

Salvia, Lavandula és *Morus* taxonok fitokémiai jellemzése terpén vegyületeik alapján

Doktori tézisek

Dr. Böszörményi Andrea

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Lemberkovics Éva egyetemi tanár
a kémiai tudomány kandidátusa

Hivatalos bírálók: Dr. Németh Éva DSc.
Dr. Hajdú Zsuzsanna PhD.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Török Tamás egyetemi tanár DSc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Máthé Imre egyetemi tanár DSc.
Dr. Sátory Éva egyetemi tanár DSc.

Budapest
2010

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az illóolajok, szterolok és triterpének analitikájában jelentős szerepet játszik a gázkromatográfia, amelyen belül szükség van további gyors, megbízható és pontos elválasztás-technikákra. A tömegspektrometriás detektálást komponensek azonosítására alkalmazzák, míg a terpénösszetétel százalékos meghatározására a lángionizációs detektálás alkalmasabb, mivel érzékenysége nagyobb, és az illóolajok esetében a területnormalizációs értékelés pontos eredményt ad. A szterolok és triterpének százalékos jellemzésére a területnormalizáció csak tájékoztató jellegű, mivel a komponensek kevésbé illékonyak, és a kivonat nem kerül teljes egészében detektálásra, kvantitatív jellemzésüket belső standard vegyülethez viszonyítva célszerű végezni.

Az illó komponensek a növényben jelenlevő eredeti arányának meghatározása nehéz feladat, mivel az extrakciós módszer jelentősen befolyásolhatja az összetételt: vízgőzdesztilláció során a magas hőmérséklet és a vizes közeg hatására egyes komponensek hidrolizálhatnak, izomerizálódhatnak. A növények illatát legjobban megközelítő illóolaj összetételt szilárdfázisú mikroextrakcióval (SPME) határozhatjuk meg. Utóbbi évtizedekben egyre inkább elterjedt módszer a környezetkímélő szuperkritikus fluid fázisú extrakció (SFE). A kivonás fluid állapotú indifferent gázok, többnyire CO₂ segítségével történik. A módszer elsősorban apoláris jellegű vegyületek kivonására alkalmas; előnye, hogy a fluid gáz nyomásának csökkentésével a kivonatból az oldószer nyom nélkül eltávolítható.

Az illóolaj tartalom és összetétel környezeti és genetikai tényezőktől egyaránt függ. Egyes esetekben a növénykémiailag analízisek mellett fontos lehet a molekuláris taxonómiai vizsgálat. A RAPD markerek tanulmányozása gyors, DNS szekvenálás nélküli eszköz a genotípusok molekuláris taxonómiai jellemzésére. A kémiai és genetikai profil alapján felállított rokonsági mintázat összehasonlítása a kémiai tulajdonságok genetikai meghatározottságára utal, ugyanakkor bizonyítja, a kémiai jellemzők alkalmasságát a genetikai rokonság jellemzésére.

Munkánkban olyan modellnövényekre esett a választás, amelyekben a farmakológiailag aktív vegyületek azonosítása és mennyiségi mérése fontos gyakorlati feladat. Az orvosi zsálya (*Salvia officinalis* L.) az egyik legfontosabb gyógynövény a *Lamiaceae* családban, drogjai és tinktúrája hivatalosak több gyógyszerkönyvben (pl. a 8. Magyar Gyógyszerkönyvben és a 6. Európai Gyógyszerkönyvben). Jelentős hatóanyaga a vérnyomáscsökkentő, antimikrobás, görcsoldó hatású illóolaja, melynek fő komponense a neurotoxikus tujon, így belsőleg csak fokozott körültekintéssel alkalmazható.

A valódi levendula (*Lavandula angustifolia* Mill., *L. officinalis* L., *L. vera* DC.) szintén a család kiemelkedő fontosságú gyógynövénye. Nyugtató, altató, anxiolitikus, antidepresszáns

hatását illóolajának köszönheti, melynek fő komponensei a linalool és a linalil-acetát. A valódi levendula illóolaja és virága hivatalos a 8. Magyar Gyógyszerkönyvben, és a 6. Európai Gyógyszerkönyvben; továbbá a kozmetikai iparban is gyakran alkalmazzák.

A fehér eperfa (*Morus alba* L., Moraceae) a távolkeleten tradicionálisan használt gyógynövény, levelének vizsgálata jelentős eredményeket hozott a diabetes terápiájában. Jelenleg hazánkban több eperfalevelet tartalmazó étrend-kiegészítő készítmény is forgalomban van. Szterol és triterpén tartalmának köszönhető gyulladáscsökkentő aktivitása a proteinkináz C enzim gátlásán alapul.

Kísérletes munkánk célja *Salvia*, *Lavandula* taxonok és a *Morus alba* terpén vegyületeinek tanulmányozása volt, gázkromatográfias metodikák alkalmazásával. Terveink közt szerepelt, az irodalomban leírt taxonok illóolaj összetételét összehasonlítani korábban nem vizsgált változataikkal, tanulmányozni az azonos fajhoz tartozó, de eltérő fenotípusú egyedek illóolaj összetételét, továbbá terveztük különböző földrészekről származó fajok kemotaxonómiai vizsgálatát is. A fehér és lila virágú, valamint 'tricolor', 'purpurascens' és 'Kew Gold' *Salvia officinalis*, a *S. judaica*, *S. africana-caerulea*, *S. mexicana*; továbbá a *Lavandula vera*, *L. vera* ssp. *pyrenaica*, *L. intermedia*, *L. stoechas* és *L. dentata* illóolajának elemzését terveztük. A *Salvia* és *Lavandula* illóolaj vizsgálat során kiemelt célkitűzésünk volt a komponensek azonosítása GC-MS módszerrel, a százalékos összetétel GC-FID meghatározása, továbbá a kivonási módszerek, mint vízgőzdesztilláció és szilárd fázisú mikroextrakció illóolaj összetételre gyakorolt hatásának tanulmányozása volt. Célunk volt továbbá néhány kiemelt taxon levélolajának virágzási stádiumok szerinti tanulmányozása, valamint a magas illóolaj tartalmú *Salvia africana-caerulea* in vitro szaporítása hazai honosítás céljából - szabadföldbe kiültetve életképes növények létrehozása - és azok illóolajának vizsgálata. Terveink közt szerepelt az illóolajösszetétel genetikai hátterének tanulmányozása RAPD markerek és az illóolaj százalékos összetétele alapján, majd a rokonság vizsgálat kiterjesztése további zsálya és levendula fajokra az illóolaj kvalitatív és kvantitatív összetételén alapuló Principal Component Analízissel.

A *Morus alba* levél és ágkéreg szterol és triterpén vizsgálatának célja az SFE kivonatok léptéknövelésének, és körülményeinek optimalizálása volt. Célunk volt a hexános és etanolos, valamint analitikai és félüzemi léptékű szuperkritikus széndioxiddal előállított, elszappanosítással tisztított kivonatainak vizsgálata; a különböző kivonási módszerekkel nyert hozamok, valamint a nyers kivonatok el nem szappanosítható anyag és β -szitoszterol tartalmának és összetételének összehasonlítása. A fitoszterol és triterpén komponensek minőségi vizsgálatát, származékképzés nélküli GC-MS módszerrel terveztük. Céljaink közt

szerepelt továbbá egy gázkromatográfiás módszer kidolgozása a β -szitoszterol tartalom mennyiségi meghatározására belső standard segítségével.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Növényanyag

A *Salvia officinalis* lila és fehér virágú változata, cv. *purpurascens*, cv. *tricolor*, cv. *Kew Gold*, és a *Salvia judaica* levelek (2007-2008), valamint a *Lavandula vera*, *Lavandula intermedia*, *Lavandula pyrenaica*, és a *Lavandula stoechas* ssp. *stoechas* virágok (2008-2009) a Pécsi Tudományegyetem Botanikus Kertjének Mediterráneumából gyűjtöttük be. A *L. vera-1* és a *L. intermedia* a sziklakertben, mészköves talajon, a többi levendula és zsálya növény löszös termőtalajon termett. A *Salvia mexicana* és a *Lavandula dentata* hajtásrendszert (2009) Los Angelesből (Kalifornia, USA), a *Salvia africana-caerulea* növények (2008) a Kirstenbosch National Botanical Garden (Dél-Afrikai Köztársaság) gyűjteményéből származnak. A *Salvia africana-caerulea* növényeket in vitro szaporítottuk: a dugványokat MS táptalajon (0,5% BAP és 2% cukor), majd földbe ültetve klímaszobában neveltük, végül szabadföldbe ültettük ki.

A *Morus alba* levelet és ágkérget (2005-2006) Budapesten (Dél-Buda, Gellért-hegy) és Solton (Kiskunság) gyűjtöttük.

2.2. Extrakciós és tisztítási módszerek

Illóolajok vízgőzdesztillációja:

Ph.Hg.VII. illóolaj kivonó készülék, 3 órás desztilláció, segédfázis (alacsony illóolajtartalom esetén): 30-50 °C fp. petroléter, tartalmi meghatározás: térfogat, gravimetriás.

Szilárd fázisú mikroextrakció (SPME):

GERSTEL MPS SPME készülék, 0,3g minta. A minta előkészítés: inkubátor (60 °C, 5,00 perc, rázatás: 250 rpm). A mintavétel: 65 μ m PDMS/DVB (fused silica, STABLE FLEX/SS) adszorbens szál (22,00 mm, 10,00 perc). Injektálás: 44,00 mm, 60s, split injektálás (0,02 perc, 50:1), kifűtés: 250,0 °C, 43,0 mm.

DNS extrakció:

DNS izoláció: friss zsályalevélből, DNeasy Plant Mini Kit. A DNS tartalom és az optimális hígítás ellenőrzése: 1% agaróz gélen elektroforézissel.

Oldószeres extrakció Soxhlet készülékben:

5g porított drog kivonása 100 ml n-hexán, ill. 96 V/V%-os etanol oldószerrel, elszíntelenedéséig. Tisztítás: elszappanosítás (Ph.Hg.VIII.), mérés: gravimetriás.

Szuperkritikus fluid fázisú extrakció (SFE):

- *Laboratóriumi (analitikai) szuperkritikus extrakció:* 5g drog, ISCO 2-10 kísérleti laboratóriumi szuperkritikus extraktor, fluid állapotú szén-dioxid, állandó hőmérséklet (40 °C), változó nyomás: 100, 150, 200, 300, 400 bar, 60 – 90 perc, CO₂ áramlási sebessége 0,280-0,300 ml/perc, tisztítás: elszappanosítás (Ph.Hg.VIII.).
- *Félüzemi szuperkritikus extrakció* (BME Vegyipari Műveletek Tanszékén kifejlesztett készülék): 1kg drog, hőmérséklet: 40 °C, CO₂ áramlási sebessége 7 kg/óra, nyomása 450 bar, kétlépcsős nyomáscsökkentés: 1. szeparátor: 40 bar (továbbiakban felhasznált kivonat), 2. szeparátor 20 bar, extrakciós idő: 510 perc, tisztítás: elszappanosítás (Ph.Hg.VIII.).

2.3. Analitikai módszerek

Vékonyrétegekromatográfia (fitoszterolok, triterpének elővizsgálata):

Réteg: Kieselgel 60 F254. Standard: β-szitoszterol 1 mg/ml hexános oldata. Kifejlesztő: hexán - etil-acetát 3:1, fronttávolság: 10 cm. Előhívás: 0,5%-os kénsavas cérium szulfát, értékelés: 100 °C 10 perc melegítés után látható fényben.

Gázkromatográfiás és tömegspektrometriás vizsgálatok

- *Az illóolaj- és triterpén-összetétel GC-MS vizsgálata:* Agilent 6890 N készülék, 5973N tömegszelektív detektor, Chrom Card Server Ver. 1.2. program, kolonna 30 m x 0,25 mm, állófázis HP-5MS, vivőgáz He, injektálás: splitless. Kolonna hőmérséklet: *illóolaj vizsgálat 1.:* 60°C 3 perc, 8°C/perc 60–230°C, 5 perc 230°C, *illóolaj vizsgálat 2.:* 60°C 3 perc, 8°C/perc 60-200°C, 200°C 2 perc, 10°C/perc 200-250°C, 250°C 15 perc, *triterpének vizsgálata:* 140°C 1perc, 10°C/perc 140–270°C, 20perc 270°C, 10°C/perc 270–300°C, 6perc 300°C. MS: ionizációs energia 70eV, tömeg tartomány 40-500m/z,. Csúcsok azonosítása: NIST spektrumtár, irodalmi adatok. Százalékos értékelés RSD% <7,25% 4 mérés alapján.
- *Illóolajösszetétel GC-FID vizsgálata:* Fisons 8000 gázkromatográf, kolonna: 30 m x 0,25 mm, Rt-β-DEXm vivőgáz: nitrogén, injektálás: 0,2 – 0,4μl illóolaj kloroformban (2μl/ml), splitless. Kolonna 8°C/perc 60 – 230°C, 5 perc 230 °C. Csúcsok azonosítása: retenciós idő, standard addíció, százalékos értékelés: területnormalizáció. 3 párhuzamos mérés, RSD< 4,5 %

- *Szterolok és triterpének GC-FID meghatározása:* Agilent 6890 N készülék, kolonna: 25 m x 0,2 mm, állófázis DB-5MS, vivőgáz: He, injektálás: splitless. Kolonna hőmérséklet: 120°C 1 perc, 10 °C/perc 120 - 300°C, 14 perc 300°C, 10°C/perc 300 – 310 °C, 10 perc 310°C. Komponensek azonosítása: retenciós adatok, standard addíció, százalékos értékelés: terület normalizáció, β -szitoszterol tartalom kvantitatív meghatározása: 5- α -kolesztán-3-on belső standarddal. Három párhuzamos mérés RSD%=1,94% .

Molekuláris taxonómiai vizsgálatok

RAPD (PCR) reakció: 62 dekamer primer: OPA-(1-20), OPB-(2-20), OPN-(4), OPO-(1-19). Hőmérsékleti program: 94 °C 2 perc, 94 °C 10s, 36 °C 30s, 72 °C, 35x ismétlés, 72 °C 2 perc
Gél elektroforézis: 1,5 %-os agaróz gél, 110 V, 55mA, 2óra, teszt: DNA Ladder+. Értékelés UV fényben.

2.4. Statisztikai módszerek

- *Klaszteranalízis RAPD fragmentumok alapján:* bináris adatmátrix, Jaccard index; *Illóolaj összetétel alapján:* folyamatos változók, Bray-Curtis koeficiens, UPGMA, dendrogram (SYN-TAX 5.0 program).
- *PCA vizsgálat illóolaj összetétel alapján:* kvalitatív elemzés (Jaccard index), százalékos eloszlás (Bray-Curtis koeficiens), Biplot analízissel a különbségekért felelős komponenseket ábrázoltuk.
- *Variancia analízis:* A szignifikancia meghatározása két adatcsoport között egy utas ANOVA módszerrel ($p < 0,05$), három párhuzamos mérés alapján.

3. ÚJ EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

3.1. *Salvia* taxonok vizsgálati eredményei

Összillóolajtartalom meghatározása

Fehér és lila virágú-, valamint '*tricolor*', '*purpurascens*' és '*Kew Gold*' *Salvia officinalis*, valamint 3 külső zsályafaj: *S. judaica*, *S. africana-caerulea* és *S. mexicana* vízgőzdesztillációja során megállapítottuk:

- A legmagasabb illóolajtartalmat a *Salvia africana-caerulea* és a *S. officinalis* cv. *Kew Gold* levelében mértük, ezeket a fehér virágú orvosi zsályalevél illóolajtartalma közelíti meg legjobban. A lila virágú *S. officinalis*, valamint *tricolor* és *purpurascens* változatai közepes illóolaj-tartalommal rendelkeznek, a *S. judaica* és *S. mexicana* csak nyomokban tartalmaz illóolajat.

Az illóolajösszetétel kvalitatív (GC-MS), és kvantitatív (GC-FID) vizsgálata

A zsálya illóolajokban 56 illó komponenszt azonosítottunk. Elsőként írtuk le a *S. officinalis* cv. *purpurascens*, *tricolor* és *Kew Gold*, valamint a *S. judaica* illóolaj összetételét.

- A *S. officinalis* taxonok levéldrogjai azonos illóolaj komponenseket tartalmaznak, különbség csak az arányukban van. A fehér virágú *Salvia officinalis* levélolajára a monoterpének magasabb aránya jellemző, fő illókomponense a toxikus α -tujon. A lila virágú, és a díszváltozatok olajában közel egyenlő arányban fordulnak elő mono- és szeszkviterpének: főként α -humulén, továbbá β -pinén, 1,8-cineol és a kámfor.
- A júdeai, afrikai és mexikói zsálya olajában a szeszkviterpének vannak túlsúlyban a monoterpénekkel szemben, legnagyobb különbség a mexikói zsályaoajra jellemző (86:2). A júdeai zsálya fő illókomponensei a β -kubebén, β -kariofillén és a ledol, az afrikai zsálya illóolajára a piperiton és a β -kopaén, a mexikói zsálya olajára a β -kariofillén, izoledén, β -kopaén és β -farnezén jellemző.
- Diterpén epimanoolt csak a *S. judaica* illóolajában azonosítottunk, minthogy a zsálya fajokra jellemző egyéb diterpének vízgőzdesztillációval nem nyerhetők ki.
- A *S. officinalis* díszváltozatok közül a *purpurascens* és *tricolor* változatokban is a szénhidrogének vannak túlsúlyban, főként α -humulén tartalmuknak köszönhetően. Az oxigenált terpének legmagasabb arányban a fehér virágú orvosi zsályában vannak jelen, ezek főként alkoholok és ketonok, de étereket és észtereket is tartalmaz. A lila virágú változatnak közel 50% az oxigén tartalmú mono- és szeszkviterpén tartalma,

míg a díszváltozatoknak, valamint a júdeai és afrikai zsályának 40% körüli, a mexikói zsályának csak 6%.

- Összehasonlítva a fehér virágú *S. officinalis* virág és levél illóolaj-összetételét, megállapítottuk, hogy a virágban a levélhez hasonlóan jelentős komponens az α -tujon, de magasabb a szeszkviterpének aránya; fontosabb komponensek a β -kariofillén, α -humulén, ledol, viridiflorol és az ar-turmeron. Az alacsonyabb tujontartalmú olaj kinyerése mégsem gazdaságos, mivel a virág illóolajtartalma kevesebb, mint fele a levélhez képest.
- Oxigenáltság tekintetében is tapasztalható különbség a levél- és a virág-olaj között, bár mindkét szervben az oxigén tartalmú terpének vannak többségben de, a virágban kisebb a különbség a két vegyületcsoport aránya között. Az alkoholok aránya a virágban, a ketonok aránya - az α -tujon tartalom miatt - a levélben magasabb.

***S. officinalis* díszváltozatok illóolaj-összetételének összehasonlítása különböző virágzási stádiumokban**

- Az illóolaj összetétel jelentősen változik a virágzás stádiumaiban: a monoterpének százalékos aránya, és ezen belül a neurotoxikus α -tujon tartalom egyedfejlődés alatt folyamatosan nő, legmagasabb virágzás után, szeptemberben. A szeszkviterpének aránya ennek megfelelően csökken, de a fő komponens α -humulén aránya virágzáskor a legmagasabb.
- A oxigén tartalmú terpének aránya virágzás előtt és alatt nem változik jelentősen, ősszel azonban nő: az alkoholok és éterek aránya nem mutat egyértelmű változást, a ketonok mennyisége virágzás után nő, míg az észterarány csökken.

A gázkromatográfiás vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a fehér virágú orvosi zsályalevél magas illóolaj tartalma magas neurotoxikus tujonaránnyal párosul, ezért biztonságos hatású illóolaj kinyerésére kevésbé alkalmas. Biztonságos illóolaj leggazdaságosabban a teljes virágzáskor gyűjtött 'Kew Gold' változat leveléből nyerhető.

In vitro *Salvia africana-caerulea* levél-kultúrák illóolaj vizsgálata

A *Salvia africana-caerulea* levél magas illóolaj tartalma mellett, illóolaj-összetétele jelentősen eltér a bizonyított hatású *S. officinalis* levelétől, ezért az illóolaj tradicionálisan tapasztalt hatásainak bizonyítására további kísérletek szükségesek. A *Salvia africana-caerulea* a Kirstenbosch National Botanical Garden (Dél-Afrikai Köztársaság) gyűjteményéből származott, ezért a jövőben esedékes vizsgálatokhoz, valamint hazai honosítás céljából elsőként szaporítottuk szövettenyészetben, szabad földbe kiültetve

életképes növényeket kaptunk. Összehasonlítottuk az eredeti gyűjtött (intakt) növény, a lombikban laboratóriumi körülmények között nevelt (in vitro), és a szabadföldbe kiültetett növények levelének illóolaj tartalmát és összetételét.

- Az intakt növény illóolaj produkcióját nem sikerült elérni az in vitro kultúráknál, a szabadföldbe ültetett növény is csak az eredeti illóolaj tartalom egyharmadát közelíti meg, ezért a termesztési körülmények további optimalizálása szükséges.
- Az illóolaj összetétel nem változik jelentősen. Minden mintában a szeszkviterpén szénhidrogének vannak legnagyobb arányban, a monoterpének aránya az in vitro kultúrák és a kiültetett növények olajában mintegy fele az intakt növényéhez képest.
- Az oxigenált terpének közül mindhárom mintában dominálnak a ketonok, ezen belül a piperiton. A szeszkviterpének közül a β -kariofillén és a γ -elemén magasabb aránya jellemző, a kiültetett növények illóolajában ezek a fő komponensek. A *S. africana-caerulea* szövettenyésztési körülményeinek optimalizálása, és fitoterápiás hatásának igazolása vizsgálataink jövőbeli tárgya.

Kivonási módszerek hatása az illó komponensek összetételére

Salvia taxonoknál elsőként hasonlítottuk össze a vízgőzdesztillációval kapott illóolaj, és az SPME kivonatok összetételét. Mivel a SPME kivonás vízmentes, és a hőmérséklet is alacsonyabb, a komponensek nem bomlanak, viszont az illékonyabb komponensek aránya megnő. A kivonási módszer illóolaj összetevők arányára gyakorolt hatásának vizsgálatakor megállapítottuk:

- Várakozásainknak megfelelően a kisebb molekulatömegű, illékonyabb monoterpének magasabb aránya az SPME kivonatokra jellemző, a szeszkviterpének a vízgőzdesztillátumban dominálnak.
- Oxigén tartalmú terpének minden esetben a vízgőzdesztillátumban található nagyobb arányban, legnagyobb különbség az alkoholok esetében tapasztalható. Éterek a SPME kivonatokban magasabb arányban vannak jelen, feltételezhetően a vízgőzdesztilláció során egy részük alkoholra bomlik.

Molekuláris és kemotaxonómiai vizsgálatok

A DNS alapú molekuláris markerek (RAPD) és az illóolaj ismert összetétele jól használhatók az illóolaj-összetétel genetikai meghatározottságának tanulmányozására. *Elsőként vizsgáltuk az említett zsálya taxonok genetikai és kémiai variabilitását.* Molekuláris és kemotaxonómiai vizsgálatainkkal a gázkromatográfia és a tömegspektrometria újabb célú alkalmazási lehetőségét kívántuk bemutatni. A genetikai

és illóolaj összetétel alapján számított hierarchikus klaszter analízis alapján megállapítottuk:

- A *S. officinalis* taxonok között a legközelebbi rokonság a 'purpurascens' és 'tricolor' változatok között mutatható ki.
- A RAPD fragmentumokon és az illóolaj összetételén alapuló klaszter analízis azonos eredményt ad, ez a kémiai profil és a genetikai készlet szoros kapcsolatára utal, eredményeink megerősítik, hogy a kémiai profil és a RAPD markerek egyaránt hatásosan alkalmazhatók a zsálya változatok közti rokonság vizsgálatára.

A zsályák rokonságvizsgálatát illóolaj összetételük alapján kiterjesztettük mindegyik általunk vizsgált taxonra. *A nagyobb számú taxon rokonsági kapcsolatainak ábrázolására elsőként végeztünk PCA vizsgálatot, melynek során vektorok segítségével koordináta rendszerben két dimenzióban ábráztuk a rokonsági kapcsolatokat:*

- A *Salvia officinalis* taxonok egy csoportot alkotnak, a többi taxon elkülönül, ezek közül a közelebbi rokonságot egymáshoz, és a *S. officinalis* taxonokhoz, a *S. mexicana* és a *S. africana-caerulea* mutatnak.
- A komponensek bináris jelenlétén alapuló vizsgálatban a *S. officinalis* taxonok közül a lila virágú különül el legjobban. A fehér virágú változat a 'purpurascens' változathoz áll legközelebb. A százalékos illóolaj összetétel alapján a lila virágú *S. officinalis* a díszváltozatok között foglal helyet, közelebbi rokonságot mutat a 'purpurascens' és 'tricolor' változatokhoz, mint a 'Kew Gold' taxon.

A rokonság vizsgálatát biplot analízissel kiegészítettük, ami a rokonság belső szerkezetéért felelős komponenseket is ábrázolta, és igazolta korábbi megállapításainkat.

- A júdeai zsálya elkülönüléséért leginkább a ledol és a viridiflorol felelős, az afrikai és a mexikói zsálya távolságát több komponens (β -kariofillén, izoledén, γ -elemén, terpinolén, piperiton és γ -kadinén) együttes jelenléte okozza.
- A *S. officinalis* változatokon belül a fehér virágú zsálya rokonsági távolságát egyértelműen az α -tujon, a lila virágú változat rokonsági távolságát az eukaliptol és kisebb mértékben a γ -muurolén okozza. A díszváltozatok különbözőségéért az α -humulén, kámfor és az α -tujon komponensek felelősek leginkább.

3.2. *Lavandula* taxonok vizsgálati eredményei

Összellóolajtartalom meghatározása

Négy féle *Lavandula vera*, valamint *L. vera* ssp. *pyrenaica*, *L.intermedia*, *L. stoechas* és *L. dentata* virág illóolaját vizsgáltuk.

- Az irodalmi adatoknak megfelelően a legmagasabb illóolajtartalma a *L. intermedia* virágának van, de a *L. vera* virágok illóolajtartalma is meghaladja a Ph.Hg.VIII. határértékét (min. 13ml/kg). A *L. stoechas* illóolajtartalma alacsonyabb az említettekhez képest, a *L. dentata* virága csak nyomokban tartalmaz illóolajat.

Az illóolajösszetétel kvalitatív (GC-MS), és kvantitatív (GC-FID) vizsgálata

- A levendula taxonok illóolajában 46 komponenst azonosítottunk.
- A *Lavandula vera* és *L. intermedia* virágok illóolajának fő komponense a linalool, ez alól kivételt képez az általunk leírt *Lavandula vera-3* taxon olaja, amelynek fő komponense a lavandulil-acetát. További fontosabb komponensek a linalil-acetát, a kámfor és terpinén-4-ol, és a *L. intermedia* esetében az eukaliptol. A linalool és a linalil-acetát aránya a levendulaolajok jellemző értéke. A linalool aránya 21 – 44,% között változik, a hibrid levendulaolajban a legmagasabb. A linalil-acetát aránya 10 – 14% között van, legmagasabb értéket a pireneusi levendula olajában éri el, tehát ez a taxon szolgáltatja a „legértékesebb” levendula olajat.
- A *Lavandula stoechas* illóolaj főkomponense a fenkon, és észtere a fenkil-acetát.
- Elsőként hasonlítottuk össze a *Lavandula dentata* virágának és levelének illóolaj tartalmát és összetételét. A virág érdekes módon csak nyomokban tartalmaz illóolajat, a levél illóolajtartalma magasabb. A levél és a virág illóolaj összetétele nem tér el jelentősen. Az illóolaj fő komponense az eukaliptol, százalékos értéke a levélben magasabb, emellett linalool is nagyobb mennyiségben tartalmaz. A virágolaj másik fő komponensét, a transz-pinokarveolt a levél alacsonyabb arányban tartalmazza. A levél jellemző komponense továbbá a β -pinén. Megállapíthattuk, hogy a *L. dentata* levél drogjából gazdaságosabban nyerhető illóolaj, mint virágából.
- A levendula virágolajokra az oxigén tartalmú monoterpének túlsúlya jellemző, legmagasabb monoterpén tartalma a pireneusi levendula, legnagyobb szeszkviterpén tartalma a *L. dentata* virág olajának van.
- Az oxigéntartalmú terpének aránya legmagasabb a *L. stoechas* olajában, míg a legnagyobb szénhidrogén arány a *L. vera-3* mintában mérhető. Az oxigéntartalmú komponensek főként alkoholok és észterek, kisebb arányban fordulnak elő éterek és

ketonok. Legmagasabb észterarányt a *L. vera-3,4* minta tartalmazza, az alkoholok - az irodalmi adatoknak megfelelően - a *L. intermedia* olajában dominálnak.

Kivonási módszerek hatása az illó komponensek összetételére

A levendula taxonok vízgőzdesztillált illóolajának, és a szilárd fázisú mikroextraktumának (SPME) összetételét elsőként hasonlítottuk össze.

- A mono- és szeszkviterpének molekulatömegén alapuló illékonyasága alapján az SPME kivonatokban magasabb monoterpén arányt vártunk, de a gyakorlat ezt nem igazolta.
- A szénhidrogének és az oxigén tartalmú terpének aránya viszont jelentősen különbözik, várakozásainknak megfelelően az illékonyabb szénhidrogének magasabb aránya az SPME kivonatokra jellemző.
- A levendula illóolaj alkalmas a vízgőzdesztilláció során történő észter hidrolízis tanulmányozására. Várakozásainknak megfelelően az SPME kivonatokban az észterek aránya magasabb, mint a desztillált illóolajokban, alkoholokban viszont az illóolajok gazdagabbak. Komponensek szintjén a linalool és a linalil-acetát aránya hasonló, ami egyértelműen a desztilláció során bekövetkezett hidrolízisre utal.

Kemotaxonómiai vizsgálatok

A levendula taxonok bináris és százalékos illóolaj-összetétele alapján elsőként végeztünk PCA vizsgálatot.

- A *L. vera* minták egy klasztert alkotnak: a pireneusi levendula elkülönül a többi mintától, a legközelebbi rokonság az *L. vera-1,2* minták között mutatható ki.
- A biplot analízis szerint a *L. stoechas* különbözőségéért első sorban a fenkon a felelős, kisebb mértékben a kámfor és a terpinen-4-ol, a *L. dentata* távolabbi rokonsága részben a transz-pinokarveol, másrészt az alacsony linalool és linalil-acetát tartalmának köszönhető. A hibrid levendula, a *L. vera-2*, és a pireneusi levendula különbözősége a linalool tartalmukra visszavezethető. Az *L. vera* illóolajok linalil-acetát tartalma nem tér el jelentősen, vektorához legközelebb az *L. vera-1* és a pireneusi levendula helyezkedik el. PCA vizsgálattal bebizonyítottuk, hogy az irodalomban gyakran külön fajként leírt pireneusi levendula a többi orvosi levendula taxon között helyezkedik el, tehát nem külön faj, hanem a *L. vera* alfaja.

3.3. *Morus alba* vizsgálati eredményei

A *Morus alba* levél és ágkéreg di- és triterpén komponenseinek vizsgálata kiegészíti a *Salvia* és *Lavandula* fajok mono és szeszkviterpén illó vegyületeinek vizsgálatát. Az eperfa terpenoid-vizsgálatának elsődleges célja az SFE kivonatok léptéknövelésének, és körülményeinek optimalizálása volt, melynek során *elsőként tanulmányoztuk a léptéknövelés hatásait a kivonás hozamára, a kivonatok összetételére és β -szitoszterol tartalmára.*

Különböző kivonási módszerek hozamának összehasonlítása

Összehasonlítva a különböző kivonási módszerek hozamát és a nyers kivonatok el nem szappanosítható anyag (tisztított kivonat) tartalmát megállapítottuk:

- Az etanolos kivonat hozama magasabb, mint a hexános kivonaté, de el nem szappanosítható részének mennyisége alacsonyabb, amit a kivonás magas hozama és alacsony szelektivitása indokol.
- Az analitikai szuperkritikus kivonás hozama rendkívül alacsony. Különböző nyomásértékeket és kivonási időt alkalmazva, várakozásainknak megfelelően, a 400 bar nyomáson 90 percen át végzett extrakciók hozama a legmagasabb. A félüzemi szuperkritikus extrakció hozama magasabb, de a hexános kivonás hozamának így is csak a felét éri el. A kivonatok el nem szappanosítható anyag tartalma nem mutat szignifikáns különbséget.
- A kéregből kiinduló kivonások minden esetben szignifikánsan magasabb hozamot eredményeznek, mint a levél kivonatok, de a kéregkivonatok el nem szappanosítható részének mennyisége alacsonyabb a levél kivonatokéhoz képest, ami a kéregdrog alacsonyabb apoláros (lipofil) anyag tartalmára utal.

Terpének azonosítása *Morus alba* kivonatokban

A fitoszterol és triterpén komponensek minőségi vizsgálatát vékonyrétegekromatográfiás elővizsgálat után, GC-MS módszerrel végeztük:

- A *Morus* levél elszappanosítással tisztított kivonataiban szterolokat: β -szitoszterolt és lanoszt-7-én-3-ont; triterpéneket: α -amirint és lupeolt; és egy nyílt láncú diterpént, a fitolt azonosítottuk, utóbbi a levél kivonatok fő komponense. *Lanoszt-7-en-3-on és a lupeol komponenseket elsőként írtunk le *Morus* levél és ágkéreg kivonatokban.*
- Az ágkéreg tisztított kivonataiban az említett komponenseken kívül β -amirint is kimutatható, a fő komponens az α -amirin, aránya eléri az 50%-ot.

A β -szitoszterol tartalom kvantitatív meghatározása

Új, származékképzés nélküli gázkromatográfiás módszert dolgoztunk ki az eperfa levél és kéreg β -szitoszterol tartalmának mennyiségi meghatározására, 5- α -kolesztán-3-on belső standarddal felvett kalibrációs egyenes alapján.

- Megállapítottuk, hogy a β -szitoszterol kivonására *Morus* levélből a félüzemi szuperkritikus kivonás a legalkalmasabb, melynek β -szitoszterol tartalma megelőzi a hexános kivonatét.
- Az analitikai szuperkritikus kivonatok közül a 200 bar nyomáson 90 perc alatt, és a 300 bar nyomáson 60 perc alatt előállított kivonat β -szitoszterol tartalma éri el legmagasabb értéket.
- A kéregdrog extrakciójára a hexános kivonás és a 400 bar nyomáson 60 perc alatt végzett kivonás a leghatékonyabb. A β -szitoszterol tartalom minden esetben szignifikánsan magasabb, mint a levélé, bizonyítva a Mori cortex jelentőségét a talán csekélyebb gazdasági szerepe ellenére is.
- Termésérés során vizsgálva a *Morus* levél β -szitoszterol tartalom alakulását, és a triterpén összetétel változását, elsőként megállapítottuk, hogy *a β -szitoszterol tartalom tavasszal a legmagasabb és termésérés során csökken; ugyanez tapasztalható az egyes komponensek százalékos arányára vonatkozóan is.*

4. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Folyóiratban megjelent publikációk

Az értekezés témájában:

- Böszörményi A, Héthelyi É, Farkas Á, Horváth Gy, Papp N, Lemberkovics É, Szőke É. (2009) Chemical and Genetic Relationships among Sage (*Salvia officinalis* L.) Cultivars and Judean Sage (*Salvia judaica* Boiss.). *J Agric Food Chem*, 57:4663-4667.
- Böszörményi A, Szarka Sz, Héthelyi É, Gyurján I, László M, Simándi B, Szőke É, Lemberkovics É. (2009) Some triterpenes of *Morus alba* Leaf and Stem Bark in Traditional and Supercritical Fluid Extracts. *Acta Chromatographica*, 21:659–669.
- Horváth Gy, Jámbor N, Végh A, Böszörményi A, Lemberkovics É, Héthelyi É, Kovács K, Kocsis B. (2010) Antimicrobial activity of essential oils: the possibilities of TLC–bioautography *Flavour Fragr J*, DOI 10.1002/ffj.1993

Az értekezés témájához közvetetten kapcsolódó publikációk:

- Böszörményi A, Lemberkovics É. (2005) Újabb gyógynövény vizsgálati módszerek az Európai Gyógyszerkönyvben. *Gyógyszerészet*, 5:275-285
- Lemberkovics É, Böszörményi A. (2004) Illóolaj-tartalmú drogok és illóolajok vizsgálata az 5. Európai Gyógyszerkönyvben. *Képzés egy életen át*, 6: 3-9
- Lemberkovics É, Kakasy AZ, Héthelyi BÉ, Simándi B, Böszörményi A, Balázs A, Szőke É. (2007) Gázkromatográfia alkalmazása illóolajok analízisére. *Dracocephalum* fajok illóolajjellemzői és az extrakciós mód illóolajösszetétel befolyásoló hatása. *Acta Pharm Hung*, 77:19-27.
- Móricz AM, Horváth Gy, Molnár P, Kocsis B, Böszörményi A, Lemberkovics É, Ott PG. Investigation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil in BioArena system. *J. Planar. Chromatogr.* 23 (2010) 6, DOI: 10.1556/JPC.23.2010.5.00

5. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Disszertációm nem jöhetett volna létre a munkám során kapott számtalan segítség nélkül.

Hálás köszönettel tartozom:

Prof. Dr. Szőke Éva, Dr. Blázovics Anna

Prof. Dr. Lemberkovics Éva

Dr. Horváth Györgyi, Dr. Farkas Ágnes, Dr. Papp Nóra, Csete Sándor

(PTE Farmakognózia Intézet; Növényrendszertani és Geobotanikai Tanszék)

Dr. Szarka Szabolcs, Héthelyi Ivánné

Prof. Dr. Gyurján István†, Dr. László Miklós (ELTE Növény szerkezettani Tanszék)

Dr. Simándi Béla (BME Kémiai és Környezeti Folyamarmérnöki tanszék)

Borosné Szabados Júlia Mathunyi Rudolfné

SE Farmakognózia Intézet minden munkatársa, Dr. Marczal Gabriella †

szüleim és férjem

Aesculap Alapítvány

GVOP 3.11.-2004-05-0397/3.0 pályázat