

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Gonda Sándor

Témavezető: Dr. Vasas Gábor



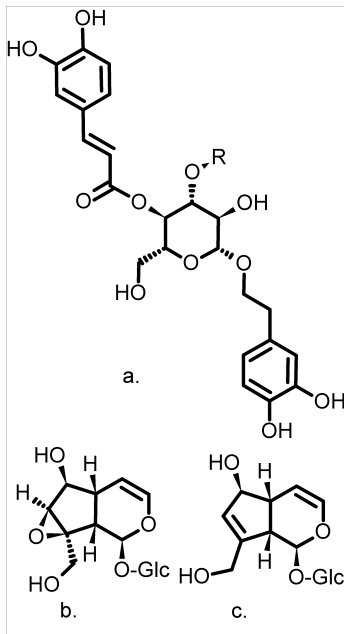
DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2011

1. Irodalmi áttekintés

A modern gyógynövényismeret (farmakognózia) interdiszciplináris tudománnyá nőtte ki magát, mely sok tudományterület eredményeit használja egyik fő célja elérésére: a növényi eredetű produktumokkal történő, bizonyítékokon alapuló gyógyászat tudományos hátterének biztosítása. Munkánkban ilyen jellegű vizsgálatok elvégzését tűztük ki célul, vizsgálódásaink alanyának a *Plantago* fajok főbb hazai képviselőit választottuk ki.

A *Plantago* fajok főbb szekunder metabolitjai az iridoid glikozidok (IG): aukubin (AUC) és katalpol (CAT); a kávésav-észter feniletanoid-glikozidok (CPG): akteozid (ACTE), plantamajozid (PMJ) és hasonló vegyületek (1.ábra); flavonoidok; poliszaharidok (Ronsted et al., 2003). Az előbbi két csoport terápiás felhasználhatóságáról számos *in vitro* és állatkísérletes adat jelent már meg a szakirodalomban. Az aukubin és katalpol hatásai között antibakteriális hatást, diabetes-ellenes hatást, neuroprotektív hatást is leírtak (Senatore et al., 2007). Az akteozidnak, ami a *P. lanceolata* fő CPG-je, és a plantamajozidnak, ami a *P. major* és számos más faj fő CPG-je, gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatását írták már le (Galvez et al., 2005). Célul tűztük ki a regionális populációk kémiai mintázatának vizsgálatát.



1. ábra. A jelenlegi munkában vizsgált főbb *Plantago* metabolitok: feniletanoidok: a., akteozid (R=ramnozil), plantamajozid (R=glükozil), iridoid glikozidok: b., katalpol és c., aukubin.

A gyógynövények és a belőlük készült termékek szempontjából rendkívül fontos a stabilitás vizsgálata, mely ennek ellenére alulprezentált a szakirodalomban, az instabilitások okát komplex mátrixokban feltáró munkákról nem is beszélve. A komplex kémiai interakciók gyakran miatt kiszámíthatatlan a vegyületek stabilitása eredeti mátrixukban (Eder & Mehnert, 1998). Stabilitási vizsgálatok nélkül nem lehetnek a gyógynövények a bizonyítékon alapuló orvoslás részei. Emiatt tűztük ki

célul egy stabilitási vizsgálat elvégzését a *Plantago lanceolata* szárított levelén.

A növényi szövettenyésztés ígéretes technika bonyolult bioaktív molekulák olcsó előállítására, azonban számos optimalizációs lépést igényel a cél elérése (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002). Célul tűztük ki *Plantago lanceolata* szövettenyészet létrehozását és a hatóanyag-termelés optimalizálását az NH_4^+ / NO_3^- arány változtatásával és a N forrás koncentrációjának változtatásával.

2. Új tudományos eredmények

A gyakoribb fajok regionális populációi alkalmasak lehetnek gyógyszerkönyvi minőségű drog előállítására vagy terápiás célra.

P. major, *P. maritima*, *P. media*, *P. altissima* és *P. lanceolata* legalább 4 populációját vizsgáltuk meg. A gyűjtött és szárított levelek IG tartalmát kapilláris elektroforézissel, CPG tartalmát és antioxidáns kapacitását spektrofotometriás eljárással határoztuk meg.

A fajok kemotaxonómiai mintázata a korábban leírtak megfelel (Ronsted et al., 2003). A minták közül kiemelkedett a *P. maritima* antioxidáns kapacitás és összes CPG tartalom tekintetében (1. táblázat), IG tartalom tekintetében a *P. lanceolata* populációkat találtuk a legjobbnak. A regionális vad populációk a nemesített *P. lanceolata* fajokhoz képest sokkal kevesebb aukubint, de sokkal több katalpolt tartalmaznak (Al-Mamun et al., 2008). Az antioxidáns kapacitás értéke, különösen a *P. maritima* esetén igen magasnak tekinthető a gyógynövények között (Apak et al., 2006). Az antioxidáns hatásért a CPG-k felelősek, amit a két paraméter 0,9202 Pearson korrelációs értéke jellemez jól ($p < 0,001$), ez megfelel a korábban leírtaknak (Galvez et al., 2005). A regionális populációk a fajokból már leírthoz hasonló mennyiséget, vagy többet tartalmaznak IG-kből, ez a többlet részben metodikai különbségekből adódhat (Jurisic et al., 2004), (Beara, 2010). A mért adatok alapján a vizsgált populációk szinte mindegyike elméletileg alkalmas lehet terápiás célra, és gyógyszerkönyvi minőségű drog előállítására.

1. 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, 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

Megfelelő vékonyréteg-kromatográfias vizsgálattal szükség esetén elválaszthatóak a hazai gyakori *Plantago* fajok, kivéve a *P. altissima* és *P. lanceolata*, amely vékonyrétegből lehet következtetni a kávésav-észter tartalomra is.

P. major, *P. maritima*, *P. media*, *P. altissima* és *P. lanceolata* fajok leveleinek extraktját vékony-rétegekromatográfiasan vizsgálva (natural product reagens) a fajok eltérő kémiai mintázata szembetűnő. Az egyes sávok jelenlétét / hiányát klaszteranalízisre bocsájtva azt tapasztaltuk, hogy 4 faj egyértelműen elválasztható egymástól: egyedül a *P. altissima* és a *P. lanceolata* esetén nem válik el egyértelműen a két faj magas támogatottságú, izolált klaszterekké. Intenzív zöldeskék sávokként jelentkeznek e vizsgálattal az akteozid, a plantamajozid, melyek az

azonosításon való hozzájáruláson kívül kvalitatív minőségi paraméterek is a terápiás hatás szempontjából.

Magas (75 %) relatív páratartalmú levegőben inkubált *P. lanceolata* levéldrog színe megváltozik, amit főleg a klorofill degradáció okoz és önmagában még ez nem jelent hatóanyag-veszteséget.

A *P. lanceolata* szárított leveleket különböző (0, 45, 75 %) páratartalmú levegőben 24 hétig eltartva számos változás következik be a 75 %-on tartott rendszerben. A levelek a 8. hétre megbarnulnak, sötétednek, amely kisebb intenzitással, de a 24 hetes inkubáció végéig folytatódik. A látható változást (barnulás és sötétedés) reflektancia-spektrofotometriával kvantifikálva azt kaptuk, hogy 75 % RH hatására 24 hét alatt a CIEL*a*b* paraméterek közül az a* $-2,48 \pm 0,34$ -ről $2,91 \pm 0,24$ -re, a b* $3,06 \pm 0,15$ -ről $2,21 \pm 0,68$ -ra, az L* pedig $61,4 \pm 5,18$ ről $49,7 \pm 1,73$ -ra változik. Ezen változások rendre 17,89, 5,07, 2,61-szer nagyobbak mint a kontroll rendszerben ($p < 0,001$). 45 % és 0 % RH-n változást nem tapasztaltunk. A változások háttérének kiderítésére kvantifikáltuk a klorofill a, b és feofitín a, b pigmenteket (Kupper et al., 2000) módszerével és azt találtuk, hogy a klorofill a és b lebomlása (a feofitinek koncentrációjának párhuzamos emelkedésével) nagyon jól korrelál az a* és b* paraméterek változásával, vagyis a barnulás előrehaladásával (a klorofill a koncentráció vs. a* és b* Pearson korrelációs koefficiensei rendre: -0,927 és 0,830). A bomlás enzimfüggetlen is lehet növényi mátrixokban (Kohata et al., 2004), valószínűleg itt is ez figyelhető meg. A színváltozás nem függ direkt módon össze az egyébként színes vegyületekké is valószínűleg történő hatóanyag-bomlással (alacsony korrelációs értékek). Mivel a változás nagy része az

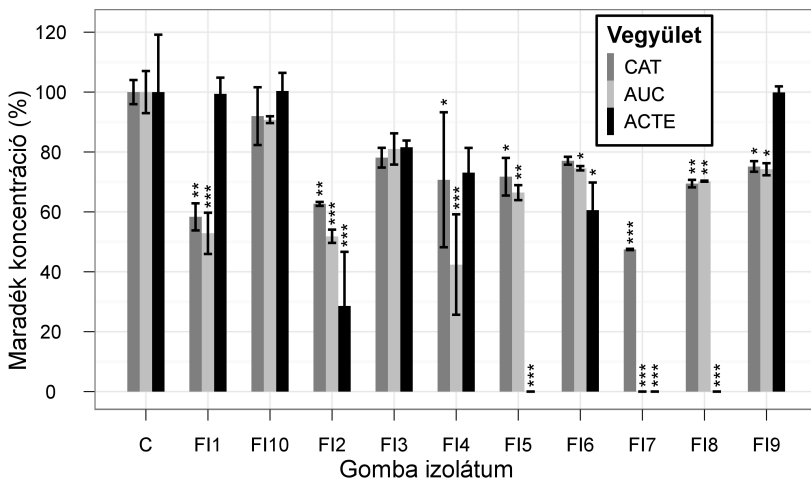
első 8 héten zajlik le, amikor szignifikáns aukubin és akteozid szint csökkenés még nincs, kijelenthető, hogy a szín mint minőségi paraméter inkább a víz-expozíció detektálására alkalmas de közvetlenül nem feltétlenül jelenti a növényi drog használhatatlanná válását a barnulás.

Magas (75 %) relatív páratartalmú levegőben inkubált *P. lanceolata* levéldrog hatóanyagai (aukubin, katalpol, akteozid) bomlást szenvednek el, illetve az alacsony (45 %) páratartalom biztosítja a növényi drog kémiai stabilitását.

A *P. lanceolata* szárított leveleket különböző (0, 45, 75 %) páratartalmú levegőben 24 hétig tároltuk. A különböző páratartalmú levegőben való inkubáció során a *P. lanceolata* hatóanyagait kapilláris elektroforézissel és kvantitatív vékony-réteg kromatográfiával vizsgáltuk. A 75 % páratartalomban inkubált *P. lanceolata* szárított levél akteozid-tartalma 24 hét alatt $2,69 \pm 0,53$ %-ról $0,79 \pm 0,09$ %-ra, aukubin tartalma $0,85 \pm 0,06$ %-ról $0,04 \pm 0,01$ %-ra, katalpol-tartalma pedig $0,71 \pm 0,09$ %-ról $0,02 \pm 0,02$ %-ra csökkent ($p < 0,001$). 45 % és 0 % páratartalmú levegőn szignifikáns bomlást egyik hatóanyag sem szenvedett el, így az a páratartalom alkalmas a drog hosszú távú tárolására. Hasonló jelenséget idáig más vegyületsaládokra írtak le gyógynövényekben (Ortiz et al., 2008), (Heigl & Franz, 2003).

A magas relatív páratartalmú levegőben végbemenő hatóanyag-bomlás (aukubin, katalpol, akteozid) oka a növényi drogan jelen lévő fonalas gombák tevékenysége.

A *P. lanceolata* száraz levelek steril vizes kivonatát aszeptikus körülmények között inkubáltuk a drogból izolált, tisztított és molekuláris biológiai módszerekkel azonosított fonalas gomba törzsekkel 15 napig. A kiindulási aukubin, katalpol és akteozid-koncentrációhoz képest számos metabolit és számos gomba törzs esetén észleltünk csökkenést a kontrollhoz képest (2.ábra, $p < 0,05$). A tízből hét vonal volt képes mindkét iridoid degradációjára *in vitro*. Tízből öt vonal volt képes az akteozid bontására a modell oldatokban. Mivel a steril kontrollokban nem volt tapasztalható degradáció, a víz mint közvetlen, hidrolízisben részt vevő reakciópartner jelentősége valószínűleg kicsi e rendszerben, holott az iridoidok spontán bomlása elképzelhető lenne (Bianco et al., 2003). A hatóanyag-bontás szempontjából a legaktívabb fajoknak a *Bipolaris tetramera*, *Epicoccum nigrum* és a *Cladosporium pseudocladosporioides* bizonyultak.



2. ábra. A gombaizolátumokkal beoltott steril *P. lanceolata* vizes kivonatokban maradt metabolitmennyiség 9 napos inkubációs idő után. AUC, aukubin, CAT, katalpol, ACTE, akteozid; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. Az izolátumok: F11, *Aspergillus niger*; F12, *Leptosphaerulina chartarum*; F13, *Aspergillus nidulans*; F14, *Eurotium amstelodami*; F15, *Cladosporium pseudocladosporioides*; F16, *Penicillium chrysogenum*; F17, *Bipolaris tetramera*; F18, *Epicoccum nigrum*; F19, *Eurotium repens*; F110, *Eurotium repens*, C: kontroll.

A *P. lanceolata* kalluszok plantamajozid-tartalma $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$ aránytól, az akteozid-tartalma pedig az N forrás koncentrációjától függ.

A *P. lanceolata* kalluszvonalak közül egy stabilan növekedő és nagy mennyiségű metabolitot termelő vonallal végeztünk kísérleteket. A vonal plantamajozidot és akteozidot termelt, amely standardekert megtisztítottunk és szerkezetüket valamint jelenlétüket a kalluszban igazoltuk. E főkomponensek jelenléte megfelel a korábban leírtaknak (Fons et al., 1999), (Budzianowska et al., 2004). A hatóanyag termelést előbb különböző $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$ arányú, majd különböző összes N koncentráció táptalajokon való neveléssel optimalizáltuk.

A 20 mM N-t tartalmazó táptalajok közül a különböző $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$ arányúak közül a csak NO_3^- -ot tartalmazó változaton volt a legnagyobb a kallusz növekedési indexe ($10,01 \pm 2,32$), és plantamajozid termelése ($2,14 \pm 0,25$ %). Mindkét paraméter csökkent a növekedő NH_4^+ koncentrációval ($p < 0,05$), 1:2 $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$ aránynál a növekedési index már csak $6,15 \pm 1,91$. Az akteozid szintézisét nem befolyásolta döntően az $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$ arány, 0,7-0,8 % körül alakult kezeléstől függetlenül. A növekedés-gátlás ismert jelenség, valószínűleg az NH_4^+ nagyobb koncentrációban direkt toxikus hatásának tudható be (George et al., 2007, p.71).

Eztuán 0:1 $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$ arányú táptalajból készítettünk 10, 20, 40, 60 mM N-t tartalmazó változatokat és a paramétereket ezen teszteltük. A N forrás koncentrációja befolyásolta a növekedést és az akteozid-termelést ($p < 0,05$), de a plantamajozid-termelésre nem hatott. Az akteozid-koncentráció 10 mM koncentráció mellett bizonyult maximálisnak, $1,11 \pm 0,18$ %-nak, a plantamajozidból a 10 és 20 mM N-t tartalmazó táptalajon szintetizálódott legtöbb, 2,15-2,2 %. Magas N forrás koncentráció erőteljesen csökkentette

az akteozid szintézisét és enyhén csökkentette a növekedési indexet is. A növekedési index 20 mM N forrás koncentráció mellett volt optimális (10.01 ± 2.32), míg 60 mM N mellett már csak 5.39 ± 0.30 volt.

Optimalizálás után az akteozid koncentrációk jóval magasabbak, mint a (Budzianowska et al., 2004) által *P. lanceolata* kalluszra leírtak, a plantamajozid mennyiség valamivel kevesebb, mint az ugyanitt leírt gyökér eredetű kalluszokban.

Az optimális hozamot átlagos indítási tömeggel és kultúra periódussal számolva akteozidra a 10 mM N-t tartalmazó, 0:1 $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$ arányú táptalajon lehetséges, az elméleti hozam 0.91 ± 0.15 mg/lemez. Bár a két vegyület azonos vegyületcsoportba tartozik, a plantamajozid optimálisan 20 mM N-t tartalmazó, 0:1 $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$ arányú táptalajon termeltethető, hozama $2,14 \pm 0,03$ mg / lemez.

3. Overview of the literature, goals

Modern pharmacognosy has become an interdisciplinary science, that uses the results and methodology of many areas of science to achieve one of its main goals: to provide scientific background for the application of phytomedicine as evidence based medicine. In our work, we aimed these kind of experiments on our selected subjects, the more common species of the genus *Plantago*.

The main secondary metabolites of *Plantago* are iridoid glycosides (IGs) aucubin (AUC) and catalpol (CAT), caffeoyl-phenylethanoid glycosides (CPGs) acteoside (ACTE) and plantamajoside (PMJ) (Figure 1.), and similar compounds, flavonoids and polysaccharides (Ronsted et al., 2003). There are many studies on the therapeutic applicability of the former two groups. The IGs aucubin and catalpol have antibacterial, anti-diabetic, neuroprotective activities (Senatore et al., 2007). Acteoside, the chief CPG in *P. lanceolata*, and plantamajoside, the main CPG of *P. major* and several other species, has anti-inflammatory and antioxidant activities (Galvez et al., 2005).

The stability of medicinal plants and the products made of them is a very important issue, but is underpresented in the literature, not to mention the papers dealing with the causes of instabilities. Complex chemical interactions make the stabilities of the compounds often unpredictable (Eder & Mehnert, 1998). Without stability studies, medicinal plants cannot be intergral parts of evidence based medicine. Therefore, we aimed to

accomplish a stability study on the dried leaves of *P. lanceolata*.

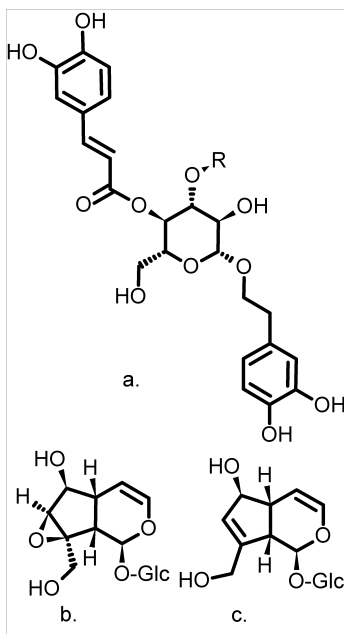


Figure 1. Chief *Plantago* secondary metabolites examined in this study. Caffeoyl phenylethanoid glycosides: a., acteoside (R=rhamnosyl), plantamajoside (R=glucosyl); iridoid glycosides: b., catalpol, c., aucubin.

Plant tissue culture is a promising technique to produce complex chemical structures in a relatively cheap way, but it requires several steps of optimization (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002). We aimed to

establish a maintainable tissue culture from *P. lanceolata* and optimize its secondary metabolite production in the culture by varying the $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$ ratio and the total concentration of N sources.

4., Novel scientific results

Regional populations of frequent *Plantago* species can be applied to produce plant drugs of pharmacopoeial quality or for therapeutic purposes.

We examined at least 4 populations of *P. major*, *P. maritima*, *P. media*, *P. altissima* and *P. lanceolata*. The IG content, CPG content and antioxidant capacity was determined from the collected dried leaves by capillary electrophoresis and spectrophotometric methods.

The detected chemotaxonomic pattern of the leaves was as previously described (Ronsted et al., 2003). With respect to antioxidant capacity and total CPG content, *P. maritima* samples showed the highest values (Table 1.), while in the case of IG content, *P. lanceolata* populations showed the highest concentrations. The regional wild populations contained much less aucubin but more catalpol than commercial *P. lanceolata* cultivars (Al-Mamun et al., 2008). The antioxidant capacity, especially in the case of *P. maritima* can be considered high among medicinal plants (Apak et al., 2006). The CPGs were responsible for the antioxidant capacity, which is best described by the high Pearson correlation value (0.9202) between the two parameters ($p < 0.001$), this fits the previously described data (Galvez et al., 2005). The examined populations contained the same amount or more IGs than previously described for *Plantago* species (Jurisic et al., 2004), (Beara, 2010), which can be in part the consequence of methodical differences. Based on the measurement's results, virtually all of the tested populations can be applied for therapeutic purposes, or the production of plant drugs of pharmacopoeial quality.

Table 1. Results of comparative quantitative analysis of regional populations of *Plantago* species. Samples not sharing the same letter are significantly different at $p < 0.05$. Abbreviations: n. d., not detected; AAEAC, ascorbic acid-equivalent antioxidant capacity; DW, dry weight.

	Catalpol (%w/w)	Aucubin (%w/w)	AAEAC ($\mu\text{mol} / \text{g DW}$)	total CPG content (%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

With the use of a proper thin-layer chromatography technique, common Hungarian *Plantago* species can be distinguished, except *P. altissima* and *P. lanceolata*. This layer can also assess the content of the main CPGs.

After examination of the extracts of *P. major*, *P. maritima*, *P. media*, *P. altissima* and *P. lanceolata* leaves by thin-layer chromatography (natural product reagent), the different chemical pattern of the species is easily recognized. Subjecting the presence / absence of bands to hierarchical cluster analysis, it is clearly visible, that 4 species are distinguishable, but *P. altissima* and *P. lanceolata* cannot be resolved as two highly supported clusters. Acteoside and plantamajoside appear as intensive blue-green bands, that help to assess therapeutic quality of the plant drugs besides helping identification.

When incubating *P. lanceolata* dried leaves in high (75 %) relative humidity (RH) air, the color of the plant drug changes, which is mainly caused by chlorophyll degradation, but this change does not necessarily mean loss of bioactive metabolites.

P. lanceolata dried leaves were stored in different humidity atmospheres (0, 45, 75 % RH) for 24 weeks, and several apparent changes were detected. Leaves showed browning and darkening by the 8th week at 75 % RH, and after that, color change continues with less intensity by the end of the incubation. Quantifying the color change by reflectance spectrophotometry it was observed, that CIEL*a*b* color parameters showed intense shifts: parameter a* changed from -2.48 ± 0.34 to 2.91 ± 0.24 , b* from 3.06 ± 0.15 to 2.21 ± 0.68 and L* 61.4 ± 5.18 to 49.7 ± 1.73 . These changes are 17.89, 5.07, 2.61 times greater than in controls ($p < 0.001$). The pigments chlorophyll a and b, as well as pheophytin a and b were quantified with the method of (Kupper et al., 2000). We found that the degradation of chlorophylls a and b correlated very well with changes in a* and b* (Pearson correlation value between chl a concentration vs. a* and b* are -0.927 and 0.830, respectively). A concurrent increase in Pheo a concentration was also detected. Degradation can be non-enzymatic in plant matrices (Kohata et al., 2004), which can be the case here. Direct link between metabolite composition and color change could not be established (low correlation values). As most of the change takes place at the first 8 weeks, when no significant metabolite loss occurred, it can be stated that color itself as a quality parameter is rather applicable for the detection of water exposure, but browning does not necessarily mean the loss of therapeutical value.

When incubating *P. lanceolata* dried leaves in high (75 %) relative humidity (RH) air, the bioactive compounds of the leaves (aucubin, catalpol, acteoside) decompose, and at low RH (45 %) bioactive metabolites are maintained.

During the incubation of plantain leaves in different RH atmospheres, the bioactive compound concentrations were determined by capillary electrophoresis and quantitative thin-layer chromatography. The acteoside content of the leaves at 75 % RH decreased from 2.69 ± 0.53 % to 0.79 ± 0.09 %, aucubin content from 0.85 ± 0.06 % to 0.04 ± 0.01 %, catalpol content from 0.71 ± 0.09 % to 0.02 ± 0.02 % ($p < 0.001$). At 45 % or 0 % RH, no metabolite loss was detected, therefore quality of the plant drug can be maintained at low RH. Similar phenomena was described previously only for other secondary metabolite families (Ortiz et al., 2008), (Heigl & Franz, 2003).

Filamentous fungi are responsible for the metabolite (aucubin, catalpol, acteoside) degradation observed in *P. lanceolata* leaves during incubation in high RH air.

Sterile water extract of *P. lanceolata* dried leaves was incubated with ten filamentous fungal strains isolated from the plant material for 15 days. Strains were identified with molecular biological methods. We detected loss of aucubin, catalpol and acteoside in the case of many strains compared to control (Fig. 2.). Seven of ten strains were able to decompose both IGs in the model solutions in, and five of ten strains were able to decompose acteoside. As no significant reduction was observed in controls, the role of water as a reaction partner seems less important, though this

would be theoretically possible (Bianco et al., 2003). Most active decomposing species were *Bipolaris tetramera*, *Epicoccum nigrum* and *Cladosporium pseudocladosporioides*.

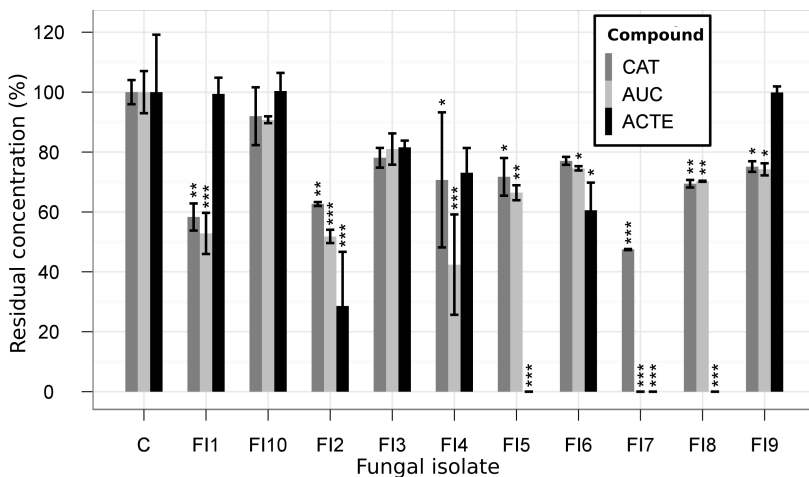


Figure 2. Residual metabolite concentrations in sterile *P. lanceolata* water extracts, incubated with isolated filamentous fungi after 9 days. AUC, aucubin, CAT, catalpol, ACTE, acteoside; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. Fungal isolates: FI1, *Aspergillus niger*; FI2, *Leptosphaerulina 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*.

The plantamajoside content of *P. lanceolata* calli depend on the NH_4^+ / NO_3^- ratio of the medium, while the acteoside content depends on the concentration of the total N source.

Experiments were done on a stable *P. lanceolata* callus line, which grew well and produced a satisfactory amount of secondary metabolites. The line produced large amounts of acteoside and plantamajoside, which were purified as standards from field sample leaves and their presence in the extract of the calli was proven. The presence of these chief compounds corresponds to previously described literature (Fons et al., 1999), (Budzianowska et al., 2004). Production of CPGs was optimized by growing the calli on media with different NH_4^+ / NO_3^- ratios, then on media with different concentrations of N sources.

Of the different media containing 20 mM N source, the best growth index (10.01 ± 2.32) and PMJ production (2.14 ± 0.25 %) was achieved on the only nitrate-containing medium variate. Both growth and PMJ production were reduced with increasing NH_4^+ concentration ($p < 0,05$), at 1:2 NH_4^+ / NO_3^- the growth index was only 6.15 ± 1.91 . Acteoside concentration was not influenced by NH_4^+ / NO_3^- ratio, 0.7-0.8 % values were detected for all media. Growth inhibition is a known phenomenon in plant tissue cultures, it is probably a consequence of direct toxicity of higher concentrations of NH_4^+ (George et al., 2007, p.71).

After that, media with 0:1 NH_4^+ / NO_3^- were tested: calli were grown on media containing 10, 20, 40, 60 mM N source. The concentration of the N source did not alter PMJ production, but did cause changes in growth index and ACTE production ($p < 0,05$). ACTE concentration was maximal at 10 mM nitrogen source (1.11 ± 0.18 %), PMJ content was high

at the media containing 10 or 20 mM nitrogen source, 2.15-2.2 %. High concentration of N source dramatically reduced ACTE content and to some extent reduced the growth index as well. Growth index was optimal at 20 mM N source ($10,01 \pm 2,32$), while at 60 mM it was only $5,39 \pm 0,30$.

After optimization, ACTE concentrations were much higher, than described by (Budzianowska et al., 2004) for *P. lanceolata* calli, PMJ content was somewhat less, than described at the same place.

Optimal yields were calculated using mean starting mass, growth index and metabolite content. Optimal ACTE yield can be obtained on the medium containing 10 mM N source, and 0:1 $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$ ratio (only nitrate), it was found 0.91 ± 0.15 mg/plate/culture period. Plantamajoside yield was maximal on 20 mM N source, and 0:1 $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$ ratio (only nitrate), a theoretical mean being 2.14 ± 0.03 mg / plate.

5. Felhasznált Irodalom / Literature cited

- 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.
- Beara, I.N., 2010. Fitohemijski skrining i procena antioksidantnog i antiinflamatornog potencijala sekundarnih biomolekula u vrstama roda *Plantago* L. ; Doktori dissertáció, University of Novy Sad, Serbia.
- 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.
- 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.
- Eder, M. & Mehnert, W., 1998. Importance of concomitant compounds in plant extracts. *Pharmazie*, 53(5), pp.285-293.
- 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.
- 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.
- George, E.F., Hall, M.A. & Klerk, G.-J.D., 2007. *Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background* 1st ed., Springer.

- Heigl, D. & Franz, G., 2003. Stability testing on typical flavonoid containing herbal drugs. *Pharmazie*, 58(12), pp.881-885.
- Jurisc, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ramachandra Rao, S. & Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2), pp.101-153.
- 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.
- 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.

6. Publikációs lista / List of publications

Az értekezés témájához kapcsolódó publikációk Publications on the topic of the dissertation

Publikációk Impakt faktoralal rendelkező folyóiratokban Publications in journal with impact factor

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) (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 Presentations, posters

S. Gonda, L. Tóth, G. Vasas and G. Borbely (2007)
Iridoid decomposition in improperly stored dried plantain leaves (Poster presentation)
7th 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)
8th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods & 15th 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 Other publications

Publikációk Impakt faktorral rendelkező folyóiratokban Publications in journal with impact factor

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. Bácsí, 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. Serfózo, 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. Serfózo, 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 Publications in other peer-reviewed journals

Bácsí 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

Presentations, posters

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