

***Lysimachia* fajok antioxidáns flavonoidjainak összehasonlító vizsgálata**

Doktori tézisek

Zempléni-Tóth Anita

Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Semmelweis Egyetem



- Témavezető: Dr. Kéry Ágnes, Ph.D., c. egyetemi tanár
- Hivatalos Bírálók: Dr. Mazákné Kraszni Márta, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Ács Kamilla, Ph.D., egyetemi adjunktus
- Szigorlati Bizottság Elnöke: Dr. Klebovich Imre D.Sc., professzor emeritus
- Szigorlati Bizottság Tagjai: Dr. Kalász Huba, D.Sc., c. egyetemi tanár
Dr. Hajdú Zsuzsanna, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2021

Bevezetés

Az utóbbi évek kutatásainak egyik meghatározó iránya az antioxidáns hatású természetes vegyületek vizsgálata. Utóbbiak hozzájárulhatnak az oxidatív stresszel összefüggésbe hozható kóros folyamatok kivédéshez és megelőzéséhez. Ezért kulcsfontosságú hatékony módszerek kifejlesztése a természetben előforduló antioxidáns vegyületek szűrésére. A növényi hatóanyagok azonosításához és mennyiségi meghatározásához elengedhetetlen a megfelelően érzékeny, pontos, ismételhető, validált módszerek alkalmazása.

A különböző antioxidáns hatású vegyületek között fontos szerepet kapnak a táplálékkal szervezetünkbe jutó polifenolok, köztük a flavonoidok. A komplex összetételű, fenoloidokban gazdag növényi kivonatok oxidatív stresszt kivédő hatásának értékelésében mindig visszatérő kérdés, hogy az egyes komponensek milyen mértékben járulnak hozzá a szabadgyökfogó kapacitáshoz. Emellett nem hagyhatjuk figyelmen kívül, hogy a farmakológiai hatások az előforduló vegyületek között létrejövő kölcsönhatások eredőjeként jelennek meg. A vezető biológiailag aktív vegyületek kimutatása elősegítheti a frakciók célzott kiválasztását a további biológiai vizsgálatokhoz. Ezenkívül a fenoloidok kemotaxonómiai markerként is szolgálhatnak.

A fentebb említettek tükrében a *Lysimachia* genus fenoloidokban gazdag fajai megfelelő példaként szolgálhatnak az egyes flavonoid komponensek összes antioxidáns aktivitáshoz való hozzájárulásának vizsgálatához. A *Lysimachia* fajok fenoloid összetételét és antioxidáns aktivitását illetően szakirodalmi adatok csak hiányosan állnak rendelkezésre, így ez irányú vizsgálatuk indokolt.

Célul tűztük ki ezért a Primulaceae családba tartozó *Lysimachia* nemzetségnek Kárpát-medencében fellelhető fajai közül a *L. vulgaris* L. - közönséges lizinka, a *L. nummularia* L. – pénzlevelű lizinka, valamint a *L. punctata* L. – pettyezetett lizinka fenoloidjainak összehasonlító fitokémiai elemzését. Emellett vizsgálatunkba vontunk két elterjedten ültetett fajt, a *L. clethroides* Duby – hattyúnyakú lizinkát és *L. ciliata* L. var. ‘Firecracker’ – vöröslevelű lizinkát, valamint értékeltük a hagyományos kínai orvoslás egyik gyógynövényét a *L. christinae* Hance - kínai lizinkát. Ismereteink szerint a *L. ciliata* fenoloid összetételéről nem lelhető fel szakirodalmi adat. Eredményeink hozzájárulhatnak a hagyományos európai és kínai orvoslás lehetséges kapcsolatának feltárásához, valamint a taxonómiai osztályozás megerősítéséhez.

Vizsgálataink középpontjába az említett *Lysimachia* fajok antioxidáns flavonoidjainak vizsgálatát helyeztük. A kivonatokban jelen lévő fenoloidok szerkezeti jellemzéséhez HPLC-ESI-MS/MS módszert választottunk. A fő flavonoidok mennyiségi meghatározására HPLC-

DAD és UPLC-DAD módszereket validáltunk. Biológiai aktivitásuk feltárására *in vitro* szabadgyökfogó módszereket alkalmaztunk.

Célkitűzések

Munkánk elsődleges célja a Magyarországon honos három *Lysimachia* faj, valamint további három természetett faj fenoloidjainak jellemzése volt. Emellett célunk volt a lizinka kivonatok antioxidáns aktivitásának részletesebb vizsgálata. Elsőként terveztük vizsgálni a *L. ciliata* fenolos anyagcseretermékeit.

A kísérletes munka célkitűzései az alábbiak voltak:

1. A *L. vulgaris*, *L. nummularia*, *L. punctata*, *L. christinae*, *L. clethroides*, *L. ciliata* herba drogok összes polifenol, cserzőanyag, összes flavonoid és összes hidroxifahéjsav tartalmának meghatározása a drogok előzetes minősítése céljából.
2. A *Lysimachia* kivonatok fenoloid-összetételének minőségi vizsgálatára HPLC-DAD-ESI-MS/MS módszer alkalmazása.
3. HPLC-DAD módszer alkalmazása és validálása a Magyarországon honos *Lysimachia* fajok fenolos főkomponenseinek mennyiségi vizsgálatára.
4. A vizsgált fajok összehasonlításának megkönnyítése és a minták fenoloidjai számának csökkentése érdekében a kivonatok hidrolízise, majd a fő flavonoid-aglikonok mennyiségének vizsgálatára UPLC-DAD módszer fejlesztése és validálása.
5. A felsorolt növényminták metanolos és hidrolizált kivonatok szabadgyökfogó aktivitásának vizsgálata *in vitro* DPPH és ABTS módszerekkel, valamint a minták flavonoidjainak azonosítása és antioxidáns aktivitáshoz való hozzájárulásuk vizsgálata DPPH-HPLC kapcsolt technikával.

Anyagok és módszerek

Növényminta

A *Lysimachia vulgaris* L., *Lysimachia punctata* L., és *Lysimachia nummularia* L. herba minták több egyedről virágzási idő alatt 2011 júliusában kerültek begyűjtésre a Bükki Nemzeti Park területén. A növények azonosítása a Semmelweis Egyetem Farmakognóziai Intézetében történt. A *Lysimachia clethroides* Duby és *Lysimachia ciliata* L. herba mintákat a lengyelországi Jagellonian Egyetem Gyógynövénykertjének 2014 júliusában virágzás alatt begyűjtött kultivált egyedei szolgáltatták. *Lysimachia christinae* Hance herba vizsgálati anyagot Sanghaji

kereskedelmi minta szolgáltatva. A növénymintákból 100-100 g került begyűjtésre különböző egyedekről, virágzás alatt.

Kivonás és mintaelőkészítés

Kivonás

30-30 g herba mintából Soxhlet készülékben készítettünk kivonatokat egymást követő extrakcióval (250 ml kloroform, 6 óra 60 °C; 250 ml metanol, 6 óra 90 °C). A kivonatokat csökkentett nyomáson, 50 °C-on szárazra pároltuk, HPLC minőségű metanolban (3-4 ml) visszaoldottuk, majd Phenex-RC 15 mm, 0.2 µm fecskendőszűrőn szűrtük.

Hidrolízis

0,1 ml (megközelítőleg 0,02 g száraz kivonat) oldathoz 2,0 ml 25%-os sósavat és 10 ml metanolt adtunk. A mintákat vízfürdőn visszafolyó hűtő alkalmazásával 85 °C-on 1 órán át melegítettük. A mintákat szobahőmérsékletre történő hűtés után választótölcsérben 20 ml víz hozzáadása után háromszor 15 ml vízzel telített etil-acetáttal extraháltuk. Az egyesített etil-acetátos frakciókat vízmentes nátriumszulfáton szűrtük, majd 40 °C-on csökkentett nyomáson szárazra pároltuk. A maradékot HPLC minőségű metanolban (1-2 ml) oldottuk, majd Phenex-RC 15 mm, 0,2 µm fecskendőszűrőn szűrtük.

Kvantitatív fitokémiai vizsgálat

Az összes polifenol, cserzőanyag, összes flavonoid és összes hidroxifahéjsav mennyiség meghatározása a lizinka herba mintákban és metanolos kivonatokban a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv irányelvei szerint történtek.

Antioxidáns aktivitás

A *Lysimachia* metanolos és hidrolizált kivonatok valamint a referencia vegyületek (miricetin, kvercetin, kempferol, miricitrin, rutin, kávésav, klorogénsav) antioxidáns aktivitását DPPH és ABTS szabadgyököket tartalmazó *in vitro* tesztekben határoztuk meg

A törzsoldatokat 10,00 mg DPPH 25,0 ml HPLC minőségű metanolban, valamint 10,00 mg ABTS 2,6 ml HPLC minőségű desztillált vízben történő oldásával készítettük. Az ABTS törzsoldathoz 1,72 mg kálium-peroxodiszulfátot adtunk. A törzsoldatokat közvetlenül mérés előtt úgy hígítottuk HPLC metanollal, illetve spektroszkópiás minőségű etanollal, hogy azok abszorbanciája 0,900 ($\pm 0,015$) legyen. A mérés során a vizsgálandó mintákat öt különböző térfogatban (10-100 µl) adagoltuk a szabadgyök törzsoldatának 2,5 ml-éhez (három párhuzamos mérést végeztünk). Összehasonlító oldatként HPLC minőségű metanolt és

spektroszkópiás etanolt alkalmaztunk. Az abszorbancia csökkenésének mértékét 360 másodperc elteltével regisztráltuk. A méréseket Hitachi U-2000 spektrofotométerrel végeztük 515 nm-en (DPPH) illetve 734 nm-en (ABTS). A minták antioxidáns aktivitást az 50%-os gátlási értékhez tartozó koncentráció értékével jellemeztük.

HPLC-DAD-ESI-MS/MS körülmények

Készülék: Agilent 6410 hármass kvadrupól (QqQ) tömegspektrométer elektropray ionforrással (ESI) Agilent 1100 HPLC rendszerhez kapcsolva. A *Lysimachia* minták kromatográfiás elválasztását 25°C-ra termosztált Zorbax SB C18 Plus C18 oszlopon (150 mm × 3 mm, 3,5 µm) végeztük 1 µl-es injektálási térfogattal. Elúciós program: 0,4 ml/perces áramlási sebesség, 0 perc: 10% (v/v) B, 30 perc: 40% (v/v) B, 31 perc: 100% (v/v) B, 35 perc: 100% (v/v) B. Az A eluens 0,3%-os (v/v) hangyasav, a B eluens acetonitril volt. A kromatogramokat 280 és 350 nm-en regisztráltuk, az UV spektrumokat a 200 és 400 nm közti tartományban vettük fel. A tömegspektrometriás analízisek során negatív ion módot alkalmaztunk.

A Magyarországon honos *Lysimachia* fajok metanolos kivonatának HPLC-DAD kvantitatív vizsgálati körülményei

A közönséges, pénzlevelű és pettyezetett lizinka kivonatokban a kempferol, kvercetin, miricetin-3-*O*-ramnozid (miricitrin), rutin és klorogénsav mennyiségi analízise céljából HPLC-DAD külső standard kalibrációs módszert alkalmaztunk és validáltunk.

Készülék: Agilent 1260 Infinity HPLC rendszer A *Lysimachia* minták kromatográfiás elválasztását 25°C-ra termosztált Zorbax Eclipse Plus C18 oszlopon (100 mm x 4,6 mm, 3,6 µm) végeztük 1 µl-es injektálási térfogattal. Elúciós program: 0,6 ml/perces áramlási sebesség, 0 perc: 20% (v/v) B, 30 perc: 100% (v/v) B, 31 perc: 100% (v/v) B, 33 perc: 20% (v/v) B, 37 perc: 20%, (v/v) B. Az A eluens 0,1%-os (v/v) hangyasav, a B eluens metanol volt. A kromatogramokat 340 nm-en regisztráltuk, az UV spektrumokat a 200 és 400 nm közti tartományban vettük fel.

Ötpontos kalibrációt végeztünk, melyhez a standard törzsoldatokból 1; 10; 50; 150 és 300 µg/ml koncentrációjú oldatokat készítettünk HPLC minőségű metanolt használva oldószerként. Minden standard oldatból 3 párhuzamos mintát készítettünk, melyeket egyszer injektáltunk. Ábrázoltuk a csúcs alatti területeket a hozzájuk tartozó koncentráció függvényében. Regresszió analízist végeztünk a legkisebb négyzetek módszerével, így meghatároztuk az egyenes egyenletét és determinációs együtthatóját. A kimutatási (LOD) és meghatározási (LOQ) határokat 3:1 és 10:1 jel/zaj aránynál határoztuk meg. 1,0; 50,0 és 300,0 µl/ml koncentrációjú

kontrollmintákat alkalmaztunk a napon belüli és napok közötti pontosság megállapítására (alacsony, közepes és magas koncentrációjú standard oldat három párhuzamos mérése egy napon belül, és egymást követő három nap folyamán). A retenciós idő ismételhetőségét a hat *Lysimachia* faj kivonatának hat egymást követő futásából állapítottuk meg.

A hidrolizált *Lysimachia* kivonatok UPLC-DAD kvantitatív vizsgálatának körülményei

Készülék: Waters Acquity UPLC-DAD (Waters Corporation, Milford, USA). A *Lysimachia* minták kromatográfiás elválasztását 40°C-ra termosztált Acquity UPLC HSS C18 oszlopon (100 mm x 2,1 mm, 1,8 µm) végeztük 3 µl-es injektálási térfogattal. Elúciós program: 0,65 ml/perces áramlási sebesség, 0 perc 22% B, 3 perc 40% B, 3,5 perc 100% B, 4 perc 22% B. Az A eluens 0,2% (v/v) ecetsav, a B eluens acetonitril volt. A kromatogramokat 254 nm-en regisztráltuk.

A flavonol aglikonok mennyiségét külső standard módszerrel határoztuk meg. A kalibrációhoz 1,0; 10,0; 50,0; 100,0; 300,0 és 500,0 µg/ml koncentrációjú oldatokat készítettünk a kempferol, kvercetin, miricetin sztenderdekből HPLC minőségű metanolt használva. Minden sztenderd oldatból 3 párhuzamos mintát készítettünk, melyeket egyszer injektáltunk. Ábrázoltuk a csúc alatti területeket a hozzájuk tartozó koncentráció függvényében. Regresszió analízist végeztünk a legkisebb négyzetek módszerével, így meghatároztuk az egyenes egyenletét és determinációs együtthatóját. A kimutatási (LOD) és meghatározási (LOQ) határokat 3:1 és 10:1 jel/zaj aránynál határoztuk meg. 1,0; 50,0 és 500,0 µl/ml koncentrációjú kontrollmintákat alkalmaztunk a napon belüli és napok közötti pontosság megállapítására (alacsony, közepes és magas koncentrációjú standard oldat három párhuzamos mérése egy napon belül, és egymást követő három nap folyamán). A retenciós idő ismételhetőségét a hat *Lysimachia* faj hidrolizált kivonatának hat egymást követő futásából állapítottuk meg.

HPLC-vel kapcsolt DPPH módszer körülményei

Minta előkészítés

A hidrolizált *Lysimachia* kivonatok 100 µl-ét 100 µl DPPH oldattal (1,5 mg/ml koncentrációjú, HPLC minőségű metanolos oldat) elegyítettük. A mintákat 30 perces szobahőmérsékleten fénytől védve történő inkubálás után HPLC-DAD-QMS módszerrel vizsgáltuk. Az analízishez használt mintakonzentrációt a DPPH tesztoldatát 0,5-5 mg/ml-es koncentrációjú oldatainak a kivonatokhoz való hozzáadásával kapott kromatogramok értékelése alapján határoztuk meg. Azt a koncentrációt választottuk, ahol a miricetin vagy ha az kis mennyiségben volt jelen, a kvercetin csúcsterület csökkenése a legnagyobbak bizonyult. A kontrollminták esetében 100µl

kivonathoz 100 µl HPLC minőségű metanolt adtunk. A kivonatok DPPH-val kezelt kromatogramját a kontroll minták kromatogramjával hasonlítottuk össze, és a három flavonoid aglikon: miricetin, kvercetin és kempferol csúcsterület változását vizsgáltuk.

HPLC-DAD-QMS körülmények

Készülék: Agilent 6120 kvadrupól tömegspektrométer elektropray ionforrással Agilent 1100 HPLC rendszerhez kapcsolva. A *Lysimachia* minták kromatográfiás elválasztását 40 °C-ra termosztált Kinetex-XB C18 oszlopon (150 mm x 4,6 mm, 2,6 µm;) végeztük 10 µl-es injektálási térfogattal. Elúciós program: 0,5 ml/perces áramlási sebesség, 0 perc 0% B, 20 perc 35% B, 40 perc 100% B, 45 perc 100% B. Az A eluens 0,1%-os (v/v) TFA vizes oldata, a B eluens 0,1% (v/v) TFA acetonitril:víz 95:5 elegyében oldva. A kromatogramokat 254 nm-en regisztráltuk, az UV spektrumokat 200 és 400 nm közötti tartományban vettük fel.

Eredmények

A *Lysimachia* fajok kvantitatív fitokémiai vizsgálata

Az endemikus fajok jelentős mennyiségű polifenolt (3-4%) tartalmaztak, míg a termesztett fajokban nagy változatosság volt megfigyelhető (1-5%). Legmagasabb polifenol, cserzőanyag és hidroxifahéjsav tartalommal a hattyúnyakú lizinka rendelkezett, bár flavonoid tartalma nem volt kiemelkedő (0,9%). A többi fajjal összehasonlítva a kínai és vöröslevelű lizinka herbájában az összes polifenol (~1%) és cserzőanyag (~0,5%) felhalmozódás jelentősen elmaradt, valamint a flavonoid (<0,3%) és hidroxifahéjsav (<0,8%) tartalmuk is jelentősen alacsonyabb volt. Legalacsonyabb flavonoid tartalmat a vöröslevelű lizinka herbájában, míg legmagasabb mennyiséget a pettyezetett lizinka herbájában mértünk. A metanolos kivonatokban a vizsgált tartalomanyagok általában 3-4-szer nagyobb mennyiségben dúsultak fel.

A *Lysimachia* kivonatok fenoloid profiljának jellemzése

RP-HPLC módszert alkalmaztunk a hat lizinka faj fenolos anyagcseretermékeinek kromatográfiás elválasztására. A vegyületek szerkezetének jellemzéséhez a HPLC-DAD vizsgálatok során detektált UV spektrumukat és a HPLC-ESI-MS/MS fragmentációs mintázatukat vetettük össze referencia-vegyületekével, illetve ezek hiányában irodalmi adatokkal. Összesen 86 fenoloid komponenst detektáltunk a lizinka kivonatokban, köztük tizenhét növényi savat, hat katechin származékot, tizenhét flavonol-*O*-glikozidot, két flavonol aglikont, a kempferolt és kvercetint, huszonzét flavon-*C*-glikozidot, és további tizenhét egyéb flavonoid vegyületet.

A közönséges lizinka metanolos kivonatának 12 komponense között, kávésav-származékot, klorogénsavat, hét flavonol- mono- di- és tri- *O*-glikozidot, egy metilált flavonoidot és a két fent említett flavonol aglikont írtunk le. A 280 nm-en detektált UV kromatogram alapján a közönséges lizinka kivonatának főkomponensei a kvercetin-3-*O*-hexozil-dezoxihexozid-7-*O*-dezoxihexozid és a rutin. A pénzlevelű lizinka mintájában a 7 azonosított fenolos komponens közül egy kávésav származékot, három kvercetin- két miricetin- és egy kempferol-*O*-glikozidot azonosítottunk. Főkomponens a miricitrin volt. A pettyegetett lizinka herbájában kilenc vegyületet feltételeztünk, melyek között egy kávésav származék, hat flavonol-*O*-glikozid, valamint kvercetin és kempferol aglikonok jelenlétét bizonyítottuk. Főkomponense szintén a miricitrin volt. A fenolos anyagcseretermékekben leggazdagabb kínai lizinka herbájában 67 vegyület közül tizennégy hidroxifahéjsav származékot, kilenc flavonol-*O*-glikozidot, kvercint, huszonhat flavon-*C*-glikozidot, kilenc metilált flavonoidot és további hat egyéb flavonoid származékot, kinasavat és gallusz sav-hexozidot írtunk le. Kromatográfias adatok alapján a főkomponens apigenin-6-*C*-hexozil-8-*C*-pentozyd. A hattyúnyakú lizinka kivonatában tizenkilenc vegyületet detektáltunk, melyek között két kávésav- hat katechin származékot, dihidrokempferol-hexozidot és tíz flavonol-*O*-glikozidot azonosítottunk. A kivonat főkomponense a kvercetin-3-*O*-hexozid. Tizenkét fenolos vegyületet elsőként írtunk le a vöröslevelű lizinka metanolos kivonatában. Két kávésav származék, három flavon-*C*-glikozid, hét flavonol-*O*-glikozid jelenlétét igazoltuk. A kivonat főkomponense a kvercetin-3-*O*-hexozid.

A Magyarországon honos fajok vizsgálata kvantitatív HPLC-DAD módszerrel

Az endemikus fajok részletesebb fitokémiai jellemzése céljából validált kvantitatív HPLC-DAD módszerrel vizsgáltuk a fő fenolos anyagcseretermékek mennyiségét a közönséges, pénzlevelű és pettyegetett lizinka herba mintákban. A metanolos kivonatok klorogénsav, miricitrin, rutin, kvercetin és kempferol mennyiségét külső sztenderd módszerrel határoztuk meg. A közönséges lizinka két fő komponense a rutin és a kvercetin-3-*O*-hexozil-dezoxihexozid-7-*O*-dezoxihexozid közel azonos mennyiségben fordul elő a fajban. A két flavonol aglikon, a kempferol és kvercetin mennyisége nagyon alacsony volt. Ezzel szemben a pettyegetett lizinka közel azonos kvercetin tartalma mellett a kempferol mennyisége csaknem kétszer magasabb volt a közönséges lizinka mintájában mért értéknél. A főkomponens, miricitrin mennyisége alacsonyabb volt a pettyegetett lizinka mintában, mint az azonos főkomponenssel rendelkező pénzlevelű lizinka kivonatában. Elsőként határoztuk meg és írtuk le a pettyegetett lizinka fenolos anyagcseretermékeinek mennyiségét.

A hidrolizált lizinka kivonatok vizsgálata kvantitatív UPLC-DAD módszerrel

A vizsgált lizinka fajokban több mint 50 flavonoidot azonosítottunk, melyek között minden fajban előfordultak flavonol-*O*-származékok. Eredményeink és szakirodalmi adatok alapján a lizinka fajokra jellemző aglikonok a kempferol, kvercetin és a miricetin, melyek szabadon és konjugált formában fordulnak elő. Nagy számuk valamint az összehasonlító anyagok korlátozott fellelhetősége miatt a teljes flavonoid profil kvantitatív mérése mindig nehézségbe ütközik. Ezért a fajra jellemző flavonoid vegyületek számának csökkentése céljából a növényi kivonatok minőségvizsgálatában gyakran alkalmazott savas hidrolízis módszerét alkalmaztuk. A *L. vulgaris*, *L. nummularia*, *L. punctata*, *L. christinae*, *L. ciliata*, *L. clethroides* hidrolizált kivonatainak kvantitatív mérésére UPLC-DAD módszert fejlesztettünk és validáltunk.

A számított összes flavonoid tartalom (a kempferol, kvercetin, miricetin tartalom összege) a hattyúnyakú lizinkában volt a legmagasabb, míg a kínai lizinkában a legalacsonyabb. Emellett a *L. clethroides*-ben mértük a legmagasabb kvercetin és kempferol tartalmat, míg legmagasabb miricetin tartalma a pénzlevelű lizinka mintának volt. A hattyúnyakú és kínai lizinka hidrolizált kivonatok tartalmazták a miricetint legalacsonyabb mennyiségben. A közönséges lizinka kivonatóban a vizsgált minták közötti második legmagasabb kvercetin tartalmat mértük. A vöröslevelű lizinka hasonlóan a közönséges lizinkához döntően kvercetint és kempferolt halmoz fel, míg a miricetin kisebb mennyiségben fordul elő bennük. Elsőként vizsgáltuk hat lizinka faj hidrolizált kivonatónak kempferol, kvercetin és miricetin tartalmát.

Antioxidáns aktivitás vizsgálatok

A metanolos és hidrolizált lizinka kivonatok és standard vegyületek szabadgyökfogó képességét DPPH és ABTS rendszerekben mértük, melyek alapján a vizsgált minták koncentrációfüggő antioxidáns aktivitást mutattak. DPPH rendszerben 43,3-229,6 µg/ml, míg ABTS rendszerben 21,3-70,80 µg/ml 50%-os gátlási koncentráció értékeket mértünk. A metanolos kivonatok közül a pettyegetett lizinka és pénzlevelű lizinka antioxidáns aktivitása a legmagasabb, mely a miricetin aglikonú flavonoidok felhalmozódására vezethető vissza. Legalacsonyabb szabadgyökfogó képességgel a vöröslevelű lizinka rendelkezett, mely fajban alacsony polifenol és flavonoid tartalmat mértünk.

A hidrolizált lizinka kivonatok erősebb szabadgyök semlegesítő képességet mutattak, mint a metanolos kivonatok: 6,4-59,6 µg/ml DPPH és 5,2-21,8 µg/ml ABTS rendszerben. A savas hidrolízis jelentősen növelte az antioxidáns hatást a glikozidos kötésekre felbomlása következtében szabadabbá váló hidroxil csoportok számának növekedésével. A pénzlevelű lizinka hidrolizált kivonata rendelkezett a legmagasabb antioxidáns hatással, mely magas

miricetin tartalmával magyarázható. Emellett a pénzlevelű, közönséges és kínai lizinka hidrolizált kivonata is erősebb szabadgyökfogó semlegesítő hatással rendelkezett, mint a kempferol. A hattyúnyakú lizinka hidrolizált kivonata magas flavonoid tartalma ellenére alacsonyabb antioxidáns aktivitást mutatott, mely a mintában található flavonoidok feltételezhető antagonistája és prooxidáns kölcsönhatásával magyarázható.

***Lysimachia* flavonoidok antioxidáns aktivitáshoz való hozzájárulásának vizsgálata HPLC-vel kapcsolt DPPH módszerrel**

Bár a hidrolizált lizinka kivonatok jelentős antioxidáns aktivitással rendelkeztek, nem találtunk összefüggést sem az egyes flavonoid aglikonok mennyiségével, sem azok számított össz mennyiségével sem. Ezért a kérdéses vegyületek antioxidáns aktivitáshoz való hozzájárulásának vizsgálatára off-line DPPH-HPLC módszert alkalmaztunk.

A pettyegetett lizinka hidrolizált metanolos kivonata nagy mennyiségben tartalmazott kvercetin és miricetint, melyek közel 75%-ban járultak hozzá a minta közepesen alacsony DPPH-semlegesítő hatásához.

Hasonló eredményeket mértünk a vöröslevelű lizinka kivonatát vizsgálva. A közepesen magas kempferol és kvercetin tartalom 60%-ban határozta meg a minta antioxidáns hatását, mely a legalacsonyabbnak bizonyult a vizsgált minták között. Ez arra enged következtetni, hogy a semlegesítési reakció végbemenetelét más, jelen vizsgálatban nem azonosított vegyületek, illetve köztük fellépő antagonisták akadályozhatta.

A pénzlevelű lizinka kivonatának szabadgyökfogó aktivitásáért főleg a legmagasabb mennyiségben felhalmozott miricetin felelős. Szabadgyökfogó aktivitáshoz való hozzájárulása kiemelkedően magas, 73,5%.

A közönséges lizinka a fentebb említett fajokhoz képest magasabb mennyiségben tartalmazott kvercetin és kempferolt. Bár a miricetin tartalma alacsonynak bizonyult, a *L. vulgaris* kivonata rendelkezett a második legmagasabb DPPH semlegesítő aktivitással, melyhez a kvercetin és kempferol együttesen 87%-ban járult hozzá. A kvercetin önmagában 76%-ban határozta meg az antioxidáns aktivitást, mely a legnagyobb területcsökkenési arány a minták között. Emellett a három vizsgált flavonoid részvétele (91%) a semlegesítési reakcióban szintén a legmagasabbnak bizonyult.

A vizsgált három flavonoid aglikon mennyisége, illetve antioxidáns aktivitáshoz való hozzájárulása a *L. christinae* mintában volt a legalacsonyabb. Ennek ellenére a minta össz-antioxidáns aktivitása közepesen magas, mely a komponensek közötti szinergista kölcsönhatást tételezhet fel. Továbbá, méréseink és szakirodalmi adatok alapján a fajra a flavonol-O-

glikozidok mellett a C-glikozidok jelenléte is jellemző. Az utóbbiak az általunk alkalmazott hidrolízis során módosítatlan formában maradnak a kivonatokban, de hozzájárulhatnak a szabadgyökfogó kapacitáshoz. Ezt támasztja alá az egyéb vegyületek antioxidáns aktivitáshoz való hozzájárulásának magas aránya.

A hattyúnyakú lizinka hidrolizált kivonata tartalmazta legmagasabb mennyiségben a kvercetin és kempferol aglikonokat, és bár ezeknek a hozzájárulása az antioxidáns aktivitáshoz kiemelkedően magas volt (87%), a kivonat szabadgyök-semlegesítő kapacitása csak közepesnek bizonyult, nem érte el a kempferol sztenderd értékét. Ezért a komponensek közötti antagonisták kölcsönhatások meglétét tételezhetjük fel annak ellenére, hogy a számított össz-aglikon tartalom (kempferol, kvercetin és miricetin tartalom összege) és a vizsgált vegyületek antioxidáns aktivitáshoz való hozzájárulása is a legmagasabbnak bizonyult. A kempferol a hattyúnyakú lizinka esetében járult hozzá legmagasabb százalékban (18,8%) az aktivitáshoz.

Következtetések

1. A Ph. Hg. VIII. spektroszkópiás módszereit alkalmazva meghatároztuk a *L. vulgaris*, *L. nummularia*, *L. punctata*, *L. christinae*, *L. clethroides* és *L. ciliata* herba drogok és metanolos kivonatok összes polifenol, cserzőanyag, flavonoid és hidroxifahéjsav tartalmát. Vizsgálataink alapján flavonoidokban a pénzlevelű lizinka a leggazdagabb.
2. A kivonatok fenoloid-profilját HPLC-DAD-ESI-MS/MS módszerrel vizsgáltuk, összesen 86 fenolos vegyület szerkezetét azonosítottuk feltételesen. Ezek között 17 szerves növényi savat, 6 katechin származékot, 17 flavonol-O-glikozidot és 2 flavonol aglikont, 27 flavon-C-glikozidot és 17 további flavonoid származékot írtunk le. Elsőként vizsgáltuk a *L. ciliata* fenolos anyagcseretermékeit, és elsőként írtunk le a fajban két kávésav származékot, hét flavonol-O-glikozidot és három flavon-C-glikozidot. Megállapítottuk, hogy a vizsgált hat faj eltérő flavonoid profilja alapján jól megkülönböztethető.
3. Elsőként vizsgáltuk három endemikus lizinka faj fenolos anyagcseretermékei közül a klorogénsav, miricitrin, rutin, kvercetin és kempferol felhalmozódását kvantitatív, validált HPLC-DAD módszerrel. Elsőként írtuk le az említett vegyületek mennyiségét a pettyezetett lizinka herbájában.
4. A fajokra jellemző flavonoid vegyületek számának csökkentése céljából savas hidrolízist végeztünk. Ezt követően a flavonoid aglikonok mennyiségének meghatározására kvantitatív UPLC-DAD módszert fejlesztettünk és validáltunk.

Elsőként írtuk le a vizsgált hat faj hidrolizált kivonatában mért flavonoid aglikonok: a kempferol, kvercetin és miricetin mennyiségét.

5. A metanolos és hidrolizált kivonatok antioxidáns aktivitását *in vitro* DPPH és ABTS szabadgyök semlegesítési módszerrel vizsgáltuk. Eredményeink alapján a kivonatok koncentrációfüggő aktivitást mutattak és a hidrolízis hozzájárult a minták szabadgyökfogó képességének növekedéséhez.
6. Elsőként alkalmaztunk off-line módon kapcsolt DPPH-HPLC módszert a *Lysimachia* hidrolizált extraktumok antioxidáns hatásához hozzájáruló komponensek azonosítására. Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az antioxidáns aktivitás mértéke egyes esetekben egyértelmű összefüggést mutat a fő flavonoid aglikonok mennyiségével, más esetekben viszont, ez az összefüggés nem áll fenn egyértelműen. Így további, az egyes komponensek között lejátszódó interakciók (antagonizmus, szinergizmus, additív effektus, prooxidáns hatás) tisztázására irányuló vizsgálatok elvégzése kívánatos.

Publikációk

Saját publikációk jegyzéke

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: 75-83.

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: 2058-2061.

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: 2372-2377.

Tóth A, Tóth G, Kéry A. (2014) Polyphenol composition and antioxidant capacity of three *Lysimachia* species. Nat Prod Commun, 9: 473-478.

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

Egyéb közlemények

Varga E, Barabás C, **Tóth A**, Boldizsár I, Noszál B, Tóth G. (2019) Phenolic composition, antioxidant and antinociceptive activities of *Syringa vulgaris* L. bark and leaf extracts. Nat Prod Res, 33: 1664-1669.

Végh K, Riethmüller E, Hosszú L, Darcsi A, Müller J, Alberti Á, **Tóth A**, Béni S, Könczöl Á, Balogh GT, 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.

Varga E, Schmidt I, Szövérfi B, Pop MD, Kelemen H, **Tóth A**. (2018) Phenolic content from medicinal plants and their products used in veterinary medicine. *Acta Medica Marisiensis*, 64: 77-82.

Pénczes R, Mészáros A, **Tóth A**, Darcsi A, Béni Sz. (2017) Separation and identification of diarylheptanoids from *Morus alba* L. *Reviews On Clinical Pharmacology And Drug Therapy*, 15: 51-52.

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

Tóth G, Barabás C, **Tóth A**, Kéry Á, Béni S, Boldizsár I, Varga E, Noszál B. (2016) Characterization of antioxidant phenolics in *Syringa vulgaris* L. flowers and fruits by HPLC-DAD-ESI-MS. *Biomed Chromatogr*, 30: 923-932.

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: 2031-2037.

Végh K, Alberti Á, Riethmüller E, **Tóth A**, Béni S, 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.