J Bot*. **2011**; 77: 887-907.
 134. Ferreira D, Kamara BI, Brandt EV, Joubert E. Phenolic Compounds from *Cyclopia intermedia* (Honeybush Tea). *J Agric Food Chem*. **1998**; 46: 3406-3410.
 135. Kokotkiewicz A, Luczkiewicz M, Pawlowska J, et al. Isolation of xanthone and benzophenone derivatives from *Cyclopia genistoides* (L.) Vent. (honeybush) and their pro-apoptotic activity on synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Fitoterapia*. **2013**; 90: 199-208.
 136. Beelders T, Brand DJ, de Beer D, et al. Benzophenone C- and O-glucosides from *Cyclopia genistoides* (Honeybush) Inhibit Mammalian α -Glucosidase. *J Nat Prod*. **2014**; 77: 2694-2699.
 137. Beelders T, de Beer D, Stander M, et al. Comprehensive Phenolic Profiling of *Cyclopia genistoides* (L.) Vent. by LC-DAD-MS and -MS/MS Reveals Novel Xanthone and Benzophenone Constituents. *Molecules*. **2014**; 19: 11760-11790.
 138. McKay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity of south African herbal teas: rooibos (*Aspalathus linearis*) and honeybush (*Cyclopia intermedia*). *Phyther Res*. **2007**; 21: 1-16.
 139. Joubert E, Richards ES, Merwe JD Van der, De Beer D, Manley M, Gelderblom W c. a. Effect of Species Variation and Processing on Phenolic Composition and In Vitro Antioxidant Activity of Aqueous Extracts of *Cyclopia* spp. (Honeybush Tea). *J Agric Food Chem*. **2008**; 56: 954-963.
 140. van der Merwe JD, Joubert E, Richards ES, et al. A comparative study on the antimutagenic properties of aqueous extracts of *Aspalathus linearis* (rooibos), different *Cyclopia* spp. (honeybush) and *Camellia sinensis* teas. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. **2006**; 611: 42-53.
 141. Morito K, Hirose T, Kinjo J, et al. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol Pharm Bull*. **2001**; 24: 351-356.
 142. Tham DM, Gardner CD, Haskell WL. Potential Health Benefits of Dietary Phytoestrogens: A Review of the Clinical, Epidemiological, and Mechanistic Evidence. *J Clin Endocrinol Metab*. **1998**; 83: 2223-2235.
 143. Verhoog NJD, Joubert E, Louw A. Screening of four *Cyclopia* (honeybush) species for putative phyto-oestrogenic activity by oestrogen receptor binding assays. *S Afr J Sci*. **2007**; 103: 13-21.
 144. Verhoog NJD, Joubert E, Louw A. Evaluation of the phytoestrogenic activity of *Cyclopia genistoides* (honeybush) methanol extracts and relevant polyphenols. *J Agric Food Chem*. **2007**; 55: 4371-4381.
 145. Mfenyana C, DeBeer D, Joubert E, Louw A. Selective extraction of *Cyclopia* for enhanced in vitro phytoestrogenicity and benchmarking against commercial phytoestrogen extracts. *J Steroid Biochem Mol Biol*. **2008**; 112: 74-86.
 146. Visser K, Mortimer M, Louw A. *Cyclopia* extracts act as ER α antagonists and ER β agonists, *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One*. **2013**; 8: e79223.
 147. Brown RP, Gerbarg PL, Ramazanov Z. *Rhodiola rosea* - A phytomedicinal overview. *HerbalGram*. **2002**; 56: 40-52.
 148. Tao H, Wu X, Cao J, et al. *Rhodiola* species: A comprehensive review of traditional use, phytochemistry, pharmacology, toxicity, and clinical study. *Med Res Rev*. **2019**; 39: 1779-1850.
 149. Cifani C, Micioni Di B. MV, Vitale G, Ruggieri V, Ciccocioppo R, Massi M. Effect of salidroside, active principle of *Rhodiola rosea* extract, on binge eating. *Physiol Behav*. **2010**; 101: 555-562.
 150. Cayer C, Ahmed F, Filion V, et al. Characterization of the anxiolytic activity of Nunavik *Rhodiola rosea*. *Planta Med*. **2013**; 79: 1385-1391.
 151. Lee F-T, Kuo T-Y, Liou S-Y, Chien C-T. Chronic *Rhodiola rosea* extract supplementation enforces exhaustive swimming tolerance. *Am J Chin Med*. **2009**; 37: 557-572.
 152. Abidov M, Crendal F, Grachev S, Seifulla R, Ziegenfuss T. Effect of extracts from *Rhodiola rosea* and *Rhodiola crenulata* (Crassulaceae) roots on ATP content in mitochondria of skeletal muscles. *Bull Exp Biol Med*. **2003**; 136: 585-587.
 153. Aslanyan G, Amroyan E, Gabrielyan E, Nylander M, Wikman G, Panossian A. Double-blind, placebo-controlled, randomised study of single dose effects of ADAPT-232 on cognitive functions. *Phytomedicine*. **2010**; 17: 494-499.
 154. Olsson E, von Schéele B, Panossian A. A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel-Group Study of the Standardised Extract SHR-5 of the Roots of *Rhodiola rosea* in the Treatment of Subjects with Stress-Related Fatigue. *Planta Med*. **2009**; 75: 105-112.
 155. van Diermen D, Marston A, Bravo J, Reist M, Carrupt P-A, Hostettmann K. Monoamine oxidase inhibition by *Rhodiola rosea* L. roots. *J Ethnopharmacol*. **2009**; 122: 397-401.
 156. Chen L, Yu B, Zhang Y, et al. Bioactivity-Guided Fractionation of an Antidiarrheal Chinese Herb *Rhodiola kirilowii* (Regel) Maxim Reveals (-) – Epicatechin-3- Gallate and (-) – Epigallocatechin-3-Gallate as Inhibitors of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *PLoS One*. **2015**; 10: 1-12.
 157. Zhou J-T, Li C-Y, Wang C-H, et al. Phenolic compounds from the roots of *Rhodiola crenulata* and their antioxidant and inducing IFN- γ production activities. *Molecules*. **2015**; 20: 13725-13739.

158. The United States Pharmacopeial Convention. *Rhodiola rosea* Root and Rhizome Powder. In: *USP Herbal Medicines Compendium*, **2015**.
159. Kurkin VA, Zapesochneya GG, Kljaznika G. Flavonoids of *Rhodiola rosea* 1. Tricin glucosides. *Khimiya Prir Soedin*. **1982**: 581-584.
160. Zapesochneya GG, Kurkin VA. Flavonoids of *Rhodiola rosea* rhizomes 2. Flavonolignan and herbacetin glycosides. *Khimiya Prir Soedin*. **1983**: 23-32.
161. Kurkin VA, Zapesochneya GG, Shchavilinsky AN. Flavonoids from the epigeal parts of *Rhodiola rosea* 1. *Khimiya Prir Soedin*. **1984**: 657-658.
162. Kurkin VA, Zapesochneya GG, Shchavilinsky AN. Flavonoids of *Rhodiola rosea* rhizomes 3. *Khimiya Prir Soedin*. **1984**: 390.
163. Zapesochneya GG, Kurkin VA, Shchavilinsky AN. Flavonoids from the aerial parts of *Rhodiola rosea* 2. Structure of the new glycosides of herbacetin and gossipetin. *Khimiya Prir Soedin*. **1985**: 496-507.
164. Wollenweber E, Dorr M, Beyer M, Roitman JN, Puttock CF. Rare flavonoids from *Oxidia* and *Ozothamnus* spp. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C Biosci*. **1997**; 52: 571-576.
165. El-Sayed NH, Awaad AS, Hifnawy MS, Mabry TJ. A flavonol triglycoside from *Chenopodium murale*. *Phytochemistry*. **1999**; 51: 591-593.
166. Stevens JF, Wollenweber E, Ivancic M, Hsu VL, Sundberg S, Deinzer ML. Leaf surface flavonoids of *Chrysanthamnus*. *Phytochemistry*. **1999**; 51: 771-780.
167. Fliniaux O, Corbin C, Ramsay A, et al. Microwave-Assisted Extraction of Herbacetin Diglycoside from Flax (*Linum usitatissimum* L.) Seed Cakes and Its Quantification using an RP-HPLC-UV System. *Molecules*. **2014**; 19: 3025-3037.
168. Wei X, Li G-H, Wang X-L, et al. Chemical constituents from the leaves of *Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn. (Lauraceae). *Biochem Syst Ecol*. **2017**; 70: 95-98.
169. Ye L, Chan FL, Chen S, Leung LK. The citrus flavonone hesperetin inhibits growth of aromatase-expressing MCF-7 tumor in ovariectomized athymic mice. *J Nutr Biochem*. **2012**; 23: 1230-1237.
170. Teuscher E. *Camellia*. In: Hänsel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G, eds. *Hagers Handbuch Drogen A-D*. Springer Verlag.
171. Juneja L. L-theanine—a unique amino acid of green tea and its relaxation effect in humans. *Trends Food Sci Technol*. **1999**; 10: 199-204.
172. Cooper R, Morre DJ, Morre DM. Medicinal benefits of green tea: Part I. Review of noncancer health benefits. *J Altern Complement Med*. **2005**; 11: 521-528.
173. Vuong Q V, Bowyer MC, Roach PD. L-Theanine: properties, synthesis and isolation from tea. *J Sci Food Agric*. **2011**; 91: 1931-1939.
174. Keenan EK, Finnie MDA, Jones PS, Rogers PJ, Priestley CM. How much theanine in a cup of tea? Effects of tea type and method of preparation. *Food Chem*. **2011**; 125: 588-594.
175. Friedman M, Levin CE, Choi S-H, Lee S-U, Kozukue N. Changes in the composition of raw tea leaves from the Korean Yabukida plant during high-temperature processing to pan-fried Kamairi-cha green tea. *J Food Sci*. **2009**; 74: C406-12.
176. Peng L, Song X, Shi X, Li J, Ye C. An improved HPLC method for simultaneous determination of phenolic compounds, purine alkaloids and theanine in *Camellia* species. *J Food Compos Anal*. **2008**; 21: 559-563.
177. Wang Y, Yang X, Li K, et al. Simultaneous determination of theanine, gallic acid, purine alkaloids, catechins, and theaflavins in black tea using HPLC. *Int J Food Sci Technol*. **2010**; 45: 1263-1269.
178. Syu K-Y, Lin C-L, Huang H-C, Lin J-K. Determination of Theanine, GABA, and Other Amino Acids in Green, Oolong, Black, and Pu-erh Teas with Dabsylation and High-Performance Liquid Chromatography. *J Agric Food Chem*. **2008**; 56: 7637-7643.
179. Wang L, Xu R, Hu B, et al. Analysis of free amino acids in Chinese teas and flower of tea plant by high performance liquid chromatography combined with solid-phase extraction. *Food Chem*. **2010**; 123: 1259-1266.
180. Peñalvo JL, Nurmi T, Adlercreutz H. A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products. *Food Chem*. **2004**; 87: 297-305.
181. Mason P. Isoflavones. *Pharm J*. **2001**; 266: 16-19.
182. Hwang CS, Kwak HS, Lim HJ, et al. Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: they can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. *J Steroid Biochem Mol Biol*. **2006**; 101: 246-253.
183. Siow RCM, Mann GE. Dietary isoflavones and vascular protection: Activation of cellular antioxidant defenses by SERMs or hormesis? *Mol Aspects Med*. **2010**; 31: 468-477.
184. Wuttke W, Jarry H, Seidlová-Wuttke D. Isoflavones—Safe food additives or dangerous drugs? *Ageing Res Rev*. **2007**; 6: 150-188.
185. Nagata C. Factors to consider in the association between soy isoflavone intake and breast cancer risk. *J Epidemiol*. **2010**; 20: 83-89.
186. Chiang W-D, Shih C-J, Chu Y-H. Optimization of acid hydrolysis conditions for total isoflavones analysis in soybean hypocotyls by using RSM. *Food Chem*. **2001**; 72: 499-503.
187. Griffith AP, Collison MW. Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-

- containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*. **2001**; 913: 397-413.
188. Rostagno MA, Villares A, Guillaumon E, Garcia-Lafuente A, Martinez JA. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *J Chromatogr*. **2009**; 1216: 2-29.
 189. Bradley P. British Herbal Compendium. British Herbal Medicine Association, **1992**: 191-193.
 190. Augustin B, Javorka S, Giovannini R RP. Magyar gyógynövények. Földművelésügyi Minisztérium, **1948**: 299-300.
 191. Hiller K MM. *Lexikon Der Arzneipflanzen Und Drogen*. Heidelberg. Spektrum Akademischer Verlag GmbH; 1999.
 192. *European Pharmacopoeia*. 6th ed. Council of Europe; **2008**.
 193. *Assessment Report on Chamaemelum Nobile (L.) All., Flos*. European Medicines Agency, London, 2011.
 194. Schrader A, Eckey H RM. Examination of the activity of irradiation-lowering substances on the human skin exemplified with various chamomile extracts. *SOFW J*. **1997**; 123: 3-11.
 195. Wilkinson S, Aldridge J, Salmon I, Cain E, Wilson B. An evaluation of aromatherapy massage in palliative care. *Palliat Med*. **1999**; 13: 409-417.
 196. Wichtl M. *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*. 2nd Edition. (Bisset NG, ed.). CRC Press, **1994**.
 197. Lukács M. The phytochemical investigation of *Anthemis nobilis* L. Szegedi Orvostudományi Egyetem, Szeged, 1990.
 198. Herisset A, Paris RR CJ. Flavonoids of Roman camomile (*Anthemis nobilis*). *Plant Med Phytoter*. **1971**; 5: 234-239.
 199. Pietta P, Mauri P, Bruno A, Rava A, Manera E, Ceva P. Identification of flavonoids from Ginkgo biloba L., Anthemis nobilis L. and Equisetum arvense L. by high-performance liquid chromatography with diode-array UV detection. *J Chromatogr A*. **1991**; 553: 223-231.
 200. Lemmens-Gruber R, Marchart E, Rawnduzi P, Engel N, Benedekl B, Kopp B. Investigation of the spasmolytic activity of the flavonoid fraction of *Achillea millefolium* s.l. on isolated guinea-pig ilea. *Drug Res*. **2006**; 56: 582-588.
 201. Simon T. *A magyarországi edényes flóra határozója: Harasztok-virágos növények*. Nemzeti Tankönyvkiadó Rt, **1994**.
 202. Csedő K. *Hargita megye gyógy- és fűszernövényei*. Magánkiadás, **1980**.
 203. Szabó A, Péntek J. *Ezerjófű - Etnobotanikai útmutató*. Kriterion Könyvkiadó, **1976**.
 204. Hegnauer R. *Chemotaxonomie Der Pflanzen*. III. Birkhäuser-Verlag, **1964**.
 205. Garbacki N, Gloaguen V, Damas J, Bodart P, Tits M, Angenot L. Anti-inflammatory and immunological effects of Centaurea cyanus flower- heads. *J Ethnopharmacol*. **1999**; 68: 235-241.
 206. Karamenderes C, Konyalioglu S, Khan S, Khan IA. Total phenolic contents, free radical scavenging activities and inhibitory effects on the activation of NF-kappa B of eight Centaurea L. species. *Phyther Res*. **2007**; 21: 488-491.
 207. Negrete RE, Backhouse N, Cajigal I, et al. Two new antiinflammatory elemanolides from *Centaurea chilensis*. *J Ethnopharmacol*. **1993**; 40: 149-153.
 208. Redl K, Breu W, Davis B, Bauer R. Anti-inflammatory active polyacetylenes from *Bidens campylotheca*. *Planta Med*. **1994**; 60: 58-62.
 209. Ramadan M, Goeters S, Watzer B, et al. Chamazulene carboxylic acid and matricin: a natural profen and its natural prodrug, identified through similarity to synthetic drug substances. *J Nat Prod*. **2006**; 69: 1041-1045.
 210. Russmann S, Lauterburg BH, Helbling A. Kava hepatotoxicity. *Ann Intern Med*. **2001**; 135: 68-69.
 211. Larrey D, Vial T, Pauwels A, et al. Hepatitis after germander (Teucrium chamaedrys) administration: another instance of herbal medicine hepatotoxicity. *Ann Intern Med*. **1992**; 117: 129-132.
 212. Foote J, Cohen B. Medicinal herb use and the renal patient. *J Ren Nutr*. **1998**; 8: 40-42.
 213. Abbott PJ. Comfrey: assessing the low-dose health risk. *Med J Aust*. **1988**; 149: 678-682.
 214. Dahms H-U, Hagiwara A, Lee J-S. Ecotoxicology, ecophysiology, and mechanistic studies with rotifers. *Aquat Toxicol*. **2011**; 101: 1-12.
 215. Oláh Z, Bush AI, Aleksza D, GalikB, Ivitz EV, Mácsai L, Janka Z, Kármán Z, Kálmán J, Datki Zs. Novel *in vivo* experimental viability assays with high sensitivity and throughput capacity using a bdelloid rotifer. *Ecotoxicol Environ Saf*. **2017**; 144: 115-122.
 216. Murray R, Méndez J, Brown S. The natural coumarins. John Wiley & Sons, **1982**.
 217. Peroutka R, Schulzová V, Botek P, Hajšlová J. Analysis of furanocoumarins in vegetables (Apiaceae) and citrus fruits (Rutaceae). *J Sci Food Agric*. **2007**; 87: 2152-2163.
 218. HMPC. *Reflection Paper on Risk Associated with the Use of Herbs Containing Angelica Archangelica*. European Medicines Agency, 2006.
 219. Wu S, Han J, Feskanich D, Cho E, Stampfer MJ, Willett WC, Qureshi AA. Citrus consumption and risk of cutaneous malignant melanoma. *J. Clin. Oncol*. **2015**; 33: 2500-2508.
 220. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. *Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42.*; **1987**.
 221. Kwon YS, Choi WG, Kim WJ, et al. Antimicrobial constituents of foeniculum vulgare. *Arch Pharm Res*. **2002**; 25: 154-157.

222. Lee JH, Lee DU, Kim YS, Kim HP. 5-Lipoxygenase inhibition of the fructus of *Foeniculum vulgare* and its constituents. *Biomol Ther.* **2012**; 20: 113-117.
223. Subehan, Zaidi SFH, Kadota S, Tezuka Y. Inhibition on human liver cytochrome P450 3A4 by constituents of fennel (*Foeniculum vulgare*): Identification and characterization of a mechanism-based inactivator. *J Agric Food Chem.* **2007**; 55: 10162-10167.
224. Aynehchi Y. *Materia Medica and Iranian Medicinal Plants*. Tehran University Publications, **1991**.
225. Mozaffarian V. *A Dictionary of Iranian Plant Names*. Farhang Moaser, **1996**.
226. Ghahreman A. *Flore de l'Iran*. University of Teheran, **1993**.
227. Shalaby NMM, Abd-Alla HI, Aly HF, Albalawy MA, Shaker KH, Bouajila J. Preliminary *in vitro* and *in vivo* evaluation of antidiabetic activity of *Ducrosia anethifolia* boiss. and its linear furanocoumarins. *Biomed Res Int.* **2014**; 480545.
228. Amiri MS, Joharchi MR. Ethnobotanical knowledge of Apiaceae family in Iran : A review. *Avicenna J Phytomedicine.* **2016**; 6: 621-635.
229. Haghi G, Safaei A, Safari J. Extraction and determination of the main components of the essential oil of *Ducrosia anethifolia* by GC and GC/MS. *Iran J Pharm Res.* **2004**; 3: 90-99.
230. Stavri M, Mathew KT, Bucar F, Gibbons S. Pangelin, an antimycobacterial coumarin from *Ducrosia anethifolia*. *Planta Med.* **2003**; 69: 956-959.
231. Queslati MH, Bouajila J, Belkacem MA, Harrath AH, Alwasel SH, Ben Jannet H. Cytotoxicity of new secondary metabolites, fatty acids and tocopherols composition of seeds of *Ducrosia anethifolia* (DC.) Boiss. *Nat Prod Res.* **2017**; 6419: 1-7.
232. Shokri H, Hekmatpou D, Ebrahimi Fakhar HR, Nyazi A, Azadi M, Taghizadeh M. Effect of *Ducrosia anethifolia* (Barilax) on anxiety after acute myocardial infarction. *Arak Med Univ J.* **2013**; 16: 28-34.
233. Zamyad M, Abasnejad M, Esmaeili-Mahani S, Mostafavi A. Alpha-pinene as the main component of *Ducrosia anethifolia* (Boiss) essential oil is responsible for its effect on locomotor activity in rats. *Avicenna J Neuro Psych Physiol.* **2016**; 3: :e38787.
234. Hajhashemi V, Rabbani M, Ghanadi A, Davari E. Evaluation of antianxiety and sedative effects of essential oil of *Ducrosia anethifolia* in mice. *Clinics (Sao Paulo).* **2010**; 65: 1037-1042.
235. Asgari Nematian M, Yaghmaei P, Mohammadi S. Assessment of the antinociceptive, antiinflammatory and acute toxicity effects of *Ducrosia anethifolia* essential oil in mice. *Sci J Kurdistan Univ Med Sci.* **2017**; 74-84.
236. Luo KW, Sun JG, Chan JYW, et al. Anticancer effects of imperatorin isolated from *Angelica dahurica*: Induction of apoptosis in HepG2 cells through both death-receptor- and mitochondria-mediated pathways. *Chemotherapy.* **2011**; 57: 449-459.
237. Bartnik M, Sławińska-Brych A, Żurek A, Kandefer-Szerszeń M, Zdzińska B. 8-methoxypsoralen reduces AKT phosphorylation, induces intrinsic and extrinsic apoptotic pathways, and suppresses cell growth of SK-N-AS neuroblastoma and SW620 metastatic colon cancer cells. *J Ethnopharmacol.* **2017**; 207: 19-29.
238. Kim Y-K, Kim YS, Ryu SY. Antiproliferative effect of furanocoumarins from the root of *Angelica dahurica* on cultured human tumor cell lines. *Phyther Res.* **2007**; 21: 288-290.
239. Appendino G, Bianchi F, Bader A, et al. Coumarins from *Opopanax chironium*. New dihydrofuranocoumarins and differential induction of apoptosis by imperatorin and heracleenin. *J Nat Prod.* **2004**; 67: 532-536.
240. Czonkowska A, Litwin T, Dusek P, et al. Wilson disease. *Nat Rev Dis Prim.* **2018**; 4: 21.
241. Loguercio C, Festi D. Silybin and the liver: from basic research to clinical practice. *World J Gastroenterol.* **2011**; 17: 2288-2301.
242. Saller R, Brignoli R, Melzer J, Meier R. An updated systematic review with meta-analysis for the clinical evidence of silymarin. *Forschende Komplementärmedizin (2006).* **2008**; 15: 9-20.
243. Lovkova MY, Buzuk GN. Medicinal plants: Concentrators and superconcentrators of copper and its role in metabolism of these species. *Appl Biochem Microbiol.* **2011**; 47: 189-195.
244. Moreira R, Pereira D, Valentão P, Andrade P. Pyrrolizidine Alkaloids: Chemistry, Pharmacology, Toxicology and Food Safety. *Int J Mol Sci.* **2018**; 19: 1668.
245. Mattocks AR. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Nature.* **1968**; 217: 723-728.
246. Prakash AS, Pereira TN, Reilly PE, Seawright AA. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutat Res.* **1999**; 443: 53-67.
247. Lin G, Wang JY, Li N, et al. Hepatic sinusoidal obstruction syndrome associated with consumption of *Gynura segetum*. *J Hepatol.* **2011**; 54: 666-673.
248. Xia Q, Chou MW, Kadlubar FF, Chan P-C, Fu PP. Human Liver Microsomal Metabolism and DNA Adduct Formation of the Tumorigenic Pyrrolizidine Alkaloid, Riddelliine. *Chem Res Toxicol.* **2003**; 16: 66-73.
249. Stegelmeier BL, Edgar JA, Colegate SM, et al. Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity. *J Nat Toxins.* **1999**; 8: 95-116.
250. Coulombe Jr RA. Pyrrolizidine alkaloids in foods. *Adv Food Nutr Res.* **2003**; 45: 61-99.
251. *Bekanntmachung Über Die Zulassung Und Registrierung von Arzneimitteln Vom 05. Juni 1992 Abwehr von Arzneimitteln - Stufe II, Hier: Arzneimittel, Die Pyrrolizidin-Alkaloide Mit Einem 1,2-Ungesättigtem Necin-Gerüst Enthalten*. Vol 111. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, **1992**.
252. Brauchli J, Lüthy J, Zweifel U, Schlatter C. Pyrrolizidine alkaloids from *Symphytum officinale* L. and their percutaneous absorption in rats. *Experientia.* **1982**; 38: 1085-1087.

253. *Public Statement on the Use of Herbal Medicinal Products Containing Toxic, Unsaturated Pyrrolizidine Alkaloids (PAs)*. European Medicines Agency, **2014**. h
254. van Heerden FR. *Hoodia gordonii*: A natural appetite suppressant. *J Ethnopharmacol*. **2008**; *119*: 434-437.
255. MacLean DB, Luo L-G. Increased ATP content/production in the hypothalamus may be a signal for energy-sensing of satiety: studies of the anorectic mechanism of a plant steroidal glycoside. *Brain Res*. **2004**; *1020*: 1-11.
256. Madgula VLM, Ashfaq MK, Wang YH, et al. Bioavailability, pharmacokinetics, and tissue distribution of the oxypregnane steroidal glycoside P57AS3 (P57) from *Hoodia gordonii* in mouse model. *Planta Med*. **2010**; *76*: 1582-1586.
257. Le Nevé B, Foltz M, Daniel H, Gouka R. The steroid glycoside H.g.-12 from *Hoodia gordonii* activates the human bitter receptor TAS2R14 and induces CCK release from HuTu-80 cells. *Am J Physiol Liver Physiol*. **2010**; *299*: G1368-G1375.
258. Shukla YJ, Pawar RS, Ding Y, Li X-C, Ferreira D, Khan IA. Pregnane glycosides from *Hoodia gordonii*. *Phytochemistry*. **2009**; *70*: 675-683.
259. Dall'Acqua S, Innocenti G. Steroidal glycosides from *Hoodia gordonii*. *Steroids*. **2007**; *72*: 559-568.
260. Pawar RS, Shukla YJ, Khan SI, Avula B, Khan IA. New oxypregnane glycosides from appetite suppressant herbal supplement *Hoodia gordonii*. *Steroids*. **2007**; *72*: 524-534.
261. Pawar RS, Shukla YJ, Khan IA. New calogenin glycosides from *Hoodia gordonii*. *Steroids*. **2007**; *72*: 881-891.
262. Mohlapo TD, Ng'ambi JW, Norris D, Malatje MM. Effect of *Hoodia gordonii* meal supplementation at finisher stage on productivity and carcass characteristics of Ross 308 broiler chickens. *Trop Anim Health Prod*. **2009**; *41*: 1591-1596.
263. van Heerden FR, Marthinus Horak R, Maharaj VJ, Vleggaar R, Senabe J V., Gunning PJ. An appetite suppressant from *Hoodia* species. *Phytochemistry*. **2007**; *68*: 2545-2553.
264. Peters HPF, Koppenol W, Schuring EAH, Gouka R, Mela DJ, Blom WAM. The effect of two weeks ingestion of a bitter tastant mixture on energy intake in overweight females. *Appetite*. **2016**; *107*: 268-273.
265. Blom WA, Abrahamse SL, Bradford R, et al. Effects of 15-d repeated consumption of *Hoodia gordonii* purified extract on safety, ad libitum energy intake, and body weight in healthy, overweight women: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. **2011**; *94*: 1171-1181.
266. Heyl FW. Analysis of ragweed pollen. *J Am Chem Soc*. **1917**; *39*: 1470-1476.
267. King TP, Norman PS, Conell JT. Isolation and characterization of allergens from ragweed pollen II. *Biochemistry*. **1964**; *3*: 458-468.
268. Ognjenovic J, Milcic-Matic N, Smiljanic K, et al. Immunoproteomic characterization of *Ambrosia artemisiifolia* pollen allergens in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol*. **2013**; *155*: 38-47.
269. Szigetvári C, Benkő ZR. Örömlevelű parlágfű (*Ambrosia artemisiifolia* L.). In: Mihály B, Botta-Dukát Z, eds. *Özönnövények – Biológiai Inváziók Magyarországon*. TermészetBÜVÁR Alapítvány Kiadó, **2004**.
270. Cunze S, Leiblein MC, Tackenberg O. Range Expansion of *Ambrosia artemisiifolia* in Europe Is Promoted by Climate Change. *ISRN Ecol*. **2013**; *2013*: 1-9.
271. Foster S, Duke JA. *A Field Guide to Medicinal Plants and Herbs of Eastern and Central North America*. 2nd ed. Houghton Mifflin Company; 2000.
272. FDA approves Ragwitek for short ragweed pollen allergies. Food and Drug Administration Announcement, **2014**.
273. Aponte J, Yang H, Vaisberg A, et al. Cytotoxic and anti-infective sesquiterpenes present in *Plagiochila disticha* (Plagioclilaceae) and *Ambrosia peruviana* (Asteraceae). *Planta Med*. **2010**; *76*: 705-707.
274. Fraga BM. Natural sesquiterpenoids. *Nat Prod Rep*. **2013**; *30*: 1226.
275. Réthy B, Csupor-Löffler B, Zupkó I, et al. Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part I. *Phytother Res*. **2007**; *21*: 1200-1208.
276. Jansen FH, Adoubi I, J C KC, et al. First study of oral Artenimol-R in advanced cervical cancer: clinical benefit, tolerability and tumor markers. *Anticancer Res*. **2011**; *31*: 4417-4422.
277. Martino R, Beer MF, Elso O, Donadel O, Sülsen V, Anesini C. Sesquiterpene lactones from *Ambrosia* spp. are active against a murine lymphoma cell line by inducing apoptosis and cell cycle arrest. *Toxicol Vitro*. **2015**; *29*: 1529-1536.
278. Dirsch VM, Stuppner H, Vollmar AM. Cytotoxic Sesquiterpene Lactones Mediate their Death-Inducing Effect in Leukemia T Cells by Triggering Apoptosis. *Planta Med*. **2001**; *67*: 557-559.
279. Csupor-Löffler B, Hajdú Z, Zupkó I, et al. Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoids from *Achillea millefolium* s.l. on cultured human tumour cell lines. *Phyther Res*. **2009**; *23*: 672-676.
280. Villagomez R, Collado JA, Muñoz E, Almanza G, Sterner O. Natural and semi-synthetic pseudoguaianolides as inhibitors of NF-κB. *J Biomed Sci Eng*. **2014**; *07*: 833-847.
281. 37/2004. (IV. 26.) ESzCsM rendelet az étrend-kiegészítőkről.
282. Étrend-kiegészítőkből felhasználásra nem javasolt gyógynövények és értékelésük.
https://www.ogyei.gov.hu/etrend_kiegeszitokben_felhasznalasra_nem_javasolt_gyogynovenyek_es_ertekelesuk (letöltve 2020. 06. 08.)
283. US. Dietary Supplement Health and Education Act of 1994.
284. Az Európai Parlament és a Tanács 2002/46/EK irányelve az étrend-kiegészítőkre vonatkozó tagállami

- jogszabályok közelítéséről.
285. Huang WF, Wen KC, Hsiao ML. Adulteration by synthetic therapeutic substances of traditional Chinese medicines in Taiwan. *J Clin Pharmacol*. **1997**; 37: 344-350.
 286. Vaysse J, Balayssac S, Gilard V, Desoubdanne D, Malet-Martino M, Martino R. Analysis of adulterated herbal medicines and dietary supplements marketed for weight loss by DOSY ¹ H-NMR. *Food Addit Contam Part A*. **2010**; 27: 903-916.
 287. Jasiurkowski B, Raj J, Wisinger D, Carlson R, Zou L, Nadir A. Cholestatic Jaundice and IgA Nephropathy Induced by OTC Muscle Building Agent Superdrol. *Am J Gastroenterol*. **2006**; 101: 2659-2662.
 288. Maughan R. Contamination of dietary supplements and positive drug tests in sport. *J Sports Sci*. **2005**; 23: 883-889.
 289. Wang J, Chen B, Yao S. Analysis of six synthetic adulterants in herbal weight-reducing dietary supplements by LC electrospray ionization-MS. *Food Addit Contam Part A*. **2008**; 25: 822-830.
 290. Wiergowski M, Galer-Tatarowicz K, Nowak-Banasik L, et al. [Hazard for human health and life by unintentional use of synthetic sibutramine, which was sold as Chinese herbal product "meizitanc"]. *Przegl Lek*. **2007**; 64: 268-272.
 291. Corns C, Metcalfe K. Risks associated with herbal slimming remedies. *J R Soc Promot Health*. **2002**; 122: 213-219.
 292. Kim SH, Lee J, Yoon T, et al. Simultaneous determination of anti-diabetes/anti-obesity drugs by LC/PDA, and targeted analysis of sibutramine analog in dietary supplements by LC/MS/MS. *Biomed Chromatogr*. **2009**; 23: 1259-1265.
 293. Poon WT, Ng SW, Lai CK, Chan YW, Mak WL. Factitious thyrotoxicosis and herbal dietary supplement for weight reduction. *Clin Toxicol*. **2008**; 46: 290-292.
 294. Wooltorton E. Hua Fo tablets tainted with sildenafil-like compound. *CMAJ*. **2002**; 166: 1568.
 295. Gratz SR, Flurer CL, Wolnik KA. Analysis of undeclared synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors in dietary supplements and herbal matrices by LC-ESI-MS and LC-UV. *J Pharm Biomed Anal*. **2004**; 36: 525-533.
 296. Balayssac S, Trefi S, Gilard V, Malet-Martino M, Martino R, Delsuc M-A. 2D and 3D DOSY H-1 NMR, a useful tool for analysis of complex mixtures: Application to herbal drugs or dietary supplements for erectile dysfunction. *J Pharm Biomed Anal*. **2009**; 50: 602-612.
 297. ATC/DDD Index, Antiobesity Preparations, excl. Diet Products. World Health Organization, **2011**.
 298. Ioannides-Demos LL, Piccenna L, McNeil JJ. Pharmacotherapies for Obesity: Past, Current, and Future Therapies. *J Obes*. **2011**; 2011: 1-18.
 299. Questions and answers on the suspension of medicines containing sibutramine. European Medicines Agency, **2010**.
 300. Chen Y, Zhao L, Lu F, Yu Y, Chai Y, Wu Y. Determination of synthetic drugs used to adulterate botanical dietary supplements using QTRAP LC-MS/MS. *Food Addit Contam Part A*. **2009**; 26: 595-603.
 301. 52/2005. (XI. 18.) EÜM rendelet az emberi alkalmazásra kerülő gyógyszerek forgalomba hozataláról.
 302. Az Európai Parlament és a Tanács Irányelve (2001. november 6.) az emberi felhasználásra szánt gyógyszerek közösségi kódexéről
 303. Kaya GI, Melzig MF. Quantitative determination of cucurbitacin E and cucurbitacin I in homeopathic mother tincture of *Gratiola officinalis* L. by HPLC. *Pharmazie*. **2008**; 63: 851-853.
 304. Szakiel A, Henry M. Analysis of gypsogenin saponins in homeopathic tinctures. *Acta Biochim Pol*. **2007**; 54: 853-856.
 305. Kamarási V, Mogorósy G. Systematic surveys of literature- importance and methodology. *Orv Hetil*. **2015**; 156: 1523-1531.
 306. Birks J, Grimley Evans J. *Ginkgo biloba* for cognitive impairment and dementia. *Cochrane Database Syst Rev*. **2009**; CD003120.
 307. *German Homeopathic Pharmacopoeia*. Medpharm Scientific Publishers, **2005**.
 308. List of Psychotropic Substances under International Control. International Narcotics Control Board, **2010**.
 309. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. **1966**; 45: 493-496.
 310. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. **1983**; 65: 55-63.
 311. Ahn KS, Sethi G, Shishodia S, Sung B, Arbiser JL, Aggarwal BB. Honokiol potentiates apoptosis, suppresses osteoclastogenesis, and inhibits invasion through modulation of nuclear factor- κ B activation pathway. *Mol Cancer Res*. **2006**; 4: 621-633.
 312. Kienast Y, Von Baumgarten L, Fuhrmann M, et al. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med*. **2010**; 16: 116.
 313. Nicolussi S, Viveros-Paredes JM, Gachet MS, et al. Guineensine is a novel inhibitor of endocannabinoid uptake showing cannabimimetic behavioral effects in BALB/c mice. *Pharmacol Res*. **2014**; 80: 52-65.
 314. Polonchuk L. Toward a new gold standard for early safety: Automated temperature-controlled hERG test on the PatchLiner®. *Front Pharmacol*. **2012**; 3: 3.
 315. Hashimoto N, Yamashita T, Tsuruzoe N. Characterization of *in vivo* and *in vitro* electrophysiological and antiarrhythmic effects of a novel IKACH blocker, NIP-151: A comparison with an IKr-blocker dofetilide. *J*

- Cardiovasc Pharmacol.* **2008**; *51*: 162-169.
316. Lai WC, Wang HC, Chen GY, et al. Using the pER8:GUS reporter system to screen for phytoestrogens from *Caesalpinia sappan*. *J Nat Prod.* **2011**; *74*: 1698-1706.
 317. Zuo J, Niu QW, Chua NH. An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J.* **2000**; *24*: 265-273.
 318. Csík G, Spiegl G, Minorics R, Falkay G, Zupkó I. The effects of adjuvant arthritis on the myometrial adrenergic functions in the nonpregnant and the late-pregnant rat. *J Physiol Pharmacol.* **2010**; *61*: 629-636.
 319. Adams M, Kunert O, Haslinger E, Bauer R. Inhibition of leukotriene biosynthesis by quinolone alkaloids from the fruits of *Evodia rutaecarpa*. *Planta Med.* **2004**; *70*: 904-908.
 320. Fiebich BL, Grozdeva M, Hess S, et al. *Petasites hybridus* Extracts *in vitro* Inhibit COX-2 and PGE₂ Release by Direct Interaction with the Enzyme and by Preventing p42/44 MAP Kinase Activation in Rat Primary Microglial Cells. *Planta Med.* **2005**; *71*: 12-19.
 321. *Community Herbal Monograph on Chamaemelum Nobile (L.) All., Flos.* European Medicines Agency, 2012.
 322. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *PLoS Med.* **2009**; *6*: e1000097.
 323. Schulz KF, Altman DG, Moher D. CONSORT 2010 Statement: Updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ.* **2010**; *340*: 698-702.
 324. Pelletier S, Mody N, Joshi B, Schramm L. The Alkaloids: Chemistry and Perspectives, Vol. 2, edited by SW Pelletier. Elsevier, **1984**.
 325. Meriçli AH, Meriçli F, Ulubelen A, et al. Diterpenoid alkaloids from the aerial parts of *Aconitum anthora* L. *Pharmazie.* **2000**; *55*: 696-698.
 326. de la Fuente G, Ruiz-Mesía L. Norditerpenoid alkaloids from *Delphinium peregrinum* var. *elongatum*. *Phytochemistry.* **1995**; *39*: 1459-1465.
 327. González AG, de La Fuente G, Reina M, Díaz R, Timón L. ¹³C NMR spectroscopy of some hetisine subtype C₂₀-diterpenoid alkaloids and their derivatives. *Phytochemistry.* **1986**; *25*: 1971-1973.
 328. Jakupovic J, Schuster A, Bohlmann F, King R, Robinson H. New lignans and isobutyraldehydes from *Heliopsis buphthalmoides*. *Planta Med.* **1986**; *52*: 18-20.
 329. Abrantes M, Mil-Homens T, Duarte N, et al. Antiplasmodial activity of lignans and extracts from *Pycnanthus angolensis*. *Planta Med.* **2008**; *74*: 1408-1412.
 330. Jim-Min F, Ching-Kuo L, Yu-Shia C. Lignans from leaves of *Juniperus chinensis*. *Phytochemistry.* **1992**; *31*: 3659-3661.
 331. Sbail H, Saad I, Ghezal N, Greca M Della, Haouala R. Bioactive compounds isolated from *Petroselinum crispum* L. leaves using bioguided fractionation. *Ind Crops Prod.* **2016**; *89*: 207-214.
 332. Fujioka T, Furumi K, Fujii H, et al. Antiproliferative constituents from Umbelliferae plants. V. A new furanocoumarin and falcariindiol furanocoumarin ethers from the root of *Angelica japonica*. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**; *47*: 96-100.
 333. Rahimifard M, Manayi A, Baeri M, Gholami M, Saeidnia S, Abdollahi M. Investigation of beta-sitosterol and prangol extracted from *Achillea tenoifolia* along with whole root extract on isolated rat pancreatic islets. *Iran J Pharm Res.* **2018**; *17*: 317-325.
 334. Lv X, Liu D, Hou J, et al. Biotransformation of imperatorin by *Penicillium janthinellum*. Anti-osteoporosis activities of its metabolites. *Food Chem.* **2013**; *138*: 2260-2266.
 335. Macías FA, Massanet GM, Rodriguez-Luis F, Salva J. ¹³C NMR of Coumarins. *Magn Reson Chem.* **1990**; *28*: 219-222.
 336. Poonkodi K. Phytoconstituents from *Richardia scabra* L. and its biological activities. *Asian J Pharm Clin Res.* **2016**; *9*: 1-4.
 337. Harker S, Razdan TK, Waight ES. Steroids, chromone and coumarins from *Angelica officinalis*. *Phytochemistry.* **1984**; *23*: 419-426.
 338. Chung CP, Hsia SM, Lee MY, et al. Gastroprotective activities of adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) on the growth of the stomach cancer cell line and indomethacin-induced gastric ulcers. *J Agric Food Chem.* **2011**; *59*: 6025-6033.
 339. Atkinson E, Boyd DR, Grundon MF. Coumarins of *Skimmia japonica*. *Phytochemistry.* **1974**; *13*: 853-855.
 340. Stöger EA. *Arzneibuch Der Chinesischen Medizin*. Deutscher Apotheker Verlag, **2017**.
 341. Wang Y, Liu Z, Song F, Liu S. Electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the aconitines in the roots of aconite. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2002**; *16*: 2075-2082.
 342. Ganzera M, Yayla Y, Khan IA. Analysis of the marker compounds of *Rhodiola rosea* L. (golden root) by reversed phase high performance liquid chromatography. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* **2001**; *49*: 465-467.
 343. Nawwar MAM, El-Sissi HI, Barakat HH. Flavonoid constituents of *Ephedra alata*. *Phytochem.* **1984**; *23*: 2937-2939.
 344. Jeong HJ, Ryu YB, Park S-J, et al. Neuraminidase inhibitory activities of flavonols isolated from *Rhodiola rosea* roots and their *in vitro* anti-influenza viral activities. *Bioorganic & Med Chem.* **2009**; *17*: 6816-6823.
 345. Reich E, Schibli A, Widmer V, Jorns R, Wolfram E, DeBatt A. HPTLC methods for identification of green tea and green tea extract. *Sect Title Food Feed Chem.* **2006**; *29*: 2141-2151.
 346. Bogusz MJ, Hassan H, Al-Enazi E, Ibrahim Z, Al-Tufail M. Application of LC-ESI-MS-MS for detection of

- synthetic adulterants in herbal remedies. *J Pharm Biomed Anal.* **2006**; 41: 554-564.
347. Takeoka G, Dao L, Wong RY, Lundin R, Mahoney N. Identification of benzethonium chloride in commercial grapefruit seed extracts. *J Agric Food Chem.* **2001**; 49: 3316-3320.
 348. *European Union Herbal Monograph on Symphytum Officinale L., Radix.* European Medicines Agency, **2009**.
 349. Ringbom T, Huss U, Stenholm A, et al. Cox-2 inhibitory effects of naturally occurring and modified fatty acids. *J Nat Prod.* **2001**; 64: 745-749.
 350. Bello-Ramirez AM, Nava-Ocampo AA. The local anesthetic activity of *Aconitum* alkaloids can be explained by their structural properties: a QSAR analysis. *Fundam Clin Pharmacol.* **2004**; 18: 157-161.
 351. *Assessment Report on Chelidonium Majus L., Herba.* European Medicines Agency, **2011**.
 352. Blazsó G, Gábor M, Schönla F, Rohdewald P. Pycnogenol® accelerates wound healing and reduces scar formation. *Phyther Res.* **2004**; 18: 579-581.
 353. Ding W, Huang R, Zhou Z, Li Y. New Sesquiterpenoids from *Ambrosia artemisiifolia* L. *Molecules.* **2015**; 20: 4450-4459.
 354. Taglialatela-Scafati O, Pollastro F, Minassi A, et al. Sesquiterpenoids from common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.), an invasive biological polluter. *European J Org Chem.* **2012**: 5162-5170.
 355. Stefanovic M, Jokic A, Behbud A. Psilostachyin and psilostachyin C from Yugoslav *Artemisia vulgaris* and *Ambrosia artemisiifolia*. *Glas Hem Drus Beogr.* **1972**; 37: 463-468.
 356. David JPJM, de O. Santos AJ, da S. Guedes ML, et al. Sesquiterpene lactones from *Ambrosia artemisiaefolia* (Asteraceae). *Pharm Biol.* **1999**; 37: 165-168.
 357. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No 407: Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents.* OECD, **2008**.
 358. Gattone VH, Tourkow B a, Trambaugh CM, et al. Development of multiorgan pathology in the wpk rat model of polycystic kidney disease. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* **2004**; 277: 384-395.
 359. Schellenberg R. Treatment for the premenstrual syndrome with agnus castus fruit extract: prospective, randomised, placebo controlled study. *BMJ.* **2001**; 322: 134-137.
 360. Schellenberg R, Zimmermann C, Drewe J, Hoexter G, Zahner C. Dose-dependent efficacy of the *Vitex agnus castus* extract Ze 440 in patients suffering from premenstrual syndrome. *Phytomedicine.* **2012**; 19: 1325-1331.
 361. He Z, Chen R, Zhou Y, et al. Treatment for premenstrual syndrome with *Vitex agnus castus*: A prospective, randomized, multi-center placebo controlled study in China. *Maturitas.* **2009**; 63: 99-103.
 362. Cipriani A, Furukawa TA, Salanti G, et al. Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet.* **2018**; 391: 1357-1366.
 363. Chrubasik-Hausmann S, Vlachoianis J, McLachlan AJ. Understanding drug interactions with St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): impact of hyperforin content. *J Pharm Pharmacol.* **2019**; 71: 129-138.
 364. Tabeshpour J, Sobhani F, Sadjadi SA, et al. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of saffron stigma (*Crocus sativus* L.) in mothers suffering from mild-to-moderate postpartum depression. *Phytomedicine.* **2017**; 36: 145-152.
 365. Abedimanesh N, Ostadrahimi A, Bathaie SZ, et al. Effects of saffron aqueous extract and its main constituent, crocin, on health-related quality of life, depression, and sexual desire in coronary artery disease patients: A double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Iran Red Crescent Med J.* **2017**; 19.
 366. Kashani L, Esalatmanesh S, Eftekhari F, et al. Efficacy of *Crocus sativus* (saffron) in treatment of major depressive disorder associated with post-menopausal hot flashes: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arch Gynecol Obstet.* **2018**; 297: 717-724.
 367. Akhondzadeh S, Tahmacebi-Pour N, Noorbala AA, et al. *Crocus sativus* L. in the treatment of mild to moderate depression: A double-blind, randomized and placebo-controlled trial. *Phyther Res.* **2005**; 19: 148-151.
 368. Moshiri E, Basti AA, Noorbala A-A, Jamshidi A-H, Hesameddin Abbasi S, Akhondzadeh S. *Crocus sativus* L. (petal) in the treatment of mild-to-moderate depression: a double-blind, randomized and placebo-controlled trial. *Phytomedicine.* **2006**; 13: 607-611.
 369. Ghajar A, Neishabouri SM, Velayati N, et al. *Crocus sativus* L versus Citalopram in the Treatment of Major Depressive Disorder with Anxious Distress: A Double-Blind, Controlled Clinical Trial. *Pharmacopsychiatry.* **2017**; 50: 152-160.
 370. Noorbala AA, Akhondzadeh S, Tahmacebi-Pour N, Jamshidi AH. Hydro-alcoholic extract of *Crocus sativus* L. versus fluoxetine in the treatment of mild to moderate depression: A double-blind, randomized pilot trial. *J Ethnopharmacol.* **2005**; 97: 281-284.
 371. Akhondzadeh Basti A, Moshiri E, Noorbala A-A, Jamshidi A-H, Abbasi SH, Akhondzadeh S. Comparison of petal of *Crocus sativus* L. and fluoxetine in the treatment of depressed outpatients: a pilot double-blind randomized trial. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **2007**; 31: 439-442.
 372. Shahmansouri N, Farokhnia M, Abbasi SH, et al. A randomized, double-blind, clinical trial comparing the efficacy and safety of *Crocus sativus* L. with fluoxetine for improving mild to moderate depression in post percutaneous coronary intervention patients. *J Affect Disord.* **2014**; 155: 216-222.
 373. Kashani L, Esalatmanesh S, Saedi N, et al. Comparison of Saffron versus Fluoxetine in Treatment of Mild to Moderate Postpartum Depression: A Double-Blind, Randomized Clinical Trial. *Pharmacopsychiatry.* **2017**; 50:

- 64-68.
374. Csúpor D, Forgo P, Máthé I, Hohmann J. Acovulparine, a new norditerpene alkaloid from *Aconitum vulparia*. *Helv Chim Acta*. **2004**; 87.
 375. Csúpor D, Forgo P, Zupkó I, Szabó P, Hohmann J. Anthranoyl-substituted norditerpene alkaloids from *Aconitum vulparia* Rchb. and their cytotoxic activities. *Zeitschrift für Naturforsch - Sect B J Chem Sci*. **2007**; 62.
 376. Csúpor D, Forgo P, Csédo K, Hohmann J. C₁₉ and C₂₀ diterpene alkaloids from *Aconitum toxicum* RCHB. *Helv Chim Acta*. **2006**; 89.
 377. William Pelletier S, A. Ross S, K. Desai H. New Diterpenoid Alkaloids from *Delphinium staphisagria* Linné. *Heterocycles*. **1987**; 26: 2895.
 378. Niitsu K, Ikeya Y, Mitsunashi H, Siying C, Huiling L. Studies on the alkaloids from *Aconitum contortum* (L). *Heterocycles*. **1990**; 31: 1517-1524.
 379. Shaheen F, Ahmad M, Khan MTH, et al. Alkaloids of *Aconitum laeve* and their anti-inflammatory, antioxidant and tyrosinase inhibition activities. *Phytochemistry*. **2005**; 66: 935-940.
 380. Bhogi Hanuman J, Katz A. Diterpenoid alkaloids from ayurvedic processed and unprocessed *Aconitum ferox*. *Phytochemistry*. **1994**; 36: 1527-1535.
 381. de la Fuente G, Orribo T, Gavín JA, Acosta RD. Lamarckinine, a new bisnorditerpenoid alkaloid from *Aconitum lamarckii* Reichenb. *Heterocycles*. **1993**; 36: 1455-1458.
 382. Sang HS, Ju SK, Sam SK, Kun HS, Bae KH. Alkaloidal constituents from *Aconitum jaluense*. *Arch Pharm Res*. **2003**; 26: 709-715.
 383. Ohta H, Seto Y, Tsunoda N. Determination of Aconitum alkaloids in blood and urine samples. I. High-performance liquid chromatographic separation, solid-phase extraction and mass spectrometric confirmation. *J Chromatogr B, Biomed Sci Appl*. **1997**; 691: 351-356.
 384. Beike J, Frommherz L, Wood M, Brinkmann B, Köhler H. Determination of aconitine in body fluids by LC-MS-MS. *Int J Legal Med*. **2004**; 118: 289-293.
 385. Singhuber J, Zhu M, Prinz S, Kopp B. *Aconitum* in traditional Chinese medicine: a valuable drug or an unpredictable risk? *J Ethnopharmacol*. **2009**; 126: 18-30.
 386. Dzshakhangirov FN, Sadritdinov FS. Antidepressive properties of the alkaloid songorine. *Dokl. Akad. Nauk UzSSR*. **1973**; 30: 39-40.
 387. Bisset NG. Arrow poisons in China. Part II. *Aconitum*--botany, chemistry, and pharmacology. *J Ethnopharmacol*. **1981**; 4: 247-336.
 388. Molina-Torres J, Salgado-Garciglia R, Ramirez-Chavez E, del Rio RE. Purely Olefinic Alkamides in *Heliopsis longipes* and *Acmella (Spilanthes) oppositifolia*. **1996**; 24: 43-47.
 389. Molinatorres J, Salgado-Garciglia R, Ramirez-Chavez E, Del Rio RE. Purely olefinic alkamides in *Heliopsis longipes* and *Acmella (Spilanthes) oppositifolia*. *Biochem Syst Ecol*. **1996**; 24: 43-47.
 390. Bohlmann F, Lonitz M, Knoll K. Neue lignan-derivate aus der tribus Heliantheae. *Phytochemistry*. **1978**; 17: 330-331.
 391. Burden R, Crombie L, Whiting D. Extractives of *Heliopsis scabra*: structure and stereochemistry of two new lignans. *Tetrahedron Lett*. **1968**; 9: 1035-1039.
 392. Burden RS, Crombie L, Whiting DA. The extractives of *Heliopsis scabra*: constitution of two new lignans. *J Chem Soc C Org*. **1969**; 693-701.
 393. Reisch J, Szendrei K, Novak I, Minker E. Lignans of *Ruta graveolens* roots. Helioxanthine Pharmazie. *Nat Prod Chem*. **1970**; 25: 435-6.
 394. Ghosal S, Kumarswamy C, Chauhan RBS, Srivastava RS. Lactonic lignans of *Polygala chinensis*. *Phytochemistry*. **1973**; 12: 2550-1.
 395. Chen C-C, Huang Y-L, Lee S-S, Ou J-C. Laurodionine, a new oxalyl-fused aporphine alkaloid from *Phoebe formosana*. *J Nat Prod*. **1997**; 60: 826-827.
 396. He K, Zeng L, Shi G, Zhao GX, Kozłowski JF, McLaughlin JL. Bioactive Compounds from *Taiwania cryptomerioides*. *J Nat Prod*. **1997**; 60: 38-40.
 397. Shen CC, Ni CL, Huang YL, Huang RL, Chen CC. Furanolabdane Diterpenes from *Hypoestes purpurea*. *J Nat Prod*. **2004**; 67: 1947-1949.
 398. Lee S, Yoo HH, Piao XL, Kim JS, Kang SS, Shin KH. Anti-estrogenic activity of lignans from *Acanthopanax chiisanensis* root. *Arch Pharm Res*. **2005**; 28: 186-189.
 399. Sammaiah G, Narsaiah N, Dayakar G, et al. Constituents and Cytotoxicity of *Polygala eriopetra*. *Int J Chem Sci*. **2008**; 6: 643-646.
 400. Yu K, Song Y, Lu Y, Xiong Z, Li F. Phenylpropanoids from roots of *Acanthopanax sessiliflorus*. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*. **2012**; 24: 469-472.
 401. Sastry K V., Rao EV, Pelter A, Ward RS. 4-Aryl-2,3-naphthalide lignans from *Justicia simplex* Indian. *J Chem Sect B Org Chem Incl Med Chem*. **1979**; 17B: 415-416.
 402. Olaniyi AA, Powell JW. Lignans from *Justicia flava*. *J Nat Prod*. **1980**; 43: 482-486.
 403. Trujillo JM, R EJ, Navarro E, Boada J. Lignans from *Justicia hyssopifolia*. *Phytochemistry*. **1990**; 29: 2991-2993.
 404. Rajasekhar D, Vanisree M, Subbaraju G V. *Justicia* lignans: part 4. - Two new aryl-naphthalide lignans from *Justicia neesii* Ramamoorthy. *Indian J Chem Sect B Org Chem Incl Med Chem*. **1999**; 38B: 713-717.
 405. B Rajasekhar D, Subbaraju G V., Pillai R. *Justicia* lignans VI. - Prostalidin D, a new aryl-naphthalide lignan from

- Justicia diffusa* var. *prostrata* C.B. Clarke. *J Asian Nat Prod Res.* **2000**; 2: 289-300.
406. Gonzalez Gonzales AG. Productos de los tallos de la *Ruta pinnata* L. fil. Estructura de la benahorina. *An Química.* **1971**; 67: 441-451.
 407. Woelkart K, Xu W, Pei Y, Makriyannis A, Picone RP, Bauer R. The Endocannabinoid System as a Target for Alkamides from *Echinacea angustifolia* Roots. *Planta Med.* **2005**; 71: 701-705.
 408. Clément C, Kneubühler J, Urwyler A, Witschi U, Kreuzer M. Effect of maca supplementation on bovine sperm quantity and quality followed over two spermatogenic cycles. *Theriogenology.* **2010**; 74: 173-183.
 409. Battista N, Meccariello R, Cobellis G, et al. The role of endocannabinoids in gonadal function and fertility along the evolutionary axis. *Mol Cell Endocrinol.* **2012**; 355: 1-14.
 410. Jungeström MB, Thompson LU, Dabrosin C. Flaxseed and its lignans inhibit estradiol-induced growth, angiogenesis, and secretion of vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts *in vivo*. *Clin Cancer Res.* **2007**; 13: 1061-1067.
 411. Gordaliza M, Castro MA d, Miguel del Corral JM, Feliciano AS. Antitumor properties of podophyllotoxin and related compounds. *Curr Pharm Des.* **2000**; 6: 1811-1839.
 412. Sloan AE, Nock CJ, Einstein DB. Diagnosis and Treatment of melanoma Brain Metastasis: A Literature Review. *Cancer Control.* **2009**; 16: 248-255.
 413. Zhang B, Liu Z, Hu X. Inhibiting cancer metastasis via targeting NADPH oxidase 4. *Biochem Pharmacol.* **2013**; 86: 253-266.
 414. Mali A V, Wagh U V, Hegde M V, Chandorkar SS, Surve S V, Patole M V. In vitro anti-metastatic activity of enterolactone, a mammalian lignan derived from flax lignan, and down-regulation of matrix metalloproteinases in MCF-7 and MDA MB 231 cell lines. *Indian J Cancer.* **2012**; 49: 181.
 415. Girnita A, All-Ericsson C, Economou MA, et al. The insulin-like growth factor-I receptor inhibitor picropodophyllin causes tumor regression and attenuates mechanisms involved in invasion of uveal melanoma cells. *Clin cancer Res.* **2006**; 12: 1383-1391.
 416. Chandra S, Chandra D, Barh A, Pankaj, Pandey RK, Sharma IP. Bryophytes: Hoard of remedies, an ethno-medicinal review. *J Tradit Complement Med.* **2017**; 7: 94-98
 417. Sabovljevic A, Sokovic M, Glamoclija J, et al. Comparison of extract bio-activities of *in situ* and *in vitro* grown selected bryophyte species. *African J Microbiol Res.* **2010**; 4: 808-812.
 418. Nikolajeva V, Liepina L, Petrina Z, Krumina G, Grube M, Muiznieks I. Antibacterial activity of extracts from some Bryophytes. *Adv Microbiol.* **2012**; 2: 345-353.
 419. Singh M, Rawat AKS, Govindarajan R. Antimicrobial activity of some Indian mosses. *Fitoterapia.* **2007**; 78: 156-158.
 420. Singh M, Singh S, Nath V, Sahu V, Rawat AKS. Antibacterial activity of some bryophytes used traditionally for the treatment of burn infections. *Pharm Biol.* **2011**; 49: 526-530.
 421. Sabovljevic A, Sokovic M, Sabovljevic M, Grubisic D. Antimicrobial Activity of *Bryum argenteum*. **2006**; 77: 144-145.
 422. Klavina L, Springe G, Nikolajeva V, et al. Chemical composition analysis, antimicrobial activity and cytotoxicity screening of moss extracts (moss phytochemistry). *Molecules.* **2015**; 20: 17221-17243.
 423. Veljic M, Tarbuk M, Martin PD, Ciric A, Sokovic M, Marin M. Antimicrobial Activity of Methanol Extracts of Mosses from Serbia. *Pharm Biol.* **2008**; 46: 871-875.
 424. Gellerman JL, Anderson WH, Schlenk H. Synthesis and analysis of phytol and phytanyl wax esters. *Lipids.* **1975**; 10: 656-661.
 425. Österdahl B-G, Suokas E, McCoy K. Chemical Studies on Bryophytes. 20. A New Branched Flavonoid-O-triglycoside from *Dicranum scoparium*. *Acta Chem Scand.* **1978**; 32b: 714-716.
 426. Asakawa Y, Tori M, Takikawa K, Krishnamurthy HG, Kar SK. Cyclic bis(bibenzyls) and related compounds from the liverworts *Marchantia polymorpha* and *Marchantia palmata*. *Phytochemistry.* **1987**; 26: 1811-1816.
 427. Toyota M, Yoshida T, Kan Y, Takaoka S, Asakawa Y. (+)-Cavicularin: A novel optically active cyclic bibenzyl-dihydrophenanthrene derivative from the liverwort *Cavicularia densa* Steph. *Tetrahedron Lett.* **1996**; 37: 4745-4748.
 428. Martini U, Zapp J, Becker H. Chlorinated macrocyclic Bisbibenzyls from the liverwort *Bazzania trilobata*. *Phytochemistry.* **1998**; 47: 89-96.
 429. Flegel M, Adam KP, Becker H. Sesquiterpene lactones and bisbibenzyl derivatives from the neotropical liverwort *Frullania convoluta*. *Phytochemistry.* **1999**; 52: 1633-1638.
 430. Nagashima F, Momosaki S, Watanabe Y, Toyota M, Huneck S, Asakawa Y. Terpenoids and aromatic compounds from six liverworts. *Phytochemistry.* **1996**; 41: 207-211.
 431. Anton H, Kraut L, Mues R, Morales I, Morales Z. Phenanthrenes and bibenzyls from a *Plagiochila* species. *Phytochemistry.* **1997**; 46: 1069-1075.
 432. Asakawa Y. Chemosystematics of the Hepaticae. *Phytochemistry.* **2004**; 65: 623-669.
 433. So ML, Chan WH, Xia PF, Cui Y. Two new cyclic bis(bibenzyl)s, isoriccardinquinone A and B from the liverwort *Marchantia paleacea*. *Nat Prod Lett.* **2002**; 16: 167-171.
 434. Adam KP, Becker H. Phenanthrenes and other phenolics from *in vitro* cultures of *Marchantia polymorpha*. *Phytochemistry.* **1993**; 35: 139-143.
 435. Asakawa Y, Ludwiczuk A, Nagashima F. Phytochemical and biological studies of bryophytes. *Phytochemistry.*

- 2013**; 91: 52-80.
436. Gould SJ, Melville CR, Chen J. The biosynthesis of murayaquinone, a rearranged polyketide. *Tetrahedron*. **1997**; 53: 4561-4568.
 437. Krone B, Hinrichs A, Zeeck A. Metabolic products of microorganisms. 208 Haloquinone, a new antibiotic active against halobacteria II. Chemical structure and derivatives. *J Antibiot (Tokyo)*. **1981**; 34: 1538-1543.
 438. De Beer D, Schulze AE, Joubert E, Villiers A, Malherbe CJ, Stander MA. Food ingredient extracts of *Cyclopia subternata* (Honeybush): Variation in phenolic composition and antioxidant capacity. *Molecules*. **2012**; 17: 14602-14624.
 439. Liu S, Zhu L, Zhang J, Yu J, Cheng X, Peng B. Anti-osteoclastogenic activity of isoliquiritigenin via inhibition of NF- κ B-dependent autophagic pathway. *Biochem Pharmacol*. **2016**; 106: 82-93.
 440. Han D-H, Denison MS, Tachibana H, Yamada K. Relationship between estrogen receptor-binding and estrogenic activities of environmental estrogens and suppression by flavonoids. *Biosci Biotechnol Biochem*. **2002**; 66: 1479-1487.
 441. Atteritano M, Marini H, Minutoli L, et al. Effects of the phytoestrogen genistein on some predictors of cardiovascular risk in osteopenic, postmenopausal women: A two-year randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab*. **2007**; 92: 3068-3075.
 442. Almutawa F, Alnomair N, Wang Y, Hamzavi I, Lim HW. Systematic review of UV-based therapy for psoriasis. *Am J Clin Dermatol*. **2013**; 14: 87-109.
 443. Loveday KS. Interrelationship of photocarcinogenicity, photomutagenicity and phototoxicity. *Photochem Photobiol*. **1996**; 63: 369-372.
 444. Kubrak T, Bogucka-kocka A, Komsta Ł, et al. Modulation of multidrug resistance gene expression by coumarin derivatives in human Leukemic cells. *Oxid Med Cell Longev*. **2017**: 5647281.
 445. Mottaghpisheh J, Nové M, Spengler G, Kúsz N, Hohmann J, Csupora D. Antiproliferative and cytotoxic activities of furocoumarins of *Ducrosia anethifolia*. *Pharm Biol*. **2018**; 56: 658-664.
 446. Ioset KN, Nyberg NT, Van Diermen D, et al. Metabolic profiling of *Rhodiola rosea* rhizomes by ^1H NMR spectroscopy. *Phytochem Anal*. **2011**; 22: 158-165.
 447. Kolodziej B, Sugier D. Influence of plants age on the chemical composition of roseroot (*Rhodiola rosea* L.). *Acta Sci Pol, Hortorum Cultus*. **2013**; 12: 147-160.
 448. Galambosi B, Galambosi Z, Uusitalo M, Heinonen A. Effects of plant sex on the biomass production and secondary metabolites in roseroot (*Rhodiola rosea* L.) from the aspect of cultivation. *Zeitschrift für Arznei- & Gewürzpflanzen*. **2009**; 14: 114-121.
 449. Buchwald W, Mscisz A, Krajewska-Patan A, Furmanowa M, Mielcarek S, Mrozikiewicz PM. Contents of biologically active compounds in *Rhodiola rosea* roots during the vegetation period. *Herba Pol*. **2006**; 4: 39-43.
 450. Ma Y-C, Wang X-Q, Hou F, et al. Rapid resolution liquid chromatography (RRLC) analysis for quality control of *Rhodiola rosea* roots and commercial standardized products. *Nat Prod Commun*. **2011**; 6: 645-650.
 451. Peschel W, Prieto JM, Karkour C, Williamson EM. Effect of provenance, plant part and processing on extract profiles from cultivated European *Rhodiola rosea* L. for medicinal use. *Phytochemistry*. **2013**; 86: 92-102.
 452. Galambosi B. Demand and availability of *Rhodiola rosea* L. raw material. *Med Aromat plants*. **2006**; 16: 223-236.
 453. Kwon H-J, Ryu YB, Jeong HJ, et al. Rhodiosin, an Antioxidant Flavonol Glycoside from *Rhodiola rosea*. *J Korean Soc Applied Biol Chem*. **2009**; 52: 486-492.
 454. Ma C, Hu L, Fu Q, Gu X, Tao G, Wang H. Separation of four flavonoids from *Rhodiola rosea* by on-line combination of sample preparation and counter-current chromatography. *J Chromatogr A*. **2013**; 1306: 12-19.
 455. Ma S, Hu L, Ma C, Lv W, Wang H. Application and recovery of ionic liquids in the preparative separation of four flavonoids from *Rhodiola rosea* by on-line three-dimensional liquid chromatography. *J Sep Sci*. **2014**; 37: 2314-2321.
 456. Choe KI, Kwon JH, Park KH, et al. The Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Phenolic Compounds Isolated from the Root of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. *Molecules*. **2012**; 17: 11484-11494.
 457. Ekborg-Ott KH, Taylor A, Armstrong DW. Varietal Differences in the Total and Enantiomeric Composition of Theanine in Tea. *J Agric Food Chem*. **1997**; 45: 353-363.
 458. Horanni R, Engelhardt UH. Determination of amino acids in white, green, black, oolong, pu-erh teas and tea products. *J Food Compos Anal*. **2013**; 31: 94-100.
 459. Achouri A, Boye JJ, Belanger D. Soybean isoflavones: Efficacy of extraction conditions and effect of food type on extractability. *Food Res Int*. **2005**; 38: 1199-1204.
 460. Chen LJ, Zhao X, Plummer S, Tang J, Games DE. Quantitative determination and structural characterization of isoflavones in nutrition supplements by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. **2005**; 1082: 60-70.
 461. Wójciak-Kosior M, Sowa I, Szymczak G, Zapala K, Kocjan R, Blicharski T. Effect of sample pre-treatment on isoflavones quantification in soybean. *Chem Pap*. **2016**; 70: 1087-1093.
 462. Wang M, Guo J, Qi W, Su R, He Z. An effective and green method for the extraction and purification of aglycone isoflavones from soybean. *Food Sci Biotechnol*. **2013**; 22: 705-712.

463. Moras B, Rey S, Vilarem G, Pontalier P-Y. Pressurized water extraction of isoflavones by experimental design from soybean flour and Soybean Protein Isolate. *Food Chem.* **2017**; *214*: 9-15.
464. Sanches de Lima F, Ida EI. Optimisation of soybean hydrothermal treatment for the conversion of β -glucoside isoflavones to aglycones. *LWT - Food Sci Technol.* **2014**; *56*: 232-239.
465. Setchell KD, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, et al. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr.* **2002**; *76*: 447-453.
466. da Costa César I, Braga FC, Soares CDV, et al. Development and validation of a RP-HPLC method for quantification of isoflavone aglycones in hydrolyzed soy dry extracts. *J Chromatogr B.* **2006**; *836*: 74-78.
467. Müller L, Mauthe RJ, Riley CM, et al. A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity. *Regul Toxicol Pharmacol.* **2006**; *44*: 198-211.
468. Van Dokkum W. The intake of selected minerals and trace elements in European countries. *Nutr Res Rev.* **1995**; *8*: 271-302.
469. Ariburnu E, Uludag MF, Yalcinkaya H, Yesilada E. Comparative determination of sibutramine as an adulterant in natural slimming products by HPLC and HPTLC densitometry. *J Pharm Biomed Anal.* **2012**; *64-65*: 77-81.
470. Zeng Y, Xu Y, Kee C-L, Low M-Y, Ge X. Analysis of 40 weight loss compounds adulterated in health supplements by liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *Drug Test Anal.* **2016**; *8*: 351-356.
471. Cheng Q, Shou L, Chen C, Shi S, Zhou M. Application of ultra-high-performance liquid chromatography coupled with LTQ-Orbitrap mass spectrometry for identification, confirmation and quantitation of illegal adulterated weight-loss drugs in plant dietary supplements. *J Chromatogr B.* **2017**; *1064*: 92-99.
472. de Carvalho LM, Martini M, Moreira AP, et al. Presence of synthetic pharmaceuticals as adulterants in slimming phytotherapeutic formulations and their analytical determination. *Forensic Sci Int.* **2011**; *204*: 6-12.
473. Hegggers JP, Cottingham J, Gusman J, et al. The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: II. Mechanism of action and in vitro toxicity. *J Altern Complement Med.* **2002**; *8*: 521.
474. von Woedtke T, Schluter B, Pfliegel P, Lindequist U, Julich WD. Aspects of the antimicrobial efficacy of grapefruit seed extract and its relation to preservative substances contained. *Pharmazie.* **1999**; *54*: 452-456.
475. U.S. Food and Drug Administration. Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm?event=browseByLetter.page&Letter=B> (letöltve: 2020. 06. 08.)
476. Opinion of the scientific committee on cosmetic products and non-food products intended for consumers concerning benzethonium chloride (SCCNFP/0539/01). European Commission, 2002.
477. Brandin H, Myrberg O, Rundlof T, Arvidsson A-K, Brenning G. Adverse effects by artificial grapefruit seed extract products in patients on warfarin therapy. *Eur J Clin Pharmacol.* **2007**; *63*: 565-570.
478. Mastodynion tabletta alkalmazási előírása, Országos Gyógyszerészeti Intézet (www.ogyei.hu, letöltve 2012. 05. 03.)
479. Agnucaston bevont tabletta alkalmazási előírása, Országos Gyógyszerészeti Intézet (www.ogyei.hu, letöltve 2012. 06. 03.)
480. Ma L, Lin S, Chen R, Zhang Y, Chen F, Wand X. Evaluating therapeutic effect in symptoms of moderate-to-severe premenstrual syndrome with *Vitex agnus castus* (BNO 1095) in Chinese women. *Aust New Zeal J Obstet Gynaecol.* **2010**; *50*: 189-193.
481. Halaska M, Beles P, Gorkow C, Sieder C. Treatment of cyclical mastalgia with a solution containing a *Vitex agnus castus* extract: results of a placebo-controlled double-blind study. *The Breast.* **1999**; *8*: 175-181.
482. Wuttke W, Splitt G, Gorkow C, Sieder C. Treatment of cyclical mastalgia: Results of a randomised, placebo-controlled, double-blind study. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* **1997**; *57*: 569-574.
483. Meier B, Berger D, Hoberg E, Sticher O, Schaffner W. Pharmacological activities of *Vitex agnus-castus* extracts in vitro. *Phytomedicine.* **2000**; *7*: 373-381.
484. Webster DE, He Y, Chen S-N, Pauli GF, Farnsworth NR, Wang ZJ. Opioidergic mechanisms underlying the actions of *Vitex agnus-castus* L. *Biochem Pharmacol.* **2011**; *81*: 170-177.
485. Kempf M, Wittig M, Reinhard A, et al. Pyrrolizidine alkaloids in honey: comparison of analytical methods. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* **2011**; *28*: 332-347.
486. Kast C, Dübecke A, Kilchenmann V, et al. Analysis of Swiss honeys for pyrrolizidine alkaloids. *J Apic Res.* **2014**; *53*: 75-83.
487. Oplatowska M, Elliott CT, Huet A-C, et al. Development and validation of a rapid multiplex ELISA for pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides in honey and feed. *Anal Bioanal Chem.* **2014**; *406*: 757-770.
488. Staiger C, Ottersbach P, Rudolph M, Schulzki G. Method validation for the determination of toxic pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides in *Symphytum officinale* L. using GC-MS. *Planta Med.* **2009**; *75*: PG6.
489. Lane ME. Skin penetration enhancers. *Int J Pharm.* **2013**; *447*: 12-21.
490. Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Foz M, Alemany M. Pharmacological approaches for the treatment of obesity 4. *Drugs.* **2002**; *62*: 915-944.
491. Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Am J Surg.* **1998**; *176*: 26S-38S.
492. Koca U, Süntar IP, Keles H, Yesilada E, Akkol EK. In vivo anti-inflammatory and wound healing activities of

- Centaurea iberica* Trev. ex Spreng. *J Ethnopharmacol.* **2009**; 126: 551-556.
493. Parkhomenko AY, Oganessian ET, Andreeva OA, Dorkina EG, Paukova EO, Agadzanyan ZS. Pharmacologically active substances from *Ambrosia artemisiifolia*. Part 2. *Pharm Chem J.* **2006**; 40: 627-632.
 494. Gowda S, Desai PB, Hull V V, Math AAK, Vernekar SN, Kulkarni SS. A review on laboratory liver function tests. *Pan Afr Med J.* **2009**; 3: 17.
 495. Giannini EG. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Can Med Assoc J.* **2005**; 172: 367-379.
 496. Noori A, Amjad L, Yazdani F. The effects of *Artemisia deserti* ethanolic extract on pathology and function of rat kidney. *Avicenna J Phytomedicine.* **2014**; 4: 371-376.
 497. Ene-ojo AS, Chinedu EA, Yakasai FM. Toxic Effects of Sub-Chronic Administration of Chloroform Extract of *Artemisia maciverae* Linn on the Kidney of Swiss Albino Rats. *Int J Biochem Res Rev.* **2013**; 3: 119-128.
 498. Narasimhan TR, Harindranath N, Premalata S, Murthy BSK, Rao PVS. Toxicity of the Sesquiterpene Lactone Parthenin to Cultured Bovine Kidney Cells. *Planta Med.* **1985**; 51: 194-197.
 499. Amorim MHR, Gil da Costa RM, Lopes C, Bastos SM. Sesquiterpene lactones: adverse health effects and toxicity mechanisms. *Crit Rev Toxicol.* **2013**; 43: 559-579.
 500. de Oliveira RB, de Paula DAC, Rocha BA, et al. Renal toxicity caused by oral use of medicinal plants: the yacon example. *J Ethnopharmacol.* **2011**; 133: 434-441.
 501. Robles M, Wang N, Kim R, Choi BH. Cytotoxic effects of repin, a principal sesquiterpene lactone of Russian knapweed. *J Neurosci Res.* **1997**; 47: 90-97.
 502. Piao Y, Liu Y, Xie X. Change trends of organ weight background data in sprague dawley rats at different ages. *J Toxicol Pathol.* **2013**; 26: 29-34.
 503. *A Quick Reference Guide for Clinicians - Managing Premenstrual Symptoms*. Association of Reproductive Health Professionals, **2008**.
 504. Nevatte T, O'Brien PMS, Bäckström T, et al. ISPM consensus on the management of premenstrual disorders. *Arch Womens Ment Health.* **2013**; 16: 279-291.
 505. Stute P, Bodmer C, Ehlert U, et al. Interdisciplinary consensus on management of premenstrual disorders in Switzerland. *Gynecol Endocrinol.* **2017**; 33: 342-348.
 506. Green LJ, O'Brien PMS, Panay N. Management of Premenstrual Syndrome. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* **2017**; 124: e73-e105.
 507. Panay N. *NAPS Guidelines on Guidelines on Premenstrual Syndrome*. The National Association for Premenstrual Syndrome
 508. Casper RF, Yonkers KA. Treatment of premenstrual syndrome and premenstrual dysphoric disorder. <https://www.uptodate.com/contents/treatmentofpremenstrualsyndromeandpremenstrualdysphoricdisorder/%0Aprint> (letöltve 2019. 11. 03.)
 509. Verkaik S, Kamperman AM, van Westrhenen R, Schulte PFJ. The treatment of premenstrual syndrome with preparations of *Vitex agnus castus*: A systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* **2017**; 217, 150-166
 510. van Die MD, Burger HG, Teede HJ, Bone KM. *Vitex agnus-castus* Extracts for Female Reproductive Disorders: A Systematic Review of Clinical Trials. *Planta Med.* **2013**; 79: 562-575.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Hohmann Judit akadémikusnak, a Farmakognóziai Intézet vezetőjének, aki diákköri és doktori témavezetőként irányította és segítette munkámat, valamint biztosította az eredményes munkához szükséges szabadságot.

Köszönettel tartozom Prof. Máthé Imrének, a Farmakognóziai Intézet korábbi tanszékvezetőjének, hogy fiatal kutatóként bizalmat szavazott nekem és támogatást nyújtott az egyetemi oktatóvá váláshoz.

Köszönöm Prof. Rudolf Bauernek, hogy az Intézetében töltött időszak alatt elkezdhettem az önálló kutatóvá válás útját.

Köszönöm Prof. Szendrei Kálmánnak, hogy példamutatásával és mentoromként alapvetően hozzájárult világlátásom alakulásához.

Köszönöm volt és jelenlegi doktoranduszaimnak (Borcsa Botond Lajosnak, Hajdu Zsanettnek, Kiss Tivadarnak, Roza Orsolyának; Bajtel Ákosnak, Horváth-Boros Klárának, Kerekes Diánának, Koncz Dorottyanak, Kovács Balázsnak, Mottaghipisheh Javadnak (Imannak), Vollár Martinnak, Zomborszki Zoltán Péternek), valamint asszisztensemnek, Horváth Attilának, hogy a disszertáció anyagát képező munka elvégzésében társaim voltak.

Köszönet illeti együttműködő partnereimet, közleményeim társszerzőit, akik hozzájárultak a kutatási eredmények megszületéséhez. Köszönöm Wieland Peschelnek az értékes kooperációt.

Köszönöm Prof. Hegyi Péternek, hogy lehetőséget biztosított ahhoz, hogy egy új kutatási területen is kipróbáljam magam. Külön köszönöm feleségemnek, Csupor-Löffler Boglárkának, hogy társszerzőként is közreműködött kutatásaim során.

Hálás vagyok mindazon kollégáimnak, akik a Farmakognóziai Intézetben szakmai és baráti segítségükkel segítették munkámat. Külön köszönöm Veres Katalinnak és Gerencsérné Makra Editnek, akik önzetlen segítsége nélkül nem lett volna energiám kutatómunkám elvégzésére.

A legnagyobb köszönet a családomat illeti. Köszönöm szüleimnek, akik felkeltették a figyelmem a természettudományok iránt, és mindvégig támogattak. Köszönöm feleségemnek, akinek biztatása nélkül ez a mű nem jött volna létre. Munkámat nekik és fiaimnak ajánlom.

Ama nemes harcot megharcoltam, futásomat elvégeztem, a hitet megtartottam...

dc_1800_20