

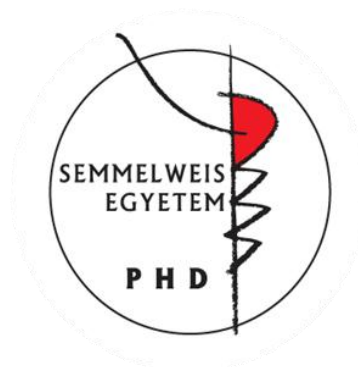
Újabb diarilheptanoid források a Betulaceae családban

A Kárpát-medencében honos mogyorófajok fenoloid-profiljának jellemzése HPLC-ESI-MS módszerekkel

Doktori tézisek

Riethmüller Eszter

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Völgyi Gergely, egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Hunyadi Attila, egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Lemberkovics Éva egyetemi tanár, Ph.D.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kalász Huba c. egyetemi tanár, D.Sc.
Dr. Máthé Imre egyetemi tanár, D.Sc.

Budapest
2017

Bevezetés

A gyógynövényekben rejlő terápiás lehetőségek évszázadok óta ismertek az emberiség számára, ezek jelentős része azonban a mai napig kiaknázatlan. A modern gyógynövénykutatás célpontjai legtöbb esetben olyan növények, melyek bár a tradicionális gyógyászatban hosszú ideje felhasználást nyernek, hatóanyagaik, azok farmakológiai sajátosságai nem ismertek. Emellett fontos szerep jut a kedvező biológiai hatással rendelkező növényi eredetű vegyületek szerkezeti analógjainak feltárását célzó taxonómiai alapú szűrővizsgálatoknak.

A növényi kivonatok komponenseinek szerkezetazonosítása, mennyiségi meghatározása a növényi mátrix komplexitásából adódóan kihívást jelentő analitikai feladat. Ehhez megfelelő eszközt nyújthat a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC) kapcsolt tömegspektrometria (MS). A tömegspektrométer kiemelkedő érzékenysége és szelektivitása lehetővé teszi a minor komponensek detektálását, mennyiségi analízisét is, emellett szerkezetükről is releváns információt nyújt. A repülési idő analízátorral (TOF) rendelkező MS detektor segítségével a vegyületek pontos tömegét felhasználva azok elemi összetétele meghatározható, míg a hármass kvadrupól (QQQ) tömegspektrométerben történő fragmentáció egyéb szerkezeti tulajdonságokról ad információt.

Az utóbbi évtizedben kedvező biológiai hatásaiknak köszönhetően a diarilheptanoid szerkezetű, növényi eredetű fenoloidok a tudományos érdeklődés előterébe kerültek. A kiemelkedő jelentőségű *Curcuma* genus (Zingiberaceae) mellett a Betulaceae családba tartozó *Alnus* nemzetség több képviselőjében igazolták e vegyületek jelenlétét, melyek nagy szerkezeti variabilitást, valamint jelentős és változatos biológiai aktivitást mutattak. Bizonyították többek között kemoprotektív, neuroprotektív, szelektív citotoxikus, májvédő, antivirális, antibakteriális, gyulladásgátló, antioxidáns hatásukat.

A fent említett ígéretes eredmények tükrében a diarilheptanoid szerkezetű fenoloidok kutatása időszerű, a Betulaceae család tagjaiban való előfordulásuk vizsgálata indokolt. Célul tűztük ki ezért a Betulaceae család *Corylus* nemzetségének Kárpát-medencében fellelhető fajai, a közönséges mogyoró (*Corylus avellana* L.), a török mogyoró (*Corylus colurna* L.) és a csöves mogyoró (*Corylus maxima* Mill.) fitokémiai vizsgálatát fenoloid profiljuk jellemzése céljából. E növényeket a tradicionális gyógyászatban hosszú ideje alkalmazzák, szakirodalmi adat azonban csak a közönséges mogyoró levelének fenoloid összetételéről áll rendelkezésre, mely nem tett említést diarilheptanoidok jelenlétéről.

Célkitűzések

Munkánk elsődleges célja a Kárpát-medencében honos mogyorófajok fenoloid-profiljának jellemzése volt. Bővíteni kívántuk a Betulaceae családban előforduló diarilheptanoid szerkezetű metabolitokra vonatkozó ismereteinket, emellett célunk volt a mogyoró kivonatok ismert biológiai, elsősorban antioxidáns aktivitásának közelebbi megértése.

A kísérletes munka célkitűzései az alábbiak voltak:

1. A *C. avellana*, *C. colurna* és *C. maxima* levél- és kéregdrogok összes fenoloid, összes flavonoid és cserzőanyag tartalmának meghatározása a drogok előzetes minősítése céljából
2. Az a felsorolt növénymintákból etil-acetáttal és metanollal készült kivonatok szabadgyökfógo aktivitásának vizsgálata DPPH és ABTS *in vitro* tesztekben.
3. A mogyoró kivonatok fenoloid-összetételének minőségi vizsgálatára HPLC-DAD-ESI-TOF-MS és HPLC-DAD-ESI-QqQ-MS módszerek fejlesztése.
4. HPLC-DAD-ESI-QqQ-MS módszerek fejlesztése és validálása a kivonatok fenoloid főkomponenseinek mennyiségi vizsgálata céljából.
5. A kivonatok antioxidáns aktivitásáért felelős fenoloid komponensek azonosítása DPPH-HPLC kapcsolt technikával

Anyagok és módszerek

Növényminta

A levél és kéreg minták begyűjtésére az alábbi helyszíneken és időpontokban került sor (50-50 gramm, három egyedről, virágzást követő stádiumban): *Corylus avellana* L.: Nógrád, 2010. június, *Corylus colurna* L.: Göd 2012. augusztus, *Corylus maxima* Mill.: Pálfişzeg 2013. augusztus. A növények azonosítása a Semmelweis Egyetem Farmakognóziai Intézetében történt.

Extrakció és mintaelőkészítés

10-10 g levél-, illetve kéregmintából Soxhlet készülékben készítettünk kivonatokat egymást követő extrakcióval kivonószerként 250-250 ml *n*-hexánt, kloroformot, etil-acetátot, és metanolt alkalmazva. Az extrakció időtartama 6-6 óra volt. A kivonatokat rotációs vákuumdesztillálóban 50°C-on szárazra pároltuk, HPLC minőségű metanolban (3-4 ml) oldottuk, majd Phenex-RC 15 mm, 20 µm fecskendőszűrőn szűrtük.

Antioxidáns aktivitás vizsgálatok

A *Corylus* kivonatok és a referencia-vegyületek 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 ($\pm 0,005$) legyen. A mérés során a vizsgálandó minták öt különböző koncentrációjú oldatának 50-50 µl-ét adagoltuk a szabadgyök törzsoldatok 2,5 ml-éhez (három párhuzamos mérést végeztünk). Az abszorbancia csökkenésének mértékét 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300 és 360 másodperc elteltével regisztráltuk. A méréseket Hitachi U-2000 spektrofotométerrel végeztük 515 nm-en (DPPH) és 734 nm-en (ABTS). A 360 másodperc elteltével mért abszorbanciákat a legegyszerűbb reakció kinetikai modell segítségével extrapoláltuk. A minták antioxidáns aktivitását IC₅₀ értékekben fejeztük ki.

HPLC-DAD-QMS körülmények

Készülék: Agilent 6120 kvadrupól tömegspektrométer elektropray (ESI) ionforrással Agilent 1100 HPLC rendszerhez kapcsolva. A *Corylus* minták kromatográfiás elválasztását 40°C-ra termosztált Kinetex-XB C18 oszlopon (15 cm × 4,6 mm, 2,6 µm) végeztük 10 µl-es injektálási térfogattal. A következő gradiens elúciós programot alkalmaztuk 0,5 ml/perces áramlási sebesség mellett, ahol az A eluens 0,2 %-os (v/v) ecetsav, a B eluens acetonitril volt: 0 perc 0% B, 5 perc 5% B, 15 perc 10% B, 30 perc 20% B, 60 perc 50% B, 70 perc 100% B. A kromatogramokat 254, 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.

HPLC-DAD-TOF-MS körülmények

Készülék: Agilent 6230 repülési idő (time-of-flight, TOF) tömegspektrométer Jet Stream elektropray ionforással (ESI) Agilent 1260 Infinity HPLC rendszerhez kapcsolva. Az adatok feldolgozása Agilent MassHunter B.03.01 szoftverrel történt.

A *Corylus* minták kromatográfias elválasztását 25°C-ra termosztált Zorbax SB C18 oszlopon (150 x 3,0 mm, 3,5 µm) végeztük, 10 µl-es injektálási térfogattal. A következő gradiens elúciós programot alkalmaztuk 0,3 ml/perces áramlási sebesség mellett, ahol az A eluens 0,2 %-os (v/v) ecetsav, a B eluens metanol volt: 0 perc: 30 % (v/v) B, 20 perc: 100 % (v/v) B 22 perc: 100 % (v/v) B 23 perc: 30 % (v/v) B. A kromatogramokat 254, 290 és 350 nm-en regisztráltuk, az UV spektrumokat 200 és 400 nm közti tartományban vettük fel. A tömegspektrometriás analízisek során negatív ion módot alkalmaztunk.

HPLC-DAD-QqQ MS körülmények

Készülék: Agilent 6410 hármás kvadрупól (QqQ) tömegspektrométer elektropray ionforrással (ESI) Agilent 1100 HPLC rendszerhez kapcsolva. A kromatográfias elválasztás körülményei megegyeztek a HPLC-DAD-TOF-MS analízisek során alkalmazottakkal. Az adatok feldolgozása a MassHunter B.01.03 szoftverrel történt. A tömegspektrometriás analízisek során negatív ion módot alkalmaztunk. Az ütközési energiát 10–50 eV között változtattunk különböző szerkezetű vegyületek esetén (ütköztető gázként nagytisztaságú nitrogént alkalmaztunk).

A vegyületek azonosítása céljából két különböző kromatográfias rendszerben mért retenciós idejüket, UV- és tömegspektrumukat, valamint pontos tömegüket autentikus referencia-vegyületek vonatkozó értékeivel, illetve ezek hiányában irodalmi adatokkal vetettük össze.

Kvantitatív vizsgálatok

A miricetin-3-*O*-ramnozid, a kvercetin-3-*O*-ramnozid a hirsutenon és oregonin mennyiségi analízise céljából HPLC-ESI-MS/MS (MRM módban) módszereket fejlesztettünk és validáltunk. Külső standard kalibrációs módszert alkalmaztunk. A kromatográfias körülmények megegyeztek a minőségi analízis leírásánál bemutatottakkal. A kvantitatív mérések előtt optimalizáltuk a fragmentor feszültséget és a kollíziós energiát, előbbit 70 és 250 V között, míg az utóbbit 5 eV és 50 eV között változtatva.

Ötpontos kalibrációt végeztünk, a standard törzsoldatokat a hirsuteton esetén 0,01; 0,1; 1; 10; és 50 µg/ml koncentrációban, az oregonin esetén 0,1; 1; 10; 50 és 100 µg/ml koncentrációban, a miricetin-3-*O*-ramnozid és a kvercetin-3-*O*-ramnozid esetén 1; 10; 50; 150 and 300 µg/ml koncentrációban készítettük, metanolt használva oldószerként.

A módszerek napon belüli és napok közötti ismételtetését és pontosságát három koncentrációs pontnál, három egymást követő napon vizsgáltuk. A retenciós idők ismételtetését a *Corylus* kivonatok felhasználásával, hat párhuzamos analízis során határoztuk meg.

DPPH-HPLC körülmények

Corylus extraktumok 100 µl-ét 100 µl DPPH oldattal (1.2 mg/ml, metanolos oldat) reagáltattuk. A 30 perces inkubálási idő (szobahőmérséklet, fénytől védve) leteltét követően a reakció elegyet HPLC-DAD-QMS módszerrel vizsgáltuk. Az összehasonlító oldatokat a kivonatok 100 µl-éhez 100 µl metanolt hozzáadásával készítettük.

Eredmények

Antioxidáns aktivitás vizsgálatok

A *C. maxima* levél és kéreg metanollal készült kivonatai kiemelkedően magas szabadgyökfógó kapacitással rendelkeztek az ABTS tesztben. A DPPH tesztben a *C. colurna* kéreg kivonatok mutatták a legmagasabb aktivitást, mely meghaladta a vizsgált referencia-vegyületekét is. A *C. avellana* kivonatoknál nem volt szignifikáns különbség az egyes extraktumok DPPH-val szemben mutatott szabadgyökfógó aktivitásában, míg az ABTS tesztben a kéreg minták lényegesen aktívabbnak bizonyultak a levél kivonatoknál. Egyértelmű trend azonban nem volt kiolvasható eredményeinkből. Az összetett növényi kivonatok antioxidáns aktivitását a komponensek diverzitása mellett azok egymásra hatása is jelentősen befolyásolhatja. Minthogy a kivonatok mindkét *in vitro* tesztben magas szabadgyökfógó kapacitást mutattak, melynek háttérében a kivonó oldószerek polaritását figyelembe véve nagy valószínűséggel azok fenoloid komponensei állnak, az extraktumok fenoloid-profiljának feltárását mindenképpen indokoltnak láttuk.

A vizsgált *Corylus* kivonatok fenoloid-profiljának jellemzése

A *Corylus* extraktumokban detektált fenoloid komponensek kromatográfiás elválasztását két különböző módszerrel valósítottuk meg. A HPLC-DAD-ESI-QMS analízis során lassú (70 perc) gradienst alkalmaztunk az optimális felbontás elérése érdekében, míg a HPLC-DAD-ESI-TOF-MS és HPLC-DAD-ESI-QqQMS vizsgálatok során, ahol a komponensek szerkezetének feltárása volt az elsődleges cél rövidebb analízis idővel (23 perc) dolgoztunk. A vegyületek szerkezetének jellemzéséhez a HPLC-DAD vizsgálatok során detektált UV spektrumukat, az HPLC-ESI-TOF analízisek eredményeként kapott pontos tömegüket és az ebből számolt összegképletüket, valamint HPLC-ESI-MS/MS fragmentációs mintázatukat vetettük össze referencia-vegyületekével, illetve ezek hiányában irodalmi adatokkal. Azon vegyületek esetén, ahol rendelkezésre állt autentikus standard, melyek a hirsutenon, az oregonin, a miricetin-3-*O*-ramnozid, a kvercetin-3-*O*-ramnozid, a kempferol és a rozmaringsav voltak, az azonosítást a kivonatok adott standarddal történő együtt kromatografálásával végeztük. A további vegyületek szerkezetét a fent említett UV-, valamint tömegspektrometriás módszerekkel, a referencia-vegyületek spektrális tulajdonságait és irodalmi adatokat alapul véve feltételesen azonosítottuk.

Összesen 37 különböző fenoloid komponenst detektáltunk a mogyoró kivonatokban, köztük húsz diarilheptanoidot, kilenc flavonol-származékot, valamint nyolc egyéb polifenol

komponenst: kávésav-, kinasav-származékokat, illetve flavanonokat. A *C. avellana* levelében a szakirodalom beszámol flavonol-3-*O*-glikozidok (miricetin-3-*O*-ramnozid, kvercetin-3-*O*-ramnozid, kempferol-3-*O*-ramnozid) valamint hidroxifahéjsav-származékok jelenlétéről. Diarilheptanoid komponenseket *Corylus* fajban azonban ezidáig nem írtak le. Elsőként igazoltuk tehát a mogyoró nemzetség e három fájában diarilheptanoidok jelenlétét, emellett elsőként jellemeztük a *C. colurna* és *C. maxima* fenoloid-összetételét.

Kvantitatív HPLC-DAD-ESI-QqQMS vizsgálatok

Kvantitatív analíziseinkkel megállapítottuk, hogy a kivonatok miricetin-3-*O*-ramnozidból és kvercetin-3-*O*-ramnozidból szignifikánsan nagyobb mennyiséget tartalmaztak, mint a vizsgált két diarilheptanoidból a hirsutenonból és oregoninból. Az előbbi kettő minden extraktumban a mennyiségi meghatározás határát meghaladó mennyiségben volt jelen. A közönséges mogyoró etil-acetátos kivonata bizonyult leggazdagabbnak miricetin-3-*O*-ramnozidban, míg a török mogyoró kéreg extraktumai kvercetin-3-*O*-ramnozidban. Az etil-acetátos kivonatok majdnem minden minta esetén nagyobb mennyiséget tartalmaztak a vizsgált flavonoidokból, mint a metanolos kivonatok. Ez alól a csöves mogyoró extraktumok képeznek kivételt, ahol ilyen szabályszerűség nem volt megfigyelhető.

Az oregonin és hirsutenon komponensek előfordulása a mennyiségi meghatározási határ alatt volt a közönséges mogyoró kéreg, valamint a török mogyoró levél kivonataiban.

A csöves mogyoró extraktumainak mindegyikében kvantálható volt mindkét komponens. A legnagyobb mennyiségben a levél kivonatai tartalmazták a két diarilheptanoidot, ez hirsutenonban bizonyult gazdagabbnak, míg a növény másik három kivonatában az oregonin volt nagyobb mennyiségben jelen. Megfigyelhető volt továbbá, hogy az etil-acetátos extraktumok minden esetben gazdagabbak voltak a két diarilheptanoid komponensben mint a metanolos kivonatok.

DPPH-HPLC vizsgálatok

A minőségi és mennyiségi analízisek eredményei birtokában lehetőségünk nyílt a kivonatok antioxidáns aktivitásának közelebbi megértésére. Először megvizsgáltuk a két flavonoid főkomponens, a miricetin-3-*O*-ramnozid és kvercetin-3-*O*-ramnozid, mennyiségének és a kivonatok antioxidáns aktivitásának kapcsolatát. Nem találtunk szignifikáns korrelációt az értékek között, melyből arra következtettünk, hogy a flavonoidok antioxidáns aktivitását befolyásolták a minor komponensek, így a diarilheptanoidok és kávésav-származékok. Ezek alapján indokoltnak tartottuk a különböző komponenseknek az

extraktumok antioxidáns hatásához való hozzájárulásának vizsgálatát. Ennek megvalósítására jól alkalmazható a HPLC-vel kapcsolt DPPH analízis. A kivonatok szabadgyökkel való reakcióját követő HPLC vizsgálatban ugyanis az antioxidáns aktivitással rendelkező komponensek kromatográfiás csúcsterülete szignifikánsan csökken.

A mérési eredményeink alapján az egyes komponensek antioxidáns aktivitásának a kivonat teljes szabadgyökfogó kapacitásához való hozzájárulása jól becsülhető, ha az adott komponens esetén mért kromatográfiás csúcsterület-csökkenést az összes csúcsterület-csökkenéshez viszonyítjuk.

A *C. avellana* levél etil-acetátos és metanolos extraktumaiban magas miricetin-3-*O*-ramnozid és kvercetin-3-*O*-ramnozid mennyiséget mértünk. DPPH-HPLC vizsgálataink eredményei alapján mindkét komponens nagy mértékben járul hozzá az antioxidáns aktivitáshoz, ez pedig viszonylagosan magas szabadgyökfogó kapacitást eredményezett az extraktum esetén. A kéreg kivonataiban a kvercetin-3-*O*-ramnozid bizonyult dominánsnak az antioxidáns aktivitást illetően. Utóbbinak a többi mogyoró kivonattal összevetve közepes mennyiségben való jelenléte mérsékelt szabadgyökfogó kapacitáshoz vezetett.

A *C. colurna* levél etil-acetátos és metanolos extraktumaiban mértük a legmagasabb kvercetin-3-*O*-ramnozid mennyiséget, a komponens hozzájárulása a kivonatok antioxidáns aktivitásához azonban kis mértékű volt. Ezen túlmenően, az extraktum szabadgyökfogó kapacitása a többi mogyoró kivonathoz viszonyítva is alacsonynak bizonyult. Ezek az eredmények a kivonat antioxidáns komponensei közt lejátszódó antagonista interakcióra utalnak. A legmagasabb antioxidáns aktivitást a *C. colurna* kéreg kivonatainál mértünk, ez esetben a kvercetin-3-*O*-ramnozid bizonyult dominánsnak a hatáshoz való hozzájárulást illetően, melyet jól magyaráz a komponens jelentős mennyiségi előfordulása a kéreg extraktumokban. Megfigyelhető volt továbbá, hogy a metanolos kivonat szignifikánsan alacsonyabb antioxidáns aktivitást mutatott, mint az etil-acetátos extraktum, mely az előbbi alacsonyabb kvercetin-3-*O*-ramnozid tartalmával függhet össze.

A *C. maxima* levél etil-acetátos és metanolos extraktumaiban a miricetin-3-*O*-ramnozid és kvercetin-3-*O*-ramnozid viszonylagosan nagy mennyiségben volt jelen. Ennek ellenére az extraktum DPPH szabadgyökfogó aktivitása alacsonynak bizonyult. Ennek magyarázata lehet, hogy a kivonat igen gazdag további antioxidáns komponensekben, mely lehetőséget jelenthet számos interakciós folyamat lejátszódására. A kéreg kivonatokban is viszonylagosan alacsony miricetin-3-*O*-ramnozid és kvercetin-3-*O*-ramnozid tartalmat mértünk, ezen túlmenően a komponensek hozzájárulása a kivonat antioxidáns aktivitásához alacsony volt, ami alacsony DPPH szabadgyökfogó kapacitást eredményezett.

Általánosságban elmondható, hogy az antioxidáns hatással rendelkező főkomponensek mennyisége és a mogyoró extraktumok antioxidáns aktivitása közötti összefüggés nem mindig egyértelmű. Ahol számos különböző komponens vesz részt a hatás kialakításában, a közöttük lejátszódó interakciós folyamatok nagy mértékben befolyásolhatják az aktivitást.

Következtetések

1. A Kárpát-medencében honos három mogyoró faj, a közönséges mogyoró (*Corylus avellana* L.), a török mogyoró (*Corylus colurna* L.) és a csöves mogyoró (*Corylus maxima* Mill.) levél- és kéregdrogok összes fenoloid, flavonoid és cserzőanyag tartalmának a Ph. Hg. VIII. spektroszkópiás módszereivel történő meghatározásaival minden minta esetén magas fenoloid tartalom volt kimutatható.
2. Az etil-acetáttal és metanollal készült kivonatok szabadgyökfogó aktivitását DPPH és ABTS *in vitro* tesztrendszerekben határoztuk meg. Eredményeink alapján elmondható, hogy a *Corylus* kivonatok ismert antioxidáns vegyületekkel összehasonlítva kiemelkedő szabadgyök-semlegesítő hatással rendelkeznek. Az extraktumok aktivitásának a fenoloid tartalom alapján való összehasonlítása során nem lehetett egyértelmű összefüggést megfigyelni. Ez arra enged következtetni, hogy a kivonatok fenoloid-összetételében különbségek lehetnek.
3. Ennek igazolására vizsgáltuk a kivonatok fenoloid-profilját HPLC-DAD-ESI-TOF-MS és HPLC-DAD-ESI-MS/MS módszerekkel. Összesen harminchét fenolos komponenszt azonosítottunk, köztük húsz diarilheptanoidot, kilenc flavonol-származékot, valamint nyolc egyéb polifenol komponenszt.
4. Elsőként írtunk le a Kárpát-medencében honos *Corylus* fajokban diarilheptanoidokat, emellett elsőként vizsgáltuk a török és csöves mogyoró fenoloid-összetételét. Eredményeink alátámasztották azt a feltételezést, hogy a különböző mogyoró kivonatok fenoloid-profiljai lényeges eltéréseket mutatnak.
5. A kivonatokra leginkább jellemző fenoloidok (miricetin-3-*O*-ramnozid, kvercetin-3-*O*-ramnozid, hirsutenon és oregonin) mennyiségi meghatározása céljából HPLC-ESI-MS/MS módszert fejlesztettünk és validáltunk. Ez a későbbiekben jól használható olyan kutatások során, amelyek e mogyoró fajokban előforduló fenoloidok termőhely-függő és szezonális mennyiségi változásainak követését célozzák.

6. Sikeresen alkalmaztuk az off-line módon kapcsolt DPPH-HPLC módszert az extraktumok antioxidáns hatásához hozzájáruló komponensek azonosítására.

Az általunk fejlesztett módszer alkalmas lehet analitikai támogatást nyújtani a mogyoró kivonatokból megnövelt antioxidáns hatású frakciók előállításához.

Eredményeink alapján arra következtettünk, hogy egyes esetekben az antioxidáns aktivitás mértéke egyértelműen összefügg a fenoloid főkomponensek mennyiségével, más esetekben viszont, amikor számos komponens játszik szerepet az antioxidáns hatás kialakításában, ez az összefüggés nem áll fenn. Így további, az egyes komponensek között lejátszódó interakciók (antagonizmus, szinergizmus, additív effektus) tisztázására irányuló vizsgálatok elvégzése feltétlenül indokolt.

Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

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 Comm, 11: 641-644.

Alberti Á, **Riethmüller E**, Béni Sz, Kéry Á. (2016) Evaluation of Radical Scavenging Activity of *Sempervivum Tectorum* and *Corylus Avellana* Extracts with Different Phenolic Composition. Nat Prod Comm, 11:469-474.

Riethmüller E, Tóth G, Alberti Á, Végh K, Burlini I, Könczöl Á, Balogh GyT, 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 GyT, Kéry Á. (2015) Diarylheptanoidok előfordulása a mogyoró nemzetség Kárpát-medencében honos fajaiban [Occurrence of diarylheptanoids in *Corylus* species native to Hungary]. Acta Pharm Hung, 85: 29-40.

Riethmüller E, Tóth G, Alberti Á, Sonati M, Kéry Á. (2014) Antioxidant activity and phenolic composition of *Corylus colurna*, Nat Prod Comm, 9: 679-682.

Riethmüller E, Alberti Á, Tóth G, Béni Sz, Ortolano F, Kéry Á. (2013) Characterisation of diarylheptanoid- and flavonoid-type phenolics in *Corylus avellana* L. leaves and bark by HPLC/DAD-ESI/MS, Phytochem Anal, 24: 493-505.

Egyéb közlemények

Fódi T, Kupai J, Túrós GyI, Németh T, Rojik E, **Riethmüller E**, Balogh GyT, Huszthy P. (2016) Application of flow chemistry to macrocyclization of crown ethers. J Flow Chem *article in press*

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

Könczöl Á, Rendes K, Dékány M, Müller J, **Riethmüller E**, Balogh Gy.T. (2016) Blood-brain barrier specific permeability assay reveals N-methylated tyramine derivatives in standardised leaf extracts and herbal products of *Ginkgo biloba*. J Pharm Biomed Anal 131: 167-174.

Szabó T, Hirsch E, Tóth T, Müller J, **Riethmüller E**, Balogh GyT, Huszthy P. (2015) Synthesis and enantioselective transport studies of optically active lipophilic proton-ionizable crown ethers containing a diarylphosphinic acid unit. Tetrahedron-Assymetr, 12-13: 650-656.

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. J Supercrit Fluid, 95: 84-91.

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.