

# Szuperkritikus állapotú oldószerek alkalmazása az őszi margitvirág vizsgálatában: extrakciótól az analízisig

Doktori tézisek

**Perjéssy-Végh Krisztina Emese**

Semmelweis Egyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kéry Ágnes Ph.D., c. egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Horváth Györgyi, Ph.D, egyetemi docens  
Dr. Völgyi Gergely, Ph.D, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Bagdy György, az MTA doktora, egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Máthé Imre, az MTA doktora, professor emeritus  
Dr. Ludányi Krisztina Ph.D., egyetemi docens

Budapest  
2020

## Bevezetés

A gyógynövények gyógyászati alkalmazása világszerte nagy népszerűségnek örvend. A betegek egyre gyakrabban keresnek szintetikus gyógyszerelésük kiegészítésére vagy akár helyettesítésére is integratív/komplementer gyógymódokat.

Az őszi margitvirág évszázadok óta ismert gyógy- és dísnövény. Az Asteraceae család több mint 160 fajt számláló *Tanacetum* nemzetség tagja. Európában és Ázsiában honos, de napjainkra az egész világon elterjedt. Migrén, fejfájás és egyéb lázas állapotok, nőgyógyászati problémák és fájdalmas, gyulladós panaszok kezelésére alkalmazzák. A növény fő tartalmi anyagai a szeszkviterpén-laktonok, flavonoidok és illó komponensek. Több mint 30 szeszkviterpén-laktont azonosítottak, hatás szempontjából legfontosabb vegyület a partenolid. Napjainkban is intenzíven vizsgálják a migrént megelőző és gyulladásgátló hatását, valamint félszintetikus származékának, a dimetilamino-partenolidnak tumorelles aktivitását, hatásmechanizmusát, és szerkezet-hatás összefüggéseit.

Az őszi margitvirág kedvező biológiai hatásaiban, elsősorban a migrénelles aktivitásban szerepet játszó komponensek kivonásához olyan extrakciós módszerekre van szükség, melyekkel a jó vér-agy gát penetrációs képességgel rendelkező, szemipoláris vegyületek előszűrése megvalósítható. Erre kiválóan alkalmas a napjainkban elsősorban környezetbarát tulajdonságuk miatt egyre népszerűbb szuperkritikus állapotú oldószerekkel történő extrakció. Utóbbi számos előnnyel rendelkezik a hagyományos kivonási technikákkal szemben. Eltérő polaritású és méretű molekulák együttes extrakciója valósítható meg mechanikai kompresszióval. A szuperkritikus állapotú oldószerek kedvező tulajdonságait az extrakció mellett az analitikai vizsgálatokban is kihasználhatjuk. A szuperkritikus folyadékkromatográfia számos előnnyel rendelkezik. A módszert egyenértékűnek tekintik a normál fázisú folyadékkromatográfiával, valamint a fordított fázisú folyadékkromatográfiával vizsgálható vegyületek 80-85%-a is elemezhető SFC rendszerekben is.

Munkánk elsődleges célja az őszi margitvirágról rendelkezésre álló fitokémiai és gyógyszerészeti információk újraértékelése és kiegészítése volt. Figyelembe véve, hogy napjainkban a gyors és környezetbarát módszerek előtérbe kerültek, valamint az őszi margitvirágban egyidejűleg jelen lévő molekulák szemipoláris természetűek, célunk volt szuperkritikus oldószereket alkalmazó módszerek fejlesztése. Feltételeztük, hogy a partenolid mellett más komponensek is részt vehetnek az őszi margitvirág kivonatok központi idegrendszeri hatásában, így indokoltnak tartottuk a *Tanacetum parthenium* L. szuperkritikus folyadékkivonataiból a jó vér-agy gát penetrációs képességgel rendelkező (BBB +)

komponensek izolálását, majd azok azonosítását. Célunk volt emellett az illóolajminták és a szuperkritikus állapotú oldószeres kivonatok minőségi és mennyiségi elemzése.

## Célkitűzések

Munkánk elsődleges célja az őszi margitvirágról rendelkezésre álló fitokémiai és gyógyszerészeti információk újraértékelése és kiegészítése volt. Figyelembe véve, hogy napjainkban a gyors és környezetbarát módszerek előtérbe kerültek, valamint a növényben egyidejűleg jelen lévő molekulák szemipoláris természetűek, célunk volt szuperkritikus állapotú oldószereket alkalmazó módszerek fejlesztése.

A kísérletes munka célkitűzései az alábbiak voltak:

1. Az őszi margitvirág minták szuperkritikus fázisú oldószerekkel történő extrakciós módszerének optimalizálása a kivonatok hozamának és partenolid-tartalmának maximalizálása érdekében, továbbá az optimalizált SFE-módszer hagyományos kivonási módszerekkel való összehasonlítása.
2. Validált kvalitatív és kvantitatív szuperkritikus folyadék kromatográfias módszer kidolgozása az előállított kivonatok partenolid tartalmának meghatározására.
3. A kivonatokban egyidejűleg jelen lévő komponensek minőségi analízise tömegspektrometriás módszerekkel, különös tekintettel a metilált flavonoidokra.
4. A *Tanacetum parthenium* L. szuperkritikus állapotú oldószeres kivonatainak vizsgálata a jó vér-agy gát penetrációs képességgel rendelkező (BBB +) vegyületekre, ezek izolálása és azonosítása.
5. A vízgőzdesztillációval előállított illóolajminták és a szuperkritikus állapotú oldószeres kivonatok kvalitatív és kvantitatív elemzésére HS-SPME-GC / MS módszer alkalmazása. A kivonatok kámfor tartalmának vizsgálatára szuperkritikus folyadékkromatográfias módszer kifejlesztése és validálása.

## Anyagok és módszerek

### Növényminta

Magminták gyűjtése a Vácrátóti Botanikus kertből, a Debreceni Egyetem Botanikus Kertjéből és a Bonni Botanikus Kertből (2011) történt. A minták vetésére, palántázására és kiültetésére Érden került sor. A vizsgálati mintákat virágzás előtt és alatt gyűjtöttük be.

### Extrakció és mintaelőkészítés

A növényminták tartalmi anyagainak kivonására különböző extrakciós módszereket alkalmaztunk: szuperkritikus állapotú oldószeres extrakciót, Soxhlet extrakciót, ultrahangos vibroextrakciót és vízgőzdesztillációt.

A szuperkritikus állapotú oldószeres extrakció Jasco PU-2080 műszeren történt, 1 ml-es extraháló edénnyel felszerelve (kb. 0,5 g). A kivonási idő 1 óra, oldószer áramlási sebesség 0,4 ml / perc volt. A vizsgálathoz egy 3<sup>3</sup> teljes faktoros kísérleti tervet állítottunk össze, amely 27 extrakcióból állt és válaszfelület analízist alkalmaztunk a változók hatásának vizsgálatára és az extrakció optimalizálására. Az eredmények reprodukálhatóságának ellenőrzésére a terv centrumában 3 mérést végeztünk. A mérési pontokra válaszfelületet illesztve vizsgáltuk a hőmérséklet, a nyomás és a módosító oldószer mennyiségének lineáris és négyzetes hatását, valamint egymással való kölcsönhatását. A 95%-os megbízhatósági intervallumon nem szignifikáns hatásokat kiemeltük a felületet leíró másodfokú egyenletről, melynek következtében az R<sup>2</sup> értékek emelkedtek.

Soxhlet készülékben készítettünk kivonatokat a Vácrátóti Botanikus Kertből származó mintákból, kivonószerként kloroformot és metanolt alkalmazva. Az extrakció időtartama 4-4 óra volt. A kivonatokat rotációs vákuumdesztillálóban 50°C-on szárazra pároltuk, HPLC minőségű acetonitrilben (3-4 ml) oldottuk, majd Phenex-RC 15 mm, 0.2 µm fecskendőszűrőn szűrtük.

Ultrahangos vibroextrakciós kivonást végeztünk friss és szárított mintákból kloroformmal szobahőmérsékleten. A kivonási idő 30 perc volt.

A minták illóolaj tartalmának kivonása céljából a Ph.Hg.VII. leírásának megfelelően vízgőzdesztillációt alkalmaztunk. A kivonási idő 3 óra volt.

## **Kromatográfiai módszerek:**

### **Partenolid tartalom mennyiségi meghatározás:**

Készülék: Waters Acquity UPC<sup>2</sup> (bináris CO<sub>2</sub> pumpa, automata mintaadagoló, diódasoros UV detektor, convergence manager). A partenolid tartalom kvantitatív vizsgálata Acquity UPC<sup>2</sup> BEH C18 (100mmx3mm, 1,7 µm) oszlopon történt, 45°C-ra termosztálva. Izokratikus programot alkalmaztunk 2 ml/perces áramlási sebesség és 2000 psi nyomás mellett, ahol az A eluens CO<sub>2</sub>, a B eluens acetonitril volt. A kromatogramokat 210 nm-en regisztráltuk, az UV spektrumokat a 200 és 400 nm közti tartományban vettük fel.

### **Kámfor tartalom mennyiségi meghatározás:**

Készülék: Waters Acquity UPC<sup>2</sup> (bináris CO<sub>2</sub> pumpa, automata mintaadagoló, diódasoros UV detektor, convergence manager). A kámfor tartalom kvantitatív vizsgálata Acquity UPC<sup>2</sup> BEH-2EP (100mmx3mm, 1,7 µm) oszlopon történt, 50°C-ra termosztálva. Gradiens elúciós programot alkalmaztunk 2 ml/perces áramlási sebesség és 2000 psi nyomás

mellett, ahol az A eluens CO<sub>2</sub>, a B eluens izopropanol volt: 0-10 perc 0% →10% B. A kromatogramokat 290 nm-en regisztráltuk, az UV spektrumokat a 200 és 400 nm közti tartományban vettük fel.

#### **Szemi-Prep HPLC:**

Készülék: Hanbon AS20005 (NP7005C preparatív pumpa, NU3000C UV detektor, preparatív injektor). A szuperkritikus oldószeres kivonatban jelenlévő komponensek elválasztása és izolálása Phenomenex Luna C18 (150 x 10.0 mm, 5µm) oszlopon történt. Gradiens elúciós programot alkalmaztunk, ahol az A: 0.1 % TFA vízben B: acetonitril: víz= 95: 5 volt: 0-30 perc 30% →100% B, 30-35 perc 100% B. A kromatogramokat 254 nm-en regisztráltuk, az UV spektrumokat a 200 és 400 nm közti tartományban vettük fel.

#### **HPLC-DAD-MS/MS:**

Készülék: Agilent 6410 hármas kvadrupól tömegspektrométer elektropray (ESI) ionforrással Agilent 1200 HPLC rendszerhez kapcsolva. A kromatográfiás elválasztást 45°C-ra termosztált Kinetex-XB C18 (150×4.6 mm, 2.6 µm) oszlopon végeztük. Gradiens elúciós programot alkalmaztunk 1ml/perces áramlási sebességgel, ahol az A: 0.1 % TFA vízben, B: acetonitril: víz= 95: 5, 0.1% TFA: 0-20 perc 5% →28% B, 20-40 perc 28% →80% B, 40-55 perc 80% →100% B, 55-65 perc 100% B. A kromatogramokat 210±5 nm és 254±5 nm-en regisztráltuk, az UV spektrumokat a 200 és 400 nm közti tartományban vettük fel.

ESI paraméterek: porlasztó gáz nyomása: 40 psi, szárító gáz hőmérséklete: 350 °C, áramlási sebessége: 13 l/min, kapilláris feszültség: 4000 V, fragmentor feszültség: 135 V, ütközési energia: 10-50 eV, scan tartomány: 50-1000 Dalton (1.0 ciklus/sec)

#### **SPME-GC-MS:**

A mintavétel egy 65 µM StableFlex PDMS/DVB SPME szállal felszerelt CTC Combi PAL műszerrel történt, az inkubációs idő 5 perc volt 100°C-on, a mintavétel 10 perc 100°C-on, a deszorpció 1 perc 250°C-on.

Készülék: Agilent 6890N/5973N GC-MSD

Az elválasztás Agilent HP-5MS (30m × 250µm × 0.25µm) oszlopon történt, az injektor hőmérséklete 250°C volt. Az alkalmazott hőmérséklet program a következő volt: 60°C → 200°C, 8°C/perc, 200 → 230°C, 10°C/perc, 230 → 250°C, 10 °C/perc.

EI paraméterek: 70 eV, full scan, kvadrupól (41–500 amu, 3.2 scan/mp)

#### **Mágneses magrezonancia spektroszkópia:**

A szuperkritikus állapotú oldószeres extraktumból izolált komponenseket mágneses magrezonanciás mérésekkel azonosítottuk.

Készülék: Varian DDR NMR, 5 mm IDPFG szondafej. A teljes rezonancia-hozzárendeléseket a közvetlen  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ , a nagy hatótávolságú  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  és a skaláris spin – spin összekapcsolódásokból állapítottuk meg 1D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , 1D TOCSY,  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  gCOSY, zTOCSY kísérletekből. A vizsgálati hőmérséklet 297K volt, a méréseket 5mm-es standard NMR mintacsövekkel végeztük.

### **PAMPA-BBB:**

A CNS hatás vizsgálatára nagy áteresztőképességű, vér-agy gát (BBB) specifikus effektív permeabilitás mérésére szolgáló szelektív, in vitro tesztrendszert alkalmaztunk.

Az őszi margitvirág szuperkritikus oldószeres kivonatát és az egyes vegyületek oldatát dimetil-szulfoxiddal (DMSO) állítottuk elő 50,0 mg/ml és 10,0 mM koncentrációban. Ezeket PBS-sel (foszfátpufferolt sóoldat; pH = 7,4) hígítottuk, majd a kapott donoroldatokat (295,0  $\mu\text{L}$  puffer + 5,0  $\mu\text{L}$  DMSO-oldat) egy órán keresztül szobahőmérsékleten rázattuk egy 96 üregű polipropilén lemezen (Agilent, Waldbronn, Németország). A szűrést követően (Vacuum Manifold, Millipore) párhuzamos mesterséges membránpermeabilitási vizsgálati (PAMPA) rendszert alkalmaztunk a vizsgált vegyületek effektív permeabilitásának ( $P_e$ ) meghatározására. A felső lemez mindegyik mintahelyét (96 üregű polikarbonát alapú szűrő donorlemezek (Multiscreen™ -IP, MAIPN4510, pórusméret 0,45  $\mu\text{m}$ ; Millipore)) befedtünk 5  $\mu\text{L}$  sertés agy lipid extraktum (PBLE) oldattal (16,0 mg PBLE és 8,0 mg koleszterin 600,0  $\mu\text{L}$  n-dodekánban oldva), majd a minta 150,0  $\mu\text{L}$ -ét a membránra helyeztük. Az alsó lemezt (96 lyukú poli-tetrafluoretilén (PTFE) akceptorlemezek (Multiscreen Acceptor Plate, MSSACCEPTOR; Millipore)) 300,0  $\mu\text{L}$  pufferoldattal (0,01 M PBS puffer, pH = 7,4) megtöltöttük. A donor és az akceptor lemezeket összeillesztettük, majd a rendszert 37 °C-on 4 órán át inkubáltuk Heidolph Titramax 1000-ben. Az inkubálás után a PAMPA lemezeket szétválasztottuk, és a vegyületek koncentrációját meghatároztuk a donor (CD (t)) és az akceptor (CA (t)) oldatokban, valamint a donor oldatot nulla időpontban (CD (0)) HPLC-DAD módszer segítségével.

## Eredmények

### Szuperkritikus állapotú oldószeres és hagyományos extrakció

Vizsgálataink során egy 3 mennyiségi faktoros 3 szintes kísérleti tervet állítottunk össze, melyben a hőmérséklet 40, 60 és 80°C, a nyomás 10,20 és 30 Mpa volt, az eluens polaritásának változtatására pedig 0, 5 és 10% etanolt alkalmaztunk. Ez a teljes faktoros kísérleti terv 27 extrakcióból és az eredmények reprodukálhatóságának vizsgálatára a terv centrumában elvégzett 3 mérésből állt. A mérési pontokra válaszfelületet illesztve vizsgáltuk a hőmérséklet, a nyomás és a módosító oldószer mennyiségének lineáris, négyzetes és kölcsönhatását. Munkánk célja az volt, hogy olyan optimális extrakciós körülményt találjunk, amelyen maximalizálni tudjuk a kivonatok partenolid tartalmát. Polinomiális regressziót alkalmaztunk a fő befolyásoló tényezők vizsgálatára és a trendek kiértékelésére.

A minták szárazanyagtartalmának vizsgálatánál megállapítottuk, hogy a vizsgált hőmérséklet, nyomás és módosító oldószer mennyiségek esetén nem értük el a kitermelési maximumot. Az illesztett modell jóságát megerősítette az előre jelzett és a mért értékek diagramja, melyen a pontok az egyenes mentén jó korrelációval helyezkedtek el. A hatások Pareto diagramja alapján a módosító oldószer mennyisége megváltoztatta a szuperkritikus oldószer polaritását, mind értékes és mind a kevésbé értékes komponensek kioldódását növelte, így az összkivonat mennyiségére pozitív hatással bírt. A nyomás és a hőmérséklet is jelentős pozitív hatást gyakorolt a kivonásra, ugyanígy a nyomás kvadrátikus hatása és a nyomás és hőmérséklet interakció.

A partenolid tartalom vizsgálatánál megállapítottuk, hogy az optimum pont a vizsgált tartományon belül található. Az illesztett modell jóságát megerősítette az előre jelzett és a mért értékek diagramja, melyen a pontok az egyenes mentén jó korrelációval helyezkedtek el. A Pareto diagramm alapján a legnagyobb abszolút hatással a szuperkritikus állapotú széndioxid etanol tartalma bírt, negatívan befolyásolta az extrakciót. A hőmérséklet és nyomás hasonlóképpen a szárazanyag tartalomhoz, itt is pozitívan hatott. A virágzás előtt és alatt gyűjtött levél, valamint a virágzat partenolid tartalmának kritikus értékét 7%-os etanol tartalom mellett 22MPa-on és 64°C-on értük el. Megállapítottuk, hogy a szárazanyag-tartalom és a partenolid-tartalom optimum értéke nem esik egybe. A legmagasabb partenolid tartalmat a virágzatban mértük, amely 0.604 tömegszázalék volt.

A partenolid és további alkotóelemek kinyerésére a legtöbbször alkalmazott konvencionális módszer a Soxhlet extrakció. A legnagyobb hozamot ezzel a technikával a virágzás előtt gyűjtött levelekből értük el, a maximális partenolid-tartalmat pedig a



virágzatban mértük. Megfigyeltük, hogy a metanol alkalmazása 30-40% közötti hozamcsökkenést eredményezett a kloroformos kivonáshoz képest mindhárom mintában, mind az összkivonat mennyiségre, mind a kinyert partenolid tartalomra.

Az összkivonat és partenolid hozamot ultrahangos vibroextrakcióval is meghatároztuk. Az alkalmazott oldószer kloroform volt, a Soxhlet extrakció eredményei és a partenolid szemipoláris jellege miatt. Irodalmi adatok alapján a partenolid nagy mennyiségben található a növény mirigyszőreiben, így aprítás nélküli friss mintákat is vizsgáltunk. Ezen minták összkivonat hozama csökkent, de partenolid tartalma nőtt, mely igazolta ezt a feltételezést.

A hagyományos módszerek, mint a Soxhlet és az ultrahangos vibroextrakció továbbra is az első választás a vegyületek növényi mátrixokból történő kivonására. A szuperkritikus állapotú oldószeres extrakció gyors, környezetbarát alternatíva. Amint az eredményekből kitűnik, az utóbbival tudtuk a legnagyobb mennyiségű partenolidot, a legmagasabb koncentrációban kinyerni, ami megerősíti a módszer hatékonyságát és szelektivitását. Csak a friss levelek ultrahangos vibroextrakciója hozott hasonló eredményt, amely megerősíti, hogy a partenolid a növény mirigyszőreiben dúsul fel. Mivel ebben az esetben a mélyebb sejtszerkezetek nem sérültek meg, a coextraktumok, például a klorofill mennyisége kevesebb, mely a partenolid tartalom növekedését eredményezi a kivonatban.

### **Szeszkviterpén-laktonok és fenoloidok azonosítása - HPLC-DAD-ESI-QqQ-MS módszerrel**

A szuperkritikus állapotú folyadék kivonatban a karakterisztikus UV és tömegspektrumok alapján a partenolidon kívül 7 szeszkviterpén-laktont és további 13 flavonoid típusú molekulát azonosítottunk. A luteolin, apigenin, axillarin, kaszticin és a partenolid esetében az azonosítás a rendelkezésre álló standardokkal történt. A flavonoid típusú molekulák között két metilkvercetin izomert és egy-egy metoxiflavont, dihidroxikvercetin, dimetilkvercetin, trihidrox-trimetoxiflavont és dihidrox-trimetoxiflavont valószínűsítettünk a tömegspektrumok alapján. A tömegspektrumok és irodalmi adatok alapján kosztunolidot, dihidro- $\beta$ -ciklopiretrozint, tanacetol A-t, tanafillint, 3- $\beta$ -hidroxianhidroverlotrint, szeko-tanapartolid A-t, szeko-tanapartolide B-t, hiszpidulint azonosítottunk.

### **Penetráció a vér-agy gáton: PAMPA-BBB, Semi-Prep HPLC, NMR**

A szuperkritikus extraktum vegyületeinek esetleges központi idegrendszeri aktivitásának vizsgálatára a PAMPA-BBB modellt választottuk, amely alkalmas a

komponensek a vér-agy gáton keresztül történő passzív diffúziójának vizsgálatára komplex növényi mátrixokban.

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a partenolid mellett az előbbieken trihidrox(trimetoxiflavonként és dihidrox(trimetoxiflavonként valószínűsített metilált flavonok is átjutnak a vér-agy gátat modellező membránon, így potenciálisan hozzájárulhatnak az őszi margitvirág központi idegrendszeri hatásaihoz. Szerkezetük pontos azonosítására a komponenseket szemipreparatív folyadékkromatográfiával izoláltuk, majd mágneses magrezonancia mérésekkel azonosítottuk. A trihidrox(trimetoxiflavon komponens aceroninként és sudachitinként azonosítottuk, melyek egymástól egy metoxi, hidrox csoport orto/para helyzetében eltérő izomerek. A dihidrox(trimetoxiflavon komponens nevadenzinként azonosítottuk.

Az összkivonat után megvizsgáltuk a luteolin, az apigenin, a két izolált metilált flavonoid, az axillarin, a kaszticin, valamint a partenolid vér-agy gát átjutási képességét monokomponensként is. A sudachitin / aceronin és a partenolid  $\log P_e$  értékei a két esetben nem különböznek szignifikánsan. Ezzel szemben a nevadenzin nagyobb permeabilitási potenciált mutatott, amikor az extraktumban mértük, mint tisztított vegyületként. Ez a kivonat alkotóelemei között előforduló farmakokinetikai kölcsönhatások fennállásának lehet köszönhető. Monokomponensként a luteolin, az apigenin és a kaszticin szintén a BBB + tartományba esik, azonban ezeket az akceptor oldalon nem detektáltuk az összkivonat esetén. Bár az axillarin a nevadenzinnel összehasonlítható mennyiségben volt jelen az extraktumban, a PAMPA akceptor oldalán sem a teljes kivonatban, sem pedig különálló vegyületként mérve nem volt kimutatható, ami igazolja, hogy az axillarin BBB-

### **Illóolajok minőségi és mennyiségi analízise**

A vízgőzdesztillációval előállított illóolaj minták és a szuperkritikus állapotú oldószeres kivonatok összetételét HS-SPME-GC / MS módszerrel vizsgáltuk.

Az illóolajokban 11 különböző vegyületet azonosítottunk retenciós idejük és tömegspektrumuk alapján. A komponensek minden mintában jelen voltak, csak a százalékos megoszlásuk volt különböző. A szuperkritikus állapotú oldószeres kivonat csak 7 komponens tartalmazott. Minden mintában a legmagasabb mennyiségben a kámfor és a krizantil-acetát volt jelen.

Az egyes vegyületek komplex mátrixban történő vizsgálatához a szuperkritikus állapotú oldószer alkalmazó kromatográfiás módszer adekvát volt, a komponensek lipofil / hidrofil bifacialis jellege miatt. A kifejlesztett UPC<sup>2</sup> módszer gyors, érzékeny és

környezetbarát alternatívát ad a kámfor meghatározására különféle mintákban, mind illóolajok, mind szuperkritikus kivonatok esetén.

A levelek 0.59-0.69g/100g, a virágzat 0.32–0.39g/100g kámfort tartalmaztak. A legtöbb kámfor a levelekben találtuk, a legalacsonyabb kámfor tartalmat a szuperkritikus állapotú oldószeres kivonatokban mértük. A kivonatok kámfor tartalmának alacsony szinten tartása és annak pontos és precíz módszerrel történő ellenőrzése létfontosságú, annak súlyos központi idegrendszeri mellékhatásai miatt. Az SFE kivonás biztosítja a szelektivitást, így a biológiailag előnyös komponensek mellett a toxikus komponensek jelenléte minimalizálható. A kifejlesztett és validált SFC módszerrel a kámfortartalom mennyiségileg meghatározható volt az érzékenység és a nagyon jó reprodukálhatóság előnyével.

### **Következtetések, tézisek**

1. Szuperkritikus fázisú oldószeres extrakciós módszert alkalmaztunk a *Tanacetum parthenium* L. valószínűsíthetően biológiailag aktív hatóanyagainak előválogatására és dúsítására. Optimalizáltuk az őszi margitvirág szuperkritikus állapotú oldószeres extrakcióját a kivonatok szárazanyag és partenolid tartalmára. Három mennyiségi faktort vizsgáltunk három szinten, majd válaszfelület módszerrel elemeztük a hőmérséklet, a nyomás és a módosító oldószer hatását a kivonásra. A virágzás előtt és alatt gyűjtött levél, valamint a virágzat partenolid tartalmának kritikus értékét 7%-os etanol tartalom mellett 22MPa-on és 64°C-on értük el. Megállapítottuk, hogy a szárazanyag-tartalom és a partenolid-tartalom optimum értéke nem esik egybe. A legmagasabb partenolid tartalmat a virágzatban mértük (0,604%).

2. Az extraktumok tartalmi anyagainak minőségi és mennyiségi vizsgálatára megbízható, gyors és pontos konvergens kromatográfias módszereket fejlesztettünk és validáltunk. Bizonyítottuk a módszer előnyeit, így a nagy felbontást, az érzékenységet, a jó reprodukálhatóságot és a rövid analízis időt. HPLC-DAD-MS/MS módszerrel igazoltuk a kivonatok komplexitását.

3. A partenolid mellett 7 terpenoidot, nevezetesen kosztunolidot, dihidro- $\beta$ -ciklopiretrozint, tanacetol A izomert, tanafillint, 3- $\beta$ -hidroxi-dihidroverlotrint, szeko-tanapartolid A-t és szeko-tanapartolid B-t azonosítottunk. Az extraktumban 12 flavonoid

komponenst detektáltunk. Az apigenin, luteolin, kaszticin és axillarin mellett további nyolc metilált flavonoidot azonosítottunk.

4. A szuperkritikus állapotú oldószeres extraktum CNS-hatásért felelős komponenseinek feltárására és azok hatás helyére való eljutásának igazolására nagy áteresztőképességű, a vér-agy gát (BBB) specifikus effektív permeabilitás mérésére szolgáló szelektív, in vitro tesztrendszer alkalmaztunk (PAMPA-BBB).

- A fő komponens partenolid mellett további szeszkviterpén-laktonokat és metilált flavonoidokat azonosítottunk az akceptor oldalon.
- Az izolált BBB+ metilált flavonoidokat szudachitin/aceronin izomerként és nevadenzinként azonosítottuk. A szudachitin és nevadenzin jelenlétét korábban bizonyították az Asteraceae családban, azonban mindhárom flavonoidot elsőként írtuk le a *Tanacetum parthenium* L.-ban.
- A komponenseket a PAMPA-BBB modellben külön-külön is teszteltük a felmerülő farmakokinetikai kölcsönhatások vizsgálata céljából. A szudachitin / aceronin és a partenolid  $\log P_e$  értékei az extraktumban mérve és külön-külön sem különböztek szignifikánsan, azonban a nevadenzin az extraktumban nagyobb permeabilitási potenciállal rendelkezik, mint monokomponensként. A luteolin, apigenin, axillarin és kaszticin kivonatban vizsgálva nem bizonyult képesnek passzív diffúzió útján átjutni a vér-agy gáton.

5. Három *Tanacetum parthenium* L. minta illóolaj tartalmát vizsgáltuk.

- A virágzás alatt gyűjtött levelek illóolaj tartalma meghaladja a virágzatok és a virágzás alatt gyűjtött levelekét.
- Az illóolajban 11, a szuperkritikus állapotú oldószeres extraktumban 7 komponenst azonosítottunk. A főkomponensek a kámfor és a krizantenil-acetát voltak.
- Egyszerű és gyors kromatográfias módszert fejlesztettünk és validáltunk a kámfor mennyiségének meghatározására a *Tanacetum parthenium* L. vígőzdesztillációval előállított illóolaj mintáiban és szuperkritikus állapotú oldószeres kivonataiban. A UPC<sup>2</sup> esetén igazoltuk annak nagy felbontását, érzékenységét és jó reprodukálhatóságát, a módszer megbízhatónak és pontosnak bizonyult. A legmagasabb kámfor tartalmat a virágzás alatt gyűjtött levelek illóolajában mértük, a legalacsonyabbat a szuperkritikus állapotú oldószeres kivonatokban. A szuperkritikus

folyadék kromatográfia alkalmazása előnyös lehet olyan kivonatok vizsgálatánál, melyek a nem illékony apoláris és szemipoláris vegyületeket és az illékony terpenoidokat egyaránt tartalmazzák. Bizonyítottuk, hogy az SFE kivonatokkal biológiailag előnyös komponensekkel dúsított terméket tudunk előállítani, alacsony kámforszint mellett, így elkerülhetők a súlyos központi idegrendszeri mellékhatások.

## Saját publikációk jegyzéke

### A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Végh K, Riethmüller E, Hosszú L, Darcsi A, Müller J, Alberti Á, Tóth A, Béni Sz, Könczöl Á, Balogh Gy T, Kéry Á. (2018). Three newly identified lipophilic flavonoids in *Tanacetum parthenium* supercritical fluid extract penetrating the Blood-Brain Barrier. J Pharm Biomed Anal, 149:488-493.

Végh K, Riethmüller E, Tóth A, Béni Sz, Kéry Á (2017). A *Tanacetum parthenium* L. parthenolid tartalmának szuperkritikus fluid extrakciója: kísérlettervezés, modellezés, optimalizálás. Acta Pharm Hung, 87(2):77-83.

Végh K, Riethmüller E, Tóth A, Alberti Á, Béni S, Balla J, Kéry Á. (2016). Convergence chromatographic determination of camphor in the essential oil of *Tanacetum parthenium* L. Biomed Chromatogr, 30(12):2031-2037.

Végh K, Alberti Á, Riethmüller E, Tóth A, Béni Sz, Kéry Á (2014). Supercritical fluid extraction and convergence chromatographic determination of parthenolide in *Tanacetum parthenium* L.: Experimental design, modeling and optimization. J Supercrit Fluids, 95:84-91.

### Egyéb közlemények

Tóth A, Riethmüller E, Végh K, Alberti Á, Béni Sz, Kéry Á. (2018). Contribution of individual flavonoids in *Lysimachia* species to the antioxidant capacity based on HPLC-DPPH assay. Nat Prod Res, 32(17):2058-2061.

Tóth A, Riethmüller E, Végh K, Alberti Á, Béni Sz, Kéry Á. (2018). *Lysimachia* fajok flavonoid összetételének és antioxidáns aktivitásának összehasonlító vizsgálata. Acta Pharm Hung, 88(2):75-83.

Tóth A, Végh K, Alberti Á, Béni Sz, Kéry Á. (2016). A new ultra-high pressure liquid chromatography method for the determination of antioxidant flavonol aglycones in six *Lysimachia* species. Nat Prod Res, 30(20):2372-2377.

Riethmüller E, Könczöl Á, Szakál D, Végh K, Balogh Gy T, Kéry, Á. (2016). HPLC-DPPH screening method for evaluation of antioxidant compounds in *Corylus* species. *Nat Prod Commun*, 11(5):641-644.

Riethmüller E, Tóth G, Alberti Á, Végh K, Burlini I, Könczöl Á, Balogh Gy T Kéry Á. (2015). First characterisation of flavonoid-and diarylheptanoid-type antioxidant phenolics in *Corylus maxima* by HPLC-DAD-ESI-MS. *J Pharm Biomed Anal*, 107:159-167.

Riethmüller E, Tóth G, Alberti Á, Végh K, Béni Sz, Balogh Gy T, Kéry Á. (2015). Diarylheptanoidok előfordulása a mogyoró nemzetség Kárpát-medencében honos fajaiban. *Acta Pharm Hung*, 85(1):29-38.

Riethmüller E, Tóth G, Alberti Á, Végh K, Béni Sz, Balogh Gy T, Kéry Á. (2015). Occurrence of diarylheptanoids in *Corylus* species native to Hungary. *Acta Pharm Hung*, 85(1):29-38.

Könczöl A, Müller J, Földes E, Béni Z, Végh K, Kéry Á, Balogh Gy T. (2013). Applicability of a blood–brain barrier specific artificial membrane permeability assay at the early stage of natural product-based CNS drug discovery. *J Nat Prod*, 76(4):655-663.

Tóth A, Riethmüller E, Alberti Á, Végh K, Kéry Á. (2012). Comparative phytochemical screening of phenoloids in *Lysimachia* species. *Eur Chem Bull*, 1(1-2):27-30.

Árok R, Végh K, Alberti Á, Kéry Á. (2012). Phytochemical comparison and analysis of *Bergenia crassifolia* L. (Fritsch) and *Bergenia cordifolia* Sternb. *Eur Chem Bull*, 1(1-2):31-34.