moricz.agnes_426_26

Vékonyrétegkromatográfiás csatolások a növényi bioaktív vegyületek felfedezésében

rövid formátumú akadémiai doktori értekezés

Móricz Ágnes

HUN-REN Agrártudományi Kutatóközpont
Növényvédelmi Intézet
2026

moricz.agnes_426_26

Tartalomjegyzék

Az értekezés alapját képező saját közlemények jegyzéke 4
Rövidítések jegyzéke 7
1. Bevezetés 8
2. A biológiai aktivitással rendelkező vegyületek kimutatása és jellemzése – (HP)TLC csatolások előnyei 8
2.1. (HP)TLC csatolások alkalmazása bioaktivitás kimutatására 8
2.2. A vékonyrétegkromatográfia fejlődése és a spektroszkópiás és spektrometriás technikákkal való csatolása 11
3. Célkitűzések 13
4. Vizsgálati módszerek 13
5. Eredmények 14
5.1. Új mikroorganizmusok bevezetése (HP)TLC–direkt bioautográfiás alkalmazásra és (HP)TLC–enzimtesztek továbbfejlesztése 14
5.2. (HP)TLC csatolások alkalmazása bioaktív komponensek kimutatására és jellemzésére 16
5.3. OPLC csatolások alkalmazása bioaktív vegyületek vizsgálatára 23
5.4. (HP)TLC csatolásokkal segített bioaktivitás irányította izolálás 28
6. Kitekintés 35
Köszönetnyilvánítás 36
Irodalomjegyzék 38
Melléklet: az értekezés alapját képező saját közlemények másolatai 56

Az értekezés alapját képező saját közlemények jegyzéke

[M1] **Móricz, Á. M.***; Häbe, T. T.; Böszörményi, A.; Ott, P. G.; Morlock, G. E. Tracking and Identification of Antibacterial Components in the Essential Oil of *Tanacetum vulgare* L. by the Combination of High-Performance Thin-Layer Chromatography with Direct Bioautography and Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1422*, 310–317. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.010.

[M2] **Móricz, Á. M.***; Krüzselyi, D.; Ott, P. G.; Garádi, Z.; Béni, S.; Morlock, G. E.; Bakonyi, J. Bioactive Clerodane Diterpenes of Giant Goldenrod (*Solidago gigantea* Ait.) Root Extract. *J. Chromatogr. A* **2021**, *1635*, 461727. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461727.

[M3] Kolozsváriné Nagy, J.; **Móricz, Á. M.***; Böszörményi, A.; Ambrus, Á.; Schwarczinger, I.* Antibacterial Effect of Essential Oils and Their Components against *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* Revealed by Microdilution and Direct Bioautographic Assays. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2023**, *13*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1204027.

[M4] Baglyas, M.; Ott, P. G.; Garádi, Z.; Glavnik, V.; Béni, S.; Vovk, I.; **Móricz, Á. M.*** High-Performance Thin-Layer Chromatography – Antibacterial Assay First Reveals Bioactive Clerodane Diterpenes in Giant Goldenrod (*Solidago gigantea* Ait.). *J. Chromatogr. A* **2022**, *1677*, 463308. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463308.

[M5] **Móricz, Á. M.***; Ott, P. G.; Alberti, Á.; Böszörményi, A.; Lemberkovics, É.; Szőke, É.; Kéry, Á.; Mincsovics, E. Applicability of Preparative Overpressured Layer Chromatography and Direct Bioautography in Search of Antibacterial Chamomile Compounds. *J. AOAC Int.* **2013**, *96* (6), 1214–1221. https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGEMoricz.

[M6] **Móricz, Á. M.***; Ott, P. G. Direct Bioautography as a High-Throughput Screening Method for the Detection of Antibacterial Components from Plant Sources. *J. AOAC Int.* **2015**, *98* (4), 850–856. https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGE1-Moricz.

[M7] Krüzselyi, D.; Bakonyi, J.; Ott, P. G.; Darcsi, A.; Csontos, P.; Morlock, G. E.; **Móricz, Á. M.*** Goldenrod Root Compounds Active against Crop Pathogenic Fungi. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69* (43), 12686–12694. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03676.

[M8] **Móricz, Á. M.***; Krüzselyi, D.; Alberti, Á.; Darcsi, A.; Horváth, G.; Csontos, P.; Béni, S.; Ott, P. G. Layer Chromatography-Bioassays Directed Screening and Identification of Antibacterial Compounds from Scotch Thistle. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1524*, 266–272. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.062.

[M9] **Móricz, Á. M.***; Jamshidi-Aidji, M.; Krüzselyi, D.; Darcsi, A.; Böszörményi, A.; Csontos, P.; Béni, S.; Ott, P. G.; Morlock, G. E. Distinction and Valorization of 30 Root Extracts of Five Goldenrod (*Solidago*) Species. *J. Chromatogr. A* **2020**, *1611*, 460602. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460602.

[M10] **Móricz, Á. M.***; Krüzselyi, D.; Lapat, V.; Ott, P. G. Acetylcholinesterase Inhibitors in the Giant Goldenrod Root. *J. Chromatogr. B* **2021**, *1185*, 123004. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.123004.

[M11] **Móricz, Á. M.***; Szeremeta, D.; Knaś, M.; Długosz, E.; Ott, P. G.; Kowalska, T.; Sajewicz, M. Antibacterial Potential of the *Cistus incanus* L. Phenolics as Studied with Use of Thin-Layer Chromatography Combined with Direct Bioautography and in Situ

Hydrolysis. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1534*, 170–178. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.056.

[M12] Łata, E.; Fulczyk, A.; Ott, P. G.; Kowalska, T.; Sajewicz, M.; **Móricz, Á. M.*** Thin-Layer Chromatographic Quantification of Magnolol and Honokiol in Dietary Supplements and Selected Biological Properties of These Preparations. *J. Chromatogr. A* **2020**, *1625*, 461230. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461230.

[M13] **Móricz, Á. M.***; Ott, P. G. Separation and Detection of Apricot Leaf Triterpenes by High-Performance Thin-Layer Chromatography Combined with Direct Bioautography and Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2022**, *1675*, 463167. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463167.

[M14] Reguigui, A.; Ott, P. G.; Darcsi, A.; Bakonyi, J.; Romdhane, M.; **Móricz, Á. M.*** Nine-Dimensional Bioprofiles of Tunisian Sages (*Salvia officinalis*, *S. aegyptiaca* and *S. verbenaca*) by High-Performance Thin-Layer Chromatography – Effect-Directed Analyses. *J. Chromatogr. A* **2023**, *1688*, 463704. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463704.

[M15] **Móricz, Á. M.***; Fornal, E.; Jesionek, W.; Majer-Dziedzic, B.; Choma, I. M. Effect-Directed Isolation and Identification of Antibacterial *Chelidonium majus* L. Alkaloids. *Chromatographia* **2015**, *78* (9–10), 707–716. https://doi.org/10.1007/s10337-015-2870-6.

[M16] **Móricz, Á. M.***; Häbe, T. T.; Ott, P. G.; Morlock, G. E. Comparison of High-Performance Thin-Layer with Overpressured Layer Chromatography Combined with Direct Bioautography and Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry for Tansy Root. *J. Chromatogr. A* **2019**, *1603*, 355–360. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.03.068.

[M17] **Móricz, Á. M.***; Lapat, V.; Morlock, G. E.; Ott, P. G. High-Performance Thin-Layer Chromatography Hyphenated to High-Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection-Mass Spectrometry for Characterization of Coeluting Isomers. *Talanta* **2020**, *219*, 121306. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121306.

[M18] **Móricz, Á. M.***; Ott, P. G.; Morlock, G. E. Discovered Acetylcholinesterase Inhibition and Antibacterial Activity of Polyacetylenes in Tansy Root Extract via Effect-Directed Chromatographic Fingerprints. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1543*, 73–80. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.02.038.

[M19] **Móricz, Á. M.***; Ott, P. G.; Yüce, I.; Darcsi, A.; Béni, S.; Morlock, G. E. Effect-Directed Analysis via Hyphenated High-Performance Thin-Layer Chromatography for Bioanalytical Profiling of Sunflower Leaves. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1533*, 213–220. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.034.

[M20] **Móricz, Á. M.***; Ott, P. G.; Böszörményi, A.; Lemberkovics, É.; Mincsovics, E.; Tyihák, E. Bioassay-Guided Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds from Thyme Essential Oil by Means of Overpressured Layer Chromatography, Bioautography and GC–MS. *Chromatographia* **2012**, *75* (17), 991–999. https://doi.org/10.1007/s10337-012-2233-5.

[M21] Cselőtey, A.; Baglyas, M.; Király, N.; Ott, P. G.; Glavnik, V.; Vovk, I.; **Móricz, Á. M.*** Bioassay-Guided Isolation and Identification of Antibacterial Compounds from

Invasive Tree of Heaven Stem and Trunk Bark. *Molecules* **2024**, *29* (24), 5846. https://doi.org/10.3390/molecules29245846.

[M22] **Móricz, Á. M.***; Ott, P. G.; Häbe, T. T.; Darcsi, A.; Böszörményi, A.; Alberti, Á.; Krüzselyi, D.; Csontos, P.; Béni, S.; Morlock, G. E. Effect-Directed Discovery of Bioactive Compounds Followed by Highly Targeted Characterization, Isolation and Identification, Exemplarily Shown for *Solidago virgaurea*. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (16), 8202–8209. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02007.

[M23] Baglyas, M.; Ott, P. G.; Schwarczinger, I.; Nagy, J. K.; Darcsi, A.; Bakonyi, J.; **Móricz, Á. M.*** Antimicrobial Diterpenes from Rough Goldenrod (*Solidago rugosa* Mill.). *Molecules* **2023**, *28* (9), 3790. https://doi.org/10.3390/molecules28093790.

[M24] Baglyas, M.; Bozsó, Z.; Schwarczinger, I.; Ott, P. G.; Bakonyi, J.; Darcsi, A.; **Móricz, Á. M.*** Discovery of Undescribed Clerodane Diterpenoids with Antimicrobial Activity Isolated from the Roots of *Solidago gigantea* Ait. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26* (18), 9187. https://doi.org/10.3390/ijms26189187.

[M25] Baglyas, M.; Ott, P. G.; Bozsó, Z.; Schwarczinger, I.; Bakonyi, J.; Dlauchy, D.; Darcsi, A.; Varga, S.; **Móricz, Á. M.*** Bioassay-Guided Isolation of Cis-Clerodane Diterpenoids and Monoglycerides from the Leaves of *Solidago gigantea* and Their Antimicrobial Activities. *Plants* **2025**, *14* (14), 2152. https://doi.org/10.3390/plants14142152.

[M26] Baglyas, M.*; Bozsó, Z.; Schwarczinger, I.; Ott, P. G.; Bakonyi, J.; Darcsi, A.; **Móricz, Á. M.*** Undescribed Antimicrobial Labdane Diterpenes from the Flowers of *Euthamia graminifolia*. *Phytochemistry* **2026**, *241*, 114674. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2025.114674.

[M27] **Móricz, Á. M.***; Baglyas, M.; Darcsi, A.; Balla, J.; Morlock, G. E. New Antioxidant Caffeate Esters of Fatty Alcohols Identified in *Robinia pseudoacacia*. *Molecules* **2024**, *29* (23), 5673. https://doi.org/10.3390/molecules29235673.

Rövidítések jegyzéke

(HP)TLC	(nagyhatékonyságú) vékonyrétegkromatográfia
$ABTS^{\cdot+}$	2,20-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfonsav
APCI	atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció
CNP-G3	2-kloro-p-nitrofenil-α-D-maltotriozid
DAD	diódasoros detektor
DART	direkt analízis valós időben
DESI	deszorpciós elektroporlasztásos ionizáció
DPA	difenil-amin
DPPH·	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EI	elektron ütköztetéses ionizáció
ESI	elektroprolasztásos ionizáció
FLD	fluoreszcens
FT-IR	Fourier-transzformációs infravörös
FT-Raman	Fourier-transzformációs Raman
GC	gázkromatográfia
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
hR_F	visszatartási tényező (értéke 0-100-ig)
IC_{50}	az 50%-os gátláshoz tartozó koncentráció
IR	infravörös
LA-ICP	lézerablációs induktív csatolású plazma
MALDI	mátrix-segített lézer deszorpció/ionizáció
MIC	legkisebb gátló koncentráció
MS	tömegspektrometria
NMR	mágneses magrezonancia
NP	normál fázisú
OPLC	túlnyomásos rétegkromatográfia
PABA	*p*-amino-benzoesav
RD	radioaktivitás detektor
R_F	visszatartási tényező (értéke 0-1-ig)
RP	fordított fázisú
SPME	szilárdfázisú mikroextrakció
TOF	repülési idő
UV	ultraibolya
Vis	látható

1. Bevezetés

A növényi eredetű természetes vegyületeket, többek közt növényi kivonatokat, főzeteket, illóolajokat, az emberiség ősidők óta használja gyógyító, egészségmegőrző szerként, valamint növényvédő szerként. Ezek az anyagok számos gyógyszer és növényvédőszer kifejlesztésében kulcsszerepet játszottak [1-4]. A növények országa több mint 300.000 fajjal kiaknázatlan tárháza a könnyű hozzáférhetőségű, különféle kémiai szerkezetekkel rendelkező és változatos hatásmechanizmusú bioaktív vegyületeknek, ami ígéretes forrássá teszi őket a kutatások számára [5, 6]. Az utóbbi évtizedekben számos kutatás irányult a növényi bioaktív természetes vegyületek vizsgálatára, mivel általában jobb a biohasznosulásuk és kevesebb mellékhatással bírnak, mint a szintetikus gyógyszerek [7, 8]. Említést érdemel az is, hogy a növényvédelemben kevésbé toxikusak más szervezetre és könnyebben lebomlanak [9]. Napjainkban óriási az igény az új (természetes eredetű) hatóanyagokra, különösen az egészségügyben az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia megjelenése miatt [10, 11] és egyes betegségek terápiájának hatékonyabbá tételére, vagy éppen a fenntartható mezőgazdaságban a szintetikus peszticidek kiváltására [12-14]. A természetes hatóanyagok kutatásának új lendületet adott néhány technológiai és tudományos fejlesztés, mint pl. új analitikai technikák, módszerek, és kutatási stratégiák bevezetése [7]. Az egyik legígéretesebb stratégia a biológiai aktivitás irányította drog kutatás [15, 16], ami lehetővé teszi a hatást kiváltó vegyületek nem célzott keresését és kiválasztását. Ennek eszköze a hatás irányította analízis [17], ami magában foglalja a kívánt hatással rendelkező vegyület detektálását és jellemzését. A legtöbb *in vitro* biológiai teszt (pl. diffúziós és hígításos módszerek) a teljes minta (pl. kivonat, frakció vagy izolátum) hatását vizsgálja, és nem ad információt egy összetett minta komponenseiről [18]. Ezzel szemben a folyadékkromatográfiához csatolt biológiai esszék alkalmasak az elválasztott komponensek hatásának vizsgálatára [18], azonban az ilyen csatolások megvalósítása a gyakorlatban korlátozott. Munkám során ezen technikák és csatolásaik fejlesztését és növényi bioaktív vegyületek kutatásában való alkalmazását tűztem ki célul.

2. A biológiai aktivitással rendelkező vegyületek kimutatása és jellemzése – (HP)TLC csatolások előnyei

2.1. (HP)TLC csatolások alkalmazása bioaktivitás kimutatására

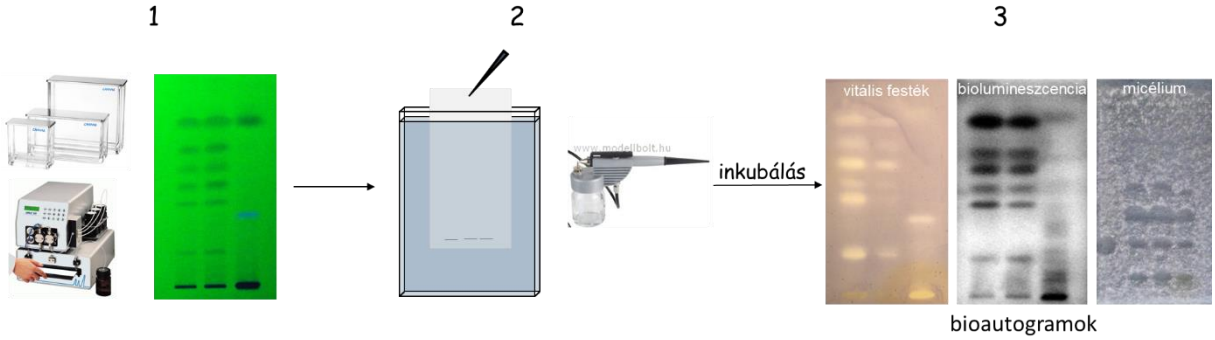
Ha összehasonlítjuk az oszlop és sík elrendezésű kromatográfiás technikákat, akkor nyilvánvalóan a ma már széles körben elterjedt kényszeráramlásos oszlopkromatográfiás módszerek jobb elválasztást tesznek lehetővé, mint a hagyományos (HP)TLC, viszont az elválasztott komponensek az oszlop után általában nagy szerves oldószer tartalmú effluensben vannak, ami alapvetően nem kompatibilis a biológiai rendszerekkel. Ennek ellenére nem csak kémiai reagens alapú bioaktivitás teszteket (pl. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, DPPH· [19] és 2,20-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfonsav, $ABTS^{\cdot+}$ [20]) sikerült on-line mód csatolni a HPLC-hez, hanem különféle biokémiai teszteket is, amikkel sikerült pl. acetilkolinészteráz [21], butirilkolinészteráz [22], foszfodiészteráz [23], vagy glutation-S-transzferáz [24] enzimeket gátló vegyületeket kimutatni. Ezekben az esetekben a tesztekhez segédpumpák segítségével juttatják az effluensbe az enzimet, a szubsztrátot, és szükség esetén az enzimreakció termékével színreakciót adó reagenst. Továbbá, reakciócellák beépítésével teszik

lehetővé a reakciók megfelelő lejátszódását, amik azonban sávszélesedést okoznak [25]. Az effluensben lévő szerves oldószer jelenléte miatt mindenképpen számítani kell rá, hogy az enzimek egy része inaktívvá válik, illetve hogy az optimális (fiziológiás) körülmények hiányában az enzim nem működik megfelelően [21]. Az egyetlen irodalomban fellelhető HPLC-vel on-line csatolt biológiai (sejt alapú) tesztben a lumineszcens *Aliivibrio fischeri* baktériumokat juttatták a HPLC effluensbe és utána luminométerrel detektálták az elválasztott anyagok antibakteriális hatását [26]. Az anyagok retenciós idejének megfelelő lumineszcencia csökkenés mutatta az anyagok gátló hatásának mértékét, de mellette a háttér lumineszcencia, azaz a baktérium sejtek életképessége is folyamatosan csökkent az effluensben lévő metanol koncentrációjának növekedésével [26]. Azonban hiába jelent meg több közlemény is a sikeresnek ítélt HPLC és bioaktivitás teszt on-line csatolásáról, ezek nem terjedtek el a szakmai körökben. Ennek magyarázata az lehet, hogy egyrészt a meglehetősen nehézkes technikai megoldás több eluens pumpát igényel, másrészt a reakciócellák jelentős sávszélesedést okoznak (elválasztási hatékonyság vesztés) [22, 27], harmadrészt az enzim/sejt megfelelő működése is megkérdőjelezhető. Viszont annál jobban elterjedtek a HPLC frakciók gyűjtése, beszárítása, majd újra szuszpendálása utáni off-line biológiai tesztek. Ilyen mikrofrakciók vizsgálatára vezettek be többek között antioxidáns [20, 28], acetilkolinészteráz [27, 28], α-glükozidáz [29], és antibakteriális [30] teszteket. De hasonló elvek mentén pl. parazitaellenes hatást vizsgáltak parazitával fertőzött vörösvértesteket alkalmazva [31], vagy megvágott zebrahalakon néztek gyulladásgátló hatást [32]. Fontos megjegyezni, hogy a HPLC-hez off-line csatolt bioaktivitás teszteknek óriási hátránya, hogy egyszerre egy minta analizálható és az eluenst el kell távolítani a frakciókról a tesztelés előtt.

Ezzel szemben (HP)TLC-vel párhuzamosan több minta is analizálható [33-35], azaz nagy mintaáteresztő képességű a technika. Mivel nyitott rendszerű, ezért a kromatográfiás kifejlesztés után könnyen eltávolítható az adszorbensről a szerves mozgófázis, ezáltal könnyen kompatibilissé tehető biológiai [18, 36, 37] és biokémiai [38-40] esszékkel, így biztosítva az elválasztott anyagok *in situ* vékonyrétegen való tesztelését. További előnyei a (HP)TLC-nek a HPLC-vel összevetve, hogy i) egy vékonyréteget csak egyszer használunk, ezért nincs keresztszennyezés, ii) általában a mintaelőkészítésre nem kell nagy hangsúlyt fektetni, a nyers kivonat is vizsgálható, iii) nem csak a retencióval nem bíró, de a mintafelviteli pontban maradó komponens is detektálható és bevonható a biológiai vizsgálatba.

A síkelrendezésű kromatográfiás elválasztások közül először 1946-ban végeztek papírkromatográfiával elválasztott penicillineken posztkromatográfiás antibakteriális tesztet, az úgynevezett kontakt bioautográfia (a kromatogram ráfektetése fertőzött agarra) módszerével [41]. Ezek után az 1970-es évekre már TLC-hez csatolt immerziós (a kromatogram lefedése fertőzött agarral) [42] és direkt bioautográfiás [43] módszereket is alkalmaztak antimikrobiális hatás kimutatására. A bioautográfiás módszerek közül a direkt bioautográfia a leggyorsabb és legegyszerűbben végrehajtható [18, 44, 45], amely során a mikroorganizmus szuszpenziót közvetlenül az adszorbensre viszik fel agar réteg nélkül, így az elválasztott anyagok közvetlenül érintkezésbe kerülnek a mikroorganizmussal, így nem játszik szerepet az agar rétegbe való diffúzió (1. ábra). A bioautogramok előhívása leggyakrabban vitális festékkel (festékoldat felvitelével) történik. Ilyen célra például a tetrazóliumsók vizes oldatát lehet alkalmazni, amikor is a világos színű sókat az élő baktérium képes redukálni színes formazan vegyületekké [46].

További lehetőségek is léteznek a bioautogram megjelenítésére, pl. biolumineszcens mikroorganizmusok alkalmazása során a metabolikusan aktív világító sejtek hiánya (sötét zóna) sötétkamrában hűtött kamerával dokumentálható [47], illetve fonalas gombák [48, 49] vagy színanyagot termelő mikroorganizmusok [49, 50] esetében a micéliumok, illetve a színanyag termelés hiánya látható [45].



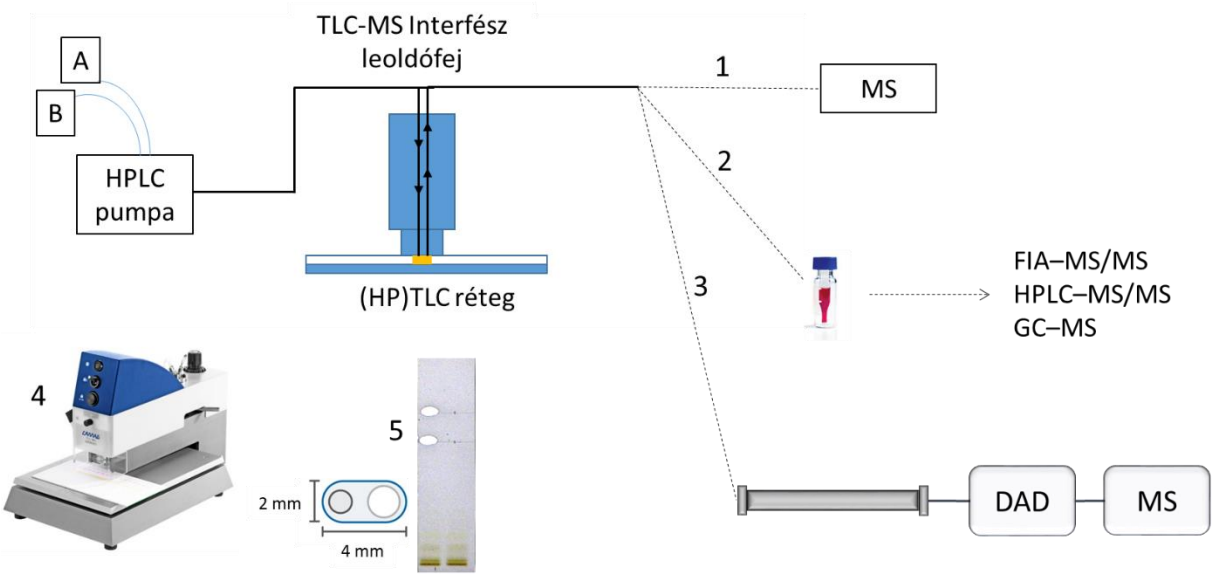
1. ábra A vékonyrétegkromatográfiához csatolt antimikrobiális hatást kimutató direkt bioautográfiás módszer lépései

1 – elválasztás vékonyrétegen (pl. TLC, HPTLC, OPLC); 2 – a mikroorganizmus (sejt, spóra, vagy micélium) szuszpenzió adszorbensre juttatása merítéssel vagy permetezéssel; 3 – a bioautogramok megfelelő inkubálás utáni detektálása, vitális festék, biolumineszcens mikroorganizmus és fonalas gomba alkalmazása esetén (a világos, a sötét és a micélium hiányos zónák az aktívak, megfelelően).

A 70-es évektől folyamatosan bővült azon baktériumok és gombatörzsek listája, amiket alkalmaztak (HP)TLC–direkt bioautográfiára [51, 52], illetve további (HP)TLC-hez csatolt biológiai aktivitást kimutató esszéket is kidolgoztak. A baktériumokon és gombákon kívül pl. algát (*Pseudokirchneriella subcapitata*) [53] és protozoa sejtet (*Leishmania infantum*) [54] is bevontak a tesztekbe. Élő sejteket nem csak az antimikrobiális tesztekben alkalmaznak; a hormon hatást (ösztrogén [55], androgén [56] és antagonisták [57]) módosított élesztősejtek, míg genotoxicitást módosított *Salmonella* [58] vagy *Escherichia coli* [59] sejtek segítségével lehet megjeleníteni a (HP)TLC-n. Ezeken kívül kidolgoztak kémiai reagensek alkalmazásán alapuló bioaktivitást kimutató teszteket is. A különféle betegségekben szerepet játszó oxidatív stressz [60] kezelésére alkalmas antioxidáns hatású vegyületek kémiai reagensekkel mutathatók ki, mint pl. a viszonylag stabil szabad gyök DPPH· vagy $ABTS^{\cdot+}$, vagy a könnyen oxidálható *β*-karotin, linolsav vagy Fe^{2+} alkalmazásával [38, 61]. Egyes betegségekben, illetve terápiájukban szerepet játszó enzimekre is dolgoztak ki (HP)TLC-hez csatolt enzimgátló biokémiai teszteket [38], mint pl. a kolinészteráz [62, 63], glükozidáz [64], xantin oxidáz [65] és lipáz [66] enzimekre. A teszt során az enzimet és a szubsztrátot felviszik a vékonyrétegre, majd megfelelő inkubáció után az enzim-szubsztrát reakció termékét detektálják, ha kell újabb, színreakciót adó reagens hozzáadásával [63]. A gyorsabb és egyszerűbb tesztek olyan szubsztrátot alkalmaznak, amelyek fluoreszcens termék képződését eredményezik [67, 68]. A (HP)TLC–enzimgátló esszékbe bevont enzimek köre folyamatosan bővül, illetve a módszereket is többféle módon fejlesztik, annak érdekében, hogy minél gyorsabbak legyenek és minél kisebb kimutatási határ legyen elérhető [38].

2.2. A vékonyrétegkromatográfia fejlődése és a spektroszkópiás és spektrometriás technikákkal való csatolása

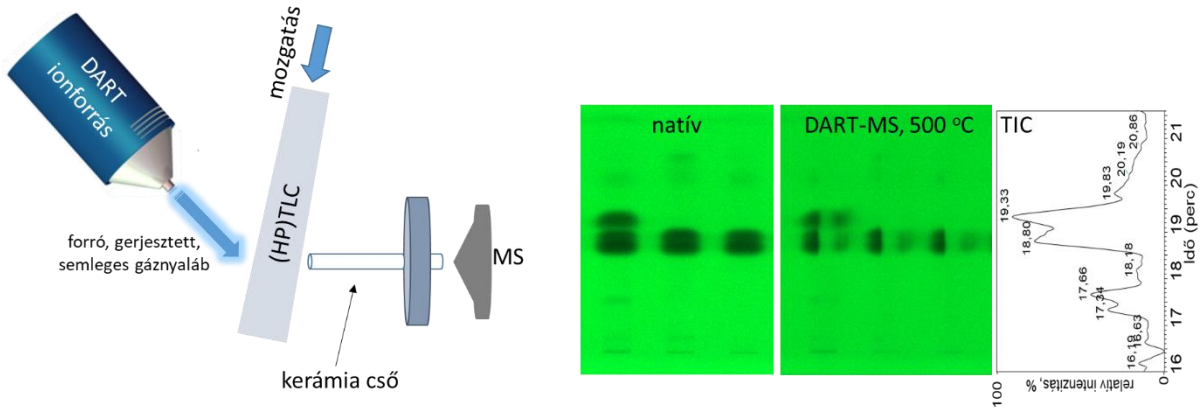
Az utóbbi évtizedekben a hagyományos (HP)TLC technika is nagyon sokat fejlődött, széles körben elterjedt a modern, műszeres változata. A gépi (automatizált) mintafelvitel, kifejlesztés és származékképzés mindennapi eszközzé váltak, elősegítve a megbízható, ismételhető, valamint hatékonyabb elválasztások és mennyiségi eredmények elérését [69, 70]. Az elválasztott komponensek detektálására különféle spektroszkópiás és spektrometriás technikák csatolását oldották meg. A spektroszkópiás technikák közül a legszélesebb körben az ultraibolya (UV), látható (Vis) és fluoreszcens (FLD) értékelést lehetővé tevő denzitometriás, illetve videodenzitometriás értékelés [71, 72] terjedt el. A (HP)TLC zónákban lévő komponensek *in situ* analízisére további spektroszkópiás technikákat is alkalmaznak, mint például az infravörös (IR) [73], Fourier-transzformációs infravörös (FT-IR) [73, 74], Raman [75, 76], és FT-Raman [77, 78] spektroszkópiákat. A tanulmányozni kívánt komponensek (HP)TLC zónájának lekaparása és eluálása után azok jellemzésére szinte végtelen az analitikai lehetőség, a korábban említett technikák mellett akár NMR-rel is bővíthető az analitikai profil [79, 80]. Az utóbbi két évtizedben különösen nagy fejlődésen ment keresztül a (HP)TLC–tömegspektrometria (MS) csatolás [81]. A leoldófejes (HP)TLC–MS csatolás (2. ábra) [82] mellett néhány deszorpciós alapú interfészt alkalmazó MS, mint pl. a deszorpciós elektroporlasztásos ionizáció MS (DESI-MS) [83], a direkt analízis valós időben MS (DART-MS) (3. ábra) [84], a mátrix segített lézer deszorpció/ionizáció MS (MALDI-MS) [85], és a lézerablációs induktív csatolású plazma MS (LA-ICP-MS) [86] (HP)TLC-hez való csatolását is megvalósították.



2. ábra TLC-MS interfész alkalmazásával létrehozható (HP)TLC csatolások

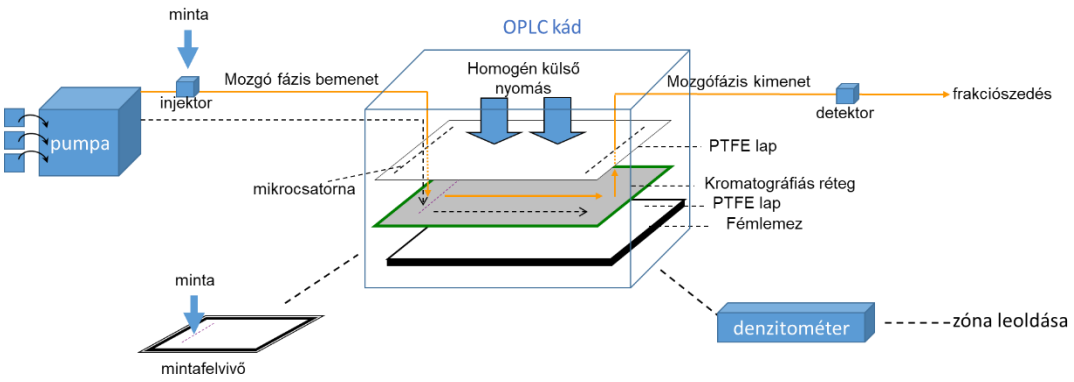
1 – közvetlen (HP)TLC–MS, a leoldófej által lezárt rétegről a pumpa által áramoltatott eluens leoldja és közvetlen az MS-be szállítja a komponenseket; 2 – off-line csatolási lehetőségek, a leoldott komponensek összegyűjtés után különféle csatolt technikákkal analizálhatók; 3 – közvetlen (HP)TLC–HPLC–DAD-MS. Az interfész (4) a HPTLC kromatogramon látható 2 mm x 4 mm-es ovális zónákat (5) zárta le az elúcióhoz.

A hagyományos (HP)TLC technika mellett megjelentek a kényszeráramlásos vékonyrétegkromatográfiás technikák, amelyek közül a túlnyomásos rétegkromatográfia (OPLC) biztosít állandó lineáris sebességet, így állandó hatékonyságot a teljes kifejlesztési távolságban [87-90]. Az OPLC esetében egy pumpa áramoltatja az eluenst egy szélein polimerrel, felülről külső nyomást biztosító folyadékpárnával lezárt rétegben. Egy rendkívül flexibilis technikáról van szó, mivel alkalmazható teljesen off-line, a hagyományos (HP)TLC-hez hasonlóan, a minta rétegre való szárításával és a réteg végéig való kifejlesztéssel, vagy teljesen on-line, a HPLC síkrendszerű analógjaként, a minta folyadékáramba való injektálásával és az eluens túlfuttatásával és átfolyócellás (4. ábra) [91] és/vagy MS [92] detektálással. További flexibilitást jelent az on-line és off-line megoldások vegyes alkalmazása [87, 93].



3. ábra A (HP)TLC–DART-MS szkennelő technika sematikus ábrája

A DART ionforrásból érkező forró, gerjesztett, semleges gáznyalábban egyenletes sebességgel mozgatott (HP)TLC kromatogramról a deszorbeált és ionizált komponensek egy kerámia csövön keresztül kerülnek az MS-be. A szkennelés előtti és utáni HPTLC kromatogram (254 nm-en) és az első kromatográfiás sávról felvett totál ion kromatogram (TIC) bemutatása.



4. ábra Az OPLC kád felépítése és működési módjai

A teljesen on-line OPLC (–) lépései a mintainjektálás, a túlfuttatásos kifejlesztés, az átfolyócellás detektálás és az opcionális frakciószedés. A teljesen off-line OPLC (---) a minta vékonyrétegre való szárítását, a kromatogram legfeljebb 18 cm-es kifejlesztését, denzitometrálást és a kromatográfiás zóna esetleges leoldását foglalja magában.

3. Célkitűzések

Az utóbbi évtizedben egyre nagyobb az igény a biológiailag aktív természetes vegyületekre, különösen az alternatív gyógyászatban, illetve a biogazdálkodásokban, a növényi betegségek elleni hatékonyabb és kevésbé környezetterhelő védekezéshez. Új hatóanyagokra azért is fokozott igény van, mert például egyes korábban alkalmazott szerek hatékonysága mára lecsökkent a változatos genetikai törzsekkel rendelkező mikroorganizmusokban kialakult ellenállóság miatt (rezisztencia). A föld flórája az új bioaktív vegyületek kimeríthetetlen tárháza, mivel a fajai a legkülönfélébb szerkezetű és hatású másodlagos metabolitot termelik.

Munkám során az alábbi célokat tűztem ki:

- (HP)TLC/OPLC, 2D-(HP)TLC és (HP)TLC–HPLC módszerek kidolgozása növényi alapú minták komponenseinek elválasztására.

- (HP)TLC/OPLC–bioesszé csatolások bevezetése és fejlesztése antimikrobiális és enzimgátló növényi komponensek kimutatására.

- (HP)TLC/OPLC–MS csatolások alkalmazása a bioaktív növényi komponensek jellemzésére.

- Antimikrobiális hatású növényi komponensek bioaktivitás ((HP)TLC/OPLC–bioesszé) irányította izolálása (fél)preparatív folyadékkromatográfiás technikák segítségével.

4. Vizsgálati módszerek

A vékonyrétegkromatográfiás elválasztásokat elsősorban szilikagél TLC és HPTLC rétegen végeztük, de alkalmaztunk szférikus és preparatív szilikagél réteget, valamint amino-HPTLC réteget is. Az antioxidáns, antibakteriális, antifungális vagy enzimgátló (*α*- és *β*-glükozidáz, α-amiláz, acetilkolinészteráz és butirilkolinészteráz) aktivitású növényi komponensek kimutatását TLC, HPTLC vagy OPLC technikákhoz csatolt direkt bioautográfiás módszerekkel végeztük. A bioaktív (HP)TLC/OPLC zónákban lévő vegyületeket reagens vizsgálatokkal, (HP)TLC/OPLC–UV/Vis/FLD és (HP)TLC/OPLC–(HR)MS(/MS) technikákkal jellemeztük, illetve azonosítottuk. (HP)TLC/OPLC–MS analízishez ESI vagy DART ionizációt alkalmaztunk. A (HP)TLC–ESI-MS és (HP)TLC–HPLC csatolásokat TLC-MS interfész segítségével valósítottuk meg. A vékonyrétegről leoldott komponensek *off-line* analíziséhez HPLC–ESI-MS és SPME-GC–EI-MS technikákat alkalmaztunk. Az aktív növényi komponensek bioaktivitás irányította izolálását preparatív szilikagél TLC-s, preparatív normál fázisú és fordított fázisú flash kromatográfiás vagy félpreparatív RP-HPLC-s frakcionálási és tisztítási lépésekkel végeztük (HP)TLC/OPLC csatolásokkal vezérelve. Az izolált vegyületek azonosítását spektroszkópiai (NMR, polarimetria) és tömegspektrometriai (FIA/HPLC–ESI-MS és GC–EI-MS) mérésekkel végeztük. Az izolátumok antimikrobiális hatását különféle baktérium és gomba törzsekkel szemben mikrohígításos módszerrel ellenőriztük, meghatározva a MIC (legkisebb gátló koncentráció) és/vagy IC_{50} (az 50%-os gátláshoz tartozó koncentráció) értéküket.

5. Eredmények

5.1. Új mikroorganizmusok bevezetése (HP)TLC–direkt bioautográfiás alkalmazásra és (HP)TLC–enzimtesztek továbbfejlesztése

A (HP)TLC–direkt bioautográfia bevezetése óta több mint 40 baktérium és közel ennyi gomba törzset vontak be ilyen tesztekbe [52]. Az évek során több növénykórokozóra elsőként dolgoztunk ki (HP)TLC–direkt bioautográfiás módszert [94, M1-M7]. A Gram-negatív baktériumok közül a többféle gazdanövényen levélfoltosságot okozó [95] *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* [94, M5, M6], a paprika levélfoltosságát okozó [96] *Xanthomonas euvesicatoria* [M1], a burgonya és paradicsom baktériumos hervadását, valamint a burgonya barna rothadását okozó [97] *Ralstonia solanacearum* [M1], és a csonthéjas gyümölcsök (mandula, szilva, őszibarack, sárgabarack) foltosságát okozó [98] *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* [M3] növénykórokozókat vezettük be a tesztbe. Továbbá, a széles gazdakörrel rendelkező, fokozott levélképződést okozó [99] *Rhodococcus fascians* [M4] Gram-pozitív baktériumra, illetve a fonalas gombakórokozók közül a gabonafélék és pillangósvirágúak gyökérrothadását, a gabonafélék kalász fuzáriózisát, illetve a burgonya szárazkorhadását okozó [100] *Fusarium avenaceum* [M2] és a búza és árpa levélfoltosodást okozó [101] *Bipolaris sorokiniana* [M7] fajokra is dolgoztunk ki (HP)TLC–direkt bioautográfiás esszét. Az antifungális tesztekhez micélium szuszpenziót alkalmaztunk, tehát micélium növekedésgátló hatást mutattunk ki a gombafonalakkal be nem szőtt területeken. Korábban már alkalmaztak *Fusarium* konídium-szuszpenziót direkt bioautográfiás és dot-blot (a mintát a TLC rétegre felcseppentve, kifejlesztés nélkül) tesztekben [pl. 43, 102, 103], de ezekben nem tudták elkülöníteni a spóra csírázást gátló és a micélium növekedést gátló hatásokat [104]. Ezek a (HP)TLC–direkt bioautográfiás tesztek különösen alkalmasak az adott növénykórokozók ellen hatásos növényi vegyületek egyszerű, gyors szűrésére.

A *P. syringae* pv. *maculicola* esetében egy kromoszomálisan génmódosított (luxCDABE, [105]) lumineszcens törzset [94, M5, M6] alkalmaztunk. A génmódosított világító baktérium alkalmazásával a bioautogram festéssel való előhívása elhagyható, így gyorsabb lesz a teszt, és kizárunk egy teszteredményt befolyásoló hibaforrást. Természetes lumineszkáló mélytengeri baktériumokat, mint az *A. fischeri* baktériumot már 1996-ban is alkalmaztak direkt bioautográfiára [106], majd 2019-ben a szintén természetes világító mélytengeri *Photobacterium phosphoreum* baktériumra is dolgoztak ki direkt bioautográfiás módszert [107]. Azonban génmódosított világító baktériumot (növénypatogén *P. syringae* pv. *maculicola*) laborunk használt először direkt bioautográfiára [94]. Lényegesen később, 2016-ban dolgozták ki az USA-ban direkt bioautográfia módszert génmódosított világító *Mycobacterium tuberculosis* humán kórokozó baktériumra [79]. Természetes lumineszkáló növényi, illetve humán kórokozó mikroorganizmust eddig nem írtak le, így csak génmódosítással érhető el, hogy gyorsabb és megbízhatóbb antimikrobiális teszteket dolgozhassunk ki. A vitális festékkel való előhívás okozhat fals negatív eredményt, mivel egyes természetes vegyületek (pl. a sztilbén transz-rezveratrol és az izoflavonoid genistein) maguk is képesek redukálni a festésre gyakran alkalmazott tetrazóliumsókat, megakadályozva a gátló zóna kialakulását [108-110]. A muskotályzsálya illóolajában lévő linalil-acetát esetében mi is

tapasztaltuk, hogy a HPTLC–*Bacillus subtilis* bioautogramon a Gauss-eloszlású kromatográfiás zónájának a közepe besötétedett tetrazóliumsóval való festés után, míg a zóna szélén egy világos gyűrű jelezte az antibakteriális hatást [M6].

Ezeken kívül a probiotikus Gram-pozitív *Lactobacillus plantarum* baktériumra [111] is fejlesztettünk HPTLC–direkt bioautográfiás esszét [M8]. Az orálisan alkalmazott antibiotikumok megváltoztathatják a gyomor-bél traktusban található bakteriális flóra igen összetett közösségét, többek között hasmenést és/vagy vastagbélgyulladást okozva. Ezen mellékhatások csökkentése érdekében probiotikumok alkalmazása javasolt. Az antibiotikumok különböző flórafajokra gyakorolt hatásának ismerete segíthet eldönteni, hogy milyen baktérium törzseket kell pótolni az egyensúly helyreállításához. A *L. plantarum*, az egyik átmeneti faj a bélflórában, amely anaerob és aerob környezetben is képes növekedni. Az *L. plantarum* számos növényben és erjesztett élelmiszerben is jelen van, és számos különböző szénhidrátot képes fermentálni [112]. Magas szintje az emberi bélben negatívan korrelál az elhízással [113], és immunmoduláló hatást fejt ki például széles spektrumú antimikrobiális aktivitása révén [114], ezért különösen fontos ezen probiotikum antibakteriális hatású anyagokkal szembeni érzékenysége.

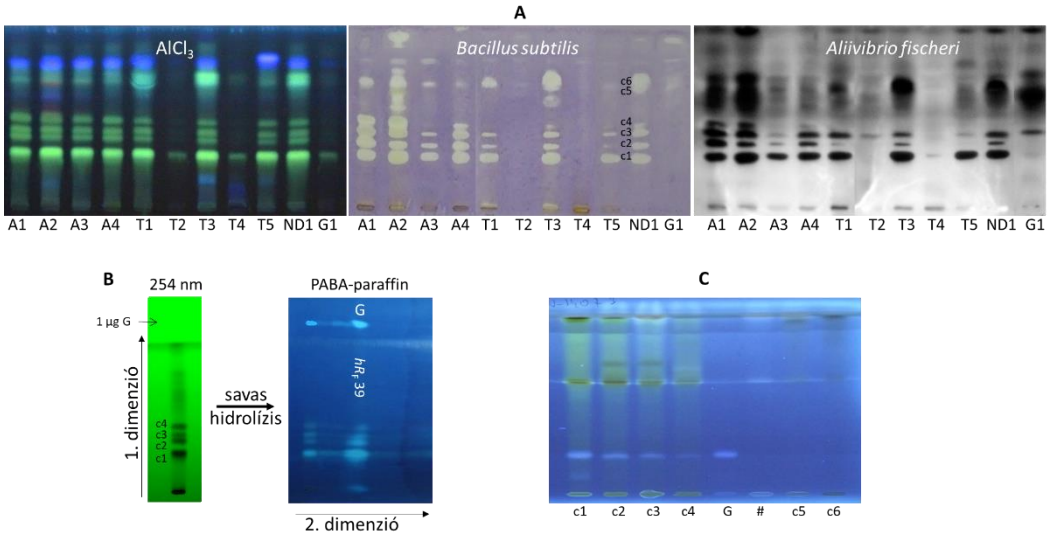
(HP)TLC–enzimgátló tesztek továbbfejlesztéséről is több közleményünk jelent meg [M9, M10]. A glükozidáz- és amilázgátló anyagok csökkentik a vér étkezés utáni glükóz szintjét, ezért a népbetegségnek számító kettes típusú diabétesz, túlsúly és elhízás kezelésében is szerepet játszhatnak [115-117]. Már a múlt században kidolgoztak (HP)TLC-hez csatolt módszereket α- és β-glükozidáz enzimekre [118], amit környezetbarátabbá tettek a sokkal kisebb oldattérfogatot igénylő piezoelektromos permetezés (CAMAG derivatizáló) alkalmazásával [119], illetve egyszerűsítettek olyan szubsztrát felhasználásával, amelyből fluoreszcens termék képződik, így a termék festésének a lépése elhagyható [67, 120]. Az először publikált (HP)TLC–α-amiláz módszerhez keményítőt használtak szubsztrátnak és jóddal hívták elő a megmaradó keményítőt [121]. A későbbiekben folyadékfázisú tesztekben bevezették a 2-kloro-*p*-nitrofenil-α-D-maltotriozid (CNP-G3) szubsztrát alkalmazását [122, 123]. Az α-amiláz gyorsan bontja a nagyon stabil CNP-G3-at (tört fehér színű), és a keletkező 2-kloro-4-nitrofenol (sárga) 5 percen belül detektálható 405 nm-en. Ezen színváltozás tette lehetővé, hogy az irodalomban elsőként kidolgozzunk egy (HP)TLC–α-amiláz tesztet a CNP-G3 szubsztrát alkalmazásával, ahol a sárga háttérrel szemben a világos zónák jelzik az enzimgátló aktivitást, és nem kell egy újabb lépésben láthatóvá tenni a bioautogramot [M9].

Az első HPTLC–kolinészteráz tesztek acetil-tiokolin-jodidot alkalmaztak szubsztrátnak és az enzimmel való reakcióban keletkezett tiokolint Ellman-reagenssel (5,5′-ditio-bisz-2-nitrobenzoesav) detektálták, így halvány sárga háttérrel szemben fehér foltokként mutatkoztak a gátló zónák [124]. Hogy jobban látszódjanak a világos gátló zónák, a szubsztrátot α-naftil-acetátra cserélték, és az enzimreakcióban keletkező α-naftolt Fast Blue B reagenssel festették meg, bíborvörös hátteret biztosítva [63]. További fejlesztésként, a festés kiiktatására, a 3-indoxil-acetátot alkalmazták szubsztrátként, így az enzimreakcióban keletkező indoxil és annak az oxidációjából származó indigófehér kék fluoreszcenciáját detektálhatjuk háttérként, és fekete gátló zónákat láthatunk 365 nm-es UV-fényben [125]. A közölt módszert fejlesztettük

tovább, összevonva első lépésként a kromatogram semlegesítését és indoxil-acetát szubsztráttal való bevonását (pufferben oldott szubsztrátba merítve a kromatogramot), majd azt követően az enzim oldatot airbrush-sal permeteztük. Az általunk kifejleszett módszer előnyeként megemlíthető, hogy kevesebb lépésből áll, illetve kevesebb enzim oldatot igényel (kb. 4 ml) mint a merítés (kb. 40 ml), így gyorsabb és sokkal gazdaságosabb is [M10].

5.2. (HP)TLC csatolások alkalmazása bioaktív komponensek kimutatására és jellemzésére

Amint a bevezetőben bemutattam, a (HP)TLC számos előnye miatt kiválóan alkalmazható nyers növényi kivonatokban jelen lévő bioaktív komponensek nem célzott analízisére, és a kimutatott komponensek célzott jellemzésére [126, 127]. A kísérletek során szinte mindig normál fázisú szilikagélt alkalmaztunk, ettől csak néhány esetben tértünk el, ezeknél az alkalmazott állófázist mindig feltüntettem. Ennek legfőbb oka az, hogy a (HP)TLC–biológiai esszék elsősorban szilikagélen működnek, RP18-on nem, RP18W-n korlátozottan [55].



5. ábra Bodorrózsa minták (A1-A4, T1-T5, ND1 és G1) vizsgálata (HP)TLC-vel

A – a TLC-vel (kloroform – metanol – etil-acetát 15:3:2 *V*/*V*/*V*) elválasztott antibakteriális fenolos vegyületek (c1–c6) kimutatása alumínium-klorid reagenssel és direkt bioautográfiával *Bacillus subtilis* és *Aliivibrio fischeri* baktériumokkal szemben; **B** – a c1–c4 vegyületek glükóz (G) építőkövének kimutatása szilikagél rétegen 2D-HPTLC-vel (1. dimenzió: kloroform – metanol – etil-acetát 15:3:2 *V*/*V*/*V*, 2. dimenzió: 1. acetonitril, 2. acetonitril–víz 7:3 *V*/*V*) köztes *in situ* savas hidrolízissel és PABA-paraffin reagenssel; **C** – A glükóz mint építőkő kimutatása amino-HPTLC rétegen az izolátumok felvitele utáni *in situ* savas hidrolízis és kétszeres kifejlesztés (1. acetonitril, 2. acetonitril – víz 7:3 *V*/*V*) utáni hevítés (140 °C 5 percig) alkalmazásával.

A nyers kivonatok mellett növényi kivonatok frakciói is vizsgálhatók, mint ahogy a gyógynövény bodorrózsa (*Cistus incanus*) fenolos vegyületeinek vizsgálatánál [128, M11], vagy a magnólia tartalmú étrend-kiegészítők [M12] esetében tettük. A beszerzett tizenegy

különböző bodorrózsa teafű fenolos vegyületeit a szakirodalomban található módszerrel [129] hat frakcióra választottuk szét. A flavonoid aglikonok, a szabad fenolos savak, az apoláris flavonoid glikozidok, a poláris flavonoid glikozidok, a savas hidrolízissel kapott fenolos savak, és a lúgos hidrolízissel kapott fenolos savak közül a (HP)TLC–direkt bioautográfiás vizsgálatok alapján a flavonoid aglikonok frakciója volt az antibakteriális vegyületekben leggazdagabb [128], amit tovább vizsgáltunk. A fenolos vegyületeket TLC-n kloroform – metanol – etil-acetát (15:3:2, *V*/*V*/*V*) mozgófázissal választottuk el [M11]. TLC–direkt bioautográfiával a Gram-pozitív *B. subtilis* és a lumineszcens Gram-negatív *A. fischeri* baktériumokkal szemben hat zóna (c1-c6) mutatott karakterisztikus gátlást, amelyek 254 nm-en is láthatóak voltak, és a fenolos komponensekre jellemző [130] sárga fluoreszcens zónát adtak alumínium-klorid és természetes vegyület reagenssel, és barnát vas(III)-kloriddal (5A. ábra). Összehasonlítva a 11 minta kémiai és biológiai profilját, egyértelműen látszott, hogy három mintánál (T2, T4 és G1) részben vagy teljesen hiányoztak a többire jellemző kromatográfiás, illetve bioaktív zónák. Ez jelentheti azt, hogy ezek a minták nem tartalmaztak elegendő bodorrózsát, vagy nem megfelelő minőségűt (5A. ábra) [M11].

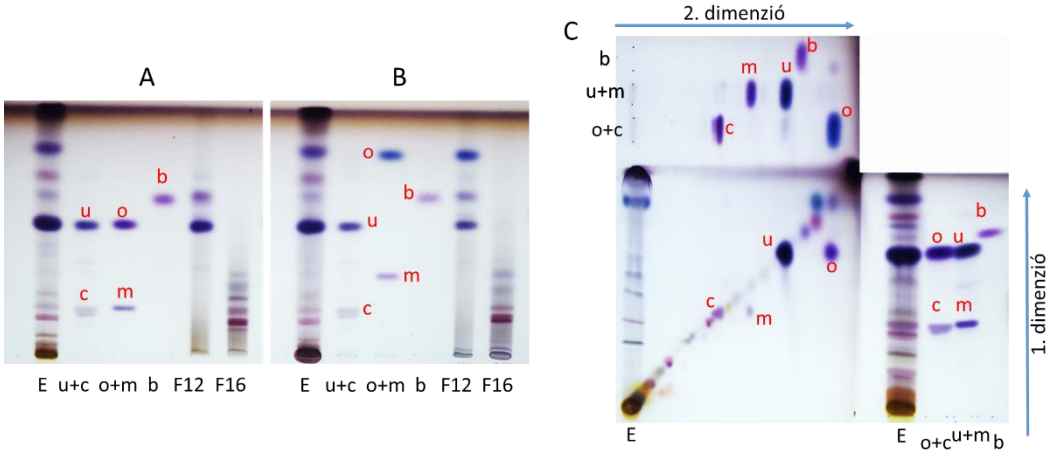
A TLC-n elválasztott nagyobb mennyiségű minta c1-c6 zónáiban lévő komponenseket lekaparás és etanolos leoldás után HPLC–DAD-ESI-MS-sel analizáltuk. Az irodalmi adatokkal összevetve a *Cistus* fajokban már leírt [131] apigenint és kaempferol-3-metil-étert (izokaempferid) azonosítottuk a c5 és c6 zónákban, az apigenin jelenlétét standarddal is megerősítettük. A c1-c4 zónákban az előzetes várakozással szemben, a flavonoid aglikonoknál nagyobb tömegű komponenseket detektáltunk, a c1-ben két 594 g/mol, a c2-c4 zónákban külön-külön több 740 g/mol moláris tömegű, feltételezhetően egymással izomer vegyület volt jelen. Mindegyik tömegspektrumában jellemzően megjelent a molekulaion $[M+1]^+$ mellett az $[M–285]^+$ fragmension is, ami a szakirodalmi adatokat [132] is figyelembe véve, a bodorrózsából készített termékekben korábban leírt kaempferol-kumaroil-glükopiranozid (tilirozid, c1) és a kaempferol-di-kumaroil-glükopiranozid (c2-c4) izomerek jelenlétére utalt. Mindazonáltal, csak a tilirozid izomereket találtuk meg a nyers kivonatban, így a kaempferol-di-kumaroil-glükopiranozid izomerek valószínűleg a flavonoid aglikon frakció készítésekor keletkeztek, azaz műtermékek. Említést érdemel, hogy a molekulákban lévő redukáló cukrokat nem tudtuk kimutatni DPA (difenil-amin) és PABA (*p*-aminobenzoesav) reagensekkel (Maillard-reakción alapuló kimutatás) [130], ezért a komponensek azonosításának további megerősítéseként a kaempferol és glükóz építőkövek kimutatását is elvégeztük. A kétdimenziós folyadékkromatográfia nagy kihívást jelent az on-line csatolt HPLC-k világában [133], viszont a (HP)TLC-nél könnyen megoldható, mivel az első kifejlesztés után a megszárított kromatogramot elforgatva 90 fokkal, könnyen végrehajtható a 2. dimenziós kifejlesztés [33]. A két dimenzióban különböző szelektivitású mozgófázist alkalmazva jobb elválasztás érhető el, és az egyes dimenziók csúcskapacitásának a szorzata lesz a végső elméleti csúcskapacitás. A 2D-(HP)TLC különlegessége, hogy a két elválasztás között birtokunkban van az első dimenzióval kapott megszárított kromatogram. Újdonságként olyan módszereket fejlesztettünk ki, ahol kihasználtuk a kifejlesztések közötti állapotot a minta komponenseinek különféle átalakítására, azaz a második kifejlesztés előtt végeztünk el pre-kromatográfiás derivatizálást az első kifejlesztéssel kapott egész mintasávon.

Az építőkövek kimutatására egy 2D-HPTLC-s módszert dolgoztunk ki, a két dimenzió közé egy *in situ* savas hidrolízist beiktatva [M11]. A kaempferol mint építőkő kimutatására a c1-c6 zónák elválasztása után 120 percig tartottuk HCl gőzben a réteget és utána 90 fokkal elforgatva végeztük el a második kifejlesztést toluol – *i*-propil-acetát – hangyasav (3:2:0.5, *V/V/V*) eluenssel. A glükóz, mint építőkő kimutatásához hasonlóan jártunk el, de az első kifejlesztés után csak 10 percre raktuk HCl gőzbe a réteget, hevítettük 100 °C-on 8 percig üveg alatt és 2 percig szabadon, majd merőlegesen először acetonitrillel, majd acetonitril – víz (4:1, *V/V*) eluenssel fejlesztettük ki a kromatogramot (5B. ábra). A második dimenzióban alkalmazott kétszeri kifejlesztés oka az, hogy a savas hidrolízis után először az egyéb termékeket eluáljuk acetonitrillel a frontba, majd utána kromatografáljuk a cukrot a víztartalmú eluenssel. Az acetonitriles „mosás" nélkül a glükóz kromatográfiás zónáját zavarták a savas hidrolízis során keletkező melléktermékek és asszimmetrikussá vált. Ezen módszerekkel sikerült kimutatni alumínium-klorid reagenssel a kaempferol, DPA és PABA reagenssel a glükóz építőkövet a c1-c4 zónákban lévő bodorrózsa komponensekben. A glükóz esetében a PABA reagenssel keletkező kék fluoreszcenciás jelet sikerült paraffinnal intenzívebbé tenni [134], ami alkalmas módszer a kimutatási határ csökkentésére. A Maillard-reakció végbe megy az amino-módosított HPTLC rétegen is hevítésre [134], így ilyen típusú rétegen reagens hozzáadása nélkül mutattuk ki a c1-c4 zónákban lévő komponensekben lévő glükóz építőkövet, miután a felvitt eluátumokat *in situ* a rétegen savasan hidrolizáltuk sósav gőzzel és acetonitriles mosás után acetonitril-víz (7:3, *V/V*) eluenssel elválasztottuk a glükózegységeket (5C. ábra) [M11].

Manapság különös nagy figyelmet kap a botanikai eredetű étrend-kiegészítők biztonságosságának, valamint a legnagyobb, egészségügyi kockázatot nem jelentő napi bevitel meghatározása [135-137]. Az étrend-kiegészítők globális piaca erőteljesen bővül, ugyanakkor mivel élelmiszernek tekintik őket, a vonatkozó jogi szabályozások kevésbé szigorúak, mint a gyógyszerekre vonatkozóak. Következésképpen, nagy szükség van pontos, robusztus és költséghatékony analitikai módszerekre az étrend-kiegészítő készítmények egyes összetevőinek ellenőrzésére. A növényi alapú étrend-kiegészítők párhuzamos kémiai és biológiai profiljának összehasonlítására, és így minőségi vizsgálatára is alkalmas a (HP)TLC. HPTLC vizsgálatok alapján, a kereskedelmi forgalomban elérhető magnólia tartalmú étrend-kiegészítők között szintén találtunk nem megfelelő minőségűt, amelyekben nem volt jelen a növény két fő hatóanyaga, a bifenil neolignán honokiol és a magnolol [M12]. Mindkét vegyület antioxidáns és antibakteriális hatását kimutattuk HPTLC-hez csatolt bioaktivitás tesztekkel (DPPH·, *B. subtilis* és *A. fischeri*). A teszteket közvetlenül a HPTLC kifejlesztés (mozgófázis: *n*-hexán – etil-acetát – etanol 16:3:1 *V/V/V*) után végeztünk el, mivel a szilikagél rétegen stabilitási problémát tapasztaltunk. Stabilitásuk vizsgálatára a tiszta vegyületek kétdimenziós elválasztását végeztük el, az azonos mozgófázissal végzett kifejlesztések között 20 órát várakozva. A mintafelviteli ponttól kiinduló átlón kívül elhelyezkedő melléktermékek megjelenését tapasztaltuk, amiket 2D-HPTLC–MS technikával jellemeztünk. Ilyen 2D-(HP)TLC módszerrel könnyen végezhető stabilitás vizsgálat is, pl. az egymásba könnyen átalakuló *cisz-transz* izomerek, vagy a könnyen oxidálódó vegyületek is kimutathatók.

A 2D-HPTLC egy köztes derivatizálás beiktatásával hatékony elválasztási megoldást jelentett triterpének elválasztásában is. Egyes triterpének, mint az urzolsav – oleánolsav és

koroszolsav – maszlinsav párok, nem választhatók el szilikagélen, csak például jóddal vagy brómmal való derivatizálás után [138, M13]. *In situ* a mintafelviteli pontban jóddal végzett pre-kromatográfiás derivatizálás után (kloroformban oldott jódot vittünk a mintafelviteli zónára) sikerült elválasztanunk és vanillin-kénsavas előhívással kimutatnunk a kritikus párokat sárgabarack (*Prunus armeniaca*) levél [M13] és három zsálya faj (*Salvia officinalis, S. aegyptiaca* és *S. verbenaca*) [M14] kivonatában (mozgófázisok: kloroform – etil-acetát – metanol 85:9:6 *V/V/V* és toluol – etil-acetát – metanol 6:3:0.5 *V/V/V*, megfelelően). A növénykivonatokban nagyon kis mennyiségben lévő maszlinsav kimutatásának megerősítése egy köztes derivatizálással elvégzett 2D-HPTLC (6. ábra) [M13], illetve a pre-kromatográfiás derivatizálás utáni HPTLC–MS [M14] segítségével történt a zavaró komponensek jelenléte miatt. Az előbbinél a maszlinsavat elválasztottuk a mátrixtól, a második esetében pedig az MS szelektív kimutatást biztosított az egyébként közel univerzális vanillin-kénsav reagenssel való előhívással szemben.



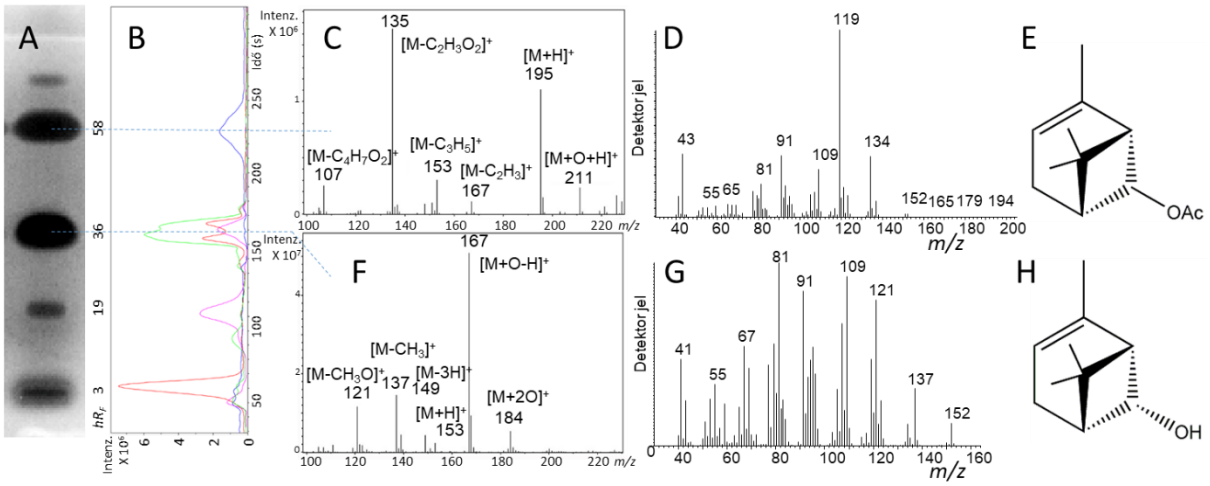
6. ábra Triterpének kimutatása sárgabarack levél kivonatában

A levél metanolos kivonatának (E), két flash kromatográfiás frakciójának (F12 és F16), valamint a triterpén urzolsav (u), oleanolsav (o), betulinsav (b), koroszolsav (k) és maszlinsav (m) vanillin-kénsav reagenssel előhívott HPTLC kromatogramja (mozgófázis: kloroform – etil-acetát – metanol 85:9:6 *V/V/V*) (**A**), a módszer alkalmazása *in situ* jóddal való pre-kromatográfiás derivatizálás után (**B**), valamint 2D-HPTLC elválasztás (mozgófázis mindkét dimenzióban: kloroform – etil-acetát – metanol 20:3:2 *V/V/V*) köztes *in situ* jóddal való derivatizálással és vanillin-kénsavas előhívással (**C**).

A TLC–MS csatolást leggyakrabban a kereskedelmi forgalomban elérhető TLC-MS interfésszel [82, 139] valósítják meg. Ez egy elúciós alapú leoldófejes megoldás, ami lehetővé teszi a kromatogram 2 mm x 4 mm-es részének lezárását és az ott lévő komponensek megfelelő eluens átáramoltatásával való leoldását és közvetlenül az MS-be történő bevezetését (2. ábra). Ezekben a csatolásokban elsősorban elektroporlasztásos ionizációt (ESI) alkalmaznak [139-142], ami a vegyületek nagy részét (kivéve a nagyon apoláris vegyületeket) képes ionizálni, de a szakirodalomban van példa a kis molekulatömegű apolárisabb molekulák ionizálását is biztosító atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció (APCI) alkalmazására is [142, 143]. A TLC-MS interfész bevezetése egy gyorsabb és akár kvantitatív (HP)TLC–MS [144, 145] analízist

biztosít a korábban alkalmazott módszerrel szemben, amikor a kijelölt kromatográfiás zónákból lekapart adszorbensről leoldották a komponenst egy mintatartó üvegbe és az eluátumot analizálták [146]. Mind a lekaparásos off-line [M15], mind az interfészes on-line [pl. M2, M4, M7, M9, M10, M12-14] megoldást alkalmaztuk biológiai aktivitást mutató (HP)TLC zónákban lévő komponensek ESI-MS jellemzésére, amikhez a (HP)TLC–biotesztekkel párhuzamosan kifejlesztett natív rétegeket használtunk.

A TLC-MS interfész megkönnyíti a (HP)TLC oszlopkromatográfiával való csatolását is (2. ábra). A (HP)TLC zónában lévő komponensek off-line HPLC–MS vagy GC–elektron ütköztetéses ionizáció (EI)-MS vizsgálata kivitelezhető a lekapart zónáról kapott eluátummal [147, 148], de a TLC-MS interfész segítségével a lekaparás elhagyható és a mintatartó üvegbe gyűjtött eluátum közvetlenül analizálható [M3]. Itt meg kell jegyezni, hogy illékony komponensek esetében a (HP)TLC-ről eluált mintákat érdemesebb szilárdfázisú mikroextrakció (SPME)-GC–EI-MS-sel analizálni, mert ez esetben a vékonyrétegből az illékony komponenseken túl leoldott anyagokat nem visszük az oszlopra, ezzel meghosszabbítva az élettartamát [M1, M3]. Lekaparással (7. ábra D, G) [M1], illetve TLC-MS interfésszel [M3] kapott eluátumok off-line SPME-GC–EI-MS analízisével azonosítottunk számos illóolaj komponenst, amelyek antibakteriális hatást mutattak HPTLC–direkt bioautográfia tesztekben.



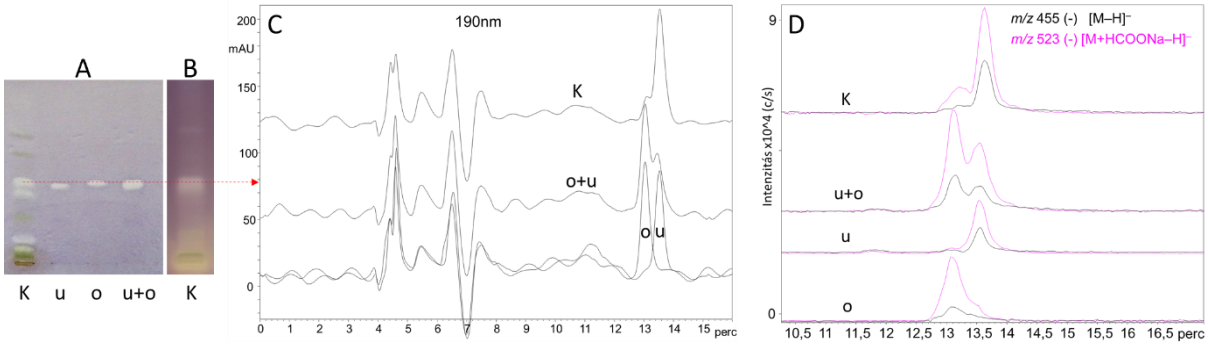
7. ábra Gilisztaűző varádics illóolaj bioaktív komponenseinek a vizsgálata

Az antibakteriális komponensek kimutatása HPTLC–*Aliivibrio fischeri* esszével (**A**), a HPTLC–DART-MS szkenneléssel kapott totál ion kromatogram (**B**) és a hR_F 36 és 58 zónákban kapott spektrumok (**C** és **F**, megfelelően), valamint a leoldott zónák SPME-GC–EI-MS analízisével kapott spektrumok (**D** és **G**, megfelelően) és a zonákban azonosított vegyületek, a *transz*-krizentenil-acetát (**E**) és a *cisz*-krizantenol (**H**) szerkezeti képlete. A HPTLC elválasztást kétszeres toluollal való kifejlesztéssel végeztük.

A TLC-MS interfész lehetővé tesz egy nem szokványos 2D-LC–MS megoldást is, amikor az első dimenzióban (HP)TLC szilikagélen választjuk el az anyagokat, majd a kiválasztott kromatográfiás zónában lévő komponenseket TLC-MS interfész segítségével eluáljuk és

közvetlenül egy fordított fázisú HPLC oszlopra vezetjük elválasztásra (második dimenzió) (2. ábra). Ilyen ortogonális HPTLC–TLC-MS interfész–HPLC–MS megközelítést alkalmaztak például a koffeinnel impregnált HPTLC rétegen elválasztott vegyületek MS analízisére, hogy a HPTLC–MS során a koffein által okozott háttérzajt megszüntessék a vizsgálandó vegyületek és a koffein RP-HPLC-s elválasztásával [149]. Említést érdemel, hogy kolinészteráz gátló alkaloidokat vizsgáltak TLC–HPLC-diódasoros detektor (DAD) és repülési idő (TOF) MS csatolással [150]. Ez a megoldás nagyon hasznos a HPTLC–biológiai tesztek kis csúcskapacitásának az ellensúlyozására, az esetleges koeluálódó komponensek meghatározására, különösen abban az esetben, ha sem az automatizált többszöri kifejlesztés [151], sem a 2D-(HP)TLC [125], sem a kényszeráramlásos technikák [M16] nem segítenek az elválasztás megoldásában.

Ilyen a triterpén urzolsav – oleánolsav konstitúciós izomerpár esete, amelyeket szilikagélen csak pre-kromatográfiás derivatizálás után lehet elválasztani. A citromfű (*Melissa officinalis*) kivonatának HPTLC–direkt bioautográfiás vizsgálatában (HPTLC mozgófázis: *n*-hexán – etil-acetát 7:3 *V*/*V*) ezen triterpénekkel azonos hR_F értékű bioaktív zónát kaptunk a triterpénekre jellemző HPTLC–HRMS spektrummal [M17] (8. ábra). A HPTLC–UV/Vis/FLD–TLC-MS interfész–HPLC–DAD-MS csatolást alkalmazva meghatároztuk, hogy mindkét triterpén jelen van a citromfű antibakteriális és α-glükozidáz gátlást mutató HPTLC zónájában, de az urzolsav a dominánsabb (8. ábra). További érdekesség, hogy a DAD detektorral is tudtuk követni a HPLC elválasztást, de az UV-kromatogramon megjelent a megszárított rétegről a HPLC oszlopra vitt levegő (4 és 8 perc között), ami esetünkben a retenciós idők különbsége miatt nem zavarta a vizsgált vegyületek (13 perc körül) detektálását [M17]. A HPTLC–UV/Vis/FLD–biológiai teszt–HPLC–MS rendszer alkalmazhatóságát elsőként német kollégák publikálták le, ugyanabban az évben [152].

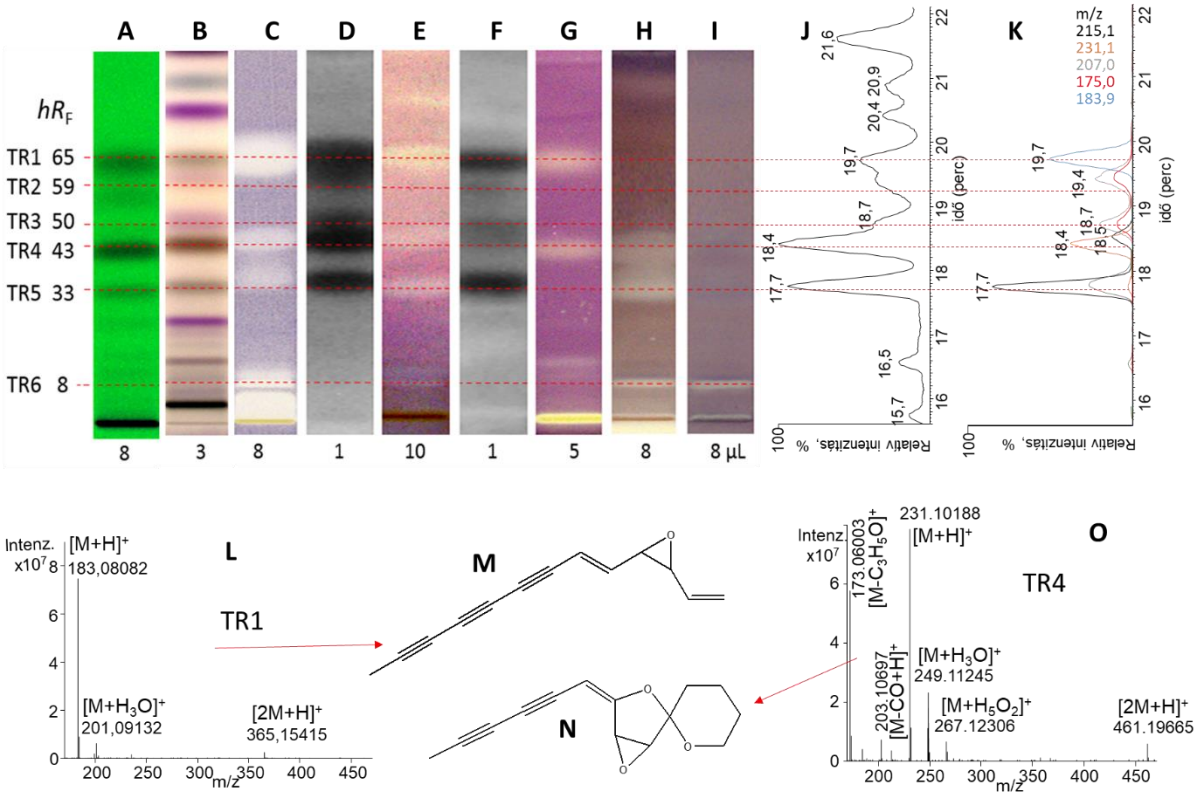


8. ábra A citromfű bioaktív triterpén vegyületeinek HPTLC–HPLC–DAD-MS analízise

A citromfű kivonat (K) és konstitúciós izomer triterpénjeinek (u – urzolsav, o – oleanolsav) kimutatása HPTLC–*Bacillus subtilis* (**A**) és HPTLC–α-glükozidáz (**B**) esszékkel, és a triterpének kromatográfiás zónáinak HPTLC–TLC-MS interfész–HPLC–DAD-MS vizsgálatával kapott UV (190 nm, **C**) és extrakt ion kromatogramok (**D**). HPTLC mozgófázis: *n*-hexán – etil-acetát 7:3 *V*/*V*, RP-HPLC (C_{18}) mozgófázis: acetonitril – víz – hangyasav 95:5:0,1 *V*/*V*/*V*, 0,2 ml/perc áramlási sebességgel.

Korábban már említettem, hogy a leggyakrabban az elúciós alapú leoldófejes TLC-MS interfész [82, 139] segítségével végeznek TLC–MS vizsgálatokat, mégpedig ESI vagy APCI ionizáció [139-143] alkalmazásával. Érdemes megemlíteni, hogy ennek a technikai megoldásnak vannak korlátai. Ilyen az ionforrás által meghatározott ionizálható és detektálható vegyületek köre, valamint a vizsgálható (HP)TLC zóna mérete, amit a leoldófej által lezárható terület (2 mm x 4 mm) határoz meg. Ezért igény volt más TLC–MS megoldások bevezetésére, mint például a különféle deszorpción és ionizáción alapuló MS csatolásokra [81, 153]. A 2005-ben bevezetett DART-MS [154] gerjesztett, semleges, forró (300-500 ^{o}C) gáznyalábot alkalmaz és szilárd és folyékony minták analízisét teszi lehetővé légköri nyomáson. Diszkriminatív technikának tekinthető, mivel csak az adott hőmérsékleten deszorbeálódó és gázhalmazállapotúvá váló vegyületek analizálhatók vele. Az első TLC–DART-MS csatolást 2007-ben publikálták [84], de azóta jelentős átalakításon ment keresztül a technika, pl. az ionforrás és a transzfercső kialakításában, az adszorbens pozíciójában és mozgásában, és az interfész geometriájában [155, 156]. A TLC-hez csatolt deszorpciós-ionizációs technikák közül egyik sem terjedt el a gyakorlatban, annak ellenére sem, hogy a TLC–MALDI-MS-hez és a TLC–DART-MS-hez kereskedelmi forgalomban elérhető speciális TLC feltét. További előnye ezeknek a csatolt technikáknak, hogy nem csak egy kromatográfiás zónában lévő vegyületek MS és tandem MS spektrumának a felvételére alkalmasak, hanem a teljes mintasáv szkennelésére is.

A gyógynövényként és dísznövényként is ismert gilisztaűző varádics (*Tanacetum vulgare*) és a napraforgó (*Helianthus annuus*) bioaktív komponenseinek HPTLC–MS vizsgálatai során tapasztaltuk, hogy a DART egy lágy ionizációs technika, de az ESI-vel szemben gyakran több fragmens ion jelenik meg a felvett MS spektrumban [M18, M19], de azért jelekben nem olyan gazdag az MS spektrum, mint EI alkalmazásával (7. ábra) [M1]. A légköri DART ionizációra jellemzők a spektrumokban megjelenő oxidációs termékek, mint ahogy mi is tapasztaltuk pl. az $[M+O+H]^+$, $[M+O–H]^–$, $[M+H_3O]^+$, $[M+3OH]^+$ és $[M+2O]^+$ ionok képződését [M1, M18, M19]. Munkánk során megtapasztaltuk, hogy az ESI-MS és a DART-MS kiválóan kiegészítheti egymást, így biztosítva az MS-sel analizálható vegyületek szélesebb körét [M18, M19]. Érdemes megemlíteni, hogy volt olyan bioaktív növényi (gilisztaűző varádics és napraforgó) komponens, ami kizárólag csak HPTLC–ESI-MS-sel vagy HPTLC–DART-MS-sel volt detektálható. A gilisztaűző varádics antibakteriális illóolaj komponenseit a két technika közül, kizárólag HPTLC–DART-MS-sel tudtuk analizálni (7. ábra) [M1]. Ugyanezen növény gyökérkivonatában HPTLC–antibakteriális/antioxidáns/enzimgátló tesztekkel kimutatott bioaktív poliacetilén vegyületek is intenzív jelet adtak HPTLC–DART-HRMS analízissel (9. ábra) [M18]. Megjegyzem, hogy a TR1 zónában (9. ábra) lévő pontika-epoxid ESI-vel nagyon gyengén ionizálódott, a nátrium addukt jelintenzitása zajszinten volt, de DART-MS-sel karakterisztikus, kiértékelhető jelet adott [M18]. A növénykivonatok komponenseire általában jellemző, hogy inkább (HP)TLC–ESI-MS-sel detektálhatók és (HP)TLC–DART-MS-sel nem, mint pl. a napraforgó levél antioxidáns zónájában lévő komponensek [M19].



9. ábra Gilisztaűző varádics gyökér bioaktív vegyületeinek vizsgálata HPTLC csatolásokkal

A gyökér kivonat HPTLC zónáinak (TR1–TR6) kimutatása 254 nm-en (**A**), vanillin-kénsavas előhívás után (**B**), *Bacillus subtilis* (**C**), lumineszcens *Aliivibrio fischeri* (**D**), *Xanthomonas euvesicatoria* (**E**), és luminescens *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (**F**) antibakteriális esszékkel, DPPH· antioxidáns teszttel (**G**), és acetilkolinészteráz (**H**) és butiril-kolinészteráz (**I**) enzimgátló tesztekkel; a HPTLC–DART-HRMS szkenneléssel kapott totál ion kromatogram (**J**), a zónáknak megfelelő extrakt ion kromatogramok (**K**), valamint a TR1 (**L**) és TR4 (**O**) zónákhoz tartozó DART-MS spektrumok és a zónákban főkomponensként azonosított 2-non-1-én-3,5,7-trinil-3-vinil-oxirán (pontika epoxid, **M**) és 2-(2,4-hexadiinilidén)-3,4-epoxi-1,6-dioxaspiro-[4.5]-dekán (**N**) szerkezeti képlete. HPTLC mozgófázis: *n*-hexán – izopropil-acetát 9:1 *V*/*V*.

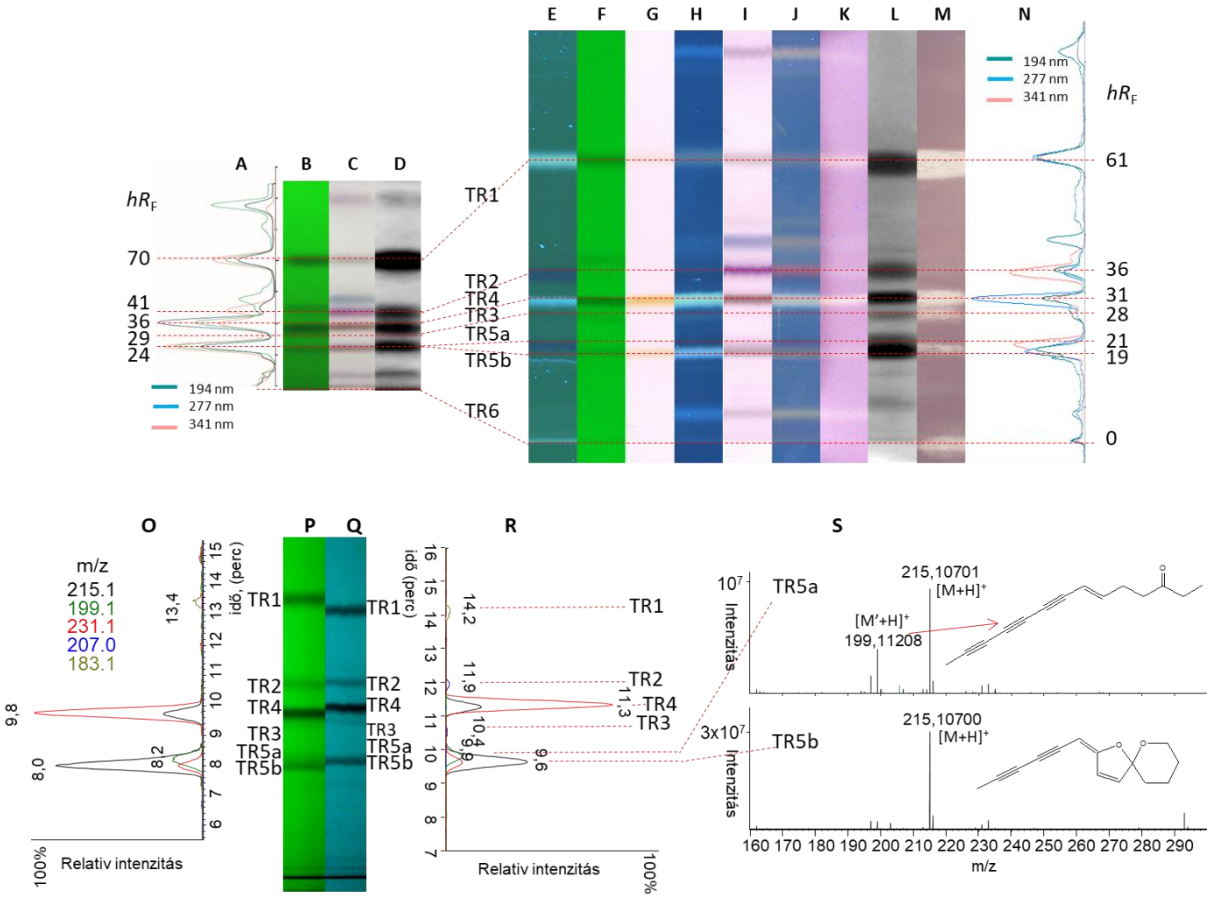
A bemutatott eredményekből is látható, hogy a nyitott rendszerű (HP)TLC bioaktivitás tesztekkel való csatolása megoldható és így az elválasztott vegyületek antioxidáns, antimikrobiális, vagy enzimgátló hatása *in situ* az adszorbensben kimutatható. A (HP)TLC-hez csatolt spektroszkópiai és spektrometriai technikákkal pedig jellemezni, azonosítani lehet a kiválasztott zónákban lévő komponenseket. Kihívást jelent a megfelelő elválasztás elérése és az összetettebb vegyületek jellemzése annak érdekében, hogy a bioaktivitásért felelős komponenseket megfelelően azonosíthassuk. Ilyen kihívások megoldására mutattunk példákat, mint pl. a különféle 2D-LC megoldások, akár köztes derivatizálással.

5.3. OPLC csatolások alkalmazása bioaktív vegyületek vizsgálatára

A kényszeráramlásos vékonyrétegkromatográfiás technikák (pl. rotációs planáris kromatográfia, planáris elektrokromatográfia, nyíróerő kromatográfia és túlnyomásos

vékonyrétegkromatográfia), nagyobb elválasztási hatékonyságot (gyorsabb, jobb elválasztás) biztosíthatnak a kapilláris erő hajtotta hagyományos vékonyrétegkromatográfiánál [157]. A túlnyomásos rétegkromatográfia magyar kutatók által a 20. század hetvenes éveiben kifejlesztett technika [158], amiben a vékonyréteg zárva, nyomás alatt van egy ultramikro kamrában [159], és a mozgófázist pumpa áramoltatja. Ezzel a gőzfázist kizárja és lehetővé teszi a konstans, optimális lineáris áramlási sebesség alkalmazását a kifejlesztés teljes hosszában [87, 88, 90, 160]. Mivel az adszorbens ágy bármikor, illetve bármilyen kifejlesztési távolságnál nyitva lehet, a mintafelvitelnél, az elválasztási folyamat kiértékelésénél vagy befejezésénél, így az OPLC egyesíti a (HP)TLC és a HPLC előnyeit [87, 89, 90]. A teljesen off-line kifejlesztés során a mintát mintafelvivővel visszük fel a legalább három oldalán zárt vékonyrétegre, a kifejlesztést legfeljebb a vékonyréteg végéig végezzük és a hagyományos (HP)TLC-ben alkalmazott detektálási módszerek teljes arzenálját használhatjuk [87]. A lineáris áramlási sebesség eredménye, hogy az elválasztási hatékonyság (elméleti tányérszám) közel állandó a teljes elválasztási távolságban [161] és rövidebb idő alatt hosszabb kifejlesztési távolságot lehet elérni, ezzel növelve a csúcskapacitást. Jobb elválasztást, kompaktabb kromatográfiás zónákat, így érzékenyebb detektálást tud biztosítani a hagyományos, kapilláris erő hajtotta HPTLC-vel összevetve, ahol a kifejlesztés során az áramlási sebesség négyzetesen csökken, ezért 7-8 cm-es kifejlesztési távolság felett jelentős a kromatográfiás hatékonyság csökkenése [161, 162]. A technika hátrányaként megemlíthető, hogy a teljesen off-line OPLC elválasztásnál száraz vékonyréteget használunk, így a teljes nedvesedési front régiójában deformálódnak (cikk-cakk alak) az elválasztott komponenesek kromatográfiás foltjai [163]. Ennek a hatásnak a csökkentésére alkalmazható a réteg feltöltése egy gyenge, elúciót nem okozó oldószerrel [164], vagy az infúziós OPLC [93]. Az infúziós OPLC-s kifejlesztés során mind a négy oldalán lezárt réteget használunk és a mozgófázis kivezetését lezárjuk, így a belső nyomás folyamatosan növekszik, ami kiegyenesíti a teljes nedvesedési frontot.

OPLC technikát alkalmaztunk többek között a gilisztaűző varádics bioaktív poliacetilénjeinek az elválasztására. Hagyományos HPTLC-vel (mozgófázis: toluol – *n*-hexán 7:3 *V*/*V*, 16 perc kifejlesztési idő, 7 cm kifejlesztési távolság) két komponenst nem tudtunk elválasztani egymástól (10. ábra), így biológiai hatásukat sem tudtuk külön vizsgálni HPTLC–bioaktivitás tesztekkel [M16]. Ezzel szemben, infúziós OPLC-vel gyorsabban és hosszabb kifejlesztési távolságot alkalmazva el tudtuk választani mind a hét bioaktív komponenst (mozgófázis: toluol – *n*-hexán 7:3 *V*/*V*, HPTLC réteg, 7 perc kifejlesztési idő, 16 cm kifejlesztési távolság). Így az infúziós OPLC-s elválasztás lehetővé tette az egyes poliacetilén komponensek OPLC–direkt bioautográfiás és OPLC–DART-MS vizsgálatát, bizonyítva azok jobb elválasztását (nagyobb felbontás) (10. ábra). A TR5 zónában lévő két komponens felbontása hagyományos HPTLC-vel gyakorlatilag 0 volt, OPLC-vel pedig HPTLC rétegen 0,5, míg szférikus vékonyrétegen 0,9. Az OPLC elválasztással bebizonyítottuk, hogy egy bioaktív HPTLC zónában két komponens koeluálódott ($C_{14}H_{14}O$ és $C_{14}H_{14}O_2$ összegképlettel) és nem a zóna vizsgálata során történt oxidáció. Továbbá megfigyeltük, hogy mindkettő vegyület aktív a Gram-negatív *A. fischeri* baktériummal szemben, de csak az egyik gátolja a Gram-pozitív *B. subtilis* baktériumot. Szférikus réteget használva tovább tudtuk növelni a komponensek közötti távolságot (felbontást).



10. ábra A gilisztaűző varádics gyökér bioaktív komponenseinek vizsgálata OPLC csatolásokkal

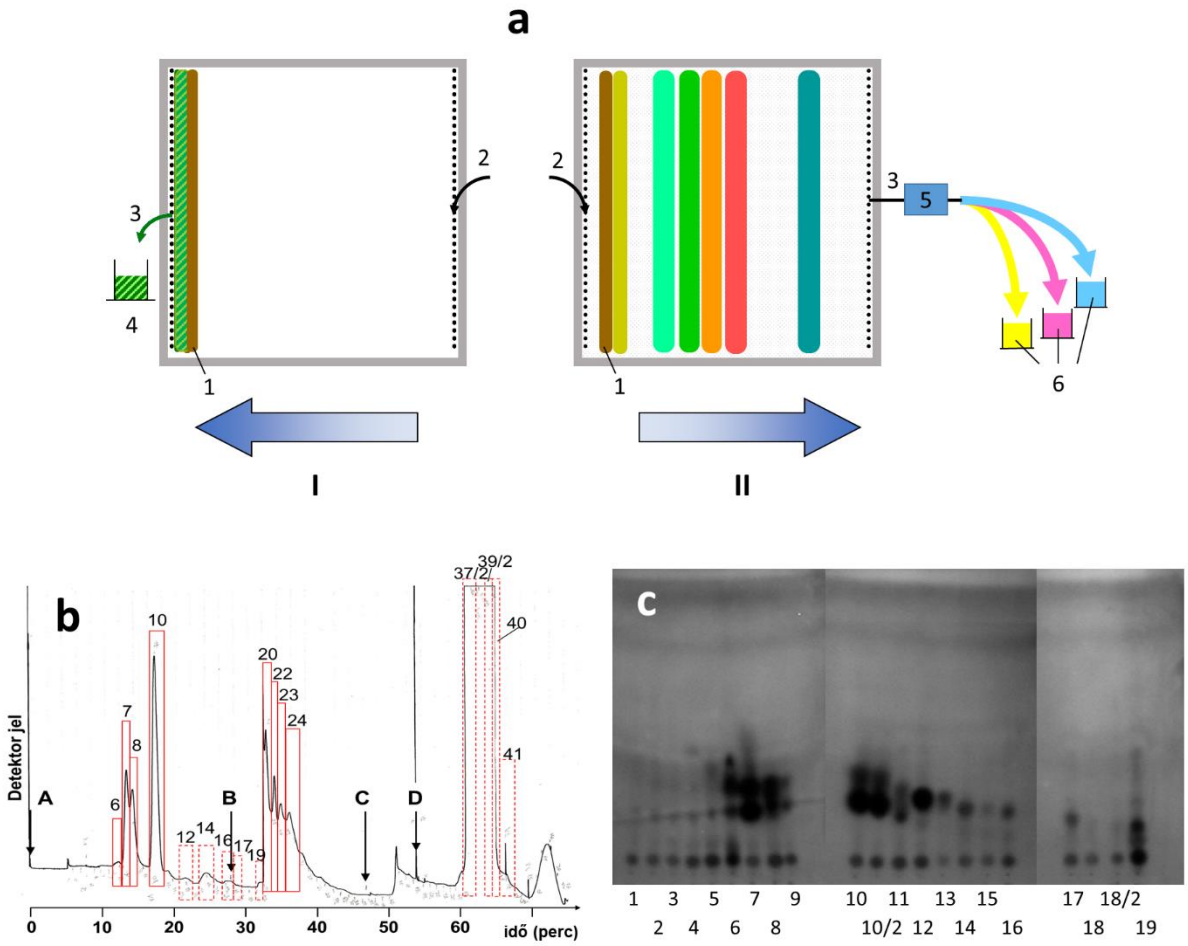
A bioaktív vegyületek (TR1-TR6) hagyományos HPTLC (**A**–**D**) és infúziós OPLC (**E**–**R**) elválasztása irreguláris (**A**-**P**) és szférikus (**Q**, **R**) HPTLC szilikagél rétegen toluol – *n*-hexán 7:3 *V/V* mozgófázissal. Denzitogramok több hullámhosszon (**A**, **N**), kromatogramok 254 nm-en (**B**, **F**, **P**, **Q**) és 365 nm-en (**E**), és PABA (**G**, **H**) és vanillin-kénsavas (**C**, **I**, **J**) előhívás után láthatóban (**C**, **G**, **I**) és 365 nm-en (**H**, **J**), valamint (bio)autogramok antioxidáns DPPH· (**K**), és antibakteriális *Aliivibrio fischeri* (**D**, **L**) és *Bacillus subtilis* (**M**) tesztek után. A bioaktív komponenseknek megfelelő HPTLC–DART-HRMS szkennelésből származó extrakt ion kromatogramok (**O**, **R**) és a TR5a és TR5b zónáiban felvett tömegspektrumok (**S**) és az azonosított komponensek szerkezeti képlete, mint tetradeka-2,4,6-triin-8-én-12-on (TR5a) és *transz*-2-(2,4-hexadiinilidén)-1,6-dioxaspiro[4.5]dek-3-én (TR5b).

A teljesen on-line OPLC elválasztás során a mozgófázisba injektálva visszük fel a mintát az előkészített vékonyrétegre, illetve átfolyócellás detektálást és esetleges frakciószedést [93, 165], MS-t [92, 166], vagy radioaktivitás detektort (RD) [167] alkalmazunk. A technika flexibilitását mutatja az is, hogy kevert módban is használható, azaz lehet off-line mintafelvitelt az on-line detektálással, illetve on-line mintafelvitelt az off-line detektálással is kombinálni. Meg kell azonban jegyezni, hogy mind az on-line mintafelvitel, mind az on-line detektálás hatékonyságcsökkenéssel jár az off-line alternatívákkal szemben [91]. Az off-line mintafelvitel és on-line detektálás és frakciószedés kombinálásával hatékony elválasztást lehet elérni és a gyűjtött frakciókkal további MALDI-MS [168], HPLC–MS [169, M5], HPLC–radioaktivitás

detektor (RD) [170], vagy GC–MS vizsgálatokat lehet végezni [169, 171, 172, M5, M20], azaz az elválasztott komponenseket nem kell lekaparni és leoldani, vagy TLC-MS interfésszel leoldani a vékonyrétegről. Ez a megoldás különösen jól alkalmazható preparatív OPLC elválasztás esetében [165, 173, M5]. A kakukkfű (*Thymus vulgaris*) illóolaj komponensekre kifejlesztett analitikai, teljesen off-line infúziós OPLC elválasztási módszert kiterjesztve egy off-line mintafelvitel utáni infúziós-transzfúziós félpreparatív on-line UV detektálásos OPLC módszerre, sikeresen izoláltuk az off-line OPLC–direkt bioautográfiával antibakteriális hatást mutató komponenseket [M20]. Az UV-aktív timol, karvakrol és dietil-ftalát mellett a nem UV-aktív linalool és *α*-terpineol bioaktív komponenseket is sikerrel izoláltuk, mivel a retenciós idejüket meg lehetett becsülni a visszatartási tényezőjükből. A két kakukkfű illóolajból csak az egyik tartalmazott szintetikus dietil-ftalátot, amit széles körben alkalmaznak oldószerként kozmetikumokban és parfümökben. A gyűjtött frakciókban lévő komponensek antibakteriális hatását off-line OPLC–direkt bioautográfiával ellenőriztük és azonosításukat GC–MS-sel elvégeztük.

Az OPLC-ben az off-line mintafelvitel lehetővé teszi a mintaelőkészítés közvetlenül *in situ*, a vékonyrétegen való elvégzését [93, 169], mivel egy fordított irányban áramoltatott (megfordítható az eluens be- és kimenete) megfelelő mozgófázissal, ami nem mozdítja ki az analizálandó komponenseket, lemosható és szükség szerint összegyűjthető a mátrix komponensek egy része. Ezzel csökken a felviteli zóna terheltsége, így jobb elválasztást lehet elérni. Az on-line detektálás és frakciószedés kiválóan alkalmas tiszta anyagok izolálására. A normál szemcsés analitikai vékonyréteget alkalmazó mikropreparatív OPLC-vel 0,1-0,5 mg tiszta komponens is kinyerhető (2–5 mg mintából), miután egy *in situ* mintaelőkészítést is elvégeznek [93]. Preparatív, 2 mm vastag rétegre akár 450 mg mintát is fel lehet vinni off-line, majd OPLC elválasztást követő on-line detektálás és frakciószedéssel több 10 mg tiszta anyagot ki lehet nyerni [165].

Kombinálva az off-line/on-line (mintafelvitel/detektálás) infúziós-transzfúziós preparatív OPLC-t az *in situ* mintaelőkészítéssel, kamilla (*Matricaria chamomilla*) virágából készített mintát frakcionáltunk, amit a kamillavirág metanolos kivonatának szilikagél oszlopon való előtisztításával kaptunk (a diklór-metánnal való mosás után a 90% vizes acetonitrillel eluálást alkalmaztunk) (11. ábra) [M5]. Metanolba visszaoldva, 20,7 mg-ot vittünk fel off-line a 0,5 mm vastag, mind a négy szélén lezárt, tiszta (OPLC-ben diklór-metánnal, acetonitrillel és vizes acetonitrillel mosott) preparatív szilikagél rétegre. Egy gyengébb mozgófázissal (*n*-hexán – kloroform – acetonitril 9,5:9,5:1 *V/V/V*), fordított irányú áramlással végzett *in situ* mintatisztítás után négy lépcsős gradienst alkalmaztunk (sorrendben: *n*-hexán – kloroform – acetonitril 8,5:8,5:3 *V/V/V* és 6,5:6,5:7 *V/V/V*; acetonitril; acetonitril – víz 9:1 *V/V*), és 300 nm-en detektálva 41 frakciót gyűjtöttünk. Ezzel a módszerrel a kivonat minor komponenseit kaptuk meg a frakciókban, amelyeket LC–MS/MS-sel jellemeztünk (flavonoidokat, fenolos savakat, kumarinokat, és ezek cukor származékait, illetve zsírsavakat azonosítottunk), illetve antibakteriális hatásukat TLC–direkt bioautográfiával vizsgáltuk lumineszcens baktériumokkal szemben (*P. syringae* pv. *maculicola* és *A. fischeri*) [M5].



11. ábra OPLC-vel végezhető mintaelőkészítési és izolálási lépések

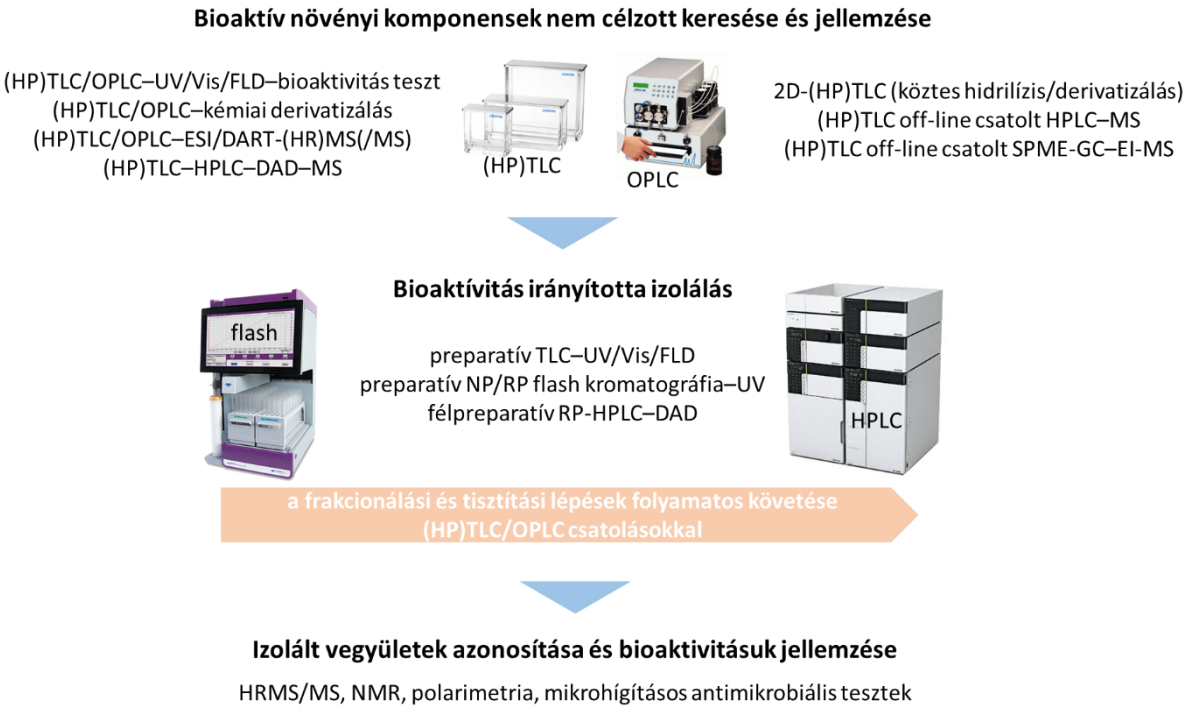
a – *in situ* mintaelőkészítési (**I**) és izolálási (**II**) lépések sematikus ábrája (1 – off-line felvitt minta sávja, 2 – eluens bemenet, 3 – effluens kimenet, 4 – a minta tisztítása során gyűjtött minta rész, 5 – UV cella, 6 – gyűjtött frakciók); **b** – a módszer alkalmazása előtisztított kamillavirág kivonatra, a lépcsős gradiens (**A-D**) elválasztással kapott OPLC–UV kromatogram (λ=300 nm); c – a gyűjtött frakciók antibakteriális hatásának vizsgálata TLC–*Aliivibrio fischeri* esszével (TLC mozgófázis: *n*-hexán – kloroform – acetonitril 42.5:42.5:15 *V/V/V)*.

Fontos megemlíteni, hogy az OPLC-t interfész nélkül, közvetlenül is lehet csatolni a HPLC-hez. Ezt az elrendezést már a 90-es évek elején megvalósították és többek közt tealevél kivonat komponenseinek elválasztására alkalmazták [174].

Az OPLC flexibilitása és hatékonysága nagy jövőt ígért a technikának, de sajnos nem terjedt el széles körben. Ennek több oka is lehet, egyrészt a kelet-európai gyökere, a hagyományos vékonyrétegkromatográfiához viszonyítva nehezebb módszerfejlesztés, és végső soron a műszert gyártó cég felszámolása.

5.4. (HP)TLC csatolásokkal segített bioaktivitás irányította izolálás

A nem célzott, hatásvezérelt eljárások bevezetése új lehetőséget kínál a bioaktív vegyületek kutatásában, annak idő- és anyagi ráfordításának csökkentésére. Az ilyen elemzések rámutatnak a kívánt aktivitással rendelkező vegyületekre egy komplex mátrixban, kémiai jellegüktől függetlenül, és biztosítják a későbbi, célzott eljárást, beleértve a jellemzést, a bioaktivitási vizsgálattal vezérelt izolálást és a kérdéses komponensek azonosítását [17, 30, 175]. A kromatográfia és a kémiai, biológiai vagy biokémiai elemzések kombinációján alapuló hatásvezérelt analízis széles körben elterjedt a gyógyszerkutatásban, különösen az összetett minták, mint például a növényi kivonatok bioesszé-vezérelt elemzéseiben [17, 176]. A (HP)TLC egyaránt alkalmas illékony és nem-illékony növényi komponensek elválasztására [177, 178]. Az elmúlt két évtizedben megvalósult fejlesztések lehetőséget biztosítanak az összetett mintákban lévő egyes hatóanyagok párhuzamos bioprofilozására, biodetektálására és jellemzésére, számottevő technikai nehézségek nélkül [153, 179]. Azaz a (HP)TLC csatolások alkalmasak nagy áteresztőképességű, gyors és költséghatékony hatás irányította analízisre, bioaktív komponensek nem célzott keresésére és célzott jellemzésére, valamint izolálási lépések (mintaelőkészítés, frakcionálás és tisztítás) során célzott követésre (biomonitorozás) [153, 179].



12. ábra A növényi bioaktív vegyületek felfedezésének lépései során alkalmazott technikák és módszerek

A bioaktív növényi komponensek keresésére, izolálására és azonosítására (HP)TLC/OPLC alapú munkamenetet dolgoztunk ki, amely magában foglalja a (HP)TLC/OPLC–bioaktivitás tesztekkel végzett nem célzott keresést, a célzott jellemzést (HP)TLC/OPLC elválasztás utáni derivatizálással (kémiai csoportokat kimutató reagensekkel), spektroszkópiával

((HP)TLC/OPLC–UV/Vis/FLD) és tömegspektrometriával ((HP)TLC–ESI/DART-(HR)MS(/MS)), a (HP)TLC/OPLC csatolásokkal vezérelt frakcionálási és tisztítási lépéseket preparatív szilikagél TLC-vel, preparatív normál fázisú (NP) és fordított fázisú (RP) flash kromatográfiával vagy félpreparatív RP-HPLC-vel, valamint az azonosítást spektroszkópiai (NMR, polarimetria) és tömegspektrometriai mérésekkel (12. ábra) [M2, M4, M7-M9, M19, M21-M27]. A kutatásainkhoz kiválasztott növények általában nagy biomasszával rendelkeznek, gondolva az izolált bioaktív komponensek esetleges későbbi gyakorlati alkalmazására, azaz arra, hogy a nagy mennyiségben való kinyerésükhöz legyen elég nyersanyag. Gyakran gyógynövények, amik jellemzően nem tartalmaznak toxikus komponenseket és évszázados, évezredes felhasználásuk előrevetíti, hogy biztonságosak. Továbbá a környezetünkben nem kívánatos idegenhonos özönnövényeket is előszeretettel vizsgáltuk, bizonyítottuk a bennük lévő vegyületek értékességét, ezzel elősegítve a környezetből való eltávolításukat, ami kettős (környezeti és gazdasági) profitot jelenthet. Ezen tulajdonságok közül a vizsgált növények gyakran többel is bírtak. A növényeknek jellemzően több szövetét is vizsgáltuk. A növények, a vizsgált szövetek, illetve a kivonó oldószerek kiválasztását előzetes TLC–direkt bioautográfiával végeztük, figyelembe véve a bioaktív zónák számát, méretét (átmérő) és a kivonat összetettségét. A disszertáció csak már publikált eredményeket tartalmaz, így az egyes növényeknél nem térek ki az eddig nem közölt, bioaktív komponenseket tartalmazó szövetekre.

Az RP flash kromatográfiás frakcionáláshoz könnyen adaptálható egy kidolgozott RP-HPLC módszer. Azonban normál fázis esetén jellemzően szilikagél (HP)TLC módszert viszünk át, amikor a kényszeráramlásos technikában megnövekedett elúciós erőket tapasztalunk, így az oldószer szételegyedése okozta frontokba kerülhetnek a komponensek. Megoldást jelent, ha a (HP)TLC módszer nem a frontokhoz közel biztosít elválasztást, vagy ha a módszert kényszeráramlásos OPLC-vel dolgozzuk ki. Ez utóbbi utat alkalmaztuk a nálunk őshonos gyógynövény, de Ausztráliában és Amerikában a mezőgazdaságban kihívást jelentő özönnövény, a szamárbogáncs (*Onopordum acanthium*) levelében lévő antibakteriális anyag frakcionálására. A szamárbogáncs levél különféle kivonata (*n*-hexán, toluol, kloroform, etil-acetát, etanol és metanol) közül az etil-acetátos mutatta az egyik legerősebb antibakteriális hatást a legkisebb mátrix-szal TLC–direkt bioautográfiával. Egy teljesen off-line analitikai OPLC módszert (mozgófázis: kloroform – etil-acetát – 2-propanol 18:1:1, *V/V/V*) dolgoztunk ki és alkalmaztuk OPLC–direkt bioautográfiára, amivel egy karakterisztikus antibakteriális zónát detektáltunk. A módszert kiterjesztettük off-line/on-line infúziós-transzfúziós félpreparatív OPLC-re (0,5 mm vastagságú réteg), amivel az UV detektálás alapján gyűjtött csúcs tisztaságát HPLC–MS-sel, bioaktivitását pedig OPLC–*B. subtilis* teszttel igazoltuk. Ezt követően a módszert adaptáltuk flash kromatográfiára [M8]. A flash kromatográfiás frakcióból félpreparatív RP-HPLC-vel izoláltuk és NMR-rel azonosítottuk a szamárbogáncsban már korábban leírt [180] szeszkviterpén lakton onopordopikrint, ami gátló hatást fejtett ki mind Gram-poztív, mind Gram-negatív baktérium törzsekre is (legkisebb gátló koncentráció, MIC=2,2–172,4 μg/mL) [M8].

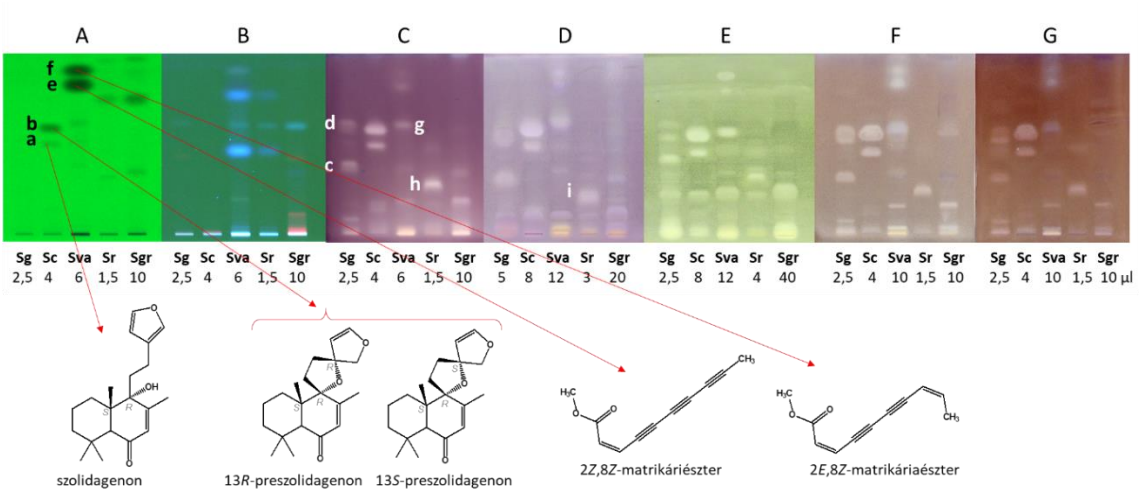
A nagy biomasszával rendelkező napraforgót (*Helianthus annuus*), így levelét is, betakarítás előtt permetezéssel szárítják. A levél jelenleg kiaknázatlan mezőgazdasági hulladéknak számít.

A napraforgó levél etil-acetátos kivonatában HPTLC–bioaktivitás tesztekkel antibakteriális és kolinészteráz gátló hatású zónákat detektáltunk és a zónákban lévő komponenseket reagens vizsgálatokkal, valamint HPTLC–ESI-HRMS és HPTLC–DART-MS/MS technikákkal jellemeztük [M19]. A flash kromatográfiával és félpreparatív HPLC-vel végzett bioaktivitás irányította izolálással a napraforgó leveléből korábban már leírt [181] ent-kaurénsavat és annak angelikasavval alkotott észterét sikerült izolálni, és hatásukat bizonyítani HPTLC–bioaktivitás esszékkel. A kaurénsav butiril-kolinészteráz és Gram-negatív *X. euvesicatoria* növény kórokozó baktériummal szembeni gátlóhatását először írtuk le [M19], valamint először társítottunk bioaktivitást a kaurénsav angelikasavval alkotott észteréhez, úgy mint *B. subtilis* és *A. fischeri* baktériumokkal szembeni gátlást és acetil- és butiril-kolinészteráz gátlóhatást [M19].

A Délkelet-Ázsiában őshonos, de manapság világszerte aggresszíven terjedő (invazív) mirigyes bálványfa (*Ailanthus altissima*) előzetes vizsgálata azt mutatta, hogy a fa több szövete is gazdag bioaktív komponensekben. Eddig a kéreg antibakteriális vegyületeiről született egy közleményünk. A fa kérgéből TLC–*B. subtilis* esszével és TLC–HRMS technikával irányított flash kromatográfiás frakcionálásokkal és tisztítással hat antibakteriális vegyületet izoláltunk, a (10*E*,12*Z*)-9-hidroxi-oktadeka-10,12-diénsav, a (9*Z*,11*E*)-13-hidroxi-oktadeka-9,11-diénsav, a hexadekándisav, a 16-hidroxi-hexadekánsav, 16-feruloiloxi-palmitinsav, és a kantin-6-on vegyületeket [M21]. A mirigyes bálványfában már korábban leírt [182] kantin-6-on mutatta a legerősebb anti-*Bacillus* hatást (MIC 8,3 μg/ml), a többi öt vegyületet a szakirodalomban először mi írtuk le a növényben [M21].

Kutatómunkám során az aranyvessző (*Solidago* és *Euthamia*) fajokkal foglalkoztunk eddig a legkiterjedtebben [M2, M4, M7, M9, M22-M26]. Az egyetlen Európában őshonos aranyvessző faj a közönséges aranyvessző (*S. virgaurea*) [183, 184], amin kívül még öt, Észak-Amerikából származó aranyvessző fajt vizsgáltunk. Az egész Európában agresszíven terjedő, ezzel súlyos környezeti károkat okozó magas (*S. gigantea*) és kanadai (*S. canadensis*) aranyvesszők [183, 184] mellett a nem annyira invazív fűlevelű aranyvessző (*E. graminifolia*, korábban *S. graminifolia*) is már kivadult Magyarországon, a Bükkalján [185]. A nálunk kertészetekben forgalmazott ráncoslevelű (*S. rugosa*) aranyvessző Svájc és Franciaország határában okoz gondot, míg a mutatós aranyvesszőt (*S. speciosa*) botanikus kertből lehet begyűjteni. A közönséges, a magas, a kanadai és a fűlevelű aranyvesszők gyökérkivonatait vizsgálva, kémiai profiljuk egyértelműen eltért egymástól, amit bizonyítottunk a HPTLC–vanillin kénsavas előhívás utáni főkomponens analízissel [M9], tehát a télen szedett gyökérből is meghatározható a növényfaj. Az idegenhonos invazív növények természetből való eltávolítását különösen elősegítheti, ha nemcsak a virágos példányokat tudjuk azonosítani, hanem télen a gyökerét, amiből tavasszal sarjhajtásokkal is szaporodik. Azaz a növény egy területről való eltávolítása csak gyökerestül lehetséges. A biológiai profiljuk eltérését HPTLC–*A. fischeri* teszt utáni főkomponens analízissel bizonyítottuk [186]. Enzimgátló hatásukat HPTLC–*α*-glükozidáz, *β*-glükozidáz, *α*-amiláz, acetil- és butiril-kolinészteráz gátló tesztekkel vizsgáltuk (13. ábra). A kanadai aranyvessző gyökérkivonatának két kromatográfiás zónájában (**a** és **b**) lévő komponensek minden vizsgált enzimet gátoltak (13. ábra) és antibakteriális hatást is mutattak *B. subtilis* és *A. fischeri* baktériumokkal szemben a HPTLC–direkt bioautográfia tesztben. A preparatív TLC-vel kapott frakciókból, a **b** zónában a (13*R*)-preszolidagenont és a

(13*S*)-preszolidagenont, míg az **a** zónában egy további ortogonális félpreparatív RP-HPLC-vel való tisztítással a szolidagenon vegyületet azonosítottuk NMR-rel [M9]. Ezeket a vegyületeket már korábban leírták a kanadai aranyvessző gyökeréből [187, 188], azonban először mi írtuk le bioaktivitásukat. A közönséges aranyvessző gyökerének **e** és **f** HPTLC zónájában elválasztott komponenseit (13. ábra) NP flash kromatográfiás frakcionálást követő félpreparatív RP-HPLC-s tisztítással izoláltuk és a növényben már korábban leírt [189, 190] 2*Z*,8*Z*- és 2*E*,8*Z*-matrikáriaészterként azonosítottuk [M22]. Ezekről a poliacetilénekről először mutattuk ki HPTLC–direkt bioautográfiával, hogy gátolják a *B. subtilis*, *X. euvesicatoria*, *P. syringae* pv. *maculicola* és *A. fischeri* baktériumokat [M7, M22], a *F. avenaceum* és *B. sorokiniana* gombákat [M7], valamint a szénhidrátok lebontásában szereplő enzimeket [M9].

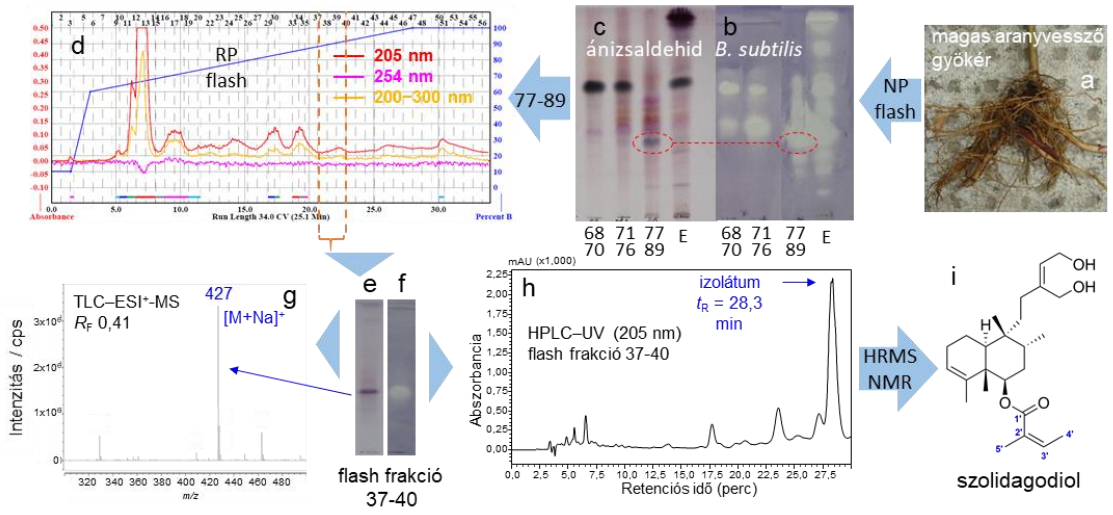


13. ábra Biokatív komponensek kimutatása aranyvessző növények gyökeréből

A magas (Sg), a kanadai (Sc), a közönséges (Sva), a ráncoslevelű (Sr) és a fűlevelű aranyvessző vegyületek HPTLC zónái (**a**–**i**) 254 nm-en (A), 365 nm-en (B), és enzimgátló hatásuk kimutatása *α*-glükozidáz (C), *β*-glükozidáz (D), *α*-amiláz (E), acetilkolinészteráz (F) és butirilkolinészteráz (G) tesztekkel, valamint az **a**, **b**, **e** és **f** zónákból azonosított vegyületek szerkezeti képlete. HPTLC mozgófázis: *n*-hexán – izopropil-acetát – aceton 16:3:1 *V*/*V*/*V*.

Szintén NP flash kromatográfiával és azt követő RP-HPLC-vel izoláltuk a fűlevelű és mutatós aranyvesszők gyökeréből a 2*E*- és 2*Z*-dehidromatrikáriaésztert, valamint utóbbiból a benzil-2-hidroxi-6-metoxibenzoátot, amelyekről elsőként írtuk le, hogy gátolják HPTLC–direkt bioautográfia tesztekben a *B. subtilis* és *A. fischeri* baktériumokat, illetve a poliacetilének a *P. syringae* pv. *maculicola* baktériumot, valamint a 2*E*-dehidromatrikáriaészter kivételével az *F. avenaceum* és *B. sorokiniana* gombákat is [M7]. Az azonosított poliacetilének jellemző komponensei az aranyvesszőknek [189, 190], azonban először írtuk le a dehidromatrikáriésztereket a mutatós aranyvesszőben és a benzil-2-hidroxi-6-metoxibenzoátot aranyvessző génuszban, illetve az izolátumok antifungális hatását megerősítettük mikrohígításos teszttel (az 50%-os gátláshoz tartozó koncentráció, IC_{50}=24-107 µg/ml) [M7]. A ráncoslevelű aranyvessző gyökeréből és leveléből HPTLC–*B. subtilis* teszttel két antibakteriális zónát mutattunk ki. Az ezekben lévő aktív vegyületek izolálását NP, RP, majd ezt követő NP flash kromatográfiás frakcionálással és tisztítással végeztük a frakciók

folyamatos HPTLC–*B. subtilis* ellenőrzésével. Két diterpént izoláltunk, a már korábban a növényben leírt [191] *transz*-klerodán-vázas hardwicksavat, illetve az abietán-vázas abietinsavat [M23], utóbbit először nekünk sikerült kimutatni a növényből. Az is említést érdemel, hogy először mi írtuk le mindkét vegyület antimikrobiális hatását növénypatogénekkel szemben. Mikrolemez kísérletekben bizonyítottuk Gram-pozitív baktériumokkal (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* és *Clavibacter michiganensis*, MIC 2-5 µg/ml) és gombákkal (pl. a hardwicksav a *B. sorokiniana* gombát gátolta, IC_{50}=3,8 µg/ml) szembeni hatásukat [M23].

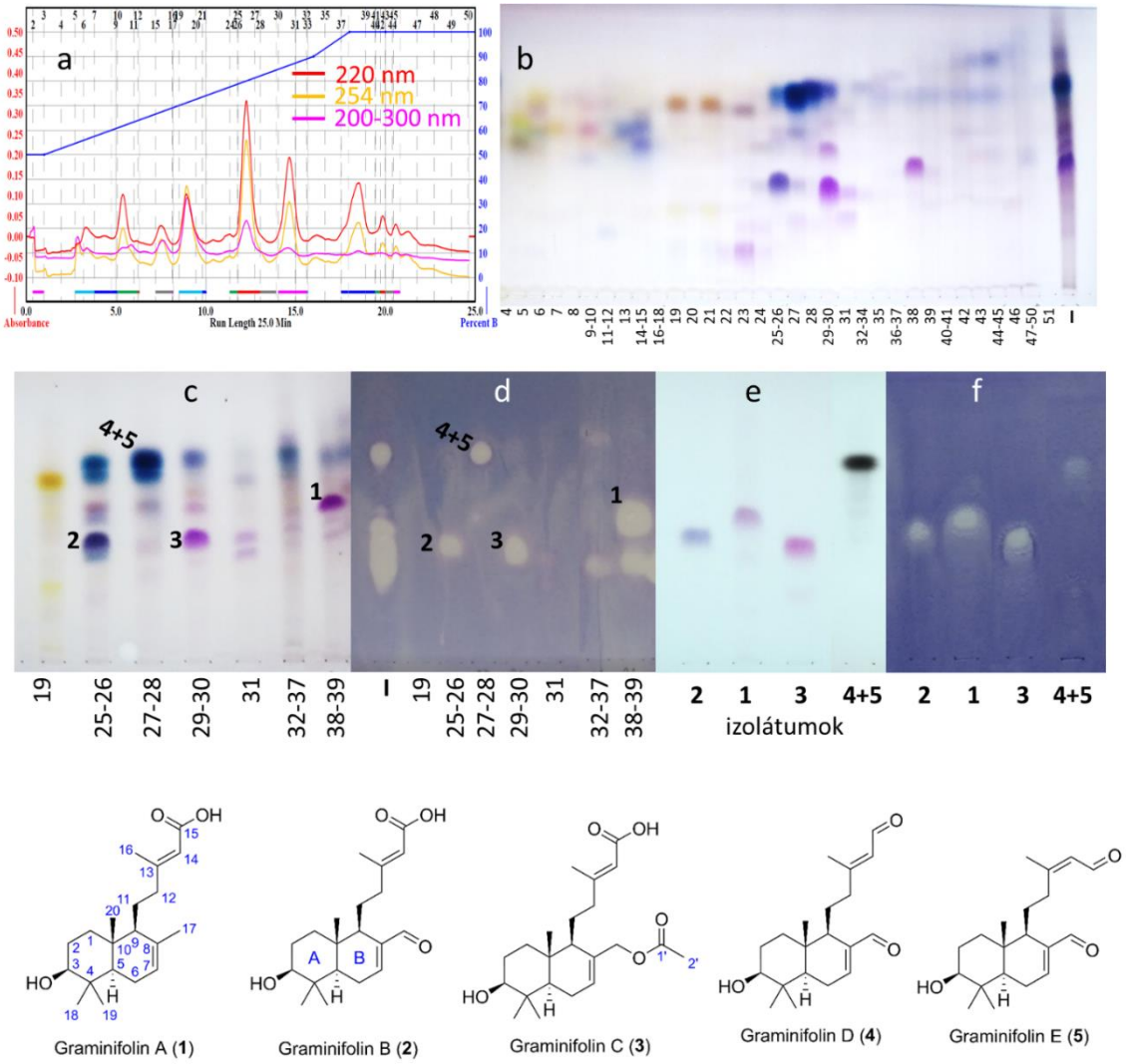


14. ábra Egy új természetes antibakteriális vegyület, a szolidagodiol (i) magas aranyvessző gyökeréből (a) való izolálásának lépései

A TLC csatolásokkal segített bioaktivitás irányította izolálás lépései: 1 – a kivonat (E) és az NP flash kromatográfiával kapott néhány egyesített frakció kémiai és antibakteriális vizsgálata TLC–ánizsaldehid (c) és TLC–*Bacillus subtilis* (b) csatolásokkal; 2 – a 77-89-es frakciók további frakcionálása RP flash kromatográfiával (d) és a 77-89/37-40 egyesített frakciók vizsgálata TLC–ánizsaldehid (e), TLC–*B. subtilis* (f) és TLC–MS (g) csatolásokkal; 3 – a 77-89/37-40 frakcióban található antibakteriális anyag tisztítása RP-HPLC technikával (h); 4 – az antibakteriális hatás elenőrzése után, az izolált anyag azonosítása HRMS/MS és NMR technikákkal. TLC mozgófázis: kloroform – etil-acetát – metanol 15:3:2 *V/V/V*.

A magas aranyvessző gyökeréből bioaktivitás irányította eljárással, preparatív NP és RP flash kromatográfiás és félpreparatív RP-HPLC-s lépések kombinációival antimikrobiális klerodán vázas diterpéneket izoláltunk és azonosítottunk (14. ábra). Először nyolc, a növény gyökeréből már ismert [192-194] főkomponenst: az Sg1 egy kingidiolként ismert glikol, az Sg2 egy epoxi-hemiacetál, az Sg3a egy dialdehid, az Sg3b a klerodán lakton, az Sg3c egy alkohol, az Sg4 egy hemiacetál, az Sg5 a szolidagosav A és az Sg6 a szolidagosav B. Majd további négy minor komponenst is azonosítottunk, amelyekből egy komponenst először mi mutattunk ki a növény gyökeréből ((−)-(5*R*,8*R*,9*R*,10*S*)-15,16-epoxi-ent-neo-kleroda-3,13,14-trien-18-ol (korábban a növény leveléből kimutatták [188]), illetve a szolidagolakton IX, a szolidagosav K

és a szolidagodiol természetes vegyületeket először mi írtuk le [M2, M24]. Először mutattuk ki HPTLC–direkt bioautográfia (14. ábra) és mikrolemez tesztekben a 12 klerodán diterpén antimikrobiális hatását, többek közt növénypatogénekkel szemben is, ami által alkalmasak lehetnek a növények gombás és baktériumos megbetegedései elleni fenntartható kémiai védekezésre [M2, M24, 195]. Ezen túl megemlíthető, hogy az egyes főkomponensek HPTLC–direkt bioautográfia tesztekben adott enzimgátló aktivitását is először mi írtuk le [M2]. Az Sg3a és az Sg6 különösen hatékonyan gátolta a Gram-pozitív baktériumokat, a pozitív kontrollnak alkalmazott gentamicinnél is kisebb MIC és IC50 értékeket adtak.

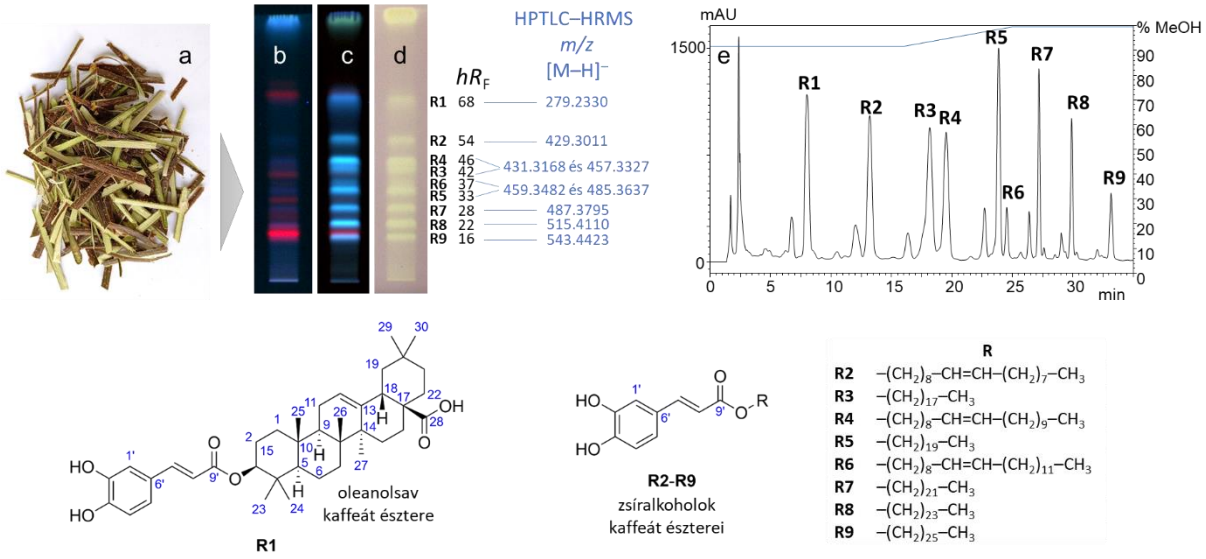


15. ábra Új természetes labdán diterpének izolálása fűlevelű aranyvessző virágkivonatából

A virágkivonat NP flash kromatográfiával kapott **I** frakciójának további RP flash kromatográfiával végzett frakcionálásával (a) gyűjtött frakciók (4-51), az egyesített frakciók és a további flash kromatográfiás tisztítással kapott izolátumok (**1**-**3**, **4+5**) TLC kromatogramja ánizsaldehides előhívás után (b, c, e) és TLC–*B. subtilis* bioautogramja (d, f), valamint lent az izolátumok szerkezeti képlete. TLC mozgófázis: izopropil-acetát – toluol – etanol 11:9:1 *V/V/V*.

Magas aranyvessző levélből kilenc antimikrobiális hatású vegyületet izoláltunk (HP)TLC–direkt bioautográfia és HPTLC–MS irányította eljárással és határoztunk meg HRMS és NMR segítségével [M4, M25]. Ezek közül egyet új természetes klerodán diterpénként írtunk le (szolidagosav J), a többi nyolc vegyületet pedig először mutattuk ki a növényben, mint a már közönséges aranyvesszőben leírt [196] szolidagosav C-F, H és I diterpéneket és a különféle növényekben már leírt [197] két telítetlen monoacilglicerolt, az 1-linoleil-glicerolt és az 1-*α*-linolenil-glicerolt. Az izolátumokat növénykórokozókkal szemben is teszteltük. Gram-pozitív baktériumok (*R. fascians*, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *C. michiganensis*) ellen különböző mértékű gátlóhatást mutattak (MIC 17-133 µg/ml), valamint a szolidagosav C és J *B. sorokiniana* és *F. graminearum* gombákkal szemben is hatásosnak bizonyultak (45-56% gátlást határoztunk meg 333 µg/ml koncentrációnál).

A Bükkalján kivadult [185] fűlevelű aranyvessző virágából TLC–*B. subtilis* esszé irányításával, flash kromatográfiás elválasztásokkal öt új természetes labdán diterpént (graminifolin A-E) izoláltunk (15. ábra), amelyek Gram-pozitív növénypatogéneket is gátoltak. Említést érdemel, hogy a leghatásosabb graminifolin A 61,5%-kal gátolta a *B. sorokiniana* gombát, 533 µg/ml koncentrációnál [M26].



16. ábra A fehér akác kéreg antioxidáns komponenseinek kimutatása és izolálása

A fehér akác kéreg (a) antioxidáns komponenseinek (R1-R9) RP18-HPTLC elválasztása acetonitril – etanol 3:2 *V/V* mozgófázissal és kimutatása 365 nm-en természetes vegyület reagenssel való derivatizálás előtt (a) és után (b), valamint DPPH· teszttel (c), a vegyületek visszatartási tényezője (hR_F) és a deprotonált molekula HPTLC–TLC-MS interfész–ESI-HRMS analízissel kapott *m/z* értéke, továbbá az izolálás során 323 nm-en felvett HPLC–UV kromatogram (e) és lent az izolált vegyületek szerkezeti képlete. Az R2, R4 és R6 új természetes vegyületek.

Az Észak-Amerikában őshonos, mára szinte az egész világban, így hazánkban is telepített és gyorsan terjedő fehér akác (*Robinia pseudoacacia*) gyógynövényként is ismert. Kérgének metanolos kivonatában RP18-HPTLC–DPPH· teszttel és RP18-HPTLC–HRMS-sel kilenc antioxidáns tulajdonságú (R1-R9), a reagens vizsgálat alapján fenolos vegyületet mutattunk ki

(16. ábra) [M27]. Izolálásukhoz HPLC elválasztást dolgoztunk ki egy HPLC–DAD–MS rendszeren. A vegyületek nagyon apolárisnak mutatkoztak, nagy szerves oldószer tartalmú mozgófázissal (metanol – víz – hangyasav 92:8:0,05–100:0:0,05 *V/V/V*) választhatók el, azaz egy általános, fenolos vegyületekre alkalmazott módszernél a mosásban jönnek le az oszlopról. Az NMR-es meghatározás alapján az oleanolsav kaffeát észterét, amit már korábban leírtak a fehér akác kérgéből [198], valamint nyolc zsíralkohol kaffeát észterét sikerült izolálnunk, amelyek közül az öt telített zsíralkoholokkal alkotott kaffeát észtert először írtuk le a *Robinia* nemzettségben, bár más növényekből már leírták ezeket az észtereket [199, 200]. A további három észter telítetlen zsíralkoholjai GC–MS vizsgálatok alapján homológ sort alkotnak, azonos helyzetű és konfigurációjú kettős kötéssel (9*Z*) rendelkeznek. Ez a három, telítetlen zsíralkoholokkal alkotott kaffeát észter új természetes vegyületnek bizonyult [M27]. A kávésavhoz viszonyítva az izolátumok antioxidáns hatása általában hasonló, vagy kissé gyengébb volt, azonban az oleanolsav kaffeát észtere erősebb antioxidánsnak mutatkozott [M27].

Eredményeinkből látható, hogy a (HP)TLC csatolásokkal a preparatív és félpreparatív oszlopkromatográfiás technikákkal kiépített platform alkalmas a bioaktív növényi vegyületek biológiai aktivitás irányította kimutatására és izolálására, és a kifejlesztett módszerekkel minor, eddig ismeretlen komponensek is azonosíthatók és izolálhatók. A mutatós és ráncoslevelű aranyvessző kivételével a mintákat Magyarországon a természetből gyűjtöttük és eddig 54 bioaktív növényi vegyület izolálását publikáltuk, 12 új természetes vegyületet azonosítottunk és további 23 vegyületet először írtunk le az adott növényben. A legtöbb izolált vegyülethez társítottunk új biológiai hatást, többek közt növénypatogénekkel szembeni gátlást, ami mutatja, hogy egyes vegyületek alkalmasak lehetnek fenntartható kémiai védekezésre a mezőgazdaságban.

6. Kitekintés

Véleményem szerint a műszeres vékonyrétegkromatográfia által nyújtott kémiai információk, a kiértékelés egyszerűsége és a minták párhuzamos elválasztásával nyert azonnali összehasonlítás lehetősége nagy előnyei a technikának. Nyilvánvaló irány az elválasztástechnikában az oszlopkromatografiás technikák térhódítása és a vékonyrétegkromatográfia túlzott háttérbe szorulása. Viszont meg kell jegyezni, hogy van, amit nem tud a zárt oszlopkromatográfia, például a gyors, állófázison végzett biotesztekkel nem lehet csatolni. Továbbá, az oszloprendszerű folyadékkromatográfia jellemzően fordított fázisú, míg a vékonyrétegkromatográfia általában normál fázisú szilikagélt alkalmaz, azaz alkalmasak egymást kiegészítő ortogonális elválasztástechnikáknak. Vékonyrétegkromatográfiához csatolt antimikrobiális, enzimgátló, hormonhatású, genotoxikus, stb. tesztek kifejlesztése az adszorbens rétegen *in situ* folyamatosan zajlik. Ezek a nagy mintaáteresztőképességű tesztek az elválasztott komponensekről adnak gyors biológiai információt, azaz különösen alkalmasak bioaktív vegyületek természetes eredetű mintákból való szűrésére és izolálásuk irányítására. Nyilvánvalóan a vékonyrétegkromatográfia nem tudja felvenni a versenyt a HPLC és GC technikákkal felbontásban és elválasztási hatékonyságban, de kiválóan alkalmas komplex

keverékek egyszerű mintaelőkészítés utáni (pl. növényi kivonat) elválasztására, és csatolt bioesszével a bioaktív komponens zónájának kijelölésére. Fontos kiemelni, hogy nincs detektálásból kizárt, legfeljebb jobban elválasztható mintakomponens, amin pedig módszerfejlesztéssel lehet segíteni. A következő kérdés pedig mindig az, mi van az egyszerű és gyors eljárással kapott bioaktív kromatográfiás zónában? Az utóbbi két évtizedben végbement (HP)TLC–MS csatolásokat célzó fejlesztések új (HP)TLC világot nyitottak meg, amire még az ipar is felfigyelt. A munkaigényes és hibalehetőségekkel teli „lekaparom-eluálom" eljárást felváltották a sokkal elegánsabb közvetlen (HP)TLC–MS csatolások, amikkel egyszerűen kimutathatók a ko-migráló komponensek is, és könnyen bizonyítható egy vizsgálandó vegyület vagy szennyezőanyag jelenléte.

Véleményem szerint most, a 21. század elején a modern, műszeres (HP)TLC reneszánszát éljük, egy gyors fejlődés tanújaként. Ez elsősorban új (HP)TLC–bioesszé és (HP)TLC–MS csatolás bevezetését jelenti. A (HP)TLC jövőjét az is biztosítja, hogy további előremutató fejlesztési irányok vannak. Ilyen az ipari felhasználás ösztönzésére szolgáló automatizálás, a mintafelvitel, kifejlesztés, derivatizálás és UV/Vis/FLD és MS detektálás lépéssor összekapcsolása automatizáltan a HPTLC PRO rendszerben (CAMAG), illetve a leoldófejes (HP)TLC–ESI-MS [201] és a szkennelő (HP)TLC–DART-MS [156] automatizálása. A miniatürizálás is fontos cél, annak érdekében, hogy még környezetbarátabb legyen a technika [202, 203], illetve hogy műszerezettsége ellenére könnyebben elérhetőbb legyen. Ez utóbbi célból fejlesztettek német kollégák egy olcsó, kompakt készüléket (2LabsToGo), amellyel a kromatográfiás és bioesszé lépések is elvégezhetők, és egy nyilvános leírás alapján összeszerelhető kereskedelmi forgalomban elérhető alkatrészekből [204].

A (HP)TLC fentebb kifejtett előnyeit és a HPLC-hez való ortogonalitását nézve, úgy gondolom, hogy a (HP)TLC alapvető és kiegészítő technika a széles körben alkalmazott komplex oszlopkromatográfiás módszerek mellett, és a jövőben különösen hasznos szerepe lehet új természetes bioaktív komponensek felfedezésében. Ezért is teszek eleget minden egyetemi felkérésnek, illetve megragadok minden fórumot, ahol népszerűsíthetem ezt a technikát.

Köszönetnyilvánítás

A PhD fokozat megszerzése utáni pályafutásom teljes egészében a HUN-REN ATK Növényvédelmi Intézet, valaha volt MTA Növényvédelmi Kutatóintézet Kórélettani Osztályához kötődik, amely jelenlegi és korábbi munkatársainak köszönöm a jó hangulatot és a sok segítséget. Továbbá köszönöm valamennyi Intézet igazgatónak, Prof. Barna Balázsnak, Prof. Kiss Leventének és Prof. Kontschán Jenőnek a munkám mindenkori támogatását.

Egyetemi diplomamunkámat az ELTE-TTK-n Horváthné Dr. Otta Klára vezetésével készítettem, majd PhD-ösztöndíjasként általa és Prof. Tyihák Ernő† segítségével ismerhettem meg a (HP)TLC és OPLC színes világát. Horváthné Dr. Otta Klára a nehézségek ellenére

mindig optimistán, minden szálat megmozgatva igyekezett a munkám és a konferencia részvételek anyagi hátterét biztosítani, töretlen támogatásáért köszönettel tartozom.

Nem lehetek elég hálás Prof. Tyihák Ernőnek, aki szenvedélyes és ötletgazdag kutatóként példát mutatott számunkra. Ő indított el igazán a kutatói pályán, segített, ösztönzött a mindennapokban, amit sosem tudtam igazán megköszönni.

Nagyon szépen köszönöm Prof. Ilisz Istvánnak, hogy értekezésem első változatát átnézte és építő kritikai megjegyzéseivel nagyban segítette elkészítését. Köszönöm Prof. Mihucz Viktornak, hogy a dolgozatot az elővédésre véleményezte és ezzel segítette a végleges változat elkészítését.

Az értekezés mögött számos hallgatóm és kollégám szorgos munkája is áll, amiért hálával tartozom. Köszönöm PhD hallgatóim, Baglyas Márton és Cselőtey Anna, egyetemi hallgatóim, Király Nóra, Krüzselyi Dániel és Lapat Virág, vendéghallgatóm Amira Reguigui, és közvetlen kollégáim, Bakonyi József, Bozsó Zoltán, Kolozsváriné Nagy Judit, Ott Péter és Schwarczinger Ildikó áldozatos munkáját, akik nélkül az értekezésben bemutatott eredmények nem jöhettek volna létre.

Köszönöm, hogy projektjeim során együttműködött velem Dr. Alberti Ágnes (SE-GYTK), Prof. Balla József (BME), Dr. Béni Szabolcs (SE-GYTK majd ELTE-TTK), Dr. Böszörményi Andrea (SE-GYTK), Prof. Irena Choma (Maria-Curie Sklodowska University, Lengyelország, Lublin), Prof. Csontos Péter (HUN-REN ATK), Dr. Darcsi András (SE-GYTK), Dr. Vesna Glavnik (National Institute of Chemistry, Szlovénia, Ljubljana), Dr. Horváth Györgyi (PTE GYTK), Prof. Kéry Ágnes (SE-GYTK), Prof. Teresa Kowalska† (University of Silesia, Lengyelország, Katowice), Prof. Lemberkovics Éva (SE-GYTK), Dr. Mincsovics Emil†, Prof. Szőke Éva (SE-GYTK) és Dr. Irena Vovk (National Institute of Chemistry, Szlovénia, Ljubljana). Különösen hálás vagyok, hogy összesen több mint fél évet tölthettem Prof. Gertrud Morlock (Justus Liebig University, Németország, Gießen) laborjában, ahol sokat tanultam a (HP)TLC–MS technikákról.

Köszönetet mondok mindazoknak a név szerint nem említett hazai és külföldi kollégáknak, akikkel együtt dolgozhattam a bemutatott projekteken.

Az értekezésben összefoglalt eredmények nem születhettek volna meg a DAAD ösztöndíj, az OECD ösztöndíj, a Bolyai János kutatási ösztöndíj és CERIC támogatása nélkül. A pénzügyi hátteret az OTKA PD 83487, az NKFIH K128921, az NKFIH SNN139496 és a 2019-2.1.11-TÉT-2020-00115 számú projektek biztosították.

Irodalomjegyzék

[1] Chopra, B.; Dhingra, A. K. Natural Products: A Lead for Drug Discovery and Development. *Phyther. Res.* **2021**, *35* (9), 4660–4702. https://doi.org/10.1002/ptr.7099.

[2] Maitra, U.; Stephen, C.; Ciesla, L. M. Drug Discovery from Natural Products – Old Problems and Novel Solutions for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2022**, *210*, 114553. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114553.

[3] Thomford, N. E.; Senthebane, D. A.; Rowe, A.; Munro, D.; Seele, P.; Maroyi, A.; Dzobo, K. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (6), 1578. https://doi.org/10.3390/ijms19061578.

[4] Pavela, R. History, Presence and Perspective of Using Plant Extracts as Commercial Botanical Insecticides and Farm Products for Protection against Insects - a Review. *Plant Prot. Sci.* **2016**, *52* (4), 229–241. https://doi.org/10.17221/31/2016-PPS.

[5] Atanasov, A. G.; Waltenberger, B.; Pferschy-Wenzig, E.-M.; Linder, T.; Wawrosch, C.; Uhrin, P.; Temml, V.; Wang, L.; Schwaiger, S.; Heiss, E. H.; Rollinger, J. M.; Schuster, D.; Breuss, J. M.; Bochkov, V.; Mihovilovic, M. D.; Kopp, B.; Bauer, R.; Dirsch, V. M.; Stuppner, H. Discovery and Resupply of Pharmacologically Active Plant-Derived Natural Products: A Review. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33* (8), 1582–1614. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001.

[6] Porras, G.; Chassagne, F.; Lyles, J. T.; Marquez, L.; Dettweiler, M.; Salam, A. M.; Samarakoon, T.; Shabih, S.; Farrokhi, D. R.; Quave, C. L. Ethnobotany and the Role of Plant Natural Products in Antibiotic Drug Discovery. *Chem. Rev.* **2021**, *121* (6), 3495–3560. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00922.

[7] Atanasov, A. G.; Zotchev, S. B.; Dirsch, V. M.; Orhan, I. E.; Banach, M.; Rollinger, J. M.; Barreca, D.; Weckwerth, W.; Bauer, R.; Bayer, E. A.; Majeed, M.; Bishayee, A.; Bochkov, V.; Bonn, G. K.; Braidy, N.; Bucar, F.; Cifuentes, A.; D'Onofrio, G.; Bodkin, M.; Diederich, M.; Dinkova-Kostova, A. T.; Efferth, T.; El Bairi, K.; Arkells, N.; Fan, T.-P.; Fiebich, B. L.; Freissmuth, M.; Georgiev, M. I.; Gibbons, S.; Godfrey, K. M.; Gruber, C. W.; Heer, J.; Huber, L. A.; Ibanez, E.; Kijjoa, A.; Kiss, A. K.; Lu, A.; Macias, F. A.; Miller, M. J. S.; Mocan, A.; Müller, R.; Nicoletti, F.; Perry, G.; Pittalà, V.; Rastrelli, L.; Ristow, M.; Russo, G. L.; Silva, A. S.; Schuster, D.; Sheridan, H.; Skalicka-Woźniak, K.; Skaltsounis, L.; Sobarzo-Sánchez, E.; Bredt, D. S.; Stuppner, H.; Sureda, A.; Tzvetkov, N. T.; Vacca, R. A.; Aggarwal, B. B.; Battino, M.; Giampieri, F.; Wink, M.; Wolfender, J.-L.; Xiao, J.; Yeung, A. W. K.; Lizard, G.; Popp, M. A.; Heinrich, M.; Berindan-Neagoe, I.; Stadler, M.; Daglia, M.; Verpoorte, R.; Supuran, C. T. Natural Products in Drug Discovery: Advances and Opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20* (3), 200–216. https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z.

[8] Marston, A.; Hostettmann, K. Biological and Chemical Evaluation of Plant Extracts and Subsequent Isolation Strategy. In *Bioassay Methods in Natural Product Research and Drug Development*; Springer Netherlands: Dordrecht, 1999; pp 67–80. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4810-8_6.

[9] Khursheed, A.; Rather, M. A.; Jain, V.; Wani, A. R.; Rasool, S.; Nazir, R.; Malik, N. A.; Majid, S. A. Plant Based Natural Products as Potential Ecofriendly and Safer

Biopesticides: A Comprehensive Overview of Their Advantages over Conventional Pesticides, Limitations and Regulatory Aspects. *Microb. Pathog.* **2022**, *173*, 105854. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105854.

[10] Brown, E. D.; Wright, G. D. Antibacterial Drug Discovery in the Resistance Era. *Nature* **2016**, *529* (7586), 336–343. https://doi.org/10.1038/nature17042.

[11] Hutchings, M. I.; Truman, A. W.; Wilkinson, B. Antibiotics: Past, Present and Future. *Curr. Opin. Microbiol.* **2019**, *51*, 72–80. https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008.

[12] *Natural Bioactive Products in Sustainable Agriculture*; Singh, J., Yadav, A. N., Eds.; Springer Singapore: Singapore, 2020. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3024-1.

[13] Lorsbach, B. A.; Sparks, T. C. Innovations in Agrochemical Discovery and the Role of Metabolism, Bioavailability and Formulations. *Pest Manag. Sci.* **2017**, *73* (4), 655–657. https://doi.org/10.1002/ps.4533.

[14] Hahn, M. The Rising Threat of Fungicide Resistance in Plant Pathogenic Fungi: *Botrytis* as a Case Study. *J. Chem. Biol.* **2014**, *7* (4), 133–141. https://doi.org/10.1007/s12154-014-0113-1.

[15] Nothias, L.-F.; Nothias-Esposito, M.; da Silva, R.; Wang, M.; Protsyuk, I.; Zhang, Z.; Sarvepalli, A.; Leyssen, P.; Touboul, D.; Costa, J.; Paolini, J.; Alexandrov, T.; Litaudon, M.; Dorrestein, P. C. Bioactivity-Based Molecular Networking for the Discovery of Drug Leads in Natural Product Bioassay-Guided Fractionation. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81* (4), 758–767. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00737.

[16] Han, J.; Zhang, J.; He, W.; Huang, P.; Oyeleye, A.; Liu, X.; Zhang, L. Bioassay-Guided Identification of Bioactive Molecules from Traditional Chinese Medicines; 2015; pp 187–196. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7_15.

[17] Jonker, W.; Lamoree, M. H.; Houtman, C. J.; Kool, J. Methodologies for Effect-Directed Analysis: Environmental Applications, Food Analysis, and Drug Discovery. In *Analyzing Biomolecular Interactions by Mass Spectrometry*; Wiley, 2015; pp 109–163. https://doi.org/10.1002/9783527673391.ch4.

[18] Rios, J. L.; Recio, M. C.; Villar, A. Screening Methods for Natural Products with Antimicrobial Activity: A Review of the Literature. *J. Ethnopharmacol.* **1988**, *23* (2–3), 127–149. https://doi.org/10.1016/0378-8741(88)90001-3.

[19] Pukalskas, A.; van Beek, T. A.; de Waard, P. Development of a Triple Hyphenated HPLC–Radical Scavenging Detection–DAD–SPE–NMR System for the Rapid Identification of Antioxidants in Complex Plant Extracts. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1074* (1–2), 81–88. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.089.

[20] Le Grandois, J.; Guffond, D.; Hamon, E.; Marchioni, E.; Werner, D. Combined Microplate-ABTS and HPLC-ABTS Analysis of Tomato and Pepper Extracts Reveals Synergetic and Antagonist Effects of Their Lipophilic Antioxidative Components. *Food Chem.* **2017**, *223*, 62–71. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.008.

[21] Rhee, I. K.; Appels, N.; Luijendijk, T.; Irth, H.; Verpoorte, R. Determining Acetylcholinesterase Inhibitory Activity in Plant Extracts Using a Fluorimetric Flow Assay. *Phytochem. Anal.* **2003**, *14* (3), 145–149. https://doi.org/10.1002/pca.695.

[22] Lin, Z.; Wang, H.; Fu, Q.; An, H.; Liang, Y.; Zhang, B.; Hashi, Y.; Chen, S. Simultaneous Separation, Identification and Activity Evaluation of Three Butyrylcholinesterase Inhibitors from *Plumula nelumbinis* Using on-Line HPLC-UV

Coupled with ESI-IT-TOF-MS and BChE Biochemical Detection. *Talanta* **2013**, *110*, 180–189. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.02.033.

[23] Schenk, T.; Breel, G. J.; Koevoets, P.; van Den Berg, S.; Hogenboom, A. C.; Irth, H.; Tjaden, U. R.; van Der Greef, J. Screening of Natural Products Extracts for the Presence of Phosphodiesterase Inhibitors Using Liquid Chromatography Coupled Online to Parallel Biochemical Detection and Chemical Characterization. *SLAS Discov.* **2003**, *8* (4), 421–429. https://doi.org/10.1177/1087057103255973.

[24] Kool, J.; Eggink, M.; Van Rossum, H.; Van Liempd, S. M.; Van Elswijk, D. A.; Irth, H.; Commandeur, J. N. M.; Meerman, J. H. N.; Vermeulen, N. P. E. Online Biochemical Detection of Glutathione-S-Transferase P1-Specific Inhibitors in Complex Mixtures. *SLAS Discov.* **2007**, *12* (3), 396–405. https://doi.org/10.1177/1087057107299527.

[25] Shi, S.-Y.; Zhang, Y.-P.; Jiang, X.-Y.; Chen, X.-Q.; Huang, K.-L.; Zhou, H.-H.; Jiang, X.-Y. Coupling HPLC to On-Line, Post-Column (Bio)Chemical Assays for High-Resolution Screening of Bioactive Compounds from Complex Mixtures. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2009**, *28* (7), 865–877. https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.03.009.

[26] Stolper, P.; Fabel, S.; Weller, M. G.; Knopp, D.; Niessner, R. Whole-Cell Luminescence-Based Flow-through Biodetector for Toxicity Testing. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390* (4), 1181–1187. https://doi.org/10.1007/s00216-007-1770-5.

[27] Fabel, S.; Niessner, R.; Weller, M. G. Effect-Directed Analysis by High-Performance Liquid Chromatography with Gas-Segmented Enzyme Inhibition. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1099* (1–2), 103–110. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.08.081.

[28] Barreca, D.; Gattuso, G.; Laganà, G.; Leuzzi, U.; Bellocco, E. C - and O -Glycosyl Flavonoids in Sanguinello and Tarocco Blood Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) Juice: Identification and Influence on Antioxidant Properties and Acetylcholinesterase Activity. *Food Chem.* **2016**, *196*, 619–627. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.098.

[29] Wubshet, S. G.; Moresco, H. H.; Tahtah, Y.; Brighente, I. M. C.; Staerk, D. High-Resolution Bioactivity Profiling Combined with HPLC–HRMS–SPE–NMR: α-Glucosidase Inhibitors and Acetylated Ellagic Acid Rhamnosides from *Myrcia palustris* DC. (Myrtaceae). *Phytochemistry* **2015**, *116*, 246–252. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.04.004.

[30] Järvinen, P.; Nybond, S.; Marcourt, L.; Ferreira Queiroz, E.; Wolfender, J.-L.; Mettälä, A.; Karp, M.; Vuorela, H.; Vuorela, P.; Hatakka, A.; Tammela, P. Cell-Based Bioreporter Assay Coupled to HPLC Micro-Fractionation in the Evaluation of Antimicrobial Properties of the Basidiomycete Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Pharm. Biol.* **2016**, *54* (6), 1108–1115. https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1103754.

[31] Adams, M.; Zimmermann, S.; Kaiser, M.; Brun, R.; Hamburger, M. A Protocol for HPLC-Based Activity Profiling for Natural Products with Activities against Tropical Parasites. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4* (10), 1377–1381. https://doi.org/10.1177/1934578X0900401013

[32] Bohni, N.; Cordero-Maldonado, M. L.; Maes, J.; Siverio-Mota, D.; Marcourt, L.; Munck, S.; Kamuhabwa, A. R.; Moshi, M. J.; Esguerra, C. V.; de Witte, P. A. M.; Crawford, A. D.; Wolfender, J.-L. Integration of Microfractionation, QNMR and

Zebrafish Screening for the In Vivo Bioassay-Guided Isolation and Quantitative Bioactivity Analysis of Natural Products. *PLoS One* **2013**, *8* (5), e64006. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064006.

[33] Geiss, F. *Fundamentals of Thin Layer Chromatography : Planar Chromatography*; A. Hüthig, 1987.

[34] Misra, K.; Tulsawani, R.; Shyam, R.; Meena, D. K.; Morlock, G. Hyphenated High-Performance Thim-Layer Chromatography for Profiling of Some Indian Natural Efficiency Enhancers. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2012**, *35* (10), 1364–1387. https://doi.org/10.1080/10826076.2012.675859.

[35] Reich, E.; Maire-Widmer, V. Thin-Layer Chromatography | Instrumentation. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*; Elsevier, 2017. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.00538-2.

[36] Choma, I. M.; Grzelak, E. M. Bioautography Detection in Thin-Layer Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218* (19), 2684–2691. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.069.

[37] Marston, A. Thin-Layer Chromatography with Biological Detection in Phytochemistry. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218* (19), 2676–2683. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.068.

[38] Böhmdorfer, S. Effect-Directed Detection. In *Instrumental Thin-Layer Chromatography*; Elsevier, 2023; pp 297–324. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99970-0.00019-3.

[39] Mendoza, C. E. Thin-Layer Chromatography and Enzyme Inhibition Techniques. *J. Chromatogr. A* **1973**, *78* (1), 29–40. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)99034-X.

[40] Legerská, B.; Chmelová, D.; Ondrejovič, M.; Miertuš, S. The TLC-Bioautography as a Tool for Rapid Enzyme Inhibitors Detection - A Review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2022**, *52* (2), 275–293. https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1797467.

[41] Goodall, R. R.; Levi, A. A. A Microchromatographic Method for the Detection and Approximate Determination of the Different Penicillins in a Mixture. *Nature* **1946**, *158* (4019), 675–676. https://doi.org/10.1038/158675a0.

[42] Nicolaus, B. J. R.; Coronelli, C.; Binaghi, A. Mikrobiologischer Nachweis von Antibiotika Auf Dünnschichtchromatogrammen. *Experientia* **1961**, *17* (10), 473–474. https://doi.org/10.1007/BF02158302.

[43] Homans, A. L.; Fuchs, A. Direct Bioautography on Thin-Layer Chromatograms as a Method for Detecting Fungitoxic Substances. *J. Chromatogr. A* **1970**, *51*, 327–329. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)96877-3.

[44] Botz, L.; Nagy, S.; Kocsis, B. Detection of Microbiologically Active Compounds. In *Planar chromatography: a retrospective view for the third millennium*; Nyiredy, S., Ed.; Springer Scientific Publisher: Budapest, 2001; pp 489–516.

[45] Tyihák, E.; Móricz, Á.; Ott, P. Biodetection and Determination of Biological Activity of Natural Compounds; 2008. https://doi.org/10.1201/9781420046786.ch9.

[46] Berridge, M. V.; Herst, P. M.; Tan, A. S. Tetrazolium Dyes as Tools in Cell Biology: New Insights into Their Cellular Reduction; 2005; pp 127–152. https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7.

[47] Eberz, G.; Rast, H.-G.; Burger, K.; Kreiss, W.; Weisemann, C. Bioactivity Screening by Chromatography-Bioluminescence Coupling. *Chromatographia* **1996**, *43* (1–2), 5–9. https://doi.org/10.1007/BF02272814.

[48] Tabanca, N.; Bedir, E.; Ferreira, D.; Slade, D.; Wedge, D.; Jacob, M.; Khan, S.; Kirimer, N.; Husnu Can Baser, K.; Khan, I. Bioactive Constituents from Turkish *Pimpinella* Species. *Chem. Biodivers.* **2005**, *2* (2), 221–232. https://doi.org/10.1002/cbdv.200590005.

[49] Arrebola, E.; Sivakumar, D.; Bacigalupo, R.; Korsten, L. Combined Application of Antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and Essential Oils for the Control of Peach Postharvest Diseases. *Crop Prot.* **2010**, *29* (4), 369–377. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.08.001.

[50] Kasote, D.; Ahmad, A.; Chen, W.; Combrinck, S.; Viljoen, A. HPTLC-MS as an Efficient Hyphenated Technique for the Rapid Identification of Antimicrobial Compounds from Propolis. *Phytochem. Lett.* **2015**, *11*, 326–331. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.08.017.

[51] Móricz, Á. M.; Ott, P. G. Conventional and Modern Bioassays—Detection, Isolation, Identification. In *Forced-Flow Layer Chromatography*; Elsevier, 2016; pp 347–395. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420161-3.00006-X.

[52] Móricz, Á. M.; Ott, P. G. Effects-Directed Detection. In *Instrumental Thin-Layer Chromatography*; Elsevier, 2023; pp 259–296. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99970-0.00012-0.

[53] Baumann, U.; Brunner, C.; Pletscher, E.; Tobler, N. Biologische Detektionsverfahren in Der Dünnschichtchromatographie. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-forsch.* **2003**, *15* (3), 163–167. https://doi.org/10.1065/uwsf2001.12.080.

[54] Hilaire, V.; Michel, G.; Majoor, A.; Hadji-Minaglou, F.; Landreau, A.; Fernandez, X. New Method for Screening Anti-*Leishmania* Compounds in Plants Extracts by HPTLC-Bioautography. *J. Chromatogr. B* **2022**, *1188*, 123061. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.123061.

[55] Klingelhöfer, I.; Morlock, G. E. Sharp-Bounded Zones Link to the Effect in Planar Chromatography-Bioassay-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1360*, 288–295. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.07.083.

[56] Riegraf, C.; Reifferscheid, G.; Belkin, S.; Moscovici, L.; Shakibai, D.; Hollert, H.; Buchinger, S. Combination of Yeast-Based in Vitro Screens with High-Performance Thin-Layer Chromatography as a Novel Tool for the Detection of Hormonal and Dioxin-like Compounds. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1081*, 218–230. https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.018.

[57] Klingelhöfer, I.; Hockamp, N.; Morlock, G. E. Non-Targeted Detection and Differentiation of Agonists versus Antagonists, Directly in Bioprofiles of Everyday Products. *Anal. Chim. Acta* **2020**, *1125*, 288–298. https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.05.057.

[58] Meyer, D. Detection of Low Levels of Genotoxic Compounds in Food Contact Materials Using an Alternative HPTLC-SOS-Umu-C Assay. *ALTEX* **2020**. https://doi.org/10.14573/altex.2006201.

[59] Shakibai, D.; Riegraf, C.; Moscovici, L.; Reifferscheid, G.; Buchinger, S.; Belkin, S. Coupling High-Performance Thin-Layer Chromatography with Bacterial Genotoxicity Bioreporters. *Environ. Sci. Technol.* **2019**, *53* (11), 6410–6419. https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00921.

[60] Pizzino, G.; Irrera, N.; Cucinotta, M.; Pallio, G.; Mannino, F.; Arcoraci, V.; Squadrito, F.; Altavilla, D.; Bitto, A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017* (1). https://doi.org/10.1155/2017/8416763.

[61] Rhee, I. K.; van de Meent, M.; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R. Screening for Acetylcholinesterase Inhibitors from Amaryllidaceae Using Silica Gel Thin-Layer Chromatography in Combination with Bioactivity Staining. *J. Chromatogr. A* **2001**, *915* (1–2), 217–223. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00624-0.

[62] Cieśla, Ł.; Kryszeń, J.; Stochmal, A.; Oleszek, W.; Waksmundzka-Hajnos, M. Approach to Develop a Standardized TLC-DPPH Test for Assessing Free Radical Scavenging Properties of Selected Phenolic Compounds. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *70*, 126–135. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.06.007.

[63] Marston, A.; Kissling, J.; Hostettmann, K. A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants. *Phytochem. Anal.* **2002**, *13* (1), 51–54. https://doi.org/10.1002/pca.623.

[64] Chen, H.; Yan, X.; Lin, W.; Zheng, L.; Zhang, W. A New Method for Screening α-Glucosidase Inhibitors and Application to Marine Microorganisms. *Pharm. Biol.* **2004**, *42* (6), 416–421. https://doi.org/10.1080/13880200490885987.

[65] Ramallo, I. A.; Zacchino, S. A.; Furlan, R. L. E. A Rapid TLC Autographic Method for the Detection of Xanthine Oxidase Inhibitors and Superoxide Scavengers. *Phytochem. Anal.* **2006**, *17* (1), 15–19. https://doi.org/10.1002/pca.874.

[66] Hassan, A. M. S. TLC Bioautographic Method for Detecting Lipase Inhibitors. *Phytochem. Anal.* **2012**, *23* (4), 405–407. https://doi.org/10.1002/pca.1372.

[67] Morlock, G. E.; Heil, J.; Inarejos-Garcia, A. M.; Maeder, J. Effect-Directed Profiling of Powdered Tea Extracts for Catechins, Theaflavins, Flavonols and Caffeine. *Antioxidants* **2021**, *10* (1), 117. https://doi.org/10.3390/antiox10010117.

[68] Morlock, G. E.; Heil, J.; Bardot, V.; Lenoir, L.; Cotte, C.; Dubourdeaux, M. Effect-Directed Profiling of 17 Different Fortified Plant Extracts by High-Performance Thin-Layer Chromatography Combined with Six Planar Assays and High-Resolution Mass Spectrometry. *Molecules* **2021**, *26* (5), 1468. https://doi.org/10.3390/molecules26051468.

[69] *Handbook of Thin-Layer Chromatography*; Sherma, J., Fried, B., Eds.; CRC Press, 2003. https://doi.org/10.1201/9780203912430.

[70] *Instrumental Thin-Layer Chromatography*; Elsevier, 2015. https://doi.org/10.1016/C2013-0-06869-7.

[71] Stroka, J.; Spangenberg, B.; Anklam, E. New Approaches in TLC-Densitometry. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2002**, *25* (10–11), 1497–1513. https://doi.org/10.1081/JLC-120005700.

[72] Spangenberg, B. Quantitative Detection of Drugs by Densitometry and Video Scanning. In *Thin Layer Chromatography in Drug Analysis*; Komsta, L.; Waksmundzka-Hajnos,

M.; Sherma, J., Eds.; CRC Press, 2013; pp 198–215. https://doi.org/10.1201/b15637-14.

[73] Percival, C. J.; Griffiths, P. R. Direct Measurement of the Infrared Spectra of Compounds Separated by Thin-Layer Chromatography. *Anal. Chem.* **1975**, *47* (1), 154–156. https://doi.org/10.1021/ac60351a030.

[74] Somsen, G. .; Morden, W.; Wilson, I. . Planar Chromatography Coupled with Spectroscopic Techniques. *J. Chromatogr. A* **1995**, *703* (1–2), 613–665. https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00296-Y.

[75] Horváth, E.; Kátay, G.; Tyihák, E.; Kristóf, J.; Rédey, Á. Critical Evaluation of Experimental Conditions Influencing the Surface-Enhanced Raman Spectroscopic (SERS) Detection of Substances Separated by Layer Liquid Chromatographic Techniques. *Chromatographia* **2000**, *51* (1), S297–S301. https://doi.org/10.1007/BF02492821.

[76] Zhang, Z.-M.; Liu, J.-F.; Liu, R.; Sun, J.-F.; Wei, G.-H. Thin Layer Chromatography Coupled with Surface-Enhanced Raman Scattering as a Facile Method for On-Site Quantitative Monitoring of Chemical Reactions. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (15), 7286–7292. https://doi.org/10.1021/ac5017387.

[77] Móricz, Á. M.; Horváth, E.; Ott, P. G.; Tyihák, E. Raman Spectroscopic Evaluation of the Influence of *Pseudomonas* Bacteria on Aflatoxin B1 in the BioArena Complex Bioautographic System. *J. Raman Spectrosc.* **2008**, *39* (10), 1332–1337. https://doi.org/10.1002/jrs.1998.

[78] Rau, A. Basic Experiments in Thin-layer Chromatography–Fourier Transform Raman Spectrometry. *J. Raman Spectrosc.* **1993**, *24* (4), 251–254. https://doi.org/10.1002/jrs.1250240412.

[79] Grzelak, E. M.; Hwang, C.; Cai, G.; Nam, J.-W.; Choules, M. P.; Gao, W.; Lankin, D. C.; McAlpine, J. B.; Mulugeta, S. G.; Napolitano, J. G.; Suh, J.-W.; Yang, S. H.; Cheng, J.; Lee, H.; Kim, J.-Y.; Cho, S.-H.; Pauli, G. F.; Franzblau, S. G.; Jaki, B. U. Bioautography with TLC-MS/NMR for Rapid Discovery of Anti-Tuberculosis Lead Compounds from Natural Sources. *ACS Infect. Dis.* **2016**, *2* (4), 294–301. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00150.

[80] Azadniya, E.; Morlock, G. E. Bioprofiling of *Salvia miltiorrhiza* via Planar Chromatography Linked to (Bio)Assays, High Resolution Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1533*, 180–192. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.014.

[81] Morlock, G.; Schwack, W. Coupling of Planar Chromatography to Mass Spectrometry. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2010**, *29* (10), 1157–1171. https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.07.010.

[82] Luftmann, H.; Aranda, M.; Morlock, G. E. Automated Interface for Hyphenation of Planar Chromatography with Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21* (23), 3772–3776. https://doi.org/10.1002/rcm.3276.

[83] Van Berkel, G. J.; Tomkins, B. A.; Kertesz, V. Thin-Layer Chromatography/Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Investigation of Goldenseal Alkaloids. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (7), 2778–2789. https://doi.org/10.1021/ac0622330.

[84] Morlock, G.; Ueda, Y. New Coupling of Planar Chromatography with Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1143* (1–2), 243–251. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.056.

[85] Fougère, L.; Da Silva, D.; Destandau, E.; Elfakir, C. TLC-MALDI-TOF-MS-based Identification of Flavonoid Compounds Using an Inorganic Matrix. *Phytochem. Anal.* **2019**, *30* (2), 218–225. https://doi.org/10.1002/pca.2807.

[86] Resano, M.; García Ruiz, E.; Mihucz, V. G.; Móricz, Á. M.; Záray, G.; Vanhaecke, F. Rapid Screening Method for Arsenic Speciation by Combining Thin Layer Chromatography and Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Dynamic Reaction Cell-Mass Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **2007**, *22* (9), 1158. https://doi.org/10.1039/b704963c.

[87] Mincsovics, E.; Garami, M.; Kecskés, L.; Tapa, B.; Végh, Z.; Kátay, G.; Tyihák, E. Personal Overpressured-Layer Chromatography (OPLC) Basic System 50, Flexible Tool in Analytical and Semipreparative Work. *J. AOAC Int.* **1999**, *82* (3), 587–598. https://doi.org/10.1093/jaoac/82.3.587.

[88] Tyihák, E.; Mincsovics, E.; Móricz, Á. M. Overpressured Layer Chromatography: From the Pressurized Ultramicro Chamber to BioArena System. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1232*, 3–18. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.11.049.

[89] Nyiredy, S. The Bridge between TLC and HPLC: Overpressured Layer Chromatography (OPLC). *TrAC Trends Anal. Chem.* **2001**, *20* (2), 91–101. https://doi.org/10.1016/S0165-9936(00)00047-9.

[90] Tyihák, E.; Móricz, Á. M.; Mincsovics, E. Overpressured-Layer Chromatography. In *Forced-Flow Layer Chromatography*; Elsevier, 2016; pp 49–186. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420161-3.00002-2.

[91] Mincsovics, E.; Tyihák, E.; Siouffi, A. M. Comparison of Off-Line and On-Line Overpressured Layer Chromatography (OPLC). *J Planar Chromatogr—Mod TLC* **1988**, *1*, 141–144.

[92] Chai, W.; Leteux, C.; Lawson, A. M.; Stoll, M. S. On-Line Overpressure Thin-Layer Chromatographic Separation and Electrospray Mass Spectrometric Detection of Glycolipids. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (1), 118–125. https://doi.org/10.1021/ac025833h.

[93] Mincsovics, E.; Sárdi, É.; Velich, I.; Kátay, G.; Tyihák, E. Micro-Preparative OPLC — Rapid Isolation by Transfusion and Infusion-Transfusion Processes. *J. Planar Chromatogr. – Mod. TLC* **2002**, *15* (4), 280–285. https://doi.org/10.1556/JPC.15.2002.4.7.

[94] Móricz, Á.; Tyihák, E.; Ott, P. Usefulness of Transgenic Luminescent Bacteria in Direct Bioautographic Investigation of Chamomile Extracts. *J. Planar Chromatogr. – Mod. TLC* **2010**, *23* (3), 180–183. https://doi.org/10.1556/JPC.23.2010.3.2.

[95] Zhao, Y.; Damicone, J. P.; Demezas, D. H.; Rangaswamy, V.; Bender, C. L. Bacterial Leaf Spot of Leafy Crucifers in Oklahoma Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. *Plant Dis.* **2000**, *84* (9), 1015–1020. https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.9.1015.

[96] Jones, J. B.; Lacy, G. H.; Bouzar, H.; Stall, R. E.; Schaad, N. W. Reclassification of the Xanthomonads Associated with Bacterial Spot Disease of Tomato and Pepper. *Syst. Appl. Microbiol.* **2004**, *27* (6), 755–762. https://doi.org/10.1078/0723202042369884.

[97] Yuliar; Nion, Y. A.; Toyota, K. Recent Trends in Control Methods for Bacterial Wilt Diseases Caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes Environ.* **2015**, *30* (1), 1–11. https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14144.

[98] Schwarczinger, I.; Bozsó, Z.; Szatmári, Á.; Süle, S.; Szabó, Z.; Király, L. First Report of Bacterial Spot Caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* on Apricot in Hungary. *Plant Dis.* **2017**, *101* (6), 1031–1031. https://doi.org/10.1094/PDIS-11-16-1582-PDN.

[99] Stes, E.; Francis, I.; Pertry, I.; Dolzblasz, A.; Depuydt, S.; Vereecke, D. The Leafy Gall Syndrome Induced by *Rhodococcus fascians*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2013**, *342* (2), 187–195. https://doi.org/10.1111/1574-6968.12119.

[100] Vogelgsang, S.; Sulyok, M.; Hecker, A.; Jenny, E.; Krska, R.; Schuhmacher, R.; Forrer, H.-R. Toxigenicity and Pathogenicity of *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum* on Wheat. *Eur. J. Plant Pathol.* **2008**, *122* (2), 265–276. https://doi.org/10.1007/s10658-008-9279-0.

[101] Kumar, J.; Schäfer, P.; Hückelhoven, R.; Langen, G.; Baltruschat, H.; Stein, E.; Nagarajan, S.; Kogel, K. *Bipolaris sorokiniana*, a Cereal Pathogen of Global Concern: Cytological and Molecular Approaches towards Better Control. *Mol. Plant Pathol.* **2002**, *3* (4), 185–195. https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00120.x.

[102] Kasanah, N.; Farr, L. L.; Gholipour, A.; Wedge, D. E.; Hamann, M. T. Metabolism and Resistance of *Fusarium* Spp. to the Manzamine Alkaloids via a Putative Retro Pictet-Spengler Reaction and Utility of the Rational Design of Antimalarial and Antifungal Agents. *Mar. Biotechnol.* **2014**, *16* (4), 412–422. https://doi.org/10.1007/s10126-014-9557-0.

[103] Hadacek, F.; Greger, H. Testing of Antifungal Natural Products: Methodologies, Comparability of Results and Assay Choice. *Phytochem. Anal.* **2000**, *11* (3), 137–147. https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(200005/06)11:3<137::AID-PCA514>3.0.CO;2-I.

[104] Aberkane, A. Comparative Evaluation of Two Different Methods of Inoculum Preparation for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, *50* (5), 719–722. https://doi.org/10.1093/jac/dkf187.

[105] Fan, J.; Crooks, C.; Lamb, C. High-throughput Quantitative Luminescence Assay of the Growth in Planta of *Pseudomonas syringae* Chromosomally Tagged with *Photorhabdus luminescens* LuxCDABE. *Plant J.* **2008**, *53* (2), 393–399. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03303.x.

[106] Weins, C.; Jork, H. Toxicological Evaluation of Harmful Substances by in Situ Enzymatic and Biological Detection in High-Performance Thin-Layer Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1996**, *750* (1–2), 403–407. https://doi.org/10.1016/0021-9673(96)00601-2.

[107] Chen, Y.; Huang, C.; Hellmann, B.; Jin, Z.; Xu, X.; Xiao, G. A New HPTLC Platformed Luminescent Biosensor System for Facile Screening of Captan Residue in Fruits. *Food Chem.* **2020**, *309*, 125691. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125691.

[108] Jabbar, S.; Twentyman, P.; Watson, J. The MTT Assay Underestimates the Growth Inhibitory Effects of Interferons. *Br. J. Cancer* **1989**, *60* (4), 523–528. https://doi.org/10.1038/bjc.1989.306.

[109] Pagliacci, M. C.; Spinozzi, F.; Migliorati, G.; Fumi, G.; Smacchia, M.; Grignani, F.; Riccardi, C.; Nicoletti, I. Genistein Inhibits Tumour Cell Growth in Vitro but Enhances Mitochondrial Reduction of Tetrazolium Salts: A Further Pitfall in the Use of the MTT Assay for Evaluating Cell Growth and Survival. *Eur. J. Cancer* **1993**, *29* (11), 1573–1577. https://doi.org/10.1016/0959-8049(93)90297-S.

[110] Bernhard, D.; Schwaiger, W.; Crazzolara, R.; Tinhofer, I.; Kofler, R.; Csordas, A. Enhanced MTT-Reducing Activity under Growth Inhibition by Resveratrol in CEM-C7H2 Lymphocytic Leukemia Cells. *Cancer Lett.* **2003**, *195* (2), 193–199. https://doi.org/10.1016/S0304-3835(03)00157-5.

[111] Reuter, G. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Microflora of the Human Intestine: Composition and Succession. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **2001**, *2* (2), 43–53.

[112] Walter, J. Ecological Role of Lactobacilli in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74* (16), 4985–4996. https://doi.org/10.1128/AEM.00753-08.

[113] Roesch, L. F. W.; Lorca, G. L.; Casella, G.; Giongo, A.; Naranjo, A.; Pionzio, A. M.; Li, N.; Mai, V.; Wasserfall, C. H.; Schatz, D.; Atkinson, M. A.; Neu, J.; Triplett, E. W. Culture-Independent Identification of Gut Bacteria Correlated with the Onset of Diabetes in a Rat Model. *ISME J.* **2009**, *3* (5), 536–548. https://doi.org/10.1038/ismej.2009.5.

[114] Gaudana, S. B.; Dhanani, A. S.; Bagchi, T. Probiotic Attributes of *Lactobacillus* Strains Isolated from Food and of Human Origin. *Br. J. Nutr.* **2010**, *103* (11), 1620–1628. https://doi.org/10.1017/S0007114509993643.

[115] Tundis, R.; Loizzo, M. R.; Menichini, F. Natural Products as α-Amylase and α-Glucosidase Inhibitors and Their Hypoglycaemic Potential in the Treatment of Diabetes: An Update. *Mini-Reviews Med. Chem.* **2010**, *10* (4), 315–331. https://doi.org/10.2174/138955710791331007.

[116] Teng, H.; Chen, L. α-Glucosidase and α-Amylase Inhibitors from Seed Oil: A Review of Liposoluble Substance to Treat Diabetes. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, *57* (16), 3438–3448. https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1129309.

[117] Parizadeh, H.; Garampalli, R. H. Evaluation of Some Lichen Extracts for β-Glucosidase Inhibitory as a Possible Source of Herbal Anti-Diabetic Drugs. *Am. J. Biochem.* **2016**, *6* (2), 46–50. https://doi.org/10.5923/j.ajb.20160602.04

[118] Simões-Pires, C. A.; Hmicha, B.; Marston, A.; Hostettmann, K. A TLC Bioautographic Method for the Detection of α- and β-glucosidase Inhibitors in Plant Extracts. *Phytochem. Anal.* **2009**, *20* (6), 511–515. https://doi.org/10.1002/pca.1154.

[119] Jamshidi-Aidji, M.; Macho, J.; Mueller, M. B.; Morlock, G. E. Effect-Directed Profiling of Aqueous, Fermented Plant Preparations via High-Performance Thin-Layer Chromatography Combined with *in Situ* Assays and High-Resolution Mass Spectrometry. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2019**, *42* (9–10), 266–273. https://doi.org/10.1080/10826076.2019.1585631.

[120] Móricz, Á. M.; Bartoszek, M.; Polak, J.; Marczewska, P.; Knaś, M.; Böszörményi, A.; Fodor, J.; Kowalska, T.; Sajewicz, M. A Comparison of Quantitative Composition and Bioactivity of Oils Derived from Seven North American Varieties of Hops (*Humulus*

lupulus L.). *Separations* **2023**, *10* (7), 402. https://doi.org/10.3390/separations10070402.

[121] Agatonovic-Kustrin, S.; Morton, D. W.; Adam, A.; Mizaton, H. H.; Zakaria, H. High-Performance Thin-Layer Chromatographic Methods in the Evaluation of the Antioxidant and Anti-Hyperglycemic Activity of *Myrmecodia platytyrea* as a Promising Opportunity in Diabetes Treatment. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1530*, 192–196. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.11.012.

[122] Winn-Deen, E. S.; David, H.; Sigler, G.; Chavez, R. Development of a Direct Assay for Alpha-Amylase. *Clin. Chem.* **1988**, *34* (10), 2005–2008.

[123] Gella, F.-J.; Gubern, G.; Vidal, R.; Canalias, F. Determination of Total and Pancreatic α-Amylase in Human Serum with 2-Chloro-4-Nitrophenyl-α-d-Maltotrioside as Substrate. *Clin. Chim. Acta* **1997**, *259* (1–2), 147–160. https://doi.org/10.1016/S0009-8981(96)06481-9.

[124] Rhee, I. K.; van de Meent, M.; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R. Screening for Acetylcholinesterase Inhibitors from Amaryllidaceae Using Silica Gel Thin-Layer Chromatography in Combination with Bioactivity Staining. *J. Chromatogr. A* **2001**, *915* (1–2), 217–223. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00624-0.

[125] Stütz, L.; Weiss, S. C.; Schulz, W.; Schwack, W.; Winzenbacher, R. Selective Two-Dimensional Effect-Directed Analysis with Thin-Layer Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1524*, 273–282. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.009.

[126] Reich, E.; Schibli, A. *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants*; Thieme: New York, 2007.

[127] Waksmundzka-Hajnos, M.; Móricz, Á. M.; Hawrył, A.; Sajewicz, M.; Kowalska, T. Applications of Thin-Layer Chromatography in the Quality Control of Botanicals. In *Instrumental Thin-Layer Chromatography*; Elsevier, 2023; pp 575–613. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99970-0.00021-1.

[128] Szeremeta, D.; Knaś, M.; Długosz, E.; Krzykała, K.; Mrozek-Wilczkiewicz, A.; Musioł, R.; Kowalska, T.; Ott, P. G.; Sajewicz, M.; Móricz, Á. M. Investigation of Antibacterial and Cytotoxic Potential of Phenolics Derived from *Cistus incanus* L. by Means of Thin-Layer Chromatography-Direct Bioautography and Cytotoxicity Assay. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2018**, *41* (6), 349–357. https://doi.org/10.1080/10826076.2018.1449056.

[129] Sajewicz, M.; Staszek, D.; Waksmundzka-Hajnos, M.; Kowalska, T. Comparison of TLC and HPLC Fingerprints of Phenolic Acids and Flavonoids Fractions Derived from Selected Sage (*Salvia*) Species. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2012**, *35* (10), 1388–1403. https://doi.org/10.1080/10826076.2012.676463.

[130] Jork, H.; Funk, W.; Fischer, W.; Wimmer, H. *Thin-Layer Chromatography : Reagents and Detection Methods*; VCH: Weinheim, Germany, 1994.

[131] Proksch, P.; Gülz, P.-G. Methylated Flavonoids from *Cistus ladanifer* and *Cistus palhinhae* and Their Taxonomic Implications. *Phytochemistry* **1984**, *23* (2), 470–471. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80359-3.

[132] Wittpahl, G.; Kölling-Speer, I.; Basche, S.; Herrmann, E.; Hannig, M.; Speer, K.; Hannig, C. The Polyphenolic Composition of *Cistus incanus* Herbal Tea and Its

Antibacterial and Anti-Adherent Activity against *Streptococcus mutans*. *Planta Med.* **2015**, *81* (18), 1727–1735. https://doi.org/10.1055/s-0035-1557822.

[133] Stoll, D. R.; Carr, P. W. Two-Dimensional Liquid Chromatography: A State of the Art Tutorial. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (1), 519–531. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03506.

[134] Vovk, I.; Simonovska, B.; Kompan, L.; Prošek, M. TLC Determination of Mannitol and Lactulose on Amino HPTLC Plates. *J. Planar Chromatogr. – Mod. TLC* **2003**, *16* (5), 374–376. https://doi.org/10.1556/JPC.16.2003.5.8.

[135] Dwyer, J.; Coates, P.; Smith, M. Dietary Supplements: Regulatory Challenges and Research Resources. *Nutrients* **2018**, *10* (1), 41. https://doi.org/10.3390/nu10010041.

[136] Thakkar, S.; Anklam, E.; Xu, A.; Ulberth, F.; Li, J.; Li, B.; Hugas, M.; Sarma, N.; Crerar, S.; Swift, S.; Hakamatsuka, T.; Curtui, V.; Yan, W.; Geng, X.; Slikker, W.; Tong, W. Regulatory Landscape of Dietary Supplements and Herbal Medicines from a Global Perspective. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2020**, *114*, 104647. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104647.

[137] Halegoua-DeMarzio, D.; Navarro, V. Challenges in Herbal-induced Liver Injury Identification and Prevention. *Liver Int.* **2025**, *45* (3). https://doi.org/10.1111/liv.16071.

[138] Naumoska, K.; Simonovska, B.; Albreht, A.; Vovk, I. TLC and TLC-MS Screening of Ursolic, Oleanolic and Betulinic Acids in Plant Extracts. *J. Planar Chromatogr. – Mod. TLC* **2013**, *26* (2), 125–131. https://doi.org/10.1556/JPC.26.2013.2.4.

[139] Luftmann, H. A Simple Device for the Extraction of TLC Spots: Direct Coupling with an Electrospray Mass Spectrometer. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378* (4), 964–968. https://doi.org/10.1007/s00216-003-2293-3.

[140] Morlock, G. E.; Brett, N. Correct Assignment of Lipophilic Dye Mixtures? A Case Study for High-Performance Thin-Layer Chromatography–Mass Spectrometry and Performance Data for the TLC–MS Interface. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1390*, 103–111. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.011.

[141] Vovk, I.; Popović, G.; Simonovska, B.; Albreht, A.; Agbaba, D. Ultra-Thin-Layer Chromatography Mass Spectrometry and Thin-Layer Chromatography Mass Spectrometry of Single Peptides of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218* (20), 3089–3094. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.03.039.

[142] Jarne, C.; Membrado, L.; Savirón, M.; Vela, J.; Orduna, J.; Garriga, R.; Galbán, J.; Cebolla, V. L. Globotriaosylceramide-Related Biomarkers of Fabry Disease Identified in Plasma by High-Performance Thin-Layer Chromatography - Densitometry- Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2021**, *1638*, 461895. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461895.

[143] Schendzielorz, M.; Schmidt, T.; Puchalla, N.; Csuk, R.; Kramell, A. E. TLC and HPTLC-APCI-MS for the Rapid Discrimination of Plant Resins Frequently Used for Lacquers and Varnishes by Artists and Conservators. *Phytochem. Anal.* **2024**, *35* (1), 64–76. https://doi.org/10.1002/pca.3273.

[144] Aranda, M.; Morlock, G. New Method for Caffeine Quantification by Planar Chromatography Coupled with Electropray Ionization Mass Spectrometry Using Stable

Isotope Dilution Analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21* (7), 1297–1303. https://doi.org/10.1002/rcm.2949.

[145] Schmidt, T.; Stommel, J.; Kohlmann, T.; Kramell, A. E.; Csuk, R. Separating the True from the False: A Rapid HPTLC-ESI-MS Method for the Determination of Cannabinoids in Different Oils. *Results Chem.* **2021**, *3*, 100234. https://doi.org/10.1016/j.rechem.2021.100234.

[146] Meisen, I.; Friedrich, A. W.; Karch, H.; Witting, U.; Peter-Katalinić, J.; Müthing, J. Application of Combined High-performance Thin-layer Chromatography Immunostaining and Nanoelectrospray Ionization Quadrupole Time-of-flight Tandem Mass Spectrometry to the Structural Characterization of High- and Low-affinity Binding Ligands of Shiga Toxi. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19* (24), 3659–3665. https://doi.org/10.1002/rcm.2241.

[147] Moise, M.-I.; Marutoiu, C.; Badea, D.; Gavrila, C.-A.; Patroescu, C. Application of TLC and GC-MS to the Detection of Capsaicin from Hot Peppers (*Capsicum annuum*). *J. Planar Chromatogr. – Mod. TLC* **2004**, *17* (2), 147–148. https://doi.org/10.1556/JPC.17.2004.2.12.

[148] Móricz, Á. M.; Baglyas, M.; Cselőtey, A.; Böszörményi, A.; Ott, P. G. Antibacterial Compounds of *Cymbopogon nardus* Essential Oil Exposed by High-Performance Thin-Layer Chromatography–Direct Bioautography. *JPC – J. Planar Chromatogr. – Mod. TLC* **2025**, *38* (4–5), 401–406. https://doi.org/10.1007/s00764-025-00344-0.

[149] Schwack, W.; Pellissier, E.; Morlock, G. Analysis of Unauthorized Sudan Dyes in Food by High-Performance Thin-Layer Chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410* (22), 5641–5651. https://doi.org/10.1007/s00216-018-0945-6.

[150] Mroczek, T. Qualitative and Quantitative Two-Dimensional Thin-Layer Chromatography/High Performance Liquid Chromatography/Diode-Array/Electrospray-Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry of Cholinesterase Inhibitors. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *129*, 155–162. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.048.

[151] Yüce, I.; Morlock, G. E. Streamlined Structure Elucidation of an Unknown Compound in a Pigment Formulation. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1469*, 120–127. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.09.040.

[152] Kirchert, S.; Morlock, G. E. Orthogonal Hyphenation of Planar and Liquid Chromatography for Mass Spectrometry of Biomarkers out of the Bioassay Matrix (NP-HPTLC-UV/Vis/FLD-Bioassay-RP/IEX-HPLC-UV/Vis-ESI-MS). *Anal. Chem.* **2020**, *92* (13), 9057–9064. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01251.

[153] Morlock, G. E. Chromatography Combined with Bioassays and Other Hyphenations – The Direct Link to the Compound Indicating the Effect; 2014; pp 101–121. https://doi.org/10.1021/bk-2014-1185.ch005.

[154] Cody, R. B.; Laramée, J. A.; Durst, H. D. Versatile New Ion Source for the Analysis of Materials in Open Air under Ambient Conditions. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (8), 2297–2302. https://doi.org/10.1021/ac050162j.

[155] Chernetsova, E. S.; Morlock, G. E.; Revelsky, I. A. DART Mass Spectrometry and Its Applications in Chemical Analysis. *Russ. Chem. Rev.* **2011**, *80* (3), 235–255. https://doi.org/10.1070/RC2011v080n03ABEH004194.

[156] Häbe, T. T.; Morlock, G. E. Quantitative Surface Scanning by Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2015**, *29* (6), 474–484. https://doi.org/10.1002/rcm.7127.

[157] Tyihák, E. *Forced-Flow Layer Chromatography*, 1st ed.; Tyihák, E., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2015. https://doi.org/10.1016/C2013-0-12790-0.

[158] Tyihák, E.; Mincsovics, E.; Kalász, H. New Planar Liquid Chromatographic Technique: Overpressured Thin-Layer Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1979**, *174* (1), 75–81. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)87038-7.

[159] Tyihák, E.; Held, G. Thin-Layer Chromatography in Pharmacognosy. In *Progress in TLC and related techniques, vol. II.*; Niederwieser, A., Pataki, G., Eds.; Ann Arbor Science Publishers, 1971; pp 183–234.

[160] Mincsovics, E.; Móricz, Á. M.; Tyihák, E. Forced-Flow Development in Overpressured Layer Chromatography. In *Instrumental Thin-Layer Chromatography*; Elsevier, 2015; pp 107–133. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417223-4.00005-4.

[161] Mincsovics, E.; Tyihák, E.; Kalász, H. Resolution and Retention Behaviour of Some Dyes in Overpressured Thin-Layer Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1980**, *191*, 293–300. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)86391-8.

[162] Tyihák, E.; Mincsovics, E. Trends in Overpressured Layer Chromatography (OPLC). *J Planar Chromatogr—Mod TLC* **1991**, *4*, 288–292.

[163] Mincsovics, E.; Tyihák, E.; Siouffi, A. M. Characteristics of the One-Dimensional on-Line Separation and Detection in a Modified CHROMPRES Chamber. In *Proceedings of international symposium on TLC with special emphasis on overpressured layer chromatography (OPLC).*; Tyihák, E., Ed.; Labor MIM: Budapest, 1986; pp 251–264.

[164] Nyiredy, S.; Mészáros, S.; Dallenbach-Toelke, K.; Nyiredy-Mikita, K.; O., S. The "Disturbing Zone" in Overpressure Layer Chromatography (OPLC). *J High Resol Chromatogr Chromatogr Commun* **1987**, *10*, 352–356.

[165] Nyiredy, S.; Erdelmeier, C. A. J.; Dallenbach-Toelke, K.; Nyiredy-Mikita, K.; Sticher, O. Preparative On-Line Overpressure Layer Chromatography (OPLC): A New Separation Technique for Natural Products. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49* (5), 885–891. https://doi.org/10.1021/np50047a020.

[166] Mincsovics, E.; Pápai, K.; Ludányi, K.; Dávid, Á.; Budai, M.; Antal, I.; Klebovich, I. Fully On-Line Hyphenation of an Experimental OPLC Separation Unit with Diode-Array Detection and Mass-Spectrometry (OPLC-DAD-MS) for Analysis of Xanthine Compounds. *J. Planar Chromatogr. – Mod. TLC* **2008**, *21* (5), 361–366. https://doi.org/10.1556/JPC.21.2008.5.8.

[167] Mincsovics, E.; Kiss, B. D.; Morovján, G.; Balogh Nemes, K.; Klebovics, I. A New Tool in Metabolism Research—Combination of OPLC On-Line Radioactivity Detection with HPLC—RD Technique. *JPC-J Planar Chromat* **2001**, *14*, 312–317. https://doi.org/10.1556/JPC.14.2001.5.1.

[168] Mincsovics, E.; Kátay, G.; Ott, P. G.; Király-Véghely, Z.; Móricz, Á. M.; Tyihák, E. Isolation of Some Antimicrobial Compounds of Red Wine by OPLC Flowing Eluent Wall Technique. *Chromatographia* **2005**, *62* (S13), s51–s56. https://doi.org/10.1365/s10337-005-0626-4.

[169] Mincsovics, E.; Ott, P.; Alberti, Á.; Böszörményi, A.; Héthelyi, É.; Szőke, É.; Kéry, Á.; Lemberkovics, É.; Móricz, Á. *In-Situ* Clean-up and OPLC Fractionation of Chamomile Flower Extract to Search Active Components by Bioautography. *J. Planar Chromatogr. – Mod. TLC* **2013**, *26* (2), 172–179. https://doi.org/10.1556/JPC.26.2013.2.12.

[170] Morovjan, G.; Dalmadi-Kiss, B.; Klebovich, I.; Mincsovics, E. Metabolite Analysis, Isolation and Purity Assessment Using Various Liquid Chromatographic Techniques Combined With Radioactivity Detection. *J. Chromatogr. Sci.* **2002**, *40* (10), 603–608. https://doi.org/10.1093/chromsci/40.10.603.

[171] Betti, A.; Lodi, G.; Bighi, C.; Chiorboli, G.; Coppi, S. Use of Overpressured Layer Chromatography and Coupled OPLC-GC-MS for the Analysis of Acetylenic Thiophene Derivatives in Extracts of *Tagetes patula*. *J Planar Chromatogr* **1994**, *7*, 301–314.

[172] M. Móricz, A.; Szarka, S.; G. Ott, P.; B. Hethelyi, E.; Szoke, E.; Tyihak, E. Separation and Identification of Antibacterial Chamomile Components Using OPLC, Bioautography and GC-MS. *Med. Chem. (Los. Angeles).* **2012**, *8* (1), 85–94. https://doi.org/10.2174/157340612799278487.

[173] Mincsovics, E.; Tyihák, E. Analytical and Preparative Overpressured Layer Chromatography. In *Recent advances in thin-layer chromatography.*; Dallas, F., Ed.; Plenum Press: New York, 1988; pp 57–65.

[174] Mincsovics, E.; Garami, M.; Tyihák, E. Direct Coupling of OPLC with HPLC: Clean-up and Separation. *J. Planar Chromatogr. - Mod. TLC* **1991**, *4*, 299–303.

[175] Pata, S.; Yaraksa, N.; Daduang, S.; Temsiripong, Y.; Svasti, J.; Araki, T.; Thammasirirak, S. Characterization of the Novel Antibacterial Peptide Leucrocin from Crocodile (*Crocodylus siamensis*) White Blood Cell Extracts. *Dev. Comp. Immunol.* **2011**, *35* (5), 545–553. https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.12.011.

[176] Harvey, A. Natural Products in Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2008**, *13* (19–20), 894–901. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.07.004.

[177] Hostettmann, K.; Wolfender, J. L. Natural Products | Liquid Chromatography. In *Encyclopedia of Separation Science*; Elsevier, 2000; pp 3424–3434. https://doi.org/10.1016/B0-12-226770-2/01651-3.

[178] *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*; Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., Kowalska, T., Eds.; CRC Press, 2008. https://doi.org/10.1201/9781420046786.

[179] Morlock, G.; Schwack, W. Hyphenations in Planar Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217* (43), 6600–6609. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.058.

[180] Droźdź, B.; Holub, M.; Samek, Z.; Herout, V.; Šorm, F. On Terpenes. CXCII. The Constitution and Absolute Configuration of Onopordopicrine — a Sesquiterpenic Lactone from *Onopordum acanthium* L. *Collect. Czech. Chem. C.* **1968**, *33*, 1730–1737. https://doi.org/10.1135/cccc196817.

[181] Gao, Y.; Zheng, C.-D.; Li, Y.; Fan, C.; Tu, G.-H.; Gao, J.-M. Chemical Constituents from Leaves of Allelopathic Cultivar Sunflower in China. *Chem. Nat. Compd.* **2008**, *44* (6), 773–775. https://doi.org/10.1007/s10600-009-9177-5.

[182] Kim, H.; Lee, J.; Sezirahiga, J.; Kwon, J.; Jeong, M.; Lee, D.; Choi, J.-H.; Jang, D. A New Canthinone-Type Alkaloid Isolated from *Ailanthus altissima* Swingle. *Molecules* **2016**, *21* (5), 642. https://doi.org/10.3390/molecules21050642.

[183] Szymura, M.; Szymura, T. H. Interactions between Alien Goldenrods (*Solidago* and *Euthamia* Species) and Comparison with Native Species in Central Europe. *Flora - Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* **2016**, *218*, 51–61. https://doi.org/10.1016/j.flora.2015.11.009.

[184] Barbara Kołodziej. Antibacterial and Antimutagenic Activity of Extracts Aboveground Parts of Three *Solidago* Species: *Solidago virgaurea* L., *Solidago canadensis* L. and *Solidago gigantea* Ait. *J. Med. Plants Res.* **2011**, *5* (31). https://doi.org/10.5897/JMPR11.1098.

[185] Schmotzer, A. A Fűlevelű Aranyvessző [*Solidago graminifolia* (L.) Salisb.] Előfordulása Magyarországon. *Flora Pannonica* **2008**, *6*, 59–77.

[186] Móricz, Á. M.; Ott, P. G.; Krüzselyi, D.; Baglyas, M.; Morlock, G. E. High-Performance Thin-Layer Chromatography–Direct Bioautography Combined with Chemometrics for the Distinction of Goldenrod Species. *JPC – J. Planar Chromatogr. – Mod. TLC* **2022**, *35* (3), 339–344. https://doi.org/10.1007/s00764-022-00159-3.

[187] Anthonsen, T.; McCabe, P. H.; McCrindle, R.; Murray, R. D. H. Constituents of *Solidago* Species—I. *Tetrahedron* **1969**, *25* (10), 2233–2239. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)82771-X.

[188] Bohlmann, F.; Fritz, U.; King, R. M.; Robinson, H. Sesquiterpene and Diterpene Derivatives from *Solidago* Species. *Phytochemistry* **1980**, *19* (12), 2655–2661. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83939-4.

[189] Lam, J.; Christensen, L. P.; Färch, T.; Thomasen, T. Acetylenes from the Roots of *Solidago* Species. *Phytochemistry* **1992**, *31* (12), 4159–4161. https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80433-F.

[190] Lam, J. Polyacetylenes of *Solidago virgaurea*: Their Seasonal Variation and NMR Long-Range Spin Coupling Constants. *Phytochemistry* **1971**, *10* (3), 647–653. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94712-5.

[191] Tiansheng Lu; Vargas, D.; Franzblau, S. G.; Fischer, N. H. Diterpenes from *Solidago rugosa*. *Phytochemistry* **1995**, *38* (2), 451–456. https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00625-4.

[192] Henderson, M. S.; McCrindle, R.; McMaster, D. Constituents of *Solidago* Species. Part V. Non-Acidic Diterpenoids from *Solidago gigantea* var. *serotina*. *Can. J. Chem.* **1973**, *51* (9), 1346–1358. https://doi.org/10.1139/v73-201.

[193] Anthonsen, T.; Henderson, M. S.; Martin, A.; Murray, R. D. H.; McCrindle, R.; McMaster, D. Constituents of *Solidago* Species. Part IV. Solidagoic Acids A and B, Diterpenoids from *Solidago gigantea* var. *serotina*. *Can. J. Chem.* **1973**, *51* (9), 1332–1345. https://doi.org/10.1139/v73-200.

[194] Anthonsen, T.; Henderson, M. S.; Martin, A.; McCrindle, R.; Murray, R. D. H. Furan-Containing Diterpenoids from *Solidago serotina* Ait. *Acta Chem. Scand.* **1968**, *22*, 351–352. https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.22-0351.

[195] Bozsó, Z.; Lapat, V.; Ott, P. G.; Móricz, Á. M. Disparate Effects of Two Clerodane Diterpenes of Giant Goldenrod (*Solidago gigantea* Ait.) on *Bacillus spizizenii*. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25* (3), 1531. https://doi.org/10.3390/ijms25031531.

[196] Starks, C. M.; Williams, R. B.; Goering, M. G.; O'Neil-Johnson, M.; Norman, V. L.; Hu, J.-F.; Garo, E.; Hough, G. W.; Rice, S. M.; Eldridge, G. R. Antibacterial Clerodane

Diterpenes from Goldenrod (*Solidago virgaurea*). *Phytochemistry* **2010**, *71* (1), 104–109. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.09.032.

[197] Li, R.; Nie, L.; Wang, Q.; Ouyang, D.; Zhang, L.; Yuan, Y.; Hong, Y.; Wang, J.; Hu, X. Phytochemical Constituents, Chemotaxonomic Significance and Anti-Arthritic Effect of Eucommia Ulmoides Oliver Staminate Flowers. *Nat. Prod. Res.* **2020**, 1–5. https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1858411.

[198] Zarev, Y. Isolation and Characterization of 3- O-Caffeoyloleanolic Acid from *Robinia pseudoacacia* Stem Bark. *Pharmacia* **2023**, *70* (4), 1209–1212. https://doi.org/10.3897/pharmacia.70.e110402.

[199] Freire, C. S. R.; Silvestre, A. J. D.; Neto, C. P. Demonstration of Long-chain N- Alkyl Caffeates and Δ 7 -steryl Glucosides in the Bark of *Acacia* Species by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Phytochem. Anal.* **2007**, *18* (2), 151–156. https://doi.org/10.1002/pca.964.

[200] Komatsu, M.; Yokoe, I.; Shirataki, Y. Studies on the Constituents of *Sophora* Species. XIII. Constituents of the Aerial Parts of *Sophora tomentosa* L. *Chem. Pharm. Bull.* **1978**, *26* (12), 3863–3870. https://doi.org/10.1248/cpb.26.3863.

[201] Häbe, T. T.; Morlock, G. E. Open-source Add-on Kit for Automation of Zone Elution in Planar Chromatography. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2020**, *34* (7). https://doi.org/10.1002/rcm.8631.

[202] Häbe, T. T.; Morlock, G. E. Miniaturization of Instrumental Planar Chromatography with Focus on Mass Spectrometry. *Chromatographia* **2016**, *79* (13–14), 797–810. https://doi.org/10.1007/s10337-016-3113-1.

[203] Ślączka-Wilk, M. M.; Włodarczyk, E.; Kaleniecka, A.; Zarzycki, P. K. Miniaturized Temperature-Controlled Planar Chromatography (Micro-TLC) as a Versatile Technique for Fast Screening of Micropollutants and Biomarkers Derived from Surface Water Ecosystems and During Technological Processes of Wastewater Treatment. *J. AOAC Int.* **2017**, *100* (4), 935–949. https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0168.

[204] Sing, L.; Schwack, W.; Göttsche, R.; Morlock, G. E. 2LabsToGo─Recipe for Building Your Own Chromatography Equipment Including Biological Assay and Effect Detection. *Anal. Chem.* **2022**, *94* (42), 14554–14564. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c02339.

moricz.agnes_426_26

Melléklet: az értekezés alapját képező saját közlemények másolatai