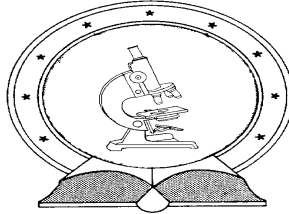


**DE TTK**



**1949**

***Plantago* fajok hatóanyag-összetételének és  
stabilitásának vizsgálata**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

**Gonda Sándor**

Témavezető: dr. Vasas Gábor

DEBRECENI EGYETEM  
Természettudományi Doktori Tanács  
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2011.

## Nyilatkozatok

*Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Biológia programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.*

*Debrecen, 2011. szeptember 2.*

*a jelölt aláírása*

*Tanúsítom, hogy Gonda Sándor doktorjelölt 2007 - 2011 között a fent megnevezett Doktori Iskola biológia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.*

*Debrecen, 2011. szeptember 2.*

*a témavezető aláírása*

***Plantago* fajok hatóanyag-összetételének és stabilitásának vizsgálata**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
a biológia tudományágban

Írta: Gonda Sándor okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál doktori iskolája  
( biológia doktori programja) keretében

Témavezető: Dr. Vasas Gábor

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Dr. Batta Gyula.....	.....
tagok:	Dr. Hajdú Zsuzsanna.....	.....
	Dr. Posta József.....	.....

A doktori szigorlat időpontja: 2011. július 11.

Az értekezés bírálói:

Dr. ....	.....
Dr. ....	.....
Dr. ....	.....

A bírálóbizottság:

elnök:	Dr. ....	.....
tagok:	Dr. ....	.....
	Dr. ....	.....
	Dr. ....	.....
	Dr. ....	.....

Az értekezés védésének időpontja: 200... ..

# Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	1
1.1. Célkitűzés.....	3
2. Irodalmi áttekintés.....	4
2.1. A vizsgált <i>Plantago</i> fajok botanikája.....	4
2.2. <i>Plantago</i> fajok leveleinek alkalmazása a gyógyászatban.....	6
2.3. A vizsgált <i>Plantago</i> fajok kémiaja és farmakológiája.....	6
2.3.1. Iridoid glikozidok.....	7
2.3.2. Kaffeoil-feniletanoid glikozidok.....	11
2.3.3. Flavonoidok.....	14
2.3.4. Egyéb vegyületek.....	16
2.4. Stabilitás-vizsgálatok általában és gyógynövény mátrixokon.....	16
2.5. Növényi szövettenyésztés hatóanyag-termelés céljából.....	19
2.5.1. A növényi szövettenyésztésben alkalmazott hormonok.....	20
2.5.2. <i>Plantago</i> fajokból készített szövetkultúrák.....	21
2.5.3. A nitrogén forrás hatása növényi szövettenyésztésekre.....	21
3. Eredmények és Megbeszélésük.....	23
3.1. Hazai <i>Plantago</i> fajok regionális populációinak hatóanyag-összehasonlító vizsgálata.....	23
3.1.1. Kvantitatív hatóanyag-összehasonlító vizsgálatok.....	23
3.1.2. <i>Plantago</i> fajok kvalitatív hatóanyag-mintázat összehasonlítása.....	26
3.2. A <i>P. lanceolata</i> levéldrog stabilitásvizsgálata különböző páratartalmú levegőben.....	30
3.2.1. A szín változása a növényi drogan.....	30
3.2.2. A növényi drogan előforduló fonalas gombák számának változása, azonosított fajok.....	34
3.2.3. Változások a bioaktív molekulák koncentrációjában.....	37
3.2.4. A fonalas gombák szerepe a hatóanyagok degradációjában.....	40
3.3. <i>P. lanceolata</i> kalluszok vizsgálata.....	42
3.3.1. <i>P. lanceolata</i> kalluszok kémiai karakterizálása.....	42
3.3.2. <i>P. lanceolata</i> kalluszok növekedésének és hatóanyag-termelésének változása $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ változtatásának hatására.....	43
3.3.3. <i>P. lanceolata</i> kalluszok hatóanyag-termelésének és növekedésének változása az összes N forrás változtatásának hatására.....	46
4. Anyag és módszer.....	49
4.1. Vegyszerek, általában használt eljárások.....	49
4.2. Növényi anyag.....	49
4.3. Kaffeoil feniletanoid észterek preparatív előállítás.....	50
4.4. Vékonyréteg kromatográfia, akteozid és plantamajozid mennyiségi meghatározása.....	51
4.5. Iridoidok meghatározása kapilláris elektroforézissel.....	51

4.6. Összes CPG meghatározása spektrofotometriásan.....	52
4.7. Antioxidáns kapacitás vizsgálata CUPRAC assay-vel.....	52
4.8. <i>P. lanceolata</i> levelek stabilitás-vizsgálata magas páratartalmú levegőben .....	52
4.9. Növényi drogminták színének meghatározása.....	53
4.10. Klorofill-típusú pigmentek kvantitatív meghatározása.....	53
4.11. Gomba-telepképző egységek kvantifikálása a növényi drogban.....	53
4.12. Fonális gomba-fajok izolálása <i>P. lanceolata</i> szárított levelekről.....	54
4.13. A <i>P. lanceolata</i> leveleket kolonizáló penészvonalak azonosítása.....	54
4.14. <i>P. lanceolata</i> metabolitok stabilitásának vizsgálata steril modell- oldatokban.....	55
4.15. Növényi szövettenyészetek indítása és általános tenyésztési paraméterei és kémiai vizsgálatuk.....	55
4.16. $\text{NH}_4^+$ / $\text{NO}_3^-$ arány és összes N forrás hatása <i>P. lanceolata</i> kalluszok növekedésére és hatóanyag-termelésére.....	56
4.17. Statisztikai vizsgálatok.....	58
5. Összefoglalás.....	59
6. Summary.....	64
7. Felhasznált irodalom.....	69
8. Köszönetnyilvánítás.....	82
9. Publikációs lista .....	83

## Többször használt rövidítések jegyzéke

<b>Rövidítés</b>	<b>Angol megfelelő</b>	<b>Magyar megfelelő</b>
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	2,4-dikloro-fenoxi-ecetsav
AAEAC	ascorbic acid equivalent antioxidant capacity	aszkorbinsav ekvivalens antioxidáns kapacitás
ACE	angiotensin converting enzyme	Angiotenzin konvertáló enzim
ACTE	Acteoside (= verbascoside)	akteozid (= verbaszkozid)
ANCOVA	Analysis of covariance	Kovariancia-analízis
ANOVA	Analysis of variance	Variancia-analízis
AUC	aucubin	aukubin
BAP	Benzyl-amino-purin	benzil-amino-purin
BSCPS	buffered sodium chloride peptone solution	pufferelt NaCl-pepton oldat
CAT	catalpol	katalpol
CE	capillary electrophoresis	kapilláris elektroforézis
CE-MEKC	capillary electrophoresis-micellar electrokinetic chromatography	kapilláris elektroforézis – micelláris elektrokinetikus kromatográfia
CFU	colony forming unit	telepképző egység
Chl	Chlorophyll	klorofill
CPG	caffeoyl phenylethanoid glycoside	feniletanoid glikozid kávésav- észter
CUPRAC	cupric reducing antioxidant capacity	réz (II) redukáló antioxidáns kapacitás
DAD	diode array detector	diódasoros detektor
DW	dry weight	száraz tömeg
G10H	geraniol-10-hydroxylase	Geraniol 10 hidroxiláz
HPLC	high pressure liquid chromatography	nagynyomású folyadékkromatográfia
IAA	indole-acetic acid	indol-ecetsav
IBA	indole-butyric acid	indol-vajsav
IG	iridoid glycoside	iridoid glikozid
ITS	Internal transcribed spacer	
LC/MS	liquid-chromatography / mass- spectrometry	Folyadékkromatográfia – tömegspektrometria
LDL	low density lipoprotein	
MALDI- TOF	matrix-assisted laser desorption and ionisation-time of flight	
MIC	minimal inhibitory concentration	legkisebb gátló koncentráció
MS	Murashige-Skoog medium	Murashige Skoog táptalaj
NMR	nuclear magnetic resonance	mágneses magrezonancia
NNA	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> / NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ratio	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> / NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> arány

PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
Pheo	pheophytin	feofitin
PMJ	plantamajoside	plantamajozid
PrOH	n-propanol	n-propanol
RH	relative humidity	relatív páratartalom
ROS	reactive oxygen species	reaktív oxigén-formák
RSD	relative standard deviation	relatív szórás
SDS	sodium dodecyl sulphate	nátrium lauril szulfát
TFA	Trifluoro-acetic acid	trifluor-ecetsav
ttkg		testtömeg-kilogramm
VRK	thin layer chromatography	vékonyréteg kromatográfia

## 1. Bevezetés

A gyógynövényekkel való gyógyítás vélhetően egyidős az emberiséggel, a világ lakosságának nagy százaléka ma is főleg növényi eredetű produktumokkal védekezik a betegségek ellen.

A gyógyításra használható növények vizsgálata, felhasználása nagy változáson ment keresztül az utóbbi évtizedekben. A szintetikus, modern gyógyszerek előretörése mellett, a gyógynövények felhasználásának is egyfajta reneszánszát élhetjük napjainkban. Ez nem csak a nagy fogyasztói igényekben és a termékek nagy választékán érhető tetten, hanem a világ kutatói is számos, új megközelítésben vizsgálták és vizsgálják a gyógynövényeket, és számos növényi termék helyet kapott a bizonyítékon alapuló orvoslásban is.

A gyógynövényekkel hagyományosan foglalkozó farmakognózia (görög, „gyógyszer” + „ismeret”) tudományága ma már messze nem csak a növények anatómiájának, etnobotanikájának és kémiájának vizsgálatából áll. A modern farmakognózia (gyógynövény-, és drogismeret) számos tudomány eredményeit felhasználva, fokozatosan fejlődik. A diszciplína egyre inkább hasznosítja nemcsak a modern műszeres analitika és preparatív elválasztástechnika, hanem a molekuláris biológia, farmakológia, mikrobiológia, biotechnológia eredményeit, metodikai megközelítéseit is. Mint rendkívül komplex rendszerek, a gyógynövények vizsgálata minden őket vizsgáló kutató számára kihívást jelentenek.

Ugyancsak sok változás ment végbe a farmakognóziái vizsgálat alanyaiban is. A magasabb rendű növények egyeduralma mára már nem egyértelmű: a vizsgált molekulákat most már egyre inkább „natural product”-ként említi a nemzetközi szakirodalom, amelynek oka az, hogy számos más taxonómiai csoportba tartozó élőlényt is intenzíven vizsgálnak farmakognóziái módszerekkel. Ilyenek pl. a tengeri élőlények, mikroorganizmusok, puhatestűek, extrém élőhelyeken élő különféle élőlények, hogy csak néhányat említsünk. Tovább nehezíti a tudományág pontos körülhatárolását az a tény, hogy a gyógynövények és az élelmiszerek határvonala nem tekinthető már olyan élesnek, mint korábban, ez különösen igaz az ún. funkcionális táplálékokra, amelyeket sok esetben a klasszikus farmakognóziára jellemző módszerekkel vizsgálnak.

A modern farmakognóziának kell választ adnia azokra a kérdésekre, melyek egy gyógynövény (vagy más természetes eredetű anyag) terméké, gyógyszeré alakításában felmerülhetnek. A terméké válásig vezető hosszú úton egyebek között olyan említendőek meg, mint a növény populációinak genetikai, kémiai vizsgálata, a növény betakarításának optimalizálása (ún. „post-harvest” vizsgálatok), a növényi nyersanyag optimális tárolását célzó vizsgálatok, továbbá a minőségbiztosításban elengedhetetlen műszeres analitikai



módszerfejlesztés és preparatív technikák, valamint a kész terméket értinő, hasonló vizsgálatok. A növényi extraktokkal, illetve azok izolált hatóanyagaival végzett farmakológiai és mindenekelőtt klinikai vizsgálatok nemkevésbé jelentősek. Fontos megjegyezni azt is, hogy alternatívaként, a mezőgazdasági körülmények között termesztett vagy vadon gyűjtött növények mellett egyre nagyobb teret kaphat a jövőben az *in vitro* tenyésztett növényi szövetkultúrákban vagy transzformált szervezetekben történő metabolit-termeltetés közvetlen gyógyászati vagy egyéb felhasználás céljából.

## 1.1. Célkitűzés

Munkánkban - fentiek szem előtt tartásával - a modern farmakognózia számos megközelítését együttesen alkalmazó vizsgálatot tűztünk ki célul választott modellünkön, az elterjedtebb hazai *Plantago* (útifű) fajokon. Munkánk három fő célkitűzése a következő:

**1., Gyakoribb hazai *Plantago* fajok regionális populációinak vizsgálata hatóanyagaik szempontjából.** A hivatalos gyógyászatban alkalmazott fajok mellett számos, hasonló faj fordul elő vadon termő populációkban, melyek hatóanyagainak vizsgálata szükséges a potenciális használhatóság megítélése miatt. Az eredmények nemcsak a népi gyógyászat által történő használat kapcsán lehetnek érdekesek, de minőségbiztosítási (rokon faj kimutatása) vonzatuk is lehet.

**2., Szárított *P. lanceolata* levelek stabilitásának vizsgálata.** A gyógynövények gyakori otthoni és ipari nyersanyagként való alkalmazása ellenére a stabilitásukkal kapcsolatos információink igen hiányosak, a komplex mátrixban megfigyelhető stabilitás sok metabolitra ismeretlen, az instabilitás okát is ritkán vizsgálják. Az itthon és Európában is elfogadott és használt szárított levél jó modellje lehet egy gyógynövényen végzett stabilitási vizsgálatnak. Célul tűztük ki tehát számos, minőséget meghatározó paraméter kvantitatív meghatározásának elvégzését egy magas páratartalmú levegőben történő, kedvezőtlen tárolás alatt, valamint a megfigyelt jelenségek magyarázatát célzó vizsgálatokat és a kapcsolódó analitikai módszerfejlesztést is.

**3., Hatóanyag-termelő *P. lanceolata* szövettenyészet előállítása és hatóanyag-termelésének optimalizálása.** Munkánkban célul tűztük ki egy hatóanyagot termelő *P. lanceolata* kalluszvonal szelekcióját, ezután pedig a plantamajozid és akteozid termelést optimalizálását *in vitro*. Mindenenkelőtt a N-forrás hatását vizsgáltuk meg. Az összes N-forrás és az  $\text{NH}_4^+$  /  $\text{NO}_3^-$  arány hatását a növekedésre és a hatóanyag-termelésre nem vizsgálták még a *Plantago* fajokban. Célul tűztük ki továbbá a kallusz által nagy mennyiségben termelt hatóanyagok azonosítását.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. A vizsgált *Plantago* fajok botanikája

A *Plantago* nemzetség fajai közül számos hazánkban is előfordul. Az általunk vizsgált fajok a *Plantago lanceolata*, *Plantago major*, *Plantago altissima*, *Plantago media* és a *Plantago maritima*.

*Plantago major* L. (Nagy útifű)

Lágyszárú, évelő növényfaj. Európában, Észak-, és Közép-Ázsiában őshonos, de gyepeken, útszélien világszerte elterjedt. Népiesen nagy útilapu névvel is illetik. Törzsszája 15-30 cm átmérőjű. Az egyes levelek nyelesek, oválisak, tipikusan 5-20 cm hosszúak, 4-9 cm szélesek (de akár 30 cm hosszúságot és 17 cm szélességet is elérhetnek), sima szélűek, csúcsban végződnek. 5-9 párhuzamos ér fut végig rajtuk. Májustól augusztusig virágzik. A virágzat vékony hengeres, a virágok aprók (1-2 mm szélesek), zöldes-barnás színűek sárgásbarna porzóval; négytagú, sárgás szegélyű pártával; 13-15 cm (néha akár 70 cm) hosszú felálló száron tipikusan 5-15 cm hosszú, keskeny füzérvirágzatot alkotnak. Szélbeporzású, virágpóra 1 µm-nél nagyobb átmérőjű, közepes mértékben allergizál, de jelentősége kicsi, mivel pollentermelése mérsékelt. Három alfaja ismeretes: *Plantago major subsp. major*; *Plantago major subsp. intermedia* (DC.) Arcang. ; *Plantago major subsp. Winteri* (Wirtg.) W. Ludw. Magyarországon a Fertő-tónál, alföldeken gyakori, mezofil és üde, bolygatott termőhelyeken, többnyire taposott gyomtársulásokban gyakori. Egyes nemesített változatai kerteket díszítenek: ilyen a lila levelű *Rubrifolia* és a tarka levelű *Variegata* változat. (Simon, 2004, pp.419-422)

*Plantago media* L. - Réti útifű

Közép-Európa bennszülött faja, de az Egyesült Államok északkeleti részén is meghonosodott. Nyirkos, füves területeken fordul elő, kaszálókon, legelőkön, réteken, 2000 m magasságig. A tőlevélrózsát alkotó levelek színe és fonáka finoman szőrözött, elliptikus, kerek vagy tojásdad; szára nyúlánk, karcsú 5-50 cm-es lehet. Május és szeptember között virágzik, kétivarú virágzata tömött, hengeres, a porzók halvány lilásak vagy fehérek. Szél vagy rovar beporzású, főleg méhek által. (Simon, 2004, pp.419-422)

*Plantago maritima* L. - Sziki útifű

Szubkozmpolitán előfordulású faj, a mérsékelt és sarki területeken. Európa bennszülött faja, ezen kívül előfordul még Észak-, Nyugat-Afrikában, Észak és Közép Ázsiában, Észak Amerika északi területein, és Dél Amerika

délebbi területein. Egyenyári, vaskos tövű és gyökerű évelő növény. A gyöktörzs elágazó, sok levelű, tömött tölevélrózsáját nyél nélküli levelek alkotják. Egyenes, szálas levelei 2-22 cm hosszúak és kevesebb mint 1 cm szélesek, vastagabb húsos levelek később ellaposodók. A levelek hegyes csúcsban végződnek, sima szélűek vagy távolabb fogazottak lehetnek, rajtuk 3-5 levélér található. Júniustól szeptemberig virágzik. A virágok kicsik, zöldes-barnák, barna porzókkal; tömött 0,5-10 cm hosszú füzérvirágzat található a 3-20 cm-es szár végén. Négy subspecies van: *Plantago maritima subsp. maritima*; *Plantago maritima subsp. borealis*; *Plantago maritima subsp. juncooides*; *Plantago maritima subsp. serpentina*. Számos elterjedési területe szigorúan tengerparti, ahol a homokos talajon nő; előfordul azonban alpesi területeken, és hegyi patakok mentén is. Magyarországon az Északi-középhegység (Szerencsi szigetehely szélein), Dunántúli-Középhegység szélein, Dunántúlon (Sopron, Őrség), Alföldön elég gyakori. Szikes és sós puszták növénye. (Simon, 2004, pp.419-422)

#### *Plantago lanceolata* L. - Lándzsás útifű

Lágyzárú növényfaj. Rétek, legelők, útszegélyek, taposott gyomtársulások világszerte elterjedt jellegzetes évelő, törzses növénye. A növény alacsony, kb. 10-25 cm magas, szára 5 barázdájú. Az apró, 1-3 cm hosszú, kb. 4 mm széles, fehér virágok tömött hengeres, hosszúkás tojásdad vagy gömbös füzében állnak, sorrendben alulról felfelé nyílnak ki. A sárgásfehér porzók hosszabbak a négytagú, barnás szegélyű pártánál, így feltűnően kiállnak a virágzat szintjétől. Szélbeporzású, májustól októberig virágzik. Virágpora közepes mértékben allergizál, jelentősége kicsi, pedig a pollenszemek száma portokonként 7700 is lehet. Pollendiagrammokban a mezőgazdaság jelzője lehet. Hosszúkás toktermésében rekeszekben ülő, csónak formájú magok találhatók. A tok 3-4 mm hosszú. A levelek 3-5 érűek, lándzsa alakúak, kopaszak vagy szőrösödők. A murvák kopaszak. Félszáraztól az üde gyepekig, sziklagyepektől a legelőkig közönséges. Májustól októberig virágzik. (Simon, 2004, pp.419-422)

#### *Plantago altissima* L. Magas útifű

A *Plantago lanceolata* L. - hoz igen hasonló növény. Magasabb kb. 30-60 cm, szára 6-9 barázdájú. A virágzat rövid (3-5 cm), hengeres. A tok 4-5 mm hosszú. A levelek 5-7 érűek, 2-4 cm szélesek. Magyarországon előfordulási helyei: Bükk, Gyöngyös, Budai-hg.; Dunántúlon (Őrség, Gőcsej, Somogy, Baranya, Tolna); Alföldön. Üde és nedves rétek növénye. (Simon, 2004, pp.419-422)

## 2.2. *Plantago* fajok leveleinek alkalmazása a gyógyászatban

A magyar gyógyszerkönyvben hivatalos növényi drogokként a *P. lanceolata* levele, a *Plantaginis lanceolatae folium* és a *P. afra* maghéja, a *Psyllii semen* fordulnak elő. Utóbbi fajnak nem a levelét, hanem a magháját alkalmazzák, metabolitmintázata és felhasználása gyökeresen más, mint a levéldrogé, részletes leírása számos fitoterápiás és farmakognóziás monográfiagyűjteményekből hozzáférhető, pl. (Awang, 2009, p.31).

A *Plantago lanceolata* levelét számos célból használják a gyógyászatban, alkalmazása igen elterjedt, Magyarországon gyógyszerkönyvi minőségben is stabilan hozzáférhető. Főleg felső légúti betegségek kezelésére alkalmazzák a torok és a garat gyulladással megbetegedései, láz stb. esetén (Tóth, 2005, p.43), (Awang, 2009, p.84). Általában 4-6 g száraz drogot vagy azzal ekvivalens extraktot adnak naponta. E felhasználási területeket tudományos bizottságok is jóvá hagyták, a jövőben minden bizonnyal részei lehetnek a bizonyítékon alapuló orvoslásnak. A humán klinikai adatok még hiányoznak, az egyes metabolitok kapcsán számos állatkísérletes adat áll rendelkezésre, mely alapján a növény felhasználása megalapozottnak látszik. Ezen kívül népi gyógyászati felhasználásai között szerepel savtúltengésben való alkalmazása, illetve a nyers préseléssel történő sebgyógyítás (Tóth, 2005, p.43).

A *Plantago* fajok extraktjainak számos farmakológiai hatását leírták. Mivel végtelen sok metabolit-metabolit interakció, szinergizmus létezhet *in vivo* és a sok metabolit keveréke egyszerre nagyon sok targeten hathat, az egyedi hatásokból nem mindig következik egyenesen a keverék hatása (Wink, 2008). Az egyedi vegyületeknél tapasztalt hatások többé-kevésbé magyarázzák a *P. lanceolata* és a *P. major* levelek főbb, elterjedt felhasználásait, mint a későbbiekben látni fogjuk. A *P. lanceolata* vizes-alkoholos extraktja görcsoldó (Fleer & Verspohl, 2007), a *P. major* számos, különböző csoportba tartozó vegyülete pedig immunmoduláns hatással bír (Chiang et al., 2003).

## 2.3. A vizsgált *Plantago* fajok kémiai és farmakológiai

A *Plantago* nemzetség kémiaiailag jól jellemzett genus. A legfőbb, farmakológiaiailag aktív tekintett vegyületcsaládok a kaffeoil feniletanoid glikozidok (CPG), az iridoid glikozidok (IG), a flavonoidok és a poliszaharidok (Tóth, 2005, p.43), (Samuelsen, 2000).

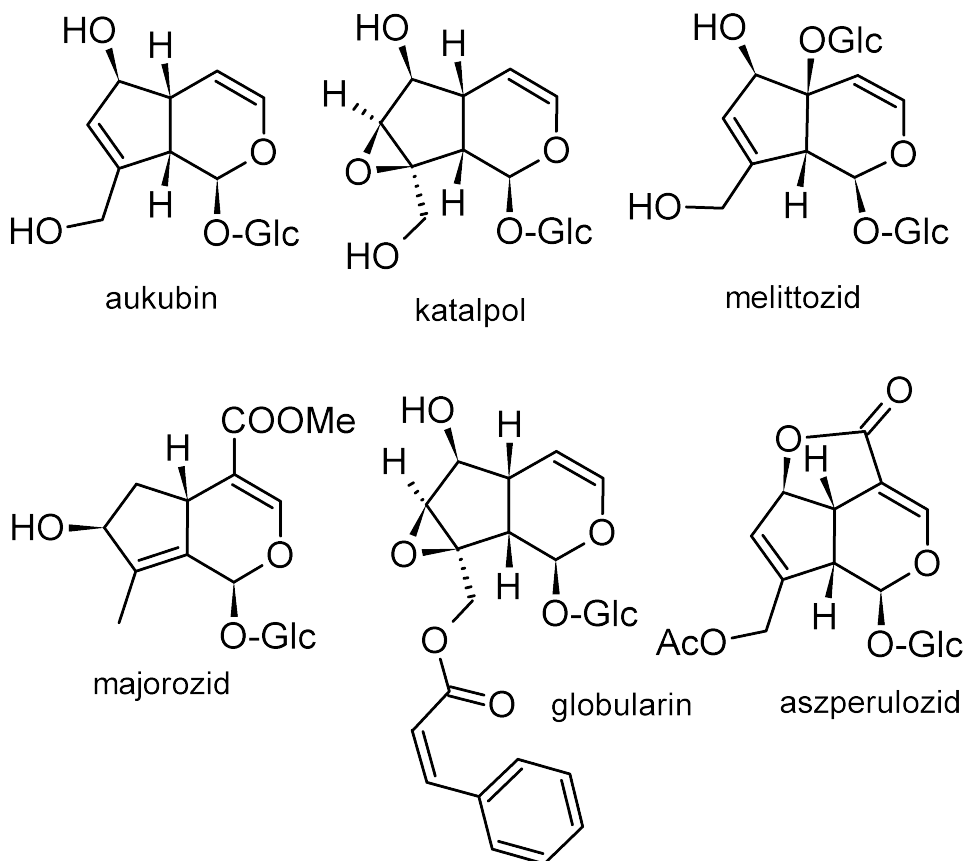
### 2.3.1. Iridoid glikozidok

Az iridoid glikozidok biogenetikailag a mevalonát vagy metileritriol útvonalon keletkező terpenoidok közé sorolhatóak, azon belül glikozilált, oxidált monoterpének. Keletkezésük kiinduló lépése a geraniol-10-hidroziláz (G10H) által történő geraniol hidroxiláció. A G10H enzim (és így az iridoidok) taxonómiaailag jól elkülönült növényekben fordul elő (Jensen, 1992), (Oudin et al., 2007). A *Plantago* fajokon kívül számos más *Plantaginaceae*, *Scrophulariaceae*, *Apocynaceae* és *Lamiaceae* stb. fajban működik az iridoid bioszintetikus útvonal (Tóth, 2005, p.116). A többek között a *Plantago* genusban is előforduló IG vegyületek különlegessége, hogy gyűrűs acetálok: az egyik oxigén heteroatomként van jelen az IG-k hattagú gyűrűjében, a másik glikozidikus kötésben, általában glükózzal.

A *Plantago* fajokban a főbb iridoid glikozidok a következők: aukubin (AUC), katalpol (CAT) és származékai (1. ábra), melittozid és származékai valamint aszperulozid és származékai (1. táblázat). (Ronsted et al., 2003), (Ronsted et al., 2000). A genus ITS (internal transcribed region) DNS alapján készített, feltételezett filogenetikai származását jól követi a *Plantago* fajokra készített IG és CPG összevetésből származó kemotaxonómiai mintázat is (Ronsted et al., 2002), (Ronsted et al., 2003).

1. táblázat. A jelen tanulmányban is vizsgált *Plantago* fajokból idáig leírt fontosabb iridoid glikozidok. Forrás: (Ronsted et al., 2003).

Faj	Iridoid glikozid
<i>P. maritima</i>	arboreszkoidsav, aukubin, melittozid, rehmanniozid D
<i>P. major</i>	aukubin, melampirozid (10-benzoil-aukubin), melittozid, genipozidsav, gardozid, majorozid, 10-OH-majorozid, 10-acetoxi-majorozid, plantarenalozid, ixorozid, aszperulozid
<i>P. media</i>	aukubin, monomelittozid, melittozid, 10-acetil-monomelittozid
<i>P. lanceolata</i>	genipozidsav, dezacetil-aszperulozidsav, aszperulozid, aukubin, katalpol, globularin
<i>P. altissima</i>	genipozidsav, epiloganinsav, hookeriozid, dezacetil-hookeriozid, dezacetil-aszperulozidsav, aszperulozid, aukubin, katalpol, globularin,



1. ábra. A vizsgált *Plantago* fajok főbb iridoid glikozidjai. Glc,  $\beta$ -D-glükózil. (Ronsted et al., 2003) nyomán.

A *Plantago* fajok iridoid-tartalmáról vannak információk, de a végzett munka nagy része inkább preparatív jellegű. Néhány tanulmány szolgáltat kvantitatív adatokat *Plantago* fajok IG tartalmáról. A *P. lanceolata* aukubin és katalpol-tartalmát határozta meg különböző nemesített változatokban és vadon termő populációkban (Al-Mamun et al., 2008), aukubinra 0,65-4,18% közötti értékeket, katalpolra 0-0,12% közötti koncentrációkat talált. A (Jurisic et al., 2004) által végzett vizsgálatokban a *P. altissima* AUC és CAT tartalma rendre 0,09 és 0,13 %-nak adódott, a *P. maritima* 0,03 % AUC-t tartalmazott, CAT-ot nem sikerült kimutatni belőle. *P. lanceolata* fajokból 0,12 és 0,16 % (AUC és CAT-ot) találtak. (Beara, 2010) munkájában számos fajt megvizsgáltak, de csak AUC tartalomra. A talált értékek 0-6,2% száraz tömegre vetített IG tartalmat mutattak.

Látható, hogy nagy variabilitás van fajon belül is a mérések között, amely részben metodikai eltérésekkel magyarázható (HPLC vs. CE, eltérő extraháló oldószerek), részben pedig azzal, hogy minden bizonnyal eltérő környezeti tényezők között nőtt, más genetikai háttérrel rendelkező növényeket vizsgáltak a szerzők.

A *Plantago* extraktok hatásossága szempontjából az aukubin és katalpol, valamint az iridoidok általában, aktív vegyületeknek tekinthetők. E vegyületek jelentős szerepet töltenek be a növény kémiai védelmi rendszerében, azon belül is a rovarok elleni védekezésben (Marak et al., 2002), (Biere et al., 2004). A növény különböző kompartmentekben tárolja az IG-eket és az őket aktiváló enzimet, a béta-glikozidázt. A rovarrágás hatására az enzim egy térbe kerülve szubsztrátjával lehasítja a glükózt az IG-ről, így az iridoid aglikon formában, azaz instabil hemiacetál formában lesz jelen. Ez dialdehiddé átrendeződve protein-keresztalkotóként működik (Lys oldalláncokon), a környezetében lévő fehérjéket tönkreteszi (Konno et al., 1999). Ennek a patogén mikroorganizmusok elleni védelem szempontjából is lehet jelentősége. Az iridoidok savakkal szemben is instabilnak tekinthetők, a nem-enzimatikus glikozid-bomlás ugyancsak az aglikon spontán degradációjával jár (Bianco et al., 2003). A felhasznált, szárított levelekben enzimaktivitás nem várható (főleg a gyakori forrázatként való kivonás után). Ennek ellenére az említett iridoid glikozidok más jellegű farmakológiai hatásait is megemlíti az irodalom, mint azt a későbbiekben látni fogjuk.

A fent említett protein keresztalkotás specifikus növényi béta-glikozidáz hiányában is létrejöhet, akár emlős vérplazmában is, a felszívódást követően (Kim et al., 2000). Ilyen spontán, vagy nem-növényi enzim által okozott hidrolízis miatt találhatták az aukubint aktívnak néhány baktérium-törzs ellen: Gram (+) baktériumok, pl.: *Staphylococcus epidermidis* (minimális inhibitorikus koncentráció, MIC: 64 µg/ml), *S. aureus* (MIC: 32 µg/ml), *Bacillus subtilis* (MIC: 128 µg/ml), Gram (-) baktériumok, pl. *Proteus vulgaris* (MIC: 64 µg/ml), *Enterobacter aerogenes* (MIC: 32 µg/ml), *Klebsiella pneumoniae* (MIC: 8 µg/ml), *Proteus mirabilis* (MIC: 64 µg/ml), *Citrobacter diversus* (MIC: 128 µg/ml) (Senatore et al., 2007). Ezen koncentrációk a humán gyógyászatban alkalmazott antibiotikumokhoz képest rendkívül magasak és önmagában nem elegendők antibakteriális terápiára. Általában 2 µg/ml MIC fölött rezisztensnek tekintik a patogén törzseket pl. penicillinek esetében (Jacobs et al., 1998). Az említett tanulmányban pozitív kontrollként alkalmazott Na-cefotaxime kevés kivételtől eltekintve 2 µg/ml alatti MIC értéket mutatott ugyanazon vizsgálatban (Senatore et al., 2007).



Az aukubinnak ezen kívül számos, érdekesebb hatását is leírták. Állatkísérletes diabetes modellen aukubin adagolásával a pancreas hisztológiai változásait sikerült részlegesen visszafordítani. Az aukubin adagolása meggátolta a lipid-peroxidációt és újra megnövelte az antioxidáns enzimek szintjét a májban, valamint csökkent az inzulin-immunoreaktivitás is (Jin et al., 2008). A vegyület diabetesben való alkalmazhatósága további vizsgálatokat igényel.

Az aukubin (és tisztított aglikonja) gyulladáscsökkentő hatással is rendelkezik, e hatást RAW 264.7 sejtvonalon igazolták. A vegyület a tumor necrosis factor termelődését csökkenti (Park & Chang, 2004).

Az aukubin 0,1%-os oldata gyorsítja a sebek gyógyulását a mátrix-képződés és a re-epitelizáció gyorsításával, emellett a gyulladásos sejtek számát is csökkenti. Ezt a hatást állatkísérletes, *in vivo* modellen demonstrálták (Shim et al., 2007).

Az aukubinnak neuroprotektív hatását is leírták. Állatkísérletes modelleken, diabetes-es egerek hippocampusának pusztulását sikerült meggátolni aukubin adagolásával (intraperitonealisan), mely gátlást részben viselkedés alapú tesztekkel, részben szövettani és hisztokémiai vizsgálatokkal igazolták. A vegyület szignifikáns neuroprotektív hatással rendelkezik, a patkányokban antioxidáns enzimek szintjének növekedését és a nitrogén-oxid szintetáz szint csökkenését, valamint az apoptosis gátlását okozta a hippocampusban (Xue et al., 2009), (Xue et al., 2008).

Az aukubin peroralis biohasznosíthatósága (patkányon) igen alacsony, mindössze 19,3%. Ennek legfőbb oka az, hogy a gyomorban a sósav hatására hidrolizál, valamint eléggé poláros vegyület, ami a spontán felszívódását megnehezíti a gasztrointesztinális traktusból (Suh et al., 1991). Ez limitálja esetleges közvetlen gyógyászati felhasználását, de analógok vagy származékok formájában értékes vegyület lehet a későbbiekben.

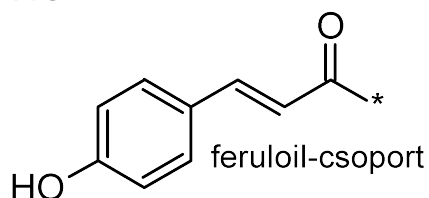
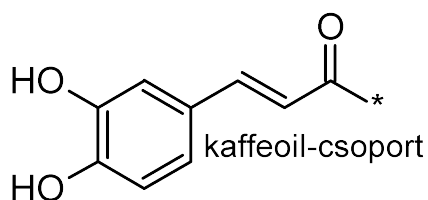
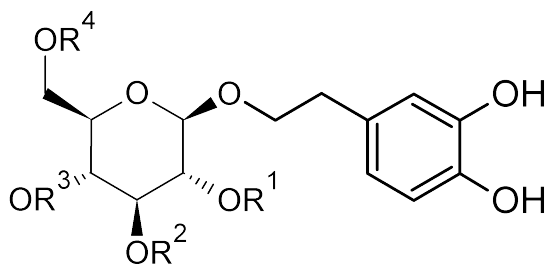
A katalpol speciális hatásai között neuroprotektív hatása szerepel. *In vitro* a vegyület csökkentette az 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP+) által kiváltott neuronpusztulást, megakadályozva a lipid-peroxidációt, megnövelve az antioxidáns enzimek (glutathion peroxidáz, szuperoxid diszmutáz) aktivitását (Tian et al., 2007). A vegyület használhatóságának megítéléséhez további vizsgálatok kellenek.

### 2.3.2. Kaffeoil-feniletanoid glikozidok

A *Plantago* fajokban előforduló kaffeoil-feniletanoid glikozidok (CPG-k) aglikonjainak bioszintézise a fenil-alanin-ammónia liáz által mediált reakcióval induló ún. sikimisav-útvonalon megy végbe. Mindkét aglikon (a kávésav típusú aglikonok, a C<sub>6</sub>C<sub>3</sub> alegységek és a feniletanoid típusú C<sub>6</sub>C<sub>2</sub> alegységek is) ezen útvonalon keletkeznek, melyeket egyéb, jelenleg ismeretlen enzimek kapcsolnak össze az akteoziddá és hasonló vegyületekké (Saimaru & Orihara, 2010) (2. ábra, 2. táblázat).

Az akteozidot a növényvilág taxonómiaiilag jól körülhatárolható fajai szintetizálják: számos *Lamiaceae* és *Plantaginaceae*, *Scrophulariaceae* növény szintetizálja az akteozidot vagy közeli kémiai rokonait (Jensen, 1992), de prekuzorként más növénycsaládokban is megjelenhet, így pl. az *Asteraceae*-ben (Kurkin, 2003).

A CPG-k a *Plantago* fajokban általában néhány % koncentrációban fordulnak elő. A nemesített és vad *P. lanceolata* populációk akteozid-tartalmát összehasonlító vizsgálatban az akteozid-tartalom 0,32-1,8 % között változik (Al-Mamun et al., 2008). *P. maritima*-ban leírt jelenség, hogy az ACTE tartalom nagy CO<sub>2</sub> koncentráció mellett akár 2,7%-ig növekedhet (Davey et al., 2004). Az összes polifenol-tartalmat 5-10% közötti értékben szokták megadni (Folin assay), 4,55%-ot írtak le *P. altissima*-ra és 7,32%-ot *P. maritima*-ra (Grubestic et al., 2005).



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
lavandulifoliozid	H	arabino(1-2)-glükózil	kaffeoil	H
plantamajozid	H	glükózil	kaffeoil	H
akteozid	H	ramnozil	kaffeoil	H
leukoszeptozid A	H	ramnozil	feruloil	H
martinozid	Me	ramnozil	feruloil	H
Dezramnozil-izoakteozid	H	H	H	kaffeoil
plantainozid D	H	glükózil	H	kaffeoil
Dezramnozil-akteozid	H	H	kaffeoil	H
echinakozid	H	ramnozil	kaffeoil	glükózil
izoakteozid*	H	ramnozil	H	kaffeoil

2. ábra. A vizsgált *Plantago* fajokból idáig leírt főbb kaffeoil-feniletanoid glikozidok (CPG-k) szerkezeti képelete. \*: az izoakteozid több vegyület neve egyben, itt a *Plantago* fajokból izolálható variánst tüntettük fel. Források: (Ronsted et al., 2003), (Budzianowska et al., 2004), (Davey et al., 2004), (Fleer & Verspohl, 2007).

2. táblázat. A vizsgált *Plantago* fajok leveleiből idáig leírt főbb kaffeoil-feniletanoid észterek (CPG-k).

Faj	CPG	Forrás
<i>P. maritima</i>	akteozid, plantamajozid, echinakozid	(Ronsted et al., 2003), (Davey et al., 2004)
<i>P. major</i>	plantamajozid, akteozid, izoplantamajozid	(Ronsted et al., 2003),
<i>P. media</i>	plantamajozid	(Ronsted et al., 2003)
<i>P. lanceolata</i>	akteozid, plantamajozid, $\beta$ -hidroxi- akteozid	(Ronsted et al., 2003), (Fleer & Verspohl, 2007)
<i>P. altissima</i>	akteozid	(Ronsted et al., 2003)

A *Plantago* fajokban előforduló CPG-k - pl. az akteozid - szerkezetükből adódóan igen jó antioxidánsok (Georgiev et al., 2011). Mindkét aglikon (a hidroxitirozol és a kávésav) tartalmaz orto-dihidroxi (catechol) szerkezeti elemet, mely egyrészt alkalmas szabad fémionok (pl.  $Fe^{2+}$ ) megkötésére és így a Fenton-reakció gátlására, másrészt könnyen oxidálható relatíve stabilis kinoidális származékokká. A kávésavak nagy antioxidáns hatását a fenil-gyűrűhöz csatlakozó  $-CH=CH-COOH$  csoport is növeli, az ariloxi-gyök stabilizálásával (Apak et al., 2007).

Így e vegyületek – elméletileg - hatékonyak lehetnek nagy szabadgyök (ROS, reactive oxygen species) szintek által mediált betegségek kezelésében, vagy prevenciójában, pl. a krónikus gyulladással járó kórképekben.

Az akteozid gyulladáscsökkentő hatását *in vivo* igazolták. Állatkísérletes bélgyulladás modellen pl. napi 120-600  $\mu g$  akteozid / patkány adagban (intraperitonealisan) javított az indukált betegség hisztológiai paraméterein. Kimutatták az interferon-gamma szekréció down-regulációját és az „oxidative burst” gátlását is (Hausmann et al., 2007). További állatkísérletekből is ismert a *Plantago lanceolata* CPG-jeinek gyulladáscsökkentő hatása (Murai et al., 1995).

Különlegesebbnek mondhatóak az akteozid kardiovaszkuláris szervrendszerre kimutatott hatásai. *In vitro* megvédi az endothel sejteket az oxidált LDL okozta káros elváltozásoktól. Az LDL oxidációját is képes gátolni,

Cu<sup>2+</sup>-el és más ágensekkel kiváltott LDL oxidációval szemben (Martin-Nizard et al., 2003). Mieloperoxidáz / nitrit rendszerben az akteozid képes az LDL oxidáció meggátlására, míg a rezveratrol nem (Kostyuk et al., 2011).

E szervrendszerhez köthető az angiotenzin konvertáló enzim gátló hatása, ezen enzim számos vérnyomáscsökkentő gyógyszer támadáspontja. A *Plantago* CPG-k (akteozid és plantamajozid, valamint mások is) viszonylag nagy koncentrációban (2,1-2,7 mM) gátolják az ACE enzimet *in vitro* (Geng et al., 2010).

Az akteozid kapcsán sok egyéb hatást is leírtak az irodalomban. Többek között ismert H<sup>+</sup> K<sup>+</sup>-ATPáz inhibitor hatása (Singh et al., 2010), csökkenti a mechanikus fájdalom-túlérzékenyéget állatkísérletes modellen (Isacchi et al., 2011). Az akteozid hatásainak teljesebb áttekintése a nemrégiben megjelent (He et al., 2011)-ban olvasható.

A CPG vegyületek az emlősök által valószínűleg jól tolerálhatóak, konkrét toxikológiai adatok a plantamajozidra vannak, patkány modellen. A plantamajozid koncentrátumát (kb. 80% plantamajozid) 90 napig adagolták patkányoknak peroralisan 2000 mg/ttkg adagban. A vegyület nem okozott elváltozásokat az alapvető klinikai paraméterekben (hematológiai paraméterek, szérumbiokémiai értékek, étel és vízfogyasztás, testsúly) (Park et al., 2007).

A plantamajozidnak kimutatták *in vitro* AGE („advanced glycation end-product”) formációt gátló hatását, e termékek az öregedésben és a diabetes progressziójában játszanak szerepet. Az AGE keletkezés standard gátlószerével, az aminoguanidinnal összevethető hatáserősséget tapasztaltak (Choi et al., 2008).

### 2.3.3. Flavonoidok

Mint a legtöbb szárazföldi növényben, a *Plantago* fajokban is találunk flavonoidokat. A főbb molekulákat a következőkben foglaljuk össze (3. ábra, 3. táblázat).

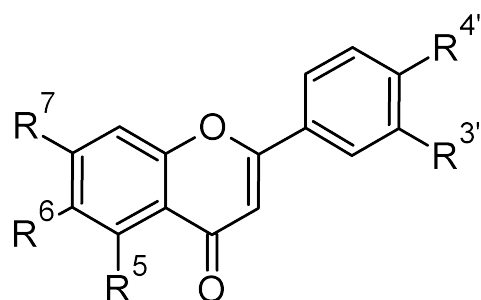
### 3. táblázat.

A vizsgált *Plantago* fajokból idáig leírt jelentősebb flavonoidok, flavonoid glikozidok.

Faj	Flavonoid	Forrás
<i>P. maritima</i>	luteolin-7-O-glükozid; apigenin- 7-O-glükozid, luteolin	(Beara et al., 2009)
<i>P. major</i>	luteolin-7-O-glükozid; apigenin- 7-O-glükozid, rutin, baikalein, baikalin (baikalein-7-O-glükuronid), szkutellarein, cinarozid, luteolin-7-diglükozid, 6-oxiluteolin, hiszpidulin, hiszpidulin-7-O-glükuronid, 6-oxiluteolin-7-O-glikozid, plantaginin (szkutellarein-7-O-glükozid), kvercetin	(Beara et al., 2009), (Оленников et al., 2007), (Beara, 2010), (Kawashty et al., 1994)
<i>P. media</i>	apigenin-7-O-glükozid, rutin	(Beara et al., 2009)
<i>P. lanceolata</i>	luteolin-5,7-O-diglükuronid, Luteolin-7-O-glükuronid, luteolin, luteolin-7-O-glükozid	(Fleer & Verspohl, 2007), (Beara, 2010), (Kawashty et al., 1994)
<i>P. altissima</i>	luteolin-7-O-glükozid; apigenin- 7-O-glükozid, luteolin	(Beara, 2010)

A *Plantago* genusban flavonoidokat kvantitatíve vizsgáló tanulmány (Beara et al., 2009) munkája. A szerzők több *Plantago* faj (többek között a *P. major*, *P. media* és a *P. maritima*) flavonoid-tartalmát vizsgálták (össz-flavonoid spektrofotometriás assay-vel és LC/MS-sel) és többféle antioxidáns-kapacitás vizsgálatot is végeztek. Konklúzióként azt vonták le, hogy a flavonoid tartalom jól korrelál az antioxidáns-kapacitás értékekkel. A luteolin-7-O-glükozidot találták fő flavonoidnak *P. major*-ban ( $213 \pm 5 \mu\text{g/g}$ ), míg a luteolint a *P. maritima*-ban ( $213 \pm 5 \mu\text{g/g}$ ). A tanulmány nem tesz említést CPG-kről.

Egy másik, szintén össz-flavonoid assay-t alkalmazó tanulmány is viszonylag alacsony, maximum 0,13% száraz tömegre vetített flavonoid-tartalmat talált a levelekben (*P. maritima*) (Grubestic et al., 2007), míg más fajokban, így pl. a *P. altissima*-ban az összes flavonoid mennyisége mindössze 0,09%-nak adódott.



	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	R <sup>7</sup>	R <sup>3'</sup>	R <sup>4'</sup>
baikalein	OH	OH	OH	H	H
baikalin	OH	OH	O-glükuronil	H	H
szkutellarein	OH	OH	OH	H	OH
plantaginin	OH	OH	O-glükozil	H	OH
hiszpidulin	OH	OMe	OH	H	OH
luteolin	OH	H	OH	OH	OH
cinarozid	OH	H	O-glükozil	OH	OH
6-oxiluteolin	OH	OH	OH	OH	OH
rutin	OH	H	O-rutinozil	H	OH

3.ábra. Az e tanulmányban is vizsgált *Plantago* fajokból idáig leírt fontosabb flavonoidok, flavonoid glikozidok. Források: (Beara et al., 2009), (Kawashty et al., 1994), (Оленников et al., 2007), (Fleer & Verspohl, 2007).

#### 2.3.4. Egyéb vegyületek

A *Plantago* fajok ezen kívül számos más vegyületcsaládot tartalmaznak preparatív előállítható koncentrációban. A *P. major* leveleiből triterpének közül urzolsavat és oleánolsavat (Chiang et al., 2003), N-tartalmú vegyületek közül plantagonint, indikaint, allantiont írtak le (Оленников et al., 2007).

## 2.4. Stabilitás-vizsgálatok általában és gyógynövény mátrixokon

Egy terápiás céllal készült termék esetében alapvető elvárás, hogy a gyártástól a végső felhasználásig biztosított legyen a bioaktív hatóanyagoknak a hatás eléréséhez kívánt minősége és mennyisége. Enélkül gyógynövény termék nem lehet a bizonyítékon alapuló orvoslás része.

A hatóanyagok bomlását többször vizsgálták már „post-harvest” vizsgálatokban gyógynövényekben. Ilyenkor a növény még rengeteg aktív enzimet tartalmaz. Legtöbbször az aktív hatóanyagok megőrzését célzó vizsgálatokat végeznek. A szárítási mód befolyásolja a *Gentiana* gyökér szekoiridoidjainak (Carnat et al., 2005) és a *Harpagophytum* gyökerének iridoidkoncentrációját (Joubert et al., 2005) a végtermékben. CPG-kre, konkrétan plantamajozid és akteozid kapcsán is készült nemrég egy szárítást optimalizálni célzó vizsgálat *P. major* leveleken (Zubair et al., 2011). Általában elmondható, hogy a hatóanyag-veszteséget áramló, nem túl nagy hőmérsékletű (40-50 °C) levegővel lehet minimalizálni. Ennek oka a viszonylag gyors enzim és mikroba-inaktiváció és a relatíve kicsi hatóanyag termodegradáció. Magasabb hőmérsékleten a hatóanyag-veszteség általában fokozódik és elszíneződés is gyakran megfigyelhető (Müller & Heindl, 2006).

A szárítás utáni stabilitásról ugyanakkor igen kevés publikáció született ezidáig. Példaként említhető néhány flavonoid tartalmú gyógynövény stabilitás-vizsgálata (Heigl & Franz, 2003), porlasztva szárított tea kivonatok stabilitás vizsgálata (Ortiz et al., 2008), *Piper* illóolaj-tartalmú növény vizsgálata (Orav et al., 2004). Az alapvető különbség a „post harvest” állapothoz képest, hogy a növény természetes védekezőrendszere ilyenkor már nem működik. Az enzimatis aktivitás víz hiányában elhanyagolható, azonban a szárítás hőfokától és idejétől, technikájától függően a növény különböző aktivitású reaktiválható enzimet tartalmazhat.

A már száraz növényi anyagoknak (mint a gyógyszerészeti termékek esetében általában) mindenekelőtt kémiai, mikrobiológiai minőségéről beszélhetünk. Természetesen számos egyéb minőségi paraméter is létezik - peszticid reziduumok szintje, nehézfém tartalom, szennyező idegen fajok megléte a gyógynövényben - itt ezekkel azért nem foglalkozunk, mivel stabilitási vizsgálat alatt elméletileg nem csökkenhet a termék ilyen jellegű minősége.

A kémiai minőség és stabilitás a bioaktív vegyületek meglétét (előírat szerint kvalitatív és kvantitatív jellemző is lehet, növényfajtól és metabolittól



függően) jelenti a gyógynövényekben. *Plantaginis lanceolatae folium*ra az előírt kémiai minőség a következő: detektálható AUC és ACTE (vékony-réteg kromatográfiás vizsgálatot ír elő a gyógyszerkönyv) és legalább 1,5% összes orto-dihidroxi-fahéjsav tartalom, amelynek mérésére egy spektrofotometriás assay a hivatalos. Ez a vizsgálat tulajdonképpen az összes CPG jellegű vegyületet méri, akteozidban kifejezve adjuk meg az eredményét (Ph.Eur. 5.2., 2005).

Mikrobiológiailag akkor lesz megfelelő minőségű a növényi drog ('A' kategória), ha max.  $10^5$  gomba CFU-t (colony forming unit, telepkepző egység), max.  $10^3$  *E. coli*-t, és max.  $10^7$  összes aerob CFU-t tartalmaz száraz grammonként. Hiányoznia kell a *Salmonella* patogén baktériumnak a mintákból (25 g tesztjét végzik el) (Kosalec et al., 2009). Ezek a számok a forró vízzel kivonásra kerülő gyógynövényekre ('A' kategória) vonatkoznak (mint az e tanulmányban vizsgált *Plantago* levelek), a 'B' és 'C' kategóriákra szigorúbb a szabályozás. A 'B' kategóriába esnek az extraktok, illetve a kezeléssel csökkentett kontaminációjú gyógynövény termékek.

A mikrobiológiai minőség kontrolljának egyik fontos apropója az, hogy a gyógynövényekből izolált fonalas gombatorzsek gyakran humán patogének, allergének; karcinogén, toxikus metabolitokat szekretálnak táptalajukba (jelen esetben, ha képesek szaporodni, a növényi drogba) (Kosalec et al., 2009). Ilyen, potenciális toxikus fajok lehetnek pl. a *Aspergillus*, *Penicillium* genus tagjai, főleg az *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. niger* és az *A. fumigatus*. Egy vizsgálatban a növényi anyagból izolált fajok *Aspergillus* és *Penicillium* spp. 20%-a volt képes valamelyik ismert mikotoxin szintézisére (aflatoxin, ochratoxin A vagy citrinin) (Bugno et al., 2006). A toxintermelés számos környezeti tényezőtől függ, főleg a meleg, párás környezetben fontos a toxinok monitorozása. Ezen kívül számos más genus tagja jelen van a gyógynövényeken megtelepedő flórának, pl. *Alternaria* spp., *Chaetomium* spp., *Cladosporium* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Paellomcyes* spp., *Phoma* spp., és *Trichoderma* spp. Mivel mezőgazdasági körülmények között termelik a növényi anyagot, a kontamináció bizonyos fokig elkerülhetetlen. A mikrobiális szennyezettség csökkenthető például gamma-besugárással (5-20 kGy) (Kumari et al., 2009). Ez nem feltétlenül csökkenti a drog terápiás értékét.

A kémiai stabilitást számos tényező befolyásolhatja. A növényi metabolitok komplex mátrixban való stabilitásának vizsgálata azért fontos, mert sokszor nincs lehetőség a vegyületek elválasztására egymástól gazdasági szempontok miatt, esetleg azért, mert a komplex hatóanyagkeverékkel jobb hatást lehet elérni, mint a tisztított monokomponenssel (Wink, 2008), így

megtisztítani a hatóanyagot nem is mindig érdemes. Egy növényi extraktban végtelen sok metabolit-metabolit interakció létezhet, amely megjósolhatatlanná teszi a metabolitok stabilitását a mono-komponensek stabilitási adataiból (Gafner & Bergeron, 2005), (Eder & Mehnert, 1998). A növényi drogokban, szárított növényi részekben a helyzet még bonyolultabb: nincs ugyanis extrakciós vagy szűrési lépés, ami az enzimeket, mikroorganizmusokat inaktívná, vagy eltávolítaná, tehát ezek potenciális reaktivációja is befolyásolhatja a hatóanyagok stabilitását a növényi drogban. Az extraktokban megszokott hasonló polaritású vegyületeken kívül nagyon sokféle makromolekula is jelen van a rendszerben.

A növényi metabolitok érzékenyek lehetnek hőre (sokszor szükséges optimalizálni a szárítást), lehetnek érzékenyek vízre (sok vegyület, pl. az általunk vizsgált vegyületek is észterek, ill. glikozidok, vagyis hosszú inkubációs idő alatt elméletileg vízzel spontán reagálva elbomolhatnak, lsd. (1-3. ábrák), vagy lehetnek enzimek szubsztrátjai. Ezen kívül, oxidációs folyamatokban is elbomolhatnak. Az enzimek azért is potenciális veszélyforrások, mert a szárítás alatt legalább részlegesen lebomolhat a kompartmentalizáció a sejtekben és az addig elszeparált enzim és metabolit egy térbe kerülhet.

## **2.5. Növényi szövettenyésztés hatóanyag-termelés céljából**

A növényi sejtek elméletileg korlátlan szaporodásra bírhatók meghatározott növényi hormonokkal vagy azok kombinációjával szerves szénforrást tartalmazó táptalajokon, aszeptikus körülmények között. A tudományban ezt a technikát számos céllal használják, pl. axenikus vonalak létrehozására, steril növények szaporítására, génbankok létrehozására (Dudits & Heszky, 2003). Hamar felmerült annak lehetősége, hogy gyógynövényekből állítsanak elő növényi szövettenyészetet, és abban termeltessenek bioaktív hatóanyagokat. Ennek számos előnye lehet, többek között az időjárástól, klímától és számos más környezeti feltételtől független termelést tesz lehetővé, valamint alkalmas technikákkal elméletileg finomítható a metabolitok aránya is, sőt új, a növényben nem gyártott molekula is termelésre kerülhet (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002). Ezen kívül a termék visszanyerése egyszerű, a gyártás igen gyors. Igen intenzív kutatómunka folyik például a citosztatikus alkaloidok, a vinkrisztin, vinblasztin kapcsán illetve a citosztatikus diterpénnel, a taxollal kapcsolatban. Ezen vegyületek igen bonyolult szerkezete a totálszintézist rendkívül drágává teszi, ezért vonzó alternatíva a növényi szövettenyészetekben való termeltetés (Collin, 2001).

A növényi sejteket ilyen célból leggyakrabban kallusz-kultúráként indítják, amely differenciálatlan sejtek koherens tömege, és a sejtek organizálatlan növekedéseként jön létre. E kallusz-kultúrákból hoznak létre szuszpenziókat, amelyeken a hatóanyag-termelési vizsgálatok zöme zajlik (Georgiev et al., 2009).

A tenyésztés paramétereit közül gyakorlatilag minden képes befolyásolni a hatóanyag-tartalmat, így a táptalaj összetétele (a teljesség igénye nélkül szerves szénforrás, vitaminok, szervetlen összetevők (N-forrás koncentrációja és jellege,  $K^+$ ,  $PO_4^{3-}$ , stb. koncentrációja), pH, ozmolaritás, stb.); megvilágítás, hőmérséklet, és természetesen számos intrinszc paraméter, mint az adott vonal genetikája (Collin, 2001).

### **2.5.1. A növényi szövettenyészetben alkalmazott hormonok**

A szövettenyészetek indításában és fenntartásában leggyakrabban használt hormonok a szintetikus auxinok és a szintetikus citokininek. Ezeket megfelelő arányban legtöbb esetben hozzá kell adni a fenntartható növekedéshez a táptalajhoz.

Az auxinok (citokininekkel kombinációban) a szövetek (kallusz és szuszpenziók) növekedését hozzák létre, de a morfogenezis irányát is befolyásolják. Sejtszinten a sejtek osztódását és elongációját szabályozzák. Szervezett szövetekben egyéb folyamatokat (tropizmus, apikális dominancia) is e hormonok regulálnak (George et al., 2007, p.175). A növények által termelt természetes auxinok közül a szövettenyészetekben használt fontosabbak az IAA (indol-ecetsav, indole acetic acid), az IBA (indol-vajsav, indole butyric acid), a mesterséges auxinok közül leggyakrabban a 2,4-D (2,4-dikloro-fenoxi-ecetsav, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid), és a NAA (naftil-ecetsav, naphtyl-acetic acid). A primer szövettenyészet létrehozásához legtöbbször szükség van auxinra (George et al., 2007, pp.180, 186). A kallusz-, ill. szuszpenziós tenyészetek indukcióját és fenntartását legtöbbször 2,4-D-vel, míg a szükséges morfogenezist (növényregeneráláskor) NAA és IBA alkalmazásával érik el (George et al., 2007, p.187). Dózis-hatás görbékük optimum-görbe, általában 1-10  $\mu\text{M}$  koncentráció-tartományban használatosak, e fölött a növekedés gátlását idézik elő.

A citokininek a növényi szövettenyészetekben ugyancsak igen gyakran alkalmazott hormoncsalád. A citokininek purinvázis vegyületek, a fontosabb természetes citokininek között a zeatint és a zeatin származékait említhetjük meg, a szövettenyészetekben főleg a mesterséges kinetint és benzil-adenint

(BA, vagy BAP = benzil-amino-purin), mert sokkal olcsóbbak a zeatineknél. Fontos szerepet játszanak a sejtciklus szabályozásában, a *de novo* proteinszintézisben, de molekuláris szinten még nem teljesen tisztázott a támadáspontjuk (George et al., 2007, p.210). Általában az auxin-citokinin arány döntő a kultúra jellegének kialakításában. Bár fajonként más és más arány a célravezető, általánosságban elmondható, hogy nagy auxin / citokinin arány gyökerek, alacsony auxin / citokinin arány hajtások, közepes auxin / citokinin arány pedig differenciálatlan szövetek kialakulásához vezet. Többnyire 0,5-2,5  $\mu\text{M}$  koncentrációban alkalmazzák őket.

### 2.5.2. *Plantago* fajokból készített szövetkultúrák

A *Plantago* fajokból sokféle szövettenyészet készült, ezek célja többnyire növény-regenerálás, ritkábban hatóanyag-termeltetés. Részletes áttekintés (Fons et al., 2008)-ben olvasható. A *P. lanceolata* szövettenyészetek fő metabolitjai a CPG-k és hasonló vegyületek, pontosabban prekursorok. A témában egy kis mennyiségben jelen lévő CPG-k izolálásával foglalkozó preparatív munka (Budzianowska et al., 2004) és egy hatóanyag-termelés fokozását prekursor-adagolással célzó vizsgálat (Fons et al., 1999) készült, előbbi kalluszokon, utóbbi ún. „hairy root” kultúrákon. Mindkét rendszerben a PMJ és az ACTE voltak a *P. lanceolata* kultúrák fő metabolitjai. Ezen kívül a metabolitokat *P. major* és *P. psyllium* kultúrákból vizsgálták még (Fons et al., 2008). A kalluszindukcióra a *Plantago* genusban 2,4-D használható BAP-al, kinetinnel kombinációban vagy magában (Fons et al., 2008).

### 2.5.3. A nitrogén forrás hatása növényi szövettenyészetekre

A nitrogén, mint a fehérjék és nukleinsavak felépítésében részt vevő elem, fontos szerepet tölt be a minden élőlény fejlődésében. A növények képesek szerves N-forrásokat felhasználni aminosavak és nukleinsavak felépítésére. A növényeknek a nitrogén főleg nitrát formájában ( $\text{NO}_3^-$ ) szolgál nitrogén forrásként, mely a szövetekben  $\text{NH}_4^+$ -á redukálódik és ez épül be szerves molekulákba. A táptalaj  $\text{NH}_4^+$  /  $\text{NO}_3^-$  aránya maga a táptalaj pufferkapacitása miatt is nagy jelentőséggel bír (George et al., 2007, pp.68-71).

A hatóanyag-termelésre a N-forrás alapvető jelentőségű. Az alap-mediumok, mint az MS (Murashige-Skoog), vagy a B5 mind  $\text{NH}_4^+$ , mind  $\text{NO}_3^-$  formában tartalmazzak nitrogént. Az MS-énél (1:2) alacsonyabb NNA ( $\text{NH}_4^+$  /  $\text{NO}_3^-$  arány) növelte pl. sikonin származékok bioszintézisét *Lithospermum erythrorhizon* tenyészetekben, míg az egyedüli N-forrásként adott  $\text{NH}_4^+$  gátolta a hatóanyag-termelést (Fujita et al., 1981). Az összes nitrogén-forrás

csökkentése vagy növelése is módosítja a hatóanyagok felhalmozását, valószínűleg többek között a kultúra periódusának vagy a növekedés intenzitásának változtatásával. Az összes nitrogén-forrás csökkentése növelte a kapszaicin-tartalmat *Capsicum frutescens* tenyészetben, az antrakinon-termelést *Morinda citrifolia* kultúrákban és az antocianin felhalmozást *Vitis* fajokban (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002). *Panax ginseng* szuszpenziókban a ginzénózid és poliszaharid termelés is az NNA, valamint a N forrás mennyiségétől függ (Zhong & Wang, 1998), itt a metabolitok fokozott szintézisének az  $\text{NH}_4^+$  mentes táptalaj (csak  $\text{NO}_3^-$  a N-forrás) és az MS-től valamivel kisebb total N, 40 mM volt az optimális. Az eredeti MS mediumhoz képest eltérő NNA (kevesebb  $\text{NH}_4^+$ ) vezetett optimális hatóanyag-termeléshez *Hypericum perforatum* szuszpenzióban is (Cui et al., 2010), bár itt a szerzők nem optimalizálták az összes N forrás paramétert.

Általában a növekedés és a metabolit-felhalmozás komplementer jelenségek, azaz erős növekedés mellett a szövettenyészet kevesebb szénforrást, energiát fordít a másodlagos metabolitok szintézisére. A tenyészidő vége felé jelentkező relatív éhezés periódusában gyakoribb a hatóanyag-akkumuláció, az ilyenkor jelen levő nagy szerves szén/nitrogén arányok kedvezőek a hatóanyag-termelés számára (Collin, 2001), de léteznek a növekedés alatt konstitutíve termelődő metabolitok is.

### 3. Eredmények és megbeszélésük

#### 3.1. Hazai *Plantago* fajok regionális populációinak hatóanyag-összehasonlító vizsgálata

##### 3.1.1. Kvantitatív hatóanyag-összehasonlító vizsgálatok

Öt különböző, Magyarországon gyakori, potenciálisan terápiás értékű fajt hasonlítottunk össze, a *P. lanceolata*, *P. altissima*, *P. major*, *P. media*, *P. maritima* fajokat. Minden fajt legalább 4 minta képviselt, különböző populációkból. A fajokból mért IG tartalmat, antioxidáns kapacitást (AAEAC, aszkorbinsav ekvivalens antioxidáns kapacitás, ascorbic acid equivalent antioxidant capacity) és összes CPG tartalmat a 4. táblázatban foglaltuk össze.

Az IG-kat kapilláris elektroforézis – micelláris elektrokinetikus kromatográfia (CE-MEKC) módszerrel mértük. Katalpolt csak a *P. lanceolata*-ban és a *P. altissima*-ban detektáltunk. Minden faj tartalmazott aukubint. Ezek az adatok megfelelnek a korábban leírt kemotaxonómiai mintázatnak (Ronsted et al., 2003). Nem lehetett szignifikáns különbséget kimutatni a *P. lanceolata* és a vele könnyen összetéveszthető *P. altissima* között ( $p > 0,05$ ), ami az AUC és CAT tartalmat illeti.

4. táblázat. Hazai *Plantago* populációk kvantitatív összehasonlító vizsgálatának eredményei. Két minta szignifikánsan különbözik, ha nem rendelhető hozzá ugyanaz a betű ( $p < 0,05$ ). Rövidítések: n.d., nem detektálható; AAEAC, aszkorbinsav-ekvivalens antioxidáns kapacitás, CPG, kaffeoil feniletanoid glikozid; DW, száraz tömeg.

	Katalpol (%w/w)	Aukubin (%w/w)	AAEAC ( $\mu\text{mol} / \text{g DW}$ )	összes CPG tartalom(%w/w)
<i>P. altissima</i>	0,66 $\pm$ 0,13% b	0,55 $\pm$ 0,04% ab	0,2206 $\pm$ 0,0290 a	2,40 $\pm$ 0,38% a
<i>P. lanceolata</i>	0,89 $\pm$ 0,22% b	0,68 $\pm$ 0,23% a	0,2428 $\pm$ 0,0191 a	2,57 $\pm$ 0,56% a
<i>P. major</i>	n.d. a	0,34 $\pm$ 0,02% b	0,1722 $\pm$ 0,0573 a	1,81 $\pm$ 0,56% a
<i>P. maritima</i>	n.d. a	0,47 $\pm$ 0,08% ab	0,4124 $\pm$ 0,0701 b	4,29 $\pm$ 0,91% b
<i>P. media</i>	n.d. a	0,34 $\pm$ 0,05% b	0,2368 $\pm$ 0,0480 a	2,57 $\pm$ 0,73% a

Méréseinkben jelentősen nagyobb IG tartalom adódott, mint (Jurisic et al., 2004) munkájában. Ennek oka valószínűleg részben a növényi anyagban, részben az extrakciós eljárásban keresendő, (Jurisic et al., 2004) ugyanis forró vizes extrakciót alkalmazott, míg e munkában 10% PrOH volt a kivonószer,

amely szignifikánsan több IG-t von ki a *Plantago* levelekből ( $p < 0,05$ ). E kivonási módszert *P. lanceolata* szárított leveleken optimalizáltuk. A 10 % n-propanolos extrakt jóval több iridoidot és CPG-t von ki a mintákból, mint a víz, miközben a minta  $-24\text{ °C}$ -on továbbra is megfagy. Az n-propanol használatát az indokolja MeOH-al és EtOH-al szemben, hogy utóbbiak nem választhatóak el az IG-ktől CE-MEKC-ben. A kevés szerves koszolvens a minta kezelhetőségét is nagyban javítja, a minta kevésbé viszkózus, valószínűleg a makromolekulák sokkal kisebb fokú extrakciója miatt. Hasonló adatokat kapott *Plantago* fajok HPLC-s AUC kvantifikálásakor (Beara, 2010), figyelembe véve, hogy a MeOH kevesebb IG-t von ki a növényből, mint a forró vizes extrakció (Suomi et al., 2000). A magyar populációk AUC tartalma elmaradt a nemesített *P. lanceolata* változatok AUC tartalmától, CAT tartalma viszont jóval megelőzte azokat (Al-Mamun et al., 2008). Fontos megjegyezni, hogy a *P. altissima* gyakorlatilag azonos mennyiségű iridoidot tartalmaz, mint a *P. lanceolata*, ami esetleges gyógyászati felhasználásának hasznos voltát támogatja. A gyakran használt *P. major* és a *P. media* azonban szignifikánsan kevesebb AUC-t tartalmaz ( $p < 0,05$ ), mint a magyar gyógyszerkönyvben hivatalos *P. lanceolata*. A fajon belüli variabilitás összességében nem magas, az RSD-k átlaga 17%-nak adódott.

Összességében adataink alapján az IG-kre alapozó terápiás felhasználás minden vizsgált faj regionális populációinak esetében megalapozottnak látszik. A terápiás használatra IG tartalom alapján legalkalmasabbnak azonban egyértelműen a *P. lanceolata* populációk látszanak, melynek összes IG tartalma 1,5% fölötti. A *P. lanceolata*-val könnyen összetéveszthető *P. altissima* tesztelt populációi inszignifikánsan kevesebb IG-t tartalmaztak, de még így is 1% fölötti IG tartalommal rendelkeztek.

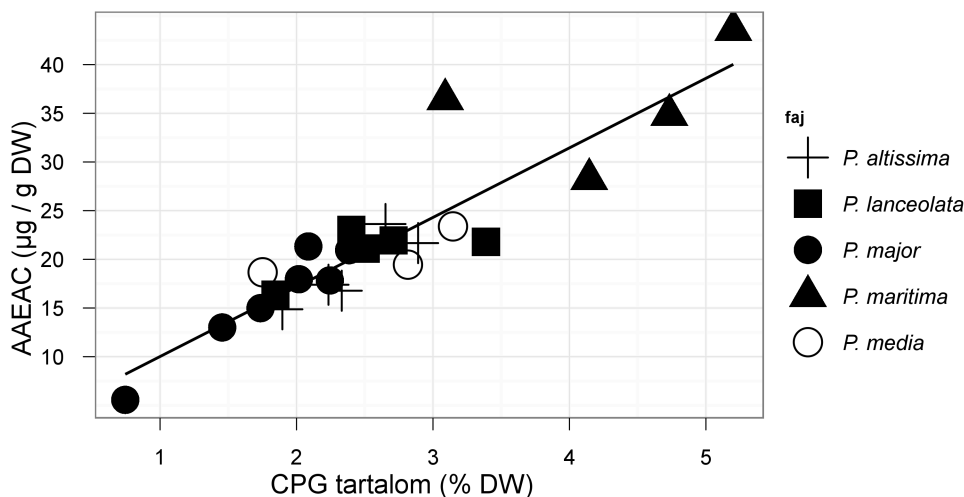
Ami a CPG tartalmat és a teljes antioxidáns kapacitást illeti, a *P. maritima* emelkedik ki a többi faj közül (4. táblázat). Szárított levelei szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) több CPG-t tartalmaznak, mint bármelyik másik faj drogja ( $4,29 \pm 0,91\%$ ), AAEAC értékei is kimagaslóak voltak ( $0,4124 \pm 0,7071\ \mu\text{mol} / \text{g}$ ). A *P. major* minták tartalmazták a legkevesebb CPG-t ( $1,81 \pm 0,56\%$ ), és antioxidáns kapacitása is a legkisebb volt a vizsgált fajok közül ( $0,1722 \pm 0,0573\ \mu\text{mol} / \text{g}$ ). Fenti adatok alapján jól tartható a megállapítás, hogy a *Plantago* fajok gazdag antioxidáns vegyületforrásnak tekinthetőek (Beara et al., 2009). A mért értékek azt mutatják, hogy a *Plantago* fajok kivonatai számos más, nagy antioxidáns kapacitásúnak ismert gyógynövényvel (orvosi zsálya, kerti kakukkfű, stb.) összemérhető AAEAC-al rendelkeznek (Apak et al., 2006) (megjegyzés: a CUPRAC assayben az aszkorbinsav Trolox ekvivalense 0,96 (Apak et al., 2007)). A gyógyszerkönyvi vizsgálat minimum 1,5% akteozidban kifejezett orto-dihidroxi-kávésav észtert ír elő. Egy kivétellel minden mintánk

megfelelt volna gyógyszerkönyvi vizsgálat esetén e kvantitatív előírásnak (4. ábra.).

A CPG tartalom és az antioxidáns kapacitás alapján a vizsgált populációk levéldrogjai alkalmasak lehetnek terápiás cél elérésére. A regionális *P. lanceolata* populációk alkalmasak lehetnek termesztésbe vonásra gyógyszerkönyvi minőségű drog előállítására, a *P. altissima* pedig valószínűleg alkalmas lehet a *P. lanceolata* helyettesítésére. A legnagyobb CPG tartalmat (több, mint 4%) mutató *P. maritima* további vizsgálata indokolt. A gyakran alkalmazott *P. major* ezen vizsgálatok alapján kisebb gyógyászati potenciállal rendelkezik, mint a *P. lanceolata*.

Az AAEAC és CPG tartalom értékeit egymás függvényében ábrázolva (4. ábra) jól látható, hogy a két érték szorosan korrelál egymással, az illesztett lineáris modell  $R^2$  értéke 0,8674, a két változó Pearson korrelációs együtthatója 0,9202 ( $p < 0,001$ ). A lineáris korrelációtól való eltéréseket az antioxidáns assay által mért egyéb, nem-orto-dihidroxifenol antioxidáns vegyület (egyéb növényi fenoloidok, bizonyos flavonoidok, glutation stb.) változó koncentrációja okozhatja. Megállapítható, hogy a CPG-k kulcsszerepet töltenek be a *Plantago* növényi drogok antioxidáns kapacitásában. Ez nem felel meg a (Beara et al., 2009), által leírt erős antioxidáns kapacitás - flavonoid-tartalom korrelációnak, de fontos megjegyezni, hogy a szerző nem végzett vizsgálatot CPG-kre. Mivel a *Plantago* fajok flavonoidtartalma egy nagyságrenddel kisebb, mint a CPG tartalmuk (Grubestic et al., 2007), (Beara et al., 2009), feltételezhető, hogy a CPG-k és a flavonoidok együttesen okozzák a *Plantago* fajok viszonylag magas antioxidáns kapacitását, mely vegyületek között az előbbieknél fogva hangsúlyosabbak. (Galvez et al., 2005) is a CPG-k és az antioxidáns kapacitás között talált szoros korrelációt, általunk nem vizsgált *Plantago* fajokban. A flavonoid-antioxidáns kapacitás korrelációt az okozhatja, hogy mindkét vegyületcsalád szintézise közös útvonalon zajlik (fenilalanin-ammónia liáz, PAL mediált sikimisav útvonal) (Vogt, 2010), és így valószínűleg szintjük párhuzamosan változik, ami multikorrelációt okoz.





4. ábra. A kaffeoil feniletanoid glikozid (CPG)-tartalom és aszkorbinsav-ekvivalens antioxidáns kapacitás (AAEAC) korrelációjának vizsgálata. A folytonos vonal az adatpontokra illesztett lineáris modell (AAEAC a CPG tartalom függvényében) egyenesét mutatja ( $R^2 = 0,8674$ ).

### 3.1.2. *Plantago* fajok kvalitatív hatóanyag-mintázat összehasonlítása

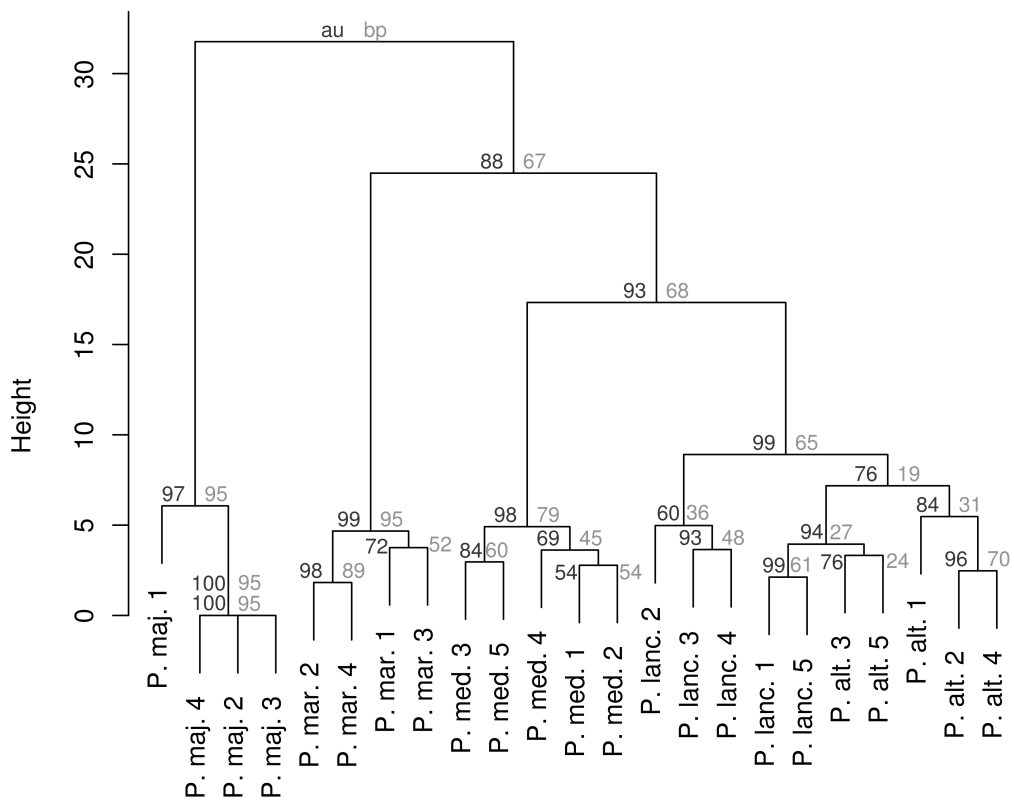
A különböző fajok metanolos extraktjait VRK vizsgálatnak vetettük alá. A módszerválasztást többek között a nagyszámú minta párhuzamos vizsgálatának lehetősége, valamint az indokolta, hogy a jelenleg hivatalos gyógyszerkönyvi vizsgálat is e technikát alkalmazza nemcsak a *Plantago* fajok levelének, hanem számos más növényi drog vizsgálatára is. A vizsgálat részben arra irányult, hogy megtudjuk, mely fajok különíthetők el a *Plantago lanceolata*-tól a gyógyszerkönyvi vizsgálat alapján. A hivatalos gyógyszerkönyvi vizsgálat csak aukubin és akteozid kvalitatív kimutatását írja elő (standardek mellett). A standard, előhívószeres bepermetezés nélküli vékonyréteg-kromatográfiai vizsgálat csak részlegesen képes e fajokat elkülöníteni, mivel AUC-t mindegyik tartalmaz, akteozidot, mint fő CPG-t tartalmazott VRK vizsgálat alapján a *P. lanceolata*, *P. maritima* és a *P. altissima*. Natural Product A (Naturstoff-reagent, 2-aminoetil-difenil-borinát vagy NP) reagenssel azonban számos eltérő sáv jelent meg a kromatogramokon, amely alkalmasnak bizonyult bizonyos fajok elkülönítésére. A különböző fajokra jellemző sávokat az 5. táblázatban összegeztük.

Az NP előhívás láthatóan jól alkalmazható a *Plantago* fajok extraktjaira.

A narancssárga sávok valószínűleg flavonoid-glikozidok kvercetin vagy miricetin aglikonnal (Sherma & Fried, 2003, p.719). Az adatokat hierarchikus klaszter-analízisnek vetettük alá, hogy egyértelműen kiderüljön, alkalmas-e a módszer a fajok elkülönítésére. A bootstrap valószínűségi értékek alapján 4 „igazi” klaszterre bonthatóak a minták, melyek jól megfelelnek a fajoknak (5. ábra). A *P. altissima* és *P. lanceolata* nem különíthető el e módon, amely ugyanakkor tovább erősíti annak valószínűségét, hogy a *P. altissima* alkalmas lehet gyógyászati felhasználásra.

5. táblázat. *Plantago* fajok összehasonlító kvalitatív vékonyréteg-kromatográfiás mintázatelemzésének eredményei, NP reagenssel történt előhívás után, 356 nm-es UV fényben vizsgálva. +, jelen van adott faj összes mintájában; ++, nagy mennyiségben jelen; V, jelenléte változó (de a minták legalább 50%-ban detektálható). A későbbiekben azonosított vegyületek nevét feltüntettük. Az IG-k nem detektálhatóak ezzel az előhívási móddal.

R <sub>f</sub>	Vegyület, Szín (NP, UV)	<i>P. major</i>	<i>P. media</i>	<i>P. altissima</i>	<i>P. lanceolata</i>	<i>P. maritima</i>
0.84	világos kék					V
0.81	narancssárga					+
0.78	narancssárga	V				
0.76	narancssárga	+				+
0.73	szürke	+				
0.7	sötét (fekete)	+				
0.68	narancssárga				V	V
0.66	narancssárga	+				
0.65	kék/zöld <b>akteozid</b>		++	++	++	++
0.61	narancssárga	++		+	+	+
0.57	világos kék		V	+	V	
0.55	világos kék					+
0.5	kék/zöld <b>plantamajozid</b>	++	V	+		
0.44	kék/zöld					+
0.39	kék/zöld		++	+	+	
0.34	kék/zöld				V	
0.27	kék/zöld		V	+	V	
0.23	sötét (fekete)			V		
0.21	kék/zöld			V	V	
0.18	kék/zöld					+
0.17	világos kék	V	+			
0.16	sötét (fekete)			V	+	



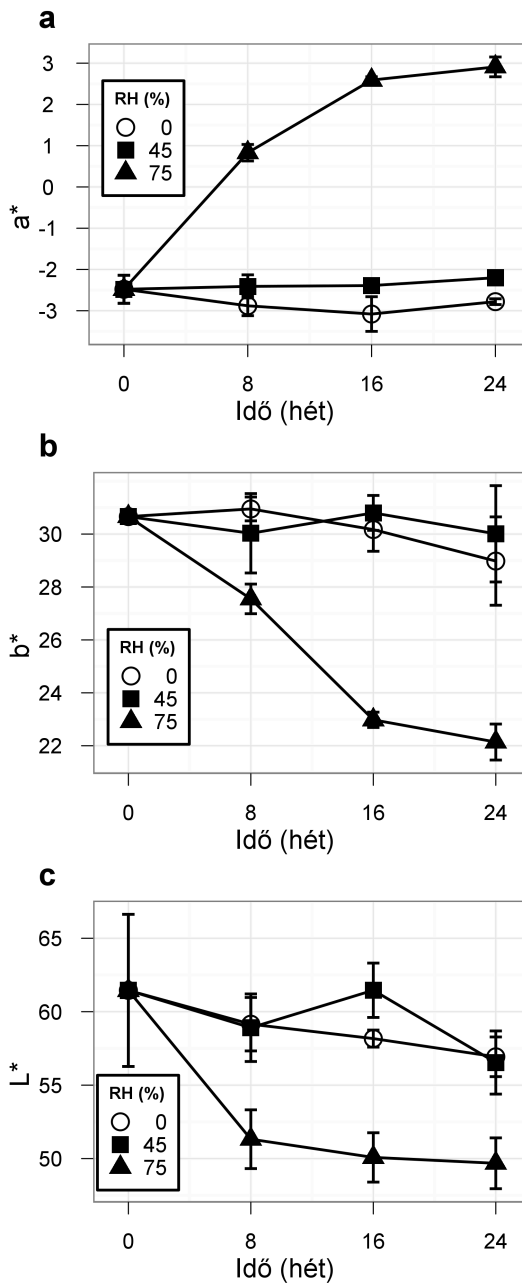
5. ábra. A *Plantago* fajok VRK analiziséből származó sávok klaszteranalízisének eredményei. Az elágazásoknál feltüntetett értékek: „approximately unbiased p-value” (AU) és “bootstrap probability” (BP).

### 3.2. A *P. lanceolata* levéldrog stabilitásvizsgálata különböző páratartalmú levegőben

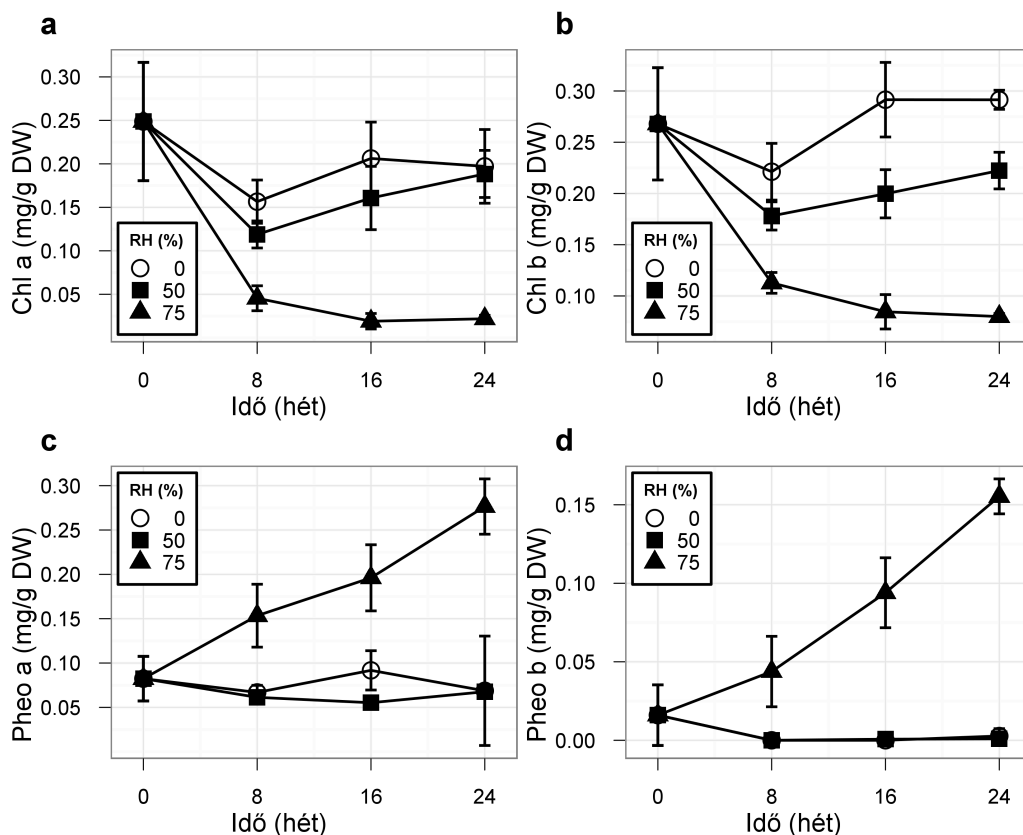
A *Plantaginis lanceolatae folium* stabilitását különböző relatív páratartalmú (RH, relative humidity) levegőben vizsgáltuk, 24 hétig. A kvantitatíve vizsgált minőségi paraméterek között szerepelt a szín, a gomba CFU-szám és néhány bioaktív vegyület koncentrációja (AUC, CAT, ACTE). A gombák metabolit-bontásban betöltött szerepének tisztázására *in vitro* tesztek végeztünk: a növényi drogból izoláltunk és azonosítottunk 10 fonalas gomba törzset, melyekkel inkubáltuk a növény vizes kivonatait. A színváltozás hátterének felderítésére kvantifikáltuk a klorofill típusú pigmenteket a drogból.

#### 3.2.1. A szín változása a növényi drogban

A 75% RH-n történő inkubáció a drog jól megfigyelhető, gyors barnulását eredményezte. Ezen változások kvantifikálására CIELAB paramétereket számoltunk a mért reflektancia spektrumokból. A 75% RH-n történt változás szignifikáns ( $p < 0,001$ ), a változás nagy része az első nyolc kezelési héten ment végbe (6. ábra.) 0 és 45% RH-n nem volt látható színváltozás, ugyanakkor műszeresen a 45% RH esetében is kimutatható volt egy kis eltolódás mely elhanyagolható volt a 75% RH-n mérthez képest. Legjelentősebb eltolódások az  $a^*$  paraméterben voltak tapasztalhatóak (vörös-zöld színkoordináta). A 75% RH az  $a^*$ ,  $b^*$  és  $L^*$  paraméterekben rendre 17,89; 5,07; 2,61-szer nagyobb eltolódás következett be, mint a kontroll rendszerben. Minden színparaméter lényegében állandó maradt 45% RH-n és kontrollokban. Az  $a^*$  és  $b^*$  paraméter a szín változását, míg az  $L^*$  a sötétedést írja le kvantitatíve (6.ábra).



6.ábra. CIEL\*a\*b\* szín-koordináták változása különböző páratartalmú (RH) levegőn történő inkubáció hatására, *P. lanceolata* szárított levelekben. a., a\* paraméter (vörös-zöld); b., b\* paraméter (sárga-kék); c., L\* paraméter (fényesség).



7. ábra. Klorofill típusú pigmentek koncentrációjának változása különböző páratartalmú (RH) levegőn történő inkubáció hatására, *P. lanceolata* szárított levelekben. a., klorofill a; b., klorofill b; c., feofitin a; d., feofitin b.

A színváltozás hátterének vizsgálására kvantifikáltuk a növény színéhez feltehetően leginkább hozzájáruló vegyületeknek, négy klorofill típusú pigmentnek mennyiségét. A talált értékek jól megfelelnek egy száraz, földfeletti növényi szervből származó koncentrációnak. Az RH komolyan befolyásolta a Chl pigmentek stabilitását a *P. lanceolata* levelekben ( $p < 0,001$ ). A változások az 7. ábrán láthatóak. Az exponenciális változások láthatóan jól követik a szín változását (vö. 6. és 7. ábra.). A Chl a és az Chl b exponenciális csökkenése, és a Pheo a, valamint a Pheo b növekedése jól magyarázzák a zöld – barna színátmenetet. 45 és 0 % RH-n nem következett be szignifikáns változás a pigmentek koncentrációjában, arányában. A színek komponensek és a pigmentkoncentrációk között Pearson korrelációs értékeket számolva még szembetűnőbb, hogy lineáris kapcsolat áll fenn, különösen az a\* és b\* koordináta, valamint a Chl a\* és Chl b\* koncentrációja között (6. táblázat.). E

pigmenteken kívül számos más dolog befolyásolhatja a színt, pl. az IG-k (Moritome et al., 1999), (Touyama et al., 1994a), (Touyama et al., 1994b) vagy polifenolos molekulák színes bomlástermékeinek megjelenése (Pourcel et al., 2007), (Artes et al., 1998), vagy a szaporodó fonalas gombák pigmentjei. A növényből izolált gombafajok (lsd. 3.2.2.) többsége intenzív színt mutat, közülük több pigmentet is szekretál táptalajába *in vitro*.

A Chl → Pheo átalakulás nem igényel enzimet növényi mátrixokban, spontán reakcióként is lejátszódhat - a központi Mg<sup>2+</sup> H<sup>+</sup>-ra cserélődése jelenti a Chl-ek átlakulását a megfelelő Pheo vegyületekké. Pl. tea levelekben a pH jól korrelál a degradáció sebességével (Kohata et al., 2004). Így feltehetően a víz, mint reakcióközeg hatására felgyorsuló H<sup>+</sup> beépülés áll a színváltozás hátterében. Adataink alapján ugyanakkor a sötétedést nem magyarázza meg (kicsi korrelációs értékek, 6. táblázat) ez a változás, azt a fentebb említett jelenségek együttes hatása okozhatja.

6. táblázat. A CIEL\*a\*b\* színkoordináták és az egyes klorofill típusú pigmentek Pearson korrelációs értékei. A korrelációs értékek vizsgálatához minden mintapontot felhasználtunk.

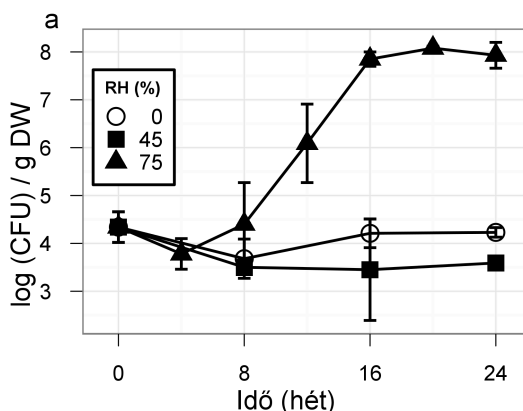
	Chl a	Chl b	Pheo a	Pheo b
L*	0.224	0.222	-0.081	-0.264
a*	-0.927	-0.773	0.849	0.823
b*	0.830	0.860	-0.777	-0.857

Maga a szín, bár gyógyszerkönyvi minőségi paraméter, nem lényeges a *P. lanceolata* terápiás hatásának elérése szempontjából. Mivel azonban minden tesztelt paraméter közül (lsd. később) a szín reagált leghamarabb és legérzékenyebben a magas RH kezelésre, a szín alkalmas markernek a vízexpoziáció kimutatására.



### 3.2.2. A növényi drogban előforduló fonalas gombák számának változása, azonosított fajok

A színváltozás mellett egy másik szembetűnő jelenség is tapasztalható volt: a magas RH-n történő kezelés a drog penészedését okozta, melyet kellemetlen szag is kísért. Összességében elmondható, hogy az RH szignifikánsan hozzájárult a gombák növekedéséhez a gyógynövény mátrixban ( $p < 0,001$ ). A kontroll rendszeren és a 45% RH-n tartott növényen semmilyen ilyen jellegű elváltozást nem tapasztaltunk a 24 hetes inkubációs periódus alatt. A telepkepző egységek kvantifikálásának eredményeit az 8. ábrán találjuk. Mint látható, 75% RH-n a gombák intenzív proliferációját lag fázis előzte meg, majd rendkívül gyorsan 3-4 nagyságrenddel emelkedett meg a csíraszám. A felvett vízmennyiség  $2,68 \pm 0,23$  és  $25,94 \pm 0,94\%$  45 és 75% RH-n (rendre), száraz tömegre vonatkoztatva. Ez az alacsony mennyiségű adszorbeált víz elegendő a xerofil szervezetek számára, hogy 75% RH-jú közegben nőni tudjanak (Gock et al., 2003), és biztosíthat annyi vizet is, amelyben bizonyos enzimek már aktívak lehetnek (Müller & Heindl, 2006). Az a tény, hogy 45% RH nem elegendő a mikrobiális proliferációhoz, nem meglepő, valószínűleg egyszerűen nincs elegendő víz a növekedéshez, mint azt korábban (Gock et al., 2003) és (Müller & Heindl, 2006) is leírta.



8. ábra. Gomba (összes penész és élesztő) telepkepző egységek számának változása a különböző páratartalmú levegőn (RH) történő inkubáció hatására, *P. lanceolata* levelekben.

A klóramfenikolt tartalmazó táptalajon való telepszámolás során a gombaflórát teljes mértékben a fonalas gombák uralták a 8.héttől kezdődően, de számuk a 0.heti mintákban is jóval meghaladta az élesztőkét. A gombaflóra

részleges jellemzésére ezért különböző fonalas gomba törzseket izoláltunk mind a kísérlet elején (0.hét) vett mintákból, mind az intenzív proliferáció időszakából, ebből 10 törzset tisztítottunk és azonosítottunk. A törzsek DNS szekvenciáik alapján kerültek azonosításra, a fajok összefoglalása az 7. táblázatban látható. A szekvenciák makroszkópos és mikroszkópos megjelenés alapján kerültek kiválasztásra.

7. táblázat. A szárított *P. lanceolata* levelekről izolált penészfajok azonosításának eredménye és az azonosításhoz szekvenált gének.

Nr.	Species	Szekvenált gének
1	<i>Aspergillus niger</i>	ITS; $\beta$ -tubulin
2	<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	ITS; eF1
3	<i>Aspergillus nidulans</i>	ITS; $\beta$ -tubulin
4	<i>Eurotium amstelodami</i>	ITS; $\beta$ -tubulin; calmodulin
	<i>Cladosporium</i>	eF1
5	<i>pseudocladosporioides</i>	
6	<i>Penicillium chrysogenum</i>	$\beta$ -tubulin
7	<i>Bipolaris tetramera</i>	ITS; eF1
8	<i>Epicoccum nigrum</i>	ITS
9	<i>Eurotium repens</i>	ITS; $\beta$ -tubulin
10	<i>Eurotium repens</i>	$\beta$ -tubulin; calmodulin

Az azonosított fajok közül számos faj potenciálisan káros lehet az emberi egészségre. A lényegesebb idevonatkozó irodalmi adatokat a 8. táblázatban foglaltuk össze.

E fajok jelenléte a növényi anyagban önmagában valószínűleg nem jelent problémát. Többségük növényekkel asszociációban leírt faj, a *Leptosphaerulina chartarum* (= *Pithomyces chartatum*) fajt füvekkel asszociációban írták le (szaprofita) (Russomanno et al., 2003), az általunk is kimutatott *Eurotium* fajok növényi anyagokban, pl. szénában fordulnak elő (Seguin et al., 2010). Ugyancsak növényekkel asszociációban írták le a *Cladosporium pseudocladosporioides*-t (gabonában) (Bensch et al., 2010) és az *Epicoccum nigrum*-ot (gyümölcsök, pl. *Sorbus* felszíne) (Labuda et al., 2005), míg a *Bipolaris tetramera* (= *Cochliobolus spicifer*) növénypatogén is (Hoagland et al., 2000, p.115) is.

8. táblázat. Az azonosított fajok és a szakirodalomban velük összefüggésbe hozott humán egészségügyi kockázatok.

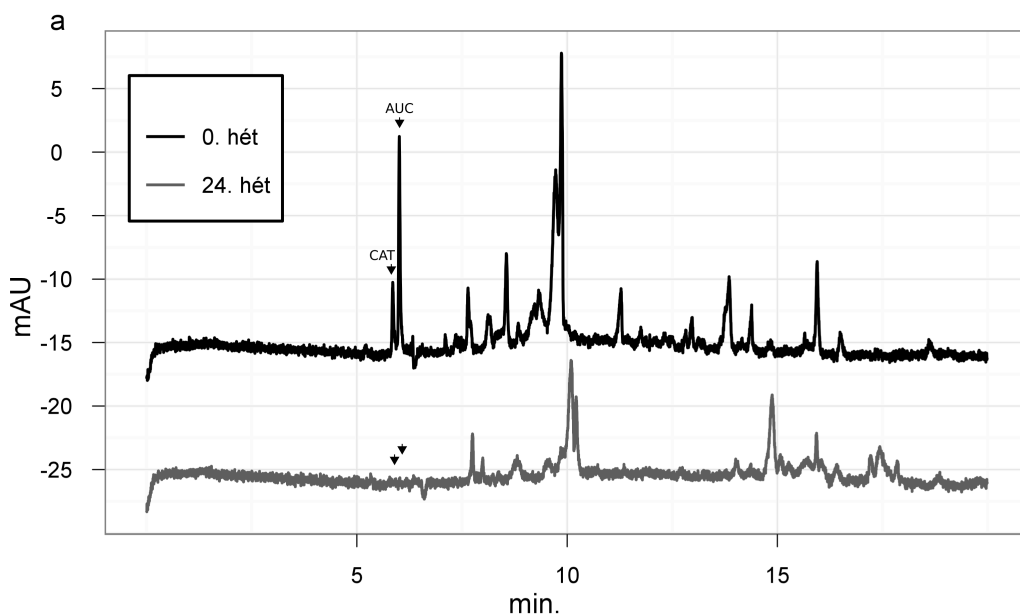
Species	Potenciális egészségügyi rizikó	Ref.
<i>Aspergillus niger</i>	ochratoxin A-t (nefrotoxikus) fumonisin B <sub>2</sub> -t (karcinogén) termelő törzse ismert	(Abarca et al., 1994), (Frisvad et al., 2007), (Duarte et al., 2011), (Logrieco et al., 2011)
<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	Sporidezmint (gyulladásos kórképek – állatokon) termelő törzse ismert	(Russomanno et al., 2003)
<i>Aspergillus nidulans</i>	Szterigmatocisztint termelő törzse ismert (karcinogén)	(Georgianna & Payne, 2009), (Wang & Groopman, 1999)
<i>Eurotium amstelodami</i>	Intenzív spóraképzés (farmer's lung disease); ochratoxint, szterigmatocisztint (karcinogén) termelő törzse ismert	(Roussel et al., 2005), (Al-Julaifi, 2003), (Rank et al., 2011)
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	Idáig nem ismert	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	roafortin C-t termelő törzse ismert (csak enyhén toxikus)	(Finoli C. et al., 2001), (Nielsen et al., 1999)
<i>Bipolaris tetramera</i>	Idáig nem ismert	
<i>Epicoccum nigrum</i>	Idáig nem ismert	
<i>Eurotium repens</i>	Intenzív spóraképzés (farmer's lung disease)	(Roussel et al., 2005)

Ugyanakkor e fajok elszaporodása és esetleges toxintermelése, spóráképzése egészségügyi rizikót rejthet (lsd. 8. táblázat). Az *Eurotium* fajok képesek igen alacsony vízmennyiséget tartalmazó táptalajon is növekedni (Butinar et al., 2005), így valószínűleg kulcsfontosságúak a tároláskor bekövetkező fonalas gomba-szaporodásban. Fontos megjegyezni azt az *Aspergillus niger* kapcsán leírt jelenséget is, hogy fumonisin termelése alacsony vízáktivitású táptalajon a legjobb (Frisvad et al., 2007), amilyen egy rehidrálódott gyógynövény alapanyag is.

Összességében elmondható, hogy a kolonizáló gombafajok magas RH okozta növekedése potenciális mikotoxin termeléssel és allergiás reakciók kiváltására képes spórázással párosulhat, így az alacsony páratartalmú levegőn való tárolás mikrobiológiai szempontból igen fontos a gyógynövény terápiás értékének megtartásában.

### **3.2.3. Változások a bioaktív molekulák koncentrációjában**

A jól látható változások mellett a magas RH komoly kémiai változásokat is okozott a *P. lanceolata* levelekben, mint az a különböző időpontokban vett minták extraktjainak analiziséből jól látható (9. ábra). Az IG-k szintjét erősen befolyásolta a nagy RH kezelés ( $p < 0,001$ ). Az AUC esetében a kezdeti koncentráció 95,7%-a bomlott el 24 hét alatt, míg a 45% RH-n tárolt rendszerben a veszteség csak 4,5% volt (10. ábra.). A katalpol esetében 97% és 33,5% volt a kiindulási koncentrációhoz képest mért veszteség 75 és 45% RH-n (10. ábra.). A CPG bioszintetikus csoporthoz tartozó akteozid szintje 70,5%-kal csökkent a magas páratartalmú levegővel kezelt gyógynövényben (10. ábra.). Mindhárom metabolit esetében nagyon hasonló trendek voltak megfigyelhetőek a 45% RH-n inkubált drogban, mint a kontrollban. A változások általában inszignifikánsak ( $p > 0,05$ ), de mindig elhanyagolhatóak voltak a 75% RH-n történt változásokhoz képest.

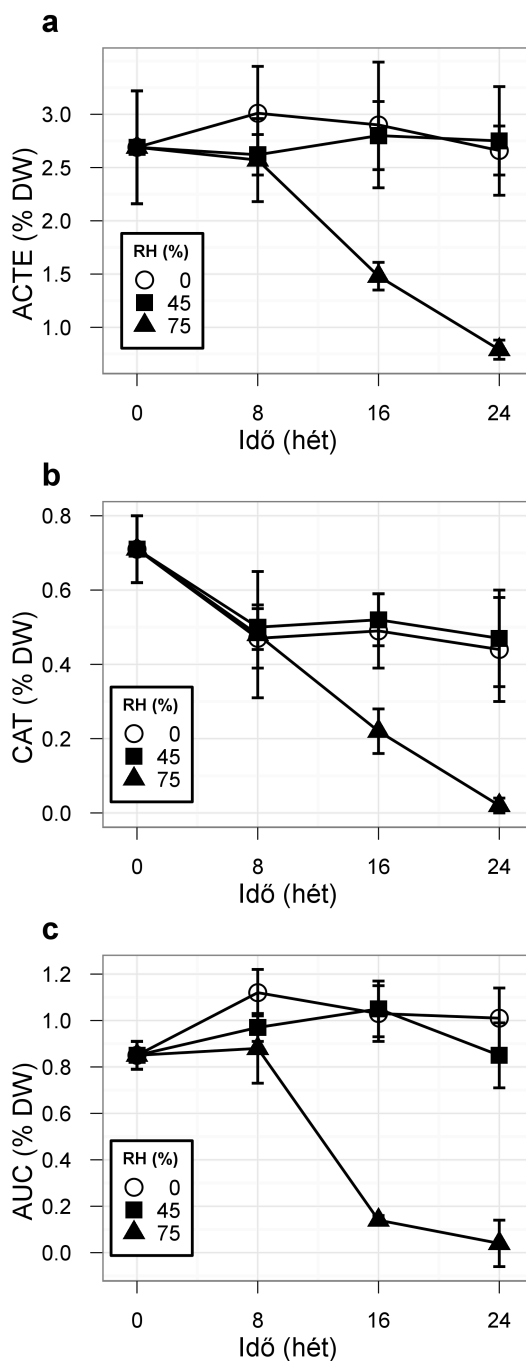


9. ábra. Magas (75%-os) páratartalmú levegőn inkubált *P. lanceolata* levelek kémiai mintázatának változása. A két elektroferogram 0. és 24.heti mintából készült. Az iridoidokat nyilak jelölik: AUC, aukubin; CAT, katalpol.

A gyógyszerkönyvi minőség feltétele *Plantaginis lanceolatae folium* esetében a min. 1,5% száraz tömegre vetített akteozid-ekvivalens orto-dihidroxi-fahéjsav-észter és az aukubin kimutathatósága. Így a minták a különböző RH-jú közegben való inkubáció alatt gyógyszerkönyvi minőségüket bioaktív metabolitjaik szempontjából is elveszítették.

Ezen kémiai változások rávilágítanak az RH jelentőségére a tárolás folyamán, illetve monitorozásának fontosságára. A bioaktív metabolitok nem tudják tolerálni a hosszú idejű víz-expozíciót. Egy háztartásban is gyakran előforduló (Zhang & Yoshino, 2010) RH már agresszív tényezőnek számíthat egy gyógynövény-drog stabilitása szempontjából, mind mikrobiológiai, mind kémiai értelemben.

Ezt az általános jelenséget leírták más metabolitokra is, pl. tea katechinekre (Ortiz et al., 2008) és flavonoid glikozidokra (Heigl & Franz, 2003) gyógynövényekben, de a probléma hátterét e szerzők nem vizsgálták meg részletesen.

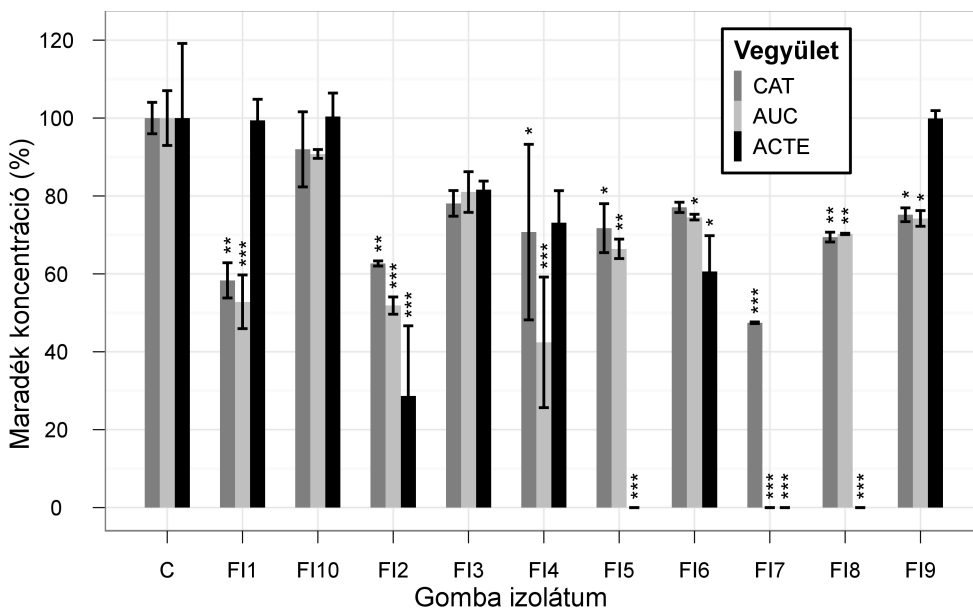


10. ábra. Bioaktív szekunder metabolitok koncentrációjának változása különböző páratartalmú (RH) levegőn történő inkubáció hatására, *P. lanceolata* szárított levelekben. a., akteozid; b., katalpol; c., aukubin

### 3.2.4. A fonalas gombák szerepe a hatóanyagok degradációjában

A gomba CFU növekedése (8. ábra) és a kémiai szintváltozások (10. ábra) között egyfajta egyidejűség figyelhető meg: a 8. hétig nincs sem komolyabb hatóanyag-degradáció, sem intenzív gombaproliferáció. Ezután az élő csíraszám hirtelen megemelkedik és a hatóanyagok is bomlásnak indulnak, ez különösen az AUC esetében jól megfigyelhető, de az ACTE esetében is látható. Hogy kiderüljön, milyen szerepet játszanak a fonalas gombák a hatóanyag-degradációban, modell oldatokat készítettünk: a *P. lanceolata* steril, vizes kivonatát inkubáltuk a drogból izolált fonalas gomba törzsekkel. Az inkubáció rövid ideig zajlott, mivel az izolált törzsek igen gyorsan növekedtek a gyógynövény extraktban, amely – sok proteint, poliszacharidot és egyéb molekulát tartalmazván - igen gazdag táptalajnak bizonyult. A hatóanyagok degradációját maradék %-ban kifejezve a 11. ábrán láthatjuk. A tízből hét vonal volt képes mindkét IG degradációjára *in vitro* ( $p < 0,05$ ). A legtöbb izolált törzs a két IG-t hasonló hatékonysággal, míg a *Eurotium amstelodami* és a *Bipolaris tetramera* törzs az AUC-t a CAT-tól hatékonyabban bontotta el. Tízből öt vonal volt képes az ACTE bontására a modell oldatokban, ebből három gyakorlatilag a teljes mennyiséget elbontotta az ábrán látható 9. napra ( $p < 0,001$ ). Három vonal ugyanakkor nem tudta csökkenteni ennyi idő alatt az ACTE koncentrációját a modell oldatokban ( $p > 0,05$ ). Mivel a kontrollokban nem történt szignifikáns változás a 9 nap alatt, elmondható, hogy a víz önmagában nem képes erőteljes metabolit destrukciót okozni, vagy hatása, mint reakciópartner minimális. Hatását valószínűleg inkább mint szaporodást és mikrobiális enzimmunkát elősegítő (Janda et al., 2009), (Janda-Ulfig et al., 2009) közeg fejt ki. Mivel a különböző metabolitokkal szemben törzsenként rendkívül variabilis a bontó aktivitás, elmondható, hogy a gombaflóra összetétele rendkívüli módon befolyásolhatja a növényi drogok stabilitását. A hatóanyagok stabilitásának szempontjából nem csak a potenciális humán egészségügyi kockázatot hordozó fajok (*Aspergillus niger*, *Leptosphaerulina chartarum*) jelentősek. A hatóanyagokat viszonylag kis hatékonysággal bontották az *Aspergillus nidulans* és a két izolált *Eurotium repens* vonal, a hatásuk az egyik *E. repens* vonal IG bontó képességét leszámítva nem szignifikáns. Az általunk végzett tesztben a növénypatogénként ismert *Bipolaris tetramera* és *Epicoccum nigrum*, és a szintén növényeken leírt *Cladosporium pseudocladosporioides* jelenléte csökkentette legjobban a hatóanyagok stabilitását (11. ábra). Valószínűsíthető, hogy a növény(b)en való életben maradás és szaporodás feltétele a növényi védekező metabolitokat bontani képes enzimek termelése. E fajok elszaporodása a növényi hatóanyagok nagyon gyors degradációjához vezethet. Az a tény, hogy az iridoidok sokkal több gomba vonallal szemben érzékenyek voltak, magyarázhatja a jelenséget,

hogy míg az IG-knek gyakorlatilag teljes mennyisége degradálódott a 24 hetes periódus alatt, az akteozid viszonylag stabilabb volt.



11. ábra. A gombaizolátumokkal beoltott steril modelloldatokban maradt metabolitmennyiség 9 napos inkubációs idő után. AUC, aukubin, CAT, katalpol, ACTE, akteozid; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . Az izolátumok: FI1, *Aspergillus niger*; FI2, *Leptosphaerulina chartarum*; FI3, *Aspergillus nidulans*; FI4, *Eurotium amstelodami*; FI5, *Cladosporium pseudocladosporioides*; FI6, *Penicillium chrysogenum*; FI7, *Bipolaris tetramera*; FI8, *Epicoccum nigrum*; FI9, *Eurotium repens*; FI10, *Eurotium repens*, C: kontroll.

Munkánkban megmutattuk, hogy a bioaktív molekulák (IG-k és akteozid) gyógynövényekben való instabilitásának kulcsszereplői a kolonizáló mikroorganizmusok, a fonalas gombák. Ennek számos lényeges következménye van. Először is, a gombák nem csak a sokat hivatkozott mikotoxin-termelésük miatt fontosak egy gyógynövény minőségének szempontjából (lsd.pl. (Kneifel et al., 2002), (Kosalec et al., 2009)). Másodszer, a gombák kontrollja és esetleges monitorozásra később ipari, preparatív vagy egyéb, nem-terápiás célra történő felhasználás esetében is fontos, a humán egészség szempontjából esetleg veszélytelen fajok esetében is. Harmadszor pedig, a mikrobiális aktivitás csökkentése és az élő csíraszám redukciója emelheti a gyógynövény drogok stabilitását. A metabolit bomlás elkerülése, és így a drog terápiás és kereskedelmi értékének megtartásához tehát a gombák proliferációját meg kell gátolni, pl. alacsony ( $\leq 45\%$ ) RH-n való tárolással.

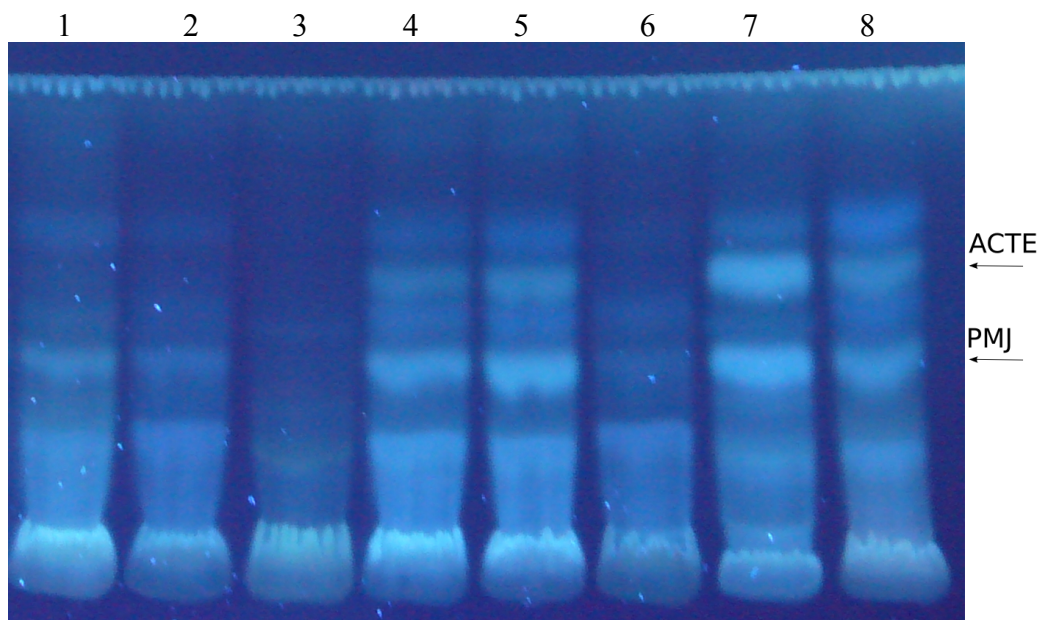


### 3.3. *P. lanceolata* kalluszk vizsgálat

*P. lanceolata* magokból sikeresen hoztunk létre fenntartható növényi szövettényészetet. Előbb a kalluszindukcióhoz és fenntartáshoz optimális hormonkombinációt határoztuk meg irodalmi adatokból és kísérletekkel egy populáció sok egyedéből indított vonalakon, majd az optimálisnak talált táptalajon indukálva és nevelve számos vonal közül kiválasztottunk egy gyorsan növekedő, és hatóanyagokat megbízhatóan termelő vonalat (12. ábra) (VRK analízis) és további kísérleteinket e kultúrán végeztük el. Az optimális hormonkombinációnak mind indukcióra, mind kalluszfenntartásra az 1 mg/L 2,4-D és 0,1 mg/L BAP bizonyult,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  mentes MS-en.

#### 3.3.1. *P. lanceolata* kalluszk kémiai karakterizálása

A *P.lanceolata* kalluszkokból sikerült kimutatni az akteozidot (ACTE) és a plantamajozidot (PMJ), melyek a fenil-propanoid-kávésav-észter vegyületek közé tartoznak (12.ábra).



12. ábra. Különböző vonalak VRK analízisének eredménye. Jól megfigyelhető a változatos metabolit-szintetizáló kapacitás. 1-4. lomblevél eredetű kalluszvonalak, 5-8. sáv: gyökér eredetű kalluszvonalak. ACTE, akteozid; PMJ, plantamajozid.

A fitokémiai screening-vizsgálatban felhasznált mintákból VRK-s mérések alapján választottuk ki azokat a terepi levélmintákat, amelyek tartalmazták a kalluszokban is előforduló két fő komponenst.

Az ACTE-t *P. lanceolata*, a PMJ-t *P. major* fajok leveleiből tisztítottuk meg. A fajok összevetéséhez is alkalmazott VRK-s analitikai módszerrel és a standardok tisztításánál leírt HPLC-s eljárással, a kalluszok MeOH-os extraktjához tiszta standardet adva igazoltuk, hogy a mátrixban e vegyületek vannak jelen. A kalluszok kémiai mintázata a *P. lanceolata* levelekhez képest viszonylag egyszerű, e két vegyület jelenti a MeOH-os extrakt főbb komponenseit, HPLC-s és VRK-s vizsgálatok alapján.

A vegyületek megfeleltek a mások által akteozidra és rokon vegyületeire között UV spektroszkópiai adatoknak (Kurkin, 2003), hidrolízisük során standard mellett sikerült kimutatni vékonyrétegen a kávésav aglikont (Sigma-Aldrich) (2.ábra), illetve szintén vékonyrétegen a rájuk jellemző cukrokat (ramnóz és glükóz (Reanal) az akteozid, illetve glükóz a plantamajozid esetében). A pontos azonosítás céljából a két vegyületet MALDI és NMR vizsgálatoknak vetettük alá.

A MALDI spektrum mindkét esetben egy vegyület jelenlétét igazolta a tisztított frakcióban, mindkét esetben a vegyületek  $M+Na^+$  csúcsának megfelelő jel volt a legintenzívebb, ACTE: 647,10 m/z, PMJ: 663,08 m/z. Ezen kívül más, kisebb csúcsok is megjelentek, pl.  $M+K^+$ : 663,08 (ACTE) , ill. 679,03 (PMJ).

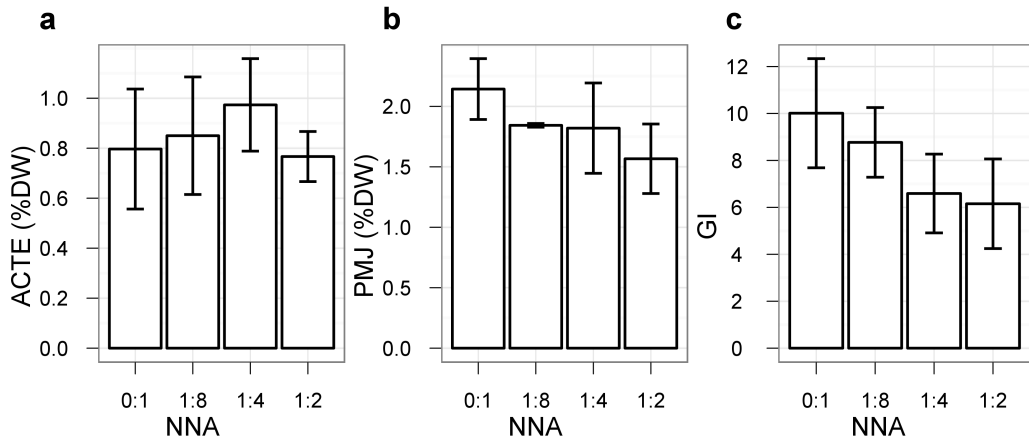
A  $^1H$  és  $^{13}C$  NMR spektrumok elemzése alapján a két vegyület megfelel a korábbi publikációkban leírt akteozidnak és plantamajozidnak (Li et al., 2009), (Schlauer et al., 2004).

### **3.3.2. *P. lanceolata* kalluszok növekedésének és hatóanyag-termelésének változása $NH_4^+/NO_3^-$ változtatásának hatására**

Gyökér eredetű *P. lanceolata* kalluszokban vizsgáltuk számos tényező hatását a hatóanyagok szintjének növekedésére. Pilótakísérleteinkben számos kémiai és biológiai ágenst alkalmaztunk a hatóanyag-termelés növelésére, azonban ezek többsége a növekedést nagyon kedvezőtlenül befolyásolta. A hatóanyag-modulációra legalkalmasabb kezelésnek előkísérleteink alapján a N forrás változtatása bizonyult, így a fő CPG metabolitok (PMJ és ACTE) szintjére és a kalluszok növekedésre ezt vizsgáltuk meg.

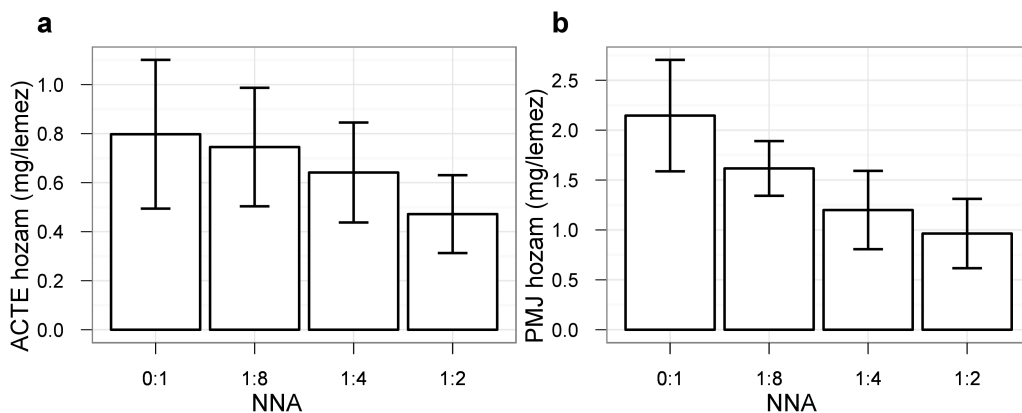
Az  $NH_4^+ / NO_3^-$  arány (NNA) és az összes N forrás befolyásolta a kalluszok növekedését ( $p < 0,01$ ), a PMJ tartalmat ( $p < 0,01$ ), de szignifikánsan

nem változtatta meg az ACTE szintjét a kalluszokban ( $p > 0,05$ ). A NNA változtatásának hatását a 13. ábrán mutatjuk be.



13. ábra. A különböző  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  arányú (NNA), 20 mM összes N-t tartalmazó MS táptalajokon nevelt *P. lanceolata* kalluszok vizsgált paramétereit. a., akteozid-tartalom; b., plantamajozid-tartalom; c., növekedési index (GI).

Mint látható, a nagyobb  $\text{NH}_4^+$  koncentráció azonos mennyiségű N forrás mellett csökkent növekedéssel és enyhén csökkent PMJ termeléssel párosul. Míg 20 (0:1) táptalajon a növekedési index  $10,01 \pm 2,32$ , addig 1:2 NNA mellett már csak  $6,15 \pm 1,90$ . A PMJ termelésnek sem kedvezett a magasabb NNA,  $2,14 \pm 0,25$ -ről  $1,56 \pm 0,28$ -ra csökkent. Az akteozid szintjében ugyanakkor trendszerű változás nem figyelhető meg.



14. ábra. Az akteozid és plantamajozid elméleti hozama *P. lanceolata* gyökér eredetű kalluszokban Petri-csészéknént, különböző  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  arányú (NNA), 20 mM N-forrást tartalmazó táptalajokon. a. akteozid; b., plantamajozid.

Az általánosan használt átoltási mennyiségekből (200 mg nyers tömeggel számoltunk), a növekedési indexből és egy tipikus szárazanyag-tartalomtól kiszámolható a tiszta metabolit elméleti hozama, amit mg CPG / Petri-csésze / 4 hét-ben megadva ábrázoltunk, a NNA függvényében (14. ábra). Mint látható, mindkét vegyület hozama csökken magasabb  $\text{NH}_4^+$ -ot tartalmazó táptalajokon, ami főleg a növekedés gátlásának tudható be, azonban sokkal kifejezettebb PMJ esetében, ahol a száraz tömegre vetített PMJ tartalomra önmagában is hatással volt a különböző NNA. Mindkét vegyület esetében kb. kétszerese a maximális hozam az általánosan használt MS mediumban használt 1:2 arányhoz képest. Optimálisnak a hatóanyag-hozam szempontjából a 0:1 arányt találtuk ( $\text{NO}_3^-$  mint önálló N-forrás), a kísérleteket ezzel a paraméterrel folytattuk tovább.

Magát az NNA hatást a hatóanyag-termelésre több növényi szövettenyészetben leírták már, akár csak a N-szint hatását (pl. (Cui et al., 2010), (Fujita et al., 1981)). A hatás okai között szerepelhet az a leírt tény, hogy a szövettenyészetek hatóanyag-termelése általában akkor intenzívebb, ha kisebb a növekedési ráta, illetve éhezési stresszhez is köthető, a magas  $\text{NH}_4^+$  okozta valószínűleg a szövettenyészetekben leírt direkt toxikus hatásnak és a puffer-sajátságaiában bekövetkezett változásának tudható be (George et al., 2007, p.71). Az eredeti MS 1:2 NNA-ja számos fajból készült tenyészet számára nem optimális, pl. (Wang & Tan, 2002), (Zhong & Wang, 1998).

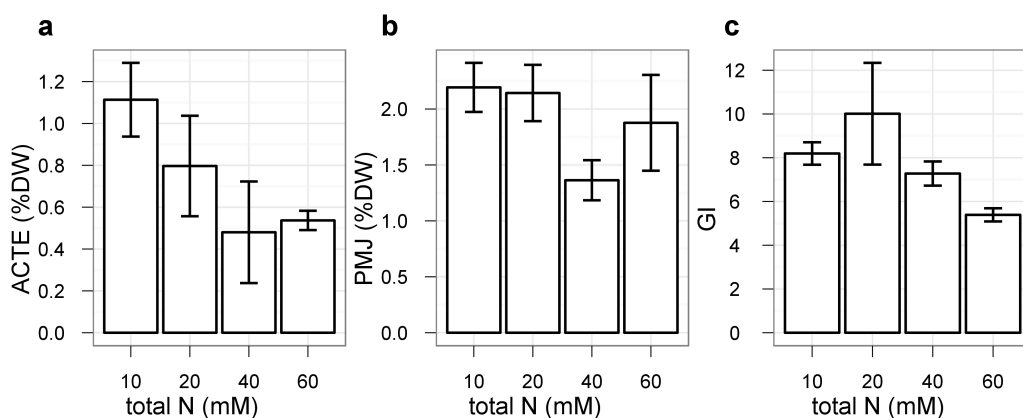
Az  $\text{NH}_4^+$ -al és  $\text{NO}_3^-$ -tal bevitt ellenionok hatását is megvizsgáltuk statisztikai modellel (ANCOVA). A bevitt koncentrációkban sem a  $\text{Na}^+$ -nak,

sem a Cl<sup>-</sup>-nak nincs hatása a növekedési indexre ( $p > 0,05$ ), ami megfelel a Na<sup>+</sup> és a Cl<sup>-</sup> szövettenyészetekre való kis hatásának e koncentrációban.

### 3.3.3. *P. lanceolata* kalluszk hatóanyag-termelésének és növekedésének változása az összes N forrás változtatásának hatására

Miután az NH<sub>4</sub><sup>+</sup> mentes 20 mM összes N-t tartalmazó MS variánst találtuk optimálisnak, a teljes N-forrás koncentrációjának hatását is megvizsgáltuk. Ezen paraméter változtatása is hatással volt mind a metabolit termelésre, mind a növekedésre ( $p < 0,01$ ).

Megfigyelhető, hogy a növekedési indexek változását okozta a teljes N-forrás mennyiségének változtatása (15. ábra). Optimálisnak a 20 mM N bizonyult a növekedés szempontjából, de 10 és 40 mM N-forrás tartalmú táptalajon is magas volt a növekedési index. Az akteozid szintjét komolyan befolyásolta ( $p < 0,05$ ) az alkalmazott összes N forrás, a legmagasabb szint ( $1,11 \pm 0,17$  % DW) 10 mM N-forrás mellett volt elérhető, ami jóval több, mint a 20 mM N táptalajon nyert mennyiség. A PMJ szintjét nem befolyásolta szignifikánsan a N-forrás mennyisége, a 40 mM N-t tartalmazó táptalajt kivéve magas értékek voltak jellemzőek. A legtöbb PMJ-t a 10 mM N-t tartalmazó táptalajon nevelt kalluszk termelték,  $2,19 \pm 0,21$  %-ot.

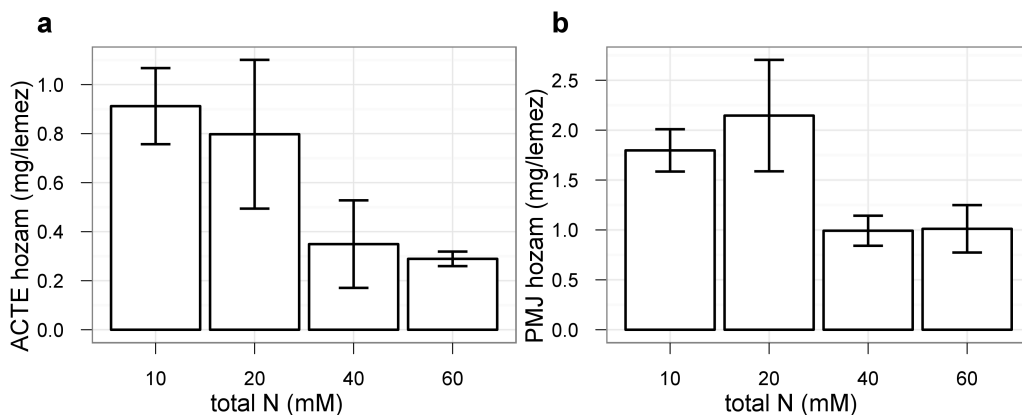


15. ábra. *P. lanceolata* gyökércalluszk paraméterei, különböző koncentrációjú N-forrást tartalmazó, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> mentes MS táptalajokon. a., akteozid tartalom; b., plantamajozid tartalom; c., növekedési index.

Az elméleti hozamokat kiszámítva (16.ábra) azt látjuk, hogy az akteozid hozama a 10 (0:1), míg a PMJ hozama a 20 (0:1) MS variánsokon a legnagyobb, rendre  $0,91 \pm 0,16$  és  $2,14 \pm 0,56$  mg / lemez a már említett körülmények között.

A termelt metabolit-mennyiség ugyan kisebb, mint a *P. lanceolata* hairy root kultúrákban képződött PMJ mennyiség (Fons et al., 1999) ugyanakkor nagyságrendileg megegyezik vagy felül is múlja a terepi minták leveleiből előállítható mennyiséget (Sun et al., 2010), (Zubair et al., 2011).

Az NNA és az összes N-forrás módosításával alapvetően befolyásolható a PMJ és ACTE aránya, valamint - bár azonos bioszintetikus vegyületcsaládba tartoznak - szintjük nem változik párhuzamosan. A különböző kezelésekre való válaszreakció eltér a két vegyületnél: míg a PMJ szintézise főleg az NNA-val volt befolyásolható és a teljes N forrásra nem reagált, az ACTE esetében ennek éppen ellenkezője figyelhető meg. E jelenség a két vegyület szintézisének eltérő regulációjára utalhat, amit az is alátámaszthat, hogy a terepi *P. lanceolata* mintákban sosem tudtunk PMJ-t kimutatni (5.táblázat), az akteozid viszont mindig detektálható volt, holott mindkét vegyület szintéziséhez szükséges gének minden bizonnyal megvannak.



16. ábra. *P. lanceolata* gyökér-kalluszok elméleti hatóanyag-hozama különböző koncentrációjú N-forrást tartalmazó,  $\text{NH}_4^+$  mentes MS táptalajokon, Petri-csészénként. a., akteozid-hozam; b., plantamajozid-hozam.

A rendszer hozamának változását megvizsgálva arra a következtetésre juthatunk (14. és 16. ábra), hogy a hozam jól optimalizálható a szervesetlen N-forrás módosításával. Az optimalizált szövettenyészet egyszerre erőteljes

növekedésű és jó relatív hatóanyag-tartalmú kell, hogy legyen, amelynek megvalósítása két egyszerű paraméter változtatásával elérhető volt. A két vegyület (PMJ és ACTE) esetében más-más táptalaj ill. táptalaj típusok voltak optimálisak.

## 4. Anyag és módszer

### 4.1. Vegyszerek, általánosan használt eljárások

Az általánosan használt szerves sókat, stb. a Reanal-tól szereztük be, analitikai minőségben. A szerves oldószereket a Spektrum 3D kft-től vagy a Carl Roth-tól vásároltuk, általában puriss., vagy „rectapur” minőségű oldószerekkel dolgoztunk, kivéve az acetonitril a HPLC-s vizsgálatokhoz és a metanol a preparatív munkához, melyek HPLC grade minőségűek voltak. Vízként bidesztillált vizet használtunk.

Sterilizéshez SANYO LABO autoclave MLS-3780 autoklávot használtunk (121 °C, 21 min), hőérzékeny vegyületek oldatait (hormonok a növényi szövettenyészetekhez stb.) regenerált cellulóz szűrőn (0,2 µm) szűrtük sterilre.

A speciális vegyszereket a későbbi módszertani fejezetben részletezzük.

### 4.2. Növényi anyag

Munkánkhoz a növényi anyagot különböző helyekről szereztük be. A fajösszehasonlításához a leveleket a régió több pontjáról szedtük, bár nem volt célunk a különböző populációk fajon belüli összevetése. A növények leveleit a késő virágzás - kora termésérés stádiumában szedtük az azonosíthatóság miatt, 2008 nyarán. A *P. lanceolata*, *P. altissima*, *P. major*, *P. media*, *P. maritima* fajok azonosítása (Simon, 2004, pp.419-422) alapján történt. Gyűjtési helyeink között Hajdúsámson (+47° 35' 42,39", +21° 44' 21,08"), Mikepércs (+47° 28' 16,15", +21° 38' 9,96"), Nádudvar (+47° 26' 32,95", +21° 8' 35,12"), Mátraháza (+47° 52' 12,26", +19° 58' 52,93"), Budapest (+47° 28' 48,63", +19° 6' 24,81"), Jászapáti (+47° 30' 5,57", +20° 9' 16,42"), Tépe (+47° 19' 15,47", +21° 33' 42,37") és néhány Debrecen beltüreltén vagy határában lévő pont (+47° 33' 39,62", +21° 26' 18,30", +47° 33' 22,68", +21° 37' 12,11", +47° 35' 21,66", +21° 35' 2,58") szerepeltek. Minden fajt legalább 4 populáció prezentált a fajösszehasonlító vizsgálatokban. A nyers leveleket 50 °C-ot meg nem haladó hőmérsékleten szárítottuk.

A hatóanyag-stabilitást célzó vizsgálatainkhoz a növényi anyagként gyógyszerkönyvi minőségű *Plantaginis lanceolatae folium*-ot vásároltunk. Az anyag megfelelt az általunk vizsgált paramétereknek (szín, morfológiai vizsgálatok, kvalitatív és kvantitatív kémiai vizsgálatok, a gyógyszerkönyv szerint).

A szövettenyészetek indításához a Hajdúsámson határában található nagy *P. lanceolata* populációból szedtünk magot 2007 novemberében.



### 4.3. Kaffeoil feniletanoid észterek preparatív előállítása

Az akteozid és a plantamajozid tisztítása teljesen analóg módon történt. Az akteozid tisztításhoz *P. lanceolata* leveleket (kereskedelmi minta), a plantamajozid tisztításához *P. major* (Debrecen melletti gyűjtés, 2008) leveleket használtunk kiindulási anyagként.

30 g *Plantago* levelet kivontunk 3x100 ml forró MeOH-al, majd a szűrt folyadékhoz vizet adtunk. A szuszpenziót centrifugáltuk, a felülúszót szárazra pároltuk vákuumban, újra szuszpendáltuk vízben (20-30 ml) és hexánnal tisztítottuk (3-4x10 ml). A vizes fázisból vákuumban eltávolítottuk a hexán maradékát, ezután dietil-éterrel, majd n-butanollal extraháltuk. Az egyesített BuOH-os fázisokat Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-on szűrtük és szárazra pároltuk.

A BuOH-os fázist MeOH-ban oldva (5-10%) saját készítésű preparatív vékonyrétegen választottuk frakciókra (20x20 cm, 12 g Merck szilikagél 60, kb. 1 mm vastag réteg). Egy rétegre kb. 50 mg mintát vittünk föl, majd eluáltuk 2x EtOAc-aceton-Et<sub>2</sub>O-víz-TFA (trifluorecetsav) 8 : 6 : 1 : 1 + 0,1% keverékével. 356 nm-es UV fényben detektáltuk a CPG-k lehetséges zónáinak határát. A CPG zónák UV fényben intenzív kékeszöld fluoreszcenciát mutattak. Az akteozid és a plantamajozid R<sub>f</sub> értéke az adott rendszerben rendre kb. 0,7-nek és 0,55-nek adódtak. A CPG-t tartalmazó sávokat lekapartuk és MeOH-al vortexelve majd centrifugálva eluáltuk. A felülúszót poliamid 6 oszlopokra vittük, több részletben (60 ml, kb. 12 g poliamid 6, 0,05-0,16 mm, Macherey Nagel MN-PA SC 6). A frakciók CPG tartalmát az 50x és 100x hígított eluátum spektrofotometriás vizsgálatával monitoroztuk, 330 nm-en (Kurkin, 2003). Ezen kívül az összegyűjtött frakciók analitikai vékonyrétegen is vizsgálatra kerültek (lsd. 4.4.). Az elúció tiszta MeOH-al történt, a CPG-k 1,1-1,2 volumen oldószernél eluálódtak, ami megfelel a poliamid vékonyrétegen MeOH-al történt elúcióban látható R<sub>f</sub> 0,9-0,95 értéknek.

A CPG-ben gazdag frakciókat összegyűjtöttük, majd bepároltuk és reszuszpendáltuk 20% acetonitrilben. Az oldat felülúszóját szemipreparatív HPLC-vel tisztítottuk meg (1,5 ml / perc áramlási sebesség), izokratikus elúcióban, 20% acetonitrillel, Supelco Supelcosil LC-18 oszlopon (25 cm x 10 mm, 5 μm), Shimadzu SPD-M10A HPLC készüléken. Az akteozid retenciósideje 10,7 perc, a plantamajozidé 11,4 perc volt.

A CPG-ben gazdag frakciókat (egyező UV-Vis spektrum alapján) összegyűjtöttük, szárazra pároltuk és szerkezetazonosító vizsgálatoknak vetettük alá. Végző azonosításuk MALDI-TOF és NMR spektroszkópiával történt meg.

A MALDI-TOF vizsgálatokban nyújtott segítségéért köszönettel tartozunk dr. Gyémánt Gyöngyinek, az NMR vizsgálatok kivitelezéséért pedig dr. Batta Gyulának.

#### **4.4. Vékonyréteg kromatográfia, akteozid és plantamajozid mennyiségi meghatározása**

A gyógyszerkönyv által kvalitatív analízisre is alkalmazott módszert használtuk fel kvantitatív analízisre (Biringanine et al., 2006). A futtatószer EtOAc - HCOOH - AcOH - víz 100 : 11 : 11 : 27 arányú elegye, az állófázis szilikagél (Macherey-Nagel 200 µm vastag Silicagel 60 üvegen vagy alufólián). A kalibráció öt pontos kalibráció volt: a tisztított standardek különböző töménységű MeOH-os oldatait vittük fel a rétegre. Kvantitatív elemzéshez a réteget futás után 105 °C-on 5 percig hevítettük, majd CAMAG CABUVis transzilluminátorban 356 nm-es UV fényben megvilágítva fotót készítettünk róla és ezt digitálisan dolgoztuk fel, értékeltük ki a CP Atlas 2.0 szoftver segítségével.

Kvalitatív vizsgálatokhoz további előhívószereket használtunk: 1., Natural Product Reagent A (Carl Roth, NP), 2-amino-difenil-borinát 1%-os, EtOH-os oldata. 2., Vanillin-kénsav Vanillin (Reanal) 1%-os oldata EtOH és cc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10:1 arányú elegyében. Mindkét előhívószer színei hevítés hatására fejlődnek ki.

Kvantitatív ACTE és PMJ mérésekhez is ezt a rendszert használtuk, ilyenkor öt pontos kalibrációs egyenest készítettünk az ACTE és a PMJ különböző hígításaiból. A kvantitatív értékelés a réteg 105 °C-on történő hevítése után, egyéb előhívás nélkül történt meg.

#### **4.5. Iridoidok meghatározása kapilláris elektroforézissel**

Az aukubint és a katalpolt dr. Tóth László (Szegedi Tudományegyetem, GYTK, Farmakognóziai Intézet) bocsátotta rendelkezésünkre, a szerkezet bizonyítása korábban történt meg.

Az IG-k mennyiségi meghatározására (Suomi et al., 2000) módosított módszerét használtuk. A száraz, porított növényi anyag pontosan mért, kb. 50 mg-os részletét 1000 µl 10% n-propanollal vontuk ki 100 °C-on, 60 percen keresztül, 20 perc szobahőmérsékleten való állás után. A kivonószerként használt víz koszolvens-tartalmát optimalizáltuk, a 10% n-propanol adódott legmegfelelőbbnek.

A használt kapilláris elektroforézis készülék egy Prince CE-C 700 volt, DAD detektorral. A használt kapilláris egy 50 µm belső átmérőjű kvarc-kapilláris volt, az alkalmazott háttéreltroлит 25 mM Na-tetraborátot, 100 mM SDS-t tartalmazott, a pH-t 9,35-re állítottuk be (1M NaOH). Az iridoidok 10% n-propanolban felvett hígítási sorozatát használtuk kalibrációs egyenes felvételéhez. Az iridoidok kvantifikálása 200 nm-en történt.

#### 4.6. Összes CPG meghatározása spektrofotometriásan

Az Európai gyógyszerkönyv 6.2 Monograph No. 1884 alapján végeztük a vizsgálatot, egy kis-léptékű változatban. Röviden, 50 mg pontosan mért porított, száraz mintát kivontunk 1000 µl 50% EtOH-al (100 °C, 60 perc), majd 13000 rpm-en lecentrifugáltuk. A felülúszóból történt a mérés. A módszer összes orto-dihidroxi-kávéssav észtert mér, akteozidra vonatkoztatva. Röviden, 100 µl mintához először 200 µl 0,5 M HCl-t, majd 200 µl nitriles molibdenát-oldatot (10 g NaMoO<sub>4</sub>, 10 g NaNO<sub>2</sub> / 100ml), végül 200 µl 8,5% NaOH oldatot adunk. Az intenzív vöröses színt 525 nm-en kvantifikáljuk, keverés után azonnal. Minden mintához külön vak készítenő, amely az éles mintákkal azonos módon készül, kivéve, hogy a nitrites molibdenát oldat helyett ugyanannyi desztillált vizet adunk.

#### 4.7. Antioxidáns kapacitás vizsgálata CUPRAC assay-vel

Az assay részletes kémiai háttere és összevetése a gyakrabban használt antioxidáns-kapacitás mérő assayekkel megtalálható (Apak et al., 2007) munkájában. Röviden, Cu<sup>2+</sup>-neocuproin (Nc) (Merck) komplex oxidáló ágenszt adunk a hígított növényi extrakthoz. A komplex sztöchiometrikus reakcióban reagál polifenol jellegű vegyületekkel, termékként a komplexből Cu<sup>+</sup>-Nc keletkezik, melynek intenzív narancssárga színe 425 nm-en mérhető. A mérés olyan érzékeny, hogy a növényi kivonatok elnyelése 425 nm-en nem különíthető el az oldószerétől, így oldószer vakkal lehet végig dolgozni. A *Plantago* fajok szekunder metabolitjai közül a CPG-k és a flavonoidok reagálnak a reagenssel (Apak et al., 2007). A növény 50% EtOH-al készített kivonatait (ld. Összes CPG meghatározása spektrofotometriásan) használtuk az antioxidáns kapacitás mérésére, 100-szoros hígításban. Az értékeket AAEC-ban (aszcorbinsav ekvivalens antioxidáns kapacitás) adtuk meg, µmol / g száraz növényi tömegre vonatkoztatva. Kalibrációként aszcorbinsavból készült hígítási sort használtunk. Az assayben az aszcorbinsav trolox-ekvivalense 0,96 (Apak et al., 2007).

#### 4.8. *P. lanceolata* levelek stabilitás-vizsgálata magas páratartalmú levegőben

A növényi anyagot 24 hétre különböző páratartalmú levegőnek tettük ki, így 75±1, 45±1 % relatív páratartalmú (RH, relative humidity) levegőnek, kontrollként 0% RH-t alkalmaztunk (szilikagél). A konstans páratartalmat glicerín-víz elegyek biztosították exszikkátorokban, a vizsgálat végéig

folyamatosan monitoroztuk a páratartalmat kereskedelemben kapható páratartalom-mérővel. Minden mintavételi időpontban 3, összesen körülbelül 1 grammos mintát vettünk az inkubált növényi drog több pontjáról. A három mintát különválasztva, párhuzamosan kezeltük. A maradék vizet 50 °C-on való hevítéssel távolítottuk el, majd a mintákat elporítottuk. A mintákat ezután –24 °C-on tároltuk további vizsgálatokig.

#### **4.9. Növényi drogminták színének meghatározása**

A teljesen száraz növényi drogokat közvetlenül használtuk szín meghatározására. A minták reflektancia spektrumait egy Avantes-2048 száloptikás spektrofotométerrel készítettünk (Avalight-DHS (kombinált halogén és deutérium lámpa), 2048 pixeles CCD detektor). BaSO<sub>4</sub> szolgált fehér kontrollként, kikapcsolt készülék (nulla jel) fekete viszonyítási pontként. Az integrálási idő 140 ms volt. A 400 és 700 nm közötti spektrumrészleteket digitálisan alakítottuk CIELAB színparaméterekké (standard D65 megvilágítás) GNU Octave 3.0.1. ben, (Westland & Ripamonti, 2004) alapján. A műszert dr. Braun Mihály bocsátotta rendelkezésünkre, amit ezúton is köszönünk.

#### **4.10. Klorofill-típusú pigmentek kvantitatív meghatározása**

10 mg pontosan mért növényi drogot kivontuk 1000 µl acetonnal, 4 °C-on, egy éjszakán át. Centrifugálás és esetleg szükséges hígítás után felvettük a minták spektrumát egy Shimadzu UV-1601 spektrofotométeren, 550-től 750 nm-ig, 0,2 nm felbontással. A (Kupper et al., 2000) által leírt görbe-illesztési módszerrel a spektrumokból a klorofill a és b (Chl a, b), feofitin a és b (Pheo a, b) koncentrációja számolható. A görbeillesztési procedúrát „fityk” 0.8.8-1 szoftverrel végeztük, Marquardt legkisebb-négyzetösszeg algoritmussal. Tipikusan 0,98 fölötti R<sup>2</sup> értékeket kaptunk. Annak eldöntésére, hogy a fentiekén kívül más lényeges színes vegyület is zavarja-e a mérést, vékonyréteg kromatográfiás vizsgálatot is végeztünk, a Chl a, b és Pheo a, b voltak a legjelentősebb foltok a színes kivonatban.

#### **4.11. Gomba-telepképző egységek kvantifikálása a növényi drogban**

A növényi drog felszínén élő mikrobiális kontamináció mértékét élő gomba csíraszám számolással mértük. A módszer alapvetően a gyógyszerkönyvben leírt eljárás kisebb léptékben megvalósított változata. A száraz, porított drog pontosan mért, körülbelül 10 mg-os részletét 10 percig szuszpendáltuk puffertelt nátrium klorid-pepton oldattal (buffered sodium chloride peptone solution, BSCPS: pepton 1 g, NaCl 4,3 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7,2 g,

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3,6 g 1 liter táptalajhoz, pH 7,2 ± 0,2), majd annyira meghígítottuk, hogy 200 µl-ében max. 100 telepképző egység (colony forming unit, CFU) legyen. Ezután a megfelelő hígítás 500 µl-ét egy 9 cm-es Petri-csészékben 50 mg/l klóramfenikollal kiegészített Saboraud-Dextrose Agar-ra (kasein pepton 10 g, húspepton 10 g, glükóz monohidrát 40 g 1 literhez, pH 5,6 ± 0,2, 2% agarral szilárdítva) szélesztettük és 25 °C-on inkubáltuk a telepek megjelenéséig. A telepek általában 72 órán belül számolhatóak voltak.

#### **4.12. Fonals gomba-fajok izolálása *P. lanceolata* szárított levelekről**

A stabilitás-vizsgálatban inkubált drogok felszínéről számos gombavonal került izolálásra. A CFU számoló lemezekről (Izd. fentebb) tíz, külalakra különböző fonals gomba vonalat izoláltunk, és tisztítottunk meg sorozatos átoltásokkal. A gombák egy részét 0. heti, más részét intenzíven fertőzött (8.heti) mintákból izoláltuk. Az izolátumokat Czapek-Dox szilárd vagy folyékony táptalajokon tartottuk fenn (NaNO<sub>3</sub> 3 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, KCl 0,5 g, FeSO<sub>4</sub> 0,01 g, szacharóz 20 g 1 liter táptalajra, pH 6,8 ± 0,1, szilárd táptalajokat 2% agarral szilárdítottuk), nevelésük 22-24 °C-on történt.

#### **4.13. A *P. lanceolata* leveleket kolonizáló penészvonalak azonosítása**

Az izolátumokat minimál-nitrát táptalajon neveltük (Barratt et al., 1965), 10 g/l peptonnal kiegészítve, 28 °C-on, 300 rpm-en, 48 óráig. A genomi DNS-t a kimosott és liofilezett micéliumokból izoláltuk Genomic DNA Purification Kit (Fermentas) segítségével, a gyártó instrukciói szerint. A kiválasztott DNS szekvenciák felszaporításához a következő primer párokat és anellációs hőmérsékleteket használtuk: ITS1, ITS4, (ITS-I; 55 °C; (White et al., 1990, pp.315-322)), Bt2a, Bt2b (β-tubulin; 56,4 °C; (Glass & Donaldson, 1995)), cmd5, cmd6 (calmodulin; 52,3 °C; (Hong et al., 2005)) and EF1-728F, EF'-986R (translation elongation factor 1α; 55 °C; (Carbone & Kohn, 1999)).

A PCR assayt (50 µl) 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM primer (egyenként), 0,1 mM dNTP és 2 U Taq polimeráz alkalmazásával kivitelezettük, egy fűtött tetővel ellátott ciklikus termosztátban. A PCR reakció lépései a következők voltak: 1., kezdeti aktiváló lépés (95 °C, 5 perc); 2., DNS denaturáció (95 °C, 45 s); 3., kapcsolódás: T<sub>m</sub> – (2-5) °C (Izd. fentebb); 4., elongáció; (72 °C, 1 perc 20 s), 35 ciklus; 5., végső elongáció, (72 °C, 10 perc). A PCR termékeket standard 1% agaróz gélelektroforézissel választottuk el TAE pufferben (800 µM Tris, 400 µM 100% ecetsav, 20 µM Na<sub>2</sub>-EDTA; pH 8,5). A tisztított sávokat (DNA Extraction Kit, Fermentas) az ABI Big Dye Terminator 3.1 Kit alkalmazásával szekvenáltuk meg egy automata DNS kapilláris szekvenáló (ABI PRISM

3100 – Avant) felhasználásával. A kapott szekvenciákat adatbázisokkal összevetve azonosítottuk a fajokat.

A fajok azonosításában való segítségéért köszönettel tartozunk dr. Emri Tamásnak.

#### **4.14. *P. lanceolata* metabolitok stabilitásának vizsgálata steril modell-oldatokban**

A lehetséges károsító tényezők feltárására steril modell oldatokat készítettünk. Röviden, a bioaktív IG-eket és akteozidot tartalmazó *P. lanceolata* vizes extraktot megfertőztük a levelekből izolált gomba vonalakkal. A kontrollokhöz steril desztillált vizet adtunk. 1000 µl-es oldatrészleteket inkubáltunk steril körülmények között,  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ -on, 9 napig.

A szubsztrátokat tartalmazó oldatot a következőképpen készítettük: 33,0 g *P. lanceolata* levelet kivontunk 350 ml vízzel, és 20000 rpm-en lecentrifugáltuk. Ez az arány hozzávetőlegesen tükrözi a növényben eredetileg meglévő száraz anyag-víz arányt. Az oldatot autoklávban sterilítettük ( $121^\circ\text{C}$ -on, 20 percig). Az inkubálást 6 ismétlésben végeztük – a minta 3 replikája IG meghatározásra, 3 replikája akteozid kvantifikálásra került. Az inkubáció alatt 50 µl-es mintákat vettünk az oldatokból. CE vizsgálathoz 10 µl 1-propanolt, VRK analízishez 50 µl etanolt adtunk a mintákhoz, majd 13000 rpm-en történő centrifugálás következett a felülúszók további felhasználása, a tulajdonképpeni analízis előtt.

#### **4.15. Növényi szövettenyészetek indítása és általános tenyésztési paraméterei és kémiai vizsgálatuk**

A *Plantago lanceolata* L. magjait 2x5 percig inkubáltuk kereskedelmi fertőtlenítőszer (Domestos) 10%-os oldatával, majd 5-7 alkalommal steril bidesztillált vízzel megmostuk, majd a magokat steril áramló levegőben szárítottuk meg.

A sterilizett magokat  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  mentes, Gamborg vitaminokkal és 2% szacharózzal kiegészített folyékony MS táptalaj (továbbiakban MS 20 (0:1)) 2 ml-ében csíráztattuk (Budzianowska et al., 2004). Az első valódi levél megjelenése után (kb. 11-14 nap) a növénykéek gyökeréből, szikleleveléből és leveléből vett explantokat kallusz-indukáló táptalajra helyeztük: MS 20 (0:1), 1 µg/ml 2,4-D, 0,1 µg/ml BAP hormonokkal kiegészítve. A teljes növényeket hormonmentes MS táptalajon neveltük tovább.

A szövettenyészetek fenntartása steril körülmények között történt, fehér fluoreszcens fény ( $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) és 14/10 órás (fény/sötét) fotoperiódus mellett. A hőmérsékletet állandó értéken tartottuk ( $22/18 \pm 2^\circ\text{C}$  fényben, ill. sötétben). A kallusz-tenyészeteket 4 hetes ciklusokban oltottuk át. Új kultúra indításához 100-250 mg nyers tömegű kallusz használtunk Petri-csészénként.

A szövettenyészetek kémiai analíziséhez a csipesszel learatott kalluszokat 4 óráig áramló meleg ( $50^\circ\text{C}$ ) levegőben szárítottuk, majd liofilezéssel távolítottuk el a maradék vizet. A mozsárban elporított kalluszok kivonása MeOH-al történt  $10 \text{ mg} / 200 \mu\text{l}$  oldószer arányban,  $100^\circ\text{C}$ -on, 60 percig. A felülúszókat  $-24^\circ\text{C}$ -on tároltuk az analízisig.

A növekedési indexet a következőképpen számoltuk: aratott tömeg / (aratott tömeg – kiindulási tömeg).

#### **4.16. $\text{NH}_4^+$ / $\text{NO}_3^-$ arány és összes N forrás hatása *P. lanceolata* kalluszok növekedésére és hatóanyag-termelésére**

A vizsgálatokat egy a vonalszelekció során hatóanyag-termelőnek és jól fenntarthatónak, jól növekedőnek bizonyult *P. lanceolata* kalluszvonallal végeztük el.

Az NNA és a N forrás hatásának meghatározásához különböző NNA-jú MS táptalajokat készítettünk. Az egyéb paramétereket változatlanul hagytuk (9. táblázat). A fenntartó táptalaj összetételéből kiindulva először az NNA-t optimalizáltuk, a tenyészet növekedését és hatóanyag-termelését. A kultúrát 0:1, 1:8, 1:4 és 1:2 NNA-jú táptalajokra (10. táblázat) oltva vizsgáltuk, 3 ismétléses kísérletben. Ezután a legjobbnak bizonyult NNA szinten módosítottuk az összes N forrás mennyiségét, a tenyészeteket 10, 20, 40, 60 mM N forrást tartalmazó táptalajokon neveltük (10. táblázat).

A különböző NNA-jú MS variánsokat az  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  és  $\text{KNO}_3$  sók helyettesítésével valósítottuk meg, a táptalajba az  $\text{NH}_4^+$  és  $\text{NO}_3^-$  ellenionjaiként  $\text{Na}^+$  és  $\text{Cl}^-$  került, amennyiben a kívánt arány elérése nem volt lehetséges  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -tal és  $\text{KNO}_3$ -tal önmagában, illetve ki kellett egészíteni az eredeti értékre a  $\text{K}^+$  koncentrációt. Így törzsoldatokként  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -ot,  $\text{KNO}_3$ -ot,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -ot,  $\text{NaNO}_3$ -ot,  $\text{KCl}$ -ot alkalmaztunk. A táptalajsorozat tagjait MS (összes N (mM),  $\text{NH}_4^+$  /  $\text{NO}_3^-$  arány) jelöléssel azonosítjuk, összetételük a 10. táblázatban szerepel.

## 9. táblázat

A Murashige-Skoog táptalaj összetétele (Murashige & Skoog, 1962). Az általunk alkalmazott táptalaj ezen kívül 2% szacharózt, és 0,8% agart tartalmazott, pH-ját autoklávozás előtt  $5,8 \pm 0,1$  értékre állítottuk be, 0,1 M NaOH-al. \*: a kísérlet során nem ilyen formában kerültek bemérésre, hanem más sok keverékeiként, lsd. 10. táblázat.

<b>Komponens</b>	<b>Bemért mennyiség (mg/l)</b>	<b>Koncentráció</b>
ammónium nitrát *	1650	20,61 mM
bórsav	6,2	100 $\mu$ M
kalcium klorid, vízmentes	332,2	2,99 mM
Kobalt-klorid • 6 H <sub>2</sub> O	25	0,11 $\mu$ M
Réz-szulfát • 5 H <sub>2</sub> O	25	0,1 $\mu$ M
Dinátrium-EDTA	37,26	100 $\mu$ M
vas(II)-szulfát • 7 H <sub>2</sub> O	27,8	100 $\mu$ M
Magnézium-szulfát • 7 H <sub>2</sub> O	180,7	1,5 mM
Mangán-szulfát • H <sub>2</sub> O	16,9	100 $\mu$ M
Na-molibdenát • H <sub>2</sub> O	0,25	1,03 $\mu$ M
Kálium-jodid	0,83	5 $\mu$ M
Kálium-nitrát *	1900	18,79 mM
Kálium-dihidrogán-foszfát	170	1,25 mM
Cink-szulfát • 7 H <sub>2</sub> O	8,6	29,91 $\mu$ M
Mio-inozitol	100	0,56 $\mu$ M
nikotinsav	1	8,12 $\mu$ M
piridoxin.HCl	1	4,86 $\mu$ M
tiamin	10	29,65 $\mu$ M



10. táblázat: A kezelésekben használt különböző MS táptalajvariánsok összetétele, N-tartalma és  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  aránya, valamint az eredeti MS medium összetétele. \*: az eredeti („alap”) MS táptalaj; \*\*: a vonal fenntartására használt táptalaj.

	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	$\text{KNO}_3$	$\text{NaNO}_3$	$\text{NH}_4\text{Cl}$	KCl	total $\text{NH}_4^+$	total $\text{NO}_3^-$	total N
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
MS 60 (1:2) *	20.63	18.80	0.00	0.00	0.00	20.63	39.43	60.06
MS 60 (0:1)	0.00	18.80	41.19	0.00	0.00	0.00	59.99	59.99
MS 40 (0:1)	0.00	18.80	21.20	0.00	0.00	0.00	40.00	40.00
MS 20 (1:2)	6.85	6.24	0.00	0.00	12.56	6.85	13.09	19.94
MS 20 (1:4)	3.96	12.03	0.00	0.00	6.76	3.96	15.99	19.95
MS 20 (1:8)	0.00	17.82	0.00	2.20	0.72	2.20	17.82	20.03
MS 20 (0:1) **	0.00	18.80	1.20	0.00	0.00	0.00	20.00	20.00
MS 10 (0:1)	0.00	8.80	1.20	0.00	10.06	0.00	10.00	10.00

#### 4.17. Statisztikai vizsgálatok

A többszintű kezelések adatait egy- vagy többutas ANOVA modellekkel elemeztük, majd többszörös összehasonlítást végeztünk (Tukey's HSD , illetve Dunnett teszt, egész tesztre vonatkozó szignifikancia szint  $p < 0,05$ ), ahol releváns volt. A teszteket R 2.11 programban végeztük el. Az összes szignifikancia szintet az eredmények után közvetlenül tüntettük fel, szignifikánsnak  $p < 0,05$  esetén tekintettük az eredményt.

## 5. Összefoglalás

Munkánkban a hazai *Plantago* fajok számos, egymástól független metodológiával történő vizsgálatát tűztük ki célul, így a tanulmányt három fő részre oszthatjuk.

Elsőként célul tűztük ki a hazai fajok regionális populációinak összehasonlító fitokémiai szkriningjét, kvantitatív hatóanyag-összevetését. Bár a *Plantago* fajok kémiaiailag jól jellemzett növények, a hazai fajok fitokémiai vizsgálata indokolt lehet minőségbiztosítási (fajok megkülönböztetése) és a népi gyógyászatban való esetleges alkalmazásuk miatt.

A több populációból gyűjtött *Plantago lanceolata*, *P. altissima*, *P. major*, *P. maritima* és *P. media* fajok szárított leveleinek kémiai mintázatát vékonyréteg-kromatográfiával (VRK), iridoid glikozid (IG) tartalmát kapilláris elektroforézissel, összes kaffeoil-feniletanoid-glikozid (CPG) tartalmukat és antioxidáns aktivitásukat (AAEAC, aszkorbinsav-ekvivalnes antioxidáns kapacitás) spektrofotometriás assay-vel vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy a regionális vad populációk alkalmasak lehetnek gyógyászati felhasználásra. Igen magas CPG tartalmat mutattak a *P. maritima* minták, amihez nagy AAEAC is társult. Az IG tartalom, a CPG tartalom és az AAEAC tekintetében a *P. altissima* alkalmasnak látszik *P. lanceolata* helyettesítésére. Az AAEAC nagyon jól korrelált a CPG tartalommal. A VRK mintázat-vizsgálat hierarchikus klaszteranalízisével megmutattuk, hogy az általunk használt VRK rendszer alkalmas a hazai, gyakori *Plantago* fajok elkülönítésére, kivéve, hogy a *P. lanceolata* és *P. altissima* elkülönítése nem volt lehetséges. A gyakran alkalmazott *P. major* levelei kevésbé mutatkoztak potens fitoterapeutikumnak e vizsgálat alapján (alacsony IG tartalom, alacsony CPG tartalom). A talált kémiai mintázat megfelel a korábban leírt kemotaxonómiai mintázatnak a *Plantago* fajokban.

Második fő célkitűzésünk egy stabilitás vizsgálat kivitelezése szárított növényi készítményen, melynek modelljéül a szárított *P. lanceolata* leveleket választottuk. A gyógynövények stabilitása a tudományos irodalom meglehetősen alulprezentált területe, akárcsak az instabilitás háttérében álló tényezők vizsgálata. A végtelen sok potenciális metabolit-metabolit interakció miatt a komplex mátrixokban (mint pl. egy növényi extraktban) lévő vegyületek stabilitása eltérhet a tiszta vegyületétől, szárított gyógynövényekben pedig a stabilitást növényi enzimek és mikroorganizmusok is változtathatják.

A *P. lanceolata* leveleket gyógyszerkönyvi minőségben szereztük be, és különböző relatív páratartalmú (RH) levegőn inkubáltuk (0, 45, 75 %). A 24 hetes inkubáció során számos minőségi paramétert kvantifikáltunk, így reflektancia-spektrofotometriával mértük a szín változását, telepképző egységek (CFU) számolásával a gombák mennyiségét, kapilláris elektroforézissel az IG

mennyiségét, VRK módszerrel az akteozid szintjének változását. Ezen kívül a mikrobiális flóra részleges jellemzését tűztük ki célul, *P. lanceolata* száraz levelekről 10 fonalas gomba vonalat izoláltunk és azonosítottunk molekuláris biológiai módszerekkel. A tapasztalt változások háttérében álló mechanizmusok kiderítésére kvantifikáltuk a klorofill-pigmentek mennyiségét, illetve az izolált fonalas gomba vonalakkal steril vizes *P. lanceolata* extraktokat inkubáltunk, hogy jellemezni tudjuk a gombák szerepét a hatóanyagok degradációjában.

A 75% RH kezelés könnyen észrevehető barnulást okozott a drogban, 45 és 0 % RH-n nem volt látható változás. Ezt kvantitatív adatokkal is alátámasztottuk, a CIEL\*a\*b\* színparaméterek meghatározásával, az a\* és b\* paraméterekben (vörös-zöld ill. kék-sárga színkoordináta) erős eltolódás jelentkezett 75% RH-n, a változás nagy része az első 8 héten ment végbe. 45% RH-n és a kontrollban (0%) a változás elhanyagolható volt. A klorofill típusú pigmentek (klorofill a és b, feofitin a és b) kvantifikálásával sikerült azonosítani a színváltozás egyik kulcs-tényezőjét. A nagy korrelációs értékek alapján elmondható, hogy a színváltozás elsődleges kiváltója a klorofiliek bomlása a megfelelő feofitinné, ugyanakkor a sötétedést nem magyarázza ez önmagában. Valószínűleg színes bomlástermékek felszaporodása és a szaporodó mikroorganizmusok színe járul hozzá a sötétedéshez. A szín (és a pigmentek) nem járulnak hozzá a *P. lanceolata* terápiás értékéhez, viszont mivel a szín minden más minőségi paramétertől gyorsabban reagált a magas RH-ra, alkalmas lehet indikátornak vízexpozíció detektálására.

Egy másik, könnyen észrevehető jelenség volt a növényi anyag penészesedése. A gomba CFU-k kvantifikálása után látszott, hogy míg 75% RH-n egy lag fázis után 3-4 nagyságrenddel növekszik meg az élő csíraszám, addig a 45% és 0% RH-n a szaporodás feltételei nem adóttak. Ez alapján a magas páratartalmú levegőben inkubált gyógynövény hamar elveszíti mikrobiológiai és ezáltal gyógyszerkönyvi minőségét ( $10^5$  / g száraz tömeg az alkalmazhatóság felső határa). A mikrobiális szennyezők jelentőségét nagy részben az általuk termelt toxinok és allergének adják. Az általunk azonosított fajok között *Aspergillus spp.*, *Eurotium spp.*, *Leptosphaerulina chartarum* is szerepelnek, melyeknek ismertek humán-egészségügyi kockázatai toxintermelő (bizonyos törzsek) és/vagy allergén jellegük miatt. Ezen felül növényekkel asszociációban élő fajokat (esetlegesen patogéneket) (*Bipolaris tetramera*, *Epicoccum nigrum*) és szárított növényeken tipikus fajokat (pl. *Eurotium repens*) találtunk meg a mintában. A mikotoxinok kimutatása nem volt e munka célja, ettől függetlenül elmondható, hogy a mikrobiológiai szennyezők szaporodásának meggátlása a potenciális egészségügyi rizikó elkerülése érdekében nagyon fontos. Ez elérhető pl. a gyógynövény max. 45% páratartalmú levegőben való tárolásával.

A bioaktív vegyületek stabilitásának vizsgálata volt a stabilitás vizsgálat

egyik legfontosabb eleme, ugyanis a bioaktív vegyületek jelenléte nélkül nem lehet a gyógynövényt terápiás célra felhasználni. Az inkubáció alatt két vegyületcsalád főbb vegyületeit, az IG-k közül az aukubint (AUC), a katalpolt (CAT), a CPG-k közül az akteozidot (ACTE) kvantifikáltuk. A magas RH a hatóanyagok bomlását okozta a *P. lanceolata* mintákban. Az AUC esetében a kezdeti koncentráció 95,7%-a bomlott el 24 hét alatt, míg a 45% RH-n tárolt rendszerben a veszteség csak 4,5% volt. A katalpol esetében 97% és 33,5% volt a kiindulási koncentrációhoz képest mért veszteség 75 és 45% RH-n. Az ACTE szintje 70,5%-kal csökkent a 24 hetes inkubációs periódus alatt. Mivel a gyógyszerkönyvi vizsgálat előírja az AUC kimutathatóságát és min. 1,5% ACTE típusú vegyület meglétét, ezért elmondható, hogy a magas páratartalmú levegőn való tárolás bioaktív vegyületek szempontjából is alkalmatlanná teszi a növényi drogot a terápiás felhasználásra. 45% RH-n viszont a vegyületek nem bomlottak el, így ez a páratartalom alkalmas lehet a tárolásra. Mivel a gombák elszaporodása és a hatóanyagszint csökkenésének intenzitása viszonylag egybeesett (8. hét után fokozódott a bomlási ráta), kísérletet végeztünk a fonalas gombák hatóanyag-degradációjában betöltött szerepének tisztázására.

Az izolált gomba törzsekkel beoltottunk steril *P. lanceolata* vizes extraktokat, és a drogban is kvantifikált három metabolit (aukubin, katalpol, akteozid) csökkenését vizsgáltuk. A rövid inkubációs idő alatt minden izolált gomba vonal elszaporodott a növényi extraktban. A kilencedik napi minták kémiai analízise azt mutatta, hogy tízből hét vonal képes volt az IG degradációjára. A legtöbb ilyen törzs a két IG-t hasonló hatékonysággal bontotta el, két törzs, az *Aspergillus nidulans* és *Penicillium chrysogenum* az AUC koncentrációját hatékonyabban csökkentette, mint a CAT-ét. Tízből öt vonal volt képes az ACTE bontására a modell oldatokban, ebből három (*Cladosporium pseudocladosporioides*, *Epicoccum nigrum*, *Bipolaris tetramera*) gyakorlatilag a teljes mennyiséget elbontotta a 9. napra. Három vonal (két *Eurotium repens* vonal és *Aspergillus nidulans*) ugyanakkor nem tudott elbontani ennyi idő alatt szignifikáns mennyiségű ACTE-t a modell oldatokban. Mivel a vizes kontrollban nem volt érdemi hatóanyag-degradáció, elmondhatjuk, hogy a víz mint közvetlen degradáló ágens szerepe másodlagos a hatóanyagok instabilitásában, annak fő kiváltói a fonalas gombák. Mivel eltérő fajok eltérő hatékonysággal degradálják a különböző metabolitokat, kijelenthetjük, hogy a mikrobiális flóra összetétele az egyes hatóanyagok stabilitását döntően befolyásolja. Különösen aktívnak bizonyultak a növényekkel asszociációban élő fajok a hatóanyagok lebontásában (*Cladosporium pseudocladosporioides*, *Epicoccum nigrum*, *Bipolaris tetramera*). Ezek elszaporodása a gyógynövényben nagyon hamar tönkretetheti a bioaktív vegyületeket. Fentiek ismeretében kijelenthető, hogy a gyógynövényeket kolonizáló fonalas gombák monitorozása és szaporodásuk

meggátlása nagyon fontos akkor is, ha nem terápiás célra tároljuk a gyógynövényt, illetve a humán egészségügyi szempontból nem veszélyes fajok inaktív állapotban tartása is lényeges. A mikroorganizmusok számának csökkentése és szaporodásuk meggátlása nemcsak a mikotoxin-termelés miatt fontos, hanem a hatóanyagok stabilitásához is hozzájárulhat.

A háztartásokban is gyakran előforduló 75% RH alapvetően csökkenti a gyógynövények stabilitását, mind mikrobiológiai értelemben, mind a bioaktív vegyületek szintjét tekintve. A 45%-os vagy alacsonyabb RH-n való tárolás különösen nagy jelentőségű nagy mennyiségek raktározásánál, ez képes biztosítani a stabilitást minden általunk vizsgált paraméter kapcsán.

Harmadik fő célkitűzésünk *P. lanceolata* növényi szövettenyészet létrehozása, kémiai karakterizálása és hatóanyag-termelésének optimalizálása volt.

Terepi mintákból gyűjtött magokból aszeptikus körülmények között csíráztatott növényekből indítottunk kallusztenyészetet  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -ot nem tartalmazó MS táptalajon. A számos vonal közül egy megbízhatóan növekedő, hatóanyagokat termelő vonalat szelektáltunk ki optimalizációs vizsgálatokra. A fő hatóanyagok kvantifikálásához szükséges standardeket preparatív analitikai módszerekkel (preparatív vékonyréteg-kromatográfia, oszlopkromatográfia és szemi-preparatív HPLC) izoláltuk *P. lanceolata* és *P. major* levelekből. A szerkezeteket MALDI-TOF és NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) spektroszkópiai módszerekkel határoztuk meg, a kallusz extraktokban való jelenlétét VRK-val és HPLC-vel is igazoltuk. A két vegyület plantamajozid (PMJ) és akteozid (ACTE) voltak.

A kiválasztott vonalat különböző  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  arányú (NNA) táptalajokon neveltük, 20 mM összes N-forrás mellett. Azt találtuk, hogy a magasabb  $\text{NH}_4^+$  koncentráció (nagyobb  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  arány) csökkenti a növekedési indexet és a plantamajozid-termelést is. Az ACTE szintjét nem befolyásolta a paraméter változtatása. Míg  $\text{NH}_4^+$  mentes tápalajon  $10,01 \pm 2,32$ , addig a 1:2  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  arány mellett már csak  $6,15 \pm 1,90$  a növekedési index. A PMJ termelésnek sem kedvezett a magasabb NNA,  $2,14 \pm 0,25$   $\text{NH}_4^+$  mentes tápalajon és  $1,56 \pm 0,28$  % DW 1:2  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  arány mellett. Az elméleti hozamok kiszámítása után megfigyeltük, hogy a nagyobb NNA igen kedvezőtlenül hat mindkét vegyület hozamára lemezenként, ami nagyrészt a növekedési index csökkenésére vezethető vissza. A bevitt ellenionok ( $\text{Na}^+$  és  $\text{Cl}^-$ ) hatásának hiányát a vizsgált paraméterekre statisztikai próbákkal igazoltuk (ANCOVA).

A második kísérletben az optimálisnak talált 0:1 NNA-jú táptalajt módosítottuk, az összes N forrás mennyiségét változtatva. Azt találtuk, hogy míg a PMJ szintjére nincs szignifikáns hatással a N-forrás szintjének változtatása, addig az ACTE szintjére és a növekedési indexre igen. Az ACTE termelésének az alacsony összes N-forrás volt a kedvező, 10 mM N-forrást tartalmazó táptalajon volt maximális ( $1,11 \pm 0,17$  % DW). A növekedési index a

20 mM N táptalajon bizonyult legmagasabbnak, de 10 és 40 mM összes N-forrás mellett sem volt sokkal kevesebb. A legtöbb PMJ a 10 mM N-forrást tartalmazó táptalajon termelődik,  $2,19 \pm 0,21$  %. A hozamot kiszámítva azt kaptuk, hogy a két vegyület hozama más-más táptalajon lesz maximális, az ACTE hozama 10 mM N (0:1 NNA) táptalajon legnagyobb ( $0,91 \pm 0,16$  mg/lemez/4 hét), a PMJ-é pedig 20 mM N (0:1 NNA) táptalajon ( $2,14 \pm 0,56$  mg/lemez/4 hét). A termelt mennyiség meghaladja, de legalábbis összemérhető az irodalomban leírt terepi mintákra (*P. lanceolata* levél) leírt akteozid-mennyiséggel, ugyanakkor a plantamajozidot terepi mintákból ebből a fajból nem lehet detektálni. Az eltérő válaszfüggvények a két vegyület bioszintézisének eltérő regulációjára utalhatnak, arányuk jól befolyásolható az NNA és a teljes N forrás szintjének változtatásával. Míg pl. MS 40 (0:1) táptalajon 3,53, addig 20 (1:4) táptalajon 1,966807 a két vegyület aránya (PMJ/ACTE).

## 6. Summary

The aim of this work was to examine *Plantago* species present in Hungary with different, independent methodologies. Therefore, the work can be divided into three main parts.

Our first aim was to accomplish a phytochemical screening, and comparative bioactive metabolite analysis of regional populations of common *Plantago* species. Though the chemistry of *Plantago* species are well studied, it might be reasonable to investigate Hungarian species because of quality assurance (distinguishment of species) and folk medicine considerations (applicable for therapy or not).

We investigated the chemical patterns with thin layer-chromatography (TLC), quantified the iridoid glycoside (IG) content with capillary electrophoresis, and the total caffeoyl-phenylethanoid glycoside (CPG) content and ascorbic acid equivalent antioxidant activity (AAEAC) with a spectrophotometric assay of five species, from samples of different populations. Studied species included the dried leaves *Plantago lanceolata*, *P. altissima*, *P. major*, *P. maritima* and *P. media*. Our results showed, that the regional wild populations of *Plantago* may be applicable for therapeutic purposes. We found high CPG content accompanied by high AAEAC values in *P. maritima*. With respect to IG concentration, CPG content and AAEAC values, *P. altissima* was found suitable to replace *P. lanceolata*. AAEAC correlated with CPG content very well. We have shown with hierarchical cluster analysis of TLC bands, that the used TLC parameters can distinguish different species of *Plantago* from Hungarian populations, except that *P. lanceolata* and *P. altissima* could not be fully separated. The often used leaves of *P. major* were found to be a less potent phytotherapeutical based on our results (low IG content, low CPG concentrations). The found chemical patterns corresponded to the previously described chemotaxonomical patterns of the genus.

Our second aim was to carry out a stability study on a dried medicinal plant product. We chose *P. lanceolata* leaves as a model system. Stability of medicinal plants is a currently underrepresented scientific area, just like the background mechanism of instabilities. As there is a virtually infinite number of potential metabolite-metabolite interactions in complex chemical matrices (like a plant extract), the stability of the compounds in the original mixture can not always be deduced from the stability data of the purified compounds. In dried medicinal plants, the situation is even more difficult because of the presence of potentially active enzymes and microorganisms.

*Plantago lanceolata* leaves of pharmacopoeial quality were used for the stability study. The dried leaves were incubated at atmospheres of different relative humidities (RH), 0, 45 and 75 %. During the 24 week incubation

period, many quality parameters were quantified, including changes in color with reflectance spectrophotometry, increase in the number of colony forming units (CFU) of filamentous fungi, IG concentration with capillary electrophoresis, acteoside concentration with TLC. Besides these, we aimed to partially characterize the microbiological community being present on the dried leaves. Ten filamentous fungal strains were isolated from the plant material, and identified with microbiological and molecular biological methods. To identify the factors contributing to the detected color changes, chlorophyll-like pigments were quantified. To assess the contribution of fungi to the metabolite decomposition, isolated strains were incubated with sterile water extracts of the leaves.

Treatment with high (75%) RH caused an easily perceptible browning in the plant drug, no changes occurred at 45 and 0 %. This change is also shown in quantitative data (CIEL\*a\*b\*) color parameters – a\* is the red-green, b\* is the blue-yellow axis, L\* is brightness. Parameters a\* and b\* showed strong shifts in the first 8 weeks of incubation (most of the total change took place here), and an exponential-like curve during the 24 weeks at 75% RH. At 45 and 0 % RH, only negligible changes occurred. With quantification of chlorophyll type pigments (chlorophyll a, b and pheophytin a, b), one of the main factors contributing to color change was identified. The pigment concentrations showed virtually the same curves as chlorophyll degradation curves. Besides the theoretical basis, the relationship is also supported by high Pearson correlation values in the case of a\* and b\*. On the other hand, darkening (L\* decrease) could not be explained by neither Chl pigment changes nor changes in the quantified metabolites – IGs, acteoside - alone. Microbiological contaminants, colorful decomposition products, etc. may add to this change. Pigments do not add to the therapeutical value of the plant drug, but as color reacted firstly among all tested quality parameters to high RH, it can be used as an indicator of water exposure.

Another easily recognizable phenomenon was the mould growth in the plant material at high RH. After colony forming unit (CFU) quantification, it was shown, that after a lag phase, fungal contaminant number is increased by 3-4 orders of magnitude at 75% RH, at 45 and 0 % conditions of growth are not met. The plant drug becomes of unacceptable quality as early as 8 weeks, as it exceeds the limit of  $10^5$  CFU / g dry weight. Microbial contaminants are mostly important for their potential ability to produce toxic compounds, which are a hazard to human health. Among the identified species, we found *Aspergillus spp.*, *Eurotium spp.*, *Leptosphaerulina chartarum*. The species are described from plant material and medicinal plants, some of their strains may produce mycotoxins and/or may give rise to allergic reactions. Besides these, species associated with (or pathogenic to) plants (*Bipolaris tetramera*, *Epicoccum*



*nigrum*) and species typical for dried plant material (*Eurotium repens*) were identified. Mycotoxin detection was not the aim of this study, but independent of that, it can be stated that the inhibition of the proliferation of contaminants is very important to avoid potential health hazard. This can be achieved by storing the plant material at low (45% or below) RH.

The quantification of bioactive metabolite changes was one of the most important part of the stability study, as therapeutical use would not make sense without the presence of the desired metabolites at an active concentration. Metabolites belonging to two classes were quantified, IG-s aucubin (AUC) and catalpol (CAT) and the CPG acteoside (ACTE) was determined during incubation. High RH caused the degradation of bioactive metabolites in *P. lanceolata* samples. During 24 weeks, 95.7% of the initial concentration of AUC was lost at 75% RH, while at 45% RH, loss was only 4.5%. In the case of catalpol, 97% and 33.5% loss occurred at 75 and 45% RH respectively. Acteoside concentration decreased by 70.5% by the end of the experiment. As pharmacopoeial quality requires detectability of AUC and minimal 1.5% metabolites of the ACTE type, it can be stated, that storage at high RH results in loss of pharmacopoeial quality, making the plant drug unusable for therapeutical purposes. At 45% RH, the metabolites did not decompose, thus, this RH seems to be suitable for storage. As the increase in CFU count and the decrease in metabolite levels showed a coincidence in time (increase in rate after 8th week), we carried out an experiment to assess the contribution of fungi to the metabolite decomposition.

Sterile water extracts from *P. lanceolata* leaves were infested with the ten filamentous fungus strains isolated from the plant material, and the decrease in AUC, CAT and ACTE was assayed. During the short incubation time, all strains grew well on the medium prepared from the leaves. The bioactive metabolite levels at the 9th day of incubation were quantified. Seven of ten strains were able to cause a significant decrease in IG concentration. Most strains decomposed the two iridoids with similar efficiency, but two strains, *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum* degraded AUC more efficiently than CAT. Five of the ten strains could decompose ACTE in the model solutions, of these, three (*Cladosporium pseudocladosporioides*, *Epicoccum nigrum*, *Bipolaris tetramera*) decomposed all ACTE by the 9th day. Three strains, however, (two lines of *Eurotium repens* and *Aspergillus nidulans*) could not decompose significant amounts of ACTE in the model solutions. As the controls (water instead of strains) did not show significant metabolite degradation, we can state, that the role of water as a direct degrading agent was secondary, and fungi play the central role in this metabolite loss. Different species degraded the metabolites with different efficiency, so we can state, that the composition of the contaminant flora can

greatly influence the stability of the different metabolites in the plant drug matrix. Species living in association with plants (*Cladosporium pseudocladosporioides*, *Epicoccum nigrum*, *Bipolaris tetramera*) were especially found active, these can destroy the bioactive metabolites in a very short time if the conditions of their proliferation are met. Seeing the facts mentioned above, it can be stated, that monitoring and inhibition of fungi is very important even if the plant drug is used for non-therapeutical purposes, and also in the case of species that are not hazardous to human health. The reduction of fungal CFU is not only important to avoid mycotoxin production, but may also increase stability of bioactive metabolites in a medicinal plant matrix.

High (75%) RH is not uncommon in households. As this condition was shown to decrease the microbiological quality, and bioactive metabolite levels of medicinal plants, it must be avoided during storage. 45% RH, on the other hand was found suitable for long-term storage with respect to all quality parameters tested. This is very important when storing large amounts of plant drug.

Our third main aim was to establish, characterize and optimize the metabolite production of plant tissue culture from *P. lanceolata*.

Seeds were collected from field samples, germinated aseptically, and callus cultures were initiated on MS medium without  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . From various lines, a stable line was selected for further experiments, that reproducibly synthesized higher amounts of secondary metabolites. For identification and quantification of the two main metabolites, standards were purified from field sample leaves (*P. lanceolata* and *P. major*), from two samples, that showed high presence of the metabolites of the calli. Purification was done with preparative thin layer chromatography, column-chromatography and semi-preparative HPLC. Structures were determined by examination of hydrolysis products, MALDI-TOF and  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR. The two metabolites were identified as plantamajoside (PMJ) and acteoside (ACTE). Presence in the calli was proven by adding purified standards to extracts of calli (HPLC).

The selected callus line was then subcultured to media with different  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  ratios (NNR): 0:1, 1:8, 1:4, 1:2; total N source concentration was 20 mM. We have found, that higher concentrations of  $\text{NH}_4^+$  (higher NNR) reduced the growth index and PMJ production in the calli, ACTE production was unaffected. Growth index was  $10.01 \pm 2.32$  at  $\text{NH}_4^+$  free medium, while at 1:2 NNR it was only  $6.15 \pm 1.90$ . PMJ concentration was  $2.14 \pm 0.25\%$  DW on  $\text{NH}_4^+$  free medium, but at 1:2 NNR it was reduced to  $1.56 \pm 0.28\%$  DW. Theoretical yields were calculated per plate using the metabolite content, a typical subculture mass, growth index, and a typical dry weight / fresh weight ratio. Higher NNR resulted in significant reduction of PMJ yields, mainly because of the reduction of growth. The counter-ions' effects was analysed in ANCOVA,

and found insignificant. Altogether, 20 mM total N with NNR 0:1 (only  $\text{NH}_4^+$ ) was found to be optimal for ACTE and PMJ yields, and also, growth.

In a subsequent experiment, calli were grown on media with different total N-source concentrations (10, 20, 40, 60), NNR was 0:1, We found, that the concentration of PMJ was not effected, while growth index and concentration of ACTE was changed. ACTE production was increased with decreasing, maximum was achieved at 10 mM N-source ( $1.11 \pm 0.17$  % DW). Growth index was highest on 20 mM N-source, but 10 and 40 mM media also supported high growth rates. Most PMJ was found on 10 mM N-source media ( $2,19 \pm 0.21$ % DW). After calculating the theoretical yield as above, we showed that the optimal medium composition differs for the two metabolites. ACTE yield was maximal at 10 mM N (0:1 NNR) medium ( $0.91 \pm 0.16$  mg/plate/4 weeks), while PMJ at 20 mM N (0:1 NNR) medium ( $2,14 \pm 0.56$  mg/plate/4 weeks). Compared to field samples (*P. lanceolata* leaves), the amount of metabolites that is produced by calli is comparable to, or greater than the ACTE content of the leaves based on literature data. PMJ could not be detected from *P. lanceolata* samples. The different response curves may be the consequence of different regulation of the biosynthesis of the two compounds, their ratio can be greatly influenced with NNR and total N. While at MS 40 mM (0:1), PMJ / ACTE ratio is 3.53, at MS 20 mM (1:4), it's only 1.97.

## 7. Felhasznált irodalom

- Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castella, G. & Cabanes, F.J., 1994. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(7), pp.2650-2652.
- Al-Julaifi, M., 2003. Ochratoxin A production by *Eurotium amstelodami* and *Eurotium spp.* isolated from locally grown barley in Saudi Arabia. *Kuwait Journal of Science and Engineering*, 30(2), pp.59-65.
- Al-Mamun, M., Abe, D., Kofujita, H., Tamura, Y. & Sano, H., 2008. Comparison of the bioactive components of the ecotypes and cultivars of plantain (*Plantago lanceolata* L.) herbs. *Animal Science Journal*, 79(1), pp.83-88.
- Apak, R., Güçlü, K., Ozyürek, M., Esin Karademir, S. & Erçağ, E., 2006. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57(5-6), pp.292-304.
- Apak, R., Guclu, K., Demirata, B., Ozyurek, M., Celik, S., Bektasoglu, B., Berker, K. & Ozyurt, D., 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7), pp.1496-1547.
- Artes, F., Castaner, M. & Gil, M., 1998. Review: Enzymatic browning in minimally processed fruit and vegetables. *Food Science And Technology International*, 4(6), pp.377-389.
- Awang, D.V.C., 2009. *Tyler's Herbs of Choice: The Therapeutic Use of Phytomedicinals, Third Edition*; CRC Press.
- Barratt, R.W., Johnson, G.B. & Ogata, W.N., 1965. Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 52(1), p.233.
- Beara, I., Lesjak, M., Jovin, E., Balog, K., Anackov, G., Orcic, D. & Mimica-Dukic, N., 2009. Plantain (*Plantago* L.) Species as Novel Sources of Flavonoid Antioxidants. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 57(19), pp.9268-9273.

- Beara, I.N., 2010. Fitohemijski skrining i procena antioksidantnog i antiinflamatornog potencijala sekundarnih biomolekula u vrstama roda *Plantago* L. ; Doktori disertáció, University of Novy Sad, Serbia.
- Bensch, K. et al., 2010. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Studies in Mycology*, 67(1), pp.1-94.
- Bianco, A., Jensen, S., Olesen, J., Passacantilli, P. & Ramunno, A., 2003. Acid rearrangement of secoiridoids related to oleuropein and secologanin. *European Journal Of Organic Chemistry*, (22), pp.4349-4354.
- Biere, A., Marak, H. & van Damme, J., 2004. Plant chemical defense against herbivores and pathogens: generalized defense or trade-offs? *Oecologia*, 140(3), pp.430-441.
- Biringanine, G., Chiarelli, M., Faes, M. & Duez, P., 2006. A validation protocol for the HPTLC standardization of herbal products: Application to the determination of acteoside in leaves of *Plantago palmata* Hook. f.s. *Talanta*, 69(2), pp.418-424.
- Budzianowska, A., Skrzypczak, L. & Budzianowski, J., 2004. Phenylethanoid glucosides from in vitro propagated plants and callus cultures of *Plantago lanceolata*. *Planta Medica*, 70(9), pp.834-840.
- Bugno, A., Almodovar, A., Pereira, T., Pinto, T. & Sabino, M., 2006. Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 37(1), pp.47-51.
- Butinar, L., Zalar, P., Frisvad, J.C. & Gunde-Cimerman, N., 2005. The genus *Eurotium*– members of indigenous fungal community in hypersaline waters of salterns. *FEMS Microbiology Ecology*, 51(2), pp.155-166.
- Carbone, I. & Kohn, L.M., 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), pp.553–556.
- Carnat, A., Fraisse, D., Carnat, A., Felgines, C., Chaud, D. & Lamaison, J., 2005. Influence of drying mode on iridoid bitter constituent levels in gentian root. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, 85(4), pp.598-602.

- Chiang, L., Ng, L., Chiang, W., Chang, M. & Lin, C., 2003. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *plantago* species. *Planta Medica*, 69(7), pp.600-604.
- Choi, S., Jung, S., Lee, H., Park, K., Yun, B. & Lee, K., 2008. Glycation inhibitory activity and the identification of an active compound in *Plantago asiatica* extract. *Phytotherapy Research*, 22(3), pp.323-329.
- Collin, H., 2001. Secondary product formation in plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, 34(1), pp.119-134.
- Cui, X., Murthy, H., Wu, C. & Paek, K., 2010. Adventitious root suspension cultures of *Hypericum perforatum*: effect of nitrogen source on production of biomass and secondary metabolites. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-plant*, 46(5), pp.437-444.
- Davey, M.P., Bryant, D.N., Cummins, I., Ashenden, T.W., Gates, P., Baxter, R. & Edwards, R., 2004. Effects of elevated CO<sub>2</sub> on the vasculature and phenolic secondary metabolism of *Plantago maritima*. *Phytochemistry*, 65(15), pp.2197-2204.
- Duarte, S., Pena, A. & Lino, C., 2011. Human ochratoxin A biomarkers-From exposure to effect. *Critical Reviews In Toxicology*, 41(3), pp.187-212.
- Dudits, D. & Heszky, L., 2003. *Növényi biotechnológia és géntechnológia*, Agroinform kiadóház, Budapest.
- Eder, M. & Mehnert, W., 1998. Importance of concomitant compounds in plant extracts. *Pharmazie*, 53(5), pp.285-293.
- Finoli C., Vecchio A., Galli A. & Dragoni I., 2001. Roquefortine C Occurrence in Blue Cheese. *Journal of Food Protection*, 64, pp.246-251.
- Fleer, H. & Verspohl, E.J., 2007. Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* L. and some isolated compounds. *Phytomedicine*, 14(6), pp.409-415.
- Fons, F., Gargadennec, A. & Rapior, S., 2008. Culture of *Plantago* species as bioactive components resources: a 20-year review and recent applications. *Acta Botanica Gallica*, 155(2), pp.277-300.

- Fons, F., Tusch, D., Rapior, S., Gueiffier, A., Roussel, J., Gargadennec, A. & Andary, C., 1999. Phenolic profiles of untransformed and hairy root cultures of *Plantago lanceolata*. *Plant Physiology And Biochemistry*, 37(4), pp.291-296.
- Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Samson, R.A., Larsen, T.O. & Thrane, U., 2007. Fumonisin B2 Production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), pp.9727-9732.
- Fujita, Y., Hara, Y., Ogino, T. & Suga, C., 1981. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* - I. Effects of nitrogen sources on the production of shikonin derivatives. *Plant Cell Reports*, 1(2), pp.59-60.
- Gafner, S. & Bergeron, C., 2005. The Challenges of Chemical Stability Testing of Herbal Extracts in Finished Products Using State-of-the-Art Analytical Methodologies. *Current Pharmaceutical Analysis*, 1, pp.203-215.
- Galvez, M., Martin-Cordero, C., Houghton, P. & Ayuso, M., 2005. Antioxidant activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 53(6), pp.1927-1933.
- Geng, F., Yang, L., Chou, G. & Wang, Z., 2010. Bioguided Isolation of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors from the Seeds of *Plantago asiatica* L. *Phytotherapy Research*, 24(7), pp.1088-1094.
- George, E.F., Hall, M.A. & Klerk, G.-J.D., 2007. *Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background* 1st ed., Springer.
- Georgianna, D.R. & Payne, G.A., 2009. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: From gene to genome. *Fungal Genetics and Biology*, 46(2), pp.113-125.
- Georgiev, M., Alipieva, K., Orhan, I., Abrashev, R., Denev, P. & Angelova, M., 2011. Antioxidant and cholinesterases inhibitory activities of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. and its phenylethanoid glycosides. *Food Chemistry*, 128(1), pp.100-105.
- Georgiev, M., Weber, J. & Maciuk, A., 2009. Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 83(5), pp.809-823.

- Glass, N.L. & Donaldson, G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), p.1323.
- Gock, M.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I. & Poulos, P.G., 2003. Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 81(1), pp.11-19.
- Grubescic, R., Vukovic, J., Kremer, D. & Vladimir-Knezevic, S., 2007. Flavonoid content assay: Prevalidation and application on *Plantago* L. species. *Acta Chimica Slovenica*, 54(2), pp.397-406.
- Grubescic, R., Vukovic, J., Kremer, D. & Vladimir-Knezevic, S., 2005. Spectrophotometric method for polyphenols analysis: Prevalidation and application on *Plantago* L. species. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 39(3-4), pp.837-842.
- Hausmann, M. et al., 2007. In vivo treatment with the herbal phenylethanoid acteoside ameliorates intestinal inflammation in dextran sulphate sodium-induced colitis. *Clinical And Experimental Immunology*, 148(2), pp.373-381.
- Heigl, D. & Franz, G., 2003. Stability testing on typical flavonoid containing herbal drugs. *Pharmazie*, 58(12), pp.881-885.
- He, J. et al., 2011. Advanced research on acteoside for chemistry and bioactivities. *Journal Of Asian Natural Products Research*, 13(5), pp.449-464.
- Hoagland, R.E., Dilday, R.H., Narwal, S.S. & Reigosa, M.J., 2000. *Allelopathy in ecological agriculture and forestry: proceedings of the 3. international congress on allelopathy in ecological agriculture and forestry, Dharwad, India, 1998*, Springer.
- Hong, S.B., Go, S.J., Shin, H.D., Frisvad, J.C. & Samson, R.A., 2005. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*, 97(6), p.1316.
- Isacchi, B., Iacopi, R., Bergonzi, M., Ghelardini, C., Galeotti, N., Norcini, M., Vivoli, E., Vincieri, F. & Bilia, A., 2011. Antihyperalgesic activity of verbascoside in two models of neuropathic pain. *Journal Of Pharmacy And Pharmacology*, 63(4), pp.594-601.



- Jacobs, M.R., Bajaksouzian, S., Palavecino-Fasola, E.L., Holoszyc, H.M. & Appelbaum, P.C., 1998. Determination of Penicillin MICs for *Streptococcus pneumoniae* by Using a Two- or Three-Disk Diffusion Procedure. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(1), pp.179-183.
- Janda, K., Ulfig, K. & Markowska-Szczupak, A., 2009. Further Studies of Extracellular Enzyme Profiles of Xerophilic Fungi Isolates from Dried Medicinal Plants. *Polish Journal Of Environmental Studies*, 18(4), pp.627-633.
- Janda-Ulfig, K., Ulfig, K. & Markowska, A., 2009. Extracellular Enzyme Profiles of Xerophilic Fungi Isolated from Dried Materials of Medicinal Plants. *Polish Journal Of Environmental Studies*, 18(3), pp.391-397.
- Jensen, S.R., 1992. Systematic Implications of the Distribution of Iridoids and Other Chemical Compounds in the *Loganiaceae* and Other Families of the *Asteridae*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 79(2), pp.284-302.
- Jin, L., Xue, H.-Y., Jin, L.-J., Li, S.-Y. & Xu, Y.-P., 2008. Antioxidant and pancreas-protective effect of aucubin on rats with streptozotocin-induced diabetes. *European Journal of Pharmacology*, 582(1-3), pp.162-167.
- Joubert, E., Manley, M., Gray, B. & Schulz, H., 2005. Rapid measurement and evaluation of the effect of drying conditions on harpagoside content in *Harpagophytum procumbens* (devil's claw) root. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 53(9), pp.3493-3502.
- Juriscic, R., Debeljak, Z., Vladimir-Knezevic, S. & Vukovic, J., 2004. Determination of aucubin and catalpol in *Plantago* species by micellar electrokinetic chromatography. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal Of Biosciences*, 59(1-2), pp.27-31.
- Kawashty, S., Gamaleldin, E., Abdalla, M. & Saleh, N., 1994. Flavonoids Of *Plantago* Species In Egypt. *Biochemical Systematics And Ecology*, 22(7), pp.729-733.
- Kim, D., Kim, B., Kim, J. & Jeong, Y., 2000. Mechanism of covalent adduct formation of aucubin to proteins. *Toxicology Letters*, 114(1-3), pp.181-188.

- Kneifel, W., Czech, E. & Kopp, B., 2002. Microbial contamination of medicinal plants--a review. *Planta Medica*, 68(1), pp.5-15.
- Kohata, K., Jyonoshita, M., Takashima, K., Ujihara, T. & Horie, H., 2004. A relationship between conversion rate of chlorophyll into pheophytin and pH in tea leaves. *Journal Of The Japanese Society For Food Science And Technology-Nippon*, 51(3), pp.177-180.
- Konno, K., Hirayama, C., Yasui, H. & Nakamura, M., 1999. Enzymatic activation of oleuropein: A protein crosslinker used as a chemical defense in the privet tree. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 96(16), pp.9159-9164.
- Kosalec, I., Cvek, J. & Tomic, S., 2009. Contaminants Of Medicinal Herbs And Herbal Products. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju*, 60(4), pp.485-501.
- Kostyuk, V.A., Potapovich, A.I., Suhan, T.O., de Luca, C. & Korkina, L.G., 2011. Antioxidant and signal modulation properties of plant polyphenols in controlling vascular inflammation. *European Journal of Pharmacology*, 658(2-3), pp.248-256.
- Kumari, N., Kumar, P., Mitra, D., Prasad, B., Tiwary, B. & Varshney, L., 2009. Effects of Ionizing Radiation on Microbial Decontamination, Phenolic Contents, and Antioxidant Properties of Triphala. *Journal Of Food Science*, 74(3), p.M109-M113.
- Kupper, H., Spiller, M. & Kupper, F., 2000. Photometric method for the quantification of chlorophylls and their derivatives in complex mixtures: Fitting with Gauss-peak spectra. *Analytical Biochemistry*, 286(2), pp.247-256.
- Kurkin, V., 2003. Phenylpropanoids from medicinal plants: Distribution, classification, structural analysis, and biological activity. *Chemistry Of Natural Compounds*, 39(2), pp.123-153.
- Labuda, R., Krivánek L, L., Tancinová, D., Mátéová, S. & Hrubcová, S., 2005. Mycological survey of ripped service tree fruits (*Sorbus domestica* L.) with an emphasis on toxinogenic fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 99(2), pp.215-223.

- Li, L.I., Liu, C., Chen, Z., Wang, J., Shi, D. & Liu, Z., 2009. Isolation and Purification of Plantamajoside and Acteoside from Plant Extract of *Plantago asiatica* L. by High Performance Centrifugal Partition Chromatography. *Chemical Research In Chinese Universities*, 25(6).
- Logrieco, A., Ferracane, R., Cozzi, G., Haidukowsky, M., Susca, A., Mule, G. & Ritieni, A., 2011. Fumonisin B-2 by *Aspergillus niger* in the grape-wine chain: an additional potential mycotoxicological risk. *Annals Of Microbiology*, 61(1), pp.1-3.
- Marak, H.B., Biere, A. & van Damme, J.M.M., 2002. Two herbivore-deterrent iridoid glycosides reduce the in-vitro growth of a specialist but not of a generalist pathogenic fungus of *Plantago lanceolata* L. *Chemoecology*, 12(4), pp.185-192.
- Martin-Nizard, F., Sahpaz, S., Furman, C., Fruchart, J., Duriez, P. & Bailleul, F., 2003. Natural phenylpropanoids protect endothelial cells against oxidised LDL-induced cytotoxicity. *Planta Medica*, 69(3), pp.207-211.
- Moritome, N., Kishi, Y. & Fujii, S., 1999. Properties of red pigments prepared from geniposidic acid and amino acids. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, 79(6), pp.810-814.
- Müller, J. & Heindl, A., 2006. Drying of medicinal plants. In: *Medicinal and aromatic plants. agricultural, commercial, ecological, legal, pharmacological and social aspects*, Wageningen UR Frontis Series, Springer, The Netherlands, pp.237–252.
- Murai, M., Tamayama, Y. & Nishibe, S., 1995. Phenylethanoids In The Herb Of *Plantago lanceolata* And Inhibitory Effect On Arachidonic Acid-induced Mouse Ear Edema. *Planta Medica*, 61(5), pp.479-480.
- Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15(3), pp.473-497.
- Nielsen, K., Gravesen, S., Nielsen, P., Andersen, B., Thrane, U. & Frisvad, J., 1999. Production of mycotoxins on artificially and naturally infested building materials. *Mycopathologia*, 145(1), pp.43-56.

- Orav, A., Stulova, I., Kailas, T. & Muurisep, M., 2004. Effect of storage on the essential oil composition of *Piper nigrum* L. fruits of different ripening states. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 52(9), pp.2582-2586.
- Ortiz, J., Ferruzzi, M., Taylor, L. & Mauer, L., 2008. Interaction of environmental moisture with powdered green tea formulations: Effect on catechin chemical stability. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 56(11), pp.4068-4077.
- Oudin, A., Courtois, M., Rideau, M. & Clastre, M., 2007. The iridoid pathway in *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry Reviews*, 6(2-3), pp.259-276.
- Park, B. et al., 2007. A 90 day repeated oral toxicity study on plantamajoside concentrate from *Plantago asiatica*. *Phytotherapy Research*, 21(12), pp.1118-1123.
- Park, K. & Chang, I., 2004. Anti-inflammatory activity of aucubin by inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$  production in RAW 264.7 cells. *Planta Medica*, 70(8), pp.778-779.
- Ph.Eur. 5.2., 2005. *European Pharmacopoeia 5.0-5.2* 5th ed., European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare.
- Pourcel, L., Routaboul, J.-M., Cheynier, V., Lepiniec, L. & Debeaujon, I., 2007. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science*, 12(1), pp.29-36.
- Ramachandra Rao, S. & Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2), pp.101-153.
- Rank, C., Nielsen, K.F., Larsen, T.O., Varga, J., Samson, R.A. & Frisvad, J.C., 2011. Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biology*, 115(4-5), pp.406-420.
- Ronsted, N., Chase, M., Albach, D. & Bello, M., 2002. Phylogenetic relationships within *Plantago* (*Plantaginaceae*): evidence from nuclear ribosomal ITS and plastid trnL-F sequence data. *Botanical Journal Of The Linnean Society*, 139(4), pp.323-338.

- Ronsted, N., Franzyk, H., Molgaard, P., Jaroszewski, J. & Jensen, S., 2003. Chemotaxonomy and evolution of *Plantago* L. *Plant Systematics And Evolution*, 242(1-4), pp.63-82.
- Ronsted, N., Gobel, E., Franzyk, H., Jensen, S. & Olsen, C., 2000. Chemotaxonomy of *Plantago*. Iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glycosides. *Phytochemistry*, 55(4), pp.337-348.
- Roussel, S., Reboux, G., Dalphin, J., Pernet, D., Laplante, J., Millon, L. & Piarroux, R., 2005. Farmer's lung disease and microbiological composition of hay: A case-control study. *Mycopathologia*, 160(4), pp.273-279.
- Russomanno, O.M.R., Portugal, M., Coutinho, L.N., Calil, E.M.B. & Figueiredo, M.B., 2003. *Leptosphaerulina chartarum* (= *Pithomyces chartarum*) e seu Envolvimento no Eczema Facial. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, 70(3), pp.385–390.
- Saimaru, H. & Orihara, Y., 2010. Biosynthesis of acteoside in cultured cells of *Olea europaea*. *Journal Of Natural Medicines*, 64(2), pp.139-145.
- Samuelsen, A., 2000. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *Journal Of Ethnopharmacology*, 71(1-2), pp.1-21.
- Schlauer, J., Budzianowski, J., Kukulczanka, K. & Ratajczak, L., 2004. Acteoside and related phenylethanoid glycosides in *Byblis liniflora* Salisb. plants propagated in vitro and its systematic significance. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 73(1), pp.9–15.
- Seguin, V. et al., 2010. Effect of agricultural and environmental factors on the hay characteristics involved in equine respiratory disease. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 135(3), pp.206-215.
- Senatore, F., Rigano, D., Formisano, C., Grassia, A., Basile, A. & Sorbo, S., 2007. Phyto-growth-inhibitory and antibacterial activity of *Verbascum sinuatum*. *Fitoterapia*, 78(3), pp.244-247.
- Sherma, J. & Fried, B., 2003. *Handbook of thin-layer chromatography*, CRC Press.

- Shim, K., Choi, S., Jeong, M. & Kang, S., 2007. Effects of aucubin on the healing of oral wounds. *In vivo*, 21(6), pp.1037-1041.
- Simon, T., 2004. *A magyarországi edényes flóra határozója*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest.
- Singh, N., Shukla, N., Singh, P., Sharma, R., Rajendran, S.M., Maurya, R. & Palit, G., 2010. Verbascoside isolated from *Tectona grandis* mediates gastric protection in rats via inhibiting proton pump activity. *Fitoterapia*, 81(7), pp.755-761.
- Suh, N., Shim, C., Lee, M., Kim, S. & Chang, I., 1991. Pharmacokinetic Study Of An Iridoid Glucoside - Aucubin. *Pharmaceutical Research*, 8(8), pp.1059-1063.
- Sun, Q., Geng, F., Cheng, X., Yang, L. & Wang, Z., 2010. Qualitative and quantitative analysis of plantamajoside in Plantaginis Herba. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi = Zhongguo Zhongyao Zazhi = China Journal of Chinese Materia Medica*, 35(16), pp.2095-2098.
- Suomi, J., Siren, H., Hartonen, K. & Riekkola, M., 2000. Extraction of iridoid glycosides and their determination by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal Of Chromatography A*, 868(1), pp.73-83.
- Tian, Y., Jiang, B., An, L. & Bao, Y., 2007. Neuroprotective effect of catalpol against MPP+-induced oxidative stress in mesencephalic neurons. *European Journal Of Pharmacology*, 568(1-3), pp.142-148.
- Tóth, L., 2005. *Gyógynövények, drogok, fitoterápia*, Debreceni Egyetem Kossuth Egyetemi Kiadója.
- Touyama, R., Inoue, K., Takeda, Y., Yatsuzuka, M., Ikumoto, T., Moritome, N., Shingu, T., Yokoi, T. & Inouye, H., 1994a. Studies On The Blue Pigments Produced From Genipin And Methylamine .2. On The Formation Mechanisms Of Brownish-red Intermediates Leading To The Blue Pigment Formation. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 42(8), pp.1571-1578.

- Touyama, R., Takeda, Y., Inoue, K., Kawamura, I., Yatsuzuka, M., Ikumoto, T., Shingu, T., Yokoi, T. & Inouye, H., 1994b. Studies On The Blue Pigments Produced From Genipin And Methylamine .1. Structures Of The Brownish-red Pigments, Intermediates Leading To The Blue Pigments. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 42(3), pp.668-673.
- Vogt, T., 2010. Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), pp.2-20.
- Wang, J.-S. & Groopman, J.D., 1999. DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1-2), pp.167-181.
- Wang, J. & Tan, R., 2002. Artemisinin production in *Artemisia annua* hairy root cultures with improved growth by altering the nitrogen source in the medium. *Biotechnology Letters*, 24(14), pp.1153-1156.
- Westland, S. & Ripamonti, C., 2004. *Computational colour science using MATLAB*, John Wiley and Sons.
- White, T., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, pp. 322, 315.
- Wink, M., 2008. Evolutionary Advantage and Molecular Modes of Action of Multi- Component Mixtures Used in Phytomedicine. *Current Drug Metabolism*, 9(10), pp.996-1009.
- Xue, H., Jin, L., Jin, L., Li, X., Zhang, P., Ma, Y., Lu, Y., Xia, Y. & Xu, Y., 2009. Aucubin Prevents Loss of Hippocampal Neurons and Regulates Antioxidative Activity in Diabetic Encephalopathy Rats. *Phytotherapy Research*, 23(7), pp.980-986.
- Xue, H., Jin, L., Jin, L., Zhang, P., Li, D., Xia, Y., Lu, Y. & Xu, Y., 2008. Neuroprotection of aucubin in primary diabetic encephalopathy. *Science In China Series C-Life Sciences*, 51(6), pp.495-502.
- Zhang, H. & Yoshino, H., 2010. Analysis of indoor humidity environment in Chinese residential buildings. *Building and Environment*, 45(10), pp.2132-2140.

- Zhong, J. & Wang, S., 1998. Effects of nitrogen source on the production of ginseng saponin and polysaccharide by cell cultures of *Panax quinquefolium*. *Process Biochemistry*, 33(6), pp.671-675.
- Zubair, M., Nybom, H., Lindholm, C. & Rumpunen, K., 2011. Major polyphenols in aerial organs of greater plantain (*Plantago major* L.), and effects of drying temperature on polyphenol contents in the leaves. *Scientia Horticulturae*, 128(4), pp.523-529.
- Оленников, Д.Н., Samuelsen, A.B. & Танхаева, Л.М., 2007. Подорожник Большой (*Plantago Major* L.). Химический Состав И Применение. *Химия растительного сырья.*, 11(2), pp.33-50.



## 8. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik lehetővé tették e munka elvégzését a Debreceni Egyetem Növényteni Tanszékének Farmakognózia Részlegén.

Köszönöm a tanácsokat, ötleteket, útmutatást mindenekelőtt témavezetőmnek, dr. Vasas Gábornak. Köszönöm a munka ideje alatt hivatalban lévő tanszékvezetőknek (dr. Mészáros Ilonának és dr. Borbély Györgynek) és a Növényteni Tanszék minden dolgozójának, hogy e munka lehetőségét megteremtették.

A munka megvalósításához munkájukkal és tanácsaikkal hozzájárultak más tanszékek munkatársai is. Így köszönettel tartozunk dr. Emri Tamásnak, a DE TTK Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék munkatársának a gombák azonosításában nyújtott segítségéért; dr. Batta Gyulának (DE TTK Szerves Kémiai Tanszék) és dr. Gyémánt Gyöngyinek (DE TTK Szeretlen- és Analitikai Kémiai Tanszék) a szerkezetanalízishez szükséges mérések kivitelezéséért; dr. Tóth Lászlónak tanácsaiért és dr. Braun Mihálynak a reflektancia-spektrofotometria kivitelezésében nyújtott segítségéért.

A munka kivitelezéséhez való hozzájárulásukért köszönöm a szakdolgozóink munkáját és a Hatvani István Gyógyszertár (Debrecen) dolgozóinak segítségét, támogatását.

Köszönöm családomnak a sok türelmet, biztatást, támogatást.

## 9. Publikációs lista

### Az értekezés témájához kapcsolódó publikációk

#### Publikációk Impakt faktorral rendelkező folyóiratokban:

**S. Gonda**, L. Tóth, P. Parizsa, M. Nyitrai and G. Vasas  
Screening of common *Plantago* species in Hungary for bioactive molecules and antioxidant activity

*Acta Biologica Hungarica* 61 (Suppl.), pp. 45–54 (2010)

DOI: 10.1556/ABiol.61.2010.Suppl.4 (IF: 0.793)

**S. Gonda**, L. Tóth, Gy. Gyémánt, M. Braun, T. Emri and G. Vasas  
Effect of High Relative Humidity on Dried *Plantago lanceolata* L. Leaves during Long-term Storage: Effects on Chemical Composition, Colour and Microbiological Quality

*Phytochemical Analysis*

DOI 10.1002/pca.1329; Article first published online: 25 MAY 2011 (IF: 1.848 (2010))

#### Prezentációk, poszterek

**S. Gonda**, L. Tóth, G. Vasas and G. Borbely (2007)

Iridoid decomposition in improperly stored dried plantain leaves (Poster presentation)

7<sup>th</sup> International Symposium and Summer School on Bioanalysis, 8-18 June, 2007, Pécs, Hungary

**S. Gonda**, L. Tóth, M. Braun and G. Vasas (2009)

Alteration of Iridoid Content in *Plantago lanceolata* L. Leaves during Improper Storage (poster presentation)

8<sup>th</sup> Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods & 15<sup>th</sup> International Symposium on Separation Sciences, September 2-4, 2009, Siófok, Hungary

**Gonda Sándor**, Tóth László, Vasas Gábor (2011)

*Plantaginis lanceolatae* folium stabilitásának vizsgálata magas páratartalmú levegőben (előadás)

XII. Magyar Gyógynövény Konferencia; 2011. május 5-7., Szeged

## Egyéb publikációk

### Publikációk Impakt faktorral rendelkező folyóiratokban

I. Bacsí, G. Surányi, **S. Gonda**, G. Gyemant, G. Vasas  
Observation of Sward Destruction Caused by Irrigation with Toxic Microcystis  
Morphospecies Containing Water in Southern Hungary.  
*BULLETIN OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY*,  
86(2), pp.232-237. (2011) (IF:1.139 - 2010)

Katalin Jámbrik, C. Máthé, G. Vasas, I. Bácsi, G. Surányi, **S. Gonda**, G.  
Borbély and Márta M.-Hamvas\*  
Cylindrospermopsin inhibits growth and modulates protease activity in the  
aquatic plants *Lemna minor* L. and *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel  
*Acta Biologica Hungarica* 61 (Suppl.), pp. 77–94 (2010)  
DOI: 10.1556/ABiol.61.2010.Suppl.9 (IF: 0.793)

D. Beyer, G. Surányi, G. Vasas, J. Roszik, F. Erdodi, M. M-Hamvas, I. Bacsí, R.  
Batori, Z. Serfozo, ZM. Szigeti, G. Vereb, Z. Demeter, **S. Gonda**, C. Mathe  
Cylindrospermopsin induces alterations of root histology and microtubule  
organization in common reed (*Phragmites australis*) plantlets cultured in vitro.  
*TOXICON*, 54(4), pp.440-449. (2009) (IF: 2.128)

C. Mathe C, D. Beyer, F. Erdodi, Z. Serfozo, L. Szekvolgyi, G. Vasas, M. M-  
Hamvas, K. Jambrik, **S. Gonda**, A. Kiss, ZM. Szigeti, G. Surányi  
Microcystin-LR induces abnormal root development by altering microtubule  
organization in tissue-cultured common reed (*Phragmites australis*) plantlets.  
*AQUATIC TOXICOLOGY*, 92(3), pp.122-130. (2009) (IF: 3.124)

### Publikációk egyéb, referált folyóiratokban

Bácsi I, Surányi Gy, **Gonda S**, Gyémánt Gy, Szőnyi A, Vasas G  
Toxintermelő Microcystis fajok megjelenése egy szegedi kerti tóban.  
*HIDROLÓGIAI KÖZLÖNY* 89:(6) pp. 90-93. (2009)

Vasas G, Bácsi I, **Gonda S**, Gyémánt Gy, Farkas O.  
Magyarországi *Planktothrix rubescens* vízvirágzás vizsgálata és  
toxintermelésének jellemzése.  
*HIDROLÓGIAI KÖZLÖNY* 89:(6) pp. 76-78. (2009)

## Prezentációk, poszterek

Vasas G., Bácsi I., **Gonda S.**, Gyémánt Gy., Farkas O. (2009)  
Magyarországi *Planktothrix rubescens* vízvirágzás vizsgálata és  
toxintermelésének jellemzése.  
L. Hidrobiológus Napok. Tihany, 2008. október 1-3. Előadás