

**Az *Aconitum anthora* és az *A. moldavicum* diterpénalkaloidjai és
lipoalkaloidokkal végzett vizsgálatok**

Ph.D. értekezés tézisei

Dr. Borcsa Botond Lajos

Szegedi Tudományegyetem
Farmakognóziai Intézet

Szeged
2013

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Farmakognózia Ph.D. program

Programvezető: Prof. Dr. Hohmann Judit D.Sc.

Farmakognóziai Intézet

Témavezetők:

Prof. Dr. Hohmann Judit D.Sc.

Dr. Csupor Dezső Ph.D.

***Az *Aconitum anthora* és az *A. moldavicum* diterpénalkaloidjai és
lipoalkaloidokkal végzett vizsgálatok***

Ph.D. értekezés tézisei
Dr. Borcsa Botond Lajos

Szigorlati bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Máthé Imre D.Sc.

Tagok: Dr. Kéry Ágnes Ph.D. Dr. Dános Béla C.Sc.

Bírálati bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Falkay György D.Sc.

Opponensek: Dr. Vasas Gábor Ph.D., Dr. Bölcskei Hedvig Ph.D.

Titkár: Dr. Lázár László C.Sc.

Tagok: Dr. Janicsák Gábor C.Sc.

Szeged, Magyarország

2013

1. BEVEZETÉS

A több mint 2000 fajt magába foglaló boglárkafélék (*Ranunculaceae*) családjába tartozó növényfajok az általuk bioszintetizált specifikus vegyületek révén változatos farmakológiai és élettani hatásokkal bírnak, így világszerte egyre növekvő tudományos érdeklődésre tartanak számot. Az e család legintenzívebben vizsgált nemzetségeibe (sisakvirág – *Aconitum*, szarkaláb – *Delphinium* és *Consolida*) tartozó növényfajok az északi mérsékelt övben általánosan elterjedtek. Tapasztalati úton ismert, hogy e növények mérgezőek. Ezekbe a nemzetségekbe tartozó növényfajok erősen toxikus diterpénalkaloidokat (DA-k) halmoznak fel, amely vegyületeket komplex szerkezetük, érdekes kémiai sajátosságuk és figyelemre méltó élettani hatásuk miatt megkülönböztetett figyelem övez.

A széleskörűen elterjedt *A. napellus* gyökerét és fő alkaloidját, az akonitint trigeminus neuralgia kezelésére használták a XX. század első feléig. Később a sisakvirágdrogok gyógyászati felhasználása eltűnt a nyugati orvoslásból, és ez összefüggött a diterpénalkaloidok igen szűk terápiás tartományának felismerésével. A távol-keleti tradicionális gyógyászati rendszerekben ugyanakkor évszázadok óta és ma is alkalmazzák a sisakvirágdrogokat fájdalomcsillapító és reumaellenes szerekként. Számos nyers és feldolgozott sisakvirágdrog jelenleg is hivatalos több távol-keleti ország nemzeti gyógyszerkönyvében.

A feldolgozott sisakvirágdrogok kémiai, farmakológiai és toxikológiai jellemzői napjainkban sincsenek teljesen feltárva. A tradicionális ázsiai gyógyászati rendszerek világszintű elterjedésével és a növényi gyógyszerek iránti növekvő közérdeklődéssel párhuzamosan, a sisakvirágdrogokkal végzett fitoanalitikai vizsgálatok egyre növekvő jelentőséggel bírnak a növények biztonságos alkalmazásának megítélésében. A Hagyományos Kínai Orvoslás (HKO) és a modern, bizonyítékokon alapuló medicina harmonizációjának következtében a sisakvirág-készítmények jelentősége a nyugati országok gyógyászatában is növekszik. Az *Aconitum* drogok felvétele az Európai Gyógyszerkönyv gyógnövénycikkelyei közé már folyamatban van.

Napjainkban intenzíven folyik a hagyományos feldolgozásmódok alkaloidösszetételre gyakorolt hatásának vizsgálata, valamint a drogok minőségellenőrzését szolgáló analitikai módszerek kidolgozása, illetve a diterpénalkaloidok farmakológiai-toxikológiai értékelése.

2. CÉLKITŰZÉS

2001-ben HOHMANN és *mtsai* (Szegedi Tudományegyetem, Farmakognóziai Intézet) kutatási programot indítottak a Kárpát-medencében őshonos *Aconitum* fajok vizsgálatára. A program a fajok mélyreható tanulmányozását célozta, mivel a ritka és/vagy endemikus *Aconitum* fajok kémiai és farmakológiai jellemzői részlegesen vagy teljes mértékben feltáratlanok. Ehhez az átfogó kutatási tevékenységhez csatlakozva munkám célkitűzései a következők voltak:

1. a diterpénalkaloidok tématerületén megjelent új kutatási eredmények áttekintése;
2. az *A. anthora* és az *A. moldavicum* alkaloidjainak fitokémiai vizsgálata, diterpénalkaloidjaik preparatív kromatográfiai módszerekkel történő izolálása annak érdekében, hogy a Ranunculaceae család e fajainak kémiai jellemzőiről információt kapjunk;
3. az izolált vegyületek szerkezetének felderítése NMR és HRMS technikák alkalmazásával, az izolált új vegyületek spektrális adatainak meghatározása, illetve a már ismert vegyületek hiányos NMR adatainak kiegészítése;
4. egy akonitinből kiinduló lipoalkaloid sorozat félszintetikus előállítás és kromatográfiai tisztítása;
5. együttműködések keretében a lipoalkaloidok gyulladáscsökkentő aktivitásának, valamint a korábban és e doktori munka során újonnan izolált diterpénalkaloidok hERG és Na_v1.2 ioncsatorna-gátló aktivitásának értékelése;
6. a toxikus diéster diterpénalkaloid-tartalom mennyiségi meghatározása autentikus és feldolgozott *A. carmichaelii* és *A. kusnezoffii* mintákban.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Az *A. anthora* hajtása és gyökere a virágzási időszak során 2002 szeptemberében a Füzéri Várhegyen és a Tar-kőnél (Északi-középhegység), míg az *A. moldavicum* föld alatti része 2006 októberében Eger közelében került begyűjtésre.

A diterpénalkaloidok izolálásához többféle kromatográfiai módszert (légköri nyomású oszlopkromatográfia (CC), centrifugális rétegekromatográfia (CPC), gélkromatográfia (GFC), preparatív rétegekromatográfia (PLC), vékonyréteg-kromatográfia (TLC), és vákuum-folyadékromatográfia (VLC)) alkalmaztunk. A kromatográfiai frakcionálást Al₂O₃ rétegeken végzett TLC-vel követtük, és tömény kénsavas permetezést követő hevítéssel vagy Dragendorff-reagenssel detektáltuk.

A vegyületek szerkezet-meghatározását HRESIMS, 1D és 2D NMR spektroszkópiás vizsgálatok (¹H-¹H COSY, NOESY, HSQC és HMBC) segítségével végeztük el.

A lipoalkaloidok félszintetikus előállítását átészterezéssel végeztük, amely során a reakcióelegyet olajfürdőn hevítettük vákuum (10 mbar) alatt 3 h keresztül. Az egyes reakciókban

akonitint észtereztünk laurin-, mirisztin-, sztearin-, palmitolein-, olaj-, α - és γ -linolén-, eikozán-, 11Z-eikozén-, 11Z,14Z-eikozadién, 8Z,11Z,14Z-eikozatrién-, eikozapentaénsavval, és dokozaheptaénsavval. Az előállított lipoalkaloidokat többlépéses kromatográfiai eljárással tisztítottuk. Az ilyen módon nyert lipoalkaloidok *in vitro* gyulladáscsökkentő aktivitását a COX-1 és COX-2 enzimek, valamint a LTB₄-képződésének gátlásán alapuló teszteken értékeltük. A COX-1 esetén indometacint (IC₅₀ 0,9 μ M), a COX-2 esetén NSB-398-at (IC₅₀ 2,6 μ M), illetve a LTB₄-képződésgátlás esetén zileutont (IC₅₀ 5,0 μ M) alkalmaztunk pozitív kontrollként.

A hERG és a Na_v1.2 ioncsatorna-gátlási vizsgálatokat az *A. anthora* és *A. moldavicum* fitokémiai feldolgozásával nyert, félszintézissel előállított illetve a Farmakognóziai Intézetben korábban más Ranunculaceae fajokból izolált vegyületekkel végeztük. A hERG vizsgálatban haloperidolt használtunk pozitív kontrollként. A diterpénalkaloidok hERG és a Na_v1.2 ioncsatornákra kifejtett hatását a *patch clamp* technika automatikus *whole-cell* elrendezésében a QPatch-16 rendszer és a hERG kálium és a Na_v1.2 nátrium ioncsatornákat stabilan expresszáló CHO sejtek használatával vizsgáltuk.

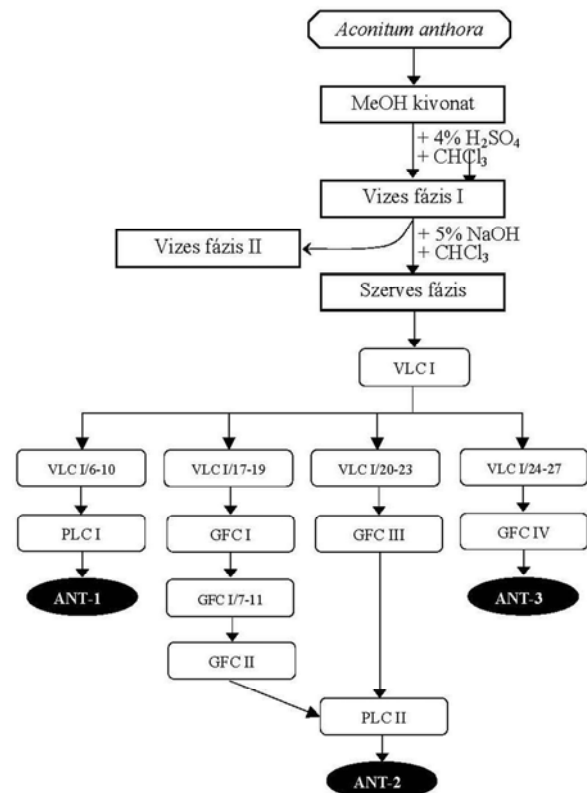
Aconitum minták toxikus alkaloidtartalmának meghatározásához titrálást és HPLC mennyiségi meghatározást végeztünk. A vizsgálatokhoz különböző forrásokból származó feldolgozott Radix aconiti mintákat szereztünk be: 3 minta Zhicaowu – Aconiti kusnezoffi praeparata; 2 minta Zhichuanwu (Shanxi) – Aconiti praeparata (radix); 2 minta Aconiti carmichaelii radix praeparata/Aconiti radix praeparata; 5 minta Aconiti radix praeparata/Aconiti radix lateralis praeparata egy sanghaji piacról; 4 minta egy németországi piacról. A fel nem dolgozott *A. carmichaelii* gyökeret (egy minta) egy Kínában található gyógyszerárbból szereztük be.

A HPLC vizsgálatok során a sisakvirággyökér-drogok kivonataiban a mezakonitin, akonitin és hipakonitin jelcsúcsait az autentikus vegyületekből készített referenciaoldatok HPLC-DAD kromatogramjaival összehasonlítva azonosítottuk. Az alkaloidtartalmat a mezakonitin, akonitin és hipakonitin görbe alatti területei (AUC) összegéből számítottuk ki az akonitinnel felvett kalibrációs egyenes alapján. Az alkaloidtitrálást a mérési eredmények összehasonlításához a Német Homeopátiás Gyógyszerkönyvben az *A. napellus* drogra előírt módszer alapján végeztük el.

4. AZ ÉRTEKEZÉS FŐBB EREDMÉNYEI ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Alkaloidok izolálása az *A. anthorából*

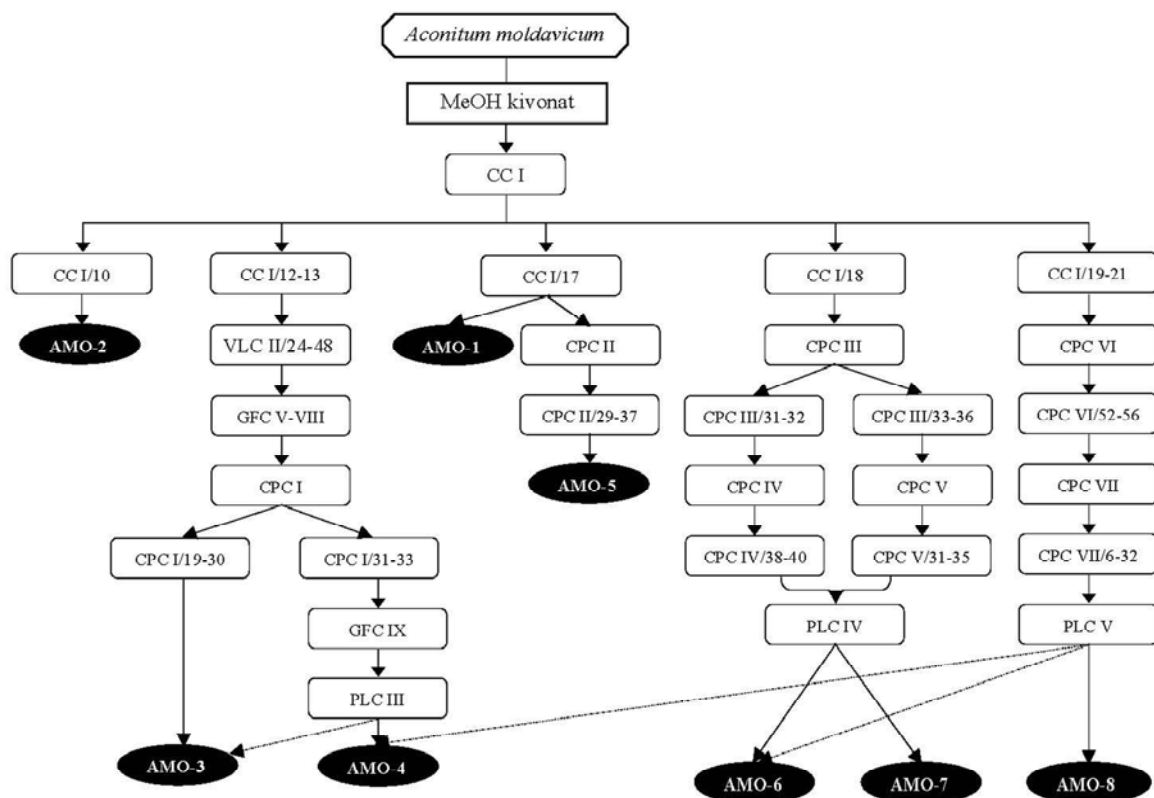
Az *A. anthora* esetén az alkaloidizolálás folyadék-folyadék megoszláson alapuló „klasszikus” módszerét követtük (1. ábra). Ezzel a módszerrel az alkaloidokat a semleges kémhatású kísérővegyületektől tudjuk elválasztani. A ledarált száraz növényi nyersanyagot metanollal vontuk ki. A kivonatot betöményítést követően vízzel hígítottuk és 4% H_2SO_4 -val savanyítottuk. A semleges anyagok kloroformmal történt eltávolítását követően a pH-t 5% NaOH oldattal 12-re állítottuk be, majd kloroformmal ismételt folyadék-folyadék megoszlást végeztünk, így nyertük a nyers alkaloidfrakciót. Ezt a továbbiakban szelektív, többlépéses kromatográfiai módszerekkel (VLC, PLC, GFC) Al_2O_3 és Sephadex® LH-20 állófázisokon különböző oldószerrendszerek alkalmazásával választottuk el, amelynek eredményeként 3 alkaloidot izoláltunk tiszta formában (ANT-1-3).



1. ábra: Alkaloidok izolálása az *A. anthorából*

Alkaloidok izolálása az *A. moldavicumból*

Az *A. moldavicum* esetén az alkaloidok izolálását semleges közegben végeztük (2. ábra), ugyanis a gyökér nem tartalmazott klorofilt, így annak eltávolítása nem igényelt fáziscserés tisztítást. További szempont volt, hogy semleges közegben a vegyületek savas vagy lúgos hidrolízisének kockázata minimálisra csökkenthető. Elsőként Al_2O_3 állófázison végeztünk léghőri nyomáson oszlopkromatográfiai elválasztást a polifenolos vegyületek eltávolítására. Az ezt követő finomelválasztási lépésekkel (ezek között CC, VLC, GFC, PLC és CPC) Al_2O_3 és Sephadex® LH-20 állófázisokon különböző oldószerrendszerek alkalmazásával jutottunk a 8 tiszta formában izolált alkaloidhoz (AMO-1-8).



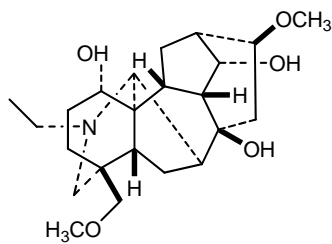
2. ábra: Alkaloidok izolálása az *A. moldavicumból*

Az izolált vegyületek szerkezetének felderítése

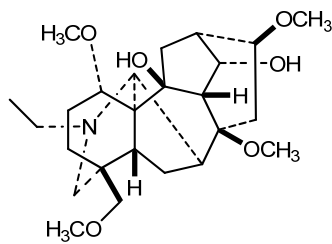
Az *A. anthorából* 1 hetizán típusú C_{20} [hetizonon (**3**, **ANT-3**)] és 2 akonitán típusú C_{19} diterpénalkaloidot [izotalatizidin (**1**, **ANT-1**) és 10-hidroxi-8-*O*-metiltalatizamin (**2**, **ANT-2**)] azonosítottunk. Meghatároztuk az új vegyület, a 10-hidroxi-8-*O*-metiltalatizamin (**2**, **ANT-2**) szerkezetét és relatív konfigurációját. Az izotalatizidinre (**1**, **ANT-1**) az irodalomban közölt 1H és ^{13}C NMR asszignációt pedig korrigáltuk illetve kiegészítettük. A hetizonont (**3**, **ANT-3**) az általunk mért és korábban közölt NMR adatok egyezése alapján azonosítottuk.

Az *A. moldavicumból* 8 akonitán típusú C_{19} diterpénalkaloidot [delkozín (**4**, **AMO-1**), ajacín (**5**, **AMO-2**), likoktonin (**6**, **AMO-3**), szwatinin (**7**, **AMO-4**), gigaktonin (**8**, **AMO-5**), kammakonin (**9**, **AMO-6**), kolumbianin (**10**, **AMO-7**), és 1-*O*-dezmetilswatinin (**11**, **AMO-8**)] azonosítottunk. Meghatároztuk az új vegyület, a 1-*O*-dezmetilswatinin (**11**, **AMO-8**) szerkezetét és relatív konfigurációját. Elvégeztük az ajacín (**5**, **AMO-2**) és a szwatinin (**7**, **AMO-4**) teljes 1H NMR jelhozárrendelését is. Valamennyi további alkaloidot, azaz a delkozint (**4**, **AMO-1**), likoktonint (**6**, **AMO-3**), gigaktonint (**8**, **AMO-5**), kammakonint (**9**, **AMO-6**), és a kolumbianint (**10**, **AMO-7**) az általunk mért és korábban közölt NMR adatok összehasonlításával azonosítottuk.

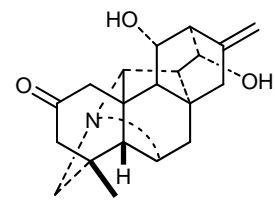
Az *A. anthorából* izolált alkaloidok



1 (ANT-1)

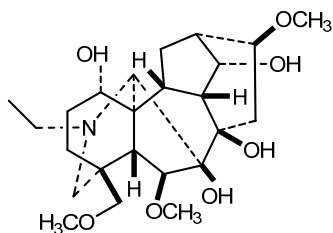


2 (ANT-2)

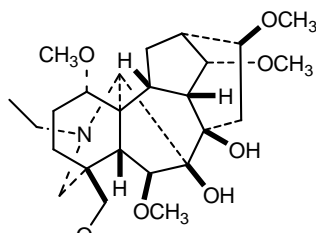


3 (ANT-3)

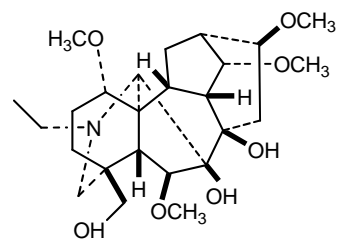
Az *A. moldavicumból* izolált alkaloidok



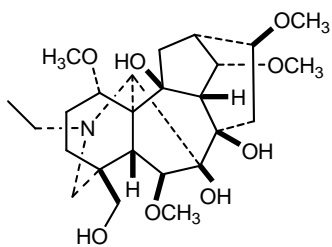
4 (AMO-1)



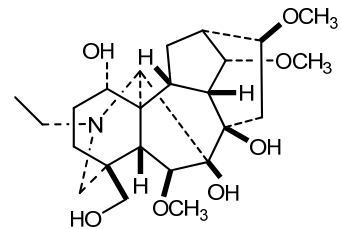
5 (AMO-2)



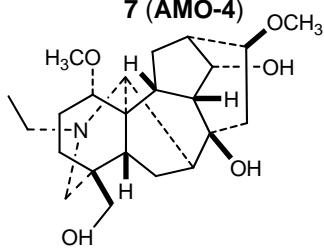
6 (AMO-3)



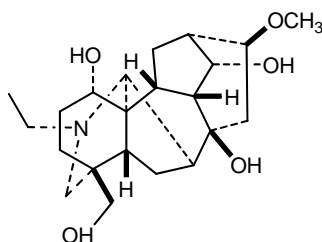
7 (AMO-4)



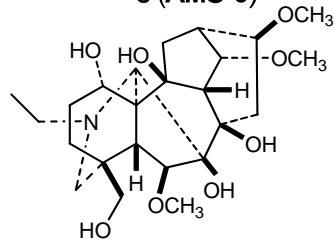
8 (AMO-5)



9 (AMO-6)

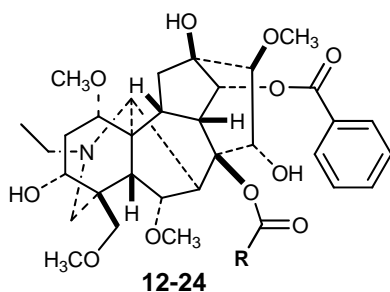


10 (AMO-7)



11 (AMO-8)

Félszintetikusan előállított lipoalkaloidok



12-24

R: észterező zsírsav

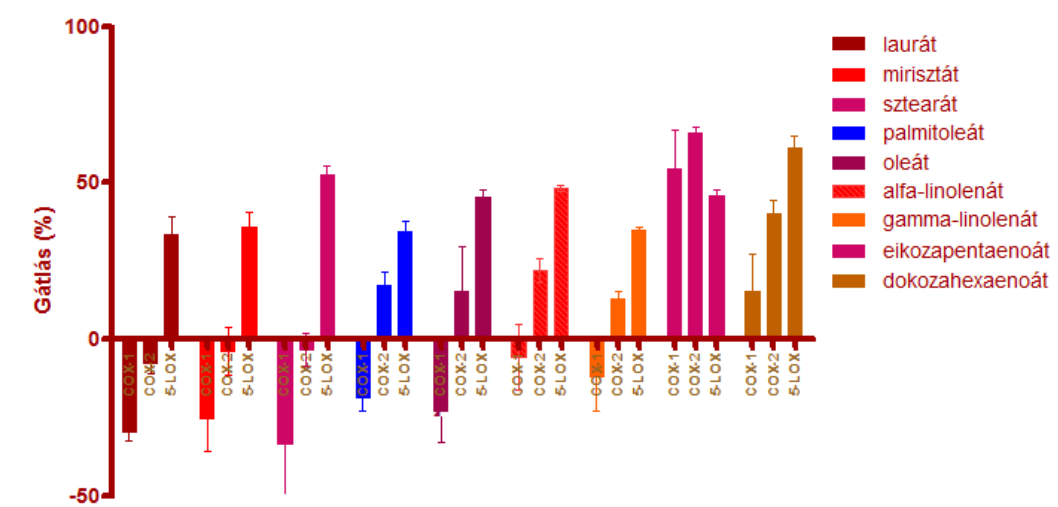
Vegy. szám	Lipoalkaloid (BzA = benzoilakonin)
12	14-BzA-8-O-laurát
13	14-BzA-8-O-mirisztát
14	14-BzA-8-O-sztearát
15	14-BzA-8-O-palmitoleát
16	14-BzA-8-O-oleát
17	14-BzA-8-O- α -linolenát
18	14-BzA-8-O- γ -linolenát
19	14-BzA-8-O-eikozanoát
20	14-BzA-8-O-eikoza-11Z-enoát
21	14-BzA-8-O-eikoza-11Z,14Z-dienoát
22	14-BzA-8-O-eikoza-8Z,11Z,14Z-trienoát
23	14-BzA-8-O-eikozapentaenoát
24	14-BzA-8-O-dokozahexaenoát

Lipoalkaloidok félszintézise és gyulladáscsökkentő aktivitásuk vizsgálata

A feldolgozott sisakvirágyökér-drogokat széles körben alkalmazzák a keleti gyógyászati rendszerekben, különösképp a HKO-ban, mint fájdalomcsillapító és reumaellenes szereket. Noha a fel nem dolgozott gyökérdrogokban található diterpénalkaloidokról ismert, hogy széleskörű farmakológiai hatással (pl. antinociceptív és gyulladáscsökkentő) rendelkeznek, figyelemre méltó, hogy a lipoalkaloidok mind a nyers, mind a feldolgozott sisakvirágdrogokra jellemző vegyületek. Mennyiségük a feldolgozás során jelentős mértékben megnövekszik. Az akonitin típusú alkaloidok (pl. akonitin, hipakonitin, mezakonitin) erősen toxikusak, szemben a lipoalkaloidokkal, amelyeket kisebb mértékű toxicitás jellemez, köszönhetően a molekuláikban a C-8-as helyzetben jelen levő hosszú szénláncú zsírsavésztereknek. Az utóbbi évtizedben e vegyületek és a feldolgozott sisakvirágdrogok analitikájával számos kutatás foglalkozott, de terápiás felhasználásukkal kapcsolatos részletes farmakológiai vizsgálatokat nem végeztek.

A nyers sisakvirágdrogok feldolgozása (általában főzés) csökkenti a toxikus alkaloidok mennyiségét és növeli a lipoalkaloidok koncentrációját. Ebből következően a toxikus alkaloidok kevésbé játszanak szerepet a terápiás hatásban, a lipoalkaloidok viszont valószínűleg igen. A tény, hogy a hosszú szénláncú zsírsavak oly módon képesek csökkenteni a diészter diterpénalkaloidok toxicitását, hogy közben az egyébiránt kívánatos antinociceptív és gyulladáscsökkentő aktivitások megmaradnak, igen nagy jelentőséggel bír. Ugyanakkor az egyes vegyületek farmakológiai vizsgálatára ezidáig még nem került sor, mivel igen közeli szerkezeti hasonlóságuk miatt ezeket az alkaloidokat még nem sikerült tiszta formában előállítani.

Vizsgálatainkban egy 13 tagú, akonitinből félszintézissel előállított lipoalkaloid vegyület-sorozat (12–24) *in vitro* gyulladáscsökkentő hatását tanulmányoztuk, hogy információkat nyerhessünk a lipoalkaloidok farmakológiai hatásáról és az észterező zsírsav természetére vonatkozó bizonyos szerkezet-hatás összefüggéseket elemezzük.



3. ábra: Egyes lipoalkaloidok gyulladáscsökkentő aktivitása

Az előállított vegyületek COX-1, COX-2 gátlási és LTB₄-képződés gátlási aktivitásait *in vitro* módszerrel vizsgáltuk (**3. ábra**). A COX-1 vizsgálatban csak a C₂₀ vagy a C₂₂ típusú zsírsavval szubsztituált vegyületek (**19-24**) mutattak mérsékelt aktivitást, míg valamennyi további lipoalkaloid (**12-18**) inaktívnak bizonyult, függetlenül az észterező zsírsav telítettségének mértékétől, illetve szénláncának hosszától. A COX-2 enzim gátlásán alapuló vizsgálatban az észterező zsírsavlánc telítettségének mértéke és az enzimgátlási aktivitás között észlelhető összefüggés; míg az 5-LOX enzim gátlásán alapuló vizsgálatban bizonyos mértékű összefüggést lehetett észrevenni a zsírsavlánc hossza és az LTB₄-képződés gátlási aktivitásának mértéke között.

Diterpénalkaloidok ioncsatornagátló aktivitásainak vizsgálata

A diterpénalkaloidok markáns szív-érrendszeri hatásának felderítésében alapvető jelentőségű a különböző ioncsatornákon kifejtett aktivitásaik vizsgálata. A kardiovaszkuláris hatások hátterében lévő mechanizmusok jobb megismerését célozva kooperációk keretében egy diterpénalkaloid-sorozat hERG és Na_v1.2 ioncsatorna-gátló aktivitását tanulmányoztuk. A sorozat vegyületei a következők voltak: akonitin, 14-benzoil-akonin-8-*O*-palmitát, piroakonitin; akotoxicin, akonozin, dolakonin, delektinin, neolinin, neolin, akotoxinin, szongoramin, szongorin, akovulparin és szeptentriodin, delkozin, gigaktonin, takaózamin, 14-dezacetil-18-dezmetilpubeszcenin, izotalatizidin (**1, ANT-1**), 10-hidroxi-8-*O*-metiltalatizamin (**2, ANT-2**), hetizinon (**3, ANT-3**), ajacin (**5, AMO-2**), likoktonin (**6, AMO-3**) és szwatinin (**7, AMO-4**).

Bár az akonitumtartalmú készítmények kardiovaszkuláris és neurológiai hatásainak többségére, valamint a mérgezések jelentős részére magyarázatot nyújt a Na⁺-csatornák aktiválása, a K⁺-csatornák szerepét a diterpénalkaloidok farmakológiai hatásaiban nem vizsgálták szisztematikusan. A hERG (human ether-à-go-go-related gene) a szív azon feszültségfüggő K⁺-csatornáját (Kv11.1) kódolja, amely a fő repolarizációs áramot (IKr) biztosítja a kardiális akciós potenciál 3. fázisában. A legtöbb olyan gyógyszer, amely az EKG QT szakaszát növeli, terápiás dózisokban is kifejti IKr-gátlást a hatásspektruma részeként. A QT intervallum megnyúlása ritka esetekben a „torsade de pointes”-nak (TdP) nevezett polimorf kamrai ritmuszavart és hirtelen szívhalált okozhat. A diterpénalkaloidok közül csupán az akonitin hERG-csatorna gátló hatásáról állnak rendelkezésre adatok.

Eredményeink arra utalnak, hogy szerkezetileg egymástól jelentősen különböző diterpénalkaloidok is gátolhatják a hERG-csatornát, és ennek következtében a QT intervallum megnyújtásával hatást gyakorolhatnak a kardiális akciós potenciál repolarizációjára és növelhetik a potenciálisan végzetes kamrai aritmiák kockázatát. A legmagasabb hERG gátlást a norditerpén diészter típusú akonitin és a 14-BzA-8-*O*-palmitát esetén figyeltük meg, amelyek 44,9, illetve 39,6%-os gátlóhatást fejtettek ki. A monoészter vegyületek, mint a szeptentriodin, az ajacin (**5, AMO-2**), akotoxinin és dolakonin csak mérsékelt K⁺-csatorna gátlást mutatott (20,9, 13,0, 6,5, és 8,3%).

Eredményeink azt jelzik, hogy a K^+ -csatorna gátlási aktivitás fontos szerkezeti feltétele a két észtercsoporttal történő szubsztitúció. Ugyanakkor nem jelenthető ki, hogy egy arilészter-csoport jelenléte szükséges a hERG aktivitáshoz, mivel az ajacin (**5**, **AMO-2**) és az akotoxinin az aromás észterszubsztituenseik jelenléte ellenére is csak mérsékelt hatású volt. Az észtercsoportot nem tartalmazó akonitánvázis vegyületek közül a gigaktonin és a neolinin fejtett ki határozott hERG gátlást (38,0 és 35,8%). Az akonitin toxikus plazmakoncentrációja 30 – 1000-szer alacsonyabb, mint a hERG csatornákon mért IC_{50} értéke, és súlyos kardiális mellékhatásait általánosságban a Na^+ -csatornák modulációjával magyarázzák. Ugyanakkor a hERG aktív alkaloidok egy része esetén a toxikus és a hERG-csatornákon kifejtett hatáshoz szükséges koncentráció különbsége elég kicsi ahhoz, hogy a sisakvirágdrogok terápiás alkalmazása során kialakuló hERG hatásuk jelentse igazi veszélyüket. Eredményeink felhívják a figyelmet arra, hogy kismértékű szerkezeti eltérés számottevő hatékonyságkülönbséget okozhat; valamint jelzik, hogy a sisakvirágdrogok biztonságosságának értékelése során a bennük megtalálható diterpénalkaloidok hERG-csatornákra kifejtett hatásait is figyelembe kell venni.

A különböző terápiás javallatokra jelenleg alkalmazott, Na^+ -csatornákon ható gyógyszervegyületek alacsony $Na_v1.x$ csatornaaltípus szelektivitása klinikai szempontból hátrányos tulajdonság, ráadásul a terápiásan alkalmazott vegyületek esetén is csak minimális mértékű hERG K^+ -csatorna gátlási aktivitás elfogadható.

A vizsgált alkaloidok szerkezeti sajátosságai és $Na_v1.2$ gátlási aktivitása közötti kapcsolat szempontjából lényegesnek tűnik, hogy egyidejűleg kell jelen lennie a molekulában egy metoxicsoportnak a C-1-es helyzetben, egy oxigéntartalmú szubsztituensnek a C-8-as helyzetben, valamint egy (szubsztituált) aroilcsoportnak a C-14-es vagy a C-18-as pozícióban, és a molekulában legalább 4 oxigéntartalmú szubsztituens jelenléte is szükséges. E feltételek valamennyi jelentős [piroakonitin, ajacin (**5**, **AMO-2**), delektinin, szeptentriodin] és közepes mértékű [likoktonin (**6**, **AMO-3**), akotoxicin, akovulparin, akonitin] gátlási aktivitást mutató vegyület esetén teljesülnek. Ha a C-1-es helyzetben metoxicsoport helyett hidroxilcsoport van, a gátlási aktivitás csökken, ahogyan az a delektinin (42% gátlás) és a takaózamin (3% gátlás) esetén is látható. Az egyetlen, mindamellet nagyon érdekes aktivitás a szwatinin (10%-os gátlás) esetén volt megfigyelhető, amely vegyület ugyan rendelkezik egy metoxicsoporttal a C-1-es pozícióban, de C-10-es helyzetben egy hidroxicsoportot is tartalmaz. Enélkül a molekula oxigéntartalmú szubsztituensei megegyeznek az akovulparinéval (30%-os gátlás; az egyetlen további szerkezeti különbség a *N* atomon található). A viszonylag nagy aktivitásbeli különbség rámutat a C-10-es helyzetű hidroxilcsoport jelentőségére, és feltételezhető, hogy ez az oxigénfunkció térbeli gátlást okozhat a csatornareceptorral való kapcsolódásnál. Ugyanakkor az sem zárható ki, hogy a *N* atom szubsztitúciójának különbsége is jelentőséggel bír. Az aroilcsoport helyzetének a gátlási aktivitásra gyakorolt hatását az akotoxinin

példája szemlélteti, amely inaktívnak bizonyult annak ellenére, hogy a molekulában található egy aroilcsoport, de annak helyzete C-8, nem pedig a C-14 vagy C-18 szénatomokhoz kapcsolódik. Megállapításainkkal összhangban vannak annak a 12 diterpénalkaloiddal végzett QSAR vizsgálatnak az eredményei, amely szerint a C-4 vagy C-14 helyzetű aroil/aroiloxi csoport az analgetikus hatás legfőbb determinánsa. A C-14-es helyzetben aroil- vagy aroiloxi-csoporttal rendelkező vegyületek patkányokon ecetsavval indukált fájdalomtesztben megközelítőleg 30-szor nagyobb mértékű analgetikus potenciált mutattak, mint a C-4-es helyzetben aroiloxi-csoporttal rendelkező alkaloidok. Korábban azt is igazolták, hogy a Na⁺-csatornák 2-es neurotoxin receptorhelyéhez alacsony affinitást mutató alkaloidoknál hiányzik az antinociceptív hatás. A vizsgálatba vont három, C₂₀-as típusú diterpénalkaloid tekintetében csak egy (hetizinon (**3, ANT-3**)) mutatott közepes mértékű aktivitást, ennek következtében e vegyületek szerkezet-hatás összefüggéseire vonatkozó következtetések levonására nem nyílt lehetőség. Figyelemre méltó azonban, hogy a szongorin gyakorlatilag inaktív volt. Kiemelendő továbbá, hogy a legaktívabb vegyületek között csak egy, a delektinin, nem észterezett (noha így is eleget tesz valamennyi fentebb vázolt szerkezeti feltételnek), valamint, hogy mindkét diészter típusú vegyület (14-BzA-8-O-palmitát és akonitin) csupán közepes mértékű aktivitást mutatott a vizsgált specifikus csatornaaltípuson.

Figyelembe véve a fenti eredményeket, megfigyelhető, hogy egyes vegyületek (14-BzA-8-O-palmitát, akonitin és gigaktonin) jelentős aktivitást mutattak mindkét farmakológiai tesztben, így az ígéretes Na_v1.2 gátlási aktivitásuk ellenére is potenciálisan veszélyesnek tekintendők a hERG aktivitásuk révén okozott nemkívánatos kardiovaszkuláris hatásai miatt. A Na_v1.2 csatornán aktív alkaloidok közül azok tartoznak a perspektívikus szelektív Na_v1.2 csatornagátló modellvegyületek közé, amelyek kismértékű hERG aktivitást fejtettek ki [pl. az ajacin (**5, AMO-2**) és a delektinin].

A HKO-ban használatos feldolgozott sisakvirágdrogok diterpénalkaloid-tartalmának vizsgálata

A távol-keleti hagyományos gyógyászati rendszerekben a sisakvirágdrogokat tradicionális feldolgozási módszerekkel készítik elő a terápiás alkalmazás előtt. A nyers *Aconitum* gyökér gondos feldolgozása csökkenti a normál diterpénalkaloidok mennyiségét és növeli a lipoalkaloidok koncentrációját, ennek eredményeként csökken a drogok toxicitása. A gyógyszerkönyvek minőségellenőrzési követelményei azonban nem minden esetben elégségesek a biztonságosság garantálására. A *Radix aconiti* és a *Radix aconiti kusnezoffii* esetén a diterpénalkaloid-tartalmat nem korlátozza a Kínai Gyógyszerkönyv, illetve az abban megfogalmazott figyelmeztetés („óvatosság szükséges a *per os* alkalmazott fel nem dolgozott gyökérrel”) nem áll arányban a toxicitás veszélyével. A *Radix aconiti praeparata* és a *Radix aconiti kusnezoffii praeparata* cikkelyeiben egy kolorimetriás vizsgálatot ír elő a Kínai Gyógyszerkönyv a diészter diterpénalkaloidok (ezek koncentrációja nem lehet >0,15%), és egy titrimetriás vizsgálatot az összalkaloidtartalom meghatározására (az előírt mennyiség nem haladhatja meg az akonitinben

számított 0,20%-ot). E két drog jellemző adagja 1,5-3 g naponta, amely akár 4,5 mg diészter diterpénalkaloidot is tartalmazhat. Mi több, a 3-15 g dózisú *Radix aconiti lateralis praeparata* esetén csak rétegekromatográfiás akonitinkimutatást ír elő a Kínai Gyógyszerkönyv. Több homeopátiás gyógyszerkönyvben (így a referenciának tekintett a *Német Homeopátiás Gyógyszerkönyvben* is) megtalálható az *A. napellus* cikkelye, és e drog minősítésére jellemzően az összalkaloidtartalom titrimetriás meghatározását végzik. Mivel a titrimetriás meghatározás nem szolgáltat közvetlen információt a toxikus diészter diterpénalkaloid-tartalomra vonatkozóan (és figyelemmel arra is, hogy az akonitin letális dózisa 3-6 mg), jóval megbízhatóbb módszerekre van szükség a feldolgozott növényi nyersanyag minőségének ellenőrzéséhez. Munkánk célja ezért egy gyors és egyszerű, a sisakvirág-gyökérdrogok minőségellenőrzéséhez a korábban közölt módszerekkel összevethető és megbízhatóbb HPLC módszer kifejlesztése volt; továbbá célul tűztük ki az alkaloidok titrálásos és HPLC módszerekkel történő meghatározásának összehasonlítását is.

Az analitikai vizsgálathoz az általunk fejlesztett HPLC módszert és minta-előkészítést alkalmaztuk a gyógyszerkönyvi titrimetriás mérések mellett. E HPLC módszer az *A. carmichaelii* és *A. kusnezoffii* legfontosabb toxikus alkaloidjainak mennyiségi meghatározására kínál gyors és megbízható lehetőséget. A kereskedelmi minták többségében a toxikus alkaloidok nem, vagy csak nyomnyi mennyiségben voltak kimutathatók az alkalmazott HPLC módszerrel. Ugyanakkor négy mintában a toxikus alkaloidok szintje a 0,04%-os határérték fölött volt, igazolva a mérési módszer relevanciáját a termékbiztonság biztosításában. A HPLC-vel kimutatási határ alatti mezakonitin-, akonitin- és hipakonitin-tartalmúnak talált minták a titrálásos meghatározás szerint 0,2%-ig terjedő alkaloidtartalmat mutattak. A HPLC-módszer és a széles körben alkalmazott titrimetria összehasonlítása rámutat arra, hogy az alkaloidtitrálás a minták toxikus diészter diterpénalkaloid-tartalmának téves értékeléséhez vezethet és megerősíti, hogy a sisakvirágdrogoknak az európai orvoslásba történő integrálása szükségessé teszi releváns és validált módszerek alkalmazását.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Új tudományos eredmények– összegzés:

1. Az *A. anthora* és az *A. moldavicum* fitokémiai vizsgálatának eredményeként 2 új [10-hidroxi-8-*O*-metiltalazitamin (**2**, **ANT-2**) és 1-*O*-dezmetilswatinin (**11**, **AMO-8**)], valamint 9 már ismert [hetizonon (**3**, **ANT-3**), izotalatizidin (**1**, **ANT-1**), delkozin (**4**, **AMO-1**), ajacin (**5**, **AMO-2**), likoktonin (**6**, **AMO-3**), szwatinin (**7**, **AMO-4**), gigaktonin (**8**, **AMO-5**), kammakonin (**9**, **AMO-6**) és kolumbianin (**10**, **AMO-7**)] diterpénalkaloidot izoláltunk, amelyeket –egy kivétellel – e fajokból elsőként mutattuk ki; az *A. moldavicum*ot elsőként vizsgáltuk kémiaiilag;
2. Kiterjedt 1D és 2D NMR vizsgálatokkal valamennyi izolált vegyület esetén teljes ¹H és ¹³C jelhozzárendelést végeztünk; a már ismert vegyületek esetén a korábban közölt adatokat javítottuk vagy kiegészítettük;
3. Akonitinből kiindulva 13 lipoalkaloidot állítottunk elő félszintetikus úton és ezeket kromatográfiásan tisztítottuk egy általunk fejlesztett metodika szerint;
4. A félszintetikusan előállított lipoalkaloidok gyulladáscsökkentő hatását mértük a COX-1 és COX-2 enzimek, illetve a LTB₄-képződés gátlásán alapuló tesztekkel; elsőként vizsgáltuk ezen vegyületek szerkezet-hatás összefüggéseit;
5. Elvégeztük egy diterpénalkaloid sorozat hERG és Na_v1.2 ioncsatornán kifejtett hatásának vizsgálatát, amely alapján bizonyos, a vizsgált diterpénalkaloidok által e csatornákon kifejtett hatásokra vonatkozó szerkezet-hatás összefüggéseket állapítottunk meg;
6. Farmakológiai vizsgálataink eredményeként a szelektív Na_v1.2 csatornaaltípus-gátló, de minimális hERG aktivitást mutató ajacint (**AMO-2**) és a delektinint mint további farmakológiai kutatások lehetséges vezérmolekuláit azonosítottuk.
7. 16 autentikus és feldolgozott *Radix aconiti* minta diterpénalkaloid-tartalmát egy általunk fejlesztett HPLC módszer segítségével határoztuk meg, amely minták közül 4, potenciálisan toxikus kereskedelmi tételt azonosítottunk; a HPLC-vel mért értékek és a széles körben alkalmazott titrimetriás meghatározással kapott értékek összehasonlítása rámutatott arra, hogy pontosság és terápiás szempontú relevancia szempontjából az *Aconitum* drogok vizsgálatára HPLC eljárás a legalkalmasabb.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném hálámat kifejezni témavezetőmnek, **Dr. Hohmann Judit** professzornak, amiért bevezetett a diterpénalkaloidok és a fitokémiai kutatás világába. Munkám szakmai irányításáért, az általa mutatott folyamatos támogatásért és segítségért megkülönböztetett köszönet illeti.

Mély hálámat és legőszintébb köszönetemet szeretném kifejezni társtémavezetőmnek, **Dr. Csupor Dezső** egyetemi adjunktusnak sosem szűnő biztatásáért, melegszívű és megszámlálhatatlan jó tanácsaiért, valamint azért a felém tanúsított mélysegés emberségéért, amellyel nem csupán inspirált, de kitartásomat is sokszor megerősítette a szélsőséges nehézségek idején.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Farmakognóziai Intézet korábbi és jelenlegi igazgatóinak, **Dr. Máthé Imre** és **Dr. Hohmann Judit** professzoroknak, hogy az Intézet berendezéseinek és eszközeinek rendelkezésemre bocsátásával lehetőséget biztosított, hogy kísérletes kutatómunkám elvégezhessem.

Külön köszönet illeti **Dr. Molnár V. Attila** egyetemi docent (Debreceni Egyetem, Növénytan Tanszék) a növényi nyersanyag azonosításáért és begyűjtéséért.

Megkülönböztetett köszönet illeti szerzőtársaimat, **Dr. Forgó Pétert** az NMR mérések elvégzéséért, **Ute Widowitzot**, **Barbara Heydelt** és **Dr. Rudolf Bauer** professzort (Karl-Franzenz University, Graz, Ausztria) a gyulladáscsökkentő tesztek és a titrimetriás mérések elvégzéséért, **Dr. Fodor Lászlót** (Richter Gedeon Nyrt.) a Na_v1.2 és hERG tesztek, valamint **Berkecz Róbertet** (Szegedi Tudományegyetem, Orvosi Vegytani Intézet) a tömegspektrometriás mérések elvégzéséért.

Hálásan köszönöm a Farmakognóziai Intézet munkatársainak, különösen is **Hadárné Berta Erzsébet** laboratóriumi asszisztensnek, **Dr. Vasas Andrea** és **Dr. Rédei Dóra** egyetemi adjunktusoknak, és **Dr. Veres Katalin** tudományos munkatársnak a kísérletes munkám elvégzéséhez nyújtott önzetlen segítségüket.

Végül, de nem utolsósorban hálás köszönetemet szeretném kifejezni szeretett Édesanyám, családom és barátaim felé minden tőlük kapott segítségért, támogatásért, bátorításért és szeretetért, amelyek nélkül nem tudtam volna ezt a munkát elvégezni.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Forgo P, **Borcsa B**, Csupor D, Fodor L, Berkecz R, Molnár VA, Hohmann J
Diterpene alkaloids from *Aconitum anthora* and assessment of the hERG-inhibiting ability of *Aconitum* alkaloids
Planta Med **2011**; 77:368-373 If: **2,153**
2. **Borcsa B**, Widowitz U, Csupor D, Forgo P, Bauer R, Hohmann J
Semisynthesis and pharmacological investigation of lipo-alkaloids prepared from aconitine
Fitoterapia **2011**; 82:365-368 If: **1,848**
3. **Borcsa B**, Csupor D, Forgo P, Widowitz U, Bauer R, Hohmann J
Aconitum lipo-alkaloids – semisynthetic products of the traditional medicine
Nat Prod Commun **2011**; 6:527-536 If: **1,242**
4. Csupor D, **Borcsa B**, Heydel B, Hohmann J, Zupkó I, Ma Y, Widowitz U, Bauer R
Comparison of a specific HPLC determination of toxic aconite alkaloids in processed *Radix aconiti* with a titration method of total alkaloids
Pharm Biol **2011**; 49:1097-1101 If: **0,878**

Az értekezés témájával rokon tárgyú, egyéb közlemények

5. **Borcsa B**, Fodor L, Csupor D, Forgo P, Molnár VA, Hohmann J
Diterpene alkaloids from *Aconitum moldavicum* and assessment of Na_v1.2 sodium channel activity of *Aconitum* alkaloids (*in press*, *Planta Med* **2014**; DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1360278>)

Előadások az értekezés témájában

1. **Borcsa B**, Fodor L, Csupor D, Forgo P, Hohmann J
Assessment of the Na_v1.2 sodium channel activity of *Aconitum* diterpene and norditerpene alkaloids
61st International Congress & Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Münster, Németország, **2013. szeptember 1-5.**
2. **Borcsa B**, Fodor L, Csupor D, Forgo P, Attila Molnár V A, Hohmann J
Diterpenoid alkaloids from *Aconitum anthora* and *A. moldavicum* and activities of selected diterpenoid alkaloids on hERG and Na_v1.2 ion channels
Trends in natural product research – a PSE young scientists' meeting, Kolymvari, Görögország, **2011. június 12-15.**
3. **Borcsa B**, Csupor D, Forgó P, Widowitz U, Bauer R, Hohmann J
Lipoalkaloidok akonitinból történő félszintetikus előállítására és analitikai vizsgálata
XXXIII. Kémiai Előadói Napok, Szeged, 2010. október 27.
4. **Borcsa B**, Widowitz U, Csupor D, Péter F, Forgo P, Bauer R, Hohmann J
Semisynthesis and pharmacological investigation of lipo-alkaloids prepared from aconitine by transesterification with eicosanoic acid analogues
58th International Congress & Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Németország, Berlin, **2010. augusztus 29. – szeptember 02.**
5. Csupor D, **Borcsa B**, Heydel B, Hohmann J, Zupkó I, Ma Y, Widowitz U, Bauer R
Specific HPLC determination of toxic alkaloids in aconite roots compared with amount of total alkaloids determined by titration
58th International Congress & Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Berlin, Németország, **2010. augusztus 29. – szeptember 02.**
6. **Borcsa B**, Csupor D, Forgó P, Widowitz U, Bauer R, Hohmann J
Aconitum fajok lipoalkaloidjainak félszintézise és analitikai vizsgálata
MTA Alkaloidkémiai Munkabizottsági ülés, Balatonfüred, **2010. május 17-18.**

7. **Borcsa B**, Widowitz U, Csupor D, Forgó P, Bauer R, Hohmann J
Lipoalkaloidok félszintetikus előállítása, kromatográfiás tisztítása és gyulladáscsökkentő aktivitásaik *in vitro* vizsgálata
Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIV., Budapest, **2009. november 13-15.**
8. **Borcsa B**, Widowitz U, Csupor D, Péter F, Forgó P, Bauer R, Hohmann J
Semisynthesis and pharmacological investigation of lipo-alkaloids prepared from aconitine
57th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, Geneva, Svájc, **2009. augusztus 16-20.**
9. Hohmann J, Csupor D, **Borcsa B**
Klasszikus és új elválasztástechnikai módszerek alkalmazása *Aconitum* alkaloidok izolálásában
XXXIX. Kromatográfiás Továbbképző Tanfolyam, Szeged, **2008. január 28-30.**
10. **Borcsa B**, Csupor D, Péter F, Molnár V A, Hohmann J
Kárpát-medencében honos *Aconitum* fajok diterpénalkaloidjainak vizsgálata – Norditerpénalkaloidok izolálása az *A. moldavicumból*
XI. Magyar Gyógynövény Konferencia - Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, Gyógynövény Szakosztály, Szeged, **2007. október 18-19.**
11. **Borcsa B**, Forgó P, Veres K, Molnár V A, Hohmann J
Diterpene alkaloids from *Aconitum anthora* and *A. moldavicum*
55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, Graz, Ausztria, **2007. szeptember 02-06.**
12. Csupor D, **Borcsa B**, Forgó P, Hohmann J, Máthé I
Aconitum diterpénalkaloidok vizsgálatának újabb eredményei
MTA Alkaloidkémiai Munkabizottsági ülés, Balatonfüred, **2007. május 14-15.**
13. Hohmann J, Csupor D, **Borcsa B**, Forgó P, Molnár A V, Csedő K, Máthé I
Isolation of biologically active diterpene alkaloids from Aconitum species native to the Carpatian Basin
15 years of Common Research on Medicinal Plants of the Romanian and Hungarian Academies – Anniversary Scientific Session, Marosvásárhely, **2007. április 23-24.**
14. Csupor D, Forgó P, Csedő K, **Borcsa B**, Máthé I, Hohmann J
Diterpén- és norditerpénalkaloidok izolálása a Kárpát-medencében honos *Aconitum* fajokból
MTA Alkaloidkémiai Munkabizottsági ülés, Balatonfüred, **2005. május 09.**
15. **Borcsa B**, Csupor D, Forgó P, Csedő K, Máthé I, Hohmann J
Kárpát-medencében honos *Aconitum* fajok vizsgálata – Diterpénalkaloidok az *Aconitum anthorából* és az *A. toxicumból*
XI. Magyar Gyógynövény Konferencia - Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, Gyógynövény Szakosztály, Dobogókő, **2005. október 13-15.**
16. **Borcsa B**
Az *Aconitum anthora* L. diterpénalkaloidjainak vizsgálata
XXVII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Orvostudományi Szekció, Gyógyszerésztudományi Tagozat, Szeged, **2005. március 21-23.**
17. **Borcsa B**
Az *Aconitum anthora* L. diterpénalkaloidjainak vizsgálata
Tudományos Diákköri Konferencia, SZTE GYTK, **2005. február 03-05.**



Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Farmakognóziái Intézet

Igazgató: Prof. Dr. Hohmann Judit
6720 Szeged, Eötvös u. 6. Tel.: 36/62-545-558, Fax: 36/62-545-704



Társszerzői nyilatkozat

Kijelentem, hogy az alábbi közleményben publikált *Aconitum anthora* növénykémiái vizsgálatára vonatkozó publikáció esetében az izolálási munka teljes egészében Borcsa Botond Lajos munkája alapján készült és hozzájárulok, hogy az említett részeket Ph.D. értekezéséhez felhasználja.

Peter Forgo, **Botond Borcsa**, Dezső Csupor, László Fodor, Róbert Berkecz, Attila V. Molnár, Judit Hohmann
Diterpene alkaloids from *Aconitum anthora* and assessment of the hERG-inhibiting ability of *Aconitum* alkaloids
Planta Medica, **2011**, DOI: DOI: 10.1055/s-0030-1250362

Szeged, 2011. február. 28.

Dr. Forgó Péter



Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Farmakognóziái Intézet

Igazgató: Prof. Dr. Hohmann Judit
6720 Szeged, Eötvös u. 6. Tel.: 36/62-545-558, Fax: 36/62-545-704



Társszerzői nyilatkozat

Kijelentem, hogy az alábbi közleményben publikált összehasonlító analitikai növénykémiai vizsgálathoz Borcsa Botond Lajos által végzett munka alapján hozzájárulok, hogy az említett közlemény eredményeit Ph.D. értekezéséhez felhasználja.

Csupor D, **Borcsa B**, Heydel B, Hohmann J, Zupkó I, Ma Y, Widowitz U, Bauer R
Comparison of a specific HPLC determination of toxic aconite alkaloids in processed
Radix aconiti with a titration method of total alkaloids
Pharm Biol **2011**; *49*:1097-1101

Szeged, 2013. augusztus. 28.



Dr. Csupor Dezső