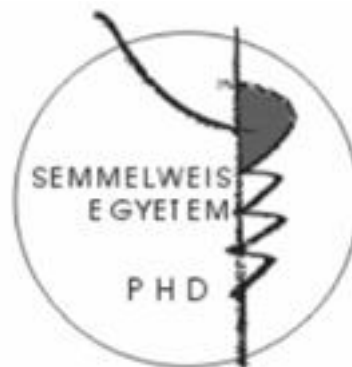


LC-ESI-MS/MS módszerek tradicionális
gyógynövények: *Sempervivum tectorum* L. és *Corylus
avellana* L. flavonoid-glikozid és fenolkarbonsav
profiljának vizsgálatában

Doktori tézisek

Alberti-Dér Ágnes

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók:

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Marton Sylvia egyetemi tanár, Ph.D.

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

Dr. Sátorj Éva egyetemi tanár, D.Sc.

Budapest
2013

BEVEZETÉS

Az utóbbi években számos gyógynövényről bizonyosodott be, hogy az alkalmazott szintetikus hatóanyagok megfelelő alternatívája lehet az enyhe és krónikus betegségek megelőzésében és adjuváns terápiájában. Standardizált növényi kivonatok minőségbiztosítása fontos szerepet játszik a biztonságosságot, hatásosságot és terápiás ismételhetséget célzó vizsgálatokban. Ugyanakkor a növényi kivonatok és készítmények komplexitása, a számos jelenlévő, különböző szerkezetű komponens – melyek jelentős része ismeretlen – megnehezíti a feladatot. Különösen igaz ez a fenoloidokat tartalmazó kivonatokra, hiszen utóbbiak nagy szerkezeti változékonyságban találhatók a növényekben. A kivonatok minőségének jellemzése magában foglalja a gyógynövények hitelesítési céllal történő fitokémiai screen vizsgálatait és az összetévesztések elkerülését lehetővé tevő diagnosztikus vegyületek feltárását.

Modern, tudományos eredményeken alapuló fitogyógyszerek, növényi készítmények fejlesztéséhez elengedhetetlen a standardizálás. Ez magában foglalja a gyógynövény aktív hatóanyagainak azonosítását és meghatározását, valamint a teljeskörű fitokémiai jellemzéshez és a főkomponensek kvantálásához szükséges validált módszerek fejlesztését. Fontos azonban megjegyezni, hogy a farmakológiai hatás nem mindig köthető egyetlen vegyülethez, ehhez gyakran több vegyület együtthatása, vagy szinergizmusa járul hozzá.

Mindezen fitoanalitikai kihívásokhoz nyújt megfelelő eszközt a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC) kapcsolt tömegspektrometria (MS). Az MS szelektivitása és érzékenysége a HPLC által biztosított megfelelő kromatográfiás elválasztással kapcsolva lehetővé teszi a komplex növényi mátrixban jelenlévő vegyületek egyidejű szerkezetvizsgálatát.

Munkánk témájául két tradicionális gyógynövényt, a *Sempervivum tectorum*-ot és a *Corylus avellana*-t választottuk. A *S. tectorum*-ban elsősorban kempferol-aglikon konjugátumokat írtak le, ezek fitokémiai jellemzése azonban nem teljes. Jóllehet a komponensek glikozilációja jelentős mértékben befolyásolhatja biohasznosulásukat, a kövirózsa flavonoid profilját ezideig csak aglikon szinten vizsgálták. A *C. avellana* termés fenoloidjait behatóan vizsgálták, azonban a levélre vonatkozó adatok hiányosak.

A legújabb tanulmányok a fenoloidok számos előnyös farmakológiai hatását írták le, pl.: gyulladáscsökkentő, rákellenes, hepatoprotektív, anti-atherogén, antimikrobiális, ösztrogén, stb. A flavonoidok és fenolkarbonsavak mind élettani hatásaik miatt, mind a növényi

kivonatok és készítmények hitelesítésére alkalmas kemotaxonómiai marker vegyületekként kitüntetett figyelemben részesülnek. Kvalitatív és kvantitatív analitikai jellemzésük nagy szerkezeti változatosságuk és a gyógynövényekben való komplex előfordulásuk miatt érzékeny és megbízható analitikai módszereket igényel. Mindezek alapján a HPLC-MS, mint robusztus, sokoldalú és elérhető technika megfelelő választás lehet.

CÉLKITÚZÉSEK

- Munkánk során célul tűztük ki két, gyógynövényként kevésbé ismert, a tradicionális gyógyászatban azonban kiterjedten alkalmazott faj fitokémiai jellemzésének teljessé tételét. Magyarázatot kívántunk adni a hagyományos felhasználásra, ezzel megalapozni a jövőbeni terápiás alkalmazást. A *Sempervivum tectorum*-ot és a *Corylus avellana*-t a népi gyógyászatban gyulladáscsökkentő hatása miatt alkalmazzák, melyet a szakirodalom a flavonoid és egyszerű fenoloid (hidroxibenzoe- és hidroxifahéjsav származék) vegyületeikkel hoz összefüggésbe.
- Mivel a növényi mátrix összetétele nagymértékben függ a kivonás során alkalmazott oldószertől, munkánk céljával tűztük ki különböző polaritású oldószerekkel készült *S. tectorum* kivonatok összehasonlítását. Fitokémiai vizsgálataink irányát a kivonatok *in vitro* antioxidáns aktivitása jelölte ki. Vizsgálni kívántuk ezért a kivonatok fenoloid összetétele és szabadgyökfogó kapacitása közti összefüggéseket.
- Munkánk fontos célja volt a legjelentősebb antioxidáns aktivitással rendelkező *S. tectorum* kivonatok fenoloid összetételének vizsgálata nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriás módszerekkel, különös tekintettel a flavonoid vegyületekre.
- Célunk volt validált kvalitatív és kvantitatív folyadékkromatográfiás / tandem tömegspektrometriás módszerek fejlesztése a hagyományosan a fülgyulladás kezelésére alkalmazott *S. tectorum* présnedv teljes körű fitokémiai analízisére.

- A *S. tectorum* hidroxifahéjsav származékaira irányuló vizsgálatokat ezideig nem végeztek, ezért célunk volt ezen vegyületek jellemzése és meghatározása kövirózsa présnedvben.
- Célul tűztük ki a *C. avellana* levél flavonol-glikozid és fenolkarbonsav vegyületeire vonatkozó adatok kiegészítését, illetve a különböző oldószerek fenoloid összetételt befolyásoló hatásának vizsgálatát.

MÓDSZEREK

Növényminta

A *Sempervivum tectorum* levélmintákat a Corvinus Egyetem Soroksári Kutatóközpontjában termesztett állományból gyűjtöttük 2007 júniusában. A *Corylus avellana* levélmintákat Nógrádban (Pest megye) gyűjtöttük 2010 júniusában.

Mintaelőkészítés

10-10 g liofilizált *S. tectorum* levélmintából Soxhlet-készülékben 500 ml oldószerral (kloroform, aceton, etanol, 70% (v/v) etanol, metanol, 80% (v/v) metanol) készítettünk kivonatokat. Vizsgáltuk az egyidejű savas hidrolízist és acetonos kivonást követő etil-acetáttal történő folyadék-folyadék extrakcióval készült kivonatot.

80% (v/v) metanollal készült kivonatot Silicagel oszlopkromatográfiával fracionáltunk, az elúciót 100-100 ml növekvő polaritású kloroform-metanol-víz eleggyel végeztük.

A kövirózsa főzetet 5 g liofilizált *S. tectorum* levélmintából készítettük 500 ml forró vízzel. A kövirózsa présnedvet a levelekből közvetlenül begyűjtés után nyertük, liofilezéssel szárítottuk. A száraz présnedvet 80% (v/v) metanolban oldottuk, a kivált poliszacharidokat centrifugálással távolítottuk el.

10 g szárított *C. avellana* levélmintából egymást követő extrakcióval, Soxhlet-készülékben készítettünk kivonatokat 250 ml *n*-hexán, kloroform, etil-acetát és metanol alkalmazásával.

A mintákat vizsgálat előtt C18 töltetű SPE-vel tisztítottuk és fecskendőszűrőn szűrtük.

Tájékoztató kvantitatív fitokémiai vizsgálatok

A *S. tectorum* minták flavonoid, összes polifenol, cserzőanyag, hidroxifahéjsav származék, proantocianidin és antocianin tartalmát a Ph. Hg. VIII. módszerei szerint határoztuk meg.

Antioxidáns aktivitás vizsgálatok

A *S. tectorum* minták antioxidáns aktivitását *in vitro* tesztekben, ABTS^{•+} [2,2'-azino-bisz(3-etilbenzotiazolin-6-szulfonsav)] és DPPH[•] [2,2-difenil-1-pikrilhidrazil] szabadgyökök semlegesítési reakciójában, spektrofotometriásan határoztuk meg. A vizsgálatokat a szabadgyökökre jellemző hullámhossznál, 734 (ABTS) illetve 515 nm-en (DPPH) detektálva végeztük. Különböző polaritású oldószerekkel készült *S. tectorum* kivonatokat, a kövirózsa főzetet és présnedvet, valamint a 80% metanollal készült kivonat frakcióit vizsgáltuk. Összehasonlításként trolox, aszkorbinsav, galluszsav, kávéssav, klorogénsav, kempferol, kvercetin, rutin és miricitrin referencia vegyületeket vizsgáltunk.

A minták peroxinitrit megkötő képességét *in vitro* kioltási fotometriás tesztben, 542 nm hullámhosszon detektálva határoztuk meg. 70% (v/v) etanollal és 80% (v/v) metanollal készült *S. tectorum* kivonatokat, kövirózsa présnedvet, valamint galluszsav, kávéssav, kempferol, kvercetin és rutin standard vegyületeket vizsgáltunk.

Az antioxidáns hatást IC₅₀ értékkel (µg/ml) jellemeztük.

HPLC és LC-MS/MS vizsgálatok

Készülékek

A kromatográfiás elválasztást ABL&E-Jasco HPLC rendszerrel, míg az on-line tömegspektrometriás analízist Agilent 1100 HPLC rendszerrel kapcsolt, elektroporlasztásos (ESI) ionforrással szerelt Agilent 6410B hármass kvadrupól tömegspektrométerrel, negatív ionizációs üzemmódban végeztük.

A vegyületek egyértelmű azonosításához retenciós idejüket, UV- és tömegspektrumaikat irodalmi adatokkal és autentikus standard vegyületekével hasonlítottuk össze.

Kromatográfiás körülmények

A mintákat a kvalitatív és kvantitatív analízisek során fordított fázisú, C18-as oszlopokon választottuk el, bináris gradiens eluensrendszereket alkalmaztunk: ecetsavas vagy hangyasavas vizes fázist és metanolt vagy acetonitrilt szerves fázisként.

Kvantitatív vizsgálatok

A *S. tectorum* présnedv hidroxifahéjsav származékainak mennyiségét 320 nm-en detektált UV-kromatogramok alapján határoztuk meg, míg a kempferol-glikozidokét MS/MS módszerrel, szelektív reakciókövetéses üzemmódban (SRM). A flavonoid főkomponenst 350 nm-en detektált UV-kromatogramok alapján is meghatároztuk. Az MS/MS kvantálás előtt a fragmentor feszültség és a kollíziós energia értékeket a kövirózsa présnedv vizsgálatával optimalizáltuk.

A meghatározás során külső standard kalibrációs módszert alkalmaztunk, ötponos kalibrációt végeztünk, a hidroxifahéjsavak meghatározásakor referencia vegyületekkel (kávésav, klorogénsav, rozmaringsav), míg a flavonol-glikozidok meghatározásakor általunk izolált komponensekkel (kempferol-3-*O*-ramnozil-glükózid-7-*O*-ramnozil, kempferol-3-*O*-dezoihexozid-7-*O*-dezoihexozid, kempferol-3-*O*-hexozid-7-*O*-dezoihexozid).

A módszerek napon belüli és napok közötti ismételhetőségét és pontosságát három koncentrációs pontnál, három egymást követő napon vizsgáltuk. A retenciós idők ismételhetőségét kövirózsa présnedv felhasználásával, hat párhuzamos vizsgálatban határoztuk meg.

A módszer visszanyerését három párhuzamos mérésben vizsgáltuk, liofilizált *S. tectorum* présnedvhez ismert mennyiségű standard oldatot adtunk. A visszanyerés (R) számítására alkalmazott képlet: $R = 100 (C_{\text{mért}} - C_{\text{eredeti}}) / C_{\text{hozzáadott}}$, ahol $C_{\text{mért}}$ = a vegyület mért koncentrációja a dúsított mintában, C_{eredeti} = a vegyület eredeti koncentrációja a mintában, $C_{\text{hozzáadott}}$ = a vegyület koncentrációja a standard oldatban.

A standard vegyületként alkalmazott kempferol-glikozidokat *S. tectorum* 80% (v/v) metanollal készült kivonatából izoláltuk egymást követő oszlop-kromatográfiás módszerekkel. Az alkalmazott állófázisokat (Silicagel 60, Sephadex LH20, MN poliamid SC-9) az egyes vegyületeknek megfelelően, célszerűen választottuk meg, illetve kombináltuk egymással. Az izolált vegyületeket a poliszacharidoktól, szerves savaktól és egyéb mátrix komponensektől fenil töltetű SPE-vel választottuk el. A flavonoid főkomponens szerkezetét NMR spektroszkópiával (600 MHz Varian DDR NMR spektrométer) azonosítottuk.

EREDMÉNYEK

Tájékozódó kvantitatív fitokémiai vizsgálatok

A *Sempervivum tectorum* előzetes fitokémiai vizsgálata során meghatároztuk a liofilizált levélminta flavonoid, összes polifenol, cserzőanyag, proantocianidin és antocianin tartalmát. Vizsgálati eredményeink: összflavonoid: $0,94 \pm 0,07$ g/100 g (hiperozidban kifejezve), összes polifenol: $1,56 \pm 0,08$ g/100 g (pirogallolban kifejezve), tannin: $0,18 \pm 0,03$ g/100 g (pirogallolban kifejezve), proantocianidin: $0,26 \pm 0,03$ g/100 g (cianidin-kloridban kifejezve) és antocianin: $0,10 \pm 0,01$ g/100 g (cianidin-3-glükozid-kloridban kifejezve). A szabadgyökfogó képesség vizsgálatával összefüggésben meghatároztuk a különböző polaritású oldószerekkel készült *S. tectorum* kivonatok összes polifenol tartalmát.

Antioxidáns aktivitás vizsgálatok

A különböző oldószerekkel készült *S. tectorum* kivonatok ABTS-t tartalmazó rendszerben magasabb antioxidáns aktivitással rendelkeztek, mint a DPPH-t tartalmazó tesztben. Szignifikáns korrelációt találtunk a kivonatok antioxidáns aktivitása (IC_{50}^{-1} , ml/ μ g) és összes polifenol tartalma (g/100 g) között mindkét vizsgált *in vitro* rendszerben. A regressziós koeficiensek, a *p*-értékek és a regressziós egyenesek egyenletei az alábbiak: DPPH: $r^2 = 0,8671$, $p < 0,005$, $y = 0,00017x + 0,0044$; ABTS: $r^2 = 0,9866$, $p < 0,005$, $y = 0,0011x - 0,0048$.

Meghatároztuk a 80% (v/v) metanollal készült *S. tectorum* kivonat frakcióinak DPPH' szabadgyökfogó aktivitását, és az eredményeket összehasonlítottuk az összkivonatéval. Az 1-3. frakciók nem rendelkeztek számottevő antioxidáns aktivitással ($IC_{50} > 5000$ μ g/ml), a 4-9. frakciók DPPH' szabadgyökfogó kapacitást mutattak, azonban az szignifikánsan alacsonyabb volt az összkivonatéval.

A kövirózsa présnedvnek és a fenoloidokra szelektívebb oldószerekkel (70%, v/v etanol és 80%, v/v metanol) készült kivonatainak peroxinitrit megkötő képessége jelentősen elmaradt a vizsgált standard vegyületekéhez képest. A *S. tectorum* kivonatokra a kempferol-3-*O*-glikozidok dominanciája volt jellemző, következésképpen a peroxinitrit megkötő képesség egyik szerkezeti feltétele – katechol-csoport a B-gyűrűben ill. nem szubsztituált OH-csoport a 3-*O* pozícióban – sem volt jelen a vegyületekben. Egyetlen kivételként a 80% (v/v) metanollal készült kivonat peroxinitrit megkötő képessége közelítette meg a rutin standardét.

Kvalitatív HPLC és LC-MS/MS analízis

Jóllehet, az ESI-MS/MS nem alkalmas a flavonoid-glikozidok egyértelmű azonosítására, megfelelő információt szolgáltat az aglikon szerkezetéről és a glikán-szekvenciáról. A deprotonált kempferol-, kvercetin- és miricetin-glikozidok (-)CID spektrumában megfigyelhetők a cukorkomponensek lehasadása után keletkező, deprotonált aglikonnak megfelelő fragmensionok: $[Y_0]^-$ m/z 285, 301 és 317 értékeknél, valamint további fragmensek: $[Y^3_0-H]^-$ m/z 284, 300 és 316, $[Y_0-H-CO-H]^-$ m/z 255, 271 és 287. A cukorszubsztituenseket a lehasadásukkor keletkező semleges veszteségek alapján azonosítottuk: 162 amu hexózra utalt, 146 amu dezoxihexózt, feltételezhetően ramnózt jelzett, míg 132 amu pentózt, feltehetően xilózt jelölt. Irodalmi források szerint a cukorkomponensek homolítikus hasadásakor keletkező gyökös aglikon anion $[Y_0-H]^-$ relatív intenzitásának és a heterolítikus hasadásból származó nem gyökös aglikon anion $[Y_0]^-$ relatív intenzitásának aránya összefüggésben van a glikozilációs pozícióval. Intenzív $[Y_0-H]^-$ fragmensionok jelenléte flavonol-glikozidok tömegspektrumában a cukorkomponensek 3-O pozícióból történt lehasadására utal. A $[Y_0-2H]^-$ fragmens keletkezése két glikozil gyök 3-O és 7-O pozícióból történt egymás utáni lehasadásával magyarázható. Munkánk során a cukorkomponensek szubsztitúciós pozícióját a flavonol-glikozidok fragmentációs mintázatát vizsgálva feltételeztük.

***S. tectorum* 80% (v/v) metanollal készült kivonat**

Antioxidáns hatás vizsgálataink eredményei alapján célunk volt a *S. tectorum* 80% (v/v) metanollal készült kivonat nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás vizsgálata. A kivonatban jelenlévő flavonol komponensek egyedi UV-spektrumainak abszorpciós maximumai kempferol- és kvercetin-O-glikozidokra voltak jellemzők.

A deprotonált molekulaionok $[M-H]^-$ azonosításához ESI-MS analízist végeztünk, az ezt követő ESI-MS/MS vizsgálatok során a deprotonált molekulaionokat alkalmaztuk prekürzorként, a vegyületek fragmentációjának elemzése céljából.

A *S. tectorum* 80% (v/v) metanollal készült kivonatában rutint és hat kempferol-glikozidot (kempferol-3-O-hexozid, kempferol-3-O-dezoxihexozid-7-O-dezoxihexozid, kempferol-3-O-hexozil-7-O-dezoxihexozid, kempferol-3-O-dezoxihexozil-pentozid-7-O-dezoxihexozid, kempferol-3-O-dezoxihexozil-hexozid-7-O-dezoxihexozid, kempferol-3-O-dezoxihexozil-pentozid-7-O-dezoxihexozil-hexozid) azonosítottunk vagy feltételeztünk.

***S. tectorum* 80% (v/v) metanollal készült kivonat frakciói**

A kövirózsa 80% (v/v) metanollal készült kivonatát Silicagel oszlopkromatográfiával fracionáltuk a komponensek dúsítása céljából. Így kívántunk információt nyerni a különböző vegyületcsoportok antioxidáns aktivitáshoz történő hozzájárulásáról. A 4-9. frakciók HPLC-UV vizsgálata során a Silicagel oszlopról későn eluálódó frakciókban flavonoid vegyületeket detektáltunk, míg a korábban eluálódott frakciók hidroxibenzoe- és hidroxifahéjsav származékokat tartalmaztak.

A frakciókban tizenhat flavonol-glikozid és öt fenolkarbonsav szerkezetét feltételeztük LC-MS/MS módszerrel. A teljes kivonatban már detektált komponensek mellett öt további kvercetin mono-, di- és triglikozidot és négy kempferol di- és triglikozid jelenlétét igazoltuk. A flavonolok csaknem minden frakcióban megfigyelhetők voltak, az öt gallusz-, kávé- és kumársav származékot azonban csak a Silicagel oszlopról korán eluálódott frakciókban detektáltuk. A komponensek oszlopkromatográfiás fracionálással végzett dúsítása lehetővé tette olyan minor komponensek detektálását a frakciókban, amelyeket az összkivonatban nem figyeltünk meg.

***S. tectorum* présnedv**

A *S. tectorum* présnedvben tíz flavonol-glikozidot és tizenhat szerves és fenolkarbonsavat detektáltunk. A kövirózsa 80% (v/v) metanollal készült kivonatában és annak frakcióiban leírt flavonoidokon kívül kempferol-3-*O*-dezoihexozil-pentozid-7-*O*-dezoihexozil-hexozid és kempferol-3-*O*-dezoihexozil-pentozid-7-*O*-dezoihexozid fumársavval képzett észterének, valamint a Crassulaceae savmetabolizmus anyagcseretermékeinek (izocitromsav, almasav, stb.), hidroxibenzoe- (galluszsav) és hidroxifahéjsavak (kumár-, kávé- és ferulasav) glikozidjainak és egyéb származékainak jelenlétét igazoltuk a présnedvben.

***S. tectorum* etanollal készült kivonat**

S. tectorum etanollal készült kivonata rendelkezett a legmagasabb antioxidáns aktivitással a vizsgált *in vitro* tesztekben, ezért munkánk célja volt a kivonat fitokémiai screen vizsgálata a szabadgyökfogó kapacitáshoz hozzájáruló komponensek azonosítása céljából. A detektált vegyületek UV-spektruma, a kövirózsa korábban vizsgált kivonataihoz hasonlóan, kempferol- és kvercetin-*O*-glikozidokra, valamint hidroxibenzoe- és hidroxifahéjsavakra volt jellemző.

LC-MS/MS módszerekkel tizenkét flavonol-glikozidot és tíz szerves savat és fenolkarbonsavat detektáltunk a kivonatban. A fenolkarbonsavak retenciós idejének és

tömegspektrumának referenciavegyületekkel és irodalmi adatokkal történő összehasonlítása alapján azokat galloil-glikozidokként és kumársav észterekként jellemeztük. A flavonolok közül a kempferol-glikozidok voltak túlsúlyban (hét mono-, di-, tri- és tetraglikozid), a kvercetin-glikozidok ritkábban fordultak elő (négy mono-, di- és triglikozid), míg a miricetin-3-*O*-hexozid volt az egyetlen detektált miricetin vegyület a *S. tectorum* mintáinkban.

***C. avellana* etil-acetáttal és metanollal készült kivonatok**

A *C. avellana* levélmintákban a flavonoidok voltak a domináns vegyületek. Az etil-acetáttal készült kivonatban öt flavonoid-glikozidot (miricetin-3-*O*-dezoihexozid, kvercetin-3-*O*-hexozid, kvercetin-3-*O*-dezoihexozid, kempferol-di(dezoihexozid), kempferol-3-*O*-dezoihexozid) és rozmaringsavat detektáltunk. A főkomponens miricetin-3-*O*-ramnozid (miricitrin) volt. A metanolos kivonatban rozmaringsavon és a fent említett flavonoidokon kívül miricetin-3-*O*-hexozidot és egy kávésav származékot is detektáltunk. A kivonat főkomponense szintén a miricitrin volt.

Kvantitatív vizsgálatok

Hidroxfahéjsav származékok meghatározása *S. tectorum* présnedvben

A kávé-, klorogén- és rozmaringsav mennyiségét *S. tectorum* présnedvben DAD (320 nm) vizsgálatok eredményei alapján határoztuk meg. A detektálási hullámhosszt referencia vegyületek UV-spektrumának vizsgálata alapján jelöltük ki. Az alkalmazott gradiens elúció jó elválást, így megfelelő szelektivitást biztosított mindhárom hidroxfahéjsav számára. A módszer napon belüli és napok közötti ismételhetősége megfelelő volt mindhárom vizsgált komponensre (RSD% < 15%), míg a napon belüli és napok közötti pontosság 73,0% és 125,4% között változott. A présnedv kávésav tartalma $2,69 \pm 0,06$ mg/100 g száraz présnedv (RSD%: 2,08), a klorogénsav tartalom $3,54 \pm 0,27$ mg/100 g (RSD%: 7,68), a rozmaringsav mennyisége < LOD volt. A módszer visszanyerése kávésav esetén 87,19% (RSD%: 1,06), klorogénsavnál 82,41% (RSD%: 1,11), míg rozmaringsavnál 88,26% (RSD%: 1,16) volt.

Kempferol-glikozidok meghatározása *S. tectorum* présnedvben

A kempferol-3-*O*- β -[α -ramnopiranozil-(1 \rightarrow 2)-glükopiranozid]-7-*O*- α -ramnopiranozid (a pontos szerkezetet NMR spektroszkópiával igazoltuk) mennyiségét *S. tectorum* présnedvben SRM (szelektív reakciókövetéses) és DAD (350 nm) analízisek alapján határoztuk meg. A

detektálási hullámhosszt és a meghatározás során mért fragmensiont (m/z 593) a vegyület UV- és tömegspektrumának figyelembevételével jelöltük ki. Az SRM üzemmód magas szelektivitást biztosított, a m/z 739 \rightarrow m/z 593 átmenetet vizsgáltuk. Az alkalmazott gradiens elúciónál jó elválást tapasztaltunk a flavonoid főkomponensre, így a szelektivitás a DAD módszer esetében is megfelelő volt. A présnedv kempferol-3-*O*-ramnozil-glükózid-7-*O*-ramnozil tartalma a TIC SRM meghatározás alapján $0,097 \pm 0,001$ (RSD%: 1,21), míg a DAD 350 nm módszer alapján $0,116 \pm 0,002$ g volt 100 g száraz présnedvben (RSD%: 2,06). A kempferol-3-*O*-dezoihexozid-7-*O*-dezoihexozid és a kempferol-3-*O*-hexozid-7-*O*-dezoihexozid tartalmat *S. tectorum* présnedvben SRM vizsgálatok eredményei alapján határoztuk meg. Az m/z 285 fragmenst (m/z 577 \rightarrow m/z 285 átmenet) választottuk a kempferol-di(dezoihexozid) és ugyanezt a fragmensiont, a m/z 593 \rightarrow m/z 285 átmenetet vizsgálva a kempferol-dezoihexozil-hexozid meghatározásához. Az előbbi vegyület mennyisége $0,044 \pm 0,001$ g/100 g (RSD%: 0,56), míg az utóbbié $0,080 \pm 0,002$ g/100 g száraz présnedv (RSD%: 2,29).

A módszerek visszanyerése 71,61-110,43% között változott. A napon belüli és napok közötti ismételhetség < 15% volt minden módszer esetén, a napon belüli és napok közötti pontosság pedig 78,3% és 113,3% között változott.

KÖVETKEZTETÉSEK

- Meghatároztuk a vizsgálati minták összflavonoid, összes polifenol, cserzőanyag, proantocianidin, antocianin és összes hidroxifahéjsav származék tartalmát gyógyszerkönyvi spektroszkópiás módszerekkel. A részletes fitokémiai analízis irányának kijelöléséhez *in vitro* antioxidáns hatás vizsgálatot végeztünk és összehasonlítottuk a különböző polaritású oldószerekkel készült *Sempervivum tectorum* kivonatokat. Mindhárom módszer (DPPH, ABTS és peroxinitritmegkötő képesség) értékes információt szolgáltatott és következtetéseket engedett meg a fenoloid összetétel változékonyságának vonatkozásában.
- A kivonatok fenoloid összetételére és tartalmára irányuló fitokémiai jellemzés alapján szignifikáns korrelációt tártunk fel a kivonatok antioxidáns aktivitása és fenoloid tartalma között. Ugyanakkor szignifikáns különbséget találtunk *S. tectorum* 80% (v/v) metanollal készült kivonata és a kivonat frakciói között.
- Elsőként alkalmaztunk negatív ionizációs LC–ESI–MS/MS módszereket a kövirózsa flavonol-*O*-glikozid, szerves sav, hidroxibenzoe- és hidroxifahéjsav vegyületeinek analízisére. A tradicionális gyógyászatban alkalmazott *S. tectorum* présnedv, valamint a szabadgyökfogó kapacitás vizsgálatok eredményei alapján kiválasztott, fenoloidokra szelektívebb oldószerekkel (etanollal és 80% (v/v) metanollal) készült kivonatok fitokémiai vizsgálatára került sor. A minor komponensek dúsítása és a különböző fenoloid osztályokba tartozó vegyületek elválasztása céljából Silicagel oszlopkromatográfiával frakcionáltuk a 80% (v/v) metanolos kivonatot.
- Hat kempferol mono-, di-, tri- és tetraglikozidot, valamint rutint azonosítottunk és feltételeztünk a *S. tectorum* 80% (v/v) metanolos kivonatában. Elsőként vizsgáltuk és jellemeztük a *S. tectorum* flavonolok glikozilációs mintázatát. A 80% (v/v) metanollal készült kövirózsa kivonat frakcióiban további kilenc kempferol- és kvercetin-glikozid, valamint gallusz- és hidroxibenzoesav származékok jelenlétét igazoltuk. A kövirózsa etanollal készült kivonatában egy miricetin monohezoxidot és a Crassulaceae savanyagcseréből származó egyszerű szerves savakat detektáltunk. Gyors és egyszerű

HPLC–DAD–ESI–MS/MS módszert fejlesztettünk a kövirózsa présnedv fenoloid és flavonol-glikozid összetételének vizsgálatára.

- Szelektív kvantitatív LC–MS/MS és LC–DAD módszereket fejlesztettünk, validáltunk és hasonlítottunk össze a présnedv flavonoid főkomponensének és két további kempferol-glikozidjának mennyiségi meghatározására, a *S. tectorum* minőségbiztosításában történő alkalmazás céljából. A présnedv fitokémiai jellemzésének kiegészítésére HPLC–UV módszert dolgoztunk ki néhány jellemző hidroxifahéjsav komponens meghatározására.
- A *Corylus avellana* fenoloid profiljának teljeskörű jellemzése céljából különböző oldószerekkel készült mogyoró kivonatokat analizáltunk, HPLC–DAD–ESI–MS/MS módszert alkalmaztunk a flavonol-glikozidok vizsgálatára. A termesztett *C. avellana* levélmintákban korábban már leírt flavonol-3-*O*-ramnozidok mellett két flavonol-3-*O*-hexozidot, valamint egy kempferol-diszacharidot detektáltunk a Magyarországon vadon növő *C. avellana* kivonataiban.
- Eredményeink alátámasztották, hogy a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt negatív ionizációs tandem tömegspektrometria megfelelő, szelektív és érzékeny eszköz a gyógynövények kivonataiban jelenlévő fenoloidok kvalitatív és kvantitatív vizsgálatában. Az alkalmazott módszerek nem tették lehetővé izomer vegyületek, illetve a cukor szubsztituensek sztereokémiájának egyértelmű azonosítását, azonban a vegyületek fragmentációja során keletkező diagnosztikus fragmensionok jelenlétének és / vagy relatív intenzitásának vizsgálata elegendő információt szolgáltatott ahhoz, hogy javaslatot tegyünk mind a flavonol-glikozidok, mind a fenolkarbonsavak szerkezetének jellemzésére.

ÖSSZEFOGLALÁS

Standardizált növényi készítmények fejlesztéséhez elengedhetetlen a minőségbiztosítás. Megnehezíti a feladatot, hogy a gyógynövények kivonatai – és különösen a fenoloid vegyületeket tartalmazók – számos, szerkezetileg nagyon különböző komponensből álló komplex elegyek.

A *Sempervivum tectorum* L. és *Corylus avellana* L. levelét a tradicionális gyógyászatban elsősorban gyulladáscsökkentő hatása miatt alkalmazzák. Farmakológiai hatásukat flavonoid és egyéb fenol-sav komponenseikkel hozták összefüggésbe.

Munkánk célja volt a *S. tectorum* és *C. avellana* fenoloid összetételének átfogó vizsgálata, különös tekintettel flavonoid vegyületeikre. Munkánk során nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt és elektroporlasztásos ionforrással szerelt tandem tömegspektrometrias módszereket alkalmaztunk.

Összefüggést találtunk a vizsgált *S. tectorum* kivonatok összes polifenol tartalma és szabadgyökfogó aktivitása között, a továbbiakban a legnagyobb antioxidáns kapacitással rendelkező kivonatok fenoloid összetételét vizsgáltuk. Egyszerű és gyors HPLC módszereket fejlesztettünk *S. tectorum* 80% (v/v) metanollal és etanollal készült kivonatok, valamint présnedv flavonoid és fenolkarbonsav komponenseinek elválasztására. Elsőként alkalmaztunk LC–ESI–MS/MS módszert negatív ionizációval a kövirózsa flavonol-*O*-glikozid, egyszerű sav, hidroxibenzoe- és hidroxifahéjsav származékainak vizsgálatára. Szelektív HPLC-UV és HPLC-DAD-ESI-MS/MS módszereket fejlesztettünk és validáltunk a tradicionális gyógyászatban leggyakrabban alkalmazott *S. tectorum* présnedv legfontosabb kempferol-3-*O*-glikozidjainak és kávésav-származékainak mennyiségi meghatározására.

Kiegészítettük a *C. avellana* levél flavonol-glikozidjaira vonatkozó adatokat HPLC-DAD-ESI-MS/MS módszerek alkalmazásával. A már korábban is detektált flavonol-3-*O*-ramnozidok mellett flavonol-3-*O*-hexozidok jelenlétét igazoltuk.

Eredményeink megerősítették, hogy a negatív ionizációs HPLC-ESI-MS/MS módszerek szelektív és érzékeny eszközt biztosítanak a vizsgált tradicionális gyógynövények fenoloid vegyületeinek kvalitatív és kvantitatív vizsgálatához.

SUMMARY

Quality control is essential for innovation of standardized herb extracts. However, it can be difficult, since medicinal plant extracts – and particularly those containing phenolics – are complex mixtures of numerous compounds of great structural variability.

Sempervivum tectorum L. and *Corylus avellana* L. have been used in traditional medicine primarily for their anti-inflammatory effects. Flavonoids and other phenolic acids have been attributed to their pharmacological actions. Aim of our work was comprehensive characterization of the phenolic profile of *S. tectorum* and *C. avellana* by electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled to high-performance liquid chromatography, with particular attention to their flavonoid compounds.

We revealed correlation between polyphenol content and radical scavenging activity of *S. tectorum*, and analyzed phenolic composition of extracts showing the highest antioxidant capacity. Simple and fast HPLC methods were developed for separation of flavonoids and phenolic acids in *S. tectorum* 80% (v/v) methanolic and ethanolic extract, as well as in leaf juice. LC–ESI–MS/MS in the negative ionization mode was used for the first time for structural analysis of flavonol *O*-glycosides, simple acids, hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives of houseleek. In addition, we developed selective and validated HPLC-UV and HPLC-DAD-ESI-MS/MS methods for quantitation of the main kaempferol 3-*O*-glycoside and caffeic acid derivative components in *S. tectorum* leaf juice, which has been used traditionally as a medication against inflammation of the ears.

Data concerning flavonol glycoside profile of *C. avellana* leaves have been complemented by the use of an HPLC-DAD-ESI-MS/MS method. Besides flavonol 3-*O*-rhamnosides, previously described for *C. avellana* leaves, we detected flavonol 3-*O*-hexosides in the extracts.

According to our results, HPLC-ESI-MS/MS in negative ionization mode provided a selective and sensitive tool for qualitative, as well as for quantitative evaluation of phenolic compounds present in extracts of traditional herbal remedies.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A szerző disszertációhoz kapcsolódó közleményei

Riethmüller E, **Alberti Á**, Tóth G, Béni Sz, Ortolano F, Kéry Á. (2013) Characterization of diaryl-heptanoid- and flavonoid-type phenolics in *Corylus avellana* L. leaves and bark by HPLC/DAD-ESI/MS. *Phytochemical Analysis*, 24: 493-503.

Alberti Á, Béni Sz, Lackó E, Riba P, Al-Khrasani M, Kéry Á. (2012) Characterization of phenolic compounds and antinociceptive activity of *Sempervivum tectorum* L. leaf juice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 70: 143-150.

Alberti Á. (2012) Étrendi hidroxí-fahéjsav-származékok jelentősége a májterápiában. *Orvosi Hetilap*, 153: 948–953.

Alberti Á, Blazics B., Kéry Á. (2008) Evaluation of *Sempervivum tectorum* L. flavonoids by LC and LC–MS. *Chromatographia*, 68: S107-S111.

A szerző disszertációtól független közleményei

Mincsovics E, Ott PG, **Alberti Á**, Böszörményi A, Héthelyi ÉB, Szőke É, Kéry Á, Lemberkovics É, Móricz ÁM. (2013) In-situ clean-up and OPLC fractionation of chamomile flower extract to search active components by bioautography. *JPC - Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, 26: 172-179.

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

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

Blazics B, **Alberti Á**, Béni Sz, Kursinszki L, Tölgyesi L, Kéry Á. (2011) Identification and LC-MS/MS determination of acteoside, the main antioxidant compound of *Euphrasia rostkoviana*, using the isolated target analyte as external standard. *Journal of Chromatographic Science*, 49: 203-208.

Blazics B, **Alberti Á**, Kéry Á. (2009) Az *Euphrasia rostkoviana* Hayne fenoloid tartalmú frakcióinak antioxidáns értékelése. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 79: 11-16.

Papp I, Simándi B, Blazics B, **Alberti Á**, Héthelyi É, Szőke É, Kéry Á. (2008) Monitoring volatile and non-volatile salicylates in *Filipendula ulmaria* by different chromatographic techniques. *Chromatographia*, 68: S125-S129.

Alberti Á, Vukics V, Hevesi Tóth B, Csedő K, Szőke É, Kéry Á. (2007) Áfonya fajok fenoloidjainak összehasonlító vizsgálata. *Orvosi és Gyógyszerészeti Szemle*, 53: 196-202.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki **Dr. Blázovics Anna** igazgató asszonynak, aki lehetőséget biztosított, hogy a Farmakognóziai Intézetben fejezhessem be doktori tanulmányaimat.

Köszönettel tartozom **Dr. Szőke Éva** professzor asszonynak, a Gyógyszertudományok Doktori Iskola vezetőjének, korábbi intézetigazgatónak, aki mindig biztosította számomra a lehetőséget, hogy az intézetben végezhessem kutatómunkámat.

Hálával tartozom **Dr. Kéry Ágnes** c. egyetemi tanárnak, témavezetőmnek a doktori tanulmányaim során nyújtott iránymutatásért és a támogatásért. Különösen hálás vagyok felbecsülhetetlen szakmai és emberi tanácsaiért és azért, hogy bízott bennem, és lehetővé tette, hogy megvalósítsam az ötleteimet.

Köszönöm **Dr. Kursinszki Lászlónak** (Semmelweis Egyetem, Farmakognóziai Intézet), hogy mindig örömmel nyújtott segítséget, ha kromatográfiai kérdésekkel fordultam hozzá.

Köszönettel tartozom **Dr. Balogh György Tibornak és Könczöl Árpádnak** (Richter Gedeon NyRt., Szintézistámogató Laboratórium) nagylelkű segítségükért, és a lehetőségért, hogy együtt dolgozhattunk.

Köszönöm **Dr. Blazics Baláznak és Dr. Szarka Szabolcsnak** az értékes szakmai megbeszéléseket és tanácsokat.

Hálásan köszönöm **Dr. Béni Szabolcsnak** (Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet) az NMR vizsgálatok során és minden más kérdésben nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom **Dr. Mahmoud Al-Khrasaninak és Lackó Erzsébetnek** (Semmelweis Egyetem, Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet) az antinociceptív vizsgálatok elvégzéséért.

Köszönöm **Dr. Riethmüller Eszternek, Dr. Bányai Péternek** és minden **Ph.D. hallgató társamnak** a laborban nyújtott segítséget és a laboron kívül együtt töltött időt.

Hálás vagyok **Kriston Annának**, aki megosztotta velem laboratóriumi ismereteit.

Köszönettel tartozom **Mathuny Rudolfnének** a minták liofilizálása során nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért.

Köszönöm **Tóth Lenkének** és **minden kollégámnak** támogató közreműködésüket.

Végül köszönöm a **családomnak** és **férjemnek, Ádámnak** a támogatást, a türelmet és a bátorítást.