

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 docens, D.Sc.

Budapest  
2013

## 1. Bevezetés

A gyógynövénykutatás fejlődésének köszönhetően ma már egyre nagyobb teret hódít a gyógynövények terápiás célú felhasználása; az igény is egyre nagyobb 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 komoly kutatási, analitikai, vizsgálati háttér szükséges, melyhez az alkalmazott kémiai és biológiai módszereknek is fel kell fejlődniük.

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 a triterpenoidok és az izoflavonoidok, melyek ígéretesek bizonyos betegségterületek (kardiovaszkuláris és egyes daganatos megbetegedések) adjuváns kezelésében illetve prevenciójában.

Az utóbbi évtizedekben egyre inkább elterjedt módszer a szuperkritikus fluid extrakció (SFE) mely során a kivonás fluid állapotú indifferens gázokkal (többnyire CO<sub>2</sub>) történik. A módszer elsősorban apoláris jellegű vegyületek kivonására alkalmas. Az *Ononis spinosa* L. apoláris jellegű vegyületei a terápiásan is ígéretes fitoszterolok, melyek több betegség területén is – benignus prostata hypertrophia (BPH), illetve egyes daganatos betegségek - preventív, illetve adjuváns hatással bírhatnak. A szterolok kvalitatív és kvantitatív analízise az irodalomban jellemzően származékképzésen alapuló gázkromatográfiával történik.

A ciklodextrinek gyógyszeripari alkalmazása mára rendkívül elterjedté vált; egyre több a ciklodextrinnel formulált gyógyszer. A gyógynövény-kémia területén belül is egyre több fenolos vegyületet, flavonoid, katechin, illóolaj komponens, illetve szteránvázas vegyület ciklodextrin komplexeiről vannak már irodalmi adatok. Gyakorlati alkalmazásukra példa a citrusféléből készült italok keserű ízének a csökkentése a naringin, heszperidin, illetve limonin eltávolításával; koffein eltávolítása kávéból és teából; margarinok, tojás és egyéb termékek koleszterin mentesítése. 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, ráadásul jobb tolerálhatósághoz, s a dózírózás csökkentéséhez, ennél fogva még kedvezőbb mellékhatás-profilhoz is vezethetnek.

## 2. Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki, hogy az *Ononis spinosa* L. gyökerének, mint gyógyszerkönyvi drognak hatóanyagait mélyebben feltárjuk. Célunk volt a növény triterpenoidjainak különböző oldószeres kivonatainak mennyiségi és minőségi értékelése. Vizsgálni kívántuk továbbá a növény két fontos izoflavonjának (genisztein és daidzein) különböző ciklodextrinekkel komplexált 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 oldószerrel, illetve szuperkritikus CO<sub>2</sub>-dal készült kivonatokban GC-MS módszerrel.
2. A különböző kivonatok  $\beta$ -szitoszterol tartalmának kvantitatív vizsgálata GC-FID módszerrel, származékképzés nélkül.
3. Az *Ononidis radix* izoflavonoidjainak kvalitatív analízise LC-MS-sel.
4. Genisztein és daidzein  $\beta$ -,  $\gamma$ -, hidroxipropil- $\beta$ - és random-metil- $\beta$ -ciklodextrin komplexek vizsgálata CD spektroszkópiával és <sup>1</sup>H-NMR-rel.
5. Genisztein és daidzein  $\beta$ -,  $\gamma$ -, hidroxipropil- $\beta$ - és random-metil-  $\beta$ -ciklodextrin komplexek kioldódásának és bioelérhetőségének vizsgálata *in vitro*; Caco-2 sejtvonalon.
6. Genisztein  $\beta$ -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 a CD nélkül nyert kivonatok összetételének tükrében.

### **3. Anyagok és módszerek**

#### **3.1. Növényanyag**

A triterpenoidokkal (fitoszterolok, triterpének), illetve az izoflavonoidokkal kapcsolatos vizsgálatokhoz felhasznált *Ononis spinosa* L. (Fabaceae) gyökérdrog a kiskőrösi Bio-Berta biokertészetből, illetve az erdőkertesi Rózsahegy Gyógy- és Fűszernövény Forgalmazó Kft-től származik. Mindkét forgalmazott növényi anyagot szárítva és aprítva kaptuk, minősége megfelelt a Ph.Hg.VIII. előírásának. A drog darálás utáni részecskemérete  $0.689 \pm 0.044$  mm illetve  $\sim 1200$   $\mu\text{m}$  volt. A drogot a továbbiakban ebben a darált formában használtuk fel a kivonásokhoz.

#### **3.2. Triterpenoidok vizsgálata**

##### **3.2.1. Extrakciós és tisztítási módszerek**

- **Soxhlet extrakció**

Soxhlet készülék, forró vízfürdő, légköri nyomáson, az oldószer forrpontján; porított drogot n-hexánnal, majd a többi oldószerrel (izopropanol, etilacetát, aceton, metanol, etanol) vontuk ki elszíntelenedésig.

- **Kíméletes extrakció**

Extrakció 40°C-on, gömblombikban, lapátos keverővel; kivonószerek: aceton, etanol és metanol; porított drogot 3 x 1 óráig vontuk ki; kivonatokat összegyűjtöttük; oldószert ledesztilláltuk (Büchi Rotavapor R-200).

- **Szuperkritikus fluid extrakció**

- *Laboratóriumi extrakció*

Extrakció ISCO 2-10 kísérleti laboratóriumi szuperkritikus extraktorban; fluid CO<sub>2</sub> ; 40°C-on; 100 g drogból; 100, 200 és 300 bár nyomáson; 60, illetve 90 percig (30 perc statikus extrakció

légköri nyomáson + 30/60 perc dinamikus extrakció előírt nyomáson); extraktumokat 96 %-os etanolban nyelettük el.

- *Félüzemi méretű extrakció*

Félüzemi méretű szuperkritikus extraktor, fluid CO<sub>2</sub>-dal állandó hőmérsékleten (40°C) és 450 bár nyomáson, 1000 g drogból.

### **3.2.2. Tisztítás elszappanosítással**

Elszappanosítás: vákuumban beszárítottuk; maradékot 50 ml 96%-os alkohollal és KOH-dal forró vízfürdőn elszappanosítottuk; kivonatokat vízzel hígítottuk, majd petroléterrel többször kiráztuk. A szerves fázisokat vízzel lúgmentesre mostuk, majd bepárooltuk, a maradékot kloroformban oldottuk.

### **3.2.2. Analitikai vizsgálatok**

#### **3.2.2.1. Triterpenoidok azonosítása és mennyiségi jellemzése GC-MS analízissel**

Agilent 6890N készülék 5973N kvadrupól tömegspektrométerrel, HP-5MS (30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm) állófázisú oszlop, hőmérsékleti program: 140°C 1 percig az injektálás után, majd 10°C min<sup>-1</sup> 140°C-tól 270°C-ig, 20 perc izoterm, majd 270°C-tól 300°C-ig 10°C min<sup>-1</sup>, 6 perc izoterm., vivőgáz: hélium; áramlási sebesség: 1 ml min<sup>-1</sup>; injektor hőmérséklet 280°C; injektált térfogat: 1 µl.

#### **3.2.2.2. β-szitoszterol tartalom meghatározása GC-FID vizsgálattal**

Agilent 6890N készülék, DB-5MS (25 cm x 0.2 mm x 0.33 µm) állófázisú oszlop; vivőgáz: hélium, áramlási sebesség: 1 ml min<sup>-1</sup>; injektor hőmérséklet: 280°C; injektált minta térfogata

1 µl; hőmérsékleti program: 120°C 1 percig, majd 120°C-tól 300°C-ig 10°C min<sup>-1</sup>, 14 perc izoterm, 300°C-tól 310°C-ig 10°C min<sup>-1</sup>, 10 perc izoterm; lángionizációs detektor hőmérséklete: 330°C; belső standard: 5α-cholestan-3-on.

### **3.3. Izoflavonoidok vizsgálata**

#### **3.3.1. Izoflavonoidok azonosítása HPLC-MS/MS-sel**

Agilent 6410 Triple Quad LC/MS rendszer; kromatográfiás oszlop: Hypersil Zorbax Eclipse, XDB-C18, 5 µm x 150 mm x 2.1 mm; eluensek: 0,3% ecetsav (A) és metanol (B); 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; MS kísérleti körülmények – porlasztó: 45 psi; szárítógáz áramlási sebesség: 9 L min<sup>-1</sup>; szárítógáz hőmérséklet: 350°C; kapilláris feszültség: 3500 V; fragmentor feszültség: 100 V; MS scan: m/z 150-1200; ütközési energia: 12, 20, 28 és 36 eV.

#### **3.3.2. Genisztein és daidzein izoflavonok komplexálása β-, γ-, HPB- és RBCD-ekkel**

- **Számítógépes molekula optimalizáció**

A komplexképzést megelőzően PM3 (Parameterized Model 3) módszerrel molekula optimalizációt végeztünk Windows 06' alapú Spartan 1.1.1 szoftverrel. Ehhez a genisztein szerkezetét a SPARTAN adatbázisból, a γ- és β-CD-ek röntgendiffrakciós szerkezetét pedig a Darmstadti Műszaki Egyetem adatbázisából töltöttük le. Az optimalizációval meg akartuk vizsgálni, hogy az izoflavon szerkezet és a ciklodextrin gyűrűje közötti kölcsönhatás térbelileg és energetikailag létrejöhet-e.

- **A genisztein és a daidzein fázisoldékonysági vizsgálata**

5 mg genisztein illetve daidzein + 5-5 ml növekvő koncentrációjú ciklodextrin oldat; keverés 10 óráig mágneses keverőn 600 rpm fordulaton; szűrés 0,45 µm-es membránszűrőn; vendégmolekula mennyiségi értékelése UV-spektrofotometrián.

- **Kompleképzés**

Nedves-gyúrásos technika (wet-kneading method): a két izoflavont és az egyes ciklodextrineket 2:1 gazda-vendég arányban homogenizáltuk, majd kevés 50 %-os etanollal éppen gyúrható masszává kevertük, s intenzív gyúrás után  $P_2O_5$  felett szárítottuk. Megmértük a szárítási veszteségüket  $105^\circ\text{C}$ -on történő hevítéssel (5-10%), s végül hatóanyag tartalmukat UV-spektrofotometriával.

- **Genisztein és daidzein / CD komplexek kioldódási profilja**

Mérés non-sink körülmények mellett UV-spektrofotometriával; 50 ml desztillált víz + 5 mg hatóanyag, illetve 50 mg komplex; mintavétel 30 percig 5 percenként, a 40-60. percig 10 percenként; majd mérés.

- **Genisztein és daidzein / CD komplexek  $^1\text{H-NMR}$  vizsgálata**

Varian Inova spektrométer, 600 MHz  $^1\text{H}$ , 5 mm-es inverz detektálású gradiens (IDPFG) mérőfej; hőmérséklet:  $30.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ; a komplex minták  $\text{D}_2\text{O}$ -ban oldva, szobahőmérsékleten rázatás 48 óráig; minta lecentrifugálása; mérés. A megfelelő jel/zaj arányt a genisztein/ $\beta$ -CD rendszer esetén kaptuk.

- **Genisztein és daidzein / CD komplexek  $\text{CD}_1$  spektroszkópiás vizsgálata**

Jasco J-815 spektropolariméter; spektrumok 200-350 ill. 200-400 nm tartományban; 20 nm/perc sebesség, 0.1 nm lépésköz; 5x akkumuláció; oldószer: desztillált víz. A komplexeket előzetesen átszitáltuk, majd vízben oldottuk, lecentrifugáltuk és szűrtük.



### **3.3.3. Genisztein és daidzein, illetve ciklodextrin komplexeinek vizsgálata biológiai tesztekben**

- **Genisztein és daidzein / CD komplexek membrán permeabilitásának 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% CO<sub>2</sub> 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. 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.

A minták izoflavon koncentrációjának meghatározása bazolaterális oldalról vett mintákból: Jasco HPLC-UV készülék; kromatográfias oszlop: 25 cm x 4,6 mm x 5  $\mu\text{m}$ ; eluensek: metanol (B) és 0,3% ecetsav (A) (20-21. ábra); oszlophőmérséklet: 25°C; gradiens program: 0-9 percig 38-100%, 9-13 percig 100% izokratikus; detektálás hullámhossza: 249 nm (daidzein), 262 nm (genisztein).

- **Genisztein /  $\beta$ -CD komplex *Caenorhabditis elegans* modellállat élettartamára gyakorolt hatásának vizsgálata**

Embriók izolálása ('szinkronizálás'); azonos stádiumú (L4) lárvákat NGM (nematode growth medium) agar lemezre (ebben FUDR antimetabolit (5-fluoro-2'-deoxyuridine)); 500 mg

komplex ill. azzal egyenértékű genisztein 50 ml NGM oldatba; ultrahangos homogenizálás, keverés, NGM lemezbe helyezés; 9. nap után állatokat új, hatóanyagmentes, FUDR-mentes NGM agarra; elhalásokat folyamatosan regisztráltuk. Eredmények minden mintánál 50-50 állat átlagából; majd élethossz-görbékét rajzoltunk.

#### **3.3.4. Izoflavonoidok extrakciója ciklodextrinekkel és analízisük**

Kontroll kivonat: 1,5 g darált, átszitált drog (Ph. Hg. VII. rész. méret: ~ 1200  $\mu\text{m}$ ); kivonás 25 ml desztillált víz/30 %-os etanol; 75 perc; ultrahangos rázó gép, 25°C. Kivonatok: 1,5 g darált, átszitált drog (Ph. Hg. VII. rész. méret; ~ 1200  $\mu\text{m}$ ); kivonás: 25 ml desztillált víz/ 30%-os etanol + 0,01 M, 0,03 M, és 0,05 M  $\beta$ -,  $\gamma$ -, HP- $\beta$ - és RAMEB-CD. Centrifugálás 7000 rpm-on; szűrés 0,22  $\mu\text{m}$ -es membránszűrőn. A HP- $\beta$ -CD DS-e 4,2 volt, a RAMEB-CD DS-e ~12.

Az analízis körülményei megegyeztek a hagyományosan kivont izoflavonoidok azonosítására alkalmazott HPL-MS módszerrel (ld. 2.3.1.).

## **4. Eredmények és megvitatásuk**

### **4.1. Triterpenoidok vizsgálatának eredményei**

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

Az *Ononidis radix* kivonatok el nem szappanosítható frakcióiban GC-MS módszerrel a  $\beta$ -szitoszterol ( $M^+414$ ), sztigmaszterol ( $M^+412$ ), kampeszterol ( $M^+400$ ), sztigmasztán-3,5-dién ( $M^+397$ ) szterol komponenseket, a triterpénszármazék  $\beta$ -amirint ( $M^+426$ ) és a speciális szeko-triterpén  $\alpha$ -onocerint ( $M^+443$ ) azonosítottuk.

Az elszappanosítási eljárás során, feltehetően a glikozidok és észterek elhidrolizáltak, így a terpénalkoholokat szabad formában tudtuk azonosítani. Az egyes komponensekre számolt Kováts indexek rendre 3304; 3230; 3260; 3342 és 3318 a sztigmasztán-3,5-dién, kampeszterol, sztigmaszterol,  $\beta$ -szitoszterol és  $\beta$ -amirin esetében.

#### **4.1.2. A különböző kivonási módszerek hatásának vizsgálata a $\beta$ -szitoszterol tartalomra, illetve a triterpenoid összetételre**

A különböző szerves oldószerek polaritása szerint a legnagyobb triterpenoid-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; ez arra utal, hogy a triterpének/szterolok részben kötött formában (glikozidok, észterek) voltak jelen, és apoláris oldószerezrel nem voltak kinyerhetők. A metanolos kivonat el nem szappanosítható része volt a legalacsonyabb hozamú, amit a kivonás alacsony szelektivitása indokol; a metanol a hexánhoz és a szuperkritikus széndioxidhoz viszonyítva lényegesen polárisabb, így több poláris anyagot old ki, ami a tisztítás során eliminálódik. A legjobb hatásfoka az alacsonyabb nyomáson történt szuperkritikus kivonásnak volt, s azon belül is a rövidebb idő kedvezett a triterpenoidok kinyerésének. 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 hozama 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 kivonatónak.

Az el nem szappanosított frakciókat nézve, a  $\beta$ -szitoszterol tartalma a hexános és az SFE kivonatoknak volt a legmagasabb. Az alkoholos kivonatok  $\beta$ -szitoszterol tartalma arra enged következtetni, hogy a  $\beta$ -szitoszterol részben kémiaiilag kötött formában található a növényben. Az SFE kivonatok közül a legnagyobb  $\beta$ -szitoszterol tartalma az 1-es kivonatnak volt. Tanulmányoztuk a triterpenoidok relatív koncentrációját ugyanezekben a kivonatokban GC-FID mérések alapján. A  $\beta$ -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 kampeszterolt, ellentétben a többi kivonattal. Az  $\alpha$ -onocerin aránya az etilacetátos kivonatban volt a legnagyobb, sztigmaszterolt és  $\beta$ -amirint nem találtunk a hexános, etilacetátos és az izopropanolos kivonatokban. A sztigmasztán-3,5-dién valamennyi frakcióban megtalálható volt. A triterpenoidokra leginkább szelektív kivonat a félüzemi SFE frakció volt (93.3%), ezután a hexános frakció (71.8%). Az etanolos és metanolos frakcióban talált viszonylag magas triterpenoid arány azzal magyarázható, hogy egy részük kötött állapotban van jelen a növényben, és a kevésbé apoláris oldószerek alkalmasabbak ezek kivonására. Bár a szuperkritikus kivonatok hozama kisebb, mint a tradicionális eljárással készütek, sokkal szelektívebb a triterpenoidokra.

## 4.2. Izoflavonoidok vizsgálatának eredményei

### 4.2.1. Izoflavonoidok azonosítása HPLC-MS/MS-sel

Az *Ononidis radix*-ból 30% etanollal kivont izoflavonoidok nagy többsége glikozid/galaktozid, glikozid- malonát volt. A következő molekulaionokat  $[M+H]^+$  detektáltuk:  $m/z$  431, 433, 447, 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. A 433-as molekulaion a hozzá tartozó 269-es produkcióval a genisztein-7-O- $\beta$ -D-glikozidot (genisztein) s ennek aglikonját jelzi. Az  $m/z$  431-es molekulaion a 269-es produkcióval jellemzően a formononetin-7-O- $\beta$ -D-glikozid (ononin), illetve annak aglikonja. A 447  $m/z$  értékhez tartozó három komponens közül az első kettő a kalikozin-7-O-glikozid, a másik ion pedig kémiai szerkezet, korábbi UV-adatok és kromatográfiai viselkedés alapján a maackiain-7-O-monohekszid. A maackiain apolárisabb szerkezete miatt később eluálódik az oszlopról. Két komponens 519  $m/z$ -nél feltehetően két formononetin-7-

O-monohezozid-malonát izomer vagy glikozid/galaktozid testvérek, figyelembe véve, hogy a galaktozidok később jönnek le a kromatográfiás oszlopról; egymáshoz viszonylag közel. Az 519-es két molekulaion a genisztein-7-O-monohezozid-malonát, illetve a medikarpin-7-O-monohezozid-malonát; a medikarpin a maackiainhoz hasonló apolárisabb szerkezettel bír, ennél fogva kromatográfiásan távolabb helyezkedik el, mint a genisztein glikozidja. Találtunk két új, irodalomban még nem közölt izoflavonoidot, a kalikozin-7-O-glikozidot ( $m/z$  447) és az irizolidon-7-O-glikozidot ( $m/z$  477), illetve ezek malonil-származékait ( $m/z$  563 és 533). Azonosságukat irodalmi UV- adatokkal is megerősítettük.

#### **4.2.2. Genisztein és daidzein ciklodextrin komplexeinek vizsgálata**

- **Genisztein és daidzein molekula optimalizációja  $\beta$ - és  $\gamma$ -CD-nel**

Az optimalizálások sikeresen megtörténtek a PM3 szemi-empirikus módszerrel  $\beta$ - és  $\gamma$ -CD esetében, a számítások egyeztek, s nem volt jele átfedésnek a Van der Waals felületekben a CD és ligandja között az output komplexben.

- **Genisztein és daidzein fázisoldékonysági vizsgálata**

A genisztein és daidzein fázisoldékonysági diagramja mind a négy CD-nel ( $\beta$ - ,  $\gamma$ -, HP-  $\beta$ -, RAMEB-CD) emelkedő oldékonysági tendenciát mutat az alkalmazott 0-10%-os CD koncentráció tartományban. A legnagyobb oldékonyság fokozást a HP- $\beta$ - és a RAMEB-CD esetén tapasztaltuk.

- **Genisztein és daidzein /CD komplexek kioldódási profilja**

A genisztein és a daidzein vízben nagyon gyengén oldódnak; oldékonyságuk 2,97 illetve 3,70  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , ezért vizes rendszerekben való alkalmazásukhoz oldékonyság fokozás szükséges. A CD-ek minden esetben megnövelték a kioldódást, ráadásul a szubsztituált CD-ek 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  $\gamma$ -CD-es komplexeknél megfigyelhető kezdeti koncentrációcsúcs a  $\gamma$ -CD általánosan jobb nedvesedésének következménye, ezt korábbi nedvesedési peremszög vizsgálatok is alátámasztják.

- **Genisztein és daidzein / CD komplexek  $^1\text{H-NMR}$  vizsgálatának eredményei**

A spektrum kinagyított részlete intramolekuláris keresztcsúcsot mutat a 4-hidroxifenil molekularészlet aromás dublettjei között. A zárványkomplex szempontjából fontos intermolekuláris keresztcsúcsok a 4-hidroxifenil molekularészlet dublettjei és a ciklodextrin üregében található H-5 és H-3 protonok között detektálhatók. Ezek relatív intenzitásai alapján megállapítható, hogy a teljes aromás gyűrű a ciklodextrin üregében helyezkedik el, a vendégmolekula a szélesebb nyílás felől lép a gazdamolekula üregébe, ezt megerősíti egy további gyenge keresztcsúcs a B gyűrű szingulettje és a gazdamolekula H-5 protonja között.

- **Genisztein és daidzein / CD komplexek CD spektroszkópia vizsgálatának eredményei**

A komplexálódás bizonyította a CD spektrumok alapján mind a négy ciklodextrinre; az indukált sávok mindkét komponens esetében jelzik az izoflavon molekulák üregbe záródását. A genisztein és a daidzein, mint akirális molekulák nem rendelkeznek  $\text{CD}_i$  spektrummal. Amennyiben a kromofór csoport királis környezetbe kerül, úgy királisan perturbálttá válik és megjelenik egy indukált CD spektrum (ICD). A geniszteinnél azonban a  $\gamma$ -CD esetében valószínűleg más az izoflavon molekula orientációja, mint a  $\beta$ -CD származékok esetében.

A genisztein esetében a  $\beta$ -CD és HP- $\beta$ -CD negatív előjelű ICD sávokat eredményezett, bár ezek lefutása eltérő, így feltételezhető, hogy a két komplex nem teljesen azonos szerkezetű. A  $\gamma$ -CD esetén pozitív előjelű a görbe, amely alapján feltételezhető, hogy a genisztein más orientációban alakít ki kölcsönhatást a CD-nel. A RAMEB-CD esetén kapott spektrum feltehetően a kolloidális méretű részecskék fényszóródása miatt nem hasonlít a többihez. A daidzein spektrumainál a  $\beta$ -CD esetében 251-nél található a legintenzívebb pozitív előjelű sáv. A HP- $\beta$ -CD-nél 250 körül a  $\beta$ -CD analóg intenzitású és előjelű pozitív sáv, viszont a 350 nm-nél megjelenő negatív sáv alapján feltételezhető, hogy a komplex szerkezete eltér a  $\beta$ -CD komplexétől. A leginkább eltérő CD spektrum a  $\gamma$ -CD esetében tapasztalható; vélhető, hogy a

vendégmolekula CD komplexe alapvetően eltérő szerkezettel rendelkezik, mint a különböző típusú  $\beta$ -CD-ek esetén. 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  $\beta$ -CD spektrumára hasonlít.

#### **4.2.3. Izoflavonok és CD-komplexeik vizsgálata biológiai tesztekben**

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

A genisztein és a genisztein CD komplexeinek látszólagos permeabilitási koefficiens értékei arra utalnak, hogy a  $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD, és a GCD komplexek formájában oldott genisztein gyorsabban jutott át a Caco-2 monolayeren. A RAMEB csak kis mértékben gyorsította a transzport sebességét, annak ellenére, hogy a legnagyobb mennyiségű geniszteint képes oldani komplex formában. Mivel eltérő genisztein koncentrációjuk voltak a kiindulási oldatok (a maximális oldékonyságnak megfelelően), eltérő mennyiségű genisztein transzportálódott. 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 esetében mértük a legnagyobb transzport mennyiséget illetve az átjutott genisztein mennyiséget, hanem a  $\gamma$ -CD esetében. (RAMEB /genisztein komplexálás erősebb, mint a  $\gamma$ -CD /genisztein; talán nem tud olyan könnyen átjutni a genisztein a membránba a komplexből).

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.

A daidzein és a daidzein CD komplexeinek látszólagos permeabilitási koefficiensei azt mutatják, hogy ahogy oldatba kerül a daidzein, már könnyen átjut a Caco-2 sejtek által alkotott monolayeren. Mivel eltérő daidzein koncentrációjuk voltak a kiindulási oldatok (a maximális oldékonyságnak megfelelően), eltérő mennyiségű daidzein transzportálódott. Ennek megfelelően abból a kiindulási oldatból, amelyben több daidzein volt, több transzportálódott. Mivel a transzport sebessége a ciklodextrinek jelenlétében ugyanolyan nagyságrendű volt, mint ciklodextrin nélkül, vélhetően a ciklodextrinek a permeabilitást oldékonyság növelés révén fokozták.

- **Genisztein és  $\beta$ -CD-nel képzett komplexének élettartam növelő hatása *Caenorhabditis elegans***

A 10. napon számolt egyedek 95 illetve 96%-a élt a genisztein tartalmú táptalajok esetében, a genisztein/ $\beta$ -CD-nél 97-100%-uk volt életben; ez már itt szignifikáns az üres, illetve  $\beta$ -CD-es táptalajok 88 és 86%-ával szemben. A 14. napon már sokkal kiugróbb a különbség: az üres táptalajt fogyasztó állatoknak 30%-a, a  $\beta$ -CD-tartalmút fogyasztóak 43%-a volt életben, míg a geniszteines táptalaj esetében ez az érték 61 és 65%, a  $\beta$ -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  $\beta$ -CD-tartalmú, a genisztein tartalmú és a genisztein/ $\beta$ -CD komplex tartalmú táptalajok esetében. Egyértelmű, hogy a komplexálás megnövelte a genisztein biológiai hozzáférhetőségét. Az is látszik, hogy a csak  $\beta$ -CD-t tartalmazó táptalajnak is volt némi hatása az állatok élethosszára.

#### **4.2.4. *Ononidis radix* izoflavonoidok, illetve kivonataik jellemzése**

- **Izoflavonoidok mennyiségi jellemzése *Ononis spinosa* gyökér hagyományos módon és különböző ciklodextrinokkal készült kivonataiban**

- *Az izoflavonoidok mennyiségi jellemzése a 30%-os etanolos - CD-es kivonatokban*

A legnagyobb össz-izoflavon terület eloszlása a HP- $\beta$ -CD-es kivonatoknak van, s a legkisebb a  $\gamma$ -CD-es kivonatok esetében. Érdekes, hogy a ciklodextrinek koncentrációjának növelésével enyhén csökken az izoflavonoid tartalom. A kontrollhoz (30%-os etanolos kivonat) hasonlítva a CD-es kivonatok még a  $\gamma$ -CD-nél is jobb a hagyományos kivonás hatékonysága. Mivel a  $\beta$ -CD vízdékonysága elég alacsony, s ez etanollal csak bizonyos szintig emelhető (2,2%; 30% etanol), a másik két magasabb koncentrációban már nem oldódott föl, ezért a következő lépcsőkben nem tudtuk vizsgálni a kivonásra gyakorolt hatását.

A kivonás során a CD-ek a HP- $\beta$ -CD >  $\beta$ -CD > RAMEB-CD >  $\gamma$ -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- $\beta$ -CD tartalmú kivonatok izoflavonoid tartalma volt a kontrollhoz mérhető.

Ezek az eredmények mind azt támasztják alá, hogy az etanol, bár kétségkívül 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 ciklodextrinekkal szemben. 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- $\beta$ -CD ragyogó vízdoldékonysága és a molekula külső felszínének kellő hidrofilitása/polaritása a legmagasabb izoflavonoid-hozamot produkálta.

Az egyes ciklodextrin származékok eltérő mennyiségben segítették a fent felsorolt izoflavonoidok kivonását; függően az üregmérettől, a polaritástól, a szubsztituensek méretétől, az oldalláncoktól. A legnagyobb mértékben a HP- $\beta$ -CD fokozta az izoflavonoidok kivonását. A  $\gamma$ -CD és a HP- $\beta$ -CD a malonil-izoflavonoidokat is kivonta a drogból, ez arra utalhat, hogy az etanol kompetáló hatása mellett a malonilcsoportok térhatása is gátlólag érvényesül a komplex asszociáció során. A legnagyobb mennyiségben a genisztint lehetett kinyerni; itt a HP- $\beta$ - és a RAMEB-CD volt a leghatékonyabb. A CD nélküli kontroll kivonatban az irizolidon-7-O-glikozid-6''-malonát, a formononetin-7-O-monohezoxid-6''-malonát, a maackiain-7-O-glikozid és a medikarpin- 7-O-glikozid malonátok mennyisége meghaladta a többi kivonatban találtakét.

Mindazonáltal az izoflavonoidok kivonásához használt ciklodextrin koncentráció emelkedése nem fokozta egyértelműen az izoflavonoidok mennyiségét.

- *Az izoflavonoidok mennyiségi jellemzése 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 felülmúlta a kontroll vizes kivonat izoflavonoid-hozamát. A legnagyobb izoflavonoid tartalmat a 0,01 M-os és a 0,03 M-os CD-oldatokkal kaptuk. A CD-ek a következő sorrendben segítették az izoflavonoidok kinyerését:  $\gamma$ -CD < RAMEB-CD < HP- $\beta$ -CD. A  $\gamma$ -CD-nek volt a leggyengébb hatása, valószínűleg a nagy aggregációs sajátsága miatt. 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- $\beta$ -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- $\beta$ -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 azt mutatják az eredmények, hogy a tiszta vizes rendszerben már szignifikánsan érvényesül a ciklodextrinek hatása. Itt nem kompetál semmilyen más anyag a CD-üregéért, így a CD-ek hozamfokozó hatása egyértelműen kifejezett. Valamennyi kivonat azonosított összizoflavon tartalma meghaladja a kontrollét. Ugyanakkor itt is a legalacsonyabb CD koncentrációlépcső bizonyult a legmegfelelőbbnek a kivonáshoz.

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- $\beta$ -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- $\beta$ -CD és kevésbé a RAMEB-CD tartalmú kivonatokban látható, mennyiségük a CD koncentrációval nem emelkedik. Az irizolidon-glikozid malonil származéka főleg a  $\gamma$ -CD és a HP- $\beta$ -CD tartalmú kivonatokban jelent meg. A medikarpin-7-O-glikozid malonil származékát a HP- $\beta$ -CD tartalmú kivonatok tartalmazták nagyobb mennyiségben.

## 5. Következtetések és új eredmények

Az *Ononis spinosa* apoláris jellegű, terápiásan is ígéretes triterpénjeit vizsgálva, különféle polaritású kivonószereket - hexánt, acetont, etil-acetátot, metanolt, etanolt, izopropanolt, illetve szuperkritikus fluid CO<sub>2</sub>-ot - alkalmazva megállapítottuk, hogy triterpenoidok kinyerésére leghatékonyabb a hexán és a szuperkritikus fluid CO<sub>2</sub>. Szignifikáns mennyiségű szterol volt azonban még kinyerhető a polárisabb kivonószerekkel, mint az etanollal és a metanollal; ez feltételezhetően a szterolok kémiaiilag kötött formája miatt volt megfigyelhető. A fenti kivonatokban GC-MS módszerrel a  $\beta$ -szitoszterol, kampeszterol, sztigmaszterol, sztigmasztán-2,5-diént,  $\alpha$ -onocerint és  $\beta$ -amirint azonosítottunk, illetve értékeltük az egyes triterpenoidok részarányát a különböző kivonatokban. Megállapítottuk, hogy a különféle komponensekben leggazdagabb kivonat a félüzemi körülmények között készült SFE kivonat. Kidolgoztunk egy származékképzés nélküli GC-FID módszert a  $\beta$ -szitoszterol – mint főkomponens - tartalom mérésére, majd vizsgáltuk az egyes fenti kivonási módszerek hatását a  $\beta$ -szitoszterol tartalomra.

A relatíve legtöbb  $\beta$ -szitoszterol a 100 baron készült SFE 1 és 2 kivonatokban volt; ezt követte a hexános kivonat; a félüzemi léptékű kivonás során ennél kevesebb  $\beta$ -szitoszterol volt kinyerhető; így a  $\beta$ -szitoszterol kinyeréséhez az alacsonyabb nyomás kedvezett.

A legnagyobb mennyiségű el nem szappanosított frakciók szintén az 1 és 2 szuperkritikus fluid extrakciókban voltak; tehát az alacsonyabb nyomás kedvezőbb volt a triterpenoidok kivonásához.

Munkánk során HPLC-MS-sel sikeresen azonosítottunk 14 izoflavon-monohezoxid származékot az *Ononis spinosa* L. gyökérdrogjában molekulaionjaik, fragment ionjaik, aglikon standardek és irodalmi adatok alapján. Az azonosított komponensek többsége glikozid, illetve malonil- glikozid, ezek jelenlétét UV-adatokkal is megerősítettük. Egy új, még irodalomban le nem írt komponensként az irizolidon-7-O-glikozidot és annak 6''-malonil származékát azonosítottuk. Az *Ononis spinosában* található genisztein és daidzein aglikonok vízben szinte alig oldódnak,

számottevő biológiai hatásuk miatt így indokolt lehet a molekuláris kapszulázásuk.

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

Megállapítottuk, hogy az alkalmazott  $\beta$ -,  $\gamma$ -, HP- $\beta$ -, és RAMEB-CD ciklodextrinek vízben többszörösére növelték a genisztein és a daidzein kioldódását a RAMEB-CD > HP- $\beta$ -CD >  $\beta$ -

CD,  $\gamma$ -CD sorrendben. Kísérletünkben a  $\beta$ -,  $\gamma$ -, HP- $\beta$ -, 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  $\gamma$ -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 genisztein és a daidzein jelentősen növelte a *Caenorhabditis elegans* élettartamát oxidatív stresszben. Kísérletünkben a genisztein/ $\beta$ -CD komplex esetében jelentős hatásfokozódást tapasztaltunk a tiszta geniszteinhez képest; ez a biológiai hozzáférhetőség növekedésére enged következtetni.

Az *Ononis spinosae* radix izoflavonoidok kinyerését vizsgálva  $\beta$ -,  $\gamma$ -, HP- $\beta$ -, és RAMEB-CD ciklodextrinek segítségével megállapítottuk, hogy a ciklodextrinek tiszta vizes közegben jelentősen növelték a kivont izoflavonoidtartalmat; a HP- $\beta$ -CD hatása volt a legjelentősebb, valamivel kevesebb izoflavonoidot vont ki a  $\gamma$ -CD, illetve a RAMEB-CD. A 30 %-os etanolos közegben a ciklodextrinek hatása nem érvényesült kellőképpen; az etanol jelenléte ezt a hatást lerontotta. A legmagasabb izoflavonoid hozamot szintén a HP- $\beta$ -CD vonta ki, majd a  $\gamma$ -CD, illetve a RAMEB-CD, azonban a legutóbbi a kontrollnál nem volt hatékonyabb. Megfigyeltük, hogy az alkalmazott CD koncentrációk közül a legalacsonyabb, vagyis a 0,01 M volt a legkedvezőbb a kivonáshoz, a másik két magasabb koncentráció esetében, némileg kevesebb anyagot sikerült kivonni. Az ciklodextrines etanolos kivonatban inkább a glikozidokat nyertük ki relatíve nagyobb mennyiségben, míg a vizes kivonatokban a malonil származékok nagyobb arányban jelentek meg a tömkegspektrumban. A legnagyobb mennyiségben kivont izoflavonoid a genisztin és az ononin volt.

## 6. 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.

## **Disszertációm elkészítésében nélkülözhetetlen segítséget nyújtottak:**

Prof. Dr. Szőke Éva, Dr. Blázovics Anna

Prof. Dr. Lemberkovics Éva

Dr. Sente Lajos

Dr. Szarka Szabolcs, Héthelyi Ivánné

Dr. Horváth Péter, Dr. Béni Szabolcs, Dr. Gergely András (SE Gyógyszerészi Kémiai Intézet)

Dr. Balogh Balázs, Dr. Mátyus Péter (SE, Szerves Kémiai intézet)

Dr. Kiss Tímea, Dr. Vecsernyés Miklós (DE, Gyógyszertechnológiai Intézet)

Dr. Simándi Béla (BME, Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszék)

Prof. Dr. Gyurján István †, Dr. László Miklós (ELTE, Növény szerkezet-tani Tanszék)

Dr. Kursinszki László

Ph.D. hallgató társaim, különösen Dr. Böszörményi Andrea, Dr. Blázics Balázs és

Dr. Kertesy Dóra

Dr. Balázs Andrea

SE Farmakognózia Intézet valamennyi munkatársa

Szüleim, testvérem, egész családom, barátaim

Richter Centenáriumi Alapítvány

GVOP 3.11.-2004-05-0397/3.0 pályázat