

Újabb adatok az *Ononis spinosa* L. fitokémiai
elemzéséhez és hatóanyagainak ciklodextrines
preformulálásához

Doktori értekezés

Daruházi Ágnes Emma

Semmelweis Egyetem

Gyógyszerésztudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Lemberkovics Éva, egyetemi tanár, C.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Fenyvesi Éva, témavezető kutató, Ph.D.
Dr. Pluhár Zsuzsanna, egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tekes Kornélia, egyetemi tanár, Ph.D.
Szigorlati bizottság: Dr. Máthé Imre, egyetemi tanár, D.Sc.
Dr. Zelkó Romána, egyetemi tanár, D.Sc.

Budapest
2013

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	6
1. Bevezetés	8
2. Irodalmi áttekintés.....	10
2.1. Az <i>Ononis spinosa</i> L. botanikai jellemzése, története	10
2.2. Az <i>Ononis spinosa</i> gyökér tartalmi anyagai	12
2.3. Az <i>Ononis spinosa</i> kivonatainak és kiemelt komponenseinek biológiai hatásai.....	14
2.3.1. <i>Ononis spinosa</i> kivonatok hatásvizsgálata.....	14
2.3.2. Az <i>Ononis spinosa</i> izoflavonjainak biológiai hatásai.....	15
2.3.2.1. Izoflavonok bioszintézise	15
2.3.2.2. Izoflavonok fitoösztrogén és egyéb hatásának vizsgálata.....	18
2.3.3. Az <i>Ononis spinosa</i> fitoszterol komponenseinek hatásai.....	23
2.3.3.1. Fitoszterolok bioszintézise és analízise.....	23
2.3.3.2. Fitoszterolok hatásai	25
2.4. Ciklodextrinek alkalmazási lehetősége a növényi hatóanyagok kivonásában és preformulálásában.....	26
2.4.1. Ciklodextrinek története, jellemzése	26
2.4.1.1. A ciklodextrinek szerepe a gyógyszerformulálásban	28
2.4.1.2. Izoflavonok/flavonok ciklodextrinokkal képzett komplexei.....	29
2.4.2. Izoflavonok és ciklodextrin komplexeik vizsgálata biológiai tesztekben	31
2.4.2.1. Izoflavonok és glikozidjaik membránpermeabilitásának vizsgálata Caco-2 sejtvonalon	31
2.4.2.2. Izoflavonok és ciklodextrin komplexeik hatásának vizsgálata <i>Caenorhabditis elegans</i> modellállat élettartamára	33
2.4.3. Növényi komponensek kivonása ciklodextrinek segítségével.....	34
3. Célkitűzések.....	36
4. Anyag és módszer	37
4.1. Növényanyag	37
4.2. Vegyszerek, reagensek, sejtkultúra	37
4.3. Triterpenoidok vizsgálata	38
4.3.1. Extrakciós és tisztítási módszerek	38
4.3.1.1. Soxhlet extrakció	38

4.3.1.2. Kíméletes extrakció	38
4.3.1.3. Szuperkritikus Fluid Extrakció	38
Laboratóriumi extrakció	38
Félüzemi méretű extrakció.....	39
4.3.1.4. Tisztítás elszappanosítással	39
4.3.2. Analitikai vizsgálatok	40
4.3.2.1. Triterpenoidok azonosítása és mennyiségi jellemzése GC-MS analízissel	40
4.3.2.2. β -szitoszterol tartalom meghatározása GC-FID vizsgálattal.....	40
4.4. Izoflavonoidok vizsgálata	41
4.4.1. Izoflavonoidok kvalitatív analízise.....	41
4.4.2. Genisztein és daidzein komplexálása β -, γ -, HP- β - és RAMEB-ciklodextrinekkel és jellemzésük	41
4.4.2.1. A genisztein és a daidzein fázisoldékonysági vizsgálata	41
4.4.2.2. Számítógépes molekula optimalizáció	43
4.4.2.3. Komplexképzés	44
4.4.2.4. Genisztein és daidzein / CD komplexek kioldódási profilja	44
4.4.2.5. Genisztein és daidzein / CD komplexek $^1\text{H-NMR}$ vizsgálata.....	44
4.4.2.6. Genisztein és daidzein / CD komplexek cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiás vizsgálata.....	45
4.4.3. Izoflavonok és CD komplexeik vizsgálata biológiai tesztekben.....	45
4.4.3.1. Genisztein és daidzein / CD komplexek membránpermeabilitásának vizsgálata Caco-2 sejtvonalon.....	45
4.4.3.2. Genisztein / β -CD komplex <i>Caenorhabditis elegans</i> modellállat élettartamára gyakorolt hatásának vizsgálata.....	46
4.4.4. Izoflavonoidok extrakciója ciklodextrinekkel és analízisük	47
HPLC-MS-sel	47
5. Eredmények	49
5.1. Triterpenoidok vizsgálata	49
5.1.1. Triterpenoidok azonosítása <i>Ononis spinosa</i> gyökér kivonatokban GC-MS módszerrel származékképzés nélkül	49
5.1.2. A különböző kivonási módszerek hatása a β -szitoszterol tartalomra, illetve a triterpenoid összetételre.....	50
5.2. Izoflavonoidok vizsgálata	53

5.2.1. Izoflavonoidok azonosítása HPLC-MS/MS-sel.....	53
5.2.2. Genisztein és daidzein ciklodextrin komplexeinek vizsgálata.....	55
5.2.2.1. Genisztein és daidzein molekula optimalizációja α -, β - és γ -CD-nel.....	55
5.2.2.2. Genisztein és daidzein fázisoldékonysági vizsgálata.....	56
5.2.2.3. Genisztein és daidzein /CD komplexek kioldódási profilja.....	57
5.2.2.4. Genisztein / β -CD komplex $^1\text{H-NMR}$ vizsgálatának eredménye.....	58
5.2.2.5. Genisztein és daidzein / CD komplexek cirkulár dikroizmus (CD_i) spektroszkópia vizsgálatának eredményei.....	59
5.2.3.1. Genisztein és daidzein / CD komplexek membránpermeabilitásának vizsgálata Caco-2 sejtvonalon.....	61
5.2.3.2. Genisztein β -CD-nel képzett komplexeinek élettartam növelő hatása <i>Caenorhabditis elegans</i>	64
5.2.4. Izoflavonoidok minőségi és mennyiségi jellemzése <i>Ononis spinosa</i> gyökérből hagyományos módon és ciklodextrinokkal készült kivonataiban.....	65
5.2.4.1. Az izoflavonoidok eloszlása a különböző 30%-os etanolos - CD-es kivonatokban.....	65
5.2.4.2. Az izoflavonoidok eloszlása a vizes CD-es kivonatokban.....	67
6. Megbeszélés.....	70
6.1. Triterpenoidok vizsgálata.....	70
6.1.1. Triterpenoidok azonosítása <i>Ononis spinosa</i> gyökér kivonatokban GC-MS módszerrel származékképzés nélkül.....	70
6.1.2. A különböző kivonási módszerek hatása a β -szitoszterol tartalomra, illetve a triterpenoid összetételre.....	70
6.2. Izoflavonoidok vizsgálata.....	71
6.2.1. Izoflavonoidok azonosítása HPLC-MS/MS-sel.....	71
6.2.2. Genisztein és daidzein ciklodextrin komplexeinek vizsgálata.....	72
6.2.2.1. Genisztein és daidzein molekula optimalizációja α - β - és γ -CD-nel.....	72
6.2.2.2. Genisztein és daidzein fázisoldékonysági vizsgálata.....	73
6.2.2.3. Genisztein és daidzein /CD komplexek kioldódási profilja.....	73
6.2.2.4. Genisztein / β -CD komplex $^1\text{H-NMR}$ vizsgálatának eredménye.....	73
6.2.2.5. Genisztein és daidzein / CD komplexek cirkulár dikroizmus (CD_i) spektroszkópia vizsgálatának eredményei.....	74
6.2.3.1. Genisztein és daidzein / CD komplexek membránpermeabilitásának vizsgálata Caco-2 sejtvonalon.....	75

6.2.3.2. Genisztein β -CD-nel képzett komplexeinek élettartam növelő hatása <i>Caenorhabditis elegans</i>	75
6.2.4. Izoflavonoidok minőségi és mennyiségi jellemzése <i>Ononis spinosa</i> gyökérből hagyományos módon és ciklodextrinnek készült kivonataiban	76
6.2.4.1. Az izoflavonoidok eloszlása a különböző 30%-os etanolos - CD-es kivonatokban	76
6.2.4.2. Az izoflavonoidok eloszlása a vizes CD-es kivonatokban	77
7. Következtetések és új eredmények	79
8. Összefoglalás	83
9. Summary.....	86
10. Irodalomjegyzék	88
11. Saját publikációk jegyzéke	105
Köszönetnyilvánítás	106

Rövidítések jegyzéke

BPH	benignus prostata hyperplasia
BMP	csont morfogenetikus protein (bone morphogenetic protein)
BRCA1	egy DNS hibajavításért felelős fehérjét expresszáló gén (breast cancer type 1)
cAMP	ciklikus AMP
CAT	kataláz enzim
CD	ciklodextrin
CD-spektroszkópia	cirkuláris dikroizmus spektroszkópia
CRP	C-reaktív protein (gyulladásos marker)
DIMEB	dimetil-béta-ciklodextrin
EDC	endocrine disrupting compounds (hormonháztartást megzavaró anyagok)
EGF	epidermal growth factor; <i>epidermális</i> növekedési faktor epidermal growth factor receptor (<i>epidermális</i> növekedési faktor receptor)
ERE	estrogen responsive element (ösztrogén reszponzív elem)
ER α	estrogen receptor (ösztrogén receptor α)
ER β	estrogen receptor (ösztrogén receptor β)
FDUR	5-fluoro-2'-dezoxiuridin
GC-FID	gas chromatography - flame ionization detector (lángionizációs detektorral kapcsolt gázkromatográfia)
GC-MS	gas chromatography - mass spectrometry (tömegspektrometriával kapcsolt gázkromatográfia)
HBSS	Hank's Buffer Salt Solution
HCEC	human corneal epithelial cells (humán cornea epithél sejtek)
HDL	high density lipoprotein
HP- β -CD	hidroxipropil-béta-ciklodextrin
HPLC-MS, LC-MS	high pressure liquid chromatography, - mass spectrometry (nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia, -val kapcsolt tömegspektrometria)
IEC-18	small intestinal epithelial cells (vékonybél epithel sejtek)
IFS	izoflavon-szintáz
iNOS	indukálható NO-szintáz
IL-1, IL-6	interleukin-1, -6; immun citokinek
LDL	low density lipoprotein
LPS	lipopoliszacharid
LOD	limit of detection (detektálási határ)
LOQ	limit of quantitaion (kvantitálási határ) emlő karcinóma sejtvonala, melyet a Michigan Cancer Foundation izolált
O-DMA	O-demetil-angiolenzin
RAMEB	random-metil-béta-ciklodextrin
SERM	selective estrogen responsive modulator (szelektív ösztrogén reszponzív modulátor)
SHBG	sex hormone binding globuline (szexhormon kötő globulin)

SOD	szuperoxid-dizmutáz
STAT-1	Signal Transducers and Activators of Transcription (transzkripciós jelátvivők és aktivátorok) családba tartozó transzkripciós faktor
TEER	transepithelial electrical resistance (transzepitáliális elektromos ellenállás)
TRIMEB	trimetil-béta-ciklodextrin
TXA ₂	tromboxán A ₂ (gyulladásos mediátor)
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule (vaszkuláris sejtadhéziós molekula)
VEGF	vascular endothelial growth factor (érendothel növekedési faktor; endogén proangiogén faktor)

1. Bevezetés

A gyógynövénykutatás fejlődésének köszönhetően ma már egyre nagyobb teret hódít a gyógynövények terápiás célú felhasználása, a szintetikus gyógyszeripar mellett.

A gyógynövénytartalmú gyógytermékek, készítmények számában, a fogyasztási adatokban és a közvéleményben is mind-mind tetten érhető, hogy egyre nagyobb az igény a minél természetesebb gyógyszerekre, terápiákra, elsősorban a kedvezőbb mellékhatás profil és a jobb tolerálhatóság miatt.

Mindazonáltal a hatékonyság és biztonságosság érdekében ugyanolyan óvatosan kell eljárni a természetes eredetű gyógyszerekkel, gyógyhatású készítményekkel, mint a szintetikumokkal kapcsolatban.

Egy-egy tradicionális gyógynövény újraértékeléséhez, egy új indikációs terület feltárásához, vagy egy tisztázatlan hatásmechanizmus leírásához a szakmai igényesség jegyében komoly vizsgálati, analitikai háttér szükséges, melyhez az alkalmazott kémiai és biológiai módszereknek is fel kell fejlődniük. Ez az elvárás érthető, hiszen az evidencián alapuló orvosláshoz a növényi drogok pontos, teljes körű megismerése elengedhetetlen.

Az *Ononis spinosa* L. újraértékelése időszerű, hiszen számon tartják ugyan, mint tradicionális gyógynövényt, és teakeverékekben is használjuk, mégis analitikai, klinikai vizsgálata terén még vannak hiányosságok.

Tartalmi anyagai két fontos vegyületcsoport, a terpének és a fenoloidok tagjai: a triterpenoidok és az izoflavonoidok, melyek ígéretesek bizonyos betegségterületek (kardiovaszkuláris és egyes daganatos megbetegedések) adjuváns kezelésében illetve prevenciójában.

Az utóbbi évtizedekben egyre inkább elterjedt vizsgálati módszer a szuperkritikus fluid extrakció (SFE). A kivonás fluid állapotú (kritikus hőmérséklet feletti magas nyomású) indifferens gázok, többnyire CO₂ segítségével történik. A módszer elsősorban apoláris jellegű vegyületek kivonására alkalmas. Előnye, hogy a fluid gáz nyomásának csökkentésével a kivonatból az oldószer nyom nélkül eltávolítható, így nem merül fel az oldószermaradványok eliminálásának problémája. Az *Ononis spinosa* apoláris jellegű vegyületei a terápiásan is ígéretes fitoszterolok, melyek több betegségben is – benignus prostata hypertrophia (BPH), illetve egyes daganatos betegségek - preventív, illetve adjuváns hatással bírnak. A szterolok kvalitatív és kvantitatív analízise az irodalomban jellemzően származékképzésen alapuló gázkromatográfiával történik.

Az izoflavonoidok általános irodalma elég nagy a speciális, flavonoidokétól eltérő szerkezetük és hatásaik miatt. Jobbára azonban 1-1 kiemelt komponens izoláltan kerül vizsgálatra, az egész növényi kivonatok kevésbé. Az *Ononis spinosa* izoflavonoidjainak pontos feltárása sem teljes; ezek a vegyületek főként nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával, illetve tömegspektrometriával vizsgálhatók megbízhatóan.

A ciklodextrinek gyógyszeripari alkalmazása ma már rendkívül elterjedt; egyre több a ciklodextrinnel formulált gyógyszer – eddig legalább 35. A ciklodextrinek fokozatosan bekerülnek a gyógyszerkönyvekbe, s éves felhasználásuk és jelentőségük is egyre növekszik. Ez a természetes oligoszacharid gyorsan világhírű lett, s folyamatosan fedezik fel előnyeit és alkalmazási lehetőségeit; így ma már ciklodextrin-kémiáról, mint önálló kutatási területről beszélhetünk. Alkalmazása a gyógynövény-kémia területén is elkezdődött; egyre több fenolos vegyületet, flavonoid, katechin, illóolaj komponens, illetve szteránvázas vegyület ciklodextrin komplexeiről vannak már irodalmi adatok. Különösen a vizes rendszerekben kevésbé oldódó komponensek esetében van reális alapja a ciklodextrinnel történő mikrokapszulázásnak, akár egy-egy aktív komponens, akár egy kisebb frakció vagy egy nyers kivonat esetében. Számos példa van természetes vegyületek szelektív kinyerésére ciklodextrinnel; például citrusféléből készült italok keserű ízének csökkentése a naringin, heszperidin, illetve limonin eltávolításával; koffein eltávolítása kávéból és teából; margarinok, tojás és egyéb termékek koleszterin mentesítése. A komponensek közti fizikai-kémiai különbségek, illetve az alkalmazott ciklodextrinszármazék vendégspecificitása lehetőséget adhat egy-egy komponens szelektív kivonására, ahogy a fenti példák mutatják. Ezen felül a ciklodextrinek befolyással lehetnek a növényi hatóanyagok/komponensek szervezetbeli hatására; növelhetik azt a biológiai hasznosíthatóság fokozása révén, például az antioxidáns hatás növelése polifenolok, flavonoidok esetében.

A ciklodextrinek tehát hozzájárulhatnak a növényi eredetű gyógyszerek, illetve gyógyhatású készítmények még jobb bioelérhetőségéhez, jobb tolerálhatósághoz, s a dózírozás csökkentéséhez, ennél fogva még kedvezőbb mellékhatás-profilhoz is vezethetnek.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az *Ononis spinosa* L. botanikai jellemzése, története

Az *Ononis spinosa* L. (vagy *Ononis vulgaris*) magyar nevén tövises iglice, a *Fabaceae* családba, azon belül az *Ononis* genusba tartozó lágyszárú évelő növény (1. ábra).

Rendszertani besorolása:

Ország:	Növények (<i>Plantae</i>)
Törzs:	Zárwatermők (<i>Magnoliophyta</i>)
Osztály:	Kétszikűek (<i>Magnoliopsida / Dicotyledoneae</i>)
Rend:	Hüvelyesek (<i>Fabales</i>)
Család:	Pillangósvirágúak (<i>Fabaceae</i>)
Alcsalád:	<i>Faboideae</i>
Nemzetségcsoport:	<i>Trifolieae</i>
Nemzetség:	Iglice (<i>Ononis</i>)
Faj:	<i>O. spinosa</i>

Magyarországon, de szerte Európában is igen elterjedt, főként legelőkön, nedves réteken, illetve árok partján, utak mentén nő. 20-70 cm-re magasodik, hosszú, karógyökerű szára alul fásodó, följebb ágas, erősen tüskézett. A fiatal hajtásai gyapjasak és aprón mirigyszőrösök, később kopaszodók. Az alsó levelek három levélkéből állnak, melyek közül a középső levélke nagyobb, a felsők osztatlanok. A levélkéik oválisak, hosszúkásak, 1-2,5 cm hosszúak. A pálhalevelek tojásdadok, fogazottak, a levélkéknél kisebbek. A virágok a leveles hajtásokon laza álfürtöt alkotnak, egyenként ülnek a levelek hónaljában. A csésze fogai 3-4-szer olyan hosszúak, mint a csöve. A párta rózsaszínű vagy piros, ritkán fehér, 11,5 cm hosszú. A hüvely tojásdad, rövidebb vagy kissé hosszabb, mint a csésze, három magvú. A magvak kerekdedek vagy tojásdadok, sötétbarnák, finoman bibircsesek, egy mély barázdával. A növény májustól októberig virágzik [Ph. Hg. VIII].



1. ábra. Az *Ononis spinosa* L. aprított gyökere és herbája

Az *Ononis* genus viszonylag népes, fajai Európában szinte mindenhol megtalálhatók, Kis-Ázsiában, Afrika és Dél-Amerika egyes területein is előfordulnak. Ezek közül néhány, például az *Ononis arvensis* (mezei iglice), ~ *repens* (kúszó iglice), ~ *pusilla* (sárga iglice), ~ *viscosa* (ragadós iglice), ~ *natrix*, ~ *fruticosa* (bozótiglice), ~ *cristata*, ~ *subspicata*, ~ *tridentata* -, ~ *pubescens* (molyhos iglice), ~ *minutissima* -, s még számos más faj; többnyire rózsaszín és sárga virágúak, de előfordul fehér is.

A növény gyógyászatban hasznosított része a gyökér, mely hivatalos drogja a VIII. Magyar és az Európai Gyógyszerkönyvnek. A drog barna színű, többé-kevésbé lapított, csavarodott és elágazó, mélyen barázdált és hosszában ráncos. A metszési felületen vékony kéreg és feltűnően sugaras szerkezetű fatest látható. A gyökér törése rövid és rostos. Azonosítása makroszkópos jellemzés és a porpreparátum mikroszkópos vizsgálata útján történik. A Ph. Hg. VII-ben előírt mikroszublimáció megbízhatóan feltárja az onocerin jellemző, tű alakú sárgás kristályait. A vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálat végső megerősítést jelenthet, melyen a fitoszterolok zónája 365 nm-en intentíven fluoreszkál kék színben, s az onocerin is jellemző, világos türkizkék színű foltot ad.

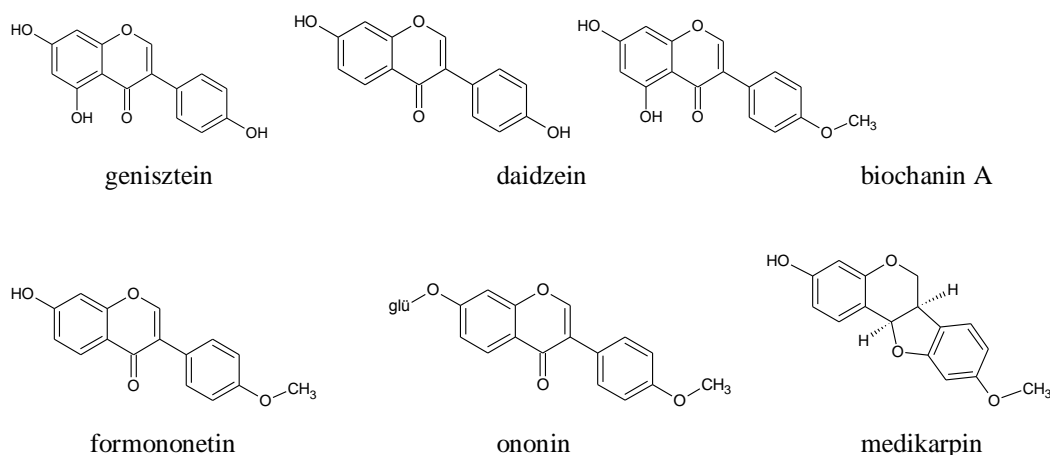
Az *Ononis spinosa* ismerete egészen Caius Plinius Caecilius: *Historia naturalis*-áig (kr.sz. 24-49.) és Pedanius Dioscorides: *De materia medicá*-jáig (kr. sz. 50-70.) nyúlik vissza. Melius Juhász Péter 1578-as Herbáriumában is fellelhető: „Görögül Anonis, azaz

szamárgyönyörúsége, Resta bouis, azaz ökörgúzsza, Remōra aratrī, eketartó fű, felette erős a gyökere, hegyes, mint egy nyíl, a tövisse, a szárából szederjes virága nő, kövér szántóföldeken terem, iglice tövisk magyarul a neve. [...] Melegítő, szárasztó a gyökere, indító a levele. [...] Az gyökerének az héját ez iglicének ha borban megfőzed s megiszod, követ ront, vizeletet indít. Dioscorides, Plinius mondják: késértett dolog. A gyökerét ha vízben megfőzed, vérfolyást meggyorsít, ha iszod.” Népi nevei ezeken kívül például még az „ekeakadály, igric” [Melius, 1578]. A népgyógyászatban teáját vizelethajtásra alkalmazták, reumás bántalmak és köszvény esetén gyulladáscsökkentőnek, leginkább más növényekkel kombinálva (boróka, kukoricabajusz, nyírf), vese- és hólyagbántalmak esetén.

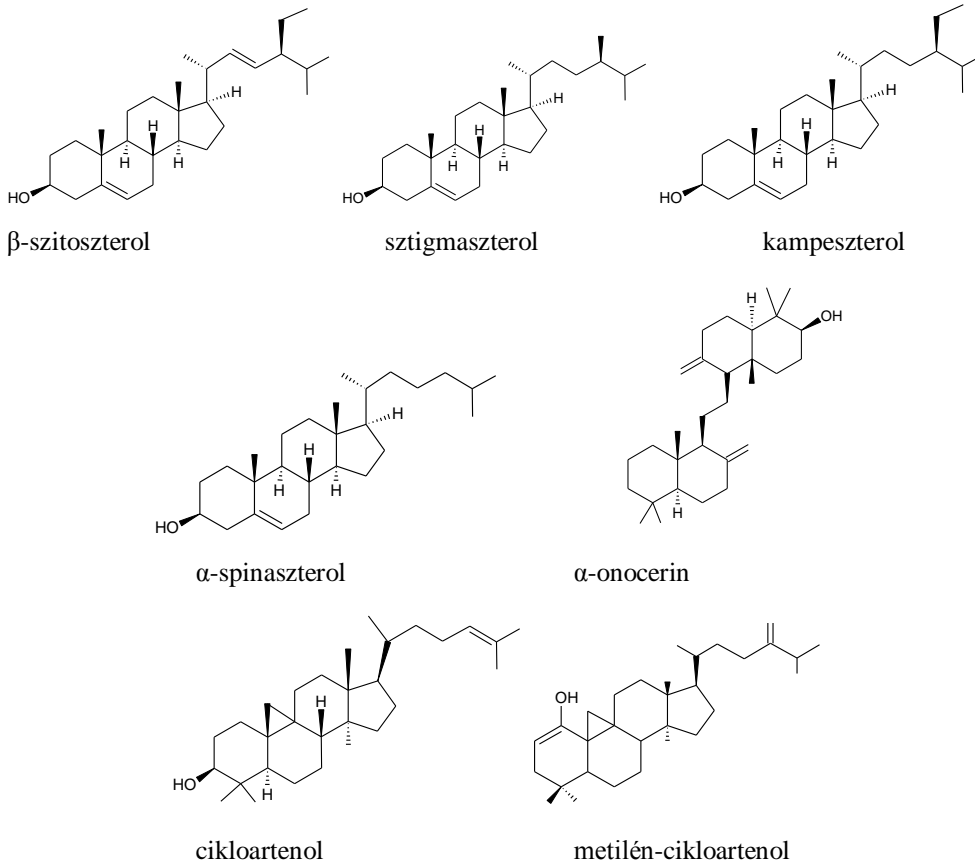
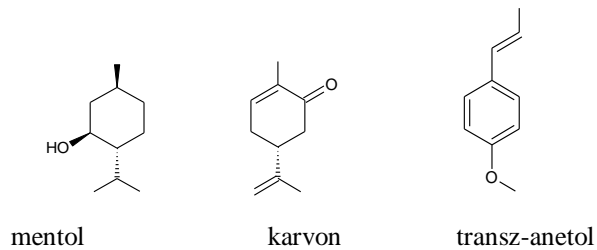
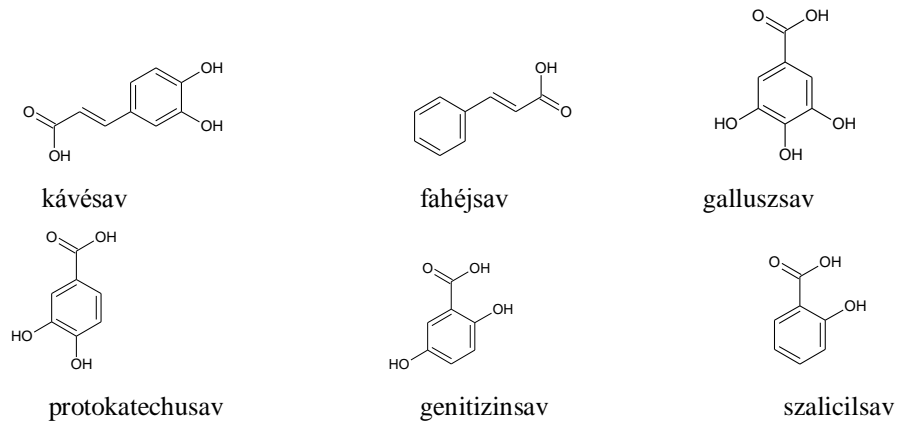
2.2. Az *Ononis spinosa* gyökér tartalmi anyagai

Az *Ononis spinosa* gyökere főként izoflavonoidokat; izoflavon aglikonokat (genisztein, daidzein, biochanin A, formononetin), illetve ezek különböző glikozilált származékait (pl. ononin), speciális izoflavon származékokat (pterokarpánok; medikarpin), flavonoidokat (rutin, kempferol), triterpéneket, szterolokat (béta-szitoszterol, sztigmatsterol, kampeszterol, α -spinaszterol; s feltételezhetően ezek glikozidjai), különböző kisebb molekulatömegű savakat (kávéssav, fahéjsav, galluszsav, protokatechusav, gentizinsav, szalicilsav), kevés illóolajat (anetol, mentol, karvon) tartalmaz (2. ábra) [Pietta és mtsai, 1983, 1990; Rowan és mtsai, 1972, Hilp és mtsai, 1975, 1977].

Izoflavonok



2. ábra. Az *Ononis spinosa* főbb tartalmi anyagai (folyt. köv.)

Triterpének, fitoszterolok**Monoterpének****Aromás savak****2. ábra. Az *Ononis spinosa* főbb tartalmi anyagai.**

2.3. Az *Ononis spinosa* kivonatainak és kiemelt komponenseinek biológiai hatásai

2.3.1. *Ononis spinosa* kivonatok hatásvizsgálata

Az irodalomban vannak utalások arra, hogy más országban is hasonló terápiás indikációban használta a népgyógyászat, jelesen reuma és köszvényes bántalmak, húgyúti fertőzések esetén. Az *Ononis* genus tagjait tradicionálisan antibiotikus, antipiretikus, antiinflammatorikus, antidiabetikus, antifungális és antiszeptikus hatásúnak írták le például Törökországban is [Erdemgil és mtsai, 2002; Söhretoglu és mtsai, 2007].

A tradicionális felhasználás megerősítése végett a növény herbájának és gyökerének különböző oldószerrel készített kivonatait eleinte állatkísérletekben vizsgálták. A herba etanolos kivonata perorálisan beadva patkányokon 2 g/kg dózisban szignifikánsan megnövelte a diuresist a Na⁺ és K⁺ szintek befolyásolása nélkül, két óra után mintegy 103 %-kal; intraperitoneális beadása után nem volt változás.

Gyulladáscsökkentő hatását karragén-indukált ödémára vizsgálták patkánytalpon 500 mg/kg dózisban, s 2 óra után 46 %-kal csökkent az ödéma, 5 óra után pedig 34 %-kal [Bolle és mtsai, 1993].

Az *analgetikus* hatását ún. tail-flick teszttel vizsgálták. Ennek alapjául a fájdalomküszöb mérése szolgált; a patkány farkát hőszugárzásnak tették ki, majd métékk az időt, amíg az állat el nem rántotta a farkát. Ebben a kísérletben a kivonat beadása után 30, 90 és 150 perccel mérték a fájdalomküszöböt, s a kivonat analgetikus hatása egyenértékű volt aszpirinnel 50 mg/kg dózissal, 30 és 90 percnél, majd minden pontban egyenértékűnek bizonyult 100 mg/kg dózissal [Yilmaz és mtsai, 2006].

A növény föld feletti részének különböző oldószeres kivonatainak *antimikrobás* hatását vizsgálták 4 mg mennyiségben agar lemezekre (disc) impregnálva 6 mm átmérőjű zónákban, melyeken a baktériumtörzsekre kifejtett gátlási zóna nagyságát mérték (mm; átmérő). Az antimikrobás hatások összehasonlíthatóak voltak a tetraciklin (50 µg/disc), gentamicin (10 µg/disc), kloramfenikol (25 µg/disc), ampicillin (10 µg/disc), és a mikonazol-nitrát (40 µg/disc) gátlási értékével [Mahasneh, 1999]. A legjobb antibakteriális hatása az *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* és *Bacillus cereus* törzsekre az etanolos kivonatnak volt (10-11), ennél valamivel gyengébb a petroléteres kivonatnak (6-9). A butanolos kivonat antibakteriális hatása változó volt (6-

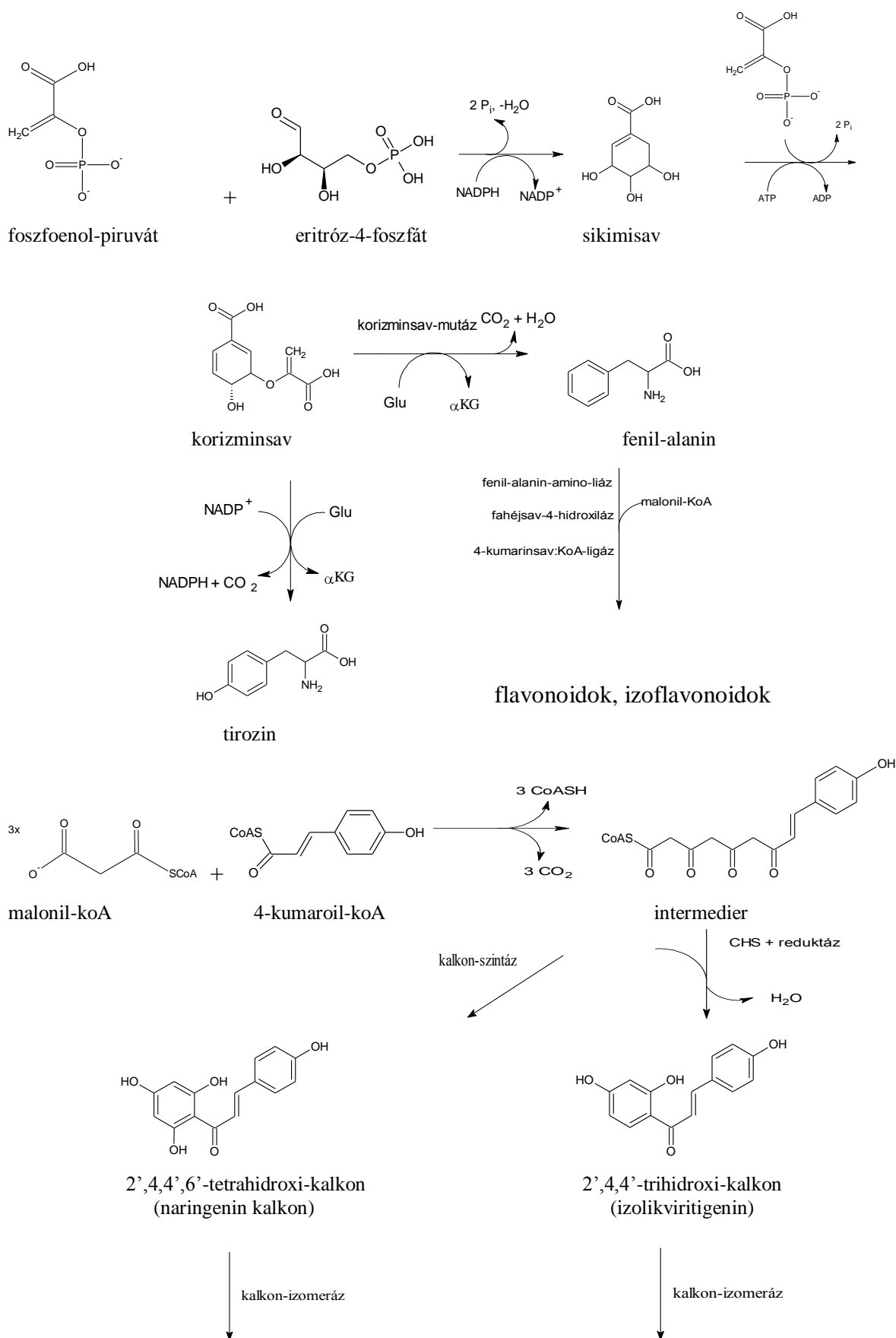
12), néhol kiugró, majd pedig a vizes kivonat 7-9 mm körüli gátlási zónát produkált. Az *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* és *Candida albicans* törzsekre kifejett *antifungális* hatás igencsak megoszlott az egyes törzsek között; az etanolos kivonat esetében 0-6 mm körül, a petroléteres kivonatnál 5 mm, a butanolosnál 0-8 mm, a vizes extraktumnál pedig 3-8 mm között mozgott. Mindazonáltal a vizes kivonat kivételével a többi a *Candida albicans*-ra fejtette ki a legnagyobb gátló hatást (5-8 mm).

2.3.2. Az *Ononis spinosa* izoflavonjainak biológiai hatásai

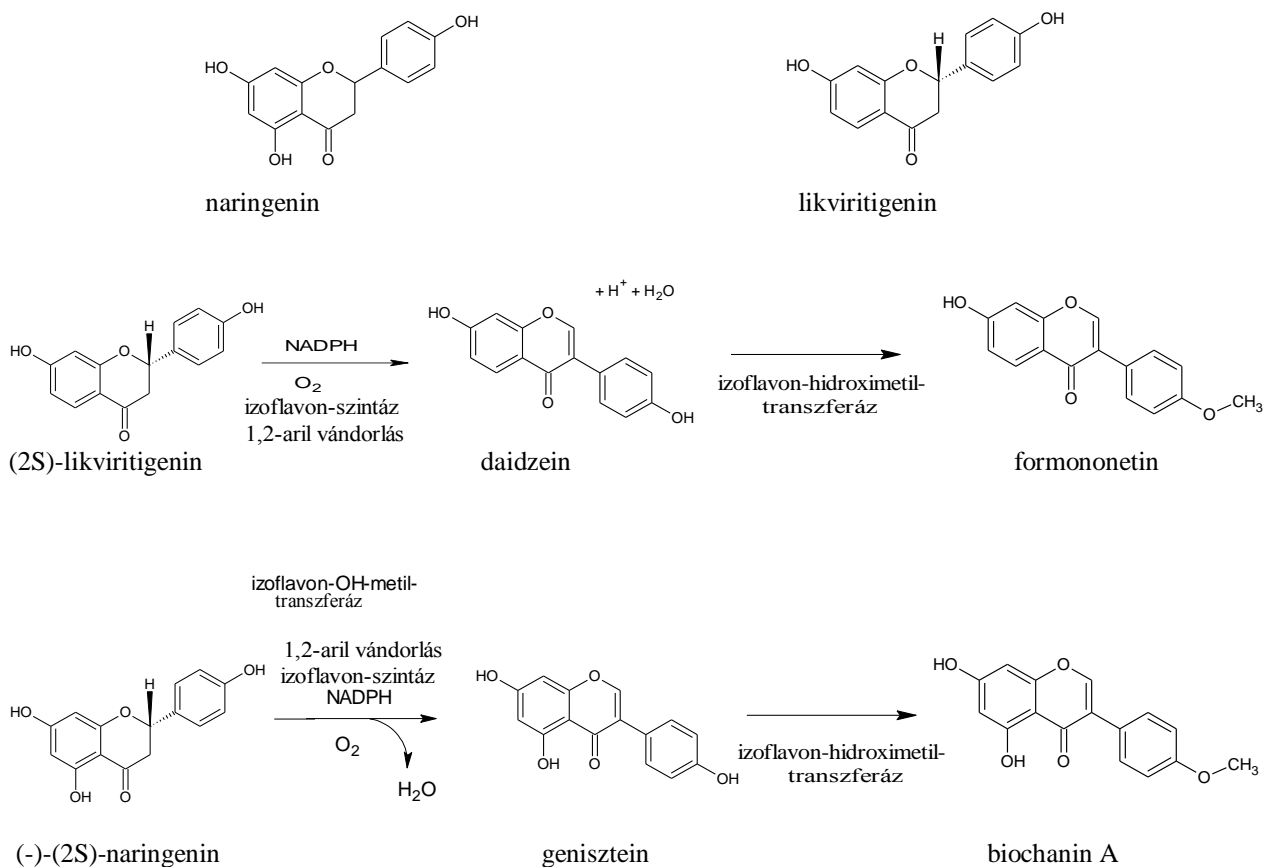
2.3.2.1. Izoflavonok bioszintézise

Az izoflavonoidok a flavonoid-bioszintézis egy speciális ágát képezik, melyben a C6-C3-C6 flavonoid szerkezetben a B-gyűrű β -helyzetben kapcsolódik. Az izoflavonoidok legnagyobb részét a *Fabaceae* (hüvelyesek) családba tartozó növényekben fordulnak elő, bár megtalálhatók más növénycsaládokban is, mint például az *Iridaceae* (*Iris florentina* – iridin), *Rosaceae* (*Prunus* fajok – prunetin), *Amaranthaceae*, *Moraceae* családokban. Az izoflavonoidok száma napjainkra már körülbelül 1600-ra tehető [Veitch, 2007].

Az izoflavonok zömmel kötötten fordulnak elő a növényekben, glikozidok, malonil-glikozidok formájában, s vakuólumokban tárolódnak. Ezen származékok kialakítását az izoflavon-7-O-glikozil-transzferáz és az izoflavon-glikozid-malonil-transzferáz enzimek végzik, míg a vegyületek hasításáért az izoflavon-glikozid-glikozidáz és az izoflavon-glikozid-malonil-észteráz enzim felelős. A B-gyűrűt az izoflavon-szintáz (IFS) teszi át α -állásból β -állásba. Bioszintézisük a sikimisavból indul ki, mely egy molekula foszfoenol-piruváttól és eritróz-4-foszfáttól képződik, majd a korizminsavon, fenil-alaninon, tirozinon, s az ezekből kialakuló kalkonokon keresztül (naringenin-kalkon és izolikviritigenin), naringeninből és liquiritigeninből szintetizálódnak (**3. ábra**).

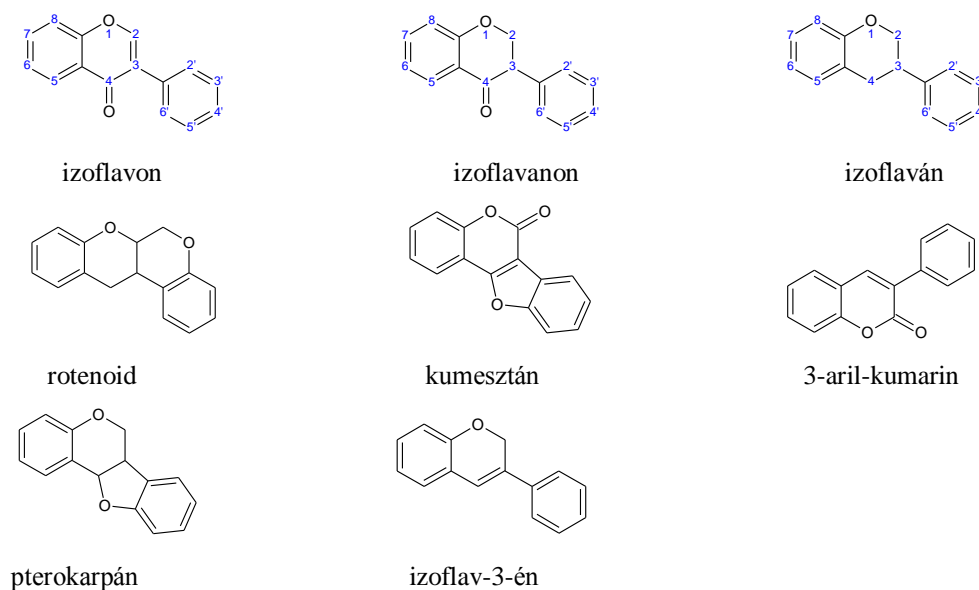


3. ábra. Az izoflavon bioszintézis főbb állomásai. (folyt. köv.)



3. ábra. Az izoflavon bioszintézis főbb állomásai (Dewick és mtsai, 2002)

Az izoflavon váznak további módosulata található meg a különböző növény családotokban, ezek az izoflavon, izoflavanon, izoflaván, izoflav-3-én, rotenoid, 3-aryl-kumarin, kumesztán, és pterokarpán vázak [Tahara és Ibrahim, 1995] (4. ábra).



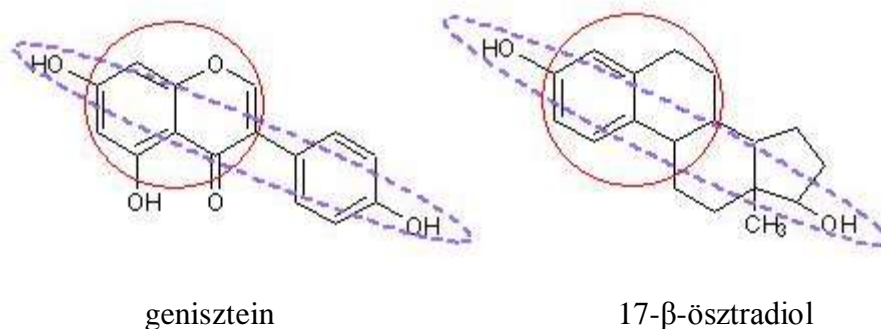
4. ábra. Az izoflavon váz különböző módosulatai

2.3.2.2. Izoflavonok fitoösztrogén és egyéb hatásának vizsgálata

Fitoösztrogén hatás

Az izoflavonok a fitoösztrogének közé tartoznak, mivel szerkezeti hasonlóságot mutatnak a 17- β -ösztradiollal; a molekula két végén található –OH csoportok távolsága (**5. ábra**) [Jacquot és mtsai, 2003] az aromás gyűrű és a hozzá kapcsolódó OH-csoport, illetve a p-OH aromás rendszer és a szekunder planáris OH-csoport fontos tényezők a receptorkapcsolódásban [Martin és mtsai, 1978; Setchell, 1988; Branham, 2002]. Így kötődnek mindkét fajta ösztrogén receptorhoz, az ER α -hoz és az ER β -hoz; a kísérleti eredmények szerint nagyobb affinitással az ER β -hoz, mint az ER α -hoz [Casanova és mtsai, 1999; Kuiper és mtsai, 1997, 1998; Pfitscher és mtsai, 2008], mindazonáltal gyengébb affinitással kötődnek, mint a 17- β -ösztradiol. Mind az ER α , mind az ER β megtalálható a reproduktív szervekben, a csontrendszerben, a szív- és érrendszerben, a központi és perifériás idegrendszerben [Ward és mtsai, 2010].

Az ER kötődésén keresztül az izoflavonok az ERE-tel (ösztrogén reszponzív elem) való interakción kívül egyes transzkripciós faktorokhoz kötődve is befolyásolhatják a transzkripciót [Kushner, 2000]. Továbbá befolyásolhatják a szteroid-bioszintézist - az aromatáz és a 17- β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz enzimek gátlásával [Krazeisen és mtsai, 2001] - és -transzportot, például az SHBG stimulálásán keresztül a májban [Adlercreutz és Mazur, 1997]. A genisztein dózisfüggő módon gátolta az aromatáz és az 5 α -reduktáz enzim működését is *in vitro* [Chen és mtsai, 1997; Evans és mtsai, 1995; Pelissero és mtsai, 1996; Wang és mtsai, 1994]. Gátol egyes tirozin-kinázokat [Akiyama és mtsai, 1987], a DNS topoizomeráz I és II enzimeket [Markovits és mtsai, 1989], fokozza az antioxidáns enzimek aktivitását, s végül befolyásolhatja az ösztrogén metabolizmusát.



5. ábra. A genisztein és a 17 β -ösztradiol kémiai szerkezete és hasonlatossága

A receptorkötődés ellenére az izoflavonok sokkal inkább szelektív ösztrogén receptor modulátorként (SERM) viselkednek. Szelektivitásuk és hatásuk függ a célszervtől és az alkalmazott koncentrációtól; lehetnek agonisták és antagonisták is. Korábbi megfigyelések szerint állatokon az izoflavonoid dús táplálék infertilitást okozott [Bennetts és mtsai, 1946; Moule, 1963; Leavitt és Wright, 1963; Setchell és mtsai, 1987; Bradbury és White, 1954] birkákban, marhákban, nyulakban, egereken és gepárdokon, míg emberen ilyen jellegű hatást nem figyeltek meg. Az izoflavonoidok jelenlétére és hatására az hívta föl a figyelmet, hogy az ázsiai országokban jelentősen kisebb a morbiditása az emlő- és prosztatákarcinómának, a kardiovaszkuláris megbetegedéseknek, illetve a peri- és postmenopauzális tüneteknek a nők körében; ennek hátterében az európaiktól eltérő táplálkozási szokásokat, a nagyobb mértékű szójafogyasztást vélték állni.

Az izoflavonoidok aktív formája az aglikon forma, mely a béltraktusban lévő bakteriális enzimek hatására keletkezik, majd a bélhámsejtekben konjugálódás után [Ward és mtsai, 2010] bekerülnek az enterohepatikus körforgásba, majd dekonjugálódnak, s végül a bélben reabszorbeálódnak vagy a széklettel, illetve vizelettel kiürülnek [Setchell, 1998; 1999]. Főbb metabolitjaik az equol és az O-demetilangiolenzin (O-DMA), illetve a máj citokróm P450 enzimekkel oxidatív metabolitok is képződnek [Kulling és mtsai, 2100]. Az equol még jobban kötődik az ER-hoz, mint az elfogyasztott izoflavonok; kialakításához egy speciális baktérium szükséges, ami a humán populáció kb. 30-50%-ában fordul elő, egyes feltevések szerint ennek szerepe lehet a hatások különbözőségében [Lampe, 2009; Frankenfeld és mtsai, 2005].

Epimediológiai megfigyelések szerint a távol-keleti országokból nyugatra (Európa, Amerika) települt nők körében megnövekedett az emlődaganatos betegségek incidenciája, ráadásul inkább azon esetekben, ahol az alanyok fiatal korukban emigráltak. Különböző esettanulmányok, metaanalízisek és állatkísérletek tanúsága szerint a pubertáskor előtti, illetve fiatalkori, de mindenképpen premenopauzális izoflavonoid expozíció csökkenti az emlődaganatos megbetegedések kialakulásának kockázatát [Dai és mtsai, 2001; Shu és mtsai, 2001; Wu és mtsai, 1996; Piller és mtsai, 2006; McCann és mtsai, 2006; Lamartiniere és mtsai, 1998, 2002; Guha és mtsai, 2009]. Kimutatták, hogy a sérült, mutálódott BRCA1 (DNS hibajavító) enzimrendszer nagyban felelős a megnövekedett emlőrák kockázatért, legalábbis a kor előrehaladtával [Hilakivi-Clarke és mtsai, 2002].

Fontos megjegyezni, hogy a zsírszövet sejtjei is képesek ösztrogént termelni [Nelson, 2001], így az elhízás is egy újabb rizikófaktort jelenthet. Egyes klinikai vizsgálatok azt

mutatják, az izoflavon tartalmú diétának kockázatsökkentő hatása volt emlőrák és endometrium rák esetében [Hirose és mtsai, 1995; Horn-Ross és mtsai, 2003].

Izoflavonoidok protektív hatását más daganatos betegségek esetén is igazolták, jelesül humán gyomor karcinóma sejteken [Piontek, 1993], illetve prosztatatarák esetében humán metaanalízisben [Yan és Spitznagel, 2009].

Végeredményben azt lehet megállapítani, hogy az elfogyasztott izoflavonok, izoflavonoidok összetétele, dózisa, a használat időtartama, a kor, illetve az etnikai hovatartozás is mind-mind befolyásoló tényező lehet a fitoösztrogének preventív hatásait illetően, így sokszor nehéz összehasonlítást tenni az egyes vizsgálatok között. Fontos a hormonális státusz, az életmód is, és az esetleges hajlamosító tényezők (genetikai háttér, testtömegindex). A vizsgálatok többsége arra mutat, hogy a premenopauzális, illetve fiatal felnőttkori izoflavon tartalmú táplálkozás szignifikánsan csökkenti az emlőrák kialakulásának kockázatát postmenopauzálisan, illetve javítja az emlőrákon átesett nők túlélési esélyeit és csökkenti a recidívát.

Gyulladásgátló hatás

A gyulladásos folyamatokban kulcsjelentőségűek a protein-tirozin-kináz jelátviteli kaszkádok, melyek aktiválják a gyulladásos sejteket. Állatkísérletekben a genisztein, mint széles spektrumú protein-kináz inhibitor, gátolta az ovalbumin-indukálta akut bronchokonstriktiót [Duan és mtsai, 2002], szignifikánsan csökkentette a krónikus gyulladásos folyamatokat karragén-indukálta talp-ödémában [Hamäläinen és mtsai, 2007], valamint arthritisben szuppresszálta az oxazolónra adott késői immunválaszt, s a granulocita–mediált választ is, mindezekon kívül az oxazolón-specifikus antitestek szintjét is csökkentette a szérumban [Verdrengh és mtsai, 2003]. A geniszten és a daidzein gátolta az iNOS fehérjét és az mRNS expressziót, valamint a NO termelést. Egészséges európai posztmenopauzális nők gyulladásos CRP (C-reaktív protein) szintjét 50 mg/nap izolált szója-izoflavon fogyasztás megnövelte [Hall és mtsai, 2005], a többi biomarker szintje azonban nem változott, ellenben korábbi *in vitro* vizsgálatokkal [Mukherjee és mtsai, 2003; Rimbach és mtsai, 2004]. A β -amiloiddal, illetve lipopoliszachariddal stimulált asztrocitasejtek számát és viabilitását a daidzein növelte, és down-regulálta az mRNS expresszióját [Liu és mtsai, 2009].

Vazorelaxáns hatás

A geniszteint és a daidzeint hatásos vazodilatátornak találták több állatkísérletben, hatásmechanizmusa azonban még nem tisztázott. Az egyik elmélet szerint a hatás a tirozinkináz gátló aktivitásán keresztül érvényesül. Izolált patkány aortán K^+ és fenilefrin-indukált kontrakcióban [Ayaj és mtsai, 2003] a vazodilatátor hatást disznó koronárián mind a geniszteinre, mind a daidzeinre igazolták [Xu és mtsai, 2007]. Szintén patkány aortáját fenilefrines kezelés után geniszteinnel inkubálták, ennek következtében a VEGF - endothel egészségéért felelős endogén proangiogén faktor - vazodilatátor hatása szignifikánsan fokozódott [Fernandez és mtsai, 2010]. Izolált nyúl artérián a genisztein és a biochanin A szignifikáns vazorelaxációt okozott endothel jelenlétében és anélkül is [Figtree és mtsai, 2000]. A genisztein gátló hatása (2 μ M) tengerimalac kamrai szívműködésének az L-típusú kalcium csatornára megerősítette a kalcium antagonizmus érzékenységet a hatásmechanizmusban.

Vérlemezke-aggregációt gátló hatás

Az ösztrogének prokoaguláns hatásának ellentmondóan a daidzein és a genisztein gátolták a kollagén-indukálta trombocita-aggregációt a TXA_2 -receptorok és a kalcium csatorna blokkolásával [Dobrydevna és mtsai, 2002], s a genisztein megszüntette az arachidonsav által indukált vérlemezke-aggregációt [Guerrero és mtsai, 2004]. Előzőleg L-nitroarginin-metilészterrel preinkubált patkány aortaszakaszban - mely részben elnyomta a genisztein antiaggregációs hatását - 10 nM genisztein szignifikánsan növelte a NO-szintézist [Polini és mtsai, 2007]. A genisztein fokozta a foszfolipáz A_2 és a prosztaciklin felszabadulást, ráadásul ovariektomizált patkányokon is hasonlóan gátolta a trombocita-aggregációt.

A japánakác (*Sophora japonica* L.) metanolos kivonatából izolált flavonoidok és izoflavonoidok (biochanin A, irizolidon, genisztein, szisszotrin, szoforabiozid, genisztin, tektoridin, apigenin, kvercitrin, rutin) trombocitággagregációt gátló hatását vizsgálva a biochanin A, a genisztein és a tektoridin 2,5–6,5-szor erősebb gátló hatást mutatott, mint maga az acetilszalicilsav az arachidonsavra [Jeong és mtsai, 2008].

Lipid-peroxidáció gátlása, antiatherogén hatás

Több kutatás szerint az izoflavonok csökkentik a plazma LDL szintjét, főleg olyan egyéneken, akikben már eleve magasabb volt ez a koncentráció. A daidzein és a genisztein

emellett anitoxidánsként is az LDL oxidációja ellenében hat [Kapiotis és mtsai, 1997; Kerry és Abbey, 1998]. A lipidperoxidáció *in vivo* biomarkere az F₂-izoprosztán, amelynek szintje magas izoflavon tartalmú étrend esetén csökken [Wiseman, 2000]. A genisztein (0,5–2,5 M) gátló hatást fejtett ki normolipémiás alanyokból izolált HDL Cu²⁺ indukálta lipidperoxidációjára, s ennél kisebb koncentrációban (2,5-20 µmolL⁻¹) a H₂O₂ által okozott oxidatív DNS károsodásokat is szignifikánsan kivédte egy T-limfocita sejtvonalon [Foti és mtsai, 2005].

A genisztein közvetlenül is antioxidáns kapacitással bírt több *in vitro* kísérletben, mind UV-A, UV-B sugárzás során keletkező, illetve peroxilgyök által okozott lipidperoxidáció, valamint a [Record, 1995] liposzómák Fe (I) aszkorbát / H₂O₂ oxidációjának gátlása révén. Az intakt szójafehérjék (melyek az izoflavonoidokat is tartalmazzák) csökkentették a szérum totál koleszterinszintjét majmokon, illetve növelték a HDL-szintet. A kontroll csoportban 63% volt az atherosclerotikus plakkok mennyiségének aránya, míg az izoflavon-fogyasztó csoportban ez az érték 39% volt [Clarkson és mtsai, 1998].

Hatások a csontanyagcserére

Az ösztrogén szerepe a csontszövet megtartásában és a csontanyagcsere dinamikus változásában a fitoösztrogének ilyen jellegű hatására is felhívta a figyelmet, és kísérletek sorozatát indította el *in vitro* és *in vivo*. Az osteoporosis növekvő prevalenciája és a hormonpótló kezelések kedvezőtlen hatásai miatt a nők s így a kutatás is a természetesebb alternatívák keresése, mint pl. az izoflavonok felé fordult az osteoporosis prevenciójában.

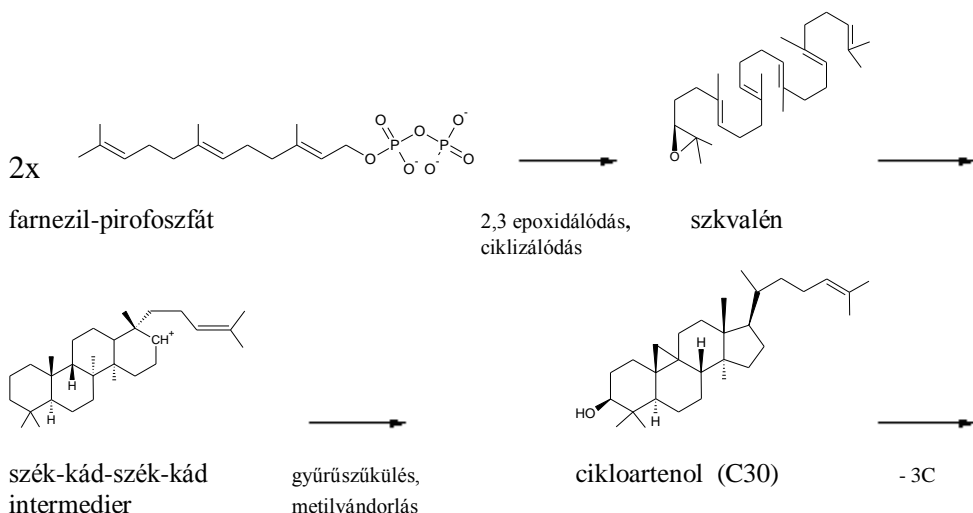
In vitro vizsgálatok szerint a daidzein fokozta az osteoblastok élettartamát és növekedését, alkalikus foszfatáz aktivitást, osteocalcin szintézist és a csont morfogenetikus protein (bone morphogenetic protein; BMP) termelését [Jia és mtsai, 2003]. Kalcium kombinálása a daidzein fogyasztással ovariectomizált patkányoknál [Fonseca és Ward, 2004] még előnyösebben befolyásolta a femur és a lumbális csigolyák csontsűrűségét, illetve a biomechanikai csonterősséget. A genisztein szintúgy segítette az osteoblastok differenciálódását és gátolta az osteoclastok demineralizáló hatását [Morris és mtsai, 2006], illetve gátolta az osteoclast sejtek toborzását és funkcióját [Gao és mtsai, 2000]. Elektronmikroszkópos felvételek szerint serkenti az osteoblastok mátrix anyagának kiválasztását, többek közt kollagént és alkalikus foszfatázt (ALP). Szintén ovariectomizált patkányokon vizsgálva a csontvesztést daidzein, genisztein és 17α-ethinyloestradiol tartalmú

diéta hatását a daidzein és a 17α -ethinyloestradiol csontvesztést gátló hatása kifejezettebb volt, mint a geniszteiné [Picherit és mtsai, 2000].

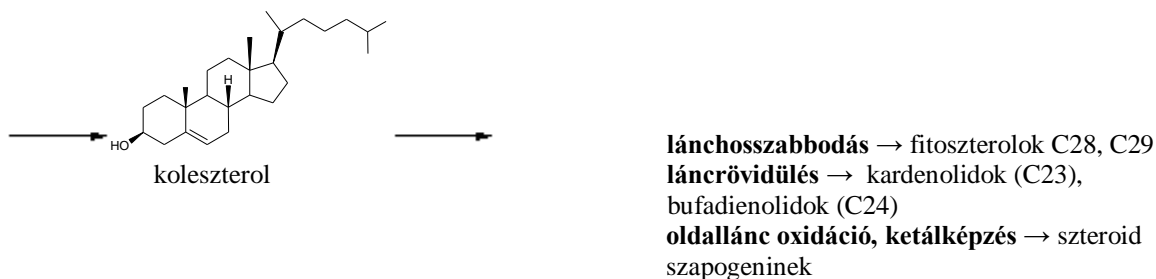
2.3.3. Az *Ononis spinosa* fitoszterol komponenseinek hatásai

2.3.3.1. Fitoszterolok bioszintézise és analízise

A 30 szénatomos vázzal rendelkező triterpének igen tekintélyes vegyületcsoportot alkotnak. Megoszlásuk széleskörű; tartalmazzák emberi és növényi szervezetek, de gombák, továbbá baktériumok, korallak és kételtűek is. Számos kétszikű növény családban előfordulnak, ilyenek az *Apiaceae*, *Araliaceae*, *Asteraceae*, *Betulaceae*, *Caryophyllaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Hippocastanaceae*, *Lamiaceae*, *Polygalaceae*, *Primulaceae*; számos gyümölcs, zöldség, mag, gabonaféle, hüvelytermés és csíraolaj is tartalmazza őket. Bioszintézisük első lépésében a közös prekursor, a szkvalén képződik két molekula farnezil-pirofoszfátból (FPP), melyből enzimatis oxidációval szkvalén-epoxid keletkezik, majd ebből két különböző cikláz enzim hatására kétféle konformációjú váz képződik: szék-kád-szék-kád, illetve szék-szék-szék-kád. Előbbiből keletkeznek majd a szterolok, szteroidok. A szterol köztitermékeken keresztül lanoszterol keletkezik - mely gyakori a növényekben és kulcsvegyület az állati szterol-bioszintézisben - s ebből a koleszterol, mely az állati szervezetek fő szterolvegyülete (**6. ábra**).



6. ábra. A fitoszterolok bioszintézisének főbb lépései (folyt. köv.)



6. ábra. A fitoszterolok bioszintézisének főbb lépései (Heinrich, 2004)

A legfontosabb és leggyakoribb fitoszterolok (növényi szterol komponensek) a β -szitoszterol, sztigmaszterol és a kampeszterol. Ezek egymáshoz nagyon hasonlóak, csupán a C17-es oldalláncukban térnek egy egymástól. A növényekben szabadon és kötött állapotban; glikozidok, zsírsav- és ferulasav-észterek formájában fordulnak elő. Funkciójuk hasonló, mint a koleszterol az állati sejtekben; a sejtmembrán integritásának megőrzésében fontos alkotóelem.

Az *Ononis spinosa* főbb szterol vegyületei a β -szitoszterol, a kampeszterol, a sztigmaszterol, az α -spinaszterol és egy speciális vegyület, a cikloartenol, s ennek 24-metilén származéka [Rowan és Dean, 1972], illetve a szeko-triterpén α -onocerin. A népgyógyászatban fellelhetők egyéb fitoszterol, illetve β -szitoszterol tartalmú gyógynövények, mint például a kisvirágú fűzike (*Epilobium parviflorum*); a csalán (*Urtica dioica* L.), a fűrészpálma (*Serenoa repens* L.); a tök (*Cucurbita pepo* L.); az afrikai törpepálma (*Pygeum africanum* L.).

Az irodalomban több kutatás található, melyek triterpének, szterolok gázkromatográfiás analízisével foglalkoznak, származékképzéssel (N,O-bisz(trimetilszilil)trifluoracetamid [Domeño és mtsai, 2005], n-butil észter-trimetilszilil éter [Batta és mtsai, 2002], trimetilszilil éter) [Ahmida és mtsai, 2006; Janicsák és mtsai, 2003]. Johnsson és mtsai (2005) két kolonna (DB35-MS és DB5-MS 25m×0,2 mm) egymás után kapcsolásával (tandem) ért el pontosabb eredményt (65 - 290°C 90°Cperc⁻¹, 290 - 305°C 0,3°Cperc⁻¹). Gutierrez és mtsai (1998) gyors, gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás módszert dolgoztak ki a szterolok tanulmányozására (DB5-HT 15m x 0,25mm kolonna, GC-FID: 100-350°C, 15°Cperc⁻¹, GC-MS: 120 - 380°C, 10°Cperc⁻¹), mely lehetővé tette a szterolok származékképzés nélküli meghatározását.

2.3.3.2. Fitoszterolok hatásai

A β -szitoszterolnak kísérletesen igazolt $5\text{-}\alpha$ -reduktáz gátló hatása van; ez az enzim kulcsfontosságú a szteroid bioszintézisben. Hatását több humán és állatkísérletben vizsgálták benignus prosztata hiperpláziában (BPH) [Berges és mtsai, 1995; Awad és mtsai, 1998; Souchet és Laplante, 2007].

A β -szitoszterolt tartalmazó fitoszterol-kivonat, illetve a β -szitoszterol és a glikozilált β -szitoszterol szignifikánsan javította a BPH szimptomákat, a kiválasztási szimptomákat és az életminőséget [Kobayashi és mtsai, 1998; Wilt és mtsai, 1999], mindazonáltal a prosztata méretét nem csökkentette [Wilt és mtsai, 1999]. Viszont egy nyomon követéses vizsgálatban a 6 hónapos folyamatos β -szitoszterol kezelés után a létrejött pozitív hatások még 18 hónapig megmaradtak [Berges és mtsai, 2000]. Egyes eredmények szerint a β -szitoszterol daganatgátló és citoprotektív hatással is rendelkezik; humán colon karcinóma sejtek növekedését gátolta, mintegy 55%-kal, a koleszterinhez képest [Awad és mtsai, 1998]. Csökkentette a sugárzás okozta sejthalált és a DNS töréseket, mivel represszálta a reaktív oxigén gyökök szintjét, fokozta az antioxidáns enzimek (superoxide dismutase (SOD), kataláz (CAT), és a glutathion peroxidáz (Gpx)) aktivitását [Li és mtsai, 2007].

Már évekkel ezelőtt észrevették, hogy a fitoszterolok csökkentik a totál és az LDL koleszterin szintet. A fitoszterolok humán kísérletekben növelték a koleszterin bélbe történő kiválasztását [Racette és mtsai, 2010], csökkentették a koleszterinfelszívódást [Ostlund és mtsai, 2003; Jones és mtsai, 1997], s fokozták a koleszterin metabolizmusát [Brauner és mtsai, 2012]; tehát több támadásponton is kifejtették hatásukat a szérumban a koleszterinszint csökkentésére. Több humán kísérlet metaanalízisében a fitoszterolok a National Cholesterol Education Program által ajánlott 2 g/dózis mennyiségben ~10%-kal csökkentették az LDL koleszterin szintet [Carr és mtsai, 2010]. A fitoszterol glikozidok és -észterek (300 mg fitoszterolnak megfelelő mennyiségben) is hasonlóan csökkentették a koleszterin felszívódást 37,6% és 30,6%-kal.

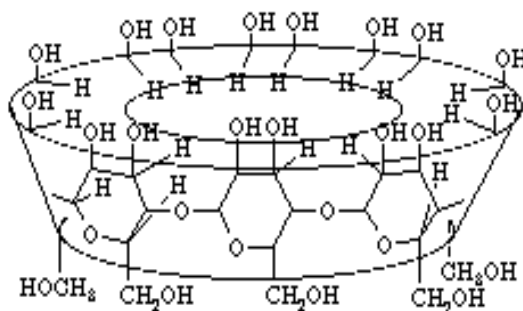
2.4. Ciklodextrinek alkalmazási lehetősége a növényi hatóanyagok kivonásában és preformulálásában

2.4.1. Ciklodextrinek története, jellemzése

A ciklodextrinek glükopiranoz molekulákból álló nem redukáló ciklikus cukrok, melyek a keményítő hidrolizációs termékei. A részlegesen előhidrolizált keményítőt a ciklodextrin-glikozil transzferáz enzim köti össze ciklikus dextrinekké (7. ábra), melyet eredetileg a *Bacillus macerans* baktérium termel, de ma már számos baktériumtörzsből izoláltak (más *Bacillus* fajok, *Klebsiella pneumoniae*, *-oxytoca*, *Micrococcus luteus*, *Thermoanaerobacter thermosulfurigenes*, *Thermococcus* fajok [Szerman és mtsai, 2007] „ciklodextrintermelő” enzimeket.

A ciklodextrineket de Villiers fedezte fel 1891-ben a burgonya rothadása során, majd később, a 20. század elején Franz Shardingger kezdte tanulmányozni („Schardingger-dextrinek”). Szerkezetét a 30-es években tárták föl Freudenberg és munkatársai, ezután az 50-es években intenzíven kutatni kezdték fizikai-kémiai tulajdonságait Amerikában French, illetve Németországban Cramer vezetésével; s végül megjelent az első ciklodextrin monográfia (French, 1957). Ezután egy félreértelmezett toxikológiai vizsgálat miatt a ciklodextrineket „elfelejtették”, azonban mint később kiderült, a ciklodextrinek atoxikusak, így a rendkívül érdekes vegyületcsaládot tovább vizsgálták a 70-es években, főként Japánban és Magyarországon.

A ciklodextrin-kutatás Magyarországon a Chinoín Gyógyszer- és Vegyészeti Termékek Gyárának Biokémiai Kutató Laboratóriumában Szejtli József vezetésével kezdődött. Ettől kezdve a ciklodextrin-kutatás erőteljes fejlődésnek indult, és a fent említett laboratórium Cyclolab néven önálló formában mára a világ szakmai élvonalába tartozó kutatólaborrá vált.



7. ábra. A β -ciklodextrin szerkezete (<http://www.biologie.uni-hamburg.de>)

Az α -CD 6 glükopiranoz egységből, a β -CD 7, a γ -CD pedig 8 glükózegységből épül föl. A ciklodextrinek enyhén csonkakúp formájú gyűrűmolekulák, melyek egy belső üreggel rendelkeznek. A hengerpalást-molekula külső felülete a hidroxil-csoportokból adódóan polárisabb, a belső üreg pedig enyhén apoláris jellegű; ez a polaritás az 1,4-dioxánéhoz hasonló, egy körülbelüli 0,3-as pK_{ow} -val [Demian, 2000]. Az üreg belsejét hidrogének és glikozidos oxigénhidak alkotják, mely utóbbiak a nemkötő elektronpárok révén nagyobb elektronsűrűséget, így némi Lewis-bázis sajátságot kölcsönöznek az üregnek. Mivel a glükózegységek 4C_1 konformációjúak, így az üreg szűkebbik bejáratánál helyezkednek el a primer, a nagyobbiknál pedig a szekunder hidroxil-csoportok. A CD-ek legfontosabb fizikai-kémiai jellemzői az **1. táblázatban** láthatók.

1. táblázat. Az α -, β - és γ -ciklodextrinek legfontosabb jellemzői [Szejtli, 1982]

Tulajdonságok	α -CD	β -CD	γ -CD
Glükopiranoz egységek száma	6	7	8
Molekulatömeg (g mol ⁻¹)	972,9	1135	1297,2
Oldhatóság vízben (g 100ml ⁻¹) 25 °C-on	14,5	1,85	23,2
Üregátmérő (nm)	0,47 ± 0,53	0,6 ± 0,65	0,75 ± 0,83
Henger magassága (nm)	0,79 ± 0,1	0,79 ± 0,1	0,79 ± 0,1
Molekula átmérője (nm)	1,46 ± 0,4	1,54 ± 0,4	1,75 ± 0,4
Közelítő térfogat (nm ³)	0,174	0,262	0,427
Üregbe felvehető vízmolekulák száma	174	262	427

A ciklodextrin üreg megfelelő méretű és polaritású molekulákat be tud fogadni, ezáltal zárványkomplex képzésre alkalmas. A primer és szekunder hidroxil-csoportok szubsztituálhatók, így a natív ciklodextrinekből kiindulva vége-hossza nincs az elméletileg lehetséges származékok sorának. Különböző hidrofil, hidrofób, illetve ionos származékok képezhetők; a legelterjedtebbek a különböző számú metil- (DIMEB-2, TRIMEB-3, RAMEB – átlagosan 2, de random elrendezésben), hidroxipropil- (hidroxipropil-béta-ciklodextrin - HPBCD, hidroxipropil-gamma-ciklodextrin - HPGCD), szulfobutil-éter-, karboxi-metil-, etil-, illetve diamino-2,3-deoxi-csoporttal helyettesített származékok [<http://www.carbomer.com/products.html>].

A szubsztituált ciklodextrin származékok fontos tulajdonsága a szubsztituáltsági fok, vagyis a DS (degree of substitution), melyet úgy szokás megadni, hogy átlagosan egy

glükopiranoz egységre, vagy ciklodextrin gyűrűre számolva mennyi szubsztituens jut. Ma leggyakrabban 6-, 7- és 8-tagú gyűrűket, vagyis az alfa- (α -CD), béta- (β -CD) és gamma-ciklodextrint (γ -CD) és származékait gyártják és használják fel, de már létrehoztak delta-, epszilon-, éta és dzéta-ciklodextrint is, azonban a nagyobb tagszámú gyűrűkre már nem jellemző a csonkakúp forma, és a nagyobb flexibilitás miatt az üregméret kisebb is lehet. A δ -ciklodextrinnel makrociklusos vegyületeket mikrokapszuláltak eddig [Akasaka és mtsai, 2000], mindazonáltal nem jellemzi a többi CD-re jellemző oldékonyságfokozás [Miyazawa és mtsai, 1995].

A natív ciklodextrinek vízdoldékonysága nem túl jó, mivel ezek hajlamosak az aggregálódásra a sok hidroxil-csoport révén [Coleman és mtsai, 1995; Messner és mtsai, 2010]. A legnagyobb aggregáció a β -CD-nél tapasztalható, ami 3 mM felett számottevő; a keletkező aggregátum több mikrométer is lehet, ezzel magyarázható a β -CD rendkívül alacsony oldékonysága, míg a dimetil-béta-ciklodextrin (DIMEB) és random-metil-béta-ciklodextrin (RAMEB) vizes oldatában az aggregáció 12 mM-nál még erősen lúgos közegben is elenyésző. A β -CD aggregálódása azzal magyarázható, hogy az egyik glükóz C2 hidroxilcsoportja hidrogénkötést létesít egy szomszédos egység C3-OH csoportjával, így a molekulán belül egy másodlagos öv alakul ki a hidrogénkötések által, mely elég merevvé teszi a szerkezetet [Sabadini és mtsai, 2006].

A DIMEB, RAMEB, HPBCD, HPGCD vízdoldékonysága már jóval nagyobb, mivel a szubsztituensek mintegy „lefogják” a hidroxil-csoportok egy részét, így a ciklodextrin molekulák nem tudnak azok révén intermolekuláris kölcsönhatást létrehozni, mindazonáltal a β -CD a legolcsóbb valamennyi között, az üregmérete is vendégmolekulák széles köre számára kedvező, így ezt használják legelterjedtebben. Ma az Európai Gyógyszerkönyvben hivatalos az α -CD, β -CD, γ -CD és a HP- β -CD, az Amerikai Gyógyszerkönyvben a β -CD, γ -CD és a HP- β -CD, valamint a Japán Gyógyszerkönyvben az α -CD, β -CD, γ -CD.

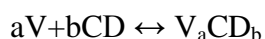
2.4.1.1. A ciklodextrinek szerepe a gyógyszerformulálásban

A ciklodextrinek, mint gyógyszeripari segédanyagok alkalmazása elsősorban a **zárványkomplex** képzésben nyilvánul meg. A ciklodextrin üreg viszonylagos apolaritása lehetőséget ad vízben kevésbé oldódó gyógyszermolekulák vízdoldékonyságának elősegítésére. Fő alkalmazási területei a gyógyszeriparban az oldékonyság-növelés,

stabilizálás, szagtalanítás, biológiai hasznosíthatóság növelése, kellemetlen ízek csökkentése, irritáló hatások csökkentése. Mindezekon kívül felhasználják még bioszintetikus és biokonverziós folyamatokban, regioszelektív és eliminációs reakciókban. A komplex képződéséhez fontos kritériumok a megfelelő méret, a polaritás, valamint a megfelelő termodinamikai viszonyok létrejötte a gazda-, a vendégmolekulák illetve az oldószer között [Charumanee és mtsai, 2006]. Vizes oldatban a ciklodextrin üregében a nagy entalpiájú vízmolekulák foglalnak helyet. Az apoláris-poláris kölcsönhatás energetikailag nem kedvező, így optimálisabb egy kevésbé poláros vendégmolekula szubsztitúciója. A komplexképzés hajtóereje tehát a vízmolekulák kiszabadulása az üregből, az általuk létrehozott hidrogénkötések létrejötte a többi oldószer-molekulával, a hidrofób vendégmolekula és a poláros oldószer közötti taszító kölcsönhatások megszűnése, valamint a ciklodextrin apoláris ürege és a hidrofób vendég között létrejövő másodlagos kötőerők, ezen belül is elsősorban van der Waals, hidrofób kölcsönhatások, illetve hidrogénkötések kialakulása [Szejtli, 1982].

A komplexképződés során a leggyakoribb és legegyszerűbb gazda-vendég sztöchiometria az 1:1, de előfordulhat, hogy egy vagy több vendégmolekulához kettő vagy több CD molekula asszociálódik vagy fogadja magába.

Oldatban a komplexképződés során fennálló egyensúly általánosan az egyensúlyi (képződési, stabilitási) állandóval (β_{ab}) fejezhető ki, a következőképpen:



$$\beta_{ab} = [V_a CD_b] / [V]_a [CD]_b \quad (1)$$

ahol D a ciklodextrin és B a vendégmolekula. A β_{qr} stabilitási állandókat felhasználva:

$$cB = \sum a \beta_{ab} [V]^a [CD]^b \quad (2)$$

$$cD = \sum b \beta_{ab} [V]^a [CD]^b \quad (3)$$

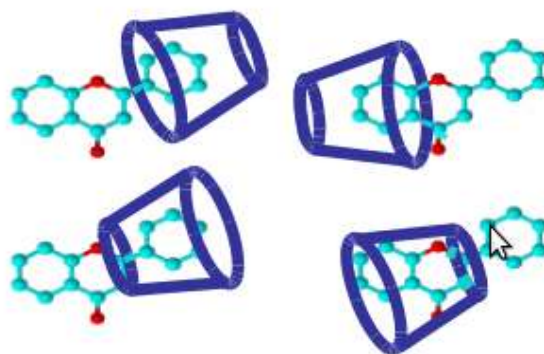
(cV a vendég és cD a gazdamolekula összkoncentrációja)

A tapasztalatok szerint ciklodextrinokkal az esetek nagy részében 1:1 sztöchiometriájú zárványkomplexek képződnek, azaz $a=b=1$.

2.4.1.2. Izoflavonok/flavonok ciklodextrinokkal képzett komplexei

Az izoflavon váz közelítőleg 0,5 x 1,5 nm méretű. Megjegyzendő, hogy az A és C gyűrű síkban rögzítve van egymáshoz, míg a B gyűrű a 3 - 1' kötés mentén képes elfordulni, tehát

az ezen a gyűrűn lévő szubsztituens lététől függően kissé változhat ez a méret, de nem jelentősen. Az α -, β - és a γ -CD üregmérete 0,47-0,83 nm között változik. Eszerint a méretek alapján a komplex képződésnek nincs akadálya. Energetikai megfelelésük vizsgálatára molekula optimalizációt végeztünk a genisztein és az α -, β -, illetve a γ -CD között PM3 módszerrel, s az eredmények azt mutatják, hogy a β - és γ -CD-k esetében a komplex képződésnek energetikai akadálya nincsen; míg az α -CD-nél ez energetikailag és méretben is gátolt (5.2.1.1. fejezet). Irodalmi adatok vannak arra, hogy a flavonoid-váz – bár a B-gyűrű elhelyezkedésében különbözik az izoflavonoidoktól – többféle módon illeszkedhet a ciklodextrin üregébe [Calabro és mtsai, 2004; Rezende és mtsai, 2009]; az A-gyűrű felől, a B-gyűrű felől, mind pedig úgy, hogy mind az A és C gyűrűk az üregben foglalnak helyet, a B-gyűrű pedig kint marad (**8. ábra**). Ezt óvatos közelítéssel, de feltehetően interpretálni lehet az izoflavon vázra is, mivel a vázméretben ez a gyűrűhelyzet különbség nagy változást nem okoz. Sikeresen mikrokapszulázták eddig a rutin, kvercetin, kempferol, miricetin, naringenin, morin, apigenin, baikalein, dioclein, robinetin és krizin flavonoidokat [Nguyen és mtsai, 1992; Sri és mtsai, 2007; Chakraborty és mtsai, 2010; Liu és mtsai, 2006; Banerjee és mtsai, 2007; Shulman és mtsai, 2011]. Stancanelli és munkatársai már vizsgálták a genisztein komplexálódását β -, HP- β - és [(2-oligo(ethyleneoxide)-6-hexylthio)- β -CD-nel 1:1 arányban, a komplexálódást UV-spektrofotometriával és CD spektroszkópiával is alátámasztották [Stancanelli és mtsai, 2007; Crupi és mtsai, 2007; Cannava és mtsai, 2010;].



8. ábra. A flavon váz és a β -CD illeszkedései irodalmi adatok alapján

(Daruhazi, 2011)

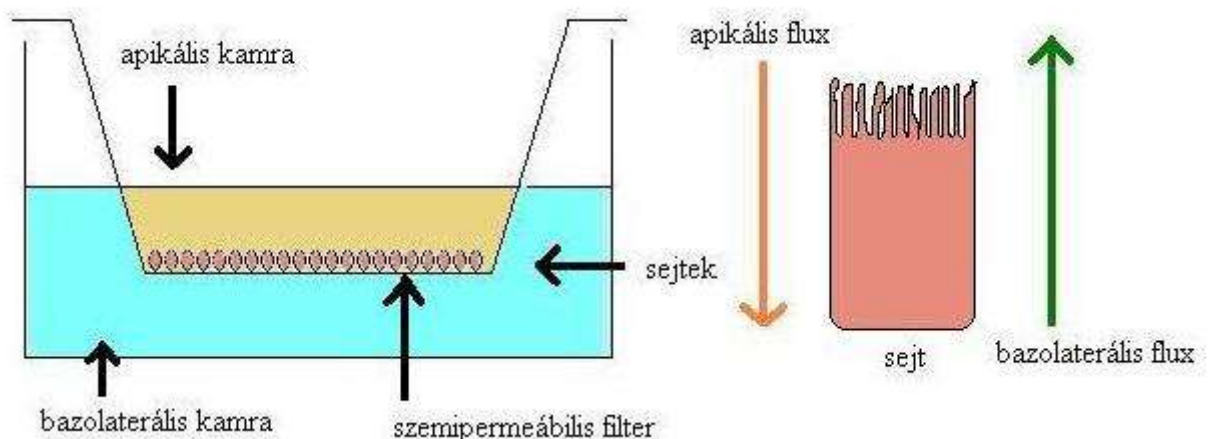
A ciklodextrinek a kevésbé oldódó komponens oldékonyságának fokozása, vagyis a bioelérhetőség növelése révén a biológiai hatást is fokozhatják, erre példák is vannak; rutin, naringenin és *Hypericum perforatum* kivonat antioxidáns hatásának fokozása, s a

rutin/ β -CD komplexnek a rutinénál fokozottabb szérumban triglicerid-csökkentő hatása [Kalogeropoulos és mtsai, 2010; Mercader-Ros és mtsai, 2010; Krishna és mtsai, 2005].

2.4.2. Izoflavonok és ciklodextrin komplexeik vizsgálata biológiai tesztekben

2.4.2.1. Izoflavonok és glikozidjaik membránpermeabilitásának vizsgálata Caco-2 sejtvonalon

A Caco-2 sejtvonal humán epithélialis colon adenokarcinóma sejtekből áll. Ez a leggyakrabban használt sejtvonal, mely folytonos monolayer kialakítására képes, s rendelkezik azon tulajdonságokkal, melyek alkalmassá teszik a per os adagolt gyógyszerkészítmények abszorpciójának *in vivo* vizsgálatára [Artursson, 1991]. A polarizált enterocitákból álló Caco-2 monolayer réskapcsolatokat (tight junction), mikrovillusokat, és számos enterocitákra jellemző enzimet és transzportert expresszál.



9. ábra. A Caco-2 transzport modell vázlata. Az apikális kamra felől a bazális kamra felé történik a farmakon-transzport

A Caco-2 sejtek által kialakított monolayer segítségével tanulmányozható az intesztinális epitheliumon keresztüli transzport-folyamatok szinte mindegyike (transzcelluláris passzív transzport; paracelluláris passzív transzport; transzcelluláris aktív transzport; aktív efflux;

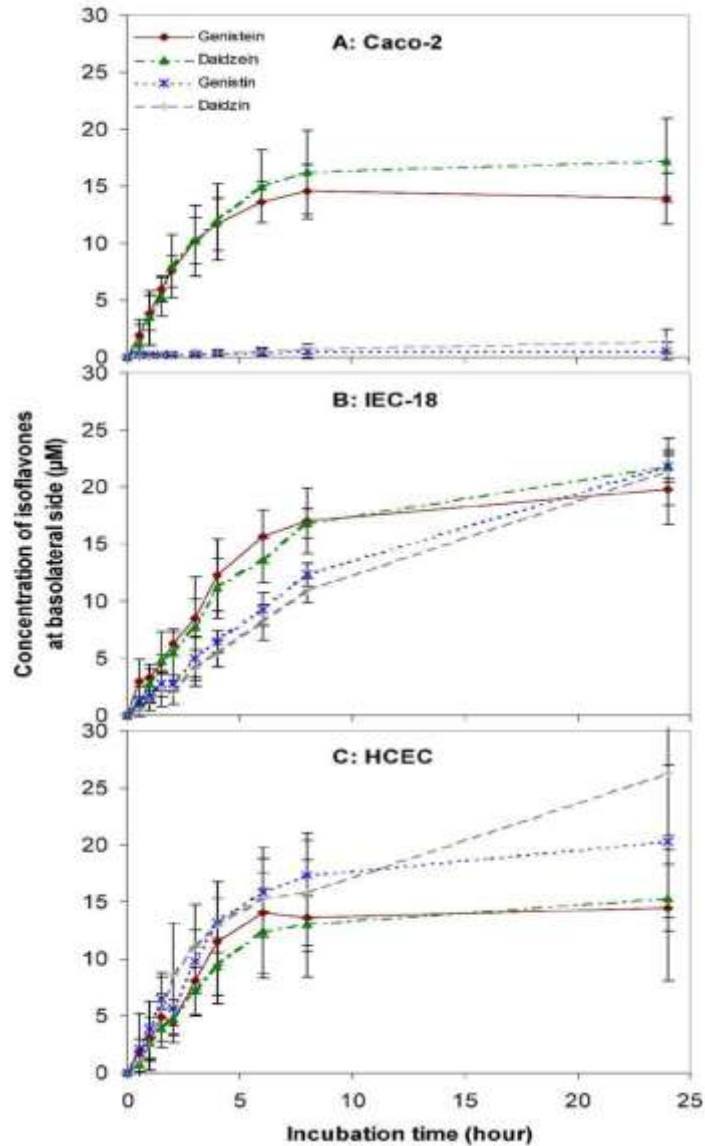
transzcitózis), melyek szabályozzák a gyógyszerfelszívódást [Hunter és Hirst, 1997.]. Az első – ma már igen széles körben alkalmazott -, felszívódási vizsgálatokhoz szolgáló modellt Hidalgo és mtsai jellemezték [Hidalgo és mtsai, 1989] **(9. ábra)**.

A Caco-2 assay elrendezése: a szemipermeábilis membránon növesztve a sejteket, megfelelő hőmérsékleten és páratartalomban megfelelő ideig inkubálva, a vizsgálandó anyagot az apikális és/vagy a bazolaterális kamrához adjuk, az előírt inkubációs idő után mintát veszünk az apikális vagy a bazolaterális oldalról, majd a vizsgálandó anyagot kvantitatíve mérjük.

A sejtvonal integritását a TEER (transepithelial electrical resistance) értéke jellemzi. Ennek mérésére radioaktívan jelzett PEG4000 és mannitol vegyületeket használnak, DMSO-ban oldva. A rezisztencia értékét epithéliális voltamméterrel határozzák meg, majd az alábbi képlettel számolva:

$$TEER = (R_{total} - R_{blanc}) \times A (cm^2)$$

(R_{total} a mért rezisztencia, R_{blanc} a kontroll filter rezisztenciája sejtek nélkül, A az inzert felülete) kapjuk meg a TEER értékét. A genisztein, daidzein és glikozidjaik, a genisztin és a daidzin membrántranszportját Caco-2 sejtvonalon vizsgálva [Steensma és mtsai, 1999; Walle és mtsai, 1994], az eredmények szerint az aglikonok 6 óra után körülbelül 30-40%-ban jutottak át a membránon, míg glikozidjaik nehezen és kis mennyiségben transzportálódtak. A sejtekben a glikozidok viszont glikozidikus hasításon estek át, jelezve, hogy ezen sejteket endogén glikozidáz aktivitás jellemzi, illetve glukuronid- és szulfátképzés is kimutatható volt. Más, humán vékonybél (IEC-18) és corneális (HCEC) sejtvonalakkal összehasonlítva lényeges különbség adódott a genisztein és daidzein, illetve glikozidjaik abszorpciója között; a Caco-2 [Stensma és mtsai, 2004] sejtvonalnál jóval nagyobb mértékben transzportálódtak a glikozidok a másik két sejtvonal esetében, míg az aglikonok transzportja hasonló nagyságrendű volt **(10. ábra)**. A Caco-2 némi hátránnyal rendelkezik a másik két sejtvonallal szemben; a sejtek közötti réskapcsolatok (tight junction) meglehetősen szorosak; a TEER értéke ennek megfelelően magasnak adódott, míg a másik 2 sejtvonal TEER értéke jóval alacsonyabb volt, továbbá a Caco-2 citokróm P450 mintázata eltér a vékonybélétől. Mindezek alapján a Caco-2 nem a legmegfelelőbb modell bizonyos paracelluláris transzporttal rendelkező molekulák számára; tehát nem alkalmazható ezek vizsgálatára.



10. ábra. Genisztein és daidzein, illetve glikozidjaik (genisztin és daidzin) transzportja
A: Caco-2, B: IEC-18 és HCEC sejteken keresztül [Stensma és mtsai, 2004]

2.4.2.2. Izoflavonok és ciklodextrin komplexeik hatásának vizsgálata

Caenorhabditis elegans modellállat élettartamára

A *Caenorhabditis elegans*, rövidebb nevén *C. elegans* egy ~ 1 mm hosszú talajlakó fonálféreg, mely a *Rhabditidae* családba tartozik. Hengeres testű, mindkét végén elkeskenyedő állat, mindössze 959 sejtből áll; egyedfejlődése során 1030 sejtjéből 131 apoptózissal elpusztul, s 302 idegsejtje van. Csupán 2-3 hétig él, a szaporodási ciklusa igen

rövid, 3 napos. A *C. elegans* az egyik legáltalánosabban használt soksejtű biológiai rendszer alapvető biológiai kérdések vizsgálatához. Két Nobel díjjal is büszkélkedhet a szervfejlődés és a programozott sejthalál genetikai szabályozásának feltárásában (S. Brenner, R.H. Horvitz és J.E. Sulston; 2002), illetve az „RNS silencing” vizsgálatában (A. Fire és C. Mello; 2006). A *C. elegans* volt az első soksejtű szervezet, amelynek a teljes DNS szekvenciáját meghatározták. Laboratóriumban viszonylag olcsón, gyorsan, könnyen és nagy mennyiségben fenntartható, napjainkban elterjedt modellszervezet a sejtdifferenciálódás, fejlődési folyamatok, meiózis, idegrendszeri válaszok és anti-age hatások tanulmányozására.

A genisztein, a daidzein és a daidzein 6-metoxi származéka, a glicitein hatását vizsgálva *C. elegans* élettartamára normális körülmények közt és juglon-indukálta oxidatív stresszben szignifikánsan pozitív eredmények születtek.

Az **ösztrogén** neuroprotektív hatása a nigrostriatális dopaminerg rendszerben már több vizsgálat tárgya volt [Dluzen, 2000], így joggal fölvetődött a szója-izoflavonok ilyen jellegű hatásának kérdése. Epidemiológiai tanulmányok összefüggésbe hozták az ösztrogén-helyettesítő terápiát az Alzheimer-kór alacsonyabb fokú morbiditásával. **Transzgenikus** *C. elegans* törzseket, melyek β -amiloidot expresszáltak ($A\beta$), genisztein, daidzein, és glicitein izoflavonokkal etettek, s azt mutatták ki, hogy a genisztein kis mértékben, a glicitein pedig szignifikáns mértékben csökkentette az $A\beta$ indukálta paralízist az állatokban [Gutierrez-Zepeda és mtsai, 2005].

Kísérletünkben a genisztein, illetve a genisztein/ β -CD komplex élettartamra gyakorolt hatását vizsgáltuk, illetve hasonlítottuk össze.

2.4.3. Növényi komponensek kivonása ciklodextrinek segítségével

Egyre több példa van természetes vegyületek szelektív kinyerésére ciklodextrinokkal. Ilyen a citrusfélékből készült italok keserű ízének a csökkentése a naringin, heszperidin, illetve limonin eltávolításával [Konno és mtsai 1981, 1982; Shaw és mtsai, 1984], koffein eltávolítása kávéból és teából [Shu és mtsai, 1995], margarinok, tojás és egyéb termékek koleszterinmentesítése [Sidhu és mtsai, 1995; Hedge és mtsai, 1998]. A komponensek közti fizikai-kémiai különbségek, illetve az alkalmazott ciklodextrinszármazék

vendégspecificitása lehetőséget adhat 1-1 komponens szelektív kivonására, ahogy a fenti példák mutatják.

Számos korábban említett vizsgálat és irodalom egyértelműsíti, hogy a flavon- és izoflavon váz méretileg és energetikailag kompatibilis a ciklodextrin üregekkel, leginkább a β -CD-ével. Irodalmi adatok alapján szőlőből és ginkgo levélből sikerült polifenolokat és flavonoidokat β -CD és metil- β -CD segítségével összehasonlíthatóan szignifikáns mennyiségben kinyerni [Xu és mtsai, 2005; Ratnasoorya és mtsai, 2012].

3. Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki, hogy az *Ononis spinosa* L. gyökerének, mint gyógyszerkönyvi drognak hatóanyagait mélyebben feltárjuk.

Célunk volt a növény triterpénjeinek, szteroljainak vizsgálata, minőségi és mennyiségi értékelése, valamint vizsgálni kívántuk két fontos izoflavon, a genisztein és daidzein különböző ciklodextrinokkal képzett komplexeinek biológiai elérhetőségét, valamint a növényben található izoflavonoidok szelektív kinyerésének lehetőségét. Mindezeket az alábbi pontokban foglaljuk össze:

1. Az *Ononidis radix* triterpenoidjainak azonosítása és mennyiségi értékelése a különböző szerves oldószerekkel, illetve szuperkritikus CO₂-dal készült kivonatokban GC-MS módszerrel.
2. A különböző kivonatok β -szitoszterol tartalmának kvantitatív vizsgálata GC-FID módszerrel, származékképzés nélkül.
3. Az *Ononidis radix* izoflavonoidjainak kvalitatív analízise LC-MS-sel.
4. Genisztein és daidzein β -, γ -, hidroxipropil- β - és random-metil- β -ciklodextrin komplexek vizsgálata CD spektroszkópiával és ¹H-NMR-rel.
5. Genisztein és daidzein β -, γ -, hidroxipropil- β - és random-metil- β -ciklodextrin komplexek kioldódásának és bioelérhetőségének vizsgálata *in vitro*; Caco-2 sejtvonalon.
6. Genisztein β -ciklodextrin komplexének *Caenorhabditis elegans* modellállat élettartamára gyakorolt hatásának vizsgálata.
7. Az *Ononidis radix* izoflavonoidjainak kivonása ciklodextrinek segítségével; a kivonás paramétereinek optimalizálása és a kivonatok értékelése.

4. Anyag és módszer

4.1. Növényanyag

A triterpenoidok vizsgálatához felhasznált *Ononis spinosa* L. (Fabaceae) gyökérdrog a kiskőrösi Bio-Berta biokertészetből származik. A növényi anyagot szárítva és aprítva kaptuk, minősége megfelelt a Ph.Hg.VIII. előírásának. A drog darálás utáni részecskemérete 0.689 ± 0.044 mm volt. A drogot a továbbiakban ebben a darált formában használtuk fel a kivonásokhoz.

Az izoflavonoidok vizsgálatához felhasznált drog a Rózsahégyi Gyógy- és Fűszernövény Forgalmazó Kft.-től származik, Erdőkertesről. A növényi anyagot szárítva és aprítva kaptuk, minősége megfelelt a Ph.Hg.VIII. előírásának. A kivonások előtt előzetesen átszitáltuk a Ph. Hg. VII szerinti IV. szitán (részecskeméret ~ 1200 μm ; a Ph. Hg. VIII. szerinti 1000-1400-as szitaszám méretnek felel meg).

4.2. Vegyszerek, reagensek, sejtkultúra

A szterol analitikai tesztanyagokat a Sigma-Aldrich-től (St Louis, MO, USA) vásároltuk, a triterpének kivonásához használt oldószerek analitikai minőségűek voltak (Reanal, Budapest, Merck & Analitics Reagents, Molar Chemicals, Budapest).

A szuperkritikus kivonáshoz használt CO_2 -t és a gázkromatográfiás vizsgálatához használt nitrogént, oxigént, hidrogént és héliumot a Messer Griesheim Hungária Kft. szállította. A genisztein és daidzein standardek az LC Laboratories termékei (U.S.A., MA). A HPLC-MS vizsgálatok során felhasznált metanol a Fisher Scientific-től származik.

A kivonáshoz és komplexképzéshez használt ciklodextrinek a Wacker Chemie termékei voltak (München, Germany); a HP- β -CD DS értéke 4,2, a RAMEB-CD DS-e pedig ~ 12 volt.

A Caco-2 vizsgálatok során az ECACC-től (European Collection of Cell Cultures, Egyesült Királyság) származó Caco-2 sejtvonalat alkalmaztuk. A transzport vizsgálatához a sejteket Transwell[®] (Corning Costar, USA) polikarbonát inzertre helyeztük ($0,4$ μm pórusméret, 2×10^5 sejt/inzert.) A kísérlethez használt HBSS (Hanks buffer salt solution)

oldat a Sigma-Aldrich-tól való. A HPLC-UV meghatározás során használt vegyszerek; a metanol, cc. ecetsav a Fisher Scientific-től, illetve a Molar Chemicals-től származtak.

4.3. Triterpenoidok vizsgálata

4.3.1. Extrakciós és tisztítási módszerek

4.3.1.1. Soxhlet extrakció

A kivonást Soxhlet készülékben, forró vízfürdőn és légköri nyomáson, az oldószer forráspontján végeztük. A porított drogot n-hexánnal, majd elszíntelenedés után etanollal vontuk ki szintén elszíntelenedésig. A többi oldószerrel (izopropanol, etilacetát) ugyanígy, az n-hexánhoz hasonlóan jártunk el.

4.3.1.2. Kíméletes extrakció

Az extrakciót kíméletes körülmények között, 40 °C-on végeztük. Az elrendezés magában foglalt egy 1000 ml-es gömblombikot és egy lapátos keverőt, mellyel 300 rpm-en végeztük a kivonást. A felhasznált oldószer az egyes kivonások során 3 x 500 ml acetont, etanol és metanol voltak. A növényi mintát (100 g) és ötszörös mennyiségű oldószert tettünk a lombikba, majd a kivonást háromszor egy óráig végeztük, a kivonatokat összegyűjtöttük, s az oldószert ledesztilláltuk vákuumdesztillálóban (Büchi Rotavapor R-200).

4.3.1.3. Szuperkritikus Fluid Extrakció

Laboratóriumi extrakció

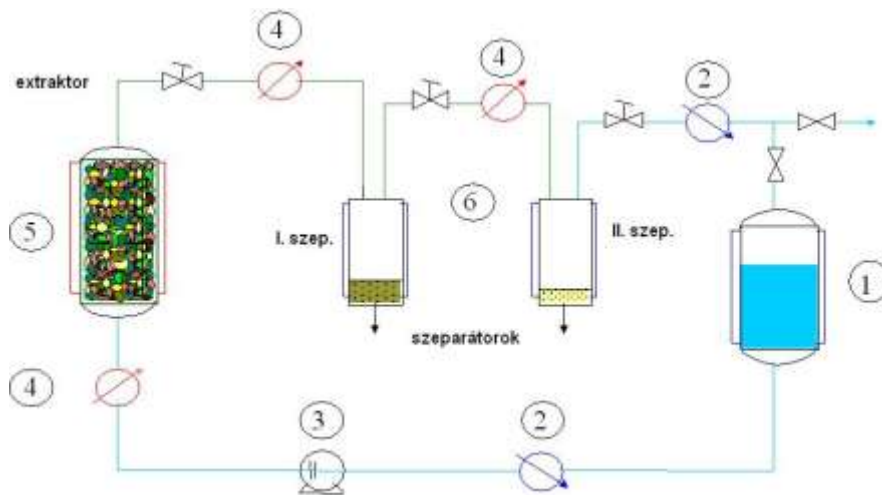
A kivonásokat ISCO 2-10 kísérleti laboratóriumi szuperkritikus extraktorban végeztük (ISCO, USA) fluid CO₂ -dal állandó hőmérsékleten (40°C) és növekvő nyomáson 100 g drogból. Az optimális nyomásérték megállapításához 100 és 200 baron végeztük a kivonást 60, illetve 90 percig, majd az extraktumokat 96%-os etanolban nyelettük el. A 60 és 90

perces kivonás során az első 30 percben a drogot CO₂-ban „áztattuk” (statikus extrakció), légköri nyomáson, a következő 30 illetve 60 percben pedig az előírt nyomást alkalmaztuk (dinamikus extrakció).

Félüzemi méretű extrakció

A kivonást egy félüzemi méretű szuperkritikus extraktorral végeztük fluid CO₂-dal állandó hőmérsékleten (40°C) és 450 bár nyomáson. A készüléket a Budapesti Műszaki Egyetemen fejlesztették ki [Oszagyán, 1996] (**11. ábra**).

Korábbi tapasztalatok alapján a terpenoidok kivonásához a 450 bár bizonyult a legmegfelelőbbnek [Kéry és mtsai, 1998; Kristó és mtsai, 2001; Lemberkovics és mtsai, 2009]. A kivonást 1000 g drogból végeztük. A különböző módszerekkel készült kivonatok el nem szappanosítható részeinek százalékos értéke a **2. táblázatban** látható.



11. ábra. Kétlépcsős szuperkritikus extrakciós készülék

1. cseppfolyós CO₂ tartály; 2. hűtő; 3. szivattyú; 4. melegítő; 5. extraktor; 6. szeparátorok

4.3.1.4. Tisztítás elszappanosítással

A kivonatokat elszappanosítással tisztítottuk meg a zsíros olajoktól. A különböző oldószerrel készült kivonatokot vákuumban beszáritottuk, majd a maradékot 50 ml 96%-os alkohollal és KOH-dal forró vízfürdőn elszappanosítottuk. A kivonatokat vízzel hígítottuk, majd petroléterrel kiráztuk. A szerves fázisokat összegyűjtöttük, és vízzel lúgmentesre

mostuk, Na_2SO_4 sicc.-mal vízmentesítettük, majd vákuumdesztillálóban bepároltuk. A maradékot kloroformban oldottuk. A továbbiakban ezeket az el nem szappanosított frakciókat vizsgáltuk, melyekben a triterpének várhatóan szabad állapotban voltak jelen.

4.3.2. Analitikai vizsgálatok

4.3.2.1. Triterpenoidok azonosítása és mennyiségi jellemzése GC-MS analízissel

A különböző triterpenoidok azonosítását Agilent 6890N készüléken és az ahhoz kapcsolt 5973N kvadrupol tömegspektrométerrel végeztük egy HP-5MS (30 m x 0.25 mm ID x 0.25 μm) állófázisú oszlopon. A hőmérsékleti program: 140°C 1 percig az injektálás után, majd 10°Cmin⁻¹ 140°C-tól 270°C-ig, 20 perc izoterm, majd 270°C-tól 300°C-ig 10°Cmin⁻¹, 6 perc izoterm. A vivőgáz nagy tisztaságú hélium volt, az áramlási sebesség 1 ml min⁻¹. Az injektor hőmérséklete 280°C, az injektált minta térfogata 1 μl volt. A komponensek azonosítását a retenciós idők, a Kovats indexek, illetve korábbi standard adatok és a NIST 05 spektrumtár alapján; a relatív koncentrációk meghatározását terület normalizációs módszerrel végeztük (15. ábra).

4.3.2.2. β -szitoszterol tartalom meghatározása GC-FID vizsgálattal

Az analízis Agilent 6890N készüléken történt DB-5MS (25 m x 0.2 mm ID x 0.33 μm) állófázisú oszlopon. A vivőgáz hélium volt 1 ml min⁻¹ áramlási sebességgel, az injektor hőmérséklete 280°C, s az injektált minta térfogata 1 μl volt. A hőmérsékleti program a következő volt: 120°C 1 percig, majd 120°C-tól 300°C-ig 10°C min⁻¹, 14 perc izoterm, 300°C-tól 310°C-ig 10°C min⁻¹, 10 perc izoterm. A lángionizációs detektor hőmérséklete 330°C volt. Az azonosítás standard addíció és retenciós adatok alapján történt, a kvantitatív meghatározáshoz 5 α -cholestan-3-on belső standard-et használtunk. A β -szitoszterol kalibrációját 1-100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ koncentrációtartományban végeztük, hat különböző koncentrációértéknél, 3 párhuzamossal. A belső standard koncentrációja 12,65 $\mu\text{g ml}^{-1}$, a korrelációs koefficiens 0,9998 volt az alkalmazott koncentrációtartományban. Az LOD

érték (S/N=3) $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$, az LOQ érték (S/N=10) pedig $0,3 \mu\text{g ml}^{-1}$ volt. A GC-FID analízis reprodukálhatóságát három párhuzamos alapján mértük (**3. táblázat**).

4.4. Izoflavonoidok vizsgálata

4.4.1. Izoflavonoidok kvalitatív analízise

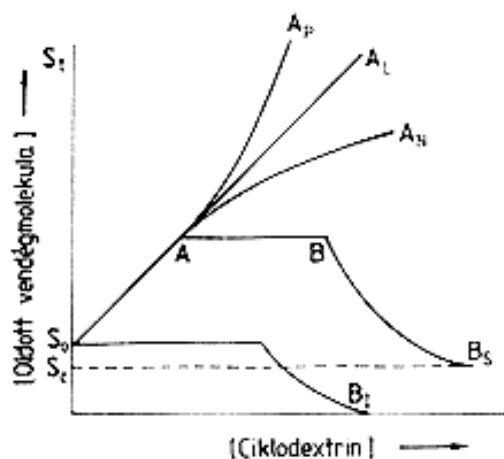
Az izoflavonoid komponensek azonosítását HPLC-MS/MS-sel végeztük a fent említett Agilent 6410 Triple Quad LC/MS rendszeren. Kromatográfiás oszlop: Hypersil Zorbax Eclipse, XDB-C18 (150 mm / 2,1 mm / 5 μm ; Agilent, Santa Clara, CA, USA), az eluensek 0,3% ecetsav (A) és metanol (B) voltak. Gradiens program: 0. perc, 29%; 20. perc, 85%; 22. perc, 100%, 27. perc 100%; 32. perc, 29%. Oszlophőmérséklet: 25 °C, injektált mintamennyiség: 2 μl , eluens áramlási sebesség: 0,25 ml/min. Az MS kísérleti körülmények a következők voltak: porlasztó, 45 psi; szárítógáz áramlási sebesség, 9 L min⁻¹; szárítógáz hőmérséklet 350°C; kapilláris feszültség 3500 V; fragmentor feszültség: 100 V; MS szkennelés m/z 150-tól 1200-ig történt, 12, 20, 28 és 36 eV ütközési energiáknál.

4.4.2. Genisztein és daidzein komplexálása β -, γ -, HP- β - és RAMEB-ciklodextrinokkal és jellemzésük

4.4.2.1. A genisztein és a daidzein fázisoldékonysági vizsgálata

A fázis oldékonysági vizsgálattal megállapítható, hogy a kérdéses vendégmolekula oldódását segíti-e a hozzáadott ciklodextrin, illetve, milyen koncentráció-tartományban, ezen kívül információt kapunk az oldékonyság típusáról is (**12. ábra**). Ha csak oldott komplex képződik, akkor a fázisoldékonyság izoterma "A" típusú, ha a komplex oldékonysága limitált, akkor "B" típusú az izoterma. B_I típus esetén csak oldhatatlan komplex képződik. A vendég oldékonysága (S_t) először növekszik a vendégmolekula eredeti vizes oldékonysági értékétől (S_0), amíg el nem éri "A" pontot, ahol megközelíti a rendszer a komplex oldékonysági értékhatárát. Tovább növelve a ciklodextrin-

koncentrációt a vendégmolekula oldékonysága nem növekszik tovább, hanem megkezdődik a komplex mikrokristályos állapotban történő kicsapódása az oldatból (B_s típusú izoterma). A "B" pont elérése azt jelenti, hogy a rendszerben lévő összes szilárd vendégmolekulát átalakítottuk kevésbé oldódó zárványkomplexszé, ezért hiába adunk több ciklodextint a rendszerhez, az asszociációs egyensúly az asszociáció irányába tolódik el és az oldékonyság értéke aszimmetrikusan közeledik a zárványkomplex inherens oldékonysági értékéhez (S_c). Elméletileg az oldott koncentráció növekedésének az S_o -tól A-ig azonosnak kellene lennie az S_c értékkel (azaz "A" pontnál az oldat éppen telített mind a vendégmolekulára, mind pedig a komplexére). Ha a vizsgált ciklodextrinkoncentráció-tartományon belül a komplex oldékonysági határát nem érjük el, akkor az izoterma "A" típusú, mely szerint az oldékonyság lineárisan növekszik, valószínűleg változatlan sztöchiometria mellett. Az " A_p " típusú izoterma a lineáristól pozitív irányban tér el, vagyis a komplexben több a vendégmolekula aránya; a komplex sztöchiometriája változik (esetleg 1:2, 2:3, stb.). Az " A_N " típusú izoterma esetében a komplexen belül növekedhet a gazdamolekula aránya 1:1-ről 2:1-re, vagy a vendégmolekula, illetve a komplex hidratációja változik pl. a vendégmolekula ionizációja következtében [Szejtli, 1990]. A genisztein illetve a daidzein 5 mg-jához 5-5 ml növekvő koncentrációjú ciklodextrin oldatokat adtunk, s ezután az így kapott szuszpenziót 10 óráig mágneses keverőn kevertettük 600 rpm fordulaton, majd 0,45 μ m-es membránszűrőn szűrtük, s UV-spektrofotometriásan mértük a beoldódott vendégmolekula mennyiségét, előzetes kalibráció alapján [Higuchi és Connors, 1965]. A kalibrációt 50%-os etanolban vettük föl **(16-17. ábra)**.



12. ábra. Oldhatósági fázisdiagram típusok.

- ☞ S_1 – vendégmolekula oldékonysága, S_0 – vendégmolekula eredeti vizes oldékonysága, A - egközelíti a rendszer a komplex oldékonysági határát, B – a rendszerben lévő összes szilárd vendégmolekula kevésbé oldódó zárványkomplexben van, A_p – 1:1-től eltérő komplex sztöchiometria; több vendégmolekula, A_N – gazdamolekula aránya növekszik a komplexben, B_s - komplex mikrokristályos állapotban történő kicsapódása, B_1 - csak oldhatatlan komplex képződik

☞ [Szejtli, 1990] .

4.4.2.2. Számítógépes molekula optimalizáció

A komplexképzést megelőzően PM3 (Parameterized Model 3) módszerrel molekula optimalizációt végeztünk Windows 06' alapú Spartan 1.1.1 szoftverrel [Wavefunction Inc. 18401 Von Karman Avenue, Suite 370 Irvine, CA 92612]. Ehhez a genisztein szerkezetét a SPARTAN adatbázisból, a γ - és β -CD-ek röntgendiffrakciós szerkezetét [Harata, 1987; Steiner et Koelner, 1994] pedig a Darmstadti Műszaki Egyetem adatbázisából töltöttük le (CIWMIE10 and BCDEXD03). Az optimalizációval azt vizsgáltuk, hogy az izoflavon szerkezet és a ciklodextrin gyűrűje közötti kölcsönhatás térbelileg és energetikailag létrejöhet-e. A PM3 egy szemi-empirikus módszer a molekuláris elektronszerkezetek kvantumszámításaihoz, melyet J. J. P. Stewart fejlesztett ki és 1989-ben publikálta.

4.4.2.3. Komplexképzés

A komplexeket nedves-gyúrásos technikával készítettük (wet-kneading method), mely során a két izoflavont és az egyes ciklodextrineket 2:1 gazda-vendég arányban homogenizáltuk, majd kevés desztillált vízzel éppen gyúrható masszává kevertük, s intenzív gyúrás után P_2O_5 felett szárítottuk. Megmértük a szárítási veszteségüket 105°C -on történő hevítéssel (5-10%), s végül hatóanyag tartalmukat UV-spektrofotometriával; ez utóbbit a hatóanyag homogenitásának vizsgálata céljából.

4.4.2.4. Genisztein és daidzein / CD komplexek kioldódási profilja

A komplexátlatlan hatóanyag s a keletkezett komplexek kioldódási profilját non-sink körülmények mellett a következőképpen határoztuk meg: 50 ml desztillált vízhez adtunk 5 mg hatóanyagot, illetve 50 mg komplexet, majd 30 percig 5 percenként, a 40. perctől kezdve pedig 10 percenként vettünk mintát, majd UV spektrofotometriával mértük a kioldódást, egészen 60 percig, ellenőrzésképpen pedig a 120. percben is megmértük. A kalibrációval koncentrációra átszámított értékeket az idő függvényében ábrázolva megkaptuk a kioldódási görbét, azaz a kioldódási profilt (**19. ábra**). Minden kioldódást három párhuzamossal végeztünk.

4.4.2.5. Genisztein és daidzein / CD komplexek ^1H -NMR vizsgálata

A genisztein és a β -CD térbeli kapcsolódását ^1H -NMR-rel vizsgáltuk. Ez a technika a legmegfelelőbb a nonkovalens interakciók megállapításában, s így megerősíti a komplexbe záródást a zárványkomplexek esetében [Schneider és mtsai, 1998]. Korábbi mérések az egyes flavonoidok, például a rutinnál arra világítottak rá, hogy az aromás gyűrű illeszkedik a CD üregbe [Calabro és mtsai, 2005].

Az ^1H -NMR mérések Varian Inova spektrométeren történtek (600MHz for ^1H), mely 5 mm-es inverz detektálású gradiens (IDPFG) mérőfejjel volt felszerelve. Minden spektrum $30.0\pm 0.1^\circ\text{C}$ -on lett felvéve. A gyúrt komplex mintákat D_2O -ban oldottuk, majd

szobahőmérsékleten rázattuk 48 óráig. A kapott szuszpenziót lecentrifugáltuk és a telített oldatot használtuk fel a mérésekhez.

A gazda-vendég interakciót 2D ROESY NMR spektroszkópiával határoztuk meg. A 2D ROESY spektrum a **21. ábrán** látható.

4.4.2.6. Genisztein és daidzein / CD komplexek cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiás vizsgálata

A vizsgálatokat Jasco J-815 spektropolariméteren végeztük. A spektrumokat 200-350 illetve 200-400 nm tartományban rögzítettük 20 nm/perc sebességgel, 0.1 nm lépésközzel, 5x akkumulációval. Az oldószer desztillált víz volt. A komplexeket előzetesen átszitáltuk a megfelelő részecskeméret elérése érdekében, majd vízben oldottuk, lecentrifugáltuk és az oldat tisztáját mértük.

4.4.3. Izoflavonok és CD komplexeik vizsgálata biológiai tesztekben

4.4.3.1. Genisztein és daidzein / CD komplexek membránpermeabilitásának vizsgálata Caco-2 sejtvonalon

A sejteket 10 (v/v)% inaktivált főtális szarvasmarha szérumot, 1 (v/v)% nem esszenciális aminosavat és 100 mg/ml gentamicint tartalmazó DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Sigma-Aldrich, Magyarország) tenyésztő folyadékban növesztettük 37°C-on, 5% CO₂ atmoszférában, 95% páratartalom mellett. A transzport vizsgálathoz a sejteket az inzertre helyeztük. Az inzerteken a médiumot 2 naponta cseréltük. A kiültetés utáni 20-35 nap között váltak alkalmassá a transzport kísérletekre, mikor a Caco-2 sejtek stabil monolayert alkottak. A monolayer kialakulását transzepitheliális elektromos ellenállás (TEER) méréssel követtük nyomon. A transzport vizsgálatokat akkor végeztük, mikor a TEER értékek 1500-2000 $\Omega \times \text{cm}^2$ között voltak. A transzport vizsgálatok során a monolayer integritásának ellenőrzése céljából a mintavételek után szintén elvégeztük a TEER mérést. A vizsgálatok előtt az inzerteket HBSS oldatban mostuk és inkubáltuk 37°C-on 30 percig. Az apikális kamrából a bazolaterális kamrába irányuló (A-B)

permeabilitási vizsgálat során az apikális kamra tartalmazta a donor oldatot. A donor oldatok HBSS-ben oldott, a daidzein, genisztein, illetve CD komplexeik maximális oldékonysága szerint készített oldatok voltak. A bazolaterális kamra tartalmazta az akceptor oldatot, tiszta HBSS oldatot. A mintákat a bazolaterális kamrából vettük 30 perces időközönként a 120. percig. A kivett térfogatokat tiszta HBSS oldattal pótoltuk, melyet a további számítások során figyelembe vettünk. Az átjutott anyagmennyiségekből a látszólagos permeabilitási koefficiens (P_{app}) értéket a következő képlet alapján számoltuk:

$$P_{app} = dQ/dt \times 1/(C_0 \times A)$$

ahol:

dQ/dt = időegység alatt átjutott Daidzein, Genistein ($\mu\text{g s}^{-1}$)

C_0 = A donor oldatok kezdő Daidzein, Genistein koncentrációja ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

A = effektív felszín (cm^2)

A vizsgálathoz az előzőekben leírt módon készített komplexeket használtuk fel, miután átszítáltuk a Ph. Hg. VII. szerinti VI. szitán. A genisztein és a daidzein kalibrációját 1-80 $\mu\text{g ml}^{-1}$ koncentrációtartományban végeztük 50%-os etanolban, hat különböző koncentrációértéknél, 3 párhuzamossal. A korrelációs koefficiens 0,9992, illetve 0,9998 volt az alkalmazott koncentrációtartományban. Az LOD érték ($S/N=3$) 4,7 és 4,5 ng ml^{-1} , az LOQ érték ($S/N=10$) pedig 13,7 és 14,1 ng ml^{-1} volt.

A bazolaterális oldalról vett minták izoflavon koncentrációjának meghatározását HPLC-UV készülékkel végeztük. A mérés Jasco típusú HPLC-DAD-UV készüléken történt; a használt oszlop 25 cm x 4,6 mm x 5 μm , az eluensek pedig metanol és 0,3% ecetsav voltak (**22-23. ábra**), az oszlophőmérséklet 25 °C volt. A gradiens program a következő volt: 0-9 percig 38-100%, 9-13 percig 100% izokratikus. A detektálás hullámhossza daidzein esetében 249 nm, a genisztein esetében 262 nm volt.

4.4.3.2. Genisztein / β -CD komplex *Caenorhabditis elegans* modellállat élettartamára gyakorolt hatásának vizsgálata

A kísérlet során embriókat izoláltunk ('szinkronizálás'), majd az azonos stádiumú (L4) lárvákat NGM (nematode growth medium) agar lemezre helyeztünk. Az agar lemezbe FDUR antimetabolitot (5-fluoro-2'-dezoziuridin) tettünk, mely anyag meggátolja a

sejtosztódást (a fiatal felnőttekben a testi sejtek ugyanis nem osztódnak, csupán csírasejtek keletkeznének), így az állatok sterilekké váltak (a fertilitás pedig nagymértékben befolyásolja az élettartamot – így ezt küszöböltük ki a FDUR- az agar lemezbe történő beadásával). Az agar lemez tartalmazta a vizsgálandó hatóanyagokat a lehető legnagyobb koncentrációban. A ciklodextrin komplexek és a hatóanyag esetén 500 mg komplexet és annak hatóanyagtartalmával azonos mennyiségű geniszteint diszpergáltunk/oldottunk fel 50 ml NGM oldatba, ebből ultrahangos homogenizálás, keverés után 10-10 ml került 1-1 NGM lemezbe. Az állatok ezen a hatóanyagokat tartalmazó táptalajon növekedtek, fejlődtek éltük kilencedik napjáig. A 9. nap után az állatokat új NGM agarra helyeztük, amelyekben már nem volt hatóanyag, sem a sejtosztódást gátló FDUR adalék. Ezen a normál táptalajon vizsgáltuk az élettartamukat, s az elhalásokat folyamatosan regisztráltuk, pontosan rögzítettük, melyik állat, életének hányadik napján pusztult el. Minden vizsgálati minta esetében 50-50 állat átlagából származtak az eredmények, melyek felhasználásával élethossz-görbéket rajzoltunk (**25. ábra**).

4.4.4. Izoflavonoidok extrakciója ciklodextrinekkal és analízisük

HPLC-MS-sel

A drogot előzetesen megdaráltuk, majd átszitáltuk a Ph. Hg. VII. szerinti VI. méretű szitán (~ 1200 μm). Ezután 25 ml desztillált vízzel, illetve 30%-os etanollal vontunk ki 1,5-1,5 g drogot ultrahangos rázógéppel, szobahőmérsékleten 75 percig. Ez volt az összehasonlító kivonat. A kivonószerbe (a vízbe és a 30 %-os etanolba) előzetesen beleoldottunk β -, γ -, HP- β - és RAMEB-CD-t, 0,01 M, 0,03 M, és 0,05 M-os töménységben. A kivonást szintén 75 percig végeztük. A kapott kivonatokat lecentrifugáltuk 7000 rpm-on, majd 0,45 μm pórusméretű membránszűrőn átszűrtük, s HPLC-MS-sel vizsgáltuk. A HP- β -CD szubsztitúciós foka (DS) 4,2 volt, a RAMEB-CD-é pedig ~12. A kivonó oldatokban a CD koncentrációkat úgy választottuk meg, hogy a leggyengébben oldódó β -CD-nel is még lehessen oldatot készíteni, s a kivonással várható izoflavonoid mennyiséggel molárisan összehasonlítható legyen. Mindazonáltal az alacsony oldékonyság miatt nem tudtunk mindhárom koncentrációlépcsőben számolni a β -CD-nel, ráadásul az etanol is csak egy határig képes növelni a feloldott β -CD mennyiségét (2,2% β -CD – 30%-os etanol)

[Chatjigakis és mtsai, 1992]. A szubsztituált CD-ek esetében nem volt probléma az oldékonysággal; mind vízben, mind 30%-os etanolban könnyedén feloldódnak.

Az izoflavonoidok minőségi és mennyiségi értékelését HPLC-MS-sel végeztük a fent említett Agilent 6410 Triple Quad LC/MS rendszeren Kromatográfiás oszlop: Hypersil Zorbax Eclipse, XDB-C18 5 μ m, 150 x 2.1 (150 mm / 3,2 mm / 5 μ m; Agilent, Santa Clara, CA, USA), az eluensek 0,3% ecetsav (A) és metanol (B) voltak. Gradiens program: 0. perc, 29%; 20. perc, 85%; 22. perc, 100%, 27. perc 100%; 32. perc, 29%. Oszlophőmérséklet: 25 °C, injektált mintamennyiség: 2 μ l, eluens áramlási sebesség: 0,25 mlmin⁻¹. Az MS kísérleti körülmények a következők voltak: porlasztó, 45 psi; szárítógáz áramlási sebesség, 9 Lmin⁻¹; szárítógáz hőmérséklet 350 °C; kapilláris feszültség 3500 V; fragmentor feszültség: 100 V; MS szkennelés m/z 100-tól 1500-ig történt. Megjegyzendő, hogy a gazda-vendég asszociátumok az electrospray során esetlegesen (ritkán) együtt maradhatnak a gázfázisban, detektálásuk azonban nehézkes és nem megbízható [Redenti és mtsai, 2005].

5. Eredmények

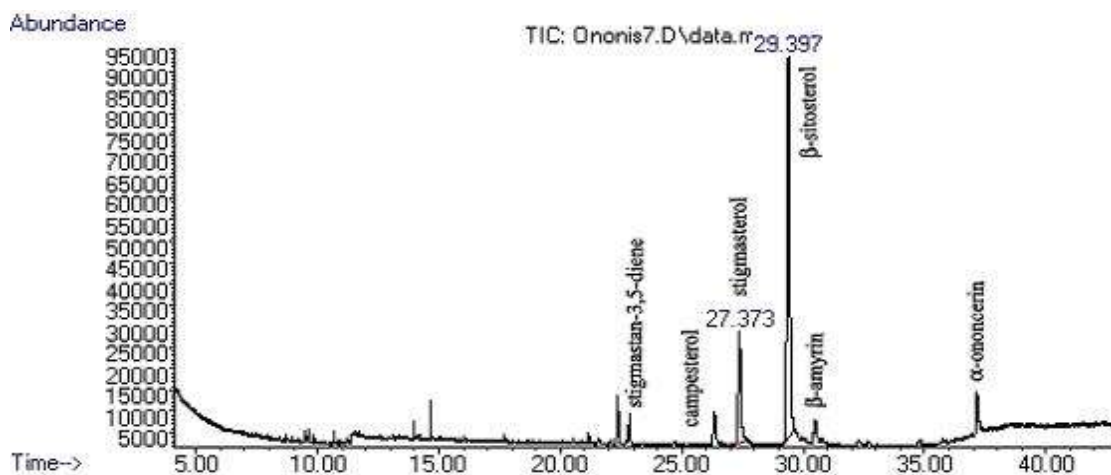
5.1. Triterpenoidok vizsgálata

5.1.1. Triterpenoidok azonosítása *Ononis spinosa* gyökér kivonatokban GC-MS módszerrel származékképzés nélkül

Az *Ononidis radix* kivonatok el nem szappanosítható frakcióiban származékképzés nélküli GC-MS az alábbi molekulaionokat találtuk: M^+414 , M^+412 , M^+400 , M^+397 , M^+426 , M^+443 (2. táblázat).

Az *Ononis spinosa* gyökér tisztított félüzemi SFE kivonatának totál ion kromatogramja a **13. ábrán**, az azonosított komponensek kémiai szerkezete a 2. ábrán látható. A **14. ábrán** jól láthatók a komponensek tömegspektrumai.

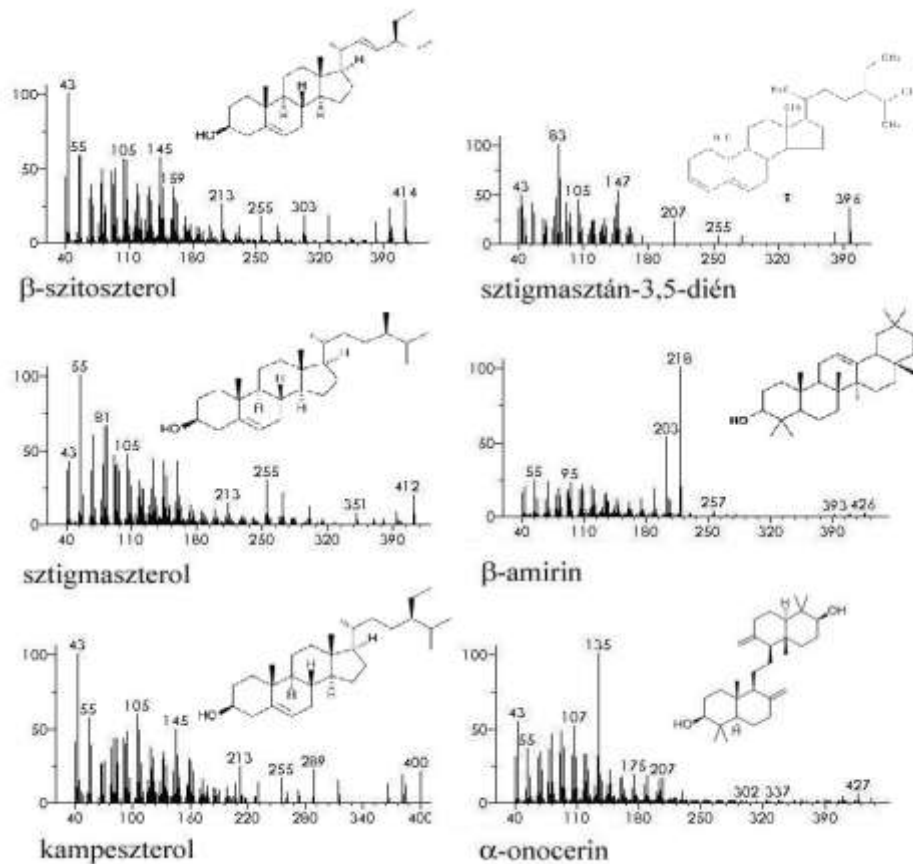
Találtunk egy ismeretlen komponenst is a TIC kromatogramon, melynek retenciós ideje 37,16 perc volt, a molekulatömege pedig megegyezett az α -onocerin-ével. Mivel az α -onocerin-t tisztán ki lehet nyerni a növényből mikroszublimációval, standard hiányában a növényből izoláltuk az α -onocerint, és VRK módszerrel [Wagner, 1996] vizsgáltuk.



13. ábra. A félüzemi SFE kivonat el nem szappanosítható részének total ion (TIC) kromatogramja

2. táblázat. A GC-MS-sel azonosított triterpenoid komponensek

t_R	komponens	M^+ (m/z)	Kovats-index
22,85	sztigmasztán-3,5-dién	397	3304
26,35	kampeszerol	400	3230
29,40	sztigmaszterol	412	3260
27,37	β -szitoszterol	414	3342
30,51	β -amirin	426	3318
37,16	α -onocerin	443	3521



14. ábra. A félüzemi SFE kivonat el nem szappanosítható részében azonosított triterpenoidok tömegspektruma

5.1.2. A különböző kivonási módszerek hatása a β -szitoszterol tartalomra, illetve a triterpenoid összetételre

Összehasonlítottuk a különböző oldószerrel készült kivonatok el nem szappanosítható anyag tartalmát és az elszappanosítással tisztított kivonatok β -szitoszterol tartalmát. A

különböző szerves oldószerekkel készült kivonatok nem szappanosítható frakcióinak mennyiségét vizsgálva a legnagyobb triterpén-hozamot a hexános kivonatban mértük. Ezt követte az izopropanolos, illetve az etilacetátos kivonat. A hexános utáni ismételt etanolos kivonással még szignifikáns mennyiségű anyagot sikerült kivonni. A metanolos kivonat el nem szappanosítható része volt a legalacsonyabb (3,05%). Az összes kivonat közül a triterpenoidokban relatíve leggazdagabbak a szuperkritikus kivonatok, ezen belül a 100 baron készült SFE extraktumok voltak (97,87% és 82,50%)

A kivonások hozama az alkoholos kivonatok esetében volt a legnagyobb. A legjobb hatásfoka az alacsonyabb nyomáson történt szuperkritikus kivonásnak volt, s azon belül is 60 perc volt a kedvezőbb.

A legnagyobb mennyiségű el nem szappanosított frakciók a szuperkritikus fluid extrakciókban voltak; a legnagyobb mennyiség a 100 baron 60 perces kivonatban volt. A félüzemi szuperkritikus kivonat triterpenoidhozama megközelítette a hexános kivonatót, de a legmagasabb hozamú analitikai kivonatnak alig harmadát érte el, míg a hexános kivonat hozama alig fele az 1-es SFE kivonatéknak (**3. táblázat**).

3. táblázat. Az *Ononis spinosa* gyökér kivonatok el nem szappanosítható részeinek aránya

Kivonat	kivonatok hozama (g/100 g száraztömeg)	kivonatok el nem szappanosítható részeinek aránya a kivonatra vonatkoztatva (%)
hexános kivonat (Soxhlet)	1,256	41.19
etanolos (hexán) kivonat (Soxhlet)	0,95	5.50
etilacetátos kivonat (Soxhlet)	5,506	11.00
izopropanolos kivonat (Soxhlet)	14,178	14.57
acetonos kivonat (kíméletes)	3,08	9.88
metanolos kivonat (kíméletes)	22,17	3.05
etanolos kivonat (kíméletes)	14,34	9.69
félüzemi SFE (1. frakció) 450 bar 40°C	0,49	31.30
analitikai SFE 1 100 bar 60 min 40°C	0,64	97.87
analitikai SFE 2 100 bar 90 min 40°C	2,90	82.50
analitikai SFE 3 200 bar 60 min 40°C	3,04	50.00
analitikai SFE 4 200 bar 90 min 40°C	4,19	36.94

A β -szitoszterol tartalmat illetően, összehasonlítva az egyes kivonatokból származó el nem szappanosított frakciókat, a β -szitoszterol tartalma a hexános és az SFE kivonatoknak volt a legmagasabb. A hexános kivonat 5,47%, az ismételt etanolos kivonat 0,39% β -szitoszterol-t tartalmazott. Az SFE kivonatok (SFE 1-6) 4,77-9,19% β -szitoszterol-t tartalmaztak. A különböző paramétereknek a szuperkritikus fluid extrakciókat vizsgálva azt találtuk, hogy a 4-es kivonatnak volt a legnagyobb a β -szitoszterol tartalma (9,05%;). Az 1-es és 2-es kivonat β -szitoszterol tartalma közel hasonló volt (5,25; 4,77%) (4. táblázat).

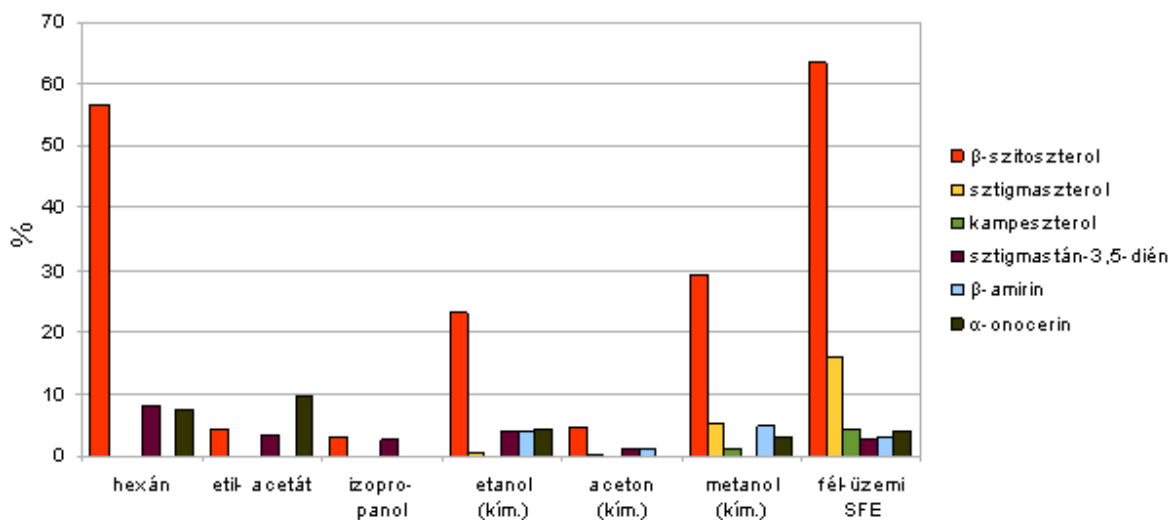
4. Táblázat. A különböző *Ononidis spinosae radix* kivonatok el nem szappanosítható részének β -szitoszterol tartalma, melyet GC-FID-del mértünk

minta	β-szitoszterol tartalom a kivonatokban (RSD %) g/100 g % (RSD %)
hexános kivonat (Soxhlet)	5,47 (1,69)
hexános utáni etanolos kivonat (Soxhlet)	0,39 (1,59)
etilacetátos kivonat (Soxhlet)	1,13 (1,93)
izopropanolos kivonat (Soxhlet)	0,19 (0,64)
acetonos kivonat (kíméletes)	1,51 (0,63)
metanolos kivonat (kíméletes)	0,22 (1,40)
etanolos kivonat (kíméletes)	0,28 (0,17)
félüzemi SFE (1. frakció) 450 bar 40°C	1,80 (0,54)
analitikai SFE 1 100 bar 60 min 40°C	9,05 (1,14)
analitikai SFE 2 100 bar 90 min 40°C	7,21 (1,20)
analitikai SFE 3 200 bar 60 min 40°C	5,25 (1,21)
analitikai SFE 4 200 bar 90 min 40°C	4,77 (1,73)

A β -szitoszterol tartalom meghatározásán kívül tanulmányoztuk a **triterpenoidok relatív koncentrációját** ugyanezekben a kivonatokban GC-FID mérések alapján. Ennek eredménye a **15. ábrán** található. Látható, hogy a β -szitoszterol százalékos aránya a hexános és a félüzemi SFE kivonatban volt a legnagyobb, ezt követik az etanolos és

metanolos kivonatok. A metanolos és a félüzemi SFE kivonat tartalmazott kampezsterolt, ellentétben a többi kivonattal. Az α -onocerin aránya az etilacetátos kivonatban volt a legnagyobb, sztigmatsterolt és β -amirint nem találtunk a hexános, etilacetátos és az izopropanolos kivonatokban. A sztigmatstán-3,5-dién valamennyi frakcióban megtalálható volt.

Megállapítottuk, hogy a félüzemi SFE a triterpenoidokra leginkább szelektív (93.3%) frakció, ezután következik a hexános frakció (71.8%).



15. ábra. Az *Ononis spinosae* radix különböző kivonataiban azonosított triterpenoidjainak aránya

5.2. Izoflavonoidok vizsgálata

5.2.1. Izoflavonoidok azonosítása HPLC-MS/MS-sel

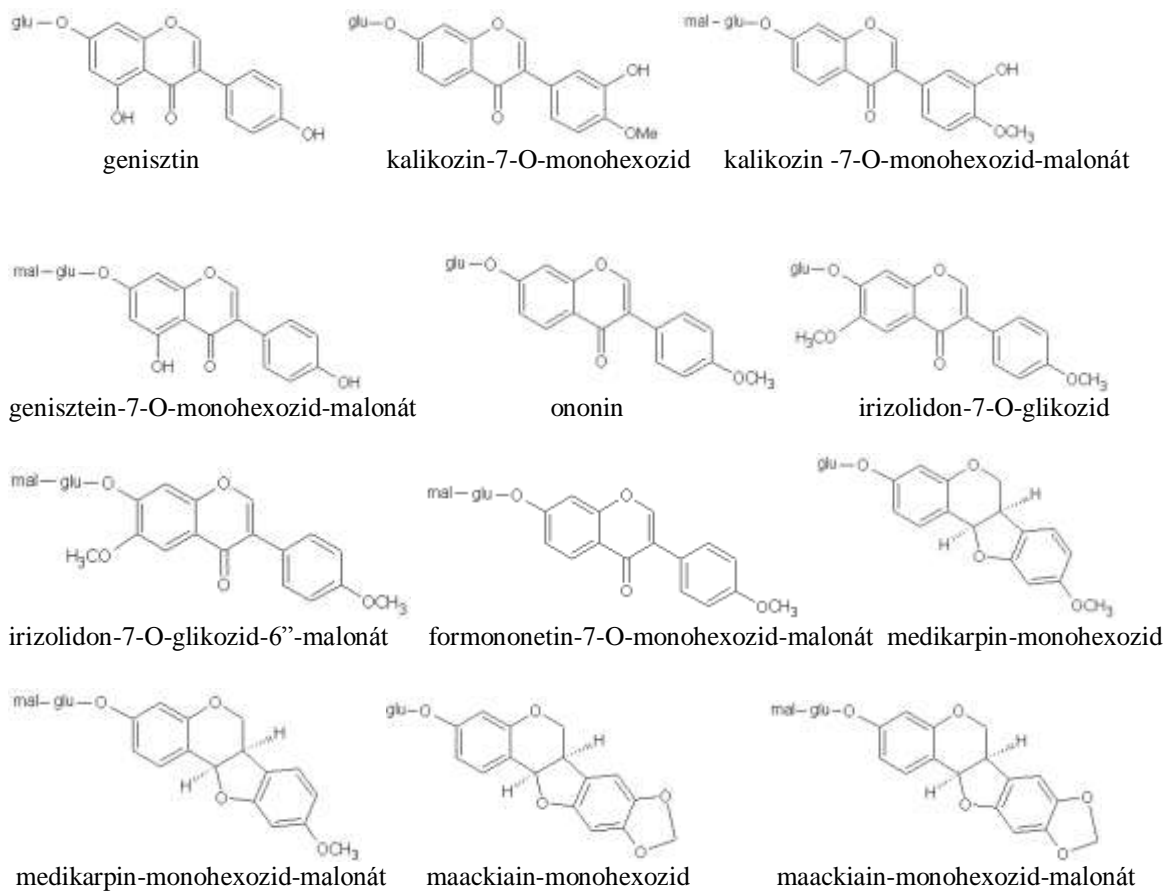
Az *Ononis spinosa* gyökeréből készült 30%-os etanolos és vizes kivonatokban az izoflavonoid komponenseket HPLC-MS/MS módszerrel határoztuk meg. Az izoflavonoidokban az O-glikozidok a 7-hidroxilcsoporton keresztül kapcsolódnak az izoflavon vázhoz. Az 30%-os etanolos kivonat ESI-MS spektruma számos molakulaiont eredményezett; ezek az izoflavonoid glikozidok az m/z 400-600 zónában foglalnak helyet. A tömegspektrumok komplexitását csökkentendő, a jellemzőbb, és vélhetően

izoflavonoidot takaró molekulaionokat tandem MS-sel vizsgáltuk majd a kapott produktionokat irodalmi adatok alapján analizáltuk. A komponenseket retenciós idejük, molekulaionjaik, produktionjaik és UV adataik alapján azonosítottuk, irodalmi adatokkal összevetve (**5. táblázat**).

A következő molekulaionokat $[M+H]^+$ detektáltuk: m/z 431, 433, 447, 473, 477, 517, 519, 533, 563. Mivel az ionizáció lágy volt, jelentősebb fragmentáció nem történt; a könnyebben lehasadó cukor- és észterező csoportok elvesztése figyelhető meg (malonil-, glikozil-, galaktozil-csoport). Az előforduló izoflavonoidok m/z értékei igen közel helyezkedtek egymáshoz, valamint több molekulaionnál 2-2 vegyület is szóba jöhetett. Az azonosított komponensek a **16. ábrán** láthatók.

5. táblázat. Az *Ononidis radix* 30%-os etanolos kivonatában azonosított komponensek HPLC-MS-sel, pozitív ion módban.

	t_R (mi)	komponens neve	$[M+H]^+$ (m/z)	$[M+Na]^+$ (m/z)	$[2M+Na]^+$ (m/z)	MS/MS adatok (m/z)	λ_{max} (nm)
1	3,71	genisztin	433	455		271, 433	
2	7,56	kalikozin-glikozid	447	469	915	285, 447	250, 260, 287
3	8,75	kalikozin-glikozid	447	469	915	285, 447	250, 260, 287
4	9,3	genisztein-7-O-glikozid-malonát	519			271, 519	265, 325
5	11,5	kalikozin-glikozid-malonát	533	555	1087	285, 533	250, 260, 287
6	12,95	formononetin-7-O-glikozid (ononin)	431	453	883	269, 431	252, 302
7	13,22	irizolidon-7-O-monohehexozid	477	499	975	315, 477	265, 332
8	13,81	formononetin-7-O-monohehexozid-malonát	517	539		269, 517	250, 300
9	14,6	maackiain-7-O-glikozid	447	469	915	285, 447	285, 308
10	14,91	irizolidon-7-O-monohehexozid-malonát	563	585	1147	315, 563	
11	15,29	formononetin-7-O-monohehexozid-malonát	517	539	1055	269, 517	250, 300
12	15,5	medicarpin-7-O-glikozid-malonát	519			271, 519	
13	15,9	maackiain-7-O-glikozid-malonát	533	555	1087	285, 533	285, 308
14	16,32	medicarpin-7-O-glikozid-malonát	519	541	1059	271, 519	230, 285



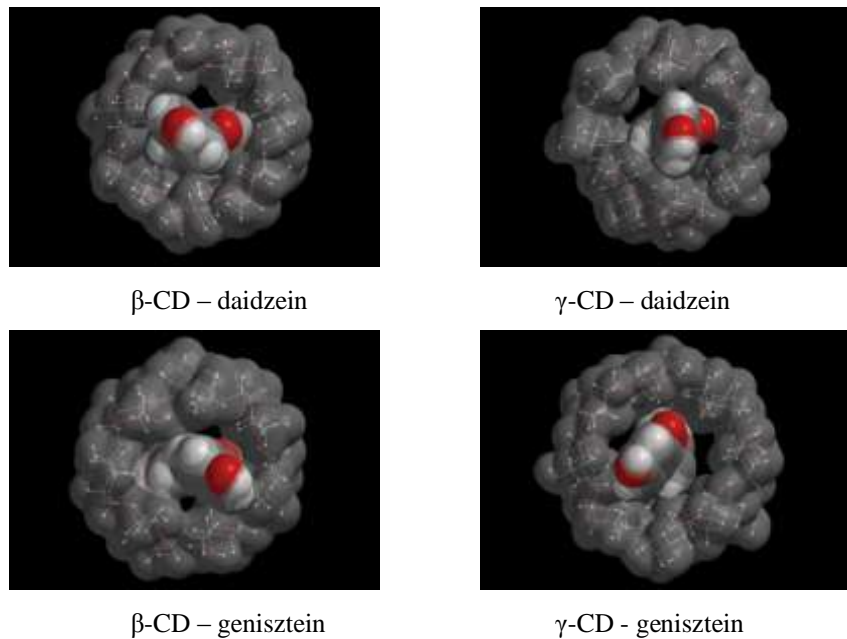
16. ábra. Az *Ononidos radix* azonosított izoflavonoidjainak szerkezete

5.2.2. Genisztein és daidzein ciklodextrin komplexeinek vizsgálata

5.2.2.1. Genisztein és daidzein molekula optimalizációja α -, β - és γ -CD-nel

Mind a CD, mind a vendégmolekulát külön optimalizáltuk PM3 szemi-empirikus módszerrel. Centroidnak mindkét CD esetében a cukoregységek alfa szénatomját definiáltuk. Az input komplexek szerkezetét a genisztein 4H-piran-4-on gyűrűjének ezen centroidokra való szuperpozíciójával és manuális kiegyenlítésével. A CD-ek és az üregbe

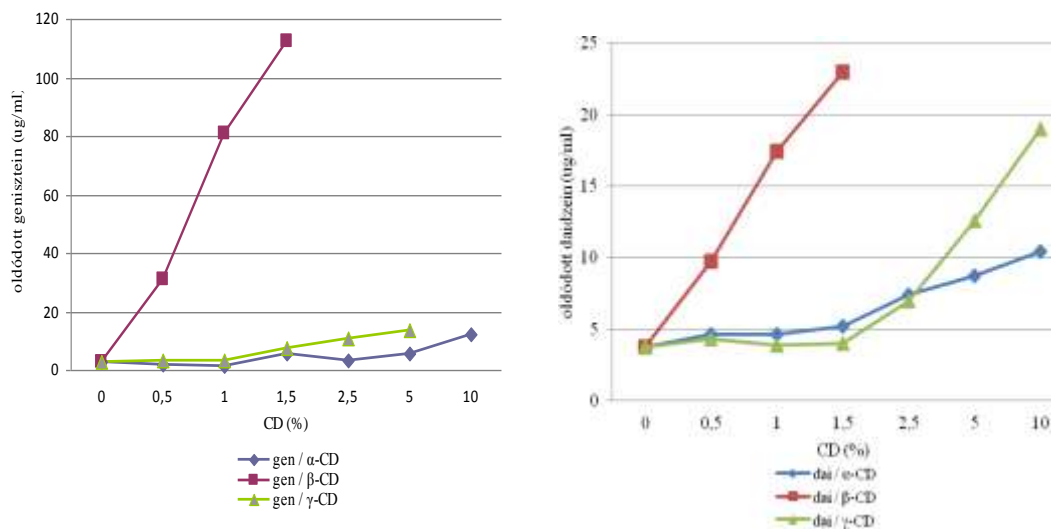
hatoló genisztein molekula együtt került optimalizálásra a PM3 szemi-empirikus módszerrel. (17. ábra).

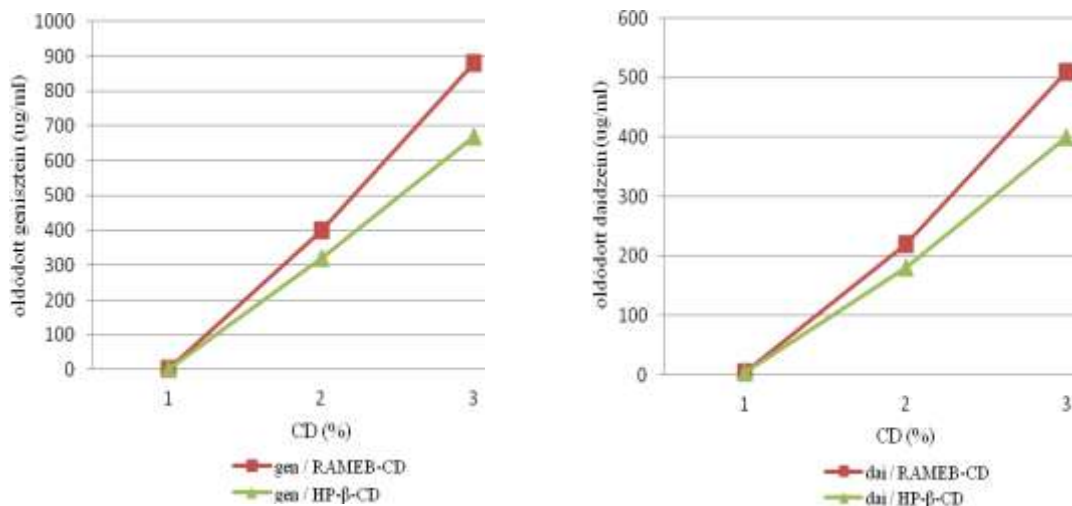


17. ábra. A daidzein és a genisztein molekulaoptimalizációja β - és γ -CD-nel

5.2.2.2. Genisztein és daidzein fázisoldékonysági vizsgálata

A genisztein és daidzein fázisoldékonysági diagramja emelkedő oldékonysági tendenciát mutat az alkalmazott 0-10%-os CD koncentráció tartományban (18-19. ábra) mind a négy CD esetében.

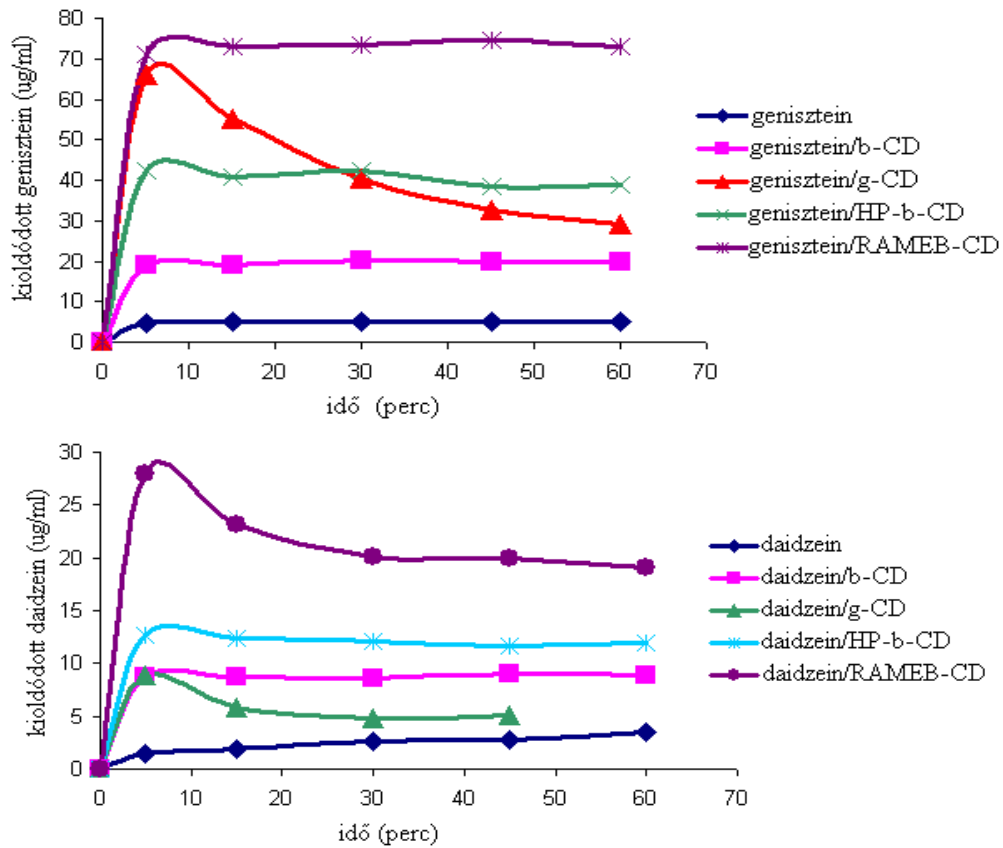


18. ábra. Genisztein és a daidzein fázisoldékonysági diagramja α -, β -, γ -CD-nel19. ábra. Genisztein és a daidzein fázisoldékonysági diagramja HP- β -D-nel és RAMEB-CD-nel

5.2.2.3. Genisztein és daidzein /CD komplexek kioldódási profilja

A 20. ábrán jól látható, hogy a nem szubsztituált natív ciklodextrinekkal képzett komplexek oldékonysága nagyobb a tiszta izoflavon oldékonyságához képest. A szubsztituált CD-k oldékonysága a fázisoldékonysági görbével összhangban rendkívüli módon megnövelte a genisztein vizes oldatba vitelét.

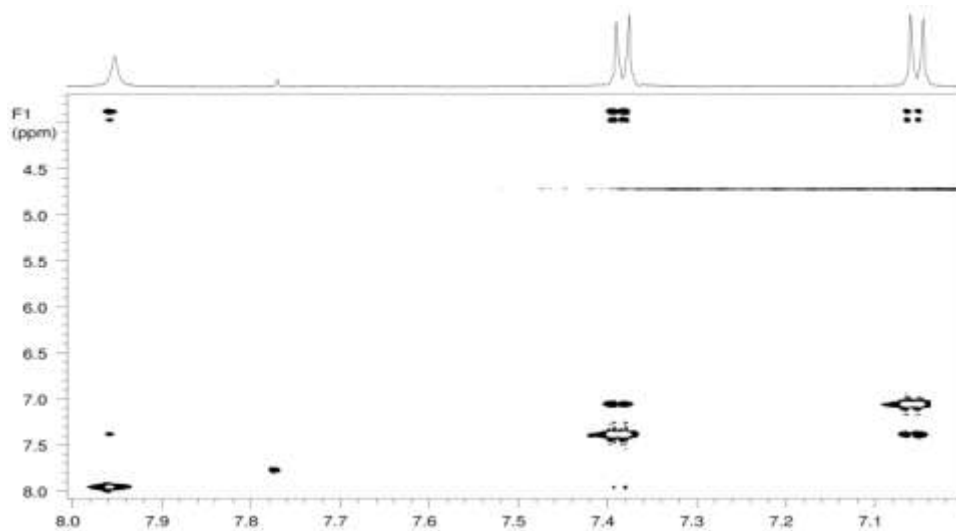
A genisztein komplexei közül magasan a legjobb kioldódása a RAMEB-CD komplexeinek volt; geniszteinnél közel 20-szorosára nőtt az oldékonyság, daidzeinnél körülbelül 6,5-szeresére. A β - és a γ -CD esetében közel hasonló kioldódást mértünk.



20. ábra. Genisztein és daidzein β -CD-nel, γ -CD-nel, HP- β -CD-nel és RAMEB-CD-nel képzett komplexeinek kioldódási profilja desztillált vízben, 37° C-on

5.2.2.4. Genisztein / β -CD komplex $^1\text{H-NMR}$ vizsgálatának eredménye

A spektrum kinagyított részlete (21. ábra) intramolekuláris keresztcsúcsot mutat a 4-hidroxifenil molekularészlet aromás dublettjei között. A 7.39 ppm-nél található protonok gyenge keresztcsúcsa a B gyűrű szingulettjével egyértelműen meghatározza, hogy a 7.39-es protonok a meta, így a 7.09-es protonok az orto pozícióhoz rendelhetőek. A zárványkomplex szempontjából fontos intermolekuláris keresztcsúcsok a 4-hidroxifenil molekularészlet dublettjei és a ciklodextrin üregében található H-5 és H-3 protonok között detektálhatók.

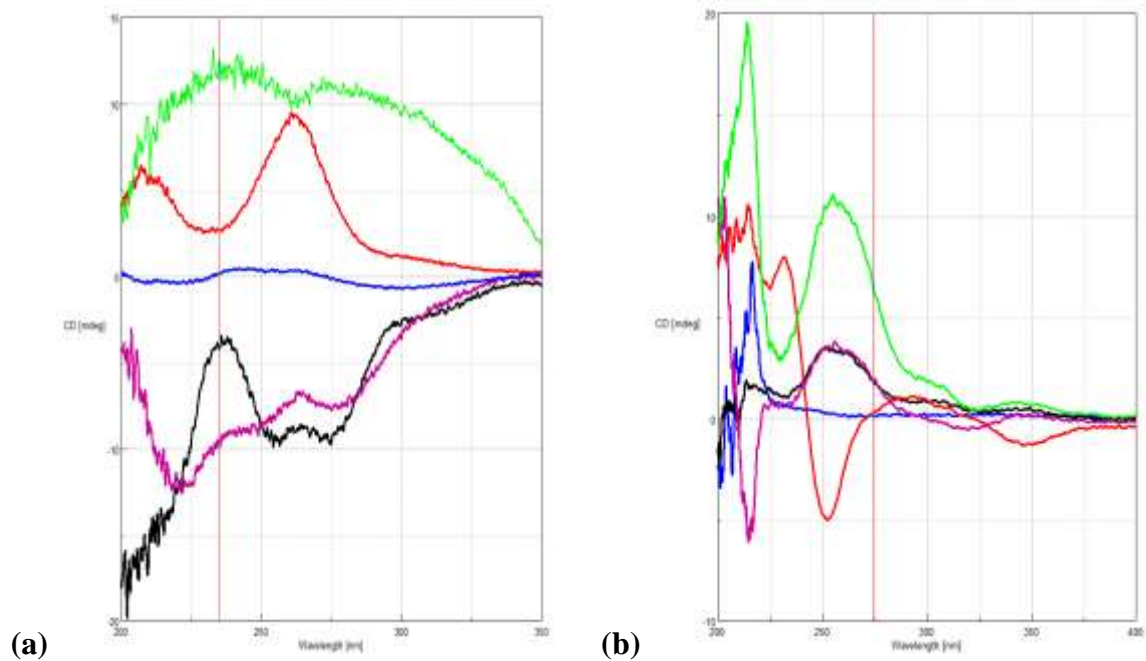


21. ábra. A genisztein/ β -CD 2D ROESY spektruma

5.2.2.5. Genisztein és daidzein / CD komplexek cirkulár dikroizmus (CD_i) spektroszkópia vizsgálatának eredményei

A genisztein, mint akirális molekula nem rendelkezik CD spektrummal. Ez nyilvánul meg a kék spektrumban. Amennyiben a kromofór csoport királis környezetbe kerül, úgy királisan perturbálttá válik és megjelenik egy indukált CD spektrum (ICD). Ez az effektus a ciklodextrinek esetén nagyon előnyösen alkalmazható a komplexképződés kialakulásának követésére. Bár a natív ciklodextrinek önmagukban királis molekulák, de megfelelő kromofór hiányában nincs CD spektrumuk. Így a komplexálódás során kialakuló ICD spektrum egyértelműen a komplex keletkezésének bizonyítéka.

Az UV és CD spektrumokon látszik a megegyező csúcs 262,5 illetve 250 nm-nél, a genisztein és a daidzein elnyelési maximumánál (22. ábra).



22. ábra. A genisztein és a daidzein β -CD, γ -CD, HP- β -CD és RAMEB-CD komplexekének indukált CD spektruma

(a; **kék**: genisztein; **fekete**: genisztein/ β -CD; **ciklámen**: genisztein/HP- β -CD; **piros**: genisztein/ γ -CD; **zöld**: genisztein/RAMEB-CD; b; **kék**: daidzein; **fekete**: daidzein/ β -CD; **ciklámen**: daidzein/ HP- β -CD; **piros**: daidzein/ γ -CD; **zöld**: daidzein + RAMEB-CD)

A keletkező ICD spektrum intenzitása a komplex stabilitására jellemző, míg az ICD spektrum előjele szerkezeti információt hordoz. Kvantumkémiai számításokkal igazolható, hogy a kromofór orientációja a ciklodextrin üregében összefüggésbe hozható a CD spektrum előjelével (pozitív vagy negatív Cotton-hatás görbe).

A genisztein esetében a β -CD és HP- β -CD negatív előjelű ICD sávokat eredményezett, bár ezek lefutása és strukturáltsága eltérő mintázatot mutat; míg a γ -CD esetén pozitív előjelű a görbe. A random metilált β -CD esetén kapott spektrum (zöld) nem értelmezhető. Feltehetően a koloidális méretű részecskék fényszóródása miatt. A mérés során a minta vizuálisan is észlelhető módon enyhén opálos volt.

A daidzein spektrumainál a pirossal jelölt β -CD esetében nagyon gyenge a 350 nm körüli sáv, kicsit erősebb a 300 nm körüli, míg 251-nél található a legintenzívebb. Ehhez képest a HP- β -CD esetén kb. 325 nm-nél negatív sáv jelenik meg, míg 250 körül a β -CD analóg intenzitású és előjelű pozitív sáv.

A többtől leginkább eltérő CD spektrum a γ -ciklodextrin esetében tapasztalható. A 350 és 250 nm körüli negatív sávok különböznek β -ciklodextrinek esetén tapasztaltaknál. Az indukált CD sávok előjelének a változása általában az aromás rendszer más irányú orientációjának eredményeként fordul elő. Az RAMEB-CD esetén a legnagyobb intenzitású a CD-jel (az UV is ennél mutatja a legnagyobb változást a telített daidzein spektrumához képest), szerkezete viszont alapvetően a β -CD spektrumára hasonlít. A daidzein esetén a random metilált β -CD-nel is intenzív, jól mérhető sáv jelenik meg.

5.2.3. Izoflavonok és CD komplexeik vizsgálata biológiai tesztekben

5.2.3.1. Genisztein és daidzein / CD komplexek membránpermeabilitásának vizsgálata Caco-2 sejtvonalon

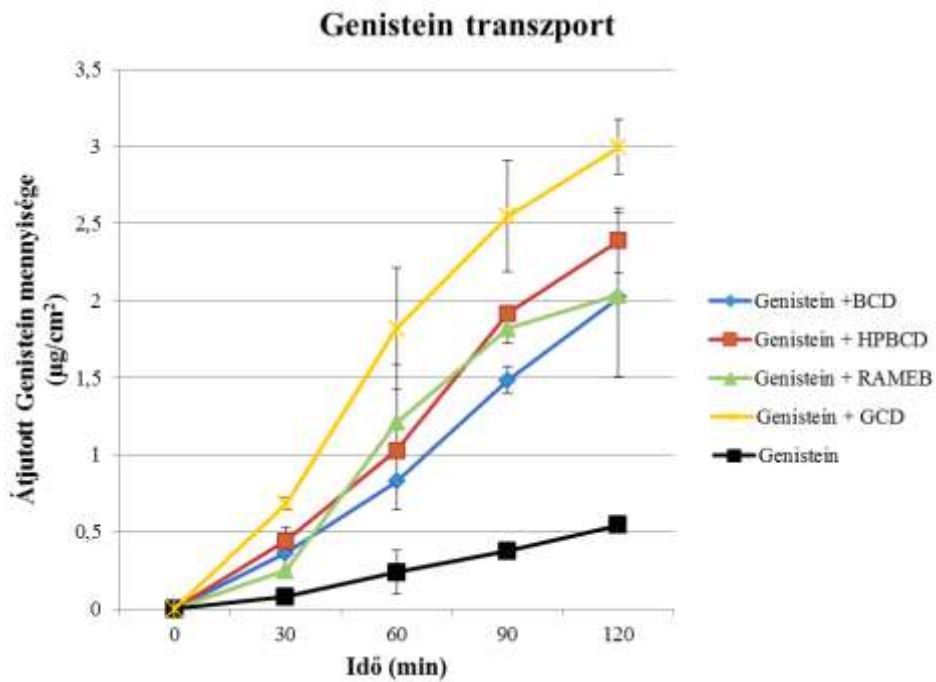
A **6. táblázatban** láthatók a **genisztein** és a genisztein CD komplexeinek látszólagos permeabilitási koefficiens értékei. Ezekne sorrendje a következő a különböző genisztein komplexeknél: genisztein/ γ -CD > genisztein/ β -CD, genisztein/HP- β -CD > genisztein/RAMEB-CD. Mivel eltérő genisztein koncentrációjúak voltak a kiindulási oldatok (a maximális oldékonyságnak megfelelően), eltérő mennyiségű genisztein transzportálódott. A genisztein önmagában csaknem egy nagyságrenddel kisebb sebességgel jutott át a membránon, mint a komplexált forma. A genisztein és a genisztein/CD komplexek felületegységre jutó membrántranszportja a **23. ábrán** látható.

6. táblázat. A genisztein számolt látszólagos permeabilitási koefficiens értékei

vizsgált anyagok	érték \pm SD (cm/s $\times 10^{-5}$)
Genisztein	0,17 \pm 0,01
Genisztein/ β -CD	1,71 \pm 0,37
Genisztein/HP- β -CD	1,71 \pm 0,35
Genisztein/RAMEB-CD	0,65 \pm 0,17
Genisztein / γ -CD	2,85 \pm 0,17

7. táblázat. A monolayeren átjutott genisztein mennyiség \pm SD egységnyi felületre számolva ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

Idő (perc)	Genisztein	Genisztein/ β -CD	Genisztein/ HP- β -CD	Genisztein/ RAMEB-CD	Genisztein/ γ -CD
0	0	0	0	0	0
30	0,081 \pm 0,043	0,362 \pm 0,120	0,443 \pm 0,092	0,251 \pm 0,012	0,683 \pm 0,041
60	0,238 \pm 0,143	0,826 \pm 0,184	1,030 \pm 0,032	1,208 \pm 0,380	1,817 \pm 0,397
90	0,376 \pm 0,035	1,482 \pm 0,089	1,917 \pm 0,046	1,817 \pm 0,090	2,548 \pm 0,364
120	0,545 \pm 0,036	2,021 \pm 0,003	2,388 \pm 0,210	2,037 \pm 0,532	2,996 \pm 0,179



23. ábra. A genisztein és β -, γ -, HP- β -, illetve RAMEB-CD-vel képzett komplexeinek transzportja Caco-2 monolayeren keresztül

A daidzein és komplexeinek esetében a következő sorrend alakult ki a membránpermeabilitási koefficienseknél: daidzein/ γ -CD > daidzein/HP- β -CD > daidzein/RAMEB-CD > daidzein/ β -CD.

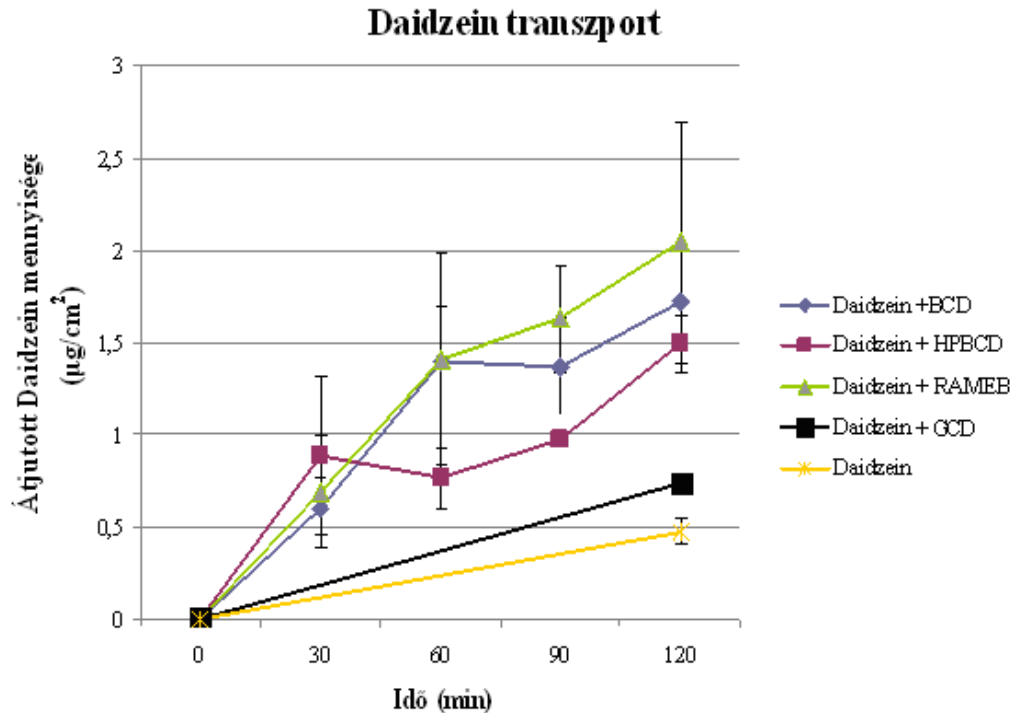
8. táblázat. A daidzein számolt látszólagos permeabilitási koefficiens értékei

	érték \pm SD (cm/s $\times 10^{-5}$)
Daidzein	1,19 \pm 0,19
Daidzein/ β -CD	3,14 \pm 0,41
Daidzein/HP- β -CD	2,17 \pm 0,91
Daidzein/RAMEB-CD	2,43 \pm 0,73
Daidzein/ γ -CD	1,62 \pm 0,13

9. táblázat A monolayeren átjutott daidzein mennyiség \pm SD egységnyi felületre számolva ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

Idő (perc)	Daidzein	Daidzein/ β -CD	Daidzein/HP- β -CD	Daidzein/RAMEB-CD	Daidzein/ γ -CD
0	0	0	0	0	0
30	----	0,597 \pm 0,172	0,887 \pm 0,429	0,687 \pm 0,303	----
60	----	1,396 \pm 0,294	0,763 \pm 0,160	1,410 \pm 0,573	----
90	----	1,370 \pm 0,262	0,977 \pm 0,164	1,628 \pm 0,294	----
120	0,477 \pm 0,076	1,719 \pm 0,274	1,492 \pm 0,155	2,042 \pm 0,651	0,734 \pm 0,059

Mivel eltérő daidzein koncentrációjúak voltak a kiindulási oldatok (a maximális oldékonyságnak megfelelően), eltérő mennyiségű daidzein transzportálódott. Ennek megfelelően abból a kiindulási oldatból, amelyben több daidzein volt, több transzportálódott. (24. ábra).

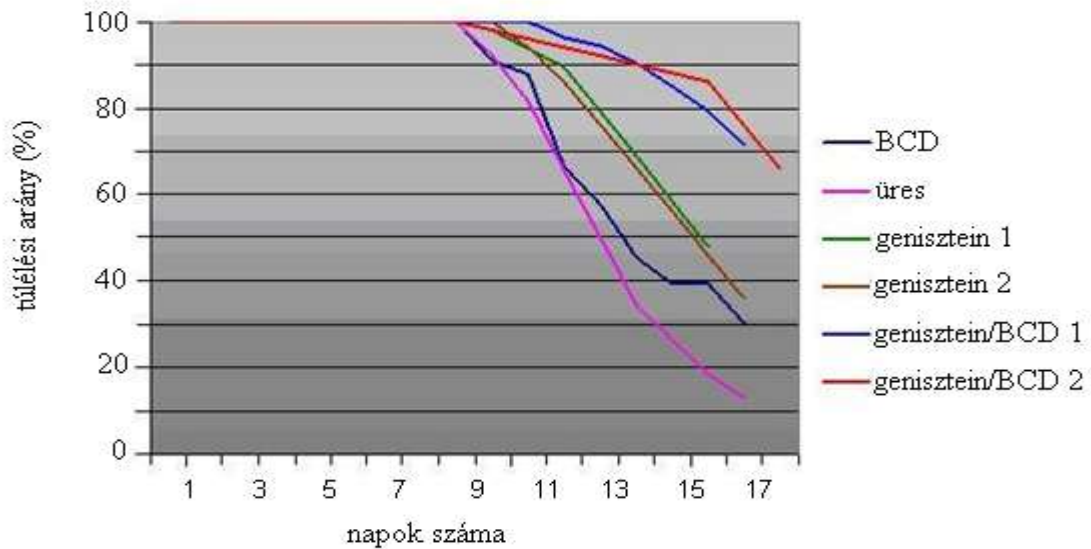


24. ábra. A daidzein és β -, γ -, HP- β -, illetve RAMEB-CD-vel képzett komplexeinek transzportja Caco-2 monolayeren keresztül

5.2.3.2. Genisztein β -CD-nel képzett komplexeinek élettartam növelő hatása *Caenorhabditis elegans*

Az élethossz görbéken az élő egyedek százalékos aránya az idő függvényében (**25. ábra**).

A 10. napon számolt egyedek 95 illetve 96%-a élt a genisztein tartalmú táptalajok esetében, a genisztein/ β -CD-nél 97-100%-uk volt életben; ez már itt szignifikáns az üres, illetve β -CD-es táptalajok 88 és 86%-ával szemben. A 14. az üres táptalajt fogyasztó állatoknak 30%-a, a β -CD-tartalmút fogyasztóak 43%-a volt életben, míg a geniszteines táptalaj esetében ez az érték 61 és 65%, a β -CD-nel komplexált geniszteinnél pedig 86 és 89 % volt. A 15. napon a túlélési arányok 22 és 39%, 51 és 54%, illetve 82 és 87% voltak az üres, a β -CD-tartalmú, a genisztein tartalmú és a genisztein/ β -CD komplex tartalmú táptalajok esetében.



25. ábra. Szabad és β -CD-nel komplexált genisztein hatása *C. elegans* egyedek élettartamára (n=50; genisztein cc. 20 mg/táptalaj)

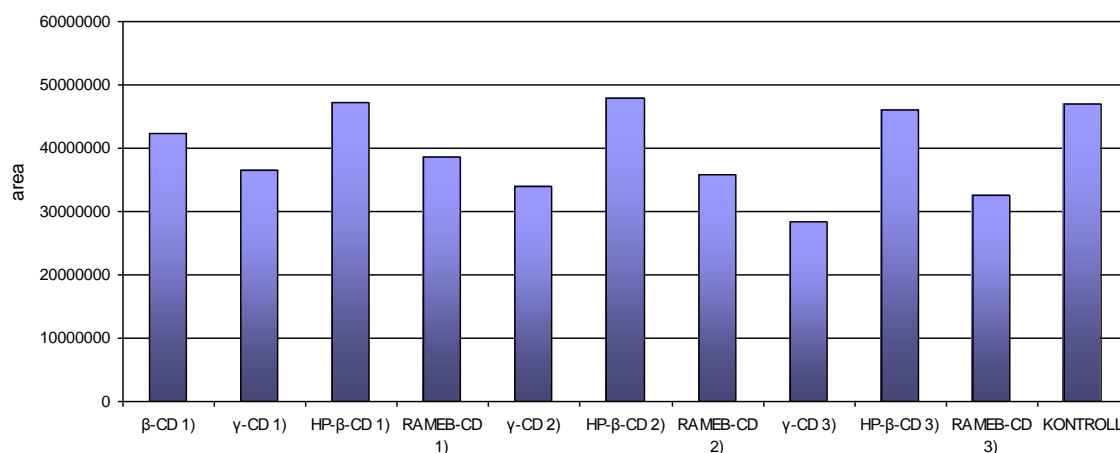
5.2.4. Izoflavonoidok minőségi és mennyiségi jellemzése *Ononis spinosa* gyökérből hagyományos módon és ciklodextrinekkal készült kivonataiban

5.2.4.1. Az izoflavonoidok eloszlása a különböző 30%-os etanolos - CD-es kivonatokban

A **26. ábrán** jól látható, hogy a legnagyobb össz-izoflavon terület eloszlása a HP- β -CD-es kivonatoknak van, s a legkisebb a γ -CD-es kivonatok esetében. A kontrollhoz (30%-os etanolos kivonat) hasonlítva a CD-es kivonatokot, az látszik, hogy még a γ -CD-nél is jobb a hagyományos kivonás hatékonysága (27-40%-kal). Mivel a β -CD vízoldékonysága elég alacsony, s ez etanollal csak bizonyos szintig emelhető (2,2%; 30% etanol) [Chatjigakis, 1992], a másik két magasabb koncentrációban már nem oldódott föl, ezért a következő lépcsőkben nem tudtuk vizsgálni a kivonásra gyakorolt hatását. 0,01 M CD koncentráció

esetén mintegy 10-kal volt rosszabb a kivonás hatásfoka a kontrollénál. A RAMEB-CD esetén az eltérések 31-18% között voltak a kontroll kivonat hatásfokától.

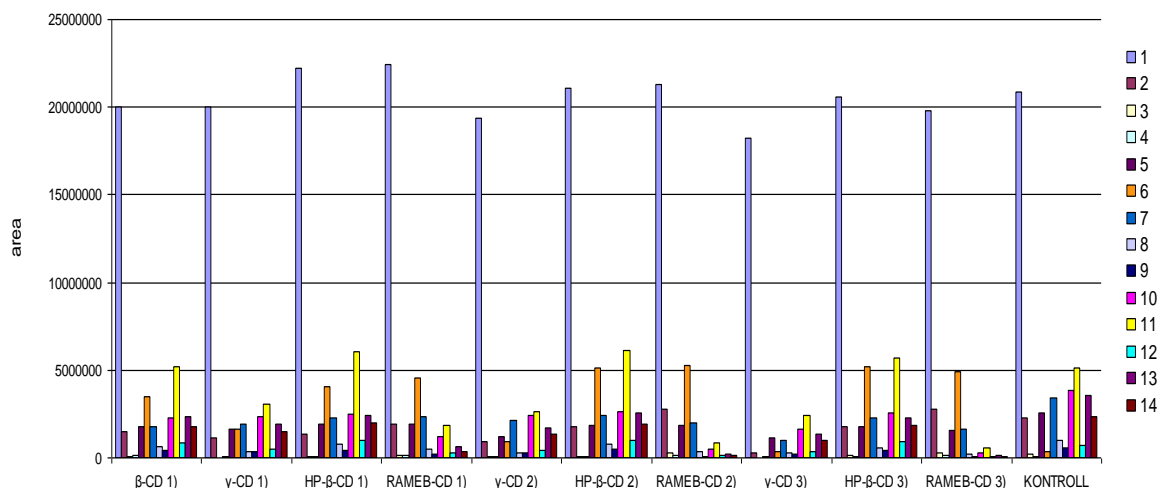
A kivonás során a CD-ek a HP- β -CD > β -CD > RAMEB-CD > γ -CD sorrendben segítették az izoflavonoidok kinyerését az *Ononis spinosa* gyökér drogból. Mindazonáltal a kontroll kivonat izoflavonoid-hozama még így is elég magas volt, így csupán a HP- β -CD tartalmú kivonatok izoflavonoid tartalma volt a kontrollhoz mérhető (2-4 % eltérés).



26. ábra. Kivont azonosított össz-izoflavonoid eloszlás a különböző ciklodextrineket háromféle koncentrációban tartalmazó 30%-os etanolos kivonatokban.

(1 - 0,01 M CD; 2 - 0,03 M CD; 3 - 0,05 M CD)

A **27. ábrán** az egyes kivonatokban található általunk azonosított izoflavonoidok eloszlása látható.



27. ábra. Az egyes azonosított izoflavonoidok eloszlása a különböző ciklodextrineket háromféle koncentrációban tartalmazó 30%-os etanolos kivonatokban

(1 - 0,01 M CD; 2 - 0,03 M CD; 3 - 0,05 M CD;

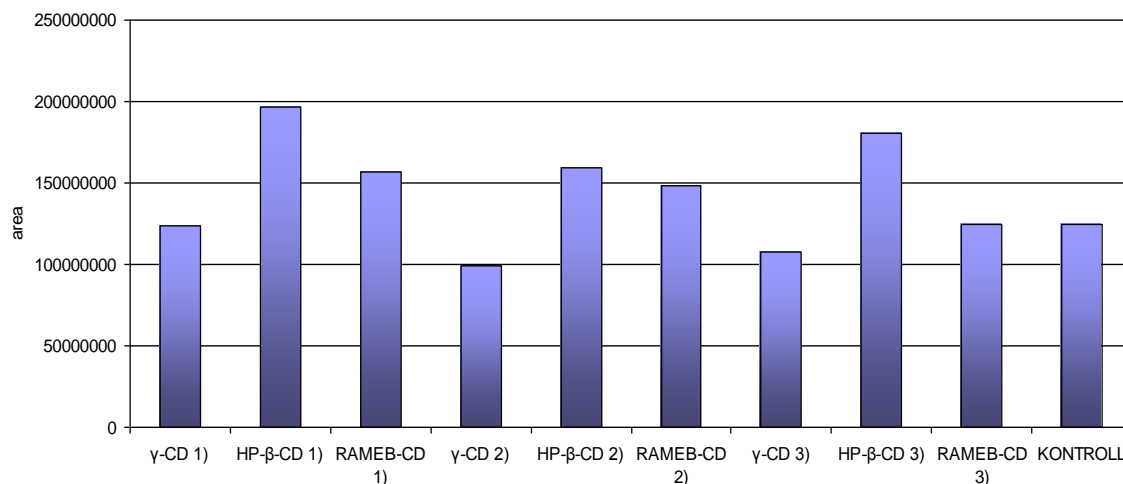
1 - genisztin; 2 - kalikozin –O-glikozid, 3 - kalikozin-glikozid, 4 - genisztein-7-O-glikozid-6"-malonát, 5 – kalikozin-glikozid, 6 – ononin, 7,- irizolidon-7-O-glikozid, 8 - formononetin-7-O-monohekozid -malonát, 9 – maackiain-7-O-glikozid , 10 - irizolidon-7-O-glikozid-6"-malonát, 11 - formononetin-7-O-monohekozid-malonát, 12 - medikarpin-7-O-glikozid-6"-malonát, 13 - maackiain-7-O-glikozid-6"-malonát, 14 - medikarpin- 7-O-glikozid-6"-malonát)

Az alkalmazott ciklodextrineket oldékonyságuk, illetve a korábban megmért kioldódás szerinti sorrendben ábrázoltuk az oszlopdigramokon. A **27. ábrán** az látható, hogy a legnagyobb mértékben a HP- β -CD fokozta az izoflavonoidok kivonását. A legnagyobb mennyiségben a genisztint lehetett kinyerni; itt a HP- β - és a RAMEB-CD volt a leghatékonyabb. A CD nélküli kontroll kivonatban az irizolidon-7-O-glikozid-6"-malonát, a formononetin-7-O-monohekozid-6"-malonát, a maackiain-7-O-glikozid és a medikarpin-7-O-glikozid malonátjainak mennyisége némileg meghaladta a többi kivonatban találtakét.

5.2.4.2. Az izoflavonoidok eloszlása a vizes CD-es kivonatokban

Az etanol nélküli vizes kivonatokban azt láthatjuk, hogy a γ -CD kivételével a többi CD tartalmú kivonatban magasabb az izoflavonoidok mennyisége, mint a kontrollnál. Jól

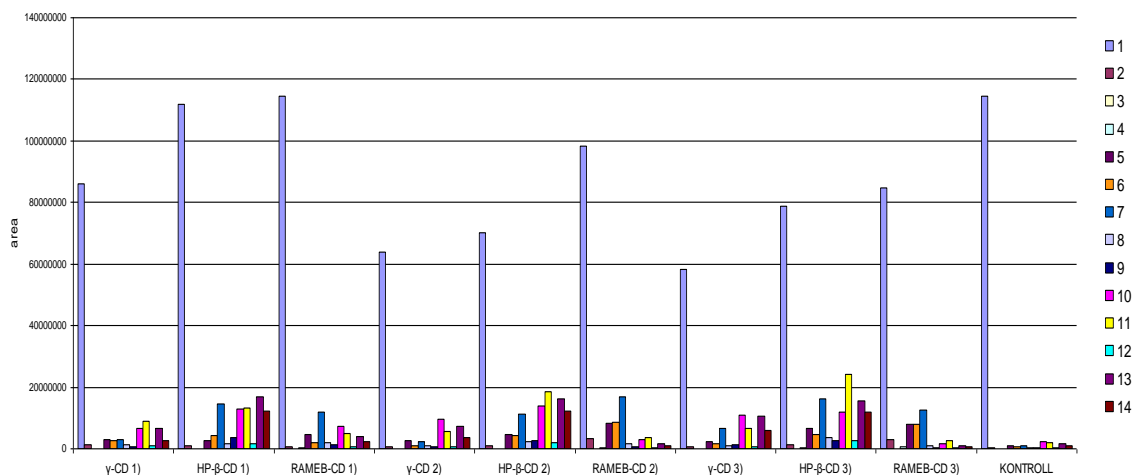
látszik a diagramon, hogy a legnagyobb izoflavonoid tartalmat a 0,01 M-os és a 0,03 M-os CD-oldatokkal kaptuk (28. ábra).



28. ábra. Kivont azonosított össz-izoflavonoidok eloszlása a különböző ciklodextrineket háromféle koncentrációban tartalmazó vizes kivonatokban.

(1: 0,01 M CD; 2: 0,03 M CD; 3: 0,05 M CD)

A CD-ek a következő sorrendben segítették az izoflavonoidok kinyerését: γ -CD < RAMEB-CD < HP- β -CD. A γ -CD hatékonysága 0,01 M-nál volt a legnagyobb, 0,03 és 0,05 M-nál valamivel kisebb, viszont nem érte el a kontrollt. A HP- β -CD esetében 54-27% között mozgott a különbség a CD-tartalmú kivonatok és a kontroll között, míg a RAMEB-CD esetében ez az eltérés 25-18% volt.



29. ábra. Az egyes azonosított izoflavonoidok relatív megoszlása a különböző ciklodextrinek háromféle koncentrációban tartalmazó vizes kivonatokban.

(1: 0,01 M CD; 2: 0,03 M CD; 3: 0,05 M CD;

1- genisztin; 2 - kalikozin –O-glikozid, 3 - kalikozin-glikozid, 4 - genisztein-7-O-glikozid-malonát, 5 – kalikozin-glikozid, 6 – ononin, 7,- irizolidon-7-O-glikozid, 8 - formononetin-7-O-monohekszid-malonát, 9 – maackiain-7-O-monohekszid , 10 - irizolidon-7-O-glikozid-6''-malonát, 11 - formononetin-7-O-monohekszid-malonát, 12 - medikarpin-7-O-glikozid-6''-malonát, 14 - medikarpin- 7-O-glikozid-malonát)

A **29. ábra** mutatja az egyes komponensek eloszlását. A CD koncentrációval emelkedő mennyiségű komponensek pl. a formononetin-glikozid, a maackiain-glikozid-malonát, ononin; csökkenő mennyiségben előforduló vegyületek volt a genisztin (mint fő komponens a spektrumban), kalikozin-7-O-glikozid és a kalikozin-7-O-glikozid malonátja. ononin a RAMEB-CD koncentrációemelkedésével növekvő mennyiségben jelennek meg. A formononetin-7-O-monohekszid 2 malonátja és az irizolidon-7-O-glikozid főleg a HP-β-CD és kevésbé a RAMEB-CD tartalmú kivonatokban látható. Az irizolidon-glikozid malonil származéka főleg a γ-CD és a HP-β-CD tartalmú kivonatokban jelent meg. A medikarpin-7-O-glikozid malonil származékát a HP-β-CD tartalmú kivonatok tartalmazták nagyobb mennyiségben.

6. Megbeszélés

6.1. Triterpenoidok vizsgálata

6.1.1. Triterpenoidok azonosítása *Ononis spinosa* gyökér kivonatokban GC-MS módszerrel származékképzés nélkül

Az *Ononidis radix* kivonatok el nem szappanosítható frakcióiban származékképzés nélküli GC-MS módszerrel a β -szitoszterol (M^+414), sztigmaszterol (M^+412), kampeszterol (M^+400), sztigmasztán-3,5-dién (M^+397) szterol komponenseket, a triterpénszármazék β -amirint (M^+426) és a speciális szeko-triterpén α -onocerint (M^+443) azonosítottuk (**2. táblázat**). Az elszappanosítási eljárás során, feltehetően a glikozidok és észterek elhidrolizáltak, így a terpénalkoholokat szabad formában tudtuk azonosítani.

Az egyes azonosított komponensekre számolt Kováts indexek rendre 3304; 3230; 3260; 3342 és 3318 a sztigmasztán-3,5-dién, kampeszterol, sztigmaszterol, β -szitoszterol és β -amirin esetében; ezek jó egyezést mutatnak korábbi irodalmi adatokkal, hasonlóan a retenciós adatokhoz (22,85; 26,35; 27,37; 29,40; 30,51 perc sztigmasztán-3,5-dién, kampeszterol, sztigmaszterol, β -szitoszterol és β -amirin).

A gyökérből nyert mikroszublimáció GC-MS spektrumát az ismeretlen komponens kromatogramjával és tömegspektrumával összevetve jó egyezést találtunk, így a kérdéses komponens valóban α -onocerin; egy szekotriterpén származék.

6.1.2. A különböző kivonási módszerek hatása a β -szitoszterol tartalomra, illetve a triterpenoid összetételre

A különböző szerves oldószerek polaritásának megfelelően nagyjából a várt sorrend alakult az el nem szappanosítható frakció mennyiségét illetően, vagyis a legnagyobb triterpén-hozamot a hexános kivonatban mértük, majd ezután következett az izopropanolos, illetve az etilacetátos kivonat. A hexános utáni ismételt etanolos kivonással kinyert szignifikáns mennyiségű anyag arra utalhat, hogy a szterolok kémiaiilag kötött

formában is előfordultak a növényben. A metanolos kivonat kevés el nem szappanosítható részét a kivonás alacsony szelektivitása indokolja; a metanol a hexánhoz és a szuperkritikus CO₂-hoz viszonyítva lényegesen polárisabb, így több poláris anyagot old ki, ami a tisztítás során eliminálódik. Az összes kivonat közül a triterpenoidokban relatíve leggazdagabb kivonatok a szuperkritikus, ezen belül a 100 baron készült SFE extraktumok voltak

Az alkoholos kivonások magas hozamuk ellenére kevésbé szelektívek; a triterpenoidokra pedig gyakorlatilag alig. A legjobb hatásfoka a 100 baron történt szuperkritikus kivonásnak volt, s azon belül is a rövidebb idő kedvezett a triterpenoidok kinyerésének. A legnagyobb mennyiségű el nem szappanosított frakció, illetve a legtöbb β -szitoszterol is ebben a szuperkritikus fluid extrakcióban volt (**3. táblázat**). Az ismételt etanolos kivonat β -szitoszterol tartalma arra enged következtetni, hogy a β -szitoszterol részben kémiaiilag kötött formában található a növényben.

A GC-FID-del mért β -szitoszterol tartalom alapján a félüzemi szuperkritikus kivonat a triterpenoidokban leggazdagabb; ebben találtuk a legtöbbféle komponenst. Az etanolos és metanolos frakcióban talált viszonylag magas terpenoid arány (35.8 és 43.0%) valószínűleg azzal magyarázható, hogy a triterpenoidok egy része kötött állapotban van jelen a növényben, és a kevésbé apoláris oldószerek alkalmasabbak ezek kivonására. Érdeemes megemlíteni, hogy bár a szuperkritikus kivonatok hozama kisebb, mint a tradicionális eljárással készülteké, mindazonáltal sokkal szelektívebb a terpenoidokra.

6.2. Izoflavonoidok vizsgálata

6.2.1. Izoflavonoidok azonosítása HPLC-MS/MS-sel

Az izoflavonoidokban az O-glikozidok a 7-hidroxilcsoporton keresztül kapcsolódnak az izoflavon vázhoz. Az *Ononidis radix*-ból kivont izoflavonoidok nagy többsége glikozid/galaktozid, glikozid-malonát volt. A következő molekulaionokat $[M+H]^+$ detektáltuk: m/z 431, 433, 447, 473, 477, 517, 519, 533, 563. Ezek közül vélhetően egyik sem volt C-glikozid, mivel nem volt megfigyelhető a C-glikozidokra jellemző 120, illetve 150 Da-os vesztes [Praisin és mtsai, 2003]. A lágy ionizáció során csupán könnyebben

lehasadó cukor- és észterező csoportok elvesztése figyelhető meg (malonil-, glikozil-, galaktozil-csoport).

A 433-as molekulaion a hozzá tartozó 269-es produkcióval a genisztein-7-O- β -D-glikozidot (genisztin) s ennek aglikonját jelzi. Az m/z 431-es molekulaion a 269-es produkcióval jellemzően a formononetin-7-O- β -D-glikozid (ononin), illetve annak aglikonja. A 447 m/z értékhez tartozó három komponens közül az első vélhetően kalikozin-7-O-glikozid, a másik két ion pedig kémiai szerkezetük, korábbi UV-adatok és kromatográfiás viselkedésük alapján szintén egy kalikozin-glikozid izomer vagy galaktozid, illetve a maackiain-7-O-glikozid. A maackiain apolárosabb szerkezete miatt később eluálódik az oszlopról. Az m/z 533-as molekulaion 11,5 percnél a kalikozin-glikozid malonil származéka, ezt az UV adatok egyértelműsítik.

Két komponens 519 m/z -nél feltehetően két formononetin-7-O-monohezoxid-malonát izomerek, melyek a malonilcsoport pozíciójában különböznek; ez esetben a malonil lehet a glükóz molekula 2-es, illetve 6-os szénatomján. Ezen kívül lehetnek még glikozid/galaktozid testvérek, figyelembe véve, hogy a galaktozidok később eluálódnak a kromatográfiás oszlopról; egymáshoz viszonylag közel. Az 519-es két molekulaion a genisztein-7-O-glikozid-malonát, illetve a medikarpin-7-O-glikozid-malonát; a medikarpin a maackiainhoz hasonló apolárosabb szerkezettel bír, ennél fogva kromatográfiásan távolabb helyezkedik el, mint a genisztein glikozidja.

Találtunk két új, irodalomban még nem közölt izoflavonoidot, az irizolidon-7-O-glikozidot, és ennek malonil-származékát, illetve a kalikozin-glikozidot, és annak malonil származékát. Azonosságukat irodalmi UV-adatokkal is megerősítettük.

6.2.2. Genisztein és daidzein ciklodextrin komplexeinek vizsgálata

6.2.2.1. Genisztein és daidzein molekula optimalizációja α - β - és γ -CD-nel

Az optimalizálások sikeresen megtörténtek, a számítások egyeztek, s nem volt jele átfedésnek a Van der Waals felületekben a CD és ligandja között az output komplexben (17. ábra) a β - és γ -CD esetében. Az α -CD-nel történő optimalizálás negatív eredményt hozott; az üregméret szűk volt mindkét izoflavon számára.

6.2.2.2. Genisztein és daidzein fázisoldékonysági vizsgálata

Látható, hogy a CD-ek közül legjobban a RAMEB-CD vitte oldatba mindkét izoflavont. Ez részben a RAMEB-CD rendkívül jó vízoldékonyságának köszönhető, illetve annak, hogy valószínűleg a metil-szubsztituensek picit apolárosabb külsőt kölcsönző hatása miatt ez a CD származék a legaffinisabb a szintén nem túl poláros geniszteinhez illetve daidzeinhez.

Ezután következik a HP- β -CD, majd a β - és γ -CD az oldékonyságnövelés csökkenő sorrendjében.

6.2.2.3. Genisztein és daidzein /CD komplexek kioldódási profilja

A genisztein és a daidzein vízben nagyon gyengén oldódnak; oldékonyságuk 2,97 illetve 3,70 μgml^{-1} , ezért vizes rendszerekben való alkalmazásukhoz oldékonyság fokozás szükséges.

Mint ahogy korábban a ciklodextrinek oldódásával kapcsolatosan leírtuk, a legjobb vízoldékonysága a szubsztituált származékoknak van; esetünkben az alkalmazott HP- β -CD-nek és a RAMEB-CD-nek rendkívül jó a vízoldhatósága; ezt feltehetően a CD molekulák közötti intermolekuláris kölcsönhatások mértékének nagymértvű csökkenése okozza. Ezzel is magyarázható a két szubsztituált CD-származék erős hatása a genisztein és a daidzein kioldódására. A β - és a γ -CD-ek nagyobb aggregációs sajátsága következtében a kioldódás gyengébb. A γ -CD-es komplexeknél megfigyelhető kezdeti koncentrációcsúcs a γ -CD általánosan jobb nedvesedésének következménye, ezt korábbi nedvesedési peremszög vizsgálatok is alátámasztják.

6.2.2.4. Genisztein / β -CD komplex $^1\text{H-NMR}$ vizsgálatának eredménye

A meghatározott keresztcsúcsok relatív intenzitásai alapján megállapítható, hogy a teljes aromás gyűrű a ciklodextrin üregében helyezkedik el, a vendégmolekula a szélesebb nyílás felől lép a gazdamolekula üregébe. A genisztein ciklodextrin üregében történő imént leírt elhelyezkedését megerősíti egy további gyenge keresztcsúcs a B gyűrű szingulettje és a gazdamolekula H-5 protonja között (**21. ábra**).

6.2.2.5. Genisztein és daidzein / CD komplexek cirkulár dikroizmus (CD) spektroszkópia vizsgálatának eredményei

A komplexálódás bizonyított a CD spektrumok alapján mind a négy ciklodextrinre; az indukált sávok mindkét komponens esetében jelzik az izoflavon molekulák üregbe záródását. Azonban a γ -CD esetében valószínűleg más az izoflavon molekula orientációja, mint a β -CD származékok esetében.

A genisztein esetében a β -CD és HP- β -CD negatív előjelű ICD sávok eltérő strukturáltsága alapján feltételezhető, hogy a két komplex nem teljesen azonos szerkezetű. A γ -CD esetén kapott pozitív előjelű a görbe arra utalhat, hogy a genisztein eltérő orientációban, esetleg más szerkezeti elemek részvételével alakít ki kölcsönhatást a ciklodextrinnel. Az üreg méretének különbözősége is ezt a hipotézist támasztja alá. A random metilált β -CD esetén kapott spektrum feltehetően a kolloidális méretű részecskék fényszóródása miatt nem volt értékelhető; későbbi mérések mégis igazolták itt is a komplexálódást.

A daidzein spektrumainál a HP- β -CD esetén kb. 325 nm-nél negatív sáv jelenik meg, míg 250 körül a β -CD analóg intenzitású és előjelű pozitív sáv. A megjelenő negatív sáv alapján feltételezhető, hogy a komplex szerkezete eltér a β -CD komplexétől.

A leginkább eltérő daidzein/ γ -ciklodextrin CD spektrumában található 350 és 250 nm körüli negatív sávok alapján vélhető, hogy a vendégmolekula ciklodextrin komplexe alapvetően eltérő szerkezettel rendelkezik, mint a különböző típusú β -ciklodextrinek esetén. Az indukált CD sávok előjelének a változása általában az aromás rendszer más irányú orientációjának eredményeként fordul elő. Az RAMEB-CD esetén a legnagyobb intenzitású a CD-jel (az UV is ennél mutatja a legnagyobb változást a telített daidzein spektrumához képest), szerkezete viszont alapvetően a β -CD spektrumára hasonlít. Az ok alighanem a β -CD-ét jelentősen meghaladó oldékonyságból eredeztethető. Feltételezhető a 350 nm körüli sávok megjelenéséből, hogy a gyűrűrendszer oxo-csoportja a ciklodextrin királis környezetének közelébe kerül és megjelenhet az $n-\pi^*$ sáv átmenete a spektrumban. További különbségek tapasztalhatók a spektrumok struktúrájában, előjelében és intenzitásában is. A daidzein esetén a random metilált β -CD-nel is intenzív, jól mérhető sáv jelenik meg. Ez a különbség a geniszteintől egyben azt is jelentheti, hogy itt kevésbé kedvezményezett az esetleges polimer asszociátumok megjelenése.

6.2.3.1. Genisztein és daidzein / CD komplexek membránpermeabilitásának vizsgálata Caco-2 sejtvonalon

A permeabilitási koefficiensek arra utalnak, hogy a β -CD, HP- β -CD, és a γ -CD komplexek formájában oldott genisztein gyorsabban jutott át a Caco-2 monolayeren.

Összevetve a kiindulási koncentrációkat, a transzport sebességét illetve a transzportálódott anyagmennyiségeket, elmondható, hogy az alkalmazott ciklodextrinek nem csak az oldékonyságot növelték meg, hanem a transzport sebességét is pozitív irányba képesek voltak modulálni, ám nem egyforma mértékben (**23. ábra**).

Ellenben az önmagában oldott genisztein egy nagyságrenddel kisebb sebességgel jutott át a Caco-2 monolayeren. Bár a RAMEB-CD képes a legnagyobb mennyiségű geniszteint komplexképzés útján oldatba vinni, nem a RAMEB-CD esetében mértük a legnagyobb transzport mennyiséget, illetve az átjutott genisztein mennyiséget, hanem a γ -CD esetében. (genisztein/RAMEB-CD komplexálás erősebb, mint a genisztein/ γ -CD; talán nem tud olyan könnyen átjutni a genisztein a membránba a komplexből).

A **daidzein** esetében a **8. táblázatban** látható látszólagos permeabilitási koefficiensek azt mutatják, hogy ahogy oldatba kerül a daidzein, már könnyen átjut a Caco-2 sejtek által alkotott monolayeren. A **9. táblázat** mutatja a membránon való átjutás dinamikáját.

Mivel a transzport sebessége a ciklodextrinek jelenlétében ugyanolyan nagyságrendű volt, mint ciklodextrin nélkül, vélhetően a ciklodextrinek a permeabilitást oldékonyság növelés révén fokozták.

6.2.3.2. Genisztein β -CD-nel képzett komplexeinek élettartam növelő hatása *Caenorhabditis elegans*on

A **25. ábrán** látható egyértelműen látható, hogy az állatok pusztulásának aránya nagyobb volt a kontroll csoportban; a komplexált genisztein esetében az életben maradt állatok száma mindig nagyobb volt.

A genisztein és a genisztein/ β -CD tartalmú táptalajokon élő egyedek esetében már jelentkezik némi különbség. Érdekes módon az is látszik, hogy a csak β -CD-t tartalmazó táptalajnak is volt némi hatása az állatok élethosszára. A 14. napon már sokkal kiugróbb a különbség: az üres táptalajt fogyasztó állatoknak 30%-a, a β -CD-tartalmút fogyasztóak 43%-a volt életben, míg a geniszteines táptalaj esetében ez az érték 61 és 65%, a β -CD-nel

komplexált geniszteinnél pedig 86 és 89 % volt. A 15. napon a túlélési arányok 22 és 39%, 51 és 54%, illetve 82 és 87% voltak az üres, a β -CD-tartalmú, a genisztein tartalmú és a genisztein/ β -CD komplex tartalmú táptalajok esetében. Ezek az eredmények egyértelműen arra utalnak, hogy a CD-nel történő komplexálás a kioldódás növelése révén a biológiai hatás mértékére is hatással volt; a biológiai elérhetőség javításával. Ezek a tesztek bevezető vizsgálatok a ciklodextrinek biológiai hatást fokozó szerepének tekintetében.

6.2.4. Izoflavonoidok minőségi és mennyiségi jellemzése *Ononis spinosa* gyökérből hagyományos módon és ciklodextrinekkel készült kivonataiban

6.2.4.1. Az izoflavonoidok eloszlása a különböző 30%-os etanolos - CD-es kivonatokban

A γ -CD-es kivonatok esetében tapasztalható legkisebb hatékonyság a γ -CD, mint natív CD-re jellemző aggregációs készséggel magyarázható. Érdekes, hogy a ciklodextrinek koncentrációjának növelésével enyhén csökken az izoflavonoid tartalom. A RAMEB-CD nagyon csekély hatása azzal magyarázható, hogy bár rendkívül könnyen feloldódott a vizes etanolban, a szekunder végén lévő szubsztituens metilcsoportok mégis egy apolárisabb külső felületet kölcsönöznek a gyűrűmolekulának, így a polárisabb izoflavon-glikozidok kevésbé affinisak hozzá. A HP- β -CD ragyogó vízoldékonysága és a molekula külső felszínének kellő hidrofilitása/polaritása a legmagasabb izoflavonoid-hozamot produkálta, mely azonban mégsem haladta meg a kontroll kivonat izoflavonoid mennyiségét.

Ezek az eredmények mind azt támasztják alá, hogy az etanol, bár kétségtelenül jó hatásfokkal vonja ki az izoflavon-glikozidokat s általában a flavonoidokat, ebben az esetben gyakorlatilag elnyomja a ciklodextrinek hatását; lévén ő maga is kompetál a ciklodextrin üregekért. Így az etanol markáns hatása érvényesül a ciklodextrinekkel szemben, ez látható a kontroll kivonat eredményein. Sajnos egyik CD tartalmú kivonat izoflavonoid eloszlása sem haladta meg a kontrollét.

Az egyes ciklodextrin származékok eltérő mennyiségben segítették a fent felsorolt izoflavonoidok kivonását; függően az üregmérettől, a polaritástól, a szubsztituensek

méretétől, az oldalláncoktól. Az alkalmazott ciklodextrineket oldékonyságuk, illetve a korábban megmért kioldódás szerinti sorrendben ábrázoltuk az oszlopdigramokon. A **27. ábrán** az látható, hogy a legnagyobb mértékben a HP- β -CD fokozta az izoflavonoidok kivonását. A legnagyobb mennyiségben a genisztint lehetett kinyerni; itt a HP- β - és a RAMEB-CD volt a leghatékonyabb. A CD nélküli kontroll kivonatban az irizolidon-7-O-glikozid-6''-malonát, a formononetin-7-O-monohexozid-6''-malonát, a maackiain-7-O-glikozid és a medikarpin-7-O-glikozid malonátjainak mennyisége némileg meghaladta a többi kivonatban találtakét.

Az is látszik a diagramon, hogy az izoflavonoidok kivonásához használt ciklodextrin koncentráció emelkedése nem fokozta egyértelműen az izoflavonoidok mennyiségét.

6.2.4.2. Az izoflavonoidok eloszlása a vizes CD-es kivonatokban

Az etanol nélküli vizes kivonatokban sokkal jobban érvényesült a CD-eknek az izoflavonoidok kivonását segítő hatása; itt a kivonás valamennyi CD esetében – a γ -CD kivételével - felülmúlta a kontroll vizes kivonat izoflavonoid-hozamát. A γ -CD hatása (**28. ábra**) valószínűleg a nagy aggregációs sajátsága miatt volt rendkívül csekély. Hatékonysága 0,01 M-nál volt a legnagyobb, 0,03 és 0,05 M-nál valamivel kisebb, viszont nem érte el a kontrollt. A HP- β -CD esetében volt a legkifejezettebb a ciklodextrinek oldékonyságnövelő hatása az izoflavonoidok kivonása során: az egyes koncentrációknál 54-27% között mozgott a különbség a kontroll kivonattól. A RAMEB-CD-nek a HP- β -CD-nél valamivel gyengébb hatása feltehetően a gyűrűnyílásánál elhelyezkedő metilcsoportok jelenlétéből adódó apolárisabb jellegnek, illetve az izoflavonoidok nagyobb polaritásának tudható be, a RAMEB-CD esetében a kontrolltól való eltérés 25-18% volt.

Összességében jól látszik az oszlopdigramon (**28. ábra**), hogy a tiszta vizes rendszerben, már szignifikánsan érvényesül a ciklodextrinek hatása. Itt nem kompetál semmilyen más anyag a CD-üregekért, így a CD-ek hozamfokozó hatása egyértelműen kifejezett. Valamennyi kivonat azonosított össz-izoflavon tartalma meghaladja a kontrollét. Ugyanakkor itt is a legalacsonyabb CD koncentrációlépcső bizonyult a legmegfelelőbbnek a kivonáshoz.

A **29. ábrán** jól látszik az egyes komponensek eloszlása. Egyes minor komponensek aránya emelkedik a CD koncentrációk növekedésével, ilyen a formononetin-glikozid, a

maackiain-glikozid-malonát; más komponensek viszont csökkenő mennyiségben jelennek meg a tömegspektrumban. Ilyen a genisztin is, mely legnagyobb mennyiségben a RAMEB-CD-t, illetve a HP- β -CD-t tartalmazó oldatokban található jelentős mennyiségben, mint főkomponens. A genisztinen kívül a kalikozin-7-O-glikozid és a kalikozin-7-O-glikozid malonátja, illetve az ononin a RAMEB-CD koncentrációemelkedésével növekvő mennyiségben jelennek meg. A formononetin-7-O-monohezoxid 2 malonátja és az irizolidon-7-O-glikozid jobbra a HP- β -CD és kevésbé a RAMEB-CD tartalmú kivonatokban látható, mennyiségük a CD koncentrációval nem emelkedik. Az irizolidon-glikozid malonil származéka főleg a γ -CD és a HP- β -CD tartalmú kivonatokban jelent meg. A medikarpin-7-O-glikozid malonil származékát a HP- β -CD tartalmú kivonatok tartalmazták nagyobb mennyiségben.

7. Következtetések és új eredmények

Az *Ononis spinosa* L. egy, a gyógyszerkönyvekben előforduló, mégis méltatlanul kevésbé vizsgált gyógynövényünk. A gyökerében található, igen markáns hatású triterpének, fitoszterolok és izoflavonoidok pontos ismerete nem teljes, ezért azok behatóbb analízise indokolt, ráadásul hatásaik vizsgálata is hiányos.

A **triterpenoidok** kinyerésére az utóbbi időben egyre elterjedtebben alkalmazzák a szuperkritikus fluid extrakciót (SFE), melyhez fluid állapotú (kritikus hőmérséklet feletti magas nyomású) indifferens gázokat, többnyire CO₂-ot használnak. A módszer elsősorban apoláris vegyületek kivonására alkalmas.

Az *Ononis spinosa* apoláris jellegű, terápiásan is ígéretes triterpenoidjait vizsgálva, különféle polaritású kivonószereket - hexánt, acetont, etil-acetátot, metanolt, etanolt, izopropanolt, illetve szuperkritikus fluid CO₂-ot - alkalmazva megállapítottuk, hogy kinyerésükre leghatékonyabb a hexán és a szuperkritikus fluid CO₂. Emellett még szignifikáns mennyiségű szterol volt kinyerhető polárisabb kivonószerekkel is (pl. etanollal és metanollal); ezt feltételezhetően a kémiailag kötött formájú szterolok (pl. szterol-glikozidok) jelenléte okozta.

A fenti kivonatokban GC-MS módszerrel a β -szitoszterol, kampeszterol, sztigmaszterol, szitgmasztán-2,5-dién fitoszterolokat, illetve α -onocerin és β -amirin triterpéneket azonosítottunk, illetve értékeltük az egyes triterpenoidok részarányát a különböző kivonatokban. Megállapítottuk, hogy a különféle komponensekben leggazdagabb a félüzemi körülmények között készült SFE kivonat.

Származékképzés nélküli GC-FID módszert dolgoztunk ki a β -szitoszterol – mint főkomponens - tartalom mérésére, majd vizsgáltuk az egyes fenti kivonási módszerek hatását a β -szitoszterol tartalomra. β -szitoszterolban leggazdagabb kivonatokot 100 baron nyertük (SFE 1 és 2); ezt követte a hexános kivonat; a félüzemi léptékű kivonás során ennél kevesebb β -szitoszterol volt kinyerhető; megállapítottuk, hogy a β -szitoszterol kinyeréséhez az alacsonyabb nyomás kedvezett. A legnagyobb mennyiségű el nem szappanosított frakciókat szintén az alacsony nyomáson nyert szuperkritikus fluid extraktumok nyújtották.

Az **izoflavonoidok** viszonylag terjedelmes irodalma speciális szerkezetük és hatásaik miatt főleg izolált hatóanyagok vizsgálatát írja le, így az *Ononis spinosa* izoflavonoidjainak

pontos feltárása sem teljes; ezek a vegyületek főként nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával, illetve tömegspektrometriával vizsgálhatók megbízhatóan. Az irodalomban eddig leírt főbb izoflavon aglikonok a formononetin, biochanin A, genisztein, daidzein, illetve medikarpin. Munkánk során HPLC-MS-sel sikeresen azonosítottunk 16 izoflavon-monohezoxidot az *Ononis spinosa* L. gyökérdrogjában fragment ionjaik, UV-adataik, aglikon standardek és irodalmi adatok alapján. Az azonosított komponensek többsége glikozid, illetve malonil-glikozid, ezeket irodalmi UV-maximumok alapján is megerősítettük. Egy új, még irodalomban le nem írt komponensként a kalikozin-7-O-glikozidot, ennek 6''-malonil származékát, illetve az irizolidon-7-O-glikozidot és annak 6''-malonil származékát azonosítottuk.

A ciklodextrinek egyre szélesebb körben alkalmazott vegyületek; felhasználási területük a gyógyszeriparon kívül kiterjed az élelmiszer-, kozmetikai, műanyag-, növényvédőszer-, illetve diagnosztikumiparban és a biotechnológiában. A gyógyszeriparban legjellemzőbben oldékonyság- illetve stabilitás fokozására használják; az Európai Gyógyszerkönyvben hivatalos az α -CD, β -CD, γ -CD és a HP- β -CD, az Amerikai Gyógyszerkönyvben a β -CD, γ -CD és a HP- β -CD, valamint a Japán Gyógyszerkönyvben az α -CD, β -CD, γ -CD. Jelenleg legalább 35 ciklodextrinnel formulált gyógyszer van forgalomban a világon.

A ciklodextrinek előnyeinek felfedezése és növekvő felhasználása mára már önálló kutatási területté nőtte ki magát. A természetes vegyületek közül számos alkalmas vendégmolekulának; több fenolos vegyület (flavonoid, katechin), illóolaj komponens, illetve szteránvázas vegyület ciklodextrin komplexeiről vannak már irodalmi adatok; különösen a kevésbé vízdékony komponenseknél lehet ez fontos.

Az oldékonyságnöveléssel együtt a ciklodextrinek befolyásolhatják az egyes komplexált hatóanyagok szerkezetbeli hatását; növelhetik azt a biológiai hasznosíthatóság fokozása révén, így az esetleges dóziscsökkentést is lehetővé teszik. Természetes vegyületek esetében például fokozhatják az antioxidáns (polifenolok, flavonoidok) vagy a szérum triglicerid-csökkentő hatást (rutin).

Az *Ononis spinosában* található genisztein és daidzein aglikonok vízben szinte alig oldódnak, számottevő biológiai hatásuk miatt indokolt lehet a molekuláris kapszulázásuk. Méretük kompatibilis a β - és γ -CD ciklodextrin üregméretével, ezt molekula optimalizációval megerősítettük α -, β - és γ -CD-nel mindkét izoflavon esetében. Megállapítottuk, hogy az α -CD ürege kicsinek bizonyult a két vegyület komplexálásához. A genisztein és daidzein 1:1 arányú komplexeit β - és HP- β -CD-vel már leírta az irodalom.

Sikeresen komplexáltuk a genisztein és a daidzein izoflavonokat β -, γ -, HP- β -, és RAMEB-CD-nel 1:2 arányban, és ezt cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával is megerősítettük.

Megállapítottuk, hogy az alkalmazott β -, γ -, HP- β -, és RAMEB- ciklodextrinek vízben többszörösére növelik a genisztein és a daidzein kioldódását a RAMEB-CD > HP- β -CD > β -CD, γ -CD sorrendben.

A Caco-2 sejtvonal elterjedt modell a bélben zajló többféle transzportfolyamat vizsgálatára a per os adagolt készítmények esetében. Genisztein és daidzein, illetve genisztin és daidzin transzportját vizsgálva korábbi adatok szerint az aglikonok 30-40%-ban jutnak át a membránon. Kísérletünkben a β -, γ -, HP- β -, és RAMEB-CD ciklodextrinek transzportra gyakorolt hatását vizsgálva azt találtuk, hogy mindegyik ciklodextrin fokozta a genisztein és a daidzein membrántranszportját; így feltehetően a bioelérhetőségét is. A genisztein önmagában egy nagyságrenddel kisebb sebességgel jutott át a monolayeren, mint komplexált származékai; a ciklodextrinek nem csak az oldékonyságot növelték meg, hanem a transzport sebességét is pozitív irányba képesek voltak modulálni, ám nem egyforma mértékben; a γ -CD volt a leghatékonyabb ciklodextrin. A daidzein esetében a komplexálatlan hatóanyag szintén jóval kisebb sebességgel jutott át a monolayeren, közel 2-3-szor, mint a komplexált forma. Ebben az esetben a RAMEB-CD volt a leghatékonyabb, mindazonáltal a daidzeinnél a ciklodextrinek a permeabilitást feltehetően az oldékonyság növelése révén fokozták.

A *Caenorhabditis elegans* fonálféreg egy ismert genommal rendelkező modellszervezet, melyen főleg sejtdifferenciálódási, fejlődési folyamatokat, meiózist, idegrendszeri válaszokat és anti-age hatásokat vizsgálnak. A genisztein és a daidzein jelentősen növelte a *C. elegans* élettartamát oxidatív stresszben. Kísérletünkben a genisztein/ β -CD komplex esetében jelentős hatásfokozódást tapasztaltunk a tiszta geniszteinhez képest; ez a biológiai hozzáférhetőség növelésére enged következtetni.

Az élelmiszeriparban sok esetben alkalmaztak ciklodextrinokat természetes vegyületek szelektív kivonására, eliminálására is (flavonoidok, koffein, koleszterin). Polifenolok és flavonoidok növényi részekből való kivonására már tettek kísérletet, szignifikánsan pozitív eredménnyel. A komponensek közti fizikai-kémiai különbségek, illetve az alkalmazott ciklodextrinszármazék vendégspecifitása lehetőséget adhat 1-1 komponens szelektív kivonására, ahogy korábbi példák is mutatják.

Az *Ononis spinosae* radix izoflavonoidok kinyerését vizsgálva β -, γ -, HP- β -, és RAMEB-CD ciklodextrinek segítségével megállapítottuk, hogy a ciklodextrinek tiszta vizes

közegben jelentősen növelték a kivont izoflavonoidtartalmat; a HP- β -CD hatása volt a legjelentősebb, a γ -CD-é a leggyengébb. A 30%-os etanos közegben a ciklodextrinek hatása nem érvényesült kellőképpen; az etanol jelenléte ezt a hatást lerontotta. Megfigyeltük, hogy az alkalmazott CD koncentrációk közül a legalacsonyabb, vagyis a 0,01 M volt a legkedvezőbb a kivonáshoz. A legnagyobb mennyiségben kivont izoflavonoid a genisztin volt.

8. Összefoglalás

Az *Ononis spinosa* L. a *Fabaceae* növény család egyik gyógyszerkönyvben is hivatalos gyógynövénye, mely hazánkban is gyakori. Fontos hatóanyagcsoportjai a **triterpenoidok** és az **izoflavonoidok**.

Jelen értekezés kísérletet tett az *Ononis spinosa* L. gyökér drog hatóanyagainak pontosabb feltárására, illetve a már egy lépéssel előbbre mutató hatóanyag-preformulálásra.

A gyökér különböző polaritású oldószerrel készült kivonataiban **GC-MS módszerrel** β -szitoszterolt, kampeszterolt, sztigmaszterolt, β -amirint, sztigmasztán-3,5-diént és α -onocerint azonosítottunk.

Az *Ononis spinosa* gyökér szerves oldószeres, valamint analitikai és félüzemi léptékű SFE tisztított kivonatait vizsgáltuk. Az SFE kivonatok közül a 100 baron készült **SFE**, a tradicionális kivonatok közül az etanolos kivonás hozama a legmagasabb, de szelektivitása alacsony szterol és triterpén vegyületekre.

Az általunk kidolgozott, származékképzés nélküli GC-FID módszerrel, 5- α -kolesztán-3-on belső standarddal a relatíve legmagasabb β -szitoszterol tartalmat a 100 baron készült **SFE** kivonatokban mértünk; a komponensekben leggazdagabb kivonat a félüzemi SFE kivonat volt.

A gyökér vizes-etanolos kivonataiban 14 különböző izoflavon-glikozidot azonosítottunk LC-MS-sel, melyek részben glikozidok, részben malonil-glikozidok. Új komponensként a kalikozin-7-O-glikozidot és az irizolidon-7-O-glikozidot, és ezek malonil-származékait azonosítottuk.

Kiválasztottuk a növény két ismertebb és fontosabb izoflavon aglikonját, a **geniszteint** és a **daidzeint**, és ezeket preparatív komplexáltuk β -, γ -, hidroxipropil- β - és random metil- β -**ciklodextrinnel** 2:1 gazda-vendég arányban. A keletkező komplexek vízdékonysága jelentősen megnőtt, közülük a legnagyobb oldékonyságváltozást a szubsztituált ciklodextrineknél tapasztaltuk, megerősítve ezzel a korábbi, a CD-ek oldékonyságára vonatkozó tapasztalatot. A komplexek fizikai kémiai vizsgálata során igazoltuk, hogy a komplexképződés valóban megtörtént (CD spektrumok), s azt, hogy az izoflavonváznak az aromás gyűrűje kerül a CD üregbe (H^1 -NMR).

A komplexek **bélhámsejt membránon keresztüli transzportját** élő sejteken is megvizsgáltuk; a Caco-2 sejtvonalon történő membránpermeabilitás vizsgálatával. Az

eredmény azt mutatta, hogy a membránon keresztüli transzportot nagyságrendileg megnövelték a CD-ek, mindkét izoflavon esetében.

Összehasonlítottuk a tiszta geniszteinnel és azzal egyenértékű genisztein/ β -CD-nel etetett *Caenorhabditis elegans* modellállatok életidejét, és megállapítottuk, hogy a β -CD jelentősen fokozta a genisztein élettartamnövelő hatását.

Mindezekon kívül megvizsgáltuk az *Ononis spinosa* **izoflavonoidok szelektív kinyerésének** lehetőségét azok ciklodextrinekkal való komplexképzési hajlamát kihasználva. A hagyományos és ciklodextrines kivonatok izoflavon tartalma és – összetétele tekintetében megállapítottuk, hogy a ciklodextrinek változó mértékben növelték az izoflavonoidok kivonását. A 30 % etanollal készült kivonatok esetében az etanol szignifikánsan elnyomja a CD-ek hatását, míg a tiszta vizes közegben a CD-ek hatása jelentősen meghaladta a kontroll kivonatót. A ciklodextrinek közül mindkét esetben a legjelentősebb hozamnövelő hatást a HP- β -CD esetében tapasztaltuk, míg érdekes módon a szintén jelentős vízdékonyságnak örvendő γ -CD hatása volt a legkevésbé kifejezett. A vizes kivonatokban a ciklodextrinek a HP- β -CD > RAMEB-CD \geq γ -CD rend szerint növelték az izoflavonoid tartalmat.

9. Summary

The *Ononis spinosa* L. is a member of *Fabaceae* family and is so common in Hungary being a widespread medicinal herb. Important compounds of this plant are triterpenoids and isoflavonoids.

We have determined triterpenoids in *Ononis spinosa* root by GC-MS as β -sitosterol, campesterol, stigmasterol, β -amyirin, stigmastan-3,5-diene and α -onocerin without derivatisation.

The different extractions of *Ononis spinosa* root obtained by organic solvents and supercritical fluid CO₂ has been investigated and compared, in addition, we evaluated the relative amounts of triterpenoids extracted different way described in methods.

Among SFE extracts the SFE extract 1 made on 100 bar yielded the most unsaponified fraction while ethanolic extraction provided the highest yield by traditional way, but was the less selective for sterol and triterpene compounds. We have measured the relatively highest amount of β -sitosterol in the analytical SFE extract 1 made on 100 bar by GC-FID method by mean of internal standard 5- α -cholestan-3-on without derivatisation.

In *Ononis spinosa* root we also characterised 14 isoflavonoids as likely glycosides or malonyl-glycosides. We newly identified calichosine-7-O-glycoside and irisolidone-7-O-glucoside and their malonyl derivatives.

We have chosen two common and important isoflavonoid aglycon; genistein and daidzein, and have prepared their inclusion complexes with β -, γ -, hydroxy-propyl- β - and random methyl- β -cyclodextrin of the ratio of 2:1 host-guest.

The complexes prepared got enhanced aqueous solubility, especially in case of the substituted CDs; HP- β -CD and RAMEB-CD. This confirmed previous evidences about basic solubility of native CDs and CD derivatives.

Observing the complexes physicochemically results showed that the complex formation has really happened (CD spectra) and the aromatic ring of the flavone skeleton is inserted into CD cavity (¹H-NMR).

We have investigated the transport of the complexes prepared previously across the gut wall by Caco-2 assay. This experiment resulted in that order of transported amounts of isoflavones have been enhanced by complexation with the different cyclodextrins.

We have investigated extraction of isoflavonoids of *Ononis spinosa* selectively based on their capacity of complex forming with CDs. Results have confirmed conclusions of other

previous studies about extracting phenolic and flavonoid compounds in this way; *Ononis* isoflavonoids are also capable for this extraction method. We gained the highest amount of isoflavonoid using HP- β -CD in aqueous system, while γ -CD showed the less isoflavonoid extracted; in aqueous-ethanolic system effect of CDs were much less than in pure aqueous extracts.

10. Irodalomjegyzék

Adlercreutz H, Mazur W. (1997) Phyto-oestrogens and western diseases. *Ann Med*, 29: 95–120.

Adlercreutz H. (2002) Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncology*, 3: 364–373.

Akasaka H, Endo T, Nagase H, Ueda H, Kobayashi S. (2000) Complex formation of cyclomaltonaose δ -cyclodextrin (δ -CD) with macrocyclic compounds. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 48(12): 1986-9.

Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem*, 262: 5592-5595.

Artursson P. (1991) Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst*, 8(4): 305–330.

Awad AB, Hartati MS, Fink CS. (1998) Phytosterol feeding induces alteration in testosterone metabolism in rat tissues. *J Nutr Biochem*, 9(12): 712-717.

Awad AB, von Holtz RL, Cone JP, Fink CS, Chen YC. (1998) beta-Sitosterol inhibits growth of HT-29 human colon cancer cells by activating the sphingomyelin cycle. *Anticancer Res*, 18(1A): 471-3.

Ayaj M, Gilani AH, Mustafa MR. (2003) Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci*, 74(5): 603-612.

Banerjee A, Basu K, Sengupta PK. (2007) Effect of b-cyclodextrin nanocavity confinement on the photophysics of robinetin. *J Photochem Photobiol B*, 89(2-3): 88-97.

Berges RR, Kassen A, Senge T. (2000) Treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia with beta-sitosterol: an 18-month follow-up. *BJU Int*, 85(7): 842-6.

Berges RR, Windeler J, Trampisch HJ, Senge TH. (1995) Randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial of beta-sitosterol in patients with benign prostatic hyperplasia. Beta-sitosterol Study Group. *The Lancet*, 345(8964): 1529-1532.

Bennetts HW, Underwood EJ, Shier FL. (1946) A specific breeding problem of sheep on subtterranean clover pastures in western Australia. *Austr Vet*, J 22: 2.

Bolle P, Faccendini P, Bello U, Panzironi C, Tita B. (1993) *Ononis Spinosa L.*: Pharmacological effect of ethanol extract. *Pharm Res*, 27(1): 27–28.

Bradbury RB, White DE. Estrogens and related substances in plants. In: Haaris RS, Marrian GF, Thimann KV (eds.) *Vitamins and hormones advances in research and applications* Academic Press, New York, 1954: 207-233.

Branham WS, Dial SL, Moland CL, Hass BS, Blair RM, Fang H, Shi L, Tong W, Perkins RG, Sheehan DM. (2002) Phytoestrogens and Mycoestrogens Bind to the Rat Uterine Estrogen Receptor. *J Nutr*, 132: 658–664.

Brauner R, Johannes C, Ploessl F, Bracher F, Lorenz RL. (2012) Phytosterols reduce cholesterol absorption by inhibition of 27-hydroxycholesterol generation, liver X Receptor α activation, and expression of the basolateral sterol exporter ATP-binding cassette A1 in Caco-2 enterocytes. *J Nutr*, 142(6): 981-989.

Calabro ML, Tommasini S, Donato P, Stancanelli R, Raneri D, Ficarra P, Villari V, Ficarra R. (2004) Rutin inclusion systems with α - and β -cyclodextrins: circular dichroism, UV absorption spectroscopy and antioxidant activity. 15th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Florence, Italy

Calabro ML, Tommasini S, Donato P, Stancanelli R, Raneri D, Catania S, Costa C, Villari V, Ficarra P, Ficarra R. (2005) The rutin/ β -cyclodextrin interactions in fully aqueous solution: spectroscopic studies and biological assays. *J Pharm Biomed Anal*, 36: 1019–1027.

Caldwell MM, Robberecht R, Flint S. (1983) Internal filters: prospects for UV-acclimation in higher plants. *Physiol Plant*, 58: 445-450.

Cannava C, Crupi V, Ficarra P, Guardo M, Majolino D, Mazzaglia A, Stancanelli R, Venuti V. (2010) Physico-chemical characterization of an amphiphilic cyclodextrin/genistein complex. *J Pharm Biomed Anal*, 51: 1064–1068.

Carr TP, Ash MM, Brown AW, (2010) Cholesterol-lowering phytosterols: factors affecting their use and efficacy. *Nutr Diet Suppl*, 2: 59–72.

Chakraborty S, Basu S, Lahiri A, Basak A. (2010) Inclusion of chrysin in β -cyclodextrin nanocavity and its effect on antioxidant potential of chrysin: A spectroscopic and molecular modeling approach. *J Mol Struct*, 977(1-3): 180-188.

Casanova M, You L, Gaido K, Archibeque-Engle S, Janszen D, Heck H, (1999)

Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague–Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro. *Toxicol Sci*, 51: 236–244.

Chakraborty S, Basu S, Lahiri A, Basak A. (2010) Inclusion of chrysin in β -cyclodextrin nanocavity and its effect on antioxidant potential of chrysin: A spectroscopic and molecular modeling approach. *J Mol Struct*, 977(1-3): 180-188.

Charumanee S, Titwan A, Sirithunyalug J, Weiss-Greiler P, Wolschann P, Viernstein H, Okonogi S. (2006) Thermodynamics of the encapsulation by cyclodextrins. *J Chem Technol Biotech*, 81(4): 523-529.

Chatjigakis KA, Donzé C, Coleman AW. (1992) Solubility behaviour of β -CD in water/cosolvents mixtures. *Anal Chem*, 64: 1632-34.

Chen S, Kao YC, Laughton CA. (1997) Binding characteristics of aromatase inhibitors and phytoestrogens to human aromatase. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 61: 107–115.

Cherdshewasart W, Panriansaen R, Picha P. (2007) Pretreatment with phytoestrogen-rich plant decreases breast tumor incidence and exhibits lower profile of mammary ERalpha and Erbeta. *Maturitas*, 58: 174–181.

Coleman AW, Nicolis I, Keller N, Dalbiez JP. (1992) Aggregation of cyclodextrins: An explanation of the abnormal solubility of β -cyclodextrin. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit Chem*, 13(2): 139-43.

Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment, Phytoestrogens and Health, Food Standards Agency, London, 2003.

Crupi V, Ficarra R, Guardo M, Majolino M, Stancanelli R, Venuti V. (2007) UV-vis and FTIR-ATR spectroscopic techniques to study the inclusion complexes of genistein with beta-cyclodextrins. *J Pharm Biomed Anal*, 44(1): 110-117.

Dai Q, Shu XO, Jin F. (2001) Population-based case-control study of soyfood intake and breast cancer risk in Shanghai. *Br J Cancer*, 85(3):372-378.

Demian BA. (2000) Correlation of the solubility of several aromatics and terpenes in aqueous hydroxypropyl- β -cyclodextrin with steric and hydrophobicity parameters. *Carbohydr Res*, 328(4): 635-639.

Dewick PM. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 2nd ed, Wiley, Nottingham, 2002: 175-176.

Dluzen DE. (2000) Neuroprotective effects of estrogen upon the nigrostriatal dopaminergic system. *J Neurocytol*, 29(5-6): 387-99.

Duan W, Kuo IC, Selvarajan S, Chua KY, Bay BH, Wong WSF. (2003) Antiinflammatory Effects of Genistein, a Tyrosine Kinase Inhibitor, on a Guinea Pig Model of Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 167(2): 185-192.

Erdemgil FZ, Kürkcüoğlu M, Baser KHC. (2002) Composition of the essential oil of *Ononis viscosa* subsp. *breviflora*. *Chem of Nat Comp*, 38: 565-567.

Ferrer MA, Pedreno MA, Munoz R, Ros Barcelo A. (1990) Oxidation of coniferyl alcohol by cell wall peroxidases at the expense of indole-3-acetic acid and O₂. *FEBS Letter*, 276: 127-130.

Evans BA, Griffiths K, Morton MS. (1995) Inhibition of 5 alpha-reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. *J Endocrinol*, 147: 295-302.

Fernandez AR, Omar SZ, Husain R. (2010) Vasorelaxant effect of genistein and vascular endothelial growth factor (VEGF) in rat. *Proc Physiol Soc*, 19, PC182

Figtree GA, Griffiths H, Lu YQ, Webb CM, MacLeod K, Collins P. (2000) Plant-derived estrogens relax coronary arteries in vitro by a calcium antagonistic mechanism. *J Am Coll Cardiol*, 35(7): 1977-1985.

Fonseca D, Ward WE. (2004) Daidzein together with high calcium preserve bone mass and biomechanical strength at multiple sites in ovariectomized mice. *Bone*, 35(2): 489-497.

Foti P, Erba E, Riso P, Spadafranca A, Criscuoli F, Testolin G. (2004) Comparison between daidzein and genistein antioxidant activity in primary and cancer lymphocytes, *Arch Biochem Biophys*, 433(2): 421-427.

Frankenfeld CL, Atkinson C, Thomas WK. (2005) High concordance of daidzein-metabolizing phenotypes in individuals measured 1 to 3 years apart. *Br J Nutr*, 94(6): 873-876.

French D. (1957) The Schardinger dextrin. *Adv Carbohydrate Chem*, 12:189.

Guha N, Kwan ML, Quesenberry Jr CP, Weltzien EK, Castillo AL, Caan BJ. (2009) Soy isoflavones and risk of cancer recurrence in a cohort of breast cancer survivors: the Life After Cancer Epidemiology study. *Breast Cancer Res Treat*, 118(2): 395-405.

Guerrero A, Lozano ML, Castillo J, Benavente-Garcia O, Vicente V, Rivera J. (2005) Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor. *J Thromb Haem* 3(2): 369-376.

Gutierrez A, Rio DC, Gonzalez-Vila FJ, Martin F. (1998) Analysis of lipophilic extractives from wood and pitch deposits by solid-phase extraction and gas chromatography. *J Chrom A*, 823: 449-455

Gutierrez-Zepeda A, Santell R, Wu Z, Brown M, Wu YJ, Khan I, Link CD, Zhao B, Luo Y. (2005) Soy isoflavone glycitein protects against beta amyloid-induced toxicity and oxidative stress in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *BMC Neurosci*, 6: 54.

Hamäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E. (2007) Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS

expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of Inflammation*, 2007: 45673.

Hall W, Vafeiadou K, Hallund J, Bügel S, Koebnick C, Reimann M, Ferrari M, Branca F, Talbot D, Dadd T, Nilsson M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, Minihane A-M, Williams CM. (2005) Soy-isoflavone-enriched foods and inflammatory biomarkers of cardiovascular disease risk in postmenopausal women: interactions with genotype and equol production. *Am J Clin Nutr*, 82: 1260–1280.

Harata K. (1987) The structure of the cyclodextrin complex 20. Crystal-structure uncomplexed hydrated gamma-cyclodextrin. *Bull Chem Soc Jpn*, 2763-2767.

Harris RM, Wood DM, Bottonley L, Blagg S, Owen K, Hughes PJ, Waring RH, Kirk CJ. (2004) Phytoestrogens are potent inhibitors of estrogen sulfation: implications for breast cancer risk and treatment. *J Clin Endocrin Metab*, 89: 1779-1787.

Hedges RA. (1998) Industrial applications of cyclodextrins. *Chem Rev*, 98: 2035–2044.

Heinrich M, Barnes J, Gibbons S, Williamson EM. (2004) in: *Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy*. Ed.: Green E, Elsevier, p. 87-89.

Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96(3): 736–49.

Higuchi T, Connors KA. (1965) Phase-solubility techniques. *Adv Anal Chem Instr*, 4: 117–212.

Hilp K, Kating H, Schaden G. (1975) Inhaltsstoffe aus *Ononis spinosa* L. 1. Mitt. Das ätherische Öl der *Radix Ononidis*. *Arch Pharm*, 308(6): 429-433.

Hilp K, Kating H, Schaden G. (1975) Inhaltsstoffe aus *Ononis spinosa* L. 2. Aromatische Kohlenwasserstoffe aus den ätherischen Ölen der *Radix* und *Herbe Ononidis*. *Arch Pharm*, 310(10): 792-795.

Hirose K, Tajima K, Hamajima N. (1995) A large-scale, hospital-based case–control study of risk factors of breast cancer according to menopausal status. *Jpn J Cancer Res*, 86(2): 146–54.

Horn-Ross PL, John EM, Canchola AJ, Stewart SL, Lee MM. (2003) Phytoestrogen intake and endometrial cancer risk. *Oxford J Med* 95(15): 1158-1164.

Hungarian Pharmacopoeia, (2004) 8th ed., Medicina Könyvkiadó Rt, Budapest, 3. kötet, 2256-2257.

Hunter J, Hirst BH. (1997) Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. *Adv Drug Del Rev*, 25(2–3): 129–157.

Jacobs M, Rubery PJ. (1988) Naturally occurring auxin transport regulators. *Science*, 241: 346-349.

Jacquot Y, Rojas C, Refouvelet B, Robert JF, Leclercq G, Xicluna A. (2003) Recent advances in the development of phytoestrogens and derivatives: an update of the promising perspectives in the prevention of postmenopausal diseases. *Mini Rev Med Chem*, 3(5): 387–400.

Jeong MK, Hye Sook YC. (2008) Anti-platelet effects of flavonoids and flavonoid-glycosides from *Sophora japonica*. *Arch Pharm Res*, 7: 886-890.

Jones PJ, MacDougall DE, Ntanios F, Vanstone CA. (1997) Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agents in humans. *Can J Physiol Pharmacol*, 75(3): 217-27.

Jia TL, Wang HZ, Xie LP, Wang XY, Zhang RQ. (2003) Daidzein enhances osteoblast growth that may be mediated by increased bone morphogenetic protein (BMP) production. *Biochem Pharmacol* 65: 709-715.

Johnsson L, Paresh C, Dutta PC. (2005) Separation of phytosterol oxidation products by combination of different polarity gas chromatography capillary columns. *J Chrom A*, 1064: 213–217.

Kalogeropoulos N, Yannakopoulou K, Gioxari A, Chiou A, Makris DP. (2010) Polyphenol characterization and encapsulation in β -cyclodextrin of a flavonoid-rich *Hypericum perforatum* (St John's wort) extract. *LWT - Food Sci Technol*, 43(6): 882-889.

Kapiotis S, Hermann M, Held I, Seelos C, Ehringer H, Gmeiner BMK. (1997) Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17: 2868-2874.

Kerry N, Abbey M. (1998) The isoflavone genistein inhibits copper and peroxy radical mediated low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis*, 40(2): 341-347.

Karr SC, Lampe JW, Hutchins AM, Slavil JL. (1997) Urinary isoflavonoid excretion in humans is dose dependent at low to moderate levels of soy-protein consumption. *Am J Clin Nutr*, 66: 46–51.

Kéry Á, Simándi B, Rónyai E, Lemberkovics É. (1998) 5th Meeting of Supercrit. Fluid. extr. materials and natural products processing, Nice, France 567-572. (1998)

Keung WM. (1993) Biochemical studies of a new class of alcohol dehydrogenase inhibitors from *Radix puerariae*. *Alcoholism Clin Exp Res*, 17: 1254-1260.

Krazeisen A, Breitling R, Moller G, Adamski J. (2001) Phytoestrogens inhibit human 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5. *Mol Cell Endocrin*, 171: 151–162.

Kobayashi Y, Sugaya Y, Tokue A. (1998) Clinical effects of beta-sitosterol (phytosterol) on benign prostatic hyperplasia: preliminary study. *Hinyokika Kyo*, 44(12): 865-868.

Konno A, Miyawaki M, Misaki M, Yasumatsu K. (1981) Bitterness reduction of citrus fruits by β - cyclodextrin. *Agric Biol Chem*, 45 (10): 2341-2342.

Konno A, Misaki M, Toda J, Wada T, Yasumatsu K. (1982) Bitterness reduction of naringin and limonin by β -cyclodextrin. *Agric Biol Chem*, 46(9): 2203-2208.

Krishna KM, Annapurna A, Gopal GS, Chalam CR, Madan K, Kumar VK, Prakash GJ. (2005) Partial reversal by rutin and quercetin of impaired cardiac function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 83(4): 343-55.

Kristó TSz, Terdy PP, Simándi B, Szőke É, Lemberkovics É, Kéry Á. (2001) Efficiency of supercritical fluid extraction for the production of non-volatile terpenoids from *Taraxaci radix*. *Acta Pharm Hung*, 71: 318-324.

Jeong MK, Hye Sook YC. (2008) Anti-platelet effects of flavonoids and flavonoid-glycosides from *Sophora japonica*. *Arch Pharm Res*, 31(7) : 886-890.

Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Höggblad J, Hilsson S, Gustafsson JA. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrin*, 138: 863–870.

Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson JC, Safe SH, Van Der Saag PT, Van Der Burg B, Gustafsson J-A. (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with receptor β . *Endocrin* 139(10): 4252-4263.

Kulling SE, Honig DM, Simat TJ, Metzler M. (2000) Oxidative in vitro metabolism of the soy phytoestrogens daidzein and genistein. *J Agric Food Chem* 48(10): 4963-4972.

Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, Webb P. (2000) Estrogen receptor pathways to AP-1. *J. Steroid Biochem Mol Biol*, 74: 311–317.

Lamartiniere CA, Cotroneo MS, Fritz WA. (2002) Genistein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. *J Nutr*, 132: 552S–558S.

Lamartiniere CA, Zhang JX, Cotroneo MS. (1998) Genistein studies in rats: potential for breast cancer prevention and reproductive and developmental toxicity. *Am J Clin Nutr*, 68: 1400S-1405S.

Lampe JW. (2009) Is equol the key to the efficacy of soy foods? *Am J Clin Nutr*, 89: 1664S-1667S.

Leavitt, WW, Wright PE. (1963) Effects of legumes on reproduction in mice. *J Reprod Fert*, 6: 115-123.

Lemberkovics É, Kéry Á, Simándi B, Kristó TSz, Kakasy A, Szőke É. (2001) Evaluation of supercritical plant extracts on volatile and non volatile biologically active lipophil components. *Int J Horticult Sci*, 7(2): 78-83.

Li CR, Zhou Z, Lin RX, Zhu D, Sun YN, Tian LL, Li L, Gao Y, Wang SQ. (2007) Beta-sitosterol decreases irradiation-induced thymocyte early damage by regulation of the intracellular redox balance and maintenance of mitochondrial membrane stability. *J Cell Biochem*, 102(3): 748-58.

Lin X, Ma L, Racette SB, Anderson Spearie CL, Ostlund Jr RE. (2009) Phytosterol glycosides reduce cholesterol absorption in humans. *Am J Physiol*, 296(4): G931-G935.

Liu MH, Lin YS, Sheu SY, Sun JS. (2009) Anti-inflammatory effects of daidzein on primary astroglial cell culture *Nutritional Neuroscience* 12(3): 123-134.

Liu J, Qiu L, Gao J, Jin Y. (2006) Preparation, characterization and in vivo evaluation of formulation of baicalein with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Int J Pharm*, 312(1-2): 137-143.

Mahasneh AM, El-Oqlah AA. (1999) Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. *J Ethnopharm*, 64(3): 271-276 (6).

Martin PM, Horwitz KB, Ryan DS, McGuire WL. (1978) Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrin*, 103: 1860–1867.

Markovits J, Linassier C, Fosse P, Couprie J, Pierre J, Jacquemin-Sablon A, Saucier JM, Le Pecq JB, Larsen AK. (1989) Inhibitory effect of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res*, 49: 5111–5117.

McCann SE, Kulkarni S, Trevisan M. (2006) Dietary lignan intakes and risk of breast cancer by tumor estrogen receptor status. *Breast Cancer Res Treat*, 99(3): 309–11.

Melius P, *Herbárium, Kritérium Könyvkiadó, Bukarest, 1979, 85.*

Mercader-Ros MT, Lucas-Abellan C, Fortea MI, Gabaldon JA, Nunez-Delicado E. Increase of antioxidant capacity of flavonols in the presence of cyclodextrins. The 15th International Cyclodextrin Symposium, May 9-12, 2010 Vienna, Austria, Abstract book No. P-091

Messner M, Kurkov SV, Jansook P, Loftsson T. (2010) Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. *Int J Pharm*, 387(1-2): 199-208.

Morris C, Thorpe J, Ambrosio L, Santin M (2006) The Soybean Isoflavone Genistein Induces Differentiation of MG63 Human Osteosarcoma Osteoblasts. *J Nutr* 136(5): 1166-70.

Miyazawa I, Ueda H, Nagase H, Endo T, Kobayashi S, Nagai T. (1995) Physicochemical properties and inclusion complex formaton of d-cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Sci*, 3(3): 153-162.

Mukherjee TK, Nathan L, Dinh H, Reddy ST, Chaudhuri G. (2003) 17- epiestriol, an estrogen metabolite, is more potent than estradiol in inhibiting vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) mRNA expression. *J Biol Chem*, 278: 11746 –52.

Moule GR, Braden AWH, Lamond DR. (1963) The significance of oestrogens in pasture plants in relation to animal production, *Animal Breeding Abstracts* 31: 139-157.

Nagy B, Simándi B, András CsD. (2008) Characterization of packed beds of plant materials processed by supercritical fluid extraction. *J Food Eng*, 88(1): 104-113.

Nelson LR, Bulun SE. (2001) Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol*, 45(3): S116-24.

Newton KM, LaCroix AZ, Levy L, Li SS, Qu P, Potter JD, Lampe JW. (2006) Soy protein and bone mineral density in older men and women: A randomized trial. *Maturitas*, 55(3): 270-277.

Nguyen TK, Galons H, Chemtob C. Study of inclusion compounds of rutin, *Congr. Int. Technol. Pharm.*, 6th, 5 (1992) 408-16. *Assoc. Pharm. Galenique Ind.: Chatenay Malabry, Fr.* (Chem. Abstr. 119:15217)

Ostlund Jr RE, Racette SB, Stenson WF. (2003) Inhibition of cholesterol absorption by phytosterol-replete wheat germ compared with phytosterol-depleted wheat germ. *Am J Clin Nutr*, 77(6): 1385-1389.

Oszagyan M, Simándi B, Sawinsky J, Kéry Á, Lemberkovics É, Fekete J. (1996) Supercritical fluid extraction of volatile compounds from lavandin and thyme. *Flavour Fragr J*, 11: 157-165.

Pelissero C, Lenczowski M, Chinzi D, Davail-Cuisset B, Sumpter J, Fostier A. (1996) Effects of flavonoids on aromatase activity, and in vitro study. *J Steroid Biochem Mol Biol* 57: 215–223.

Pfitscher A, Reiter E, Jungbauer A. (2008) Receptor binding and transactivation activities of red clover isoflavones and their metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol* 112: 87–94.

Picherit C, Coxam V, Bennetau-Pelissero C, Kati-Coulibaly S, Davicco MJ, Lebecque P, Barlet JP. (2000) Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Nutr*, 130(7): 1675-81.

Pietta P, Mauri P, manera E, Ceva P. (1990) Determination of isoflavones from *Ononis spinosa* L. extracts by high-performance liquid chromatography with ultraviolet diode-array detection. *J Chrom A*, 513: 379-400.

Pietta P, Calatroni A, Zio C. (1983) High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from *Ononis spinosa* L. *J Chrom A*, 280: 172-175.

Piller R, Chang-Claude J, Linseisen J. (2006) Plasma enterolactone and genistein and the risk of premenopausal breast cancer. *Eur J Cancer Prev*, 15(3): 225–32.

Piontek M, Hengels KJ, Porschen R, Strohmeyer G. (1993) Antiproliferative effect of tyrosine kinase inhibitors in epidermal growth factor-stimulated growth of human gastric cancer cells. *Anticancer Res*, 13(6A): 2119-23.

Polini N, Rauschemberger MB, Mendiberri J, Selles J, Massheimer V. (1997) Effect of genistein and raloxifene on vascular dependent platelet aggregation. *Mol Cell Endocrin*, 267(1-2): 55-62.

Prins GS, Warner M, Woodham C, Chang W, Kuiper G, Gustafsson JA. (1998) Estrogen receptor beta mRNA ontogeny in the rat prostate and effects of neonatal estrogen receptor on the expression pattern. *Endocrin*, 139: 874–883.

Racette SB, Lin X, Lefevre M, Anderson Spearie C, Most MM, Ma L, Ostlund jr RE. (2010) Dose effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism: a controlled feeding study. *Am J Clin Nutr*, 91(1): 32-38.

Redenti E, Selva A, Pasini M, Ventura P, Casetta B. (1995) Study of the salts with organic hydroxy acids of the terfenadine β -cyclodextrin inclusion complex in solution ionspray mass spectrometry. *J Mass Spectr*, 30(1): 219-220.

Record IR, Dreosti IE, McInerney JK. (1995) The antioxidant activity of genistein in vitro. *J Nutr Biochem*, 6(9): 481-485.

Ratnasooriya CC, Vasantha Rupasinghe HP. (2012) Extraction of phenolic compounds from grapes and their pomace using β -cyclodextrin. *Food Chem*, 134(2): 625-631.

Rezende BA, Cortes SF, De Sousa FB, Lula IS, Schmitt M, Sinisterra RD, Lemos VS. (2009) Complexation with β -cyclodextrin confers oral activity on the flavonoid dioclein. *Int J Pharm*, 367(1-2): 133-139.

Rimbach G, Weinberg PD, de Pascual-Teresa S. (2004) Sulfation of genistein alters its antioxidant properties and its effect on platelet aggregation and monocyte and endothelial function. *Biochim Biophys Acta*, 1670: 229–37.

Rowan MG, Dean PDG. (1972) α -Onocerin and sterol content of twelve species of *Ononis*. *Phytochem*, 11: 3263–3265.

Sabadini E, Cosgrove T, Egídio FC. (2006) Solubility of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) in H₂O and D₂O: a comparative study. *Carbohydr. Res*, 341(2): 270-274.

Schleicher RL, Lamartiniere CA, Zheng M, Zhang M. (1999) The inhibitory effect of genistein on growth and metastasis of a transplantable rat accessory sex gland carcinoma. *Cancer Letters*, 136: 195-201.

Schneider F, Hacket V, Rudiger H, Ikeda. (1998) NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Chem Rev*, 98:1755.

Setchell KDR, Gosselin SJ, Welsh MB, Johnston JO, Balistreri WF, Kramer LW, Dresser BL, Tarr MJ. (1987) Dietary estrogens--a probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs. *Gastroenterology*, 93: 225–233.

Setchell KDR, Adlercreutz H, in: I.R. Rowland (Ed.), *The Role of the Gut Flora in Toxicity and Cancer*, Academic Press, London, 1988: 315–346.

Setchell KD. (1998) Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr*, 68: 1333S–1346S.

Setchell KD és Cassidy A. (1999) Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr*, 129: 758S–767S.

Shaw PE, Tatum JH, Wilson CW. (1984) Improved flavor of navel orange and grapefruit juices by removal of bitter components with β -cyclodextrin polymer. *J Agric Food Chem*, 32(4): 832-836.

Shu S, Barujan HA, Sakanaka S, Kin B, Fujiki M. (1995) Removal of caffeine from tea and coffee by cyclodextrin polymer. *Jpn Kokai Tokkyo Koho*, 5.

Shu XO, Jin F, Dai Q. (2001) Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women. *Cancer Epidem Biomarkers Prev*, 10(5): 483–488.

Shulman M, Cohen M, Soto-Gutierrez A, Yagi H, Wang H, Goldwasser J, Lee-Parsons CW, Benny-Ratsaby O, Yarmush ML, Nahmias Y. (2011) Enhancement of naringenin bioavailability by complexation with hydroxypropoyl- β -cyclodextrin. *PLoS ONE*, 6(4): e18033.

Sidhu GS, Oakenfull DG. (1992) Cyclodextrin/cholesterol complexation and technology for removing cholesterol from eggs and dairy products. *Minutes Int Symp Cyclodextrins*, 6th 314-323.

Souchet N, Laplante S. (2007) Seasonal and geographical variations of sterol composition in snow crab hepatopancreas and pelagic fish viscera from Eastern Comp. *Biochem. and Phys. Part B: Biochem. and Mol. Biol*, 147(3): 378-386.

Şöhretoğlu, D. (2007) Tedavide Kullanılan Bitkiler. *Ononis spinosa* FFD monografı Ed. Demirezer Ö, Ed. Yrd. Ersöz T, Saraçoğlu İ, Şener B, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.

Sri KV, Kondaiah A, Ratna JV, Annapurna A. (2007) Preparation and characterization of quercetin and rutin cyclodextrin inclusion complexes. *Drug Dev Ind Pharm*, 33(3): 245-253.

Stancanelli R, Mazzaglia A, Tommasini S, Calabro ML, Villari V, Guardo M, Ficarra P, Ficarra R. (2007) The enhancement of isoflavones water solubility by complexation with modified cyclodextrins: A spectroscopic investigation with implications in the pharmaceutical analysis. *J Pharm Biomed Anal*, 44(4): 980-984.

Steensma A, Noteborn HPJM, Kuiper HA. (2004) Comparison of Caco-2, IEC-18 and HCEC cell lines as a model for intestinal absorption of genistein, daidzein and their glycosides. *Environm Tox Pharm*, 16: 131–139.

Steensma A, Noteborn HPJM, van der Jagt RCM, Polman THG, Mengelers MJB, Kuiper HA. (1999) Bioavailability of genistein, daidzein, and their glycosides in intestinal epithelial Caco-2 cells. *Environm Tox Pharm*, 7: 209–212.

Szejtli J. *Cyclodextrins and their Inclusion Complexes*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1982: 162-169.

Szejtli J. (1990) Ciklodextrinek és zárványkomplexeik a biotechnológiában és a vegyiparban. *Magyar Kémikusok Lapja*, 45. évfolyam, 34. szám

Steiner T, Koelner G. (1994) Crystalline beta-cyclodextrin hydrate at various humidities: fast, continuous, and reversible dehydration studied by X-ray diffraction. *J Am Chem Soc*, 116: 5122-5128.

Szerman N, Schroh I, Rossi AL, Rosso AM, Krymkiewicz N, Ferrarotti SA. (2007) Cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans*. *Biores Tech*, 98(15): 2886-2891.

Tahara S, Ibrahim R. (1995) Prenylated isoflavonoids - an update. *Phytochemistry* 38: 1073-1094.

Valero MS, Garay RP, Gros P, Alda JO. (2006) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) chloride channel and Na-K-Cl cotransporter NKCC1 isoform mediate the vasorelaxant action of genistein in isolated rat aorta. *Eur J Pharmacol*, 544(1-3): 126-131.

- Veitch NC. (2007) Isoflavonoids of the Leguminosae. *Nat Prod Rep*, 24: 417-464.
- Verdrengh M, Jonsson IM, Holmdahl R, Tarkowski A. (2003) Genistein as an anti-inflammatory agent. *Inflamm Res*, 52(8): 341-346.
- Wagner H, Bladt S. *Plant Drug Analysis*, Springer-Verlag, 2nd ed., 338 (1996)
- Walle KU, French KL, Walgren RA, Walle T. (1999) Transport of genistein-7-glucoside by human intestinal Caco-2 cells: potential role for MRP2. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 103: 45.
- Wang C, Makela T, Hase TA, Adlercreutz CHT, Kurzer MS. (1994) Lignans and isoflavonoids inhibit aromatase enzyme in human preadipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 50: 205–212.
- Ward H, Kuhnle GGC, Mulligan AA, Lentjes MAH, Luben RN, Khaw KT. (2010) Breast, colorectal and prostate cancer risk in EPIC-Norfolk in relation to phytoestrogen intake using an improved database. *Am J Clin Nutr*, 91: 440–448.
- Wilt TJ, MacDonald R, Ishani A. (1999) Beta-sitosterol for the treatment of benign prostatic hyperplasia: a systematic review. *BJU Int*, 83(9): 976-83.
- Wiseman P. (2000) Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F2-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *Am J Clin Nutr*, 72(2): 395-400.
- Wu AH, Ziegler RG, Horn-Ross PL. (1996) Tofu and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Cancer Epidem Biomark Prev*, 5: 901–906.
- Yan L, Spitznagel EL. (2009) Soy consumption and prostate cancer risk in men: a revisit of a meta-analysis. *Am J Clin Nutr*, 89: 1155–1163.
- Yilmaz BS, Ozbek H, Citoglu GS, Ugras S, Bayram I, Erdogan E. (2006) Analgesic and hepatotoxic effects of *Ononis spinosa* L. *Phytoter Res*, 20(6): 500-503.
- Xu YC, Leung SWS, Yeung DKY, Hu LH, Chen GH, Che CM, Man RYK. (2007) Structure-activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. *Phytochem*, 68(8): 1179-1188.

Xu ZH, Li L, Wu FW, Tan SJ, Peng J, Zhang ZB. (2005) *Jingxi Huagong*, 22(10): 762-765

Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC. (1993) Migration patterns and breast cancer risk in Asian–American women. *J Natl Cancer Inst*, 85: 1819–27.

<http://www.biologie.uni-hamburg.de>

<http://www.carbomer.com/products.html>

11. Saját publikációk jegyzéke

1. Daruházi Á, Szarka Sz, Héthelyi É, Simándi B, Gyurján I, László M, Szőke É, Lemberkovics É. (2008) GC-MS Identification and GC-FID Quantitation of Terpenoids in *Ononidis spinosae Radix*. *Chromatographia*, 68(1): 71-76.
2. Daruházi Á, Sente L, Balogh B, Mátyus P, Béni Sz, Takács M, Gergely G, Horváth P, Szőke É, Lemberkovics É. (2008) Utility of cyclodextrins in the formulation of genistein: Part 1. Preparation and physicochemical properties of genistein complexes with native cyclodextrins. *J Pharm Biomed Anal* 48(3): 636-640.
3. Daruházi Á, Szarka Sz, Héthelyi É, Simándi B, Gyurján I, László M, Szőke É, Lemberkovics É. (2009) Terpenoidok az *Ononidis spinosae radix* szuperkritikus és hagyományos kivonataiban. *Olaj, szappan, kozmetika* 58: 25-31.
4. Daruhazi A. (2011) Cyclodextrins for flavonoid formulations. *Cyclodextrin news* 25(4): 1-10.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Dr. Szőke Éva professzor asszonynak és Dr. Blázovics Anna docens asszonynak, a Semmelweis Egyetem Farmakognózia Intézet korábbi és jelenlegi igazgatójának, hogy lehetővé tették az értekezésemhez szükséges vizsgálataim elvégzését, és segítőkész tanácsaikkal támogatták munkámat.

Végtelen hálával tartozom Dr. Lemberkovics Éva professzor asszonynak, témavezetőmnek, aki szakmai és emberi segítségével, megértésével és hatalmas türelemmel segített Ph.D. munkám során. Köszönöm neki a munkámhoz szükséges szakmai tudásának átadását.

Rendkívüli hálával tartozom Dr. Sente Lajosnak, a magyar ciklodextrin-kutatás fejének, aki utolérhetetlen tudásával és kutatói példamutatásával rengeteget segített a ciklodextrinokkal végzett munkám koordinálásában. Külön köszönöm neki végtelen türelmét és emberségét, s azt, hogy mindvégig kitartott mellettem.

Külön köszönöm Dr. Szarka Szabolcs egyetemi tanársegédnek és Héthelyi Ivánné szakértőnek a gázkromatográfiás vizsgálatokban nyújtott nélkülözhetetlen segítségüket és szakmai tanácsaikat.

Hatalmas köszönet illeti Dr. Horváth Pétert és Dr. Gergely Andrást a CD spektroszkópiás vizsgálatokért, Dr. Balogh Balázst és Dr. Mátyus Pétert a molekulaoptimalizációért, s Dr. Béni Szabolcsot a ¹H-NMR vizsgálatokért, valamint Dr. Kiss Tímeát és Dr. Vecsernyés Miklóst a Debreceni Egyetem volt Ph.D. hallgatójának a Caco-2 vizsgálatokért.

Köszönetet mondok Dr. Simándi Béla egyetemi docensnek, a Budapesti Műszaki Egyetem Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszék munkatársának, valamint Dr. Gyurján István professzor úrnak és Dr. László Miklós tudományos főmunkatárs úrnak az, s az Eötvös Loránd Tudományegyetem Növény szerkezet-tani Tanszék munkatársainak a szuperkritikus kivonások elvégzéséért.

Különleges hálával tartozom Dr. Kursinszki László docens úrnak, az LC-MS vizsgálatokban nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért, szakmai tudásom gyarapításáért, és nem utolsó sorban barátságáért.

Nagyon köszönöm Ph.D. hallgató társaimnak, különösen Dr. Böszörményi Andreának, Dr. Blazics Balázsnak és Dr. Kertesy Dórának, s mindenki másnak az értékes szakmai tanácsokat, segítséget, s azt, hogy bármikor bizalommal fordulhattam hozzájuk.

Nagyon köszönöm Dr. Balázs Andreának, hogy intézeti bírálatában hasznos tanácsokkal látott el, s ezzel segítette dolgozatom elkészítését annak végleges formájában.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Farmakognózia Intézet minden munkatársának, akik szakmai és emberi támogatásukkal segítették munkámat.

Az *Ononis spinosa* terpenoid kivonatokkal kapcsolatos vizsgálataimat a GVOP 3.11.-2004-05-0397/3.0 pályázat keretében végeztem.

Köszönettel tartozom a Richter Centenáriumi Alapítványnak disszertációm befejezésének támogatásáért.

Kimondhatatlanul hálás vagyok édesanyámnak, édesapámnak – aki révén a ciklodextrin témába csöppentem, s aki sajnos már nem lehet velem -, mostohaapámnak, nővéremnek, nagyszüleimnek, egész családomnak és minden barátomnak, hogy szerető támogatásukkal és mérhetetlen türelmükkel mindig mellettem álltak.