

**Magyarországi *Euphorbia* fajok diterpénjeinek izolálása
és szerkezetmeghatározása**

PhD értekezés tézisei

Vasas Andrea

Témavezető: Prof. Dr. Hohmann Judit
SZTE Farmakognóziai Intézet

Szegedi Tudományegyetem
Farmakognóziai Intézet

Szeged
2006

Bevezetés

Az Euphorbiaceae (kutyatejfélék) család mintegy 8 000 fajt jelenleg 300 genusba sorolják, melyek közül legnépesebb az *Euphorbia* nemzetség közel 2 000 fajjal. A kutyatejfélék elsősorban a mérsékelt égövön és a trópusi vidékeken elterjedtek, lehetnek fák, cserjék, egyéves vagy évelő lágyszárúak illetve kaktuszszerű szukkulensek. A kutyatej fajokra erősen irritáló hatású tejnedv előfordulása jellemző, számos fajt használnak a népgyógyászatban tumorok kezelésére, szemölcsök eltávolítására.

Az Euphorbiaceae család fajai érdekes biológiai aktivitással rendelkező anyagokat tartalmaznak. E vegyületek közül kiemelkedő jelentőséggel bírnak a diterpének, amelyek biokémiai és farmakológiai kutatások fontos eszközei, számos képviselőjüket alkalmazzák gyógyszerek hatásmechanizmusának tanulmányozására. Korábban a magasabbrendű növényekből megismert ilyen vegyületek között a forboidok (ingenán, tiglián és dafnán diterpénészterek) képviselték az egyik legjelentősebb csoportot. Később terápiás szempontból fontos antileukémiás hatású ingenánvázas diterpéneket is izoláltak az *Euphorbia esulaból*, a *Croton tigliumból* és a *Cunuria spruceanaból*, valamint egy ultrapotens kapszaicin analóg hatású vegyületet, a reziniferatoxint az *E. resiniferaból*. 2005-ig 187 *Euphorbia* fajból nyertek diterpéneket vagy mutatták ki jelenlétüket. A vegyületek nagy szerkezeti változatosságot mutatnak és számos közülük jelentős biológiai aktivitással rendelkezik.

A forboidokon kívül az Euphorbiaceae fajokban egyéb diterpéntípusok is előfordulnak, amelyek lehetnek monociklusosak vagy változatosan ciklizálódott bi-, tri- és tetraciklusok (pl. jatrofán, latirán, tiglián, ingenán, jatrofólán, krotofólán, ramnofólán). Ezen kívül további tri- és tetraciklusos minor diterpénosztályokat is leírtak (pl. pepluán, szegetán, mirzinán, ciklomirzinán, jatrofatrion- és euforaktin típus). A makrociklusos diterpének egyik legfontosabb csoportját alkotják a biciklo[10.3.0]pentadekán gyűrűrendszert tartalmazó jatrofán diterpének. A '70-es évek óta több mint 180 természetes eredetű képviselőjük ismert, közülük számos vegyület rendelkezik figyelemreméltó farmakológiai hatással, pl. *in vitro* citotoxikus, antibakteriális, antiproliferatív és MDR-csökkentő aktivitással.

Célkitűzések

A Szegedi Tudományegyetem Farmakognóziai Intézetében dr. Hohmann Judit vezetésével 1995-ben indult program keretében kezdődött a magyarországi *Euphorbia* fajok növénykémiái vizsgálata. Ennek keretében került sor a korábban még nem vagy nem kimerítően vizsgált *Euphorbia esula*, *E. peplus*, *E. lathyris* és *E. villosa* tanulmányozására.

Munkánk célja új, bioaktív diterpének izolálása és szerkezetmeghatározása volt, melynek érdekében a következő feladatokat végeztük el:

- Az *Euphorbia esula*, *E. peplus*, *E. lathyris* és *E. villosa* diterpéntartalmának szűrővizsgálata.
- A növényi nyersanyag kivonása.
- A diterpénészterek izolálása és tisztítása különböző kromatográfiás módszerek (OCC, VLC, PLC és HPLC) kombinálásával.
- Az izolált vegyületek szerkezetmeghatározása spektroszkópiás módszerek (UV, IR, HR-MS, NMR) segítségével.
- Az izolált diterpének kemotaxonómiai jelentőségének értékelése és biológiai hatásvizsgálata.

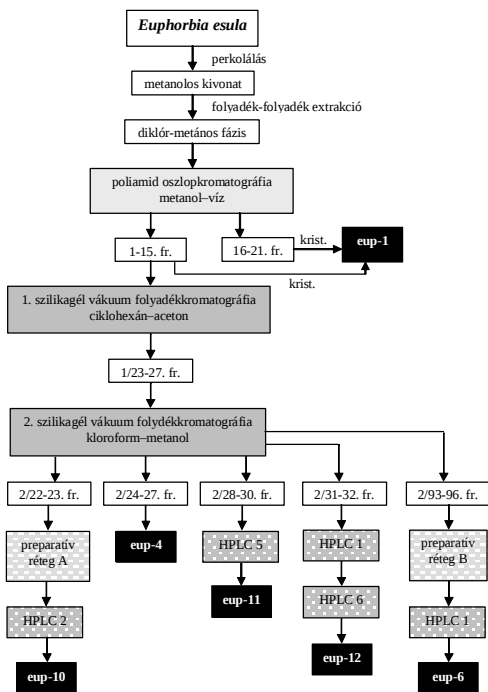
Alkalmazott módszerek

A vegyületek tisztítását többlépcsős izolálási eljárás segítségével végeztük különféle extrakciós és kromatográfiás módszerek felhasználásával; oszlopkromatográfiát (OCC), vákuum folyadékkromatográfiát (VLC), preparatív rétegekromatográfiát (PLC) és nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiát (NP-HPLC, RP-HPLC) alkalmaztunk. Az izolált vegyületek szerkezetmeghatározása UV- és IR-spektroszkópia, nagyfelbontású tömegspektroszkópia (HR-MS), valamint mágneses magrezonancia-spektroszkópia (NMR) segítségével történt. Néhány vegyületnél röntgen-kristallográfiás vizsgálatra is sor került.

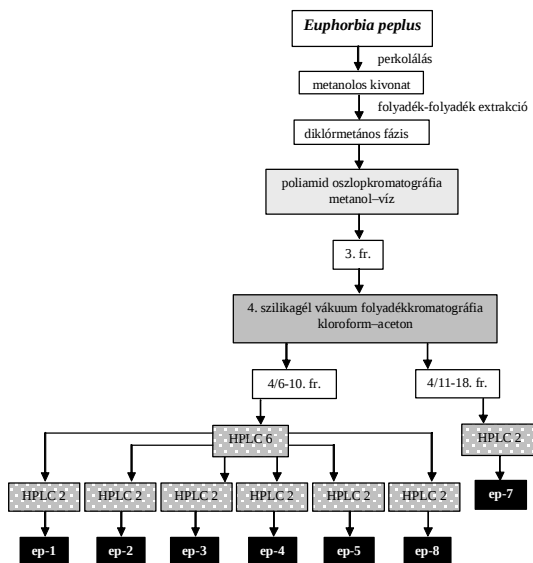
Eredmények

Diterpének kivonása és izolálása

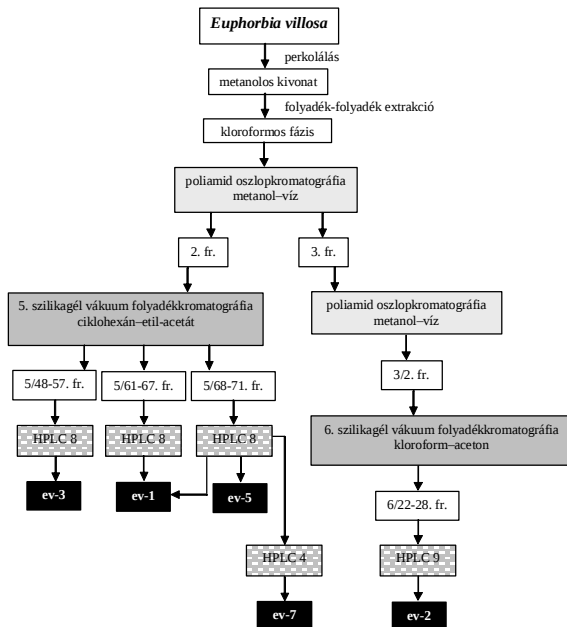
Az *E. esula* és *E. lathyris* esetén friss, az *E. peplus* esetén fagyasztott, az *E. villosa* esetén pedig szárított növényt dolgoztunk fel. A növényi nyersanyagot aprítást követően metanollal szobahőmérsékleten vontuk ki, majd betöményítés után folyadék-folyadék közti extrakciót végeztünk diklór-metánnal (*E. esula*, *E. lathyris*, *E. peplus*), illetve kloroformmal (*E. villosa*). Ezt követően a szerves fázist poliamid oszlopon kromatografáltuk metanol-víz (1:4, 2:3, 3:2 és 4:1) különböző arányú elegyeivel. A diterpének a 20–60 %-os metanollal nyert frakciókban halmozódtak fel. A diterpén komponensek kinyerésének folyamatát az 1-3. ábra szemlélteti.



1. ábra Diterpének izolálása az *E. esula*ból



2. ábra Diterpének izolálása az *E. peplus*ból



3. ábra Diterpének izolálása az *E. villosa*ból

A következő lépésekben egyre szelektívebb módszereket (VLC, PLC és HPLC) alkalmaztunk. A poliamid oszlopkromatográfiát követően a diterpéntartalmú frakciók tisztítása minden esetben adszorpciós kromatográfiával történt szilikagélén vákuum-folyadékkromatográfiával. Ez a módszer a fő komponensek durva elválasztását tette lehetővé. Végző tisztításként nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (NP- és RP-HPLC) elválasztást alkalmaztunk, mivel ez a legszelektívebb és legkíméletesebb módszer a sok esetben hő- és fényérzékeny diterpén poliészterek számára.

Az elválasztástechnikai módszerek kombinálásával 19 vegyületet izoláltunk: hatot az *E. esulaból* [eup-1 (8), eup-4 (9), eup-6 (10) eup-10 (12) eup-11 (11) és eup-12 (13)], egyet az *E. lathyrisből* [eul-1 (14)], hetet az *E. peplusból* [(ep-1 (2), ep-2 (7), ep-3 (1), ep-4 (3), ep-5 (4), ep-7 (5) és ep-8 (6)], és ötöt az *E. villosából* [ev-1 (16), ev-2 (19), ev-3 (15), ev-5 (18) és ev-7 (17)]. Néhány esetben egymáshoz igen hasonló szerkezetű vegyületek elválasztását sikerült megvalósítanunk, pl. az ep-1 (2), ep-5 (4) és ep-7 (5) mindössze észtercsoportokban, míg az ev-1 (16) és ev-7 (17) csak egy szubsztituensben különbözik egymástól.

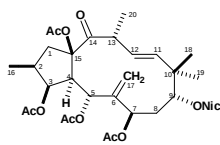
Az izolált vegyületek szerkezetmeghatározása

Az izolált vegyületek szilárd, amorf vagy kristályos anyagok, optikailag aktívak. Szerkezetmeghatározásuk spektroszkópiai vizsgálatok segítségével történt.

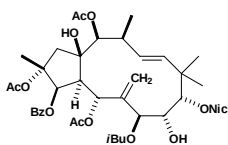
Az IR és UV spektroszkópia viszonylag kevés információt nyújtott a molekulaszerkezetre vonatkozóan. Valamennyi izolált anyag esetén HRMS mérésekkel határoztuk meg a vegyületek molekulatömegét és molekula összetételét. A szerkezetmeghatározáshoz az 1D és 2D NMR spektroszkópia szolgáltatja a legértékesebb adatokat. Az ^1H , ^{13}C NMR, JMOD, DEPT, ^1H - ^1H COSY, HMQC, HSQC és HMBC spektrumok alapján minden vegyületnél levezettük a síkbeli szerkezetet, majd a NOESY korrelációk értékelésével meghatároztuk a molekulák relatív konfigurációját. Az aszimmetrikus szénatomok száma az izolált vegyületek esetén 7-10 között változik, valamennyi királis szénatom konfigurációját – az eup-6 (10) kivételével – meghatároztuk. Az NMR vizsgálatok eredményeként elkészítettük

a vegyületek jellemzésére szolgáló teljes ^1H és ^{13}C NMR jelhozzárendelést. Az ep-5 (4), ep-8 (6) és eup-1 (8) jelzésű anyagok abszolút konfigurációját röntgendiffrakciós vizsgálatok segítségével határoztuk meg.

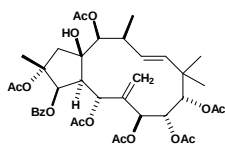
Az izolált vegyületek közül 11 jatrofán-, 3 latirán-, 3 euforaktin- 2 pedig pepluán származék. Az ep-1 (2), ep-3 (1) és ep-7 (5) nikotinoilcsoportot tartalmaz, ezért pszeudoalkaloidnak is tekinthető. Az eup-4 (9), eup-10 (12), eup-11 (11) és ev-3 (15) csak acetilcsoporttal szubsztituált. Az észtercsoportok sokfélesége az ep sorozat tagjaira jellemző leginkább, pl. az ep-1 (2) jelzésű jatrofánvázas diterpénben 4 (acetil, izobutiroil, nikotinoil és benzoil), az ep-5 (4) és ep-7 (5) jelzésű vegyületekben pedig 3 különböző észtercsoport található. Az eup-1 (8) és eup-6 (10) hét észtercsoporttal a legmagasabban észterezett jatrofán diterpén. Az eup-1 (8), eup-4 (9) és eup-6 (10) jelzésű vegyületekben talált diterpénalkoholt munkánkat megelőzően még nem írták le. Az észtercsoportokon kívül gyakori a keto-, hidroxi-, epoxicsoportok valamint telítetlen kötés jelenléte; az ev-1 (16) és ev-5 (18) esetén pedig metoxicsoport található a molekulában. Az eup-6 (10) esetén a 11,14-helyzetben található éterkötés következtében egy ritka heterociklusos gyűrűrendszer van jelen. Ilyen vegyületeket eddig csak az *E. kansui*-ből és az *E. esulaból* izoláltak. Az eup-10 (12) jelzésű jatrofánszármazék az egyetlen ma ismert 7,8-én szerkezetű, többszörösen telítetlen dion. Az eup sorozat sztereokémiailag homogén, jellemzője a 2 β -metil, 13 α -metil és 3 β -, 7 β -, 5 α -, 8 α - és 9 α -acil szubsztitúció. Az ep sorozat ellenben sztereokémiailag heterogén: a 20-as szénatom konfigurációja egyaránt lehet α vagy β (az ep-2, ep-3 és ep-8 esetén α , az ep-1, ep-4, ep-5 és ep-7 esetén pedig β). A latirán típusú eup-1 (14) enol szerkezete és *n*-vajsavas észterezettsége rendhagyó. Az ev-2 (19) egy latiránszármazék, amely ritkán előforduló 5,6-epoxicsoportot tartalmaz. A vegyületet alkotó diterpénalkoholt szintén elsőként írtuk le. Az első pepluánvázas diterpént munkánkkal egyidőben közölték. Röntgendiffrakciós vizsgálataink alapján e vegyület szerkezetét – amely megegyezett az általunk izolált ep-8-cal (6) – revidáltuk. A pepluánváz olyan új diterpén alapváz, amelyben a cembrén-kasbén eredetű geminális dimetilcsoportok egyike hiányzik, mivel a hattagú gyűrűbe épült be. Az ev-1 (16) és ev-7 (17) alapvázat munkánkat megelőzően mindössze 3 természetes anyagban, az *Euphorbia micractinaból* izolált



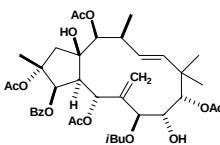
1



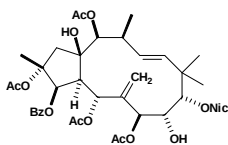
2



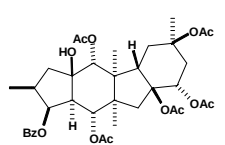
3



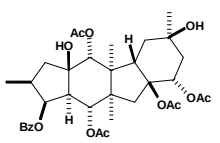
4



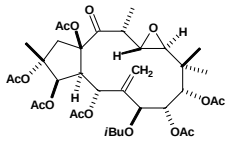
5



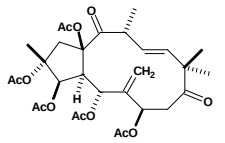
6



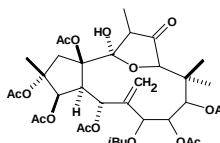
7



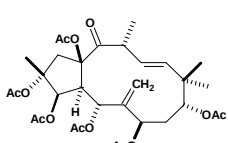
8



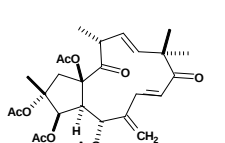
9



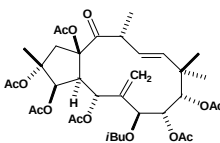
10



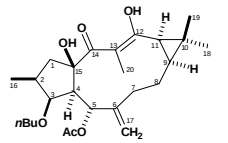
11



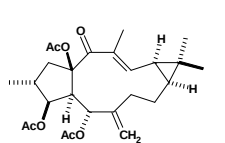
12



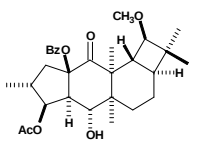
13



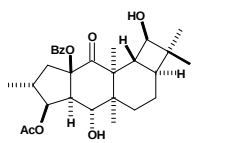
14



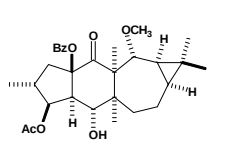
15



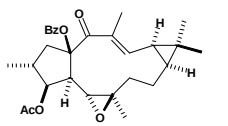
16



17



18



19

euforaktin A, C és D-ben, míg az ev-5 (18) alapvázát az euforaktin B és E-ben találták meg.

Valamennyi diterpént elsőként mutattuk ki a vizsgált növényekből; az *E. peplus*-ból izolált 5 vegyület (ep-1, ep-4, ep-5, ep-7 és ep-8) szerkezetét munkánkkal egyidőben közölték. Az *E. villosa* tartalomanyagait korábban még nem vizsgálták.

Az izolált vegyületek kemotaxonómiai jelentősége

Az *E. esula* diterpénösszetétele alapján szoros rokonságot mutat az *E. salicifolia*-val, mivel fő diterpénkomponensük, az eup-1 (8) megegyezik, és további vegyületek is csak észterezettségükben különböznek egymástól. A különböző lelőhelyekről gyűjtött *E. esula* minták diterpénjeinek különbözősége azt jelzi, hogy a növény nagyfokú változékonysága nemcsak a jól ismert morfológiai bélyegeken, hanem a diterpénösszetételben is megmutatkozik. A különböző lelőhelyekről származó *E. peplus* minták diterpénjei – egy olaszországi minta kivételével – hasonlóan mutatkoztak, ez utóbbi esetben az észtercsoportok minőségében mutatkozott eltérés. Az olasz minta esetén feltételeztük, hogy kémiai változatról van szó.

Az izolált vegyületek biológiai aktivitása

Az izolált diterpének flogisztikus, tumorelles, antivirális és multidrog rezisztencia (MDR) csökkentő aktivitását együttműködések keretében tanulmányoztuk.

- Flogisztikus aktivitás: A vizsgálat során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a jatrófán diterpének rendelkeznek-e az ingenán és tiglián diterpénekre jellemző gyulladáskeltő hatással. A flogisztikus hatás vizsgálata egérful teszten történt, referencia anyagként tetradekanoil-forbol-acetátot (TPA) alkalmaztunk (ID_{50} ⁴ 0,00938 μ g/fül, ID_{50} ²⁴ 0,00645 μ g/fül). Az eredmények azt mutatták, hogy a tesztelt jatrófán diterpének [ep-4 (3), eup-1 (8), eup-4 (9), eup-11 (11) és eup-12 (13)] az

ep-1 (2) kivételével igen magas, 200 µg/fül dóziséig nem mutatnak gyulladáskeltő hatást, és az ep-1 (2) ID₅₀ értéke (ID₅₀⁴ = ID₅₀²⁴ = 29 µg/ear) is igen magas a TPA-éhoz viszonyítva. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a számos toxikológiai problémát okozó *E. esula* és *E. peplus* erős irritáló hatásáért elsősorban a forboidok a felelősek.

- Antitumor hatás: Mivel korábban néhány jatrofánszármazékról tumorelles hatást közöltek, megvizsgáltuk néhány izolált jatrofánészter citotoxikus aktivitását humán cervix karcinóma (HeLa) és L5178 egér limfóma sejteken MTT teszt alkalmazásával. Az eredmények mérsékelt sejtnövekedés gátló hatást mutattak az eup-1 (8), eup-4 (9) és eup-12 (13) esetén L5178 sejtvonalon. A HeLa sejtvonalon az ep-1 (2), ep-5 (4) és eup-1 (8) jelzésű vegyületek esetén csekély mértékű citotoxicitást regisztráltunk.

- Antivirális hatás: A diterpének aktivitását Vero sejteken 2-típusú *Herpes simplex* vírus (HSV-2) ellen vizsgáltuk. A citotoxicitás meghatározását követően szignifikáns vírusellenes hatást tapasztaltunk az ep-3 (1), ep-4 (3), ep-5 (4), ep-7 (5) és ep-2 (7) esetén. A vizsgált vegyületek egyike sem mutatott virucid hatást HSV-2 vírus ellen.

- MDR csökkentő hatás: Az izolált diterpének anti-MDR aktivitásának vizsgálata azt mutatta, hogy néhány jatrofán-, pepluán- és latiránszármazék a pozitív kontroll verapamil hatását meghaladó mértékben növeli a tumorsejtek gyógyszerakkumulációját a permeabilitási glikoprotein efflux-pumpa tevékenységének gátlásával. Különösen az ep és ev sorozat tagjai [ep-3 (1), ep-1 (2), ep-7 (5), ev-3 (15) és ev-2 (19)] mutattak erős hatást multidrog rezisztens L5178 egér limfóma sejteken rhodamin 123 kizárásos teszt alkalmazásakor.

Az eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a jatrofánvázas diterpének nem játszanak jelentős szerepet az *Euphorbia* fajok irritáló hatásában, hanem figyelemreméltó farmakológiai hatásaik miatt terápiás szempontból ígéretes vegyületeknek tekinthetők.

Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom Dr. Máthé Imre professzor úrnak, az SZTE Farmakognóziai Intézet tanszékvezetőjének, aki mindenben támogatott munkám során.

Őszinte köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek Dr. Hohmann Judit professzor asszonynak a munkám során nyújtott iránymutatásért és az értekezés megírásában nyújtott segítségért.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Penszka Károlynak és Miklóssy V. Vilmosnak a növényi nyersanyag begyűjtéséért, illetve azonosításáért. Köszönetemet fejezem ki Dr. Günther Gábornak, Dr. Evanics Ferencnek és Dr. Forgó Péternek az NMR spektrumok felvételéért, Dr. Jerkovich Gyulának és Dr. Szabó Pálnak a tömegspektroszkópiás mérésekért, Dr. Kálmán Alajos professzor úrnak, Dr. Argay Gyulának és Dr. Tanusree Karnak a röntgen-krisztallográfiás vizsgálatokért, Dr. Blaszó Gábornak az izolált vegyületek gyulladáskeltő hatásának vizsgálatáért és Dr. Molnár József professzor úrnak és Dr. Mucsi Ilonának a vegyületek multidrog rezisztencia csökkentő, citotoxikus és antivirális hatásának vizsgálatáért.

Hálás vagyok Berta Erzsébet laborasszisztensnek, valamint kollégáimnak és barátaimnak az SZTE Farmakognóziai Intézetében, hogy hozzájárultak kísérletes munkám elvégzéséhez és az értekezés összeállításához.

Köszönöm Családom szeretetét és türelmét.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

1. a) Hohmann J, **Vasas A**, Günther G, Máthé I, Evanics F, Dombi G, Jerkovich G: Macrocyclic diterpene polyesters of the jatrophone type from *Euphorbia esula*, *J. Nat. Prod.* 1997; **60**: 331-335
If*: 2.202
- b) Hohmann J, **Vasas A**, Günther G, Máthé I, Evanics F, Dombi Gy, Jerkovich Gy: Jatrófánvázak makrociklusos diterpén-poliészterek az *Euphorbia esula*-ból, *Acta Pharm. Hung.* 1998; **68**: 175-182
2. Günther G, Hohmann J, **Vasas A**, Máthé I, Dombi G, Jerkovich G: Jatrophone diterpenoids from *Euphorbia esula*, *Phytochemistry* 1998; **47**: 1309-1313
If: 2.101
3. Günther G, Martinek T, Dombi G, Hohmann J, **Vasas A**: Structural characterization and dynamic NMR studies of a new peracylated macrocyclic diterpene, *Magn. Reson. Chem.* 1999; **37**: 365-370
If: 1.489
4. Hohmann J, Günther G, **Vasas A**, Kálmán A, Argay G: Isolation and structure revision of pepluane diterpenoids from *Euphorbia peplus*, *J. Nat. Prod.* 1999; **62**: 107-109
If: 2.202
5. Hohmann J, **Vasas A**, Günther G, Dombi G, Blazsó G, Falkay G, Máthé I, Jerkovich G: Jatrophone diterpenoids from *Euphorbia peplus*, *Phytochemistry* 1999; **51**: 673-677
If: 2.101
6. Hohmann J, Evanics F, **Vasas A**, Dombi G, Jerkovich G, Máthé I, A novel lathyrane diterpenoid from the roots of *Euphorbia lathyris*, *J. Nat. Prod.* 1999; **62**: 176-178
If: 2.202
7. **Vasas A**, Hohmann J, Forgo P, Szabó P: New tri- and tetracyclic diterpenes from *Euphorbia villosa*, *Tetrahedron* 2004; **60**: 5025-5030
If: 2.643

* ISI© Journal Citation Report, Science Edition 2004 alapján