

## 1. Bevezetés és célkitűzések

A Szegedi Tudományegyetem Farmakognóziai Intézetének ekdiszteroidok izolálásával foglalkozó kutatócsoportja már több évtizede foglalkozik a Caryophyllaceae családba tartozó *Silene* fajok vizsgálatával, azok ekdiszteroid összetételének feltérképezésével.

Munkánk célja elsődlegesen olyan hazai, termesztető ill. vadon előforduló növényfajt találni, amely kiemelkedő ekdiszteroid-szintetizáló képességgel rendelkezik. Továbbá célunk volt új természetes fitoekdiszteroidok izolálása, és azok szerkezetvizsgálata. A *Silene* fajok korábbi széleskörű vizsgálata lehetővé tette az ekdiszteroid-tartalom nemcsak mennyiségi, de minőségi összehasonlítását is a nemzetségen belül.

## 2. Módszerek

A MTA Vácrátóti Ökológiai Botanikai Kutatóintézetében termesztett növényt 1997 májusában gyűjtöttük, majd a herbát légszáraz állapotig szárítottuk,

aprítottuk, metanollal perkoláltuk. Az így kapott nyers metanolos kivonatot tisztítottuk meg a kísérő szennyező anyagoktól az előtisztításkor preparatív léptékű minta-előkészítést (frakcionált lecsapás, folyadék-folyadék extrakció, normál fázisú oszlopkromatográfia) alkalmazva. A tisztítást alacsony nyomású, fordított fázisú oszlopkromatográfiával folytattuk. Minor komponensek esetén további kromatográfiás lépésekre is szükség volt a megfelelő tisztaság eléréséhez (preparatív rétegekromatográfia, nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia).

Az izolált vegyületek fiziko-kémiai jellemzéséhez és szerkezetvizsgálatához a hagyományos fizikai (olvadáspont, optikai rotáció, cirkuláris dikroizmus) és spektroszkópiai (UV, IR) módszerek mellett a nagy felbontóképességű tömeg-, egy- és kétdimenziós NMR spektroszkópiás, ill. röntgen-diffrakciós mérések adatait is felhasználtuk.

### 3. A tudományos eredmények összefoglalása \*

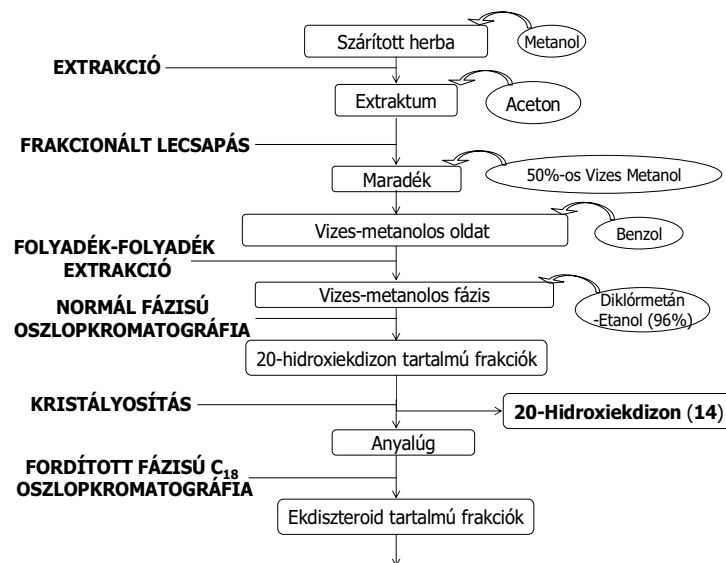
- 3.1. A disszertáció anyagát a *Silene italica* (L.) Pers. ssp. *nemoralis* (Waldst. & Kit.) Nyman ekdiszteroidjainak izolálása és szerkezetvizsgálata képezi. A növény az előzetes tesztek során jó ekdiszteroid szintetizáló képességet mutatott.
- 3.2. Az ekdiszteroidok hatékony és minél szelektívebb izolálására egy olyan izolálási eljárást dolgoztunk ki, amely egyszerű elválasztás-technikai és kromatográfiai módszereket alkalmaz kombináltan. **(1/a, b. ábrák).**

A nyers metanolos kivonatból előtisztítással (frakcionált lecsapás, folyadék-folyadék extrakció, oszlop-kromatográfia) eltávolítottuk a nagy mennyiségben jelen lévő hidrofil és lipofil szennyező és az ekdiszteroidokkal interferáló egyéb anyagokat. A nagy terhelhetőségű normál fázisú oszlop-kromatográfia alkalmazásával értük el az ekdiszteroidok feldúsulását az egyes frakciókban.

---

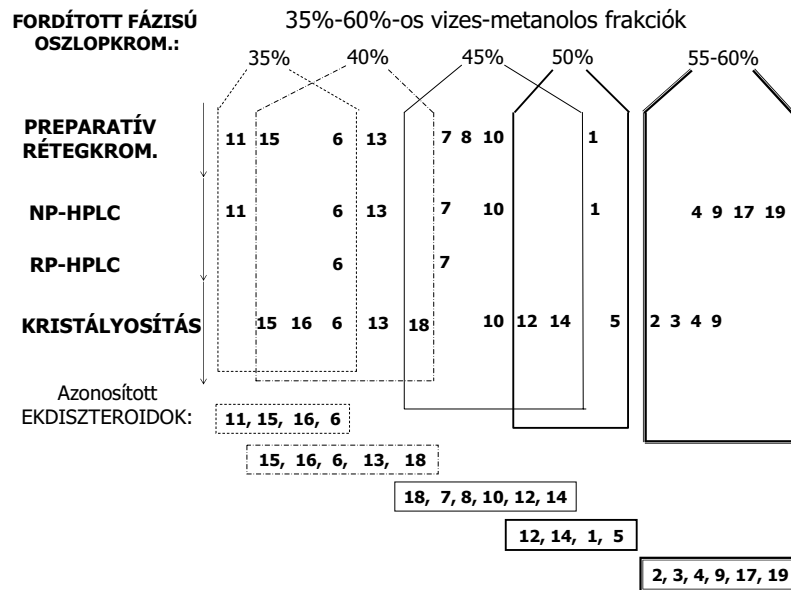
\* A vegyületek számozása megegyezik a doktori értekezésben alkalmazottal.

Fordított fázisú oszlopkromatográfiával folytattuk az ekdiszteroid tartalmú frakciók tisztítását. A módszer nagy kapacitást és jó felbontóképességet biztosított, az elválasztás idejét lerövidítette. Az így nyert frakciókból kristályosítással tiszta ekdiszteroidokat állíthattunk elő. Az anyalúgot ismételt oszlopkromatográfiával vagy preparatív rétegekromatográfiával tisztítottuk tovább.



1/a. ábra Előtisztítás menete.

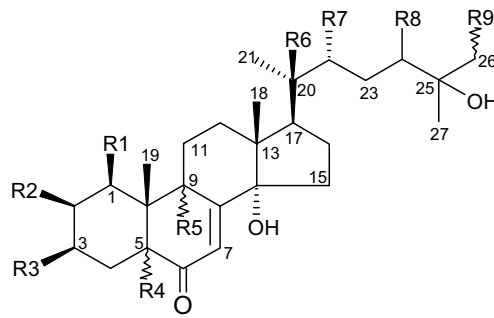
Az izolálás végső szakaszában már szelektívebb, nagyobb felbontóképességű kromatográfiás eljárásokat alkalmaztunk a minor komponensek elválasztásához, mint a normál és fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiát (NP/RP-HPLC).



**1/b ábra** Az ekdiszteroidok izolálásának utolsó lépései.

3.3. Az ekdiszteroidok (**1-19**) azonosítása először kromatográfiásan történt. Normál és fordított fázison rétegekromatográfiával (NP- és RP-TLC) 5-5, nagy-hatékonyságú folyadékkromatográfiával (NP- és RP-HPLC) 3-3 oldószerrendszerben jellemeztük az anyagokat. A továbbiakban fizikai állandók mérésével (olvadáspont, optikai rotáció, CD) és hagyományos spektroszkópiás módszerekkel (UV, IR) történt a szerkezetvizsgálat. Az új vegyületek szerkezetének meghatározását MS-MS, ill. egy- ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  és DEPT) és kétdimenziós (COSY, TOCSY, HMBC, HMQC) NMR spektrumok felvételével végeztük el. Néhány kristályos vegyület esetében (**6**, **14**, **18**) a röntgendiffrakciós eljárással egyértelműen bizonyítottuk a szerkezetet.

Az izolált ekdiszteroidok szerkezetét a **2. ábra** mutatja.



E	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
<b>1</b>	H	OH	OH	H	H	OH	OH	=CH	H
<b>2</b>	H	<b>H</b>	OH	H	H	<b>H</b>	OH	H	H
<b>3</b>	H	<b>H</b>	OH	H	H	OH	OH	H	H
<b>4</b>	H	OH	OH	H	H	OH	<b>H</b>	H	H
<b>5*</b>	H	<b>H</b>	OH	H	H	OH	<b>O-gl</b>	H	H
<b>6*</b>	<b>OH</b>	<b>H</b>	OH	<b>H (α)</b>	H	OH	OH	H	H
<b>7</b>	<b>OH</b>	<b>H</b>	OH	H	H	OH	OH	H	H
<b>8</b>	<b>OH</b>	OH	OH	H	H	OH	<b>H</b>	H	H
<b>9*</b>	H	<b>H</b>	OH	<b>OH</b>	H	OH	OH	H	H
<b>10*</b>	H	OH	OH	H	<b>OH (α)</b>	OH	OH	H	H
<b>11*</b>	H	OH	OH	H	<b>OH (β)</b>	OH	OH	H	H
<b>12</b>	H	OH	OH	H	H	<b>H</b>	OH	H	H
<b>13</b>	H	OH	OH	<b>H (α)</b>	H	OH	OH	H	H
<b>14</b>	H	OH	OH	H	H	OH	OH	H	H
<b>15</b>	H	OH	OH	<b>OH</b>	H	OH	OH	H	<b>OH</b>
<b>16</b>	<b>OH</b>	OH	OH	H	H	OH	OH	H	H
<b>17</b>	H	OH	OH	H	H	OH	OH	<b>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub></b>	H
<b>18</b>	H	OH	OH	<b>OH</b>	H	OH	OH	H	H
<b>19</b>	H	OH	OH	H	H	OH			

E, ekdiszteroid; \*új ekdiszteroid; gl, glükóz

## 2. ábra\*

\* A táblázat kiemelései az egyes vegyületek szerkezeti eltéréseit mutatják a 20-hidoxiekdizonhoz (14) képest.

A *S. italica* ssp. *nemoralis*ból izolált ekdiszteroidok:

- 1: 24(28)-dehidromakiszteron A
- 2: 2-dezoxiekdizon
- 3: 2-dezoxi-20-hidroxiiekdizon
- 4: 22-dezoxi-20-hidroxiiekdizon
- 5: 2-dezoxi-20-hidroxiiekdizon 22-*O*- $\beta$ -D-glikozid
- 6: 5 $\alpha$ -2-dezoxiintegrizteron A
- 7: 2-dezoxiintegrizteron A
- 8: 22-dezoxiintegrizteron A
- 9: 2-dezoxipolipodin B
- 10: 9 $\alpha$ ,20-dihidroxiiekdizon
- 11: 9 $\beta$ ,20-dihidroxiiekdizon
- 12: ekdizon
- 13: 5 $\alpha$ -20-hidroxiiekdizon
- 14: 20-hidroxiiekdizon
- 15: 26-hidroxiolipodin B
- 16: integrizteron A
- 17: makiszteron C
- 18: polipodin B
- 19: shidaszteron



3.4. A izolált 19 ekdiszteroidból 14 ismert szerkezetű vegyületnek bizonyult, amelyek a következők. A százalékos ekdiszteroid tartalmat szárított tömegre adjuk meg:

FŐ KOMPONENS:

20-hidroxi-ekdizon (**14**) (~0,5 %),

MINOR KOMPONENSEK:

2-dezoxi-20-hidroxi-ekdizon (**3**), ekdizon (**12**), polipodin B (**18**), 2-dezoxi-ekdizon (**2**) (0,05-0,01%);

22-dezoxi-20-hidroxi-ekdizon (**4**), integriszteron A (**16**), 2-dezoxi-integriszteron A (**7**), 22-dezoxi-integriszteron A (**8**), 5 $\alpha$ -20-hidroxi-ekdizon (**13**), 26-hidroxi-polipodin B (**15**), makiszteron C (**17**), 24(28)-dehidmakiszteron A (**1**) (<0,001 %).

3.5. Ezek mellett 5 új természetes vegyületet is izoláltunk a növényből: 9 $\alpha$ ,20-dihidroxi-ekdizon (**10**), 9 $\beta$ ,20-dihidroxi-ekdizon (**11**), 2-dezoxi-20-hidroxi-ekdizon 22-O- $\beta$ -D-glikozid (**5**), 2-dezoxipolipodin B (**9**), 5 $\alpha$ -2-dezoxi-integriszteron A (**6**) (~ 0,0001%).

- 3.6. Összehasonlítottuk a *Silene italica* ssp. *nemoralis* ekdiszteroid tartalmát és ekdiszteroid összetételét más *Silene* fajokkal. A *Silene italica* ssp. *nemoralis*
- viszonylag magas 20-hidroxiiekdizon tartalmú (a növény és állatvilágban egyaránt a legnagyobb mennyiségben előforduló ekdiszteroid).
  - 2-dezoxi ekdiszteroidokat szintetizáló képessége kiemelkedően magas összehasonlítva más növényfajokkal. A *Silene* fajok jellemző minor vegyületei közül a 2-dezoxi-20-hidroxiiekdizont és a polipodin B-t izoláltuk nagy mennyiségben. Az utóbbi vegyület a növényvilágban általánosan előforduló ekdiszteroid.
  - a *Silene* fajokra jellemző széles ekdiszteroid spektrumot mutat (apoláris 2-dezoxi ekdiszteroidoktól a poláris cukor ill. 8 hidroxilcsoportot tartalmazó ekdiszteroidokig).

- 3.7. A 9-es helyzetben hidroxilezett 20-hidroxiiekdizon származékok farmakológiai jelentőséggel is bírhatnak, mivel a citotoxikus szteroidokhoz szerkezetileg közeli rokon vegyületek.
- 3.8. A *Silene italica* ssp. *nemoralis* viszonylag magas 20-hidroxiiekdizon tartalma miatt alkalmas hazai nyersanyagforrás lehet ekdiszteroid tartalmú roboráló, tonizáló hatású készítmények előállításához.

### Tudományos közlemények

- I. Pongrácz, Z., Blaszó, G., Báthori, M. 2000. Az ecdiszteroidok szerepe és jelentősége, különös tekintettel a humán terápiára. *Fitoterápia* **V**(3-4): 57-64.
- II. Báthori, M., Kalász, H., Pongrácz, Z., Máthé, I., Kálmán, A., Argay, G. 2002. 5-Alpha-and 5-beta isomer pair of ecdysteroids isolated from the *Silene* genus. *Biomed. Chromatogr.* **16**(1): 373-378.  
IF: 1,430
- III. Báthori, M., Pongrácz, Z., Tóth, G., Simon, A., Kandra, L., Kele, Z., Omacht, R. 2002. Isolation of a new member of the ecdysteroid glycoside family: 2-dezoxi-20-hidroxiiekdizon-22-O-D-glycopyranoside, *J. Chromatogr. Sci.* **40**(7): 409-415.  
IF: 0,987
- IV. Pongrácz, Z., Báthori, M., Tóth, G., Simon, A., Mák, M., Máthé, I. 2003.  $9\alpha,20$ -dihidroxiiekdizon, a new natural ecdysteroid with a unique structure isolated from *Silene italica* ssp. *nemoralis*. *J. Nat. Prod.* **66**: 450-451.  
IF: 1,737

- V. Báthori, M., Kalász, H., Janicsák, G., Pongrácz, Z., Vámos, J. 2003. TLC of phytoecdysteroids. *J. Liquid Chromatogr. R. T.*, közlésre elfogadva.  
IF: 0,762
- VI. Báthori, M., Pongrácz, Z. 2003. Phytoecdysteroids – From Isolation to Genetics. *Curr. Med. Chem.*, közlésre elfogadva.  
IF: 5,76
- VII Báthori, M., Pongrácz, Z., Máthé, I. 2003. Chromatographic purification of 2-deoxypolypodine B and shidasterone from *Silene italica* ssp. *nemoralis*. *J. Chromatogr. Sci.* közlésre beküldve.
- VIII Simon, A., Pongrácz, Z., Tóth, G., Mák, M., Máthé, I., Báthori, M. 2003. A unique ecdysteroid with modified skeleton at C-9 and three accompanying ecdysteroids of *Silene italica* ssp. *nemoralis*. *J. Nat. Prod.* közlésre beküldve.

**ΣIF: 10,676**

### Tudományos poszterek és előadások

1. Pongrácz, Z., Báthori, M., Máthé, I., Janicsák, G., Miklóssy, V. V. Ecdysteroids as varying chemical constituents of *Silene* species growing in Hungary. *World Conference on Medicinal and Aromatic Plants*, „Poster Section”, Budapest, Hungary, 2001. Jul.  
Proceedings of the International Conference on Medicinal and Aromatic Plants, Part II, Bernáth, J. et al. (Eds.), Acta Horticulturae 597, ISHS 2003, pp. 131-135.
2. Pongrácz, Z., Báthori, M., Máthé, I., Janicsák, G. Fitoekdiszteroidok megoszlása a *Silene nutans*ban és a *S. otites*ben. Magyar Biológiai Társaság Botanikai Szakosztály 1377. Szakülés, Budapest, 2001. dec.10.  
*Botanikai Közlemények* 2001, **88**(1-2): 221.
3. Pongrácz, Z., Báthori, M., Simon, A., Tóth, G., Miklóssy-Vári, V., Máthé, I. A *Silene italica* ssp. *nemoralis*, mint új ekdiszteroid forrás. Gyógynövények kutatása és felhasználása 2002, Kecskemét, 2002. nov. 13-15.

Előadásösszefoglalók 175. old. (E-36).

4. Simon, A., Tóth, G., Báthori, M., Pongrácz, Z. Isolation and NMR investigation of ecdysteroids from *Silene italica* ssp. *nemoralis*. 4th Central European NMR Symposium & Bruker NMR Users Meeting, Budapest, 2002. szept. 2-3.
5. Simon, A., Tóth, G., Báthori, M., Pongrácz, Z., Hunyadi, A. *Silene italica* ssp. *nemoralis* növényből izolált minták szerkezetvizsgálata. Analitikai Napok, Magyar Kémikusok Egyesülete, Budapest, 2003. január 29-30.
6. Pongrácz, Z., Báthori, M., Simon, A., Tóth, G., Miklóssy-Vári, M., Máthé, I. Modellvegyületek a biológiailag aktív ekdiszteroidok félszintetikus előállításához. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XII, Budapest, 2003. május 8-10.  
*Gyógyszerészet* 2003, Kongresszusi Különszám, Poszterek 85. old (P-86).