

# **Juncaceae fajok biológiailag aktív vegyületeinek izolálása és szerkezet-meghatározása**

Doktori értekezés tézisei

**Dr. Tóth Barbara Éva**

Szegedi Tudományegyetem  
Farmakognóziai Intézet

Szeged  
2016



Szegedi Tudományegyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola  
Farmakognózia PhD. program  
Programvezető: Prof. Hohmann Judit DSc.

**Farmakognóziai Intézet**

**Témavezetők: Prof. Hohmann Judit DSc.**

**Dr. Vasas Andrea PhD.**

**Prof. Fang-Rong Chang PhD.**

**Juncaceae fajok biológiailag aktív vegyületeinek izolálása és  
szerkezet-meghatározása**

Doktori értekezés tézisei

**Dr. Tóth Barbara Éva**

**Szigorlati Bizottság:**

**Elnök:** Prof. Máthé Imre DSc., SZTE Farmakognóziai Intézet

**Tagok:** Dr. Kéry Ágnes PhD., SE Farmakognóziai Intézet

Dr. Zupkó István PhD., SZTE Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

**Bíráló Bizottság:**

**Elnök:** Prof. Fülöp Ferenc DSc., SZTE Gyógyszerkémiai Intézet

**Opponensek:** Prof. Deli József DSc., PTE Farmakognóziai Intézet

Prof. Vasas Gábor DSc., DE TTK Növénytan Tanszék, Farmakognóziai részleg

**Tagok:** Dr. Benkő Ria PhD., SZTE Klinikai Gyógyszerészeti Intézet

Dr. Jójártné Dr. Laczkovich Orsolya PhD., SZTE Gyógyszerkeletudományi Intézet

Szeged  
2016



## BEVEZETÉS

A Juncaceae család (szittyófélék) 7 genuszába közel 500 növényfaj tartozik, legnagyobb nemzetségei a *Juncus* (n=347) és a *Luzula* (n=115). A szittyófélék elsősorban a mérsékelt égövön és a trópusi vidékeken elterjedt egyéves vagy évelő, lágyszárú növények. A legtöbb Juncaceae faj kizárólag nedves területeken (mocsarak, lápok) él, de előfordulnak szikes talajt kedvelő növények is. Hazánkban 15 *Juncus* és 6 *Luzula* faj honos.

A Juncaceae család fajai különböző vegyületcsoportokba tartozó másodlagos anyagcseretermékeket halmoznak fel (pl. fenantrének, flavonoidok, kumarinok, terpenoidok), melyek közül kiemelkedő jelentőségűek a figyelemre méltó biológiai aktivitással és szerkezeti változékonysággal rendelkező fenantrének. Ezek a vegyületek az aromás anyagok egy ritka csoportját alkotják, amelyek a növényi bioszintézis során feltehetőleg a stilbének gyűrűzáródásával jönnek létre. A vegyületcsoport iránti nagy érdeklődést mutatja, hogy az eddig izolált több mint 450 természetes fenantrén közel felét az utóbbi tíz évben írták le.

A Juncaceae családdal végzett korábbi fitokémiai és farmakológia vizsgálatok során csak igen kisszámú, szinte kizárólag a *Juncus* nemzetségbe tartozó fajt tanulmányoztak. Korábban öt *Juncus* fajból közel 100 fenantrént izoláltak, amely vegyületek nagy szerkezeti változatosságot mutatnak, és számos közülük jelentős biológiai aktivitással rendelkezik. A *Luzula* fajokból vékonyrétegekromatográfias módszerrel flavonoidokat (luteolin és krizoeriol származékokat) azonosítottak, azonban a nemzetségbe tartozó növényeket ez idáig sem preparatív fitokémiai, sem farmakológiai szempontból nem vizsgálták.

A fenantréneket tartalmazó növényeket, köztük a Juncaceae család számos tagját is gyakran használták a népi gyógyászatban a legkülönbözőbb betegségek (pl. láz, alvászavarok) kezelésére. A vegyületek széleskörű farmakológiai vizsgálata több esetben igazolta a népi gyógyászati felhasználást. Több anyag rendelkezik *in vitro* citotoxikus, antimikrobiális (baktérium-, gomba- és vírusellenes), antioxidáns és

gyulladáscsökkentő, valamint központi idegrendszerre és simaizmokra kifejtett hatással.

A fenantrének limitált előfordulásuk miatt értékes kemotaxonomai markerek lehetnek, mivel jelenlétük megerősítheti a fajok botanikai rokonságát, ezáltal lehetőség nyílik a botanikailag kérdéses fajok kémiai összetétel alapján történő botanikai rendszerbe illesztésére.

## **CÉLKITŰZÉSEK**

A Szegedi Tudományegyetem Farmakognózi Intézetében indult kutatási program keretében célul tűztük ki a Kárpát-medencében előforduló, Juncaceae családba tartozó növények fitokémiai és farmakológiai vizsgálatát. Ennek keretében került sor korábban még nem, vagy nem kimerítően vizsgált 19 *Juncus* és *Luzula* nemzetségbe tartozó faj tanulmányozására.

Munkánk célja új, biológiailag aktív fenantrének izolálása és szerkezet-meghatározása volt, melynek érdekében a következő feladatokat végeztük el:

- A természetben előforduló fenantrének szakirodalmának rendszerezése.
- A Juncaceae fajok fitokémiájával és farmakológiájával kapcsolatos szakirodalom áttekintése.
- A begyűjtött Juncaceae fajok különböző polaritású oldószerekkel készített kivonatainak előállítás.
- A kivonatok antibakteriális hatásának vizsgálata multirezisztens baktérium törzseken.
- A *Juncus inflexus* L. biológiailag aktív szekunder metabolitjainak azonosítása: izolálás, szerkezetazonosítás, kivonatok és komponensek *in vitro* antibakteriális potenciáljának meghatározása.
- Az antibakteriális vizsgálat során legaktívabbnak bizonyult növényfajok kivonatainak analízise HPLC-MS módszerrel.
- *Luzula* fajok gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata.

- A *Luzula luzuloides* (Lam.) Dandy & Wilmott fitokémiai és farmakológiai vizsgálata: komponensek izolálása, szerkezet-meghatározása, valamint *in vitro* gyulladáscsökkentő hatásuk vizsgálata.
- Az izolált királis vegyületek abszolút konfigurációjának meghatározása.
- A fenantrének lehetséges bioszintézis útjainak feltárására félszintetikus átalakítások elvégzése.
- Az izolált fenantrének kemotaxonomiai jelentőségének értékelése.

## ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK

Az antibakteriális és gyulladáscsökkentő hatás szűrővizsgálatához a Juncaceae fajokat [*Juncus acutus* L., *J. alpinoarticulatus* Chaix, *J. articulatus* L., *J. compressus* Jacq., *J. conglomeratus* L., *J. effusus* L., *J. filiformis* L., *J. gerardii* Loisel., *J. inflexus* L., *J. maritimus* Lam., *J. monanthos* Jacq., *J. squarrosus* L., *J. tenuis* Willd., *J. trifidus* L., *Luzula campestris* (L.) DC., *L. forsteri* (Sm.) DC., *L. luzuloides* (Lam.) Dandy & Wilmott, *L. sudetica* (Willd.) Schult., *L. sylvatica* (Huds.) Gaudin] virágzó állapotban, a Kárpát-medence különböző területeiről (Magyarország, Horvátország és Románia) gyűjtöttük 2014. májusa és szeptembere között. A preparatív növénykémiai vizsgálathoz használt *J. inflexus* gyökerét Hódmezővásárhely mellett (2014. május), a *L. luzuloides* pedig a Pádis-fennsíkon gyűjtöttük (2014. június).

A vegyületek tisztítását többlépcsős kromatográfiai eljárás segítségével végeztük el, oszlopkromatográfia (OCC), vákuum folyadékkromatográfia (VLC), rotációs planárokromatográfia (RPC), közepes nyomású folyadékkromatográfia (MPLC), preparatív rétegekromatográfia (PLC), gélszűrés (GF) és nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) alkalmazásával. Állófázisként normál (NP) és fordított fázisú (RP) szilika gélt, poliamidot és Sephadex LH-20 gélt használtunk.

Az izolált vegyületek szerkezet-meghatározása UV-spektroszkópia, nagy felbontású tömegspektroszkópia (HR-MS), valamint mágneses magrezonancia-spektroszkópia (NMR) segítségével történt. A királis vegyületek abszolút

konfigurációját ECD mérésekkel és molekulamechanikai számításokkal határoztuk meg.

A szűrővizsgálatok során a Juncaceae fajokból készült kivonatok, valamint a *J. inflexus*ból izolált vegyületek antibakteriális hatását 10 multirezisztens baktériumtörzsön vizsgáltuk. Egy standard [*Staphylococcus aureus* (ATCC43300)] és kilenc klinikai izolátumot [multirezisztens *Acinetobacter baumannii* (64060/2 és 61748/2), ESBL-pozitív *Citrobacter freundii* (63458), ESBL-pozitív *Enterobacter cloacae* (63033), ESBL-pozitív *Escherichia coli* (64663), ESBL-pozitív *Klebsiella pneumoniae* (63735), multirezisztens *Pseudomonas aeruginosa* (61485/1 és 64658) és methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (64326)] alkalmaztunk.

A *Luzula* kivonatok, az izolált és a félszintetikusan előállított vegyületek gyulladáscsökkentő aktivitását az elasztáz enzim felszabadulás és a szuperoxid anion képződés gátlásán keresztül vizsgáltuk fMLP/CB-indukált humán neutrofil sejteken.

## EREDMÉNYEK

### A KIVONATOK ANTIBAKTERIÁLIS SZŪRŐVIZSGÁLATA

A Juncaceae család *Juncus* és *Luzula* nemzetségeibe tartozó 19 növényfajból 96 kivonatot állítottunk elő úgy, hogy ahol lehetséges volt, a növényeket föld alatti és föld feletti részre bontottuk, majd az így nyert mintákat metanollal extraháltuk. A metanolos kivonatot betöményítettük, és ezt követően 50%-os vizes metanolban szuszpendáltuk, majd *n*-hexánnal, diklórmetánnal és etil-acetáttal folyadék–folyadék megosztást végeztünk. A különböző polaritású frakciók antibakteriális hatását 10 multirezisztens baktériumtörzsön teszteltük.

Először korongdiffúziós módszerrel meghatároztuk az 50 mg/ml koncentrációban alkalmazott kivonatok gátlási zónáját. 19 kivonat mutatott gátló hatást (gátlási zóna = 6,7 mm–14,6 mm). Néhány kivételtől eltekintve csak a diklórmetános frakciók bizonyultak aktívnak a standard és a klinikai mintákból származó methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) törzsön. A többi baktériumtörzs esetén az extraktumok hatástalanok voltak.



A leghatásosabb kivonatok (gátlási zóna  $\geq 10$  mm) MIC értékét mikrodilúciós módszerrel határoztuk meg, melyek közül a *J. inflexus* gyökeréből készült diklórmetános extraktum volt a legaktívabb (MIC = 9,75  $\mu\text{g/ml}$ ). Jelentős aktivitást mutattak továbbá a *J. maritimus*ból (MIC = 78  $\mu\text{g/ml}$ ), a *J. gerardi*ból (MIC = 78  $\mu\text{g/ml}$ ) és a *J. effusus* gyökeréből készített diklórmetános kivonatok (MIC = 39  $\mu\text{g/ml}$ ). Mérsékelt hatást detektáltunk a *J. acutus* (egész növény) és a *J. tenuis* föld feletti részének diklórmetános frakciójánál (MIC = 156  $\mu\text{g/ml}$ , mindkét kivonat esetén).

A *Juncus* nemzetségbe tartozó növényfajok antibakteriális aktivitása az általunk vizsgált baktériumtörzseken kifejezettebb volt, mint a *Luzula* fajok hatása, amely a két nemzetségbe tartozó növények eltérő fitokémiai összetételével magyarázható.

Az antibakteriális szűrővizsgálat alapján célul tűztük ki a hatásért felelős vegyületek hatáskövetett izolálását a *J. inflexus* gyökerének diklórmetános frakciójából.

### **LUZULA FAJOK GYULLADÁSCSÖKKENTŐ HATÁSÁNAK SZŪRŐVIZSGÁLATA**

A *Luzula* fajokból az antibakteriális szűrővizsgálatnál ismertetett módon különböző polaritású oldószerekkel (*n*-hexán, diklórmetán, etil-acetát) készítettünk kivonatokot. A kivonatok gyulladáscsökkentő aktivitását fMLP/CB-indukált humán neutrofil sejteken vizsgáltuk 10  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációban. Több kivonat jelentősen gátolta a szuperoxid anion képződést és az elasztáz enzim felszabadulást.

A *L. forsteri*, *L. luzuloides*, *L. sudetica* és *L. sylvatica* föld alatti és föld feletti részéből *n*-hexánnal készült apoláros kivonatok szignifikánsan (> 70%) gátolták mind a szuperoxid anion képződést, mind az elasztáz enzim felszabadulást. A *L. campestris* *n*-hexános frakciója szelektíven gátolta az elasztáz enzim felszabadulást.

A különböző polaritású frakciók közül a diklórmetánnal készült, főként lipofil komponenseket tartalmazók bizonyultak a leginkább hatásosnak, minden diklórmetános minta esetén 93%-ot meghaladó gátlást detektáltunk a két teszrendszeren. Általánosan elmondható, hogy a frakciók gátló hatása az elasztáz enzim felszabadulására kifejezettebb volt, mint a szuperoxid anion képződésre gyakorolt gátlás.

A polárosabb vegyületekben gazdag etil-acetát oldékony frakciók közül a *L. campestris*ből, *L. luzuloides*ből, *L. sudeticaból* és *L. sylvatica* föld feletti részéből készült kivonatok mutattak mérsékelt (> 65%) gátló hatást. A *L. luzuloides* vizes-metanolos frakciója 65%-ot meghaladó gátlást mutatott mindkét tesztrendszeren.

Az előzetes farmakológiai eredmények alapján a *L. luzuloides*t választottuk ki további preparatív fitokémiai vizsgálatok céljára.

### **FENANTRÉNEK KIVONÁSA ÉS IZOLÁLÁSA**

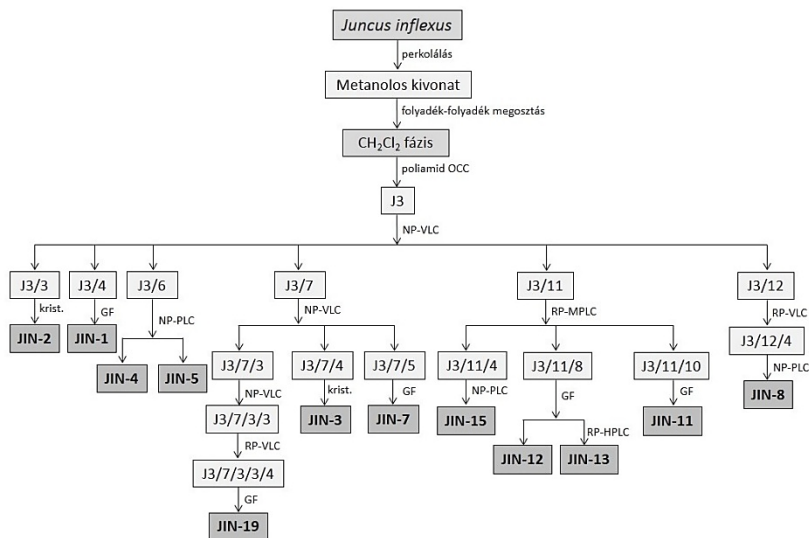
A száraz növényi minták extrakciója metanollal végzett perkolálással történt szobahőmérsékleten, majd ezt követően diklórmetánnal folyadék–folyadék megosztást végeztünk. A szerves fázisokat különféle kromatográfiai technikák alkalmazásával frakcionáltunk, így jutottunk a tiszta vegyületekhez.

### **A JUNCUS INFLEXUS VEGYÜLETEINEK IZOLÁLÁSA**

A *J. inflexus* (deres szittyó) diklórmetános fázisának poliamid oszlopkromatográfiai frakcionálása metanol–víz különböző polaritású elegyeivel (2:3, 1:1, 3:2, 4:1, 1:0) történt, mellyel 4 főfrakcióhoz (J1–4) jutottunk. Ezt követően vizsgáltuk a frakciók (J1–4) antibakteriális aktivitását standard (ATCC43300) és klinikai (64326) MRSA törzseken. A poliamid frakciók közül a 60% és 80%-os metanollal nyert, J3 jelzésű bizonyult a leghatásosabbnak mindkét MRSA törzs (ATCC43300 és 64326) ellen (gátlási zóna = 15,3 mm és 14,3 mm). A J2 jelzésű, 50% metanollal eluált frakció (gátlási zóna = 7,3, mindkét törzs esetén) és a J4-es, 100% metanollal nyert frakció mérsékelt aktivitást (gátlási zóna = 7,6, mindkét törzs esetén) mutatott. A 40%-os metanollal eluált frakció (J1) nem bizonyult hatásosnak egyik baktériumtörzs ellen sem.

A további preparatív munkát a leginkább hatásos, J3-as frakció feldolgozásával folytattuk. Mivel ez a frakció kémiaiilag rendkívül komplexnek bizonyult, ezért a további elválasztásokat szelektívebb módszerekkel (VLC, MPLC, GF, PLC és HPLC), normál és fordított fázisú szilikagél, valamint Sephadex LH-20 gél állófázison végeztük. A további alfrakciókat eltérő polaritású és összetételű mozgófázisok

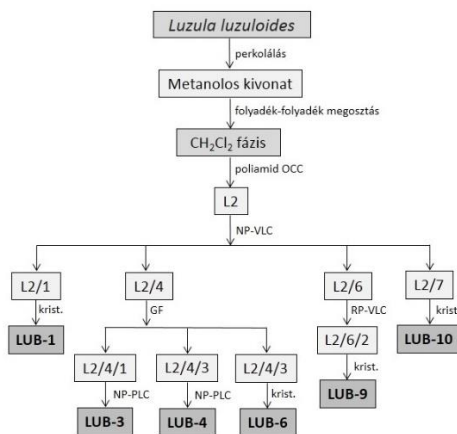
alkalmazásával alacsony, légköri és túlnyomáson tisztítottuk. Kombinált kromatográfiai módszerekkel 12 vegyületet (**JIN-1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13, 15, 19**) izoláltunk. A komponensek kinyerésének folyamatát az **1. ábra** szemlélteti.



**1. ábra** A *J. inflexus* vegyületeinek izolálása

#### A *LUZULA LUZULOIDES* VEGYÜLETEINEK ISZOLÁLÁSA

A *L. luzuloides* (fehér perjeszittyó) diklórmétános fázisát légköri nyomású oszlopkromatográfiával tisztítottuk poliamid állófázison 50%-os és 80%-os metanollal. Az így nyert 2 főfrakció közül fitokémiai szempontból az L2 jelzésű, 80% metanollal nyert frakció volt az ígéretesebb, ezért ezt a frakciót normál fázisú szilikagél oszlopon, ciklohexán–etilacetát–etanol gradiens elúciót alkalmazva tisztítottuk. Számos vegyület esetén kristálykiválást (krist.) tapasztaltunk. A komponensek végső tisztításához gélszűrést, majd ezt követően NP- és RP-PLC elválasztást alkalmaztunk. A *L. luzuloides* tartalomanyagainak (**LUB-1, 3, 4, 6, 9, 10**) izolálását a **2. ábra** szemlélteti.



2. ábra A *L. luzuloides* vegyületeinek izolálása

## AZ ISZOLÁLT VEGYÜLETEK SZERKEZET-MEGHATÁROZÁSA

Az izolált vegyületek szerkezet-meghatározása különböző spektroszkópiai módszerek segítségével történt. Tömegspektrometriás vizsgálatokkal meghatároztuk a molekulatömeget és az összegképletet, UV spektroszkópiai és optikai forgatóképesség mérésekkel pedig további fontos információkat nyertünk. A szerkezet-meghatározáshoz az 1D és 2D NMR spektroszkópia szolgáltatta a legértékesebb adatokat. Az  $^1\text{H}$  NMR, JMOD,  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  COSY, HSQC és HMBC spektrumok alapján levezettük a vegyületek síkbeli szerkezetét, majd a NOESY korrelációk segítségével meghatároztuk a molekulák relatív konfigurációját. Az NMR vizsgálatok eredményeként elkészítettük az új vegyületek és néhány ismert vegyület jellemzésére szolgáló teljes  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR jelhozzárendelést.

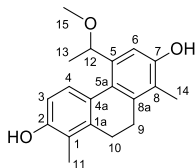
A királis anyagok esetén először meghatároztuk a vegyületek optikai forgatóképességét. Ezt követően királis HPLC elválasztásra került sor, amely lehetővé tette az enantiomer felesleg (ee) meghatározását. Az eluálódó enantiomerek abszolút konfigurációját kvantummechanikai számításokkal határoztuk meg, majd az így kapott számolt ECD spektrumot összevetettük a vegyület mért CD spektrumával, s ezzel a fő enantiomer abszolút konfigurációjához jutottunk.

## **A *JUNCUS INFLEXUS* VEGYÜLETEI**

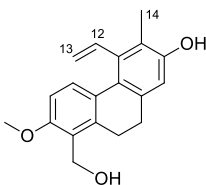
A *J. inflexus* gyökeréből 11 fenantrént és egy flavonoidot izoláltunk. A fenantrének közül négy új természetes anyag: jinflexin A [**JIN-7 (1)**], jinflexin B [**JIN-12 (2)**], jinflexin C [**JIN-15 (3)**] és jinflexin D [**JIN-19 (4)**]. Az új fenantrének közül a jinflexin A (**1**) 5-ös helyzetben metoxietil szubsztituált, azonban a vegyület nem tartalmazza a Juncaceae családra jellemző vinilcsoportot. A jinflexin A-ról (**1**) annak ECD spektruma és királis HPLC analízise alapján megállapítottuk, hogy racém elegy. A jinflexin B (**2**) C-1 helyzetben hidroximetil, a 2-es C-atomon pedig metoxicsoportot tartalmazó 9,10-dihydrofenantrén. A jinflexin C (**3**) különlegessége, hogy a metil és a vinil szubsztitúció egyazon C-atomon, a 7-es helyzetben található. A TDDFT-ECD számolások és a királis HPLC elválasztás eredményeként meghatároztuk a jinflexin C (**3**) abszolút konfigurációját. A (6*R*,7*R*)-jinflexin C (**3**) 80% enantiomer felesleggel rendelkezik. A jinflexin D (**4**) egy dimér fenantrén, amely a dehidrojunkuenin A-ból (**9**) és a 2,7-dihidroxil-1,8-dimetil-5-vinil-9,10-dihydrofenantrénből származtatható. A monomerek feltehetőleg a vinil csoportokon keresztül kapcsolódtak össze egy eddig egyedülálló gyűrűrendszerre. A jinflexin D (**4**) abszolút konfigurációja 9%-os enantiomer felesleggel (*S*)-nek bizonyult.

A növényből ezen kívül izoláltunk három ismert dihydrofenantrént, a junkuenin A-t [**JIN-2 (5)**], junkuenin B-t [**JIN-3 (6)**] és a junkuzolt [**JIN-5 (7)**], valamint ezen vegyületek 9,10-es helyzetben telítetlen fenantrén párjait, a dehidrojunkuenin A-t [**JIN-1 (9)**], a dehidrojunkuenin B-t [**JIN-11 (11)**] és a dehidrojunkuzolt [**JIN-4 (10)**], továbbá egy fenantrénkinont [junkuenin D, **JIN-13 (8)**], valamint a flavonoid krizoeriol [**JIN-8 (12)**].

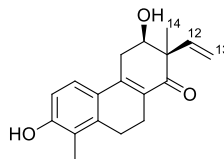
A királis új anyagok (**1**, **3**, **4**) mellett, a korábban már más *Juncus* fajból is közölt junkuenin D (**JIN-13**, **8**) esetében is meghatároztuk a vegyület abszolút konfigurációját. Az (*S*)-junkuenin D (**8**) 4%-os enantiomer felesleggel rendelkezett.



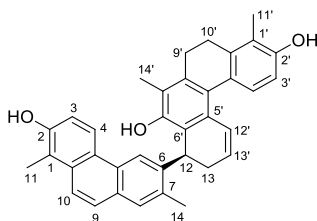
(±)-**1**



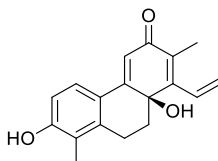
**2**



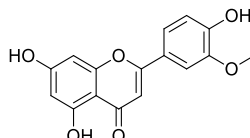
(6*R*,7*R*)-**3** (80% ee)



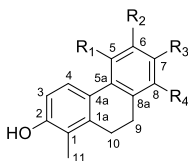
(*S*)-**4** (9% ee)



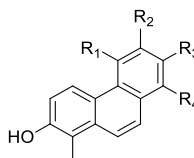
(*S*)-**8** (4% ee)



**12**



**5**     $R_1$      $R_2$      $R_3$      $R_4$



**9**     $R_1$      $R_2$      $R_3$      $R_4$

**5**    H    CH=CH<sub>2</sub>    CH<sub>3</sub>    H

**9**    H    CH=CH<sub>2</sub>    CH<sub>3</sub>    H

**6**    H    OH    CH<sub>3</sub>    CH=CH<sub>2</sub>

**10**    CH=CH<sub>2</sub>    CH<sub>3</sub>    OH    H

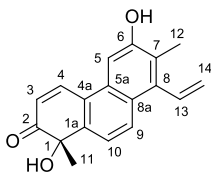
**7**    CH=CH<sub>2</sub>    CH<sub>3</sub>    OH    H

**11**    H    OH    CH<sub>3</sub>    CH=CH<sub>2</sub>

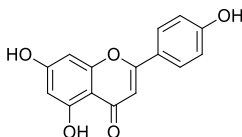
### A *LUZULA LUZULOIDES* VEGYÜLETEI

A *L. luzuloides*ből izolált vegyületek közül négy fenantrén, kettő pedig flavonoid típusú. A **LUB-3** (luzulin A, **13**) jelzésű fenantrén új természetes anyag, amelynek elkészítettük a teljes <sup>1</sup>H és <sup>13</sup>C NMR jelhozarárendelését, valamint meghatároztuk az abszolút konfigurációját. A korábban ismert komponensek [**LUB-1** (junkuzol, **7**), **LUB-4** (junkuenin B, **6**), **LUB-6** (dehidrojunkuenin B, **11**), **LUB-9** (apigenin, **14**) és **LUB-10** (luteolin, **15**)] azonosítása az általunk mért illetve korábban közölt NMR és MS

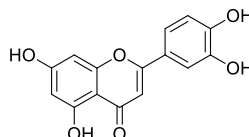
adatok összehasonlításával történt. Az izolált metabolitokat elsőként mutattuk ki a növényből, és elsőként detektáltunk fenantréneket a *Luzula* nemzetségben.



(S)-**13** (25% ee)



**14**



**15**

### LEHETSÉGES BIOSZINTÉZIS UTAK VIZSGÁLATA

A *J. inflexus* esetén a főkomponens a junkuenin B (**6**), amelyet közel 1 g mennyiségben izoláltunk a növény gyökeréből. A *J. inflexus*ból izoláltuk továbbá a junkuenin D-t (**8**) és a dehidrojunkuenin B-t (**11**), amelyek a junkuenin B-hez (**6**) hasonlóan szubsztituáltak, de oxidáltsági fokukban különböznek attól. A *L. luzuloides*ből szintén izoláltuk a junkuenin B-t (**6**) és a dehidrojunkuenin B-t (**11**), valamint a luzulin A-t (**13**), amelynek C-gyűrűje a junkuenin B-vel megegyezően szubsztituált. A junkuenin B-ből (**6**) hipervalens jódvegyület segítségével, oxidációval mindhárom vegyületet (**8**, **11**, **13**) sikerült előállítani, így feltételezhető, hogy a junkuenin D (**8**), a dehidrojunkuenin B (**11**) és a luzulin A (**13**) a bioszintézis során is ebből a vegyületből [junkuenin B (**6**)] keletkezik.

### AZ ISZOLÁLT VEGYÜLETEK BIOLÓGIAI AKTIVITÁSA

#### ANTIBAKTERIÁLIS HATÁS

A *J. inflexus* diklórmetános kivonatából izolált vegyületek (**1-12**) esetén először korongdiffúziós módszerrel vizsgáltuk a komponensek MRSA-ellenes aktivitását a standard baktérium törzsön (ATCC43300) 10 mg/ml koncentrációban. Az izolált vegyületek közül a jinflexin B (**2**), a junkuzol (**7**), a dehidrojunkuenin B (**11**) és a junkuenin D (**8**) bizonyult hatásosnak. Ezt követően meghatároztuk az aktív vegyületek MIC értékeiket. Pozitív kontrollként vankomicint (MIC = 2 µg/ml)

alkalmaztunk. Az antibakteriális vizsgálat eredményeit az **1. táblázat** foglalja össze, melyben csak az aktív vegyületeket tüntettük fel.

**1. táblázat** A *J. inflexus*ból izolált vegyületek MRSA-ellenes hatása

Vegyület	MRSA (ATCC43300) gátló hatás	
	Gátlási zóna (átmérő, mm)	MIC (µg/ml)
<b>2</b> (jinflexin B)	7,0 ± 0,1	100
<b>7</b> (junkuzol)	12,0 ± 0,6	25
<b>8</b> (junkuenin D)	12,0 ± 0,3	12,5
<b>11</b> (dehidrojunkuenin B)	10,0 ± 0,2	25
vankomicin*	15,5 ± 0,6	2

\*Pozitív kontrol: vankomicin (5 µg/korong)

A vizsgált vegyületek közül a junkuenin D (**8**) mutatta a legjelentősebb MRSA-ellenes aktivitást (MIC = 12,5 µg/ml). A korábbi irodalmi adatokkal összhangban a junkuzol (**7**) is kifejezett (MIC = 25 µg/ml) antibakteriális hatással rendelkezett a klinikai MRSA törzsön. A junkuzolhoz hasonló mértékben, azonos MIC értékkel gátolta a baktériumok növekedését a dehidrojunkuenin B (**11**). Leggyengébb gátló hatása a jinflexin B-nek (**2**) volt, melynek MIC értéke a mikrodilúciós módszer alapján 100 µg/ml-nak bizonyult.

#### **GYULLADÁSCSÖKKENTŐ HATÁS**

A *L. luzuloides*ből azonosított vegyületek (**6, 7, 11, 13–15**), valamint a félszintetikusan előállított junkuenin D (**8**) *in vitro* gyulladáscsökkentő hatását a szuperoxid anion termelésén és az elasztáz enzim gátlásán alapuló tesztek segítségével, fMLP/CB indukálta humán neutrofil sejteken értékeltük (**2. táblázat**). A vizsgálatok során az anyagokat először 10 µM koncentrációban teszteltük, pozitív kontrolként egy PI3K gátlót (LY294002) alkalmaztunk. Ezt követően meghatároztuk a vegyületek IC<sub>50</sub> értékét.



**2. táblázat** A *L. luzuloides*-ből izolált vegyületek gyulladáscsökkentő hatása

Vegyület	Szuperoxid anion képződés		Elasztáz enzim felszabadulás	
	IC <sub>50</sub> (μM)	Gátlás (%)	IC <sub>50</sub> (μM)	Gátlás (%)
<b>6</b> (junkuenin B)	4,92 ± 0,27	81,54 ± 3,5***	5,47 ± 1,11	80,57 ± 4,15***
<b>7</b> (junkuzol)	3,11 ± 0,25	93,07 ± 0,48***	> 10	2,05 ± 2,07
<b>8</b> (junkuenin D)	> 10	43,29 ± 5,77***	> 10	32,75 ± 6,98**
<b>11</b> (dehidrojunkuenin B)	3,17 ± 1,19	82,90 ± 7,65***	> 10	25,58 ± 2,83**
<b>13</b> (luzulin A)	> 10	12,26 ± 3,76*	> 10	40,50 ± 5,57**
<b>14</b> (apigenin)	6,12 ± 0,72	73,92 ± 4,11***	> 10	46,14 ± 6,03**
<b>15</b> (luteolin)	4,73 ± 0,49	79,77 ± 4,37***	6,91 ± 2,25	54,16 ± 4,66***
LY294002 (pozitív kontrol)	1,29 ± 0,05	-	4,97 ± 0,80	-

Az eredményeket átlag (n=3–5) ± S.E.M. tüntettük fel. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.

A vizsgált anyagok közül a junkuenin B (**6**) (IC<sub>50</sub> = 4,92 μM), a junkuzol (**7**) (IC<sub>50</sub> = 3,11 μM), a dehidrojunkuenin B (**11**) (IC<sub>50</sub> = 3,17 μM), az apigenin (**14**) (IC<sub>50</sub> = 6,12 μM) és a luteolin (**15**) (IC<sub>50</sub> = 4,73 μM) gátolta jelentősen a szuperoxid anion képződést. Ezen kívül a junkuenin B (**6**) és a luteolin (**15**) a pozitív kontrollal összemérhető mértékben, 5,47 μM és 6,91 μM IC<sub>50</sub> értékkel gátolta az elasztáz enzim felszabadulást.

A szerkezet-hatás vizsgálataink eredményeként megállapítottuk, hogy a junkuenin B (**6**) oxidációjával jelentősen csökken annak elasztáz enzim felszabadulást gátló hatása. Továbbá ezek a vegyületek (**8**, **13**) – a dehidrojunkuenin B (**11**) kivételével – a szuperoxid anion képződést gátló hatásukat is elveszítik.

#### JUNCACEAE FAJOK KIVONATAINAK LC-MS VIZSGÁLATA

A *J. inflexus*-ból hatáskövetett izolálással négy (**2**, **7**, **8**, **11**) antibakteriális aktivitással rendelkező metabolitot nyertünk. A vegyületek jelenlétét a korábban antibakteriális hatásúnak bizonyult – a *J. effusus* és *J. inflexus* gyökeréből, a *J. tenuis* föld feletti részéből, valamint a *J. acutus*-ból, *J. gerardi*-ből és *J. maritimus*-ból készült – diklórmetános kivonatokban HPLC-MS módszerrel vizsgáltuk.

A kromatogramok alapján mind a négy vegyület detektálható volt a *J. inflexus* diklórmétános kivonatában, amiből arra következtethetünk, hogy a vizsgált anyagok nem izolációs műtermékek.

Mindegyik kivonatban kimutatható volt a junkuzol (**7**), amely egy, a Juncaceae család fajaiban gyakran előforduló tartalomanyag. Érdekes módon az általunk elsőként leírt jinflexin B (**2**) a *J. inflexus*on kívül két másik növény, a *J. acutus* és a *J. gerardii* diklórmétános kivonatában is detektálható volt.

Bár az általunk azonosított aktív vegyületek hozzájárulnak a vizsgált növények kivonatainak antibakteriális hatásához, feltételezhető, hogy más, eddig azonosítatlan komponenseknek is szerepe lehet a hatás kialakításában.

#### **AZ ISZOLÁLT VEGYÜLETEK KEMOTAXONÓMIAI JELENTŐSÉGE**

A *J. inflexus* és a *L. luzuloides* tartalomanyagait korábban még nem vizsgálták, valamennyi vegyületet elsőként mutattuk ki a vizsgált növényekből. A *J. inflexus*sból 11 fenantrént izoláltunk, melyek közül 9 vinilsubstituíált származék és 4 új természetes vegyület. A *L. luzuloides*ből 4 fenantrént azonosítottunk, melyek mindegyike tartalmaz vinilcsoportot, közülük egy vegyület új természetes anyag. Vizsgálataink során először sikerült a Juncaceae családra jellemző vinilsubstituíált monofenantréneket azonosítani a *Luzula* nemzetségből. A *L. luzuloides* fenantrénösszetétele alapján szoros rokonságot mutat a *J. inflexus*szal, mivel fő fenantrén komponenseik közül a junkuenin B (**6**), a junkuzol (**7**) és a dehidrojunkuenin B (**11**) mindkét növényben megtalálható. A növényekből izolált ismert anyagokat korábban más *Juncus* fajokból is leírták, ezért eredményeink megerősítik a fajok botanikai rokonságát. A vinilcsoporttal substituíált fenantrének jelenléte lehetőséget ad a botanikailag kérdéses fajok kémiai összetétel alapján történő rendszerbe illesztésére.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni őszinte köszönetemet *Prof. Hohmann Judit*nak, a Farmakognózi Intézet vezetőjének, aki felbecsülhetetlen szakmai tudásával segítette a doktori munkámat.

Örökké hálás leszek *Dr. Vasas Andreának*, aki munkámat kifogyhatatlan energiával, kreativitással, lelkesedéssel és szeretettel irányította.

Köszönöm tajvani témavezetőmnek, *Prof. Fang-Rong Chang*nak, hogy intézetében dolgozhattam. Köszönöm továbbá, hogy rendkívüli meglátásaival jelentősen hozzájárult a munkámhoz.

Köszönöm *Dr. Jakab Gusztávnak* a növények begyűjtését és azonosítását; valamint *Dr. Kúsz Norbertnek* és *Csorba Attilának* az NMR és MS méréseket. Hálás vagyok *Prof. Kurtán Tibornak*, *Dr. Mándi Attilának* és *Szappanos Ádámnak* az abszolút konfiguráció meghatározásért. Őszinte köszönetem fejezem ki *Dr. Liktör-Busa Erikának* az antibakteriális, és *Prof. Tsong-Long Hwang*nak a gyulladáscsökkentő vizsgálatok elvégzéséért.

Köszönöm a Farmakognózi Intézet valamennyi munkatársának a munkám során nyújtott segítségét. Külön köszönöm *Dr. Rédei Dórának* a magyar nyelvű munkáim lektorálást. Hálás vagyok *Dr. Veres Katalinnak*, hogy önzetlen segítségével támogatta munkámat. Köszönettel tartozom *Dr. Csupor Dezsőnek*, hogy elősegítette a fitoterápiai ismereteim bővítését, továbbá köszönöm, hogy lehetőséget adott szakmai tudásom mindennapi életben történő hasznosítására. Köszönöm munkatársaim, *Dr. Roza Orsolya*, *Dr. Lajter Ildikó*, *Kiss Tivadar*, *Dr. Éles Orsolya* és *Dr. Ching-Ying Kuo* barátságát és támogatását, amellyel nemcsak a PhD tanulmányaim elkezdésére, de befejezésre is bátorítottak.

Hálásan köszönöm családomnak és barátaimnak azt a szeretetet, támogatást, bizalmat és megértést, amivel erőt adtak PhD munkámhoz.

#### AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK:

1. **Tóth B**; Liktör-Busa E; Kúsz N; Szappanos Á; Mándi A; Kurtán T; Urbán E; Hohmann J; Chang FR; Vasas A.  
Phenanthrenes from *Juncus inflexus* with antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*  
*Journal of Natural Products* 2016; **79**: 2814–2823. If: 3.662\*
2. **Tóth B**; Liktör-Busa E; Urbán E; Csorba A; Jakab G; Hohmann J; Vasas A.  
Antibacterial screening of Juncaceae species native to the Carpathian Basin against resistant strains and LC-MS investigation of phenanthrenes responsible for the effect  
*Fitoterapia* 2016; **115**: 69–73. If: 2.408\*
3. **Tóth B**; Chang FR; Hwang TL; Szappanos Á; Mándi A; Hunyadi A; Kurtán T; Jakab G; Hohmann J; Vasas A.  
Screening of *Luzula* species native to the Carpathian Basin for anti-inflammatory activity and bioactivity-guided isolation of compounds from *Luzula luzuloides* (Lam.) Dandy & Wilmott  
*Fitoterapia* 2017, **116**: 131–138. If: 2.408\*

#### EGYÉB KÖZLEMÉNYEK:

1. **Tóth B**; Bartho L; Vasas A; Sándor Z; Jedlinszki N; Pinke G; Hohmann J.  
Dual excitatory and smooth muscle-relaxing effect of *Sideritis montana* extract on guinea-pig ileum  
*Natural Product Communications* 2015; **10**: 487–490. If: 0.884

\*2015. évi számítás alapján

#### ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK:

1. **Tóth B**; Liktör-Busa E; Urban E; Jakab G; Hohmann J; Vasas A.  
Antibacterial activity of 19 species from the Juncaceae family, and bioactivity guided fractionation of the most active species *Juncus inflexus*  
63<sup>rd</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA2015)  
Budapest, 2015. augusztus 23-27.
2. **Tóth B**; Kúsz N; Liktör-Busa E; Csorba A; Urbán E; Hohmann J; Vasas A.  
A *Juncus inflexus* biológiailag aktív vegyületeinek izolálása és szerkezet-meghatározása  
MTA Alkaloid- és Flavonoidkémiai Munkabizottságának ülése  
Mátrafüred, 2016. április 14-15.

3. **Tóth B**; Kúsz N; Liktör-Busa E; Urbán E; Hunyadi A; Chang FR; Kurtán T; Hohmann J; Vasas A.  
Juncaceae fajok biológiailag aktív vegyületeinek izolálása és szerkezet-meghatározása  
Fiatal Gyógynövénykutatók Fóruma: A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság Gyógynövény Szakosztályának tudományos konferenciája  
Budakalász, 2016. június 24.
4. **Tóth B**; Kúsz N; Csorba A; Kurtán T; Hohmann J; Vasas A.  
Isolation and characterization of new phenanthrenes from *Juncus inflexus* and their chemotaxonomic significance  
9<sup>th</sup> Joint Natural Product Conference 2016 (Joint Meeting with ASP, AFERP, JSP, PSE and SIF) and 64<sup>th</sup> International Conference and Annual Meeting of GA  
Koppenhága, 2016. július 24-27.
5. Kuo CY; Schelz Z; **Tóth B**; Vasas A; Hohmann J; Zupkó I; Wang HC.  
Study the anticancer mechanism for compounds from *Juncus inflexus* root extract in cervical cancer cells  
9<sup>th</sup> Joint Natural Product Conference 2016 (Joint Meeting with ASP, AFERP, JSP, PSE and SIF) and 64<sup>th</sup> International Conference and Annual Meeting of GA  
Koppenhága, 2016. július 24-27.
6. Vasas A; **Tóth B**; Kúsz N; Hwang TL; Cheng YB; Chang FR; Wu YC; Hohmann J.  
Anti-inflammatory activity of *Luzula luzuloides* and isolation of its compounds  
9<sup>th</sup> Joint Natural Product Conference 2016 (Joint Meeting with ASP, AFERP, JSP, PSE and SIF) and 64<sup>th</sup> International Conference and Annual Meeting of GA  
Koppenhága, 2016. július 24-27.
7. **Tóth B**; Kuo CY.  
Fenantrének: ritka természetes vegyületek, ígéretes biológiai aktivitással  
XIII. Clauder Ottó Emlékverseny  
Budapest, 2016. október 20-21.



