Új adatok a vérehulló fecskefű (*Chelidonium majus* L.) ismeretanyagához

Doktori értekezés

Sárközi Ágnes

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Kéry Ágnes, c.egyetemi tanár, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Mincsovics Emil, kutatási igazgató, Ph.D.
Dr. Szabó László Gy., egyetemi tanár, D.Sc.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tekes Kornélia, egyetemi tanár, Ph.D.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Máthé Imre, egyetemi tanár, D.Sc.
Dr. Varga Erzsébet, egyetemi docens, C.Sc.
Dr. Sátory Éva, egyetemi tanár, D.Sc.

Budapest
2007.

TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék 1
Összefoglaló 4
Summary 5

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS **6**

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS **9**

2.1 A vérehulló fecskefű (Chelidonium majus L.) farmakognóziai bemutatása **9**
2.1.1. Farmakobotanikai jellemzés 10
2.1.2. A vérehulló fecskefű növénykémiája 12
2.1.3 A vérehulló fecskefű farmakológiai jellegzetességei 16
2.1.4. Klinikai kísérletekben igazolt hatások 21
2.1.5. *Chelidonium* drogok indikációja 21
2.1.6. *Chelidonium* drogokból előállított készítmények 23

2.2. A Chelidonium alkaloidok analitikája **26**
2.2.1. Gyors azonosításra alkalmas módszerek 26
2.2.2. *Chelidonium majus* L. összalkaloid tartalmának meghatározására alkalmas módszerek 26
2.2.3. *Chelidonium* alkaloidok elválasztása vékonyréteg kromatográfiás (VRK) módszerrel 26
2.2.4. *Chelidonium* alkaloidok elválasztása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel 31
2.2.5. *Chelidonium* alkaloidok elválasztása egyéb elválasztástechnikai módszerekkel 34

2.3. A formaldehid szerepe a biológiai rendszerekben **35**
2.3.1. A formaldehid előfordulása 35
2.3.2. A formaldehid ciklus elemei és jelentősége 36
2.3.3. A formaldehidom elemei és jelentősége 39
2.3.4. A formaldehid toxikus hatásai 40
2.3.5. A szingulet oxigén és gerjesztett HCHO képződésének általános lehetősége a biológiai redszerekben 41

2.4. Bioautográfiától a BioArena-ig **44**

3. ANYAG ÉS MÓDSZER **48**

3.1. Vizsgálati anyagok **48**
3.1.1. Növényminták 48
3.1.2. Kémiai reagensek 49
3.1.3. Mikroorganizmus és táptalaj 49

3.2. Vizsgálati módszerek **50**
3.2.1. Drogok szárítási veszteségének meghatározása 50

3.2.2. Mintaelőkészítési műveletek és extrakciós módszerek 50
3.2.2.1. TRADICIONÁLIS GYÓGYSZERFORMÁK KÉSZÍTÉSE 50
3.2.2.2. LIOFILIZÁTUMOK ELŐÁLLÍTÁSA 51
3.2.2.3. MINTAELŐKÉSZÍTÉS HPLC VIZSGÁLATHOZ 51
3.2.2.4. GYÓGYSZERKÖNYVEK EXTRAKCIÓS MÓDSZEREI 51
3.2.3. Fitoanalítikai módszerek 52
3.2.3.1. ALKALOID-TARTALOM MEGHATÁROZÁSA 52
3.2.3.2. VÉKONYRÉTEG-KROMATOGRÁFIÁS (VRK) VIZSGÁLATOK 53
3.2.3.3. VRK-DENZITOMETRIÁS MÉRÉSEK ÉRTÉKELÉSE DENZITOMETRIÁS MÉRÉSEK 54
3.2.3.4.. NAGYHATÉKONYSÁGÚ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLAT 55
3.2.3.5. ÁSVÁNYELEM TARTALOM MEGHATÁROZÁSA ICP-OES MÓDSZERREL 56
3.2.4. Antibakteriális hatásvizsgálat BioArena módszerrel 57

3.3. Statisztikai analízis **58**

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS **60**

4.1. A Chelidonii herba vizsgálata a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv szerint **60**
4.1.1. Makromorfológiai vizsgálat 60
4.1.2. Mikromorfológiai vizsgálat 61
4.1.3. Vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálat 62
4.1.4. Tisztasági vizsgálat 64
4.1.4.1. IDEGEN ANYAG 64
4.1.4.2. SZÁRÍTÁSI VESZTESÉG 64
4.1.4.3. ÖSSZES HAMU TARTALOM 65
4.1.5. Tartalmi meghatározás 65

4.2. Összalkaloid tartalom meghatározás kritikai értékelése és a módszer módosítása **67**

4.3. Növényrészek vizsgálata **70**
4.3.1. Összalkaloid tartalom meghatározás a növényrészekben 70
4.3.2. VRK-denzitometriás módszer kidolgozása az alkaloid összetétel meghatározására 71
4.3.2.1. A DENZITOMETRÁLÁST MEGELŐZŐ VÉKONYRÉTEG KROMATOGRÁFIA KIVITELEZÉSE 72
4.3.2.2. A DENZITOMETRIÁS VIZSGÁLAT OPTIMALIZÁLÁSA 74
4.3.2.2.1 Mérési hullámhossz meghatározása 74
4.3..2.2. Színstabilitási vizsgálat 76
4.3.2.2.3. A kalibrációs görbék felvétele 77
4.3.2.2.4. A legkisebb detektálható mennyiség megállapítása 78

4.3.2.2.5. A mérések reprodukálhatósága 78
4.3.2.3. A VRK-DENZITOMETRIÁS MEGHATÁROZÁS ISMÉTELHETŐSÉG VIZSGÁLATA NÖVÉNY MINTÁN 79
4.3.3. Alkaloid összetétel meghatározása VRK-denzitometriás módszerrel 80
4.3.4. Alkaloid összetétel meghatározása HPLC-s módszerrel 85
4.3.5. VRK-denzitometriás és HPLC-s módszerek összehasonlítása 89

4.4. Chelidonium alkaloidok tradicionális gyógyszerformákba való kioldódásának vizsgálata **91**
4.4.1. Alkaloidok kioldódásának vizsgálata spektrofotometriás összalkaloid tartalom meghatározással 91
4.4.2. Alkaloidok kioldódásának vizsgálata HPLC módszerrel 93

4.5. A Chelidonium drogok és a tradicionális kivonatok ásványelem tartartalmának vizsgálata **98**
4.5.1. A Chelidonii herba és radix ásványelem tartalmának vizsgálata 98
4.5.2. Ásványelemek kioldódásának vizsgálata a Chelidonii herba-ból készült tradicionális gyógyszerformákba 101

4.6. A vérehulló fecskefű összalkaloid tartalmának és alkaloid összetételének változása a vegetációs periódus alatt **106**

4.7. A Chelidonium alkaloidok antibakteriális hatásának vizsgálata BioArena módszerrel **118**
4.7.1. A vékonyréteg-kromatogramok kifejlesztése 118
4.7.2. A *Chelidonium* alkaloidok antibakteriális hatásának vizsgálata 119
4.7.3. A *Chelidonium* alkaloidok antibakteriális hatásmechanizmusának vizsgálata 123
4.7.4. A *Chelidonium* gyökér kivonat antibakteriális hatásának vizsgálata 124
4.7.5. A Cu(II)-ion hatása a *Chelidonium* alkaloidok antibakteriális aktivitására 126

5. ÖSSZEFOGLALÁS **128**

6. IRODALOMJEGYZÉK **136**

7. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE **152**

8. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS **156**

MELLÉKLET **Saját közlemények különlenyomatai**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Új adatok a vérehulló fecskefű (*Chelidonium majus* L.) ismeretanyagához

Készítette: Sárközi Ágnes
Témavezető: Dr. Kéry Ágnes, Ph.D.

Semmelweis Egyetem, Farmakognózia Intézet

ÖSSZEFOGLALÓ

Az izokinolin vázas alkaloidokat tartalmazó vérehulló fecskefű spazmolitikus, gyulladásgátló, mikróba- és tumorellenes hatásai miatt alkalmazott gyógynövény. Bár a nagyszámú publikáció tanúsága szerint tárgyát képezi a legújabb kutatásoknak is, racionális terápiás felhasználása nem kellően megalapozott. Sajátos aktualitást ad a növény újraértékelésének a Chelidonii herba drog hivatalossá válása a VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben. Munkánkban olyan ismeretekkel kívántuk bővíteni a vérehulló fecskefű adatbázisát, amelyek elősegítik a *Chelidonium* drogok és készítményeik gyógyszerészeti és terápiás minőségének biztosítását.

A begyűjtésből származó *Chelidonium* drogok felhasználása mindig több bizonytalanságot rejt magában, mint a termesztett drog-alapanyag alkalmazása, ezért vizsgálataink megkezdésekor minősítettük a saját begyűjtésből származó növénymintákat.

Ajánlást fogalmaztunk meg az összalkaloid tartalom gyógyszerkönyvben előírt spektrofotometriás meghatározási módszerének módosítására, amely figyelembe veszi a tercier és kvaterner alkaloidok együttes előfordulását. A meghatározás fontosabb lépéseit és eredményességét HPLC vizsgálatokkal támasztottuk alá.

Az alkaloid arányok meghatározására alkalmas munka és időigényes HPLC eljárás mellett alternatív módszerként használható egyszerű VRK-denzitometriás eljárást fejlesztettünk ki. Utóbbi különösen alkalmas nagyszámú növényminta rutin mérésére, mert gyors, olcsó, és a kvaterner N-t tartalmazó alkaloidok fluoreszkáló tulajdonságát kihasználva a HPLC módszerrel összehasonlítva is megfelelő érzékenységű (RSD = 0,67-1,24%) és kielégítő pontosságú (RSD = 3,3,-4,8%) (1).

Az összalkaloid tartalom és a terápiás hatás szempontjából fontos alkaloid arányok megismerésében kromatográfiás módszerekkel alátámasztott adatokat szolgáltattunk. A növényrészek alkaloid tartalma sorrendben: generatív szervek (1,54%), gyökér (1,43%), levél (0,71%), szár (0,68%). Megállapítottuk, hogy a föld feletti részek fő alkaloidja a koptizin. A gyökérben a kelidonin található legnagyobb mennyiségben, de jelentős a szangvinarin, koptizin, keleritrin és berberin tartalma is. Legmagasabb alkaloid értékek a növény nyugalmi periódusában (két virágzás között) gyűjtött mintákban mérhetők. Ezzel kijelöltük a Chelidonii herba és -gyökér drogok előállítására alkalmas gyűjtési időt.

A *Chelidonium* készítmények fitotechnológiájának megalapozásához adatokat szolgáltattunk az egyes alkaloidok tradicionális gyógyszerformákba való kioldódásához.

ICP-OES módszerrel vizsgáltuk a drogban található ásványi elemek (Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Ti, V, Zn) mennyiségét, valamint azok kioldódását a tradicionális gyógyszerformákba (2).

BioArena módszerrel végzett biológiai vizsgálataink megerősítették a *Chelidonium* alkaloidok antibakteriális aktivitását, és alátámasztották azt a feltételezést, hogy a hatásmechanizmus a demetilálódást követő formaldehid képződésen keresztül valósul meg (3).

(1) Sárközi, Á., Janicsák, G., Kursinszki, L., Kéry, Á. (2006) *Chromatographia* 63, 81-86.
(2) Sárközi, Á., Then, M., Szentmihályi, K. (2005) *Acta Alimentaria* 34, 113-120.
(3) Sárközi, Á., Móricz, Á.M., Ott, P.G., Tyihák, E., Kéry, Á. (2006) *J. Planar Chromatogr.* 19, 267-272.

Ph.D.Thesis

Novel data contributing to our knowledge of the greater celandine (*Chelidonium majus* L.)

Prepared by: Ágnes Sárközi
Supervised by: Dr. Ágnes Kéry, Ph.D.

Semmelweis University, Department of Pharmacognosy

SUMMARY

The greater celandine is a medicinal plant well-known for the spasmolytic, anti-inflammatory, antimicrobial and antitumor effects of its isoquoinoline alkaloids. Although this medicinal herb is a subject of recent investigations its successful therapeutic applications has not been corroborated so far by scientific results. Re-evaluation of the aerial parts of the plant has become especially timely with its adoption as an official drug in the VIIIth Hungarian Pharmacopoeia. We wished to offer new data to the plant database, in order to ensure the pharmaceutical and therapeutic quality of *Chelidonium* drugs and preparations.

The application of *Chelidonium* drugs obtained by collection always involves higher risks than those of cultivated drugs, therefore herbal samples from our own collection have been qualified according to pharmacopoeia.

Determination of the total alkaloid content by spectrofotometry has been modified so as to allow the measurement of tertiary and quaternary alkaloids as well. The main steps and results of determination have been confirmed by HPLC assessment.

For the investigation of main alkaloids – usually carried out by HPLC method, a highly accurate but rather laboursome procedure– taking the advantage of the fluorescence property of quaternary alkaloids we developed a simple, low-cost TLC-densitometry method. This is applicable for routine determination of a large amount of samples (sensitivity: RSD = 0.67 – 1.24% and accuracy: RSD = 3,3 – 4,8%) (1).

For a closer knowledge of alkaloid ratios, important from the aspect of total alkaloid content and therapeutic effect we supplied data obtained by chromatographic methods. Measurement of the total alkaloid content of the plant parts gave the following results: generative organs (1,54%), root (1,43%), leaf (0,71%), stem (0,68%). The main alkaloid of the aerial part was determined as coptisine. In the root part, chelidonine can be found in highest amount, but the concentration of sanguinarine, coptisine, chelerythrine and berberine is also considerable. Highest total alkaloid content was measured in samples collected during the rest period, therefore this time is most appropriate for the collection of both the herb and the root.

In order to contribute to the phytotechnology of *Chelidonium* preparations, we measured the results of alkaloid dissolution from traditional extracts of the herb.

The mineral element composition of *Chelidonium* drugs and their traditionally applied extracts were analysed by ICP-OES for Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Ti, V and Zn content (2).

Our biological studies performed by the BioArena method confirmed the antibacterial activity of *Chelidonium* alkaloids and also support the assumption that the reaction mechanism is realized by the formation of formaldehyde due to demethylation (3).

(1) Sárközi, Á., Janicsák, G., Kursinszki, L., Kéry, Á. (2006) *Chromatographia* 63, 81-86.
(2) Sárközi, Á., Then, M., Szentmihályi, K. (2005) *Acta Alimentaria* 34, 113-120.
(3) Sárközi, Á., Móricz, Á.M., Ott, P.G., Tyihák, E., Kéry, Á. (2006) *J. Planar Chromatogr.* 19, 267-272.

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A növényi készítmények terápiában történő alkalmazása számos jelentős eredménnyel járult hozzá a modern orvostudomány fejlődéséhez, felhasználásuk napjainkban is bővül. A folyamatban kiemelkedő szerepet játszik a nemzeti gyógyszerkönyvekben is régóta szereplő tradicionális gyógynövények értékeinek újrafelismerése, amelyek hosszú évek tapasztalatai alapján eredeti, vagy feldolgozott állapotukban, gyógyszerkészítmények alkotórészeként is hatásosnak bizonyultak. Ilyen ősidők óta alkalmazott gyógynövény a vérehulló fecskefű (*Chelidonium majus* L.), mely az irodalomban található nagyszámú publikáció tanúsága szerint tárgyát képezi a legújabb kutatásoknak is.

A gyógynövények felhasználása az utóbbi évtizedben világszerte növekedett, aminek az oka, sok más mellett, a szintetikus gyógyszerekkel ellentétben a növényi készítmények irányába tapasztalható egyre növekvő bizalom, valamint az a felfogás, amelyben a természetes fogalma mellé a biztonságosság is kapcsolódott.

Ahhoz, hogy a növekvő információs igény adatbázisát ne csak a gyógynövények tradicionális felhasználásából származó hagyományok és tapasztalatok képezzék, szükség van a gyógynövények, méginkább a gyógynövénykészítmények tudományos eredményekkel alátámasztott fitokémiai és farmakológiai vizsgálatára.

A *Chelidonium majus* L. számos gyógyszerkönyvben és monográfia gyűjteményben megtalálható, valamint föld feletti hajtása a 2006. augusztus 1-én érvénybe lépett VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben először emelkedett Magyarországon is hivatalos drog rangjára. Ezzel egyidőben a vérehulló fecskefű és drogjai (Chelidonii herba és -radix), valamint a növényből előállított törzskönyvezett készítmények iránt növekszik a szakszerű tájékozódás és tájékoztatás igénye.

A vérehulló fecskefűvel kapcsolatos növénytani, fitokémiai és farmakológiai adatok felkutatása a meglévő nagyszámú ismeretanyag összegzésének szükségességéről és további fitokémiai és biológiai kutatások elvégzésének időszerűségéről győzött meg.

Célkitűzéseink között szerepelt gyors és egyszerű módszerek kidolgozása az Európa-szerte jelentős felhasználású *Chelidonium majus* L. drogjainak és készítményeinek

fitokémiai és biológiai vizsgálatára, hozzájárulva a fitoterápiás alkalmazások biztonságosabbá tételéhez és a további gyógyszerfejlesztéshez.

Mivel a vérehulló fecskefű görcsoldó, gyulladásgátló, mikróba- és tumorellenes hatásaiért elsősorban izokinolin vázas alkaloidjai felelősek, a *Chelidonium* alkaloidok vizsgálata képezte kutatásaink fő irányát. A gyógyszerkönyvekben (10. Német Gyógyszerkönyv, 5. Európai Gyógyszerkönyv, VIII. Magyar Gyógyszerkönyv) hivatalos összalkaloid tartalom meghatározások mellett fontosnak tartottuk az egyes alkaloid komponensek mennyiségi mérésére is alkalmas módszerek adaptálását, kritikai értékelését, összehasonlítását és szükséges módosítását is. A fő alkaloidok vizsgálatára a pontos, ugyanakkor idő és munkaigényes HPLC eljárás mellett egy egyszerű, gazdaságos, és nagyszámú minta rutin meghatározására megfelelő VRK-denzitometriás módszer kifejlesztését is célszerűnek tartottuk, remélve, hogy a kvaterner N-t tartalmazó alkaloidok fluoreszkáló tulajdonságát kihasználva, a denzitometriás módszer pontossága úgy növelhető, hogy alternatív lehetőség lehet a HPLC mellett.

Munkánkban célul tűztük ki a gyógynövények felhasználása során kiemelkedő jelentőségű, általánosan elterjedt tradicionális vizes és alkoholos gyógyszerformákba történő alkaloid kioldódás vizsgálatát is. A komplex kémiai összetétel nagy hatékonyságú és kiemelkedő érzékenységű analitikai módszer alkalmazását követelte meg, melyeket célszerű volt úgy optimalizálni, hogy a drog analízisén kívül a különböző extraktumok vizsgálatára is alkalmas legyen.

Biológiai vizsgálatainknál felvetődött a növényben található makro- és mikroelemek hatást befolyásoló szerepe. Mivel a *Chelidonium* drogokra vonatkozó kellően részletes és pontos ásványelem meghatározást nem találtunk az irodalomban, célkitűzéseink közé soroltuk a drogok, illetve a herbából a tradicionális gyógyszerkészítés szabályai szerint előállított vizes (főzet, forrázat) és alkoholos (tinktúrák) kivonatok ásványelem tartalmának korszerű, induktíven csatolt plazma emissziós spektrofotometriás (ICP-OES) módszerrel való feltárását is.

Az érvényes gyógyszerkönyvek nem definiálják a *Chelidonium* drogok pontos begyűjtési idejét, az irodalomból megismert ajánlások pedig ellentmondóak, és nincsenek megfelelő eredményekkel alátámasztva. Ezért fontosnak éreztük az összalkaloid tartalom és a terápiás hatás szempontjából lényeges alkaloid arányok

változását tanulmányozni a vegetációs periódus alatt, valamint korszerű kromatográfiás módszerekkel meghatározott adatokat szolgáltatni a helyes gyűjtési idő kiválasztásához. A *Chelidonium* alkaloidok, valamint kivonatok antivirális, antibakteriális és antifungális hatása széleskörben ismert az irodalomban. A vérehulló fecskefű izokinolin vázas alkaloidjai N-, illetve O-atomján könnyen lehasadó metilén csoportokat tartalmaznak, így potenciális formaldehid-adó molekuláknak tekinthetők. Fent említett okok miatt ígéretesnek tűnt a *Chelidonium* alkaloidok BioArena módszerrel történő antibiotikus hatásvizsgálatának elvégzése, valamint az általunk feltételezett demetilálódást követő formaldehiden keresztül kialakuló hatás mechanizmusának tanulmányozása.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A vérehulló fecskefű (Chelidonium majus L.) farmakognóziai bemutatása

A vérehulló fecskefű (1.ábra) feltűnő színű tejnedve miatt korán felkeltette az érdeklődést. Legkorábban Teofrastus (Kr. e. 287) írásaiban találkozunk a növény említésével. Plinius (Kr. e. 79-23) úgy vélte, hogy a fiatal vak fecskéket az öregek a fecskefű tejnedvével gyógyították meg. Az alkimisták az ég adományának (coeli donum) nevezték, benne vélték felfedezni a négy elemet. Hildegard von Bingen (1098-1179) figyelmeztet a növény mérgező hatására. Dürer 1526-ban festményben örökíti meg a növényt (Habrich 1993). Pápai Páricz Ferenc (1764) külsőleg (hályog és fogfájás esetén) és belsőleg (sárgaság és hasgörcsök ellen) is ajánlja használatát.
A *chelidon* szó görögül fecskét jelent, mely a növény virágzására (amikor a fecskék jönnek) és elszáradására (amikor a fecskék elköltöznek) utal (Halmai és Novák 1963).

1.ábra Vérehulló fecskefű (*Chelidonium majus* L.)

2.1.1. Farmakobotanikai jellemzés

A vérehulló fecskefű a Papaverales (mákvirágúak) rendjébe, ezen belül a Papaveraceae (mákfélék) családjába tartozik (Dános 1997, Dános 1998).

Tudományos neve: *Chelidonium majus* L. (2.ábra).

Magyar szinonim nevek: arannyal versengő, cinadó, cinadógódirc, gódavere, vérrel harmatozó fű, vereslőfű, sárga festőfű.

Idegen nevei: (angol) greater celandine, swallowort; (német) Schöllkraut, Goldwurz, Gelbkraut, Augenkraut, Warzenkraut; (francia) chélidonine; (olasz) cinerognolle (Mills és Bone 2000, WHO Monográfia 2006).

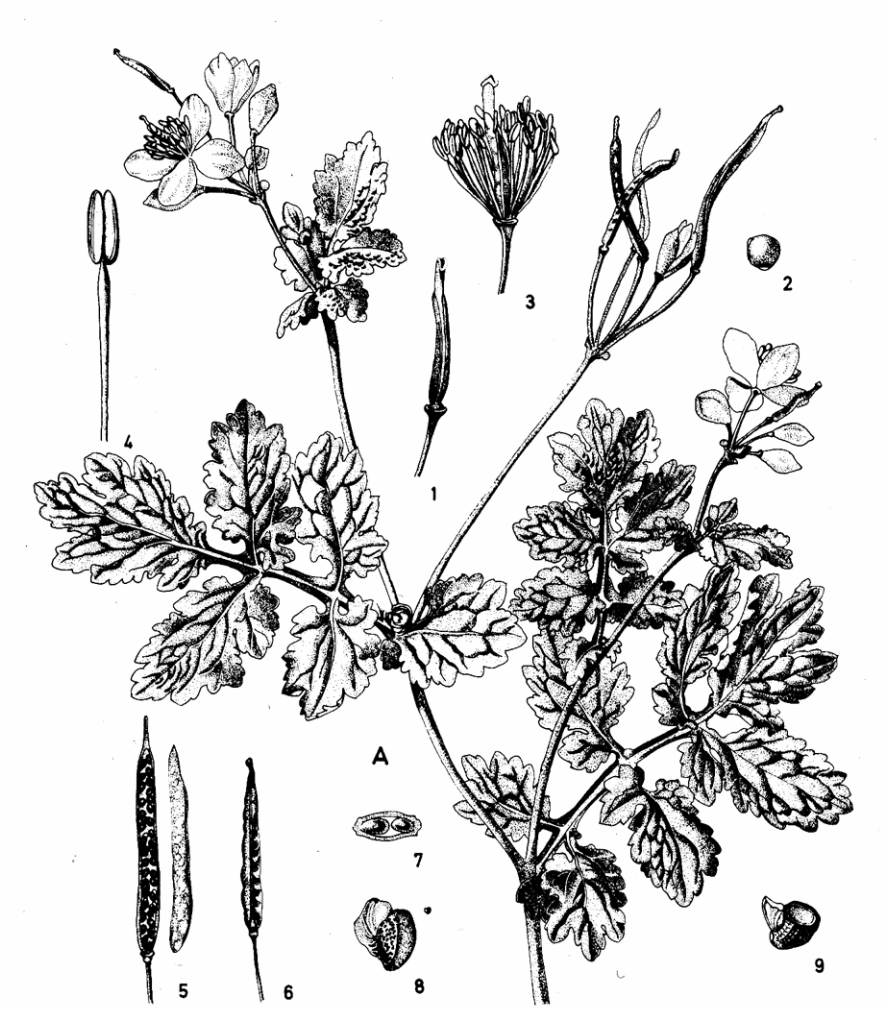
Egész Európában, Ázsia mérsékelt és hideg éghajlatú tájain, valamint Észak-Amerikában élő flóraelem. Amerikában nem volt honos, valószínűleg behurcolták.

Rudeális területeken: erdők szélén, árokpartokon, akácosokban, parlagokon, kerítések mentén, kertekben élő közönséges gyomnövény. Mint „hangya cipelmény" azonban szokatlan helyeken: várfalak repedéseiben, meredek sziklafalak hasadékaiban is előfordulhat. A hangyák ugyanis a magon található fehér olaj tartalmú dudorokat előszeretettel fogyasztják, így a magvakat széthurcolják.

A növény lágyszárú, évelő. Jellemző rá, hogyha bárhol megsebezzük vörösessárga, keserű ízű, ragadós tejnedv csordul ki.

Gyökerei rostszerűek, gyöktörzse húsos, hengeres, kissé elágazó, többfejű és több szárat is fejleszt. *Szára* 30-80 cm magas, tompán szögletes, felső részén álvillásan elágazó, kékeszöld, gyéren puha szőrű, tövén gyapjas, belül csöves. *Levelei* váltakozó állásúak, színükön világoszöldek, fonákjukon kékeszöldek, szőrösek. Tőlevelei hosszúnyelűek, szárlevelei rövidnyelűek, vagy ülők. A levelek szárnyasan szeldeltek, a szeletek részben nyelesek, hosszúkás tojás alakúak, durván csipkézettek. *Virágzata* 3-8 virágú ernyős forgó; az alsó virágok alatt apró murvák vannak. Két csészelevele tojás alakú, zöldes, szőrös és virágfakadáskor lehullik. Négy aranysárga színű, fordított tojás alakú, 1-1,5 cm hosszú és sok, a szirmoknál rövidebb porzója van.

Termője húsos, hengeres, bibéje kétlebenyű, bibeszála rövid. Termése húsos, hengeres, kopasz becőszerű tok, alulról felfelé kovad. Számos magja van, melyek ferde tojás alakúak, feketék, vagy sötét olajzöldek fehér, húsos dudorral. A növény április-május, ill. szeptemberben (másodvirágzás) virágzik (Halmai és Novák 1963).



2.ábra Chelidonii herba (A), (1 - bibe; 2 - pollen; 3 – bibe és porzószálak együtt , 4 - porzószál; 5 – felnyílt toktermés a magokkal ; 6 – zárt toktermés; 7 - bibe keresztmetszete; 8 - mag; 9 – mag keresztmetszete) (Deutschmann és mtsai 1979)

A legtöbb országban – főleg Kelet-Európában - vadon előforduló állományból gyűjtik drogjait, de a növény szelektált változatának termesztését is megoldották pl. Lengyelországban (Cynober fajta) (Hagers Handbuch 1993). Franz és Fritz (1979) kísérletei szerint a terméshozam ásványi talajon nagyobb, viszont a szerves talajon fejlődő növények magasabb alkaloid tartalmúak voltak.

Drogként a növény virágzó hajtása (Chelidonii herba) és gyökere (Chelidonii radix) használatos. Herbáját virágzáskor, gyökerét kora tavasszal vagy késő ősszel gyűjtik (Soó 1973).

A vérehulló fecskefű föld feletti része (Chelidonii herba) hivatalos a Német Gyógyszerkönyvben (DAB 10 - 1999), valamint egyike annak a nagyszámú drognak, amely – minthogy szerepel az érvényes Európai Gyógyszerkönyvben (Ph.Eur.5. - European Pharmacopoeia 2004) – a 2006. augusztus 1-én érvénybe lépett VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben (Ph.Hg.VIII. 2004) először emelkedett Magyarországon is hivatalos drog rangjára.

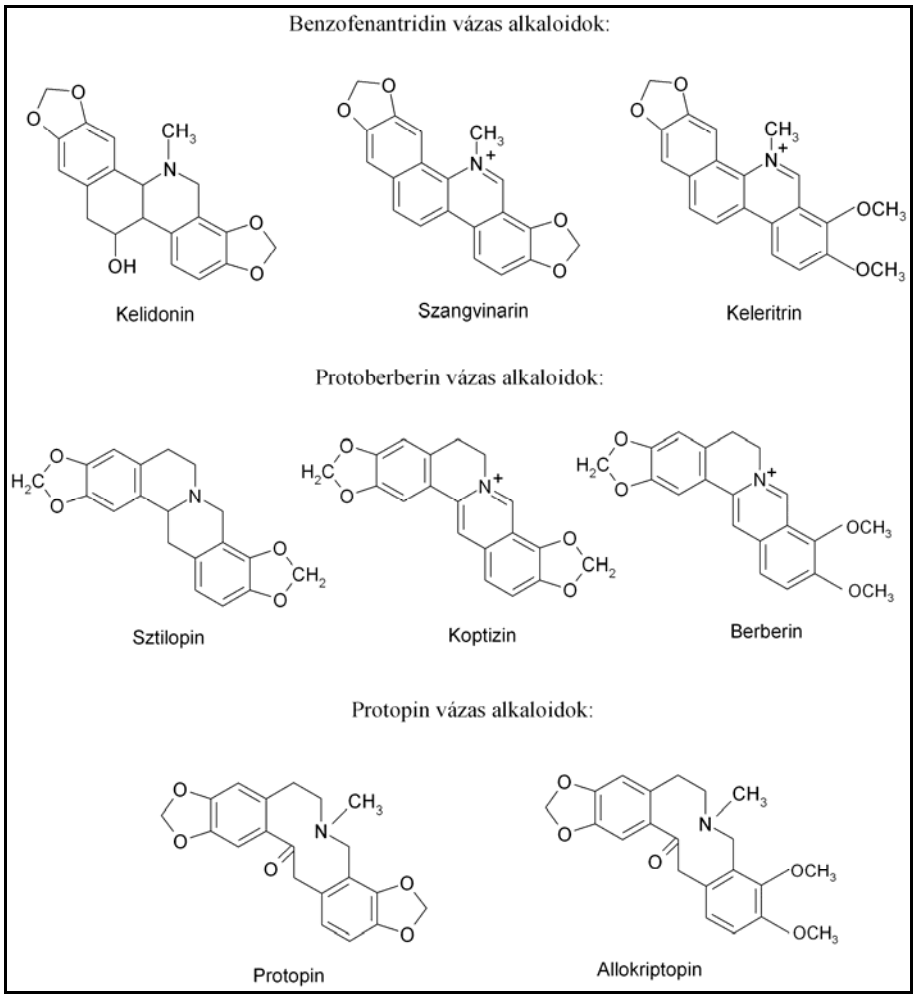
2.1.2. A vérehulló fecskefű növénykémiája

A vérehulló fecskefű botanikai és kémiai rokonságban van, egy növénycsaládba tartozik a mákkal. Amint e család tagjaira jellemző, a fecskefű is alkaloid tartalmú, alkaloidjait savakkal alkotott sók formájában sárga tejnedvében akkumulálja. A növény alkaloidjai izokinolin vázasok. Ezen alkaloid-család 2000-nél több izolált képviselőjével előkelő helyet foglal el az alkaloid-csoportok között (Petri 1991, Tóth 2005).

A vérehulló fecskefű alkaloidjai heterociklusuk alapján három típusba sorolhatók:

- benzofenantridin (kelidonin, keleritrin, szangvinarin)
- protoberberin (berberin, koptizin, sztilopin)
- protopin (α,β-allokriptopin, protopin) vázas alkaloidok (3. ábra) (Schilcher 1997).

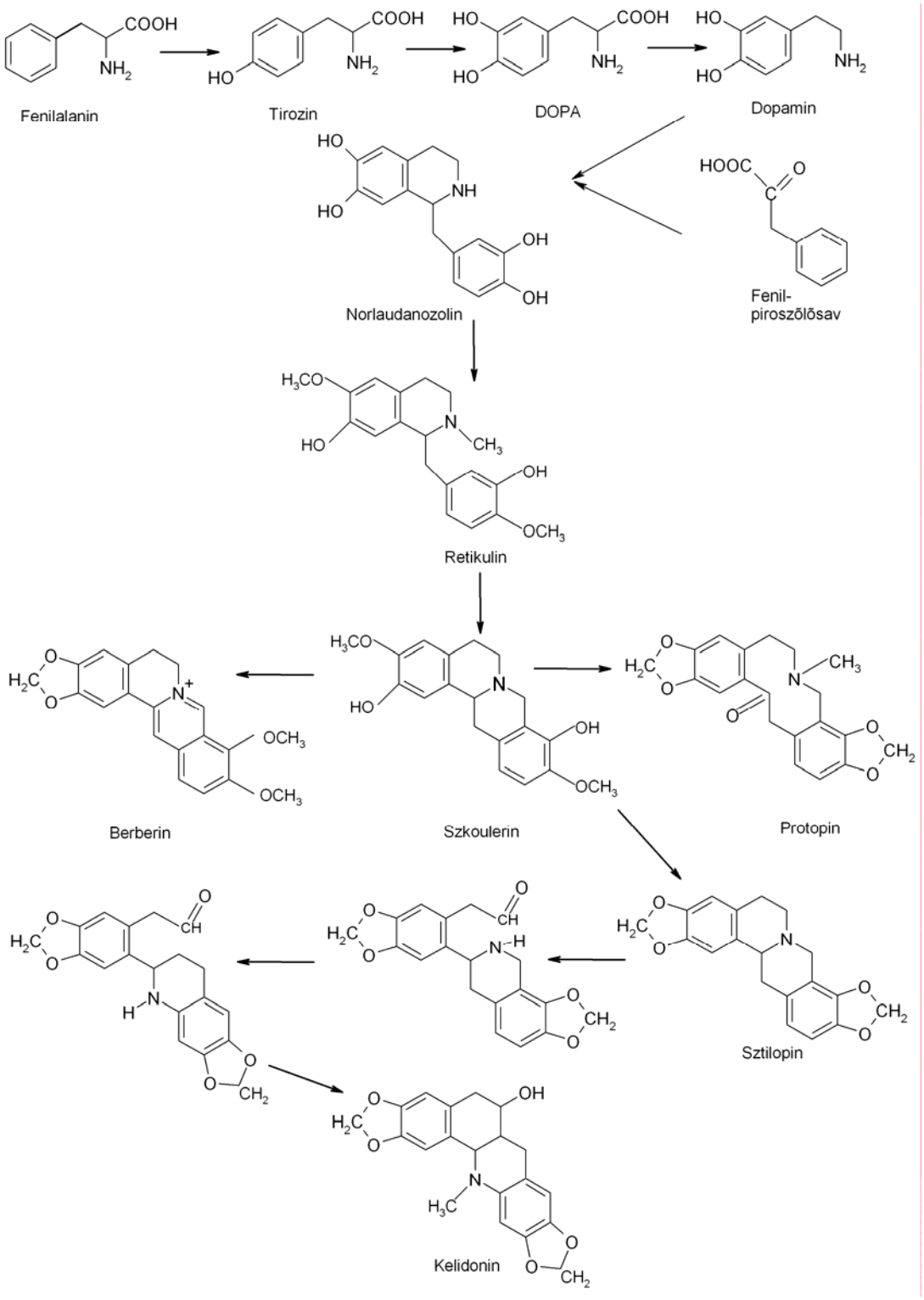
A *Chelidonium* alkaloidok N atomja a fenilalaninból származik, mely aminosavból a bioszintézis során tirozin, DOPA, később dopamin keletkezik. Dopaminból és fenil-piroszőlősavból képződő termék a norlaudanozolin, mely kiindulási anyaga a fecskefűben található benzilizokinolin vázas alkaloidokon kívül a mákfélék morfinán és aporfin vázas alkaloidjainak is. Norlaudanozolinból retikulin, majd gyűrűzárodással szkoulerin képződik. Szkoulerinből kialakulnak a protoberberin- és protopin vázas *Chelidonium* alkaloidokra jellemző heterociklusok. A protoberberin vázból (sztilopin) benzofenantridin váz (kelidonin) a B gyűrű felnyílása, majd átrendeződést követő gyűrűzárodással képződik (4.ábra).



3.ábra Benzofenantridin-, protoberberin- és protopin-vázas *Chelidonium* alkaloidok

A herbában és a gyökérben 23 alkaloidot írtak le és jellemeztek egyértelműen (Táborska és mtsai 1994). Néhány alkaloid nevét a *Chelidonium* szóból képezték az első leírók (kelidonin, keleritrin). A 90-es években azonosított új alkaloidok a növényben a turkijenin (Kadan és mtsai 1990); izokelidonin (De Rosa és Di Vincenso 1992); norkelidonin (Kadan és mtsai 1992); koridin, norkoridin (Shaffee és Jafarabadi 1998).

A Chelidonii herba és -radix fő alkaloidjának sokáig a kelidonint tartották, mai ismereteik szerint a gyökér fő alkaloidja a kelidonin, magas keleritrin és szangvinarin tartalommal; a herba fő alkaloidjának a vegetációs periódustól függően a kelidonint, a protopint, illetve a koptizint írják le (Kustrak és mtsai 1982, Fulde és Wichtl 1994, Tomé és Colombo 1995).



4.ábra A *Chelidonium* alkaloidok bioszintézise (Santavy 1970)

Eltérően a többnyire színtelen vagy fehér alkaloidoktól, a fecskefűben található kvaterner N atomot tartalmazó alkaloidok jellemző élénk színűek: a berberin zöldessárga, a keleritrin és a koptizin sárga, a szangvinarin narancssárga. Utóbbiak adják a kicsorduló tejnedv feltűnő színét.

A gyógyszerkönyvekben előírt sprektrofotometriás módszerrel mért kelidoninban kifejezett összalkaloid tartalom széles határok között változik: föld feletti hajtásban (herba): 0,1-1%; a gyökérben: 1-3% (Wichtl 1994).

A növény egyéb tartalom anyagai az aminok (kolin, metilamin, tiramin) és szerves savak (kelidonsav, almasav, citromsav, borostyánkősav). A herba tartalmaz továbbá kávésav-származékokat (2-kaffeoil-D-glicerinsav, kaffeoil-L-almasav, 4-kaffeiol-trihidroxivajsav) (Hanh és Nahrstedt 1993) és flavonoidokat is (Colombo és Bosisio 1996).

Az utóbbi években több olyan vegyületet írtak le a növényben, melyek nem alkaloid jellegűek, de hozzájárulnak a drogok korábban dokumentált hatásaihoz (pl.: lektin frakció, kelidocisztein nevű protein, proteolítikus enzimek) (Fik és mtsai 1995, Fik és mtsai 2001, Song és mtsai 2002, Song és mtsai 2003, Rogelj és mtsai 1998).

Tekintve, hogy munkánk célja az alkaloidok vizsgálata, e dolgozat kereteit meghaladja a fent említett szerves tartalomanyagok részletes ismertetése.

A gyógynövények és kivonataik terápiás hatásának kialakulásában a bennük lévő szerves komponenseken (bioaktív anyagok) kívül a szintén jelenlévő szervetlen elemek is részt vehetnek (Parmar és mtsai 1993). A drogok kivonataiba kioldódott elemeket (makro- és mikroelemek) bizonyos minőségi és mennyiségi megszorításokkal ugyancsak hatóanyagnak tekinthetjük.

Tölgyesi (1969) kolorimetriás módszer alkalmazásával elvégezte néhány elem (Ca, P, Fe, Mn, Zn, Cu) meghatározását a vérehulló fecskefű herbában és gyökérben. *Chelidonium* drogokra vonatkozó korszerűbb ásványelem meghatározást nem találtunk az irodalomban.

2.1.3 A vérehulló fecskefű farmakológiai jellegzetességei

A *Chelidonium* alkaloidokkal, illetve kivonatokkal végzett hatástani vizsgálatok főként a hagyományos orvoslásban megfigyelt spazmolitikus, antimikróbás, gyulladásgátló és tumorellenes hatásokra irányulnak.

• A vérehulló fecskefű alkoholos kivonatát, alkaloidjai közül a koptizint, protopint, kelidonint és berberint, valamint a növényben található kávésav származékokat hatásos spazmolitikumnak találták *in vitro* állatkísérletes modellekben. A vizsgálatokat tengerimalac, patkány- ileum- és fundus simaizomzatán végezték. Standardként papaverin-klorid oldatot alkalmaztak. A *Chelidonium* kivonat 0,5 mg/ml, a kelidonin és protopin 0,01-0,1 mg/ml, a berberin 0,03 mg/ml koncentrációban volt hatásos (Üstünes és mtsai 1988, Ko és mtsai 1992, Lin és Chang 1995, Boegge és mtsai 1996, Piacente és mtsai 1997, Hiller és mtsai 1998).

• Friss fecskefű kivonat 50%-kal növelte a kutyák epekiválasztását (Kreitmair 1950). Rentz és mtsai (1947) csak koncentrált friss kivonat használatakor észlelt kolerézist patkányokon és tengerimalacokon végzett kísérletei során. Német kutatócsoport a növény alkoholos összkivonatának vizsgálatakor epefolyást elősegítő hatásról számolt be. Sem az önmagában alkaloid- (0,4 mg/ml), sem a csupán fenoloid komponenseket (1 mg/ml) tartalmazó frakciók nem bizonyultak olyan hatásosnak, mint az összkivonat (10 mg/ml) (Valensieck és mtsai 1994).

• Lenfeld és mtsai (1981) a *Chelidonium majus* gyökeréből izolált kvaterner benzofenantridin alkaloidok (szangvinarin és keleritrin 25 – 250 μg/ml) gyulladásgátló hatását vizsgálták patkánytalpon kiváltott karragén ödéma modellben. A vizsgálatot a két alkaloid *Gram pozitív* baktériumokra kifejtett hatásával, illetve egereken végzett kísérletek toxicitási adataival egészítették ki. A szangvinarint alacsony toxicitása, jó gyulladásgátló és antimikróbás hatása miatt a szájüreg gyulladásos betegségeinek kezelésére ajánlják.

A növény leveléből izolált sztilopin hatásos nitrogén-monooxidáz és ciklooxigenáz-2 gátló, valamint csökkenti a prosztaglandin E_2 képződését. Ez a hatásmechanizmus feltételezhetően hozzájárul a fecskefű gyulladásgátló hatásához (Jang és mtsai 2004).

• Vavrekova és mtsai (1996) humán keratinocita sejtek növekedésgátló hatásvizsgálatában hatékony vegyületnek találták a *Chelidonium majus*-ból izolált keleritrin (3,2μM) és szangvinarin (0,2μM) alkaloidokat.

• Haberlein és mtsai (1996) szerint a *Chelidonium* alkaloidok agonistaként viselkednek a $GABA_A$-receptorokon, valamint az egyes alkaloidok között sikerült szinergizmuson alapuló receptorhatást kimutatniuk.

• A fecskefűből előállított tinktúra (5 napon át 25 mg/testtömeg kg) *per os* adagolása csökkentette a szén-tetraklorid okozta májkárosodást patkányokban (Cerni és mtsai 1970). Mitra és mtsai (1996) a *Chelidonium* alkaloidok patkány májsejtekre gyakorolt hepatoprotektív hatását vizsgálta mikroszkóp segítségével. Egyszerre adagolt szén-tetraklorid és *Chelidonium* kivonat esetén nem találtak elváltozást a májsejteken.

• Régikeletű a növény alkalmazása rosszindulatú daganatos megbetegedésekben. Több kutatócsoport kísérelte meg a *Chelidonium* alkaloidok és kivonatok tumorellenes hatásigazolását (Sokoloff 1968, Stermitz és mtsai 1973). Sokoloff és mtsai (1964) vizes és alkoholos *Chelidonium* extraktumokkal kezelt szarkómás és Erlich karcinómás egerek vizsgálata során tumorgátló hatásról számolt be. A hatást a kivonatból izolált kelidonin és protopin alkaloidoknak tulajdonították.

A gyökérből készített alkoholos kivonat *in vitro* rákos sejteken citotoxikus hatást mutatott. A tumorellenes hatásért felelős fő komponensnek a koptizin nevű alkaloidot jelölték meg (Kim és mtsai 1969).

Lengyel kutatók az N-metil kelidonin metil-szulfát származéknak *in vitro* nagyobb antitumor hatást tulajdonítanak, mint a kelidoninnak. Érdekesség, hogy *in vivo* állatkísérletekben előbbi vegyületek azonos hatékonyságúnak bizonyultak (Zbierska és Kowalewski 1979). Kelidonin N-oxid és más kelidoninból előállított félszintetikus vegyületek vizsgálatakor jelentősebb tumorellenes hatást észleltek, mint kelidonin hatására (Zbierska és Kowalewski 1980).

Bocharova és mtsai (1999) negyven növényi kivonat antiproliferatív hatását vizsgálta méhrák sejteken, hogy egy hatásos növényi készítményt fejleszthessenek ki. A kísérletek során a Chelidonii herba kivonata 10 mg/ml koncentrációban jó tumornövekedés gátló hatást mutatott.

Japán kutatók egy szintetikus benzofenantridin alkaloid (NK109) tumorellenes hatását vizsgálták és hasonlították össze természetben előforduló benzofenantridin alkaloidokkal (keleritrin és szangvinarin). *In vivo* állatkísérleteik szerint csak az NK109-nek tulajdonítható tumorellenes hatás (Nakanishi és mtsai 1999).

Török kutatók Chelidonii herba vizes és alkoholos kivonatok, valamint a herbában található kelidonin és protopin alkaloidok citotoxikus hatását tanulmányozták. A két alkaloid enyhe citotoxikus hatást mutatott, míg a föld feletti részből előállított vizes és alkoholos kivonatok jóval toxikusabbnak bizonyultak (Saglam és Arar 2003).

A tumorellenes hatás bizonyítására tett erőfeszítések ma is folytatódnak. Nowicky és mtsai (1987) Ukrain (NSC-631570) néven előállítottak és szabadalmilag is levédtek egy *Chelidonium* összalkaloid-tiofoszforsav komplex són alapuló készítményt.

Elvégezték a termék teratogén hatásvizsgálatát (Juszkiewicz és mtsai. 1992), bizonyították citotoxikus, tumornövekedés gátló, valamint immunmoduláló aktivitását (Nowicky és mtsai 1992, Nowicky és mtsai 1991, Liepins és Nowicky 1996). Vizsgálták továbbá az Ukrain antivirális és antibakteriális (Lozjuk és mtsai 1996, Boyko és mtsai 1996, Ciebiada és mtsai 1996a) hatását és számos állatkísérletben igazolták a készítmény tumorellenes aktivitását (Brüller 1992, Jagiello-Wojtowicz és mtsai 1996, Ciebiada és mtsai 1996b).

A félszintetikus vegyületet eredményesen alkalmazták Ewing szarkómában, kissejtes tüdőrákban és Kaposi szarkómaban szenvedő betegeken (Lohninger és Hamler 1992, Staniszewski és mtsai 1992, Voltchek és mtsai 1996), valamint melanóma, mellrák, méhnyakrák, hererák, húgyhólyagrák és nyelőcsőrák kezelésénél (Stabuc és Benedicic 1996, Hamler és mtsai 1996, Schramm és mtsai 1996, Kroiss és mtsai 1996, Lohninger és mtsai 1996, Sakalo és mtsai 1996, Kadan és mtsai 1996, Vyas és Jain 1996). Németországban humán II. fázis vizsgálatokat végeztek Ukrain-nal 90 hasnyálmirigyrákos betegen. A betegek jól tolerálák a készítményt. A vizsgálók orvosi felügyelet mellett potenciális tumorellenes szernek tartják az Ukraint (Gansauge és mtsai 2002).

Cordes és mtsai (2002) megállapították, hogy e félszintetikus *Chelidonium* készítmény a tumorsejeket nem, de a humán fibroblasztokat védi az ionizáló sugárzás ellen. A szerzők szerint ez a szer alkalmas lehet a sugárterápia károsító mellékhatásának csökkentésére.

• A vérehulló fecskefű kivonatai, valamint izolált alkaloidjai *in vitro* és *in vivo* állatkísérletekben is hatásosnak bizonyultak influenza vírussal szemben (Lozyuk 1977, Furusawa és mtsai 1970). A herba kivonatának *H. simplex* ellenes hatását már a 70-es években bizonyították (Amaros és mtsai 1977).

Kéry és mtsai (1987) a kivonatból oszlopkromatográfia segítségével elválasztott F-4 alkaloid frakciót hatásosnak találták 5 és 12 típusú adenovírus, illetve *Herpes simplex* vírus ellen. Az alkaloid frakciót kombinálva már ismert antivirális vegyülettel hatásnövekedést tapasztaltak.

A benzofenantridin alkaloidok reverz transzkriptáz gátlóként erősebb hatásúnak bizonyultak, mint a protoberberin vázas vegyületek Tan és Sethl vizsgálatai szerint (Tan és mtsai 1991, Sethl 1985).

A Baxter cég kutatói érdekes eredményeket tettek közzé, miszerint a frissen gyűjtött fecskefűből előállított nyers kivonatból izolált poliglükóz-aminoglükán anti-retrovírus hatású *in vitro* és *in vivo* kísérletekben. A hatás-szerkezet összefüggést még nem tisztázták. (Gerencer és mtsai 2006).

• A *Chelidonium majus* gyökerének alkoholos kivonata erős antibiotikus hatást gyakorolt a *Bacillus cereus* (MIC = 15,65 mg/ml), *Staphylococcus aureus* (MIC = 62,5 mg/ml) baktérium és a *Candida albicans* (MIC = 62,5 mg/ml) gomba fajokra. Referenciaként amfotericin, eritromicin és gentamicin antibiotikumokat alkalmaztak a vizsgálatokban (Kokoska és mtsai 2003).

Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella galinarium, és Klebsiella pneumoniae baktériumokat vizsgálva tiszta *Chelidonium* alkaloidokkal, a keleritrin és szangvinarin erős, míg a protopin és kelidonin gyenge antibakteriális hatást mutatott (Mitscher és mtsai 1978).

A növényből előállított kvaterner benzofenantridin frakciót hatásosnak találták *Gram pozitív*, de hatástalannak *Gram negatív* baktériumokkal szemben (Lenfeld és mtsai 1981). Standardként indometacin antibiotikumot használtak az antibiotikus hatás-vizsgálatok elvégzésekor.

A berberin antibiotikus hatása jól ismert, és a Távol-Keleten ma is alkalmazott szer. A hatás hordozójának a kvaterner amin struktúrát tartják (Pitea és Margineanu 1972, Iwasa és mtsai 1996).

Egy bostoni fogászati centrumban végzett kísérlet során a szangvinarin alkaloid 52 szájüregben jelenlévő baktérium ellen bizonyult hatásosnak (Dzink és Socransky 1985). A szangvinarin (50 µg/ml), keleritrin (100 µg/ml) és berberin (12,5 µg/ml) alkaloidok viszonylag kis koncentrációban gátló hatással voltak a *Helicobacter pylori* szaporodására (Mahady és mtsai 2003). Összehasonlításként amoxicillint (0,02 µg/ml) használtak a vizsgálatban.

Angol kutatók a keleritrint hatékony ellenszernek találták a meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* által okozott kórházi fertőzésekben (Gibbons és mtsai 2003). A vizsgálatban a norfloxacin (32 µg/ml), eritromicin (64 µg/ml) és tetraciklin (0,5 µg/ml) antibiotikumok legkisebb gátló koncentrációit hasonlították a keleritrin MIC értékéhez (8 µg/ml).

• A növényből előállított 5 mg/ml koncentrációjú kvaterner benzofenantridin frakció *Trichophyton* törzs, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum* és *Aspergillus fumigatus* gombafajokra kifejtett fungisztatikus hatását igazolták. Nagyobb koncentrációban alkalmazott keleritrin fungicid hatásúnak bizonyult *T. rubrum* gombafaj vizsgálatakor. (Hejtmankova és mtsai 1984, Vukusik és mtsai 1991).

Chelidonium majus-ból izolált protopin és kelidonin alkaloidok (10 - 10 µg mennyiségben) gombaellenes hatását igazolták japán kutatók (Wei és mtsai 2000). A vizsgálatban referenciaként 0,1 µg propikonazolt használtak.

Matos és mtsai (1999) a vérehulló fecskefű vizes és alkoholos kivonatainak hatásosságát vizsgálták tíz *Fusarium* törzs növekedésének gátlásában. Megállapították, hogy az alkoholos kivonatok jelentősebb gombaellenes hatással rendelkeznek, mint a vizes kivonatok. Bizonyították továbbá, hogy a gyökérből előállított kivonatok jóval hatásosabbak a herba-ból készített kivonatoknál. Mivel a *Chelidonium* gyökér alkoholos kivonata öt *Fusarium* törzsre fingicid hatással volt, a vizsgálat elvégzői terápiás kipróbálást javasolnak.

A drogok farmakológiai hatásának kialakításában az alkaloidok játsszák a főszerepet. Az utóbbi években a növényből azonosított egyéb, nem alkaloid jellegű vegyületek (pl. lektin frakció, kelidocisztein nevű protein, proteolítikus enzimek), több kutatócsoport vizsgálatai szerint is hozzájárulnak a drogok korábban dokumentált hatásaihoz (Fik és mtsai 1995, Fik és mtsai 2001, Song és mtsai 2002, Song és mtsai 2003, Rogelj és mtsai 1998).

2.1.4. Klinikai kísérletekben igazolt hatások

A klinikai jellegű vizsgálatok adatai két fő forrásból származnak: a már forgalomban lévő, *Chelidonium*-ot tartalmazó készítményekkel történő orvosi kezelések során végzett adatfeldolgozásokból és új készítmények fejlesztésére engedélyezett, különböző fázisú humán kísérletekből. Ezen vizsgálatokban szinte kizárólag a *Chelidonium* készítmények gasztrointesztinális rendszerre, főleg a máj- és epe-elválasztási funkciókra gyakorolt hatását tanulmányozták.

• Retrospektív klinikai tanulmány 206 epeköves, illetve epehólyagműtéten átesett beteg hathetes eredményes kezeléséről számol be. A tartós hasi fájdalmak, puffadás, váltakozó hasmenés és székrekedés, táplálék tolerancia tünetei egyaránt lényeges javulást mutattak. A vizsgálatban *Chelidonium* fluid extraktumot használtak (0,675 mg kelidonin tartalom naponta 3 × 20 cseppben beadva) (Baumann 1971).

• Ritter és mtsai (1993) placebo kontrollos, kettősvak klinikai kísérlet eredményét közölték. Felső emésztőszervi és epeelválasztás eredetű, gyakori görcsökkel járó panaszokban *Chelidonium* extraktummal (kelidoninban kifejezett összalkaloid tartalma 24 mg/100 g) folytatott kezelés (60 kezelt, 60 placebo) után a kivonatot fogyasztó páciensek 60%-ánál, míg a placebo csoport 27%-ánál regisztráltak lényeges javulást.

• Multicentrikus, prospektív tanulmányban 608 beteg részvételével folytattak vizsgálatokat. Az emésztéssel összefüggő görcsös hasi fájdalommal küszködő betegek standardizált *Chelidonium* kivonatot kaptak tabletta formájában (2,85 mg összalkaloid tartalom és 0,79 mg kelidonin tartalom tablettánként) naponta öt alkalommal. Megállapították, hogy a betegek 62,3%-ánál 30 percen belül jelentkezett a hatás és 42,1%-uknál a kezelés három órán át hatékonynak bizonyult. Összességében a kivonatot a betegek 97,4%-a jól tolerálta és 87%-uknál számoltak be eredményes terápiáról (Kneibel és Urlacher 1993).

2.1.5. *Chelidonium* drogok alkalmazásának indikációja

A *Chelidonium majus* jó példa a gyógynövények alkalmazására a hagyományos, népies orvoslásban, a fitoterápiában, a klasszikus orvoslásban és a homeopátiában egyaránt.

Kevés tiszta empírián alapuló gyógynövény alkalmazás van, mely olyan általánosan ismert lenne, mint a vérehulló fecskefű vöröses tejnedvének csepegtetése, bedörzsölése vírusos eredetű szemölcsökre.

Jellegzetes sötétsárga tejnedve alapján évszázadok óta azoknak a drogoknak a megtestesítője, melyet a „hasonlót a hasonlóval" elképzelés alapján a májfunkciók javítására, epe elválasztási zavarok kezelésére tartottak alkalmas szernek. Tény, hogy a ma is folytatódó kutatások eredményei egyre határozottabban alátámasztják ezeket az hagyományos indikációkat.

Jelentősebb kézikönyvek, monográfiák a növénnyel kapcsolatban a gasztrointesztinális, elsősorban epeelválasztással kapcsolatos (puffadással járó emésztési zavarok enyhítése, epe elválasztás és ürítés fokozása, fájdalmak enyhítése) belsőleges alkalmazásokat tartják elfogadhatónak. Külsőleges (bőrgyógyászati) alkalmazások közül a verruca, papilloma, kondiloma eltávolítására, illetve pszoriázis kezelésére ajánlják (Hagers Handbuch 1993, Herbal Drugs 1994, ESCOP Monográfia 1996, Mills és Bone 2000, WHO Monográfia 2006).

Jó összefoglalást ad az Egészségügyi Világszervezet által kiadott Chelidonii herba monográfia, mely a drog alkalmazásait három kategóriába sorolja. A szakértők a három kategória között a különbséget a rendelkezésre álló kísérletes és klinikai bizonyítékok meglétében vagy hiányában látják. Az első kategóriába a népi orvoslás szintjén leírt alkalmazásokat sorolja, melyeket nem támasztanak alá kísérletes vagy klinikai adatok. Ezek a következők: bronchitisz, pertuszisz, szem irritáció, epekő, sárgaság, irritábilis bélszindróma, migrénes fejfájás, férgek, szemölcsök és tyúkszem.

A második kategóriába a gyógyszerkönyvekben és hagyományos orvoslási rendszerekben szereplő alkalmazásokat sorol: hasi fájdalmak, gasztritisz, gyomorfekély, enteritisz.

A harmadik kategória az alátámasztott, igazolt alkalmazásokat tartalmazza: gyomor-bélrendszeri eredetű enyhe és középsúlyos görcsök oldása, enyhébb fokú epehólyag panaszok, emésztési panaszok (puffadással járó diszpepszia) (WHO Monográfia 2006).

Az ESCOP Monográfia (1996) által összegyűjtött indikációk megegyeznek a WHO harmadik kategóriájába felsorolt ajánlásokkal, tehát gyomor és bélrendszeri görcsök oldására, valamint epehólyag panaszok kezelésére ajánlja a vérehulló fecskefű drogok alkalmazását.

A német E-Bizottság által készített monográfia a javallatok körét kizárólag a gastrointesztinális és epe-elválasztó rendszer fájdalommal járó görcsös panaszaira korlátozza. Csak ezt tartja kielégítő szinten bizonyítottnak egy esetleges gyógyszer regisztrációhoz (Kommission – E 1985).

A pozitív kimenetelű sejt-, szövet-, és élőállat-kísérleti színtű eredmények után (Uglyanitsa és mtsai 2000) sem tekinti egyetlen mértékadó értékelés sem elfogadható szinten igazoltnak a növény tumorellenes hatását vagy klinikailag bizonyítottnak az alkalmazás eredményességét rosszindulatú daganatokban (Kommission – E 1985, ESCOP-Monográfia 1996, WHO-Monográfia 2006).

Egy 2005-ben megjelent átfogó tanulmány sürgeti független szakértő állásfoglalását az Ukrain rákterápiában betöltött szerepével kapcsolatban (Ernst és Schmidt 2005).

2.1.6. *Chelidonium* drogokból előállított készítmények

A törzskönyvezett *Chelidonium*-tartalmú készítmények alapvetően két kategóriába sorolhatók: teakeverékek és alkoholos-vizes kivonatok további feldolgozásával előállított készítmények (cseppek, tabletták). Előbbiekben a növény herbáját, utóbbiakban mindkét drogot alkalmazzák nyersanyagként.

Bár a vérehulló fecskefűből előállított készítmények alkalmazása több évszázados múltra tekint vissza és több kultúrkörben hasonló, a drog és az ipari feldolgozással előállított készítmények csak nagyon kevés országban emelkedtek gyógyszer szintre.

Érdekes, hogy a magyar viszonylatban súlyos közegészségügyi jelentőséggel bíró máj- és epe-elválasztási panaszok kezelésére csak egyetlen teát találunk, az új FoNo-ba felvett Species choleretica-t (FoNo VII. 2003), mely a Menthae piperitae folium, Absintii herba, Achilleae herba, Ononidis radix és Taraxaci radix drogok kombinációjában tartalmazza a Chelidonii herbát (spazmilitikum, kolagógum, analgetikum).

Magyarországon 1988-ban került forgalomba az első *Chelidonium*-termék, a gyógyszernek nem minősülő gyógytermék kategóriában a Chelident gyógyfogkrém és szájvíz, mely ínygyulladás és fogágybetegségek kezelésére, tehát szájhigiénés és fogászati célokra alkalmazható (Vademecum 1995-1997, OGYI 2004). Kidolgozása a

nyolcvanas évek elején a *Chelidonium* alkaloidok régóta megfigyelt, majd számos vizsgálatban igazolt jelentős antimikrobás aktivitásán alapult.

Később megjelentek a fecskefüvet tartalmazó teakeverékek, instant teák, vizes-alkoholos, olajos kivonatok, különböző gyógyszerformákban (csepp, ecsetelő, oldat gél, kenőcs, tabletta).

A ma már Magyarországon is kapható homeopátiás készítmények többsége friss, illetve szárított herbából vagy gyökérből előállított alap-tinktúrából készülnek a homeopátia hígítási és készítmény gyártási szabályai szerint (Pathak 1996).

A törzskönyvezett *Chelidonium* tartalmú készítmények között található egy teakeverék, négy feldolgozott készítmény - ebből három külsőleges, egy belsőleges alkalmazásra. Megjegyzendő továbbá, hogy a forgalomban lévő gyógytermékek egy kivétellel (Vérehulló fecskefű ecsetelő) kombinációs készítmények (1.táblázat).

1.táblázat A Magyarországon törzskönyvezett *Chelidonium*-tartalmú gyógyszerek/gyógyhatású készítmények és ajánlott indikációik

Készítmény	Jelleg	Ajánlott indikációk
Vesevédő teakeverék	kombinációs	veseműködést javító, vesekő képződést gátló
Depsorin kenőcs	kombinációs	enyhe- és középsúlyos pszoriázis kezelése
Herpesil ecsetelő és gél	kombinációs	*Herpes simplex* helyi kezelése
Dr. Kleinschrod's Leber und Gallenpflege tabletta	kombinációs	epekő-, epehólyag bántalmak kezelése
Vérehulló fecskefű ecsetelő	monokomponensű	szemölcs, tyúkszem eltávolítása
Species choleretica (FoNo VII)*	kombinációs	epehajtó

* gyógyszer

Említett indikációkra a Rote Liste (2006) számos *Chelidonium* (főként herba) drogot tartalmazó készítményt sorol fel a teakeverékektől a tablettákig, pl. Panchelidon® kapszula és cseppek (monokomponensű), Carduocatt-T® tabletta, Cefachol® cseppek, Cholhepan® S drazsé, Cholongal Saft® oldat, Esberigal® N drazsé és cseppek, Heumann Leber- und Gallentee Solu-Hepa®r N por (Ernst és Weihmayr 1998, Schilcher és Kammerer 2000).

Érdemes megegyezni, hogy az európai ismertségen túl jelentős a *Chelidonium* használat a Távol-Keleten (Kína, Korea) is. A *Chelidonium* alkaloidok közül egyedül a berberint

állítják elő tiszta formában gyógyászati célra, nyersanyagként más növényfajokat használnak (*Berberis sp*., *Hydrastis sp*.).

Különösképpen belsőleges alkalmazás esetén a megbízható terápiás hatás kialakulásában fontos a készítmények megfelelő dozírozása, ami teaként 2-5 gramm herba drogot, kivonatok esetében pedig ennek megfelelően legalább 12-30 mg összalkaloidot jelent napi átlagos adagként (ESCOP Monográfia 1996, WHO Monográfia 2006). Mindez 1:2 arányban készült kivonatnál 1-2 ml-t, míg 1:5 arányban készített tinktúrából 2-4 ml-t jelent naponta (ESCOP Monográfia 1996, Mills és Bone 2000).

Chelidonium-tartalmú készítmény hosszantartó fogyasztását követően akut hepatitisz, sárgaság kialakulását írták le. Igazolták az összefüggést a tünetek és a készítmény között, az adagolás felfüggesztésével a tünetek megszűntek (Greving és mtsai1998, Benninger és mtsai 1999, Bone 2000).

Kosina és mtsai (2004) 90 napon át adagoltak *per os* sertéseknek szangvinarin és keleritrin alkaloidot tartalmzó kivonatot. Megállapították, hogy 5 mg / testtömeg kg keleritrin, illetve szangvinarin nem okozott károsodást az állatok szervezetében. A szerzők a fecskefűben található alkaloidokat, illetve kivonataikat tartalmazó készítményeket megfelelő alkalmazás esetén biztonságosnak tartják.

Adler és mtsai (2006) humán májsejteken végezett vizsgálatai szerint a 6,2 mg/g összalkaloid tartalmú vérehulló fecskefű kivonat nem mutat hepatotoxikus hatást (EC_{50} = 5,9 µg/ml). Összegzésükben kijelentik, hogy a növényből előállított készítmények nem jelentenek farmakológiai kockázatot.

Tartós használatból származó ártalmak elkerülésére a *Chelidonium*-tartalmú készítmények alkalmazását lehetőleg rövid (1-4 hét) tartamúra kell korlátozni.

Kellő tapasztalat hiányában terhesség vagy szoptatás idején kizárólag kezelőorvossal történt konzultáció után javasolt a készítmények belsőleges alkalmazása.

Epeút elzáródás, korábbi, vagy aktív májbetegség esetén használatuk kontraindikált, ezért alkalmazásukat gondos diagnózis kell, hogy megelőzze (ESCOP Monográfia 1996, Mills és Bone 2000).

2.2. A Chelidonium alkaloidok analitikája

2.2.1. Gyors azonosításra alkalmas módszerek

A vérehulló fecskefű azonosítására használt vizsgálatok döntően kelidonsav kimutatáson alapulnak. A porított drogot 20%-os kálilúggal lecseppentve a drog körüli folyadék sárgára színeződik, majd finom cseppecskék, végül hajlott, elágazó szőrszerű kristályok figyelhetők meg. A kelidonsav lúg hatására xanthidrokelidonsavvá alakul, melynek káliumsója kikristályosodik.

A drog metanolos oldatának 2 ml-éhez 1 ml 10 g/V% kálilúgot adva, a folyadék zavarossá válik és kék opáleszenciát mutat.

E két reakció a kelidonsav kimutatására alkalmas, de a hasonló szerkezetű mekonsav már nem adja. A kelidonsav viszonylag kevés drog tartalomanyaga: *Urginea maritima*, *Colhicum autumnale*, és egyes *Lobelia* fajok, így lehetőséget ad kelidonsavat nem tartalmazó drogoktól történő megkülönböztetésére is.

Gombostűhegynyi drogot tárgylemezen 1-2 ml 5-10%-os tannin-oldattal lecseppentve és fedőlemezzel lefedve, kb. 100 ×-os nagyítással sárga hólyagok, majd hosszú ostorszerűen elhajló hajszálszerű képletek láthatók, melyek egy idő múlva eltűnnek, illetve olajszerű cseppekké tömörülnek. Ez a Kwasniewski-féle kelidonsavas alkaloidsó mikroreakció (Hahn-Deinstrop 1994).

A vérehulló fecskefű éteres kivonata a növény kvaterner N-t tartalmazó alkaloidjai miatt ultraibolya fényben intenzív, világos narancssárga színben fluoreszkál (Halmai és Novák 1963).

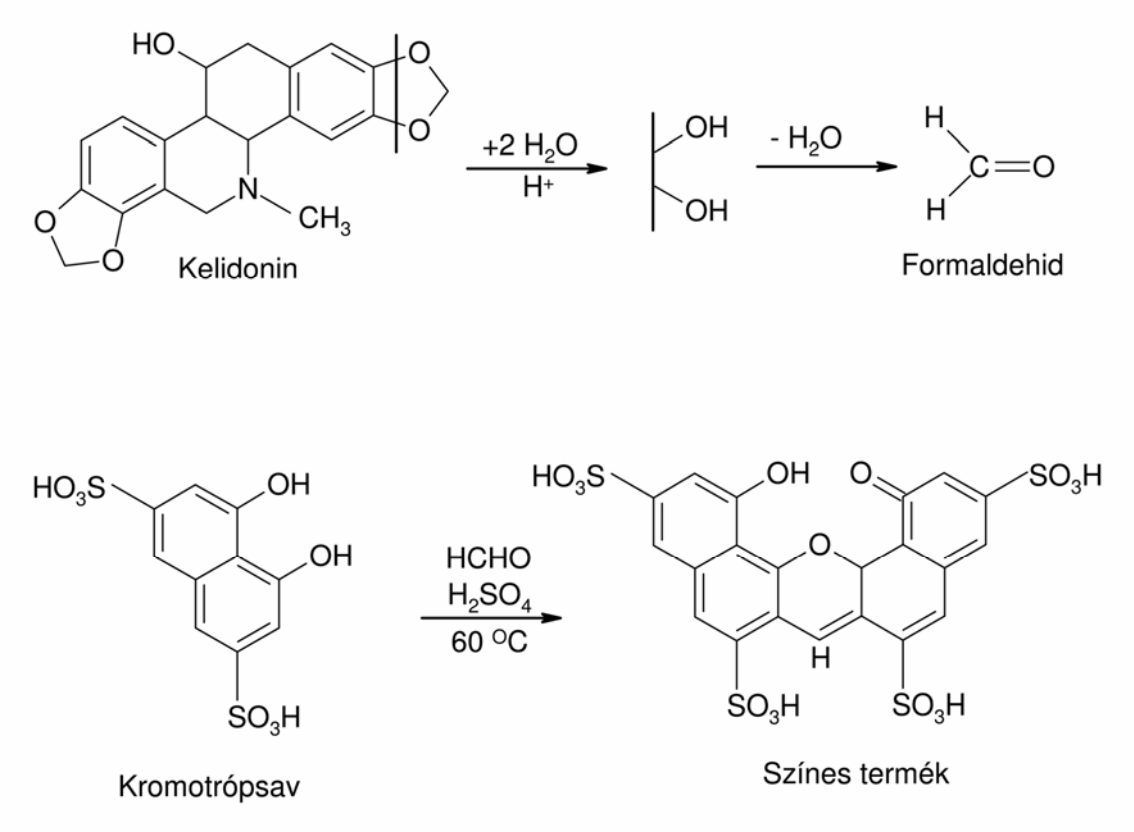
2.2.2. *Chelidonium majus* L. összalkaloid tartalmának meghatározására alkalmas módszerek

A Kelet-Német Gyógyszerkönyv (AB – DDR 1975) az alkaloid kémiában jól ismert titrimetriás módszerrel határoztatta meg a Chelidonii herba összalkaloid tartalmát. Acidimetriás titrálást írt elő, melyben a kivonathoz feleslegben adott erős sav visszatitrálásával állapíható meg a bázikus alkaloidok mennyisége (Arzneibuch der Demokratischen Republik 1975).

Az összalkaloid tartalom spektrofotometriás mérését a Német Gyógyszerkönyvben (1999) tették hivatalossá, melyet kisebb módosításokkal átvett az Európai Gyógyszerkönyv (2004) és a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv (2004) is.

Az alkaloid-tartalom meghatározása – a híg savas kivonás, majd tisztítás után – származékképzést követő spektrofotometriás ($\lambda = 570$ nm-en) méréssel történik. A származékképzés során sav hatására a metiléndioxi csoport az alkaloid molekulából kihasad és a keletkező formaldehid a kromotrópsavval ibolyaszínű kondenzációs terméket képez. A meghatározás reakciómechanizmusát az 5.ábra mutatja be (Stahl és Schild 1981). A gyógyszerkönyvek a % m/m-ban kifejezett összalkaloid tartalmat kelidoninra vonatkoztatva adják meg.

A jelenleg érvényben lévő szabályozás szerint a vérehulló fecskefüvet tartalmazó készítmények standardizálására általában elfogadják az összalkaloid tartalom mérését.



5.ábra A *Chelidonium majus* spektrofotometriás összalkaloid tartalom meghatározásának kémiai reakciója.

Német szerzők az eltérő számú metiléndioxi csoportot tartalmazó *Chelidonium* alkaloidok miatt a gyógyszerkönyvekben hivatalos spektrofotometriás mérés kvantitatívitását megkérdőjelezik (Fulde és Wichtl 1994).
Véleményünk szerint a mérés pontatlanságának okozója az is, hogy a kvaterner alkaloidok nagyrésze elveszik a tisztítás során.

2.2.3. *Chelidonium* alkaloidok elválasztása vékonyréteg kromatográfiás (VRK) módszerrel

A *Chelidonium* drogok azonosítására újabban a kiemelt hatóanyagok, az alkaloidok kimutatásán alapuló vékonyréteg kromatográfiát (VRK) alkalmazzák. A gyógyszerkönyvekben (DAB 10, Ph.Eur.5. és Ph.Hg.VIII.) hivatalos vékonyréteg kromatográfiás módszer hordozóként szilikagél F_{254}-et, kifejlesztő rendszerként hangyasav : víz : n-propanol (1 : 9 : 90 V/V/V) oldószer elegyet használtat. Az értékelés UV (254 + 365 nm) fényben kezeletlenül, majd kálium-tetrajodo-bizmutát(III)-oldattal (Dragendorff-reagens) lepermetezve történik (Wagner ésBladt 1996).
A Kelet-Német Gyógyszerkönyv a Chelidonii herba alkaloidjainak elválasztására aluminium-oxid hordózón kloroform : benzol : éter (50 : 40 : 10 V/V/V) eluenst használt. A leirat nem nyújtott segítséget a kiértékeléshez (Arzneibuch der Demokratischen Republik 1975).
Kustrak és mtsai (1982) a *Chelidonium* alkaloidok szilikagél hordozón történő elválasztására új mozgófázist fejlesztettek ki: xilén : metil-etil–keton : metanol : dietilamin (20 : 20 : 2 : 0,5 V/V/V/V). Tanulmányozták továbbá az összalkaloid tartalom változását a vegetációs periódus alatt. Vizsgálataik szerint a legmagasabb alkaloid tartalommal mind a herba (1,48%), mind a gyökér (1,86%) augusztus végén, illetve szeptember elején rendelkezik, és a begyűjtésre ezt az időszakot javasolják.
Wolf (1996) mikro módszert ajánl a *Chelidonium* kivonatok alkaloid komponenseinek vékonyréteg kromatográfiás elválasztására. Mozgó fázisnak toluol : metanol (90 : 10 V/V) oldószerelegyet alkalmaz és hordozóként kisebb szilika réteglapok (2 × 6 cm) használatára ösztönöz. A kifejlesztés időigénye e módszer használatával jelentősen csökken. Míg a toluol : metanol (90 : 10 V/V) rendszerben történő kifejlesztés 15 percet

vesz igénybe, addig a gyógyszerkönyvek módszerét (hangyasav : víz : n-propanol; 1 : 9 : 90 V/V/V) alkalmazva 77 perc kifejlesztési idővel kell számolni (Hahn-Deinstrop 1994).

Matysik és Jusiak (1990) a *Chelidonium* alkaloidok elválasztására hatlépéses gradiens vékonyréteg kromatográfiás módszert fejlesztett ki. Toluol – etilacetát (1 : 1 V/V) és metanol különböző arányú elegyeit alkalmazva jó elváláshoz jutottak (szangvinarin $R_f = 0,12$, homokelidonin $R_f = 0,24$, keleritrin $R_f = 0,64$, allokriptopin $R_f = 0,69$, protopin $R_f = 0,75$, kelidonin $R_f = 0,79$).

Lengyel kutatók mikropreparatív oszlopkromatográfiás módszer segítségével elválasztották a *Chelidonium majus* kvaterner és tercier alkaloidjait a gyökér kivonatból. A kvaterner alkaloid frakció szilikagélen történő vékonyréteg kromatográfiás elválasztása során toluol : etil-acetát : metanol (78 : 20 : 2 V/V/V) kifejlesztő rendszert használtak. A közölt denzitogramon látható, hogy a keleritrin és szangvinarin elválását zavarták a minor komponensek (kelilutin és kelirubin) (Golkiewicz és mtsai 1993). Későbbi publikációjukban módosított módszerrel, kétlépéses gradiens elúciót használva denzitogrammal igazolták nyolc kvaterner major és minor alkaloid komponens (kelirubin, szangvinarin, kelilutin, keleritrin, korizamin, berberin, koptizin és magnoflorin) kielégítő elválasztását. Első lépésben toluol : etil-acetát : metanol (80 :15 : 5 V/V/V), majd második lépésben etanol : kloroform : ecetsav (67 : 30 : 3 V/V/V) mozgófázist alkalmaztak (Golkiewicz és Gazdikowska 1999).

Szumilo és Flieger (1999) *Chelidonium* és mák alkaloidok elválasztására különböző szilikagélek (extra tiszta, normál, impregnált), valamint fémionokkal (Ni(II), Zn(II), Cr(III), Co(III)) impregnált normál szilikagél rétegek használhatóságát tesztelte. A vérehulló fecskefű vékonyréteg kromatográfiás vizsgálata során a legjobb elválást az extra tiszta szilikagélen toluol : aceton : etanol : ammónia-oldatot (45 : 45 : 7 : 3 V/V/V/V) eluenssel történő kifejlesztéssel kapták. Az impregnált fémionok rontották a szelektivitást.

Lengyel kutatók speciális vékonyréteg kromatográfiás módszereket (egydimenziós többszöri kifejlesztés, normál gradiens módszer, fordított gradiens módszer) dolgoztak ki a *Chelidonium* alkaloidok elválasztására. A kifejlesztésekhez szilika és alumínium-oxid szorbenseket használtak. Háromszori kifejlesztéssel javult a kvaterner alkaloidok elválása szilikagélen (eluens: toluol : etil-acetát : metanol (83 : 15 : 2 V/V/V)). Gradiens

rendszert használva jó elválást figyeltek meg a kvaterner alkaloid frakció esetében az eluens oldószererősség folyamatos növelésekor, míg tercier alkaloidok elválasztásakor a mozgó fázis oldószererősségének csökkentése bizonyult eredményesnek. Alumínium-oxid hordozók mind a kvaterner (berberin $R_f = 0,11$, keleritrin $R_f = 0,65$, szangvinarin $R_f = 0,67$, dihidrokeleritrin $R_f = 73$, dihidroszangvinarin $R_f = 0,77$), mind a tercier (allokriptopin $R_f = 0,47$, protopin $R_f = 0,60$, homokelidonin $R_f = 0,71$, kelidonin $R_f = 0,78$) alkaloid frakciók esetében jól alkalmazhatók (Waksmundzka-Hajnos és mtsai 2000).

Golkiewicz és mtsai (2001) milligramm mennyiségű nagy tisztaságú szangvinarint és keleritrint izoláltak Chelidonii radix-ból mikropreparatív VRK módszerrel. A tercier és kvaterner alkaloidok elválasztására oszlopkromatográfiát használtak. A savas-vizes növényi kivonatot az oszlopra jutatták, melyen a kvaterner alkaloidok erősen kötődtek, míg a tercier alkaloidok könnyen eluálódtak. A kvaterner alkaloid frakciók oldásához folyamatosan növelték a mozgófázis metanol tartalmát. A 20% metanolt tartalmazó savas-vizes mozgó fázis alkalmas volt keleritrint és szangvinarint tartalmazó frakció eluálására. A két alkaloidot mikropreparatív rétegen (0,2 mm) történő elválasztást (szilikagél hordozó és kloroform : metanol : ecetsav (82 : 15 : 3 V/V/V) kifejlesztő rendszer) követően izolálták, melyet UV-spektrum alapján azonosítottak.

Waksmundzka-Hajnos és mtsai (2002) a vérehulló fecskefű kvaterner alkaloid frakció preparatív elválasztásának optimalizálása során az egydimenziós háromszori kifejlesztéssel jó alapvonal elválást értek el, mely többszöri kifejlesztéssel nem mutatott további javulást.

Kvaterner és tercier *Chelidonium* alkaloid frakciók túlnyomásos rétegkromatográfiás (OPLC) eljárása során a 350 – 400 µl / perc kifejlesztési sebesség nyújtott kielégítő elválást. Ugyanakkor reprodukálhatóság szempontjából a legoptimálisabb 250-300 µl / perc kifejlesztési sebesség volt. Gyorsabb, illetve lassabb elúciós sebességet választva a kalibráció nem volt lineáris. Kvaterner alkaloidok esetében toluol : etil-acetát : metanol (83 : 15 : 2 V/V/V) mozgófázist, tercier alkaloidoknál toluol : etil-acetát : metanol (70 : 15 : 15 V/V/V) eluenst alkalmaztak az OPLC-s elválasztás során (Malinowska és mtsai 2005).

Petruczynik és mtsai (2005) izokinolin alkaloidok kétdimenziós vékonyréteg kromatografálásánál az első kifejlesztéshez ammóniát tartalmazó vizes eluenst, a

második kifejlesztéshez dietil-amint tartalmazó nemvizes kifejlesztő rendszert ajánlanak, mellyel jó alapvonal elválást értek el.

A Chelidonium alkaloidok denzitometriás irodalmát áttekintve mindössze két irodalmat találtunk.

Freytag (1980) *Chelidonium* drogokban (herba és radix) denzitometriás módszerrel határozta meg három alkaloid mennyiségét eltérő hullámhosszakat alkalmazva (kelidonin: $\lambda = 285$ nm; szangvinarin: $\lambda = 325$ nm; keleritrin: $\lambda = 315$ nm). A kifejlesztéshez toluol : metanol (93 : 7 V/V) mozgófázist használt, mely jó elválást eredményezett (kelidonin $R_f = 0{,}51$; szangvinarin $R_f = 0{,}67$; keleritrin $R_f = 0{,}57$).

Nikolic és mtsai (2002) a fecskefű olajos kivonatában VRK-denzitometriás módszerrel 0,017% (m/m) kelidonin tartalmat mértek. A kifejlesztéshez sziligagél réteget és toluol : metanol (90 : 10 V/V) eluenst alkalmaztak (kelidonin R_f értéke 0,53).

Összegezve a nagyszámú vékonyréteg kromatográfiával foglalkozó irodalmat megállapíthatjuk, hogy a növényben található nagyszámú és eltérő kémiai sajátságú alkaloid elválasztási nehézségei újabb és újabb módszerek kifejlesztésére ösztönöznek. A vérehulló fecskefű alkaloidjainak rétegkromatográfiás elválasztásával ellentétben kevés VRK-denzitometriás módszerrel történő kvantitatív mérés ismert, mely eljárások alkalmazása során három vagy kevesebb alkaloid mennyiségét határozzák meg.

2.2.4. *Chelidonium* alkaloidok elválasztása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel

Tekintettel a *Chelidonium* alkaloidok nagy számára és eltérő báziserősségére a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszerek nagy része ion-pár kromatográfiát alkalmaz vizsgálatukra.

Freytag (1986) *Chelidonium* extraktumok tanulmányozására izokratikus fordított-fázisú ion-pár HPLC módszert dolgozott ki (eluens: metanol : 0,1M NaH_2PO_4 puffer-oldat (pH=2,1) : trietanolamin 70 : 55 : 1,2 m/m/m, oszlop: C_{18}). Összehasonlításként normálfázisú és gradiens fordított-fázisú ion-pár módszert is bemutat a szerző, azonban kelidonin, keleritrin és szangvinarin alkaloidok elválasztására, illetve kvantitatív meghatározására az izokratikus fordított-fázisú ion-pár HPLC módszert tartja a legjobbnak.

Dzido (1988) fordított-fázisú ion-pár HPLC módszerrel választotta el a főbb tercier alkaloidokat (kelidonin, protopin, allokriptopin) a vérehulló fecskefűben. Ion-pár reagensként di-2-etilhexil-ortofoszforsavat használt.

Bugatti és mtsai (1987) normál-fázisú HPLC módszert alkalmaztak a friss gyökér szangvinarin, keleritrin és berberin (kvaterner alkaloidok) tartalmának kvantitatív mérésére. Mozgó fázisként 0,005M Na-acetát tartalmú metanol : 1,4-dioxán : ecetsav 88 : 10 : 2 (V/V/V) arányú elegye szolgált. Az elválasztást Alltech szilika oszlopon, a detektálást 290 nm-en végezték. Kísérleteik során számos fordított-fázisú és ion-pár kromatográfiás módszert próbáltak ki, legmegfelelőbbnek a kvaterner alkaloidok mérésére az előbbiekben ismertetett normál-fázisú módszert találták. Megállapították, hogy a tavasszal gyűjtött friss gyökérben az alkaloid komponensek mennyisége: 0,33% keleritrin, 0,38% szangvinarin, 0,07% berberin (m/m). A szerzők későbbi publikációjukban ezzel a normál-fázisú HPLC módszerrel vizsgálták a frissen gyűjtött herba, gyökér, valamint a tejnedv alkaloid komponenseinek változását a hőmérséklet és a megvilágítás függvényében (Tome és Colombo 1995).

Rey és mtsai (1993) a sztilopin alkaloid mérésére alkalmas izokratikus normál-fázisú HPLC módszert publikáltak. Az elválasztás Superspher Si 60 oszlopon, 0,1% trifluorecetsavat tartalmazó kloroform : metanol (90 : 10 V/V) eluenssel történt és 292,5 nm-en detektálták a virágzó hajtás (6,3; m/m), valamint a gyökér (4,9%; m/m) sztilopin tartalmát.

Nowicky és mtsai (1992) vizsgálataikban megállapították, hogy különböző sók (pl. kálium-jodid) eredményesen alkalmazhatók a tailinges csúcs megszüntetésére és a kationos molekulák retenciójának csökkentésére a *Chelidonium* alkaloidok fordított-fázisú HPLC elválasztása során.

Han és mtsai (1991) a vérehulló fecskefű etanolos kivonatából tizenhárom tercier és kvaterner alkaloid komponens elválasztását oldották meg gradiens fordított-fázisú ion-pár HPLC módszer segítségével. Hypersil ODS (C_{18}) oszlopot, mozgófázisként víz : acetonitril : metanol (50 : 20 : 30 V/V/V → 15 : 55 : 30 V/V/V / 15 perc) elegyét használták. A víz pH-ját 7,5-re állították be propilaminnal, a metanol 0,15mM kálium-jodidot tartalmazott. Kvantitatív mérésre a módszert nem használták.

Han és mtsai (1992) a vérehulló fecskefű alkaloidok kapacitás faktorának hőmérséklet függését vizsgálták az állófázis felületének deaktiválását követően fordított-fázisú

HPLC elválasztás során. A van't Hoff görbék alapján két csoportra osztották a *Chelidonium* alkaloidokat: az alacsony bázicitású tercier (metoxikelidonin, allokriptopin, protopin, kelidonin) és az erősen bázikus tercier és kvaterner alkaloidok (berberin, sztilopin, oxiszangvinarin, szangvinarin, dihidrokeleritrin és dihidroszangvinarin) csoportjára.

Niu és He (1991) a Chelidonii radix-ból nyolc izokinolin vázas alkaloid elválasztását oldották meg izokratikus fordított-fázisú ion-pár HPLC módszerrel. Eluensként 0,05M borkősav : metanol : acetonitril 44 : 10 : 46 (V/V/V) arányú elegyét, oszlopként oktadecil-szilán oszlopot használták. Vizsgálták a különböző ion-pár reagensek (nátrium-decilszulfát, -dodecilszulfát és -tetradecilszulfát) alkalmazhatóságát. A nátrium-dodecilszulfátot 0,5%-ban az eluenshez adva megfelelő elválást és szimmetrikus csúcsokat kaptak. A módszer segítségével Kína területén július hónapban gyűjtött fecskefű gyökér minták alkaloid összetételét vizsgálták. A különböző területekről származó gyökér minták összalkaloid tartalma 0,86% - 1,94% (m/m, kelidoninban kifejezve) között változott. A legnagyobb mennyiségben minden radix minta a kelidonin alkaloidot tartalmazta.

Taborsaka és mtsai (1994) ősszel gyűjtött *Chelidonium* drogokból huszonegy alkaloid elválasztására és azonosítására alkalmas komplex gradiens fordított-fázisú ion-pár HPLC módszert dolgozott ki. A mintaelőkészítésük egyszerű, azonban a módszerrel kvantitatív méréseket nem végeztek.

Kursinszki és mtsai (2006) izokratikus, fordított-fázisú HPLC módszert dolgoztak ki a az öt fő alkaloid komponens elválasztására és kvantitatív mérésére a vérehulló fecskefű kivonatokban. Savas-metanolos kivonást követően szilárd fázisú extrakciót alkalmaztak a kivonatok tisztítására. Mind az extrakció, mind a tisztítás jól reprodukálható volt. Luna C_{18} új generációs szilika alapú állófázist, 14,7 : 18 : 67,3 (V/V/V) arányú acetonitril : metanol : 30mM ammónium-formiát-oldat (pH = 2,8) elegyét alkalmazták mozgó fázisként. A módszer részletes ismertetése került az „Anyag és Módszer" fejezet 3.2.3.4. pontjában. A kiválasztott oszlop, illetve az egyszerű összetételű eluens jó elválást és szimmetrikus csúcsokat eredményezett. A módszer alkalmas tercier (kelidonin, protopin) és kvaterner (koptizin, berberin és szangvinarin) alkaloidok egyidejű meghatározására. A módszert mind ismételhetőség, mind visszanyerés

szempontjából validálták. A legkisebb mérhető mennyiség koptizin esetében 0,2 ng, szangvinarin esetében 0,4 ng, protopin, kelidonin és berberin esetében 0,5 ng.
Az utóbbi kromatográfiás rendszer előnye a korábban leírt eljárásokkal összevetve, hogy izokratikusan, ion-pár reagens nélkül oldja meg a vérehulló fecskefű alkaloidjainak (kelidonin, protopin, koptizin, berberin, szangvinarin) elválasztását, valamint kvantitatív mérését.

2.2.5. *Chelidonium* alkaloidok elválasztása egyéb elválasztástechnikai módszerekkel

Az irodalomban szépszámmal találunk elválasztás technikákat, melyeket a *Chelidonium* alkaloidok meghatározására, illetve vérehulló fecskefüvet tartalmazó készítmények standardizálására alkalmaznak.
Walterova és mtasi (1984) a *Chelidonium majus* benzofenantridin alkaloidjainak izotachoforetikus elválasztását oldotta meg, mely módszer alkalmas a kivonatok keleritrin és szangvinarin tartalmának gyors meghatározására.
Pietta és mtasi (1995) vérehulló fecskefű leveléből és gyökeréből hat izokinolinvázas alkaloid elválasztására és mennyiségi mérésére alkalmas kapilláris elektroforézis (CE) módszert publikáltak. Az elválasztott alkaloidok a kelidonin, szangvinarin, koptizin, keleritrin, berberin és sztilopin voltak.
Stuppner és Ganzera (1995) megállapították, hogy a *Chelidonium* alkaloidok CE-sel történő elválasztásához nélkülözhetetlen a puffer-oldathoz adagol β–ciklodextrin.
Sturm és Stuppner (1998) izokinolin vázas alkaloidok elválasztására alkalmas CE-tömegspektrométer (MS) technikát dolgozott ki. A módszer előnye, hogy a nyers metanolos kivonatból az alkaloid komponensek elválasztása és azonosítása tisztítási lépések nélkül oldható meg.
Sevcic és mtsai (2000) új CE módszert dolgoztak ki kivonatok és gyógyszerkészítmények szangvinarin és keleritrin tartalmának meghatározására.
Kínai kutatók egyszerű, gyors HPLC-MS módszert alkalmaztak a mézben jelenlévő szangvinarin és keleritrin mennyiségének mérésére, mely alkaloid komponensek megváltoztatják a méz ízét és minőségét. A módszer érzékenységét alátámasztja, hogy milliliterenként 1,6 ng szangvinarin, illeteve 1,1 ng keleritrin mérésére alkalmas (Luo és mtsai 2004).

Suau és mtsai (2005) izokinolinvázas alkaloidok azonosítására és kvantitatív meghatározására gáz kromatográfiás (GC)-MS módszert fejlesztettek ki. A módszerrel *Sarcocapnos*-fajok alkaloid komponenseit vizsgálták, melyek közül a protopin, dihidroszangvinarin és kelidonin a *Chelidonium majus*-ban is megtalálható, így a leírt GC-MS módszer nagy valószínűséggel a vérehulló fecskefű alkaloid meghatározására is alkalmazható.

2.3. A formaldehid szerepe a biológiai rendszerekben

2.3.1. A formaldehid előfordulása

A formaldehidet (HCHO) a közelmúltig csupán környezetszennyező anyagnak tartották, mely nagyobb mennyiségben található meg számos háztartási áruban, pl. ruhákban, bútorokban, fényképészeti és élelmi anyagokban, valamint dohányfüstben, kipufogógázban és ipari üzemek levegőjében, és így könnyen bekerülhet az emberi szervezetbe (Walker 1964, IARC 1995).

Közismert tény, hogy a HCHO az elsőként azonosított szerves molekula a világűrben. Több mint 80 csillagközi felhő vizsgálata mutatta, hogy a HCHO diffúz és sűrű fellegeket is alkot. A hat legnagyobb mennyiségben előforduló elem a világegyetemben a H, C, N, O, S, P, melyből három alkotóeleme a formaldehidnek. E reaktív molekulának meghatározó szerepet tulajdonítanak az élet keletkezésében (Greenberg 1989).

Míg korábbi tanulmányokban és kézikönyvekben azt olvashatjuk, hogy a HCHO toxikus molekula és ezért nem fordul elő élő sejtekben szabadon, mára bizonyított az exogén eredetű HCHO-en túl humán, állati és növényi szövetekben mérhető mennyiségű, anyagcsere folyamatokban keletkező endogén HCHO jelenléte (főleg kötött formában) (Tyihák és mtsai 1978, Tyihák és mtsai 1980, Burgyán és mtsai 1982, Szarvas és mtsai 1982, Merk és Speit 1998).

Már a 70-es években kimutatták HCHO keletkezését a limfocitákban és granulocitákban a metil-tetrahidro-folát tetrahidro-foláttá történő átalakulása során (Thorndike és Beck 1977). Vizsgálataik szerint a mérhető HCHO termelés jóval nagyobb leukémiás, mint normál limfocita sejtekben. Korai megfigyelést tettek a HCHO hasonló szintű

felhalmozódására vesében, májban és agyszövetekben is (Laduron és mtsai 1975, Taylor és Hanna 1975). Tyihák és mtsai (1978) pedig megállapították, hogy a dohánylevelekben eredetileg mérhető HCHO mennyisége TMV (dohány mozaik vírus) - fertőzés hatására jelentősen megnő.

Az endogén HCHO keletkezése túlnyomó részben a sejtekben végbemenő metilezési-demetilezési / oxidációs-redukciós folyamatokhoz kapcsolható (Tyihák és mtsai 1980, Tyihák és Szőke 1996, Merk és Speit 1998, Tyihák 2006). A HCHO főleg kötött formában van jelen a biológiai rendszerekben, mégpedig különböző molekulákhoz (pl. glutation, L-arginin) különböző erősséggel kötötten.

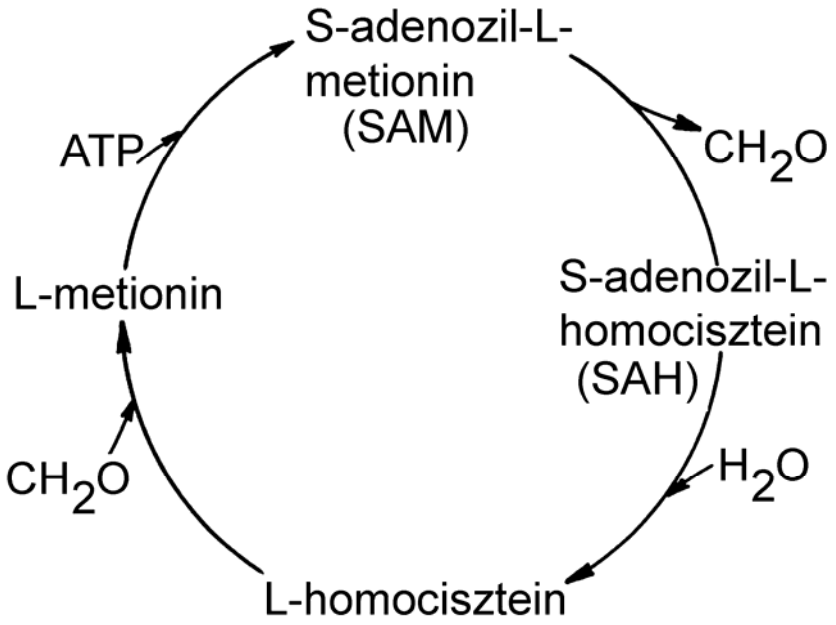
A metilezett vegyületek és általában az enzimatikus metilezés hosszú idő óta jelentős szerepet játszik a karcinogenezis és az antikarcinogenezis kutatásában. Vannak olyan metilezett vegyületek, pl. dimetil-nitrózamin, melyek részben ismert folyamatokon át rosszindulatú sejtszaporodást generálnak (Lin és Hollenberg 2001), míg más metilezett vegyületek, pl. 1'-metil-aszkorbigén antitumor hatással rendelkeznek (Szende és mtsai 1995).

Ma már nyilvánvaló, hogy a metilezett vegyületek – így az alkaloidok jelentős része is - potenciális HCHO-előanyagok. Bizonyított továbbá az is, hogy a különböző vegyületek enzimatikus metilezése HCHO-en keresztül megy végbe, mely felfedezés új lehetőségeket nyit a rákkutatásban, normális és abnormális folyamatok megismerésében egyaránt (Huszti és Tyihák 1986, Tyihák 2006).

2.3.2. A formaldehid ciklus elemei és jelentősége

Az *S*-adenozil-*L*-metionin (SAM) szolgál metildonorként valamennyi enzimatikus transzmetilezési reakcióban, beleértve a DNS-metilezést is (Adams és Burdon 1985). Megállapították, hogy a SAM radioaktív S-metil-csoportjából radioaktív formaldemeton képződött dimedon, mint HCHO-befogó molekula jelenlétében a hisztamin N-metil-hisztaminná történő enzimes átalakítása során (Huszti és Tyihák 1986). Ebből a tényből az következik, hogy a HCHO eltávolítása a reakcióelegyből a transzmetilezés arányos elmaradását eredményezi. Ez volt az első megfigyelés arra vonatkozóan, hogy az enzimes transzmetilezés HCHO-n keresztül megy végbe, és ebben a folyamatban a SAM *S*-metil csoportjának a speciális demetilezése az első lépés.

Kísérleti bizonyítékok és biokémiai elvek alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a biológiai rendszerekben gyors, elsődleges HCHO ciklus létezik, melyben a metionin *S*-metil csoportjának a képződése HCHO-ból és SAM HCHO-adó funkciója az adott biokémiai rendszer alapvető összetevői (Tyihák 1987c). Gyors HCHO utak sokasága létezik különböző szövetekben, hidroximetil csoportokon át kötődvén az akceptor molekulákhoz (Tyihák és mtsai 1998). Az elsődleges, egyszerűsített HCHO ciklus biotranszformációs lépéseit a 6.ábra foglalja össze.



6.ábra Az egyszerűsített formaldehid ciklus biotranszformációs lépései (Tyihák 2002)

Az élő szervezetben a HCHO három különböző forrásból származik:

- HCHO képződése ellenőrzött körülmények között (formaldehid ciklus),
- endogén HCHO képződésből, pl. véletlenszerű indukció hatására,
- exogén eredetű HCHO-ből (Tyihák és Szende 2004).

A HCHO ciklus rendellenességei, különös tekintettel a kontrollálatlan körülmények között képződött HCHO-re, patológiás folyamatokban játszhatnak szerepet.

Az emberi szervezetben a HCHO ciklus lépéseit befolyásolni, és szükség szerint normalizálni is lehet, mindez kémiai-biokémiai úton, valamint táplálkozáson át közelíthető meg.

Az *L*-aszkorbinsav (C-vitamin) kedvező biológiai hatásait egyebek között rosszindulatú daganatok kezelésében próbálták felhasználni, mégpedig nagy dózisokat adagolva. Mára kiderült, hogy precíz kezeléssel sem sikerült egyértelmű javulást elérni a klinikai vizsgálatokban (Padayatt és Levine 2000 a,b). Ennek az lehet az oka, hogy az L-aszkorbinsav, mint redukáló anyag eliminálhatja a HCHO molekulákat, és ezzel befolyásolhatja a HCHO ciklust. Azonban az un. kötött C-vitamin, az aszkorbigén (indolváz és L-aszkorbinsav reakciójából képződik) N-metilezett formájában (1'-metil-aszkorbigén) immunstimuláló, antimikrobiális, valamint tumorgátló hatásúnak bizonyult (Szende és mtsai 1995, Bocsi és mtsai 1998, Kátay és Tyihák 1998, Kátay és mtsai 2002). Megállapítást nyert, hogy e hatások a metilcsoportból származó HCHO-nek, illetve reakciótermékeinek tulajdoníthatók. Ebben az esetben tehát a kedvező hatásért egy HCHO-generátor a felelős.

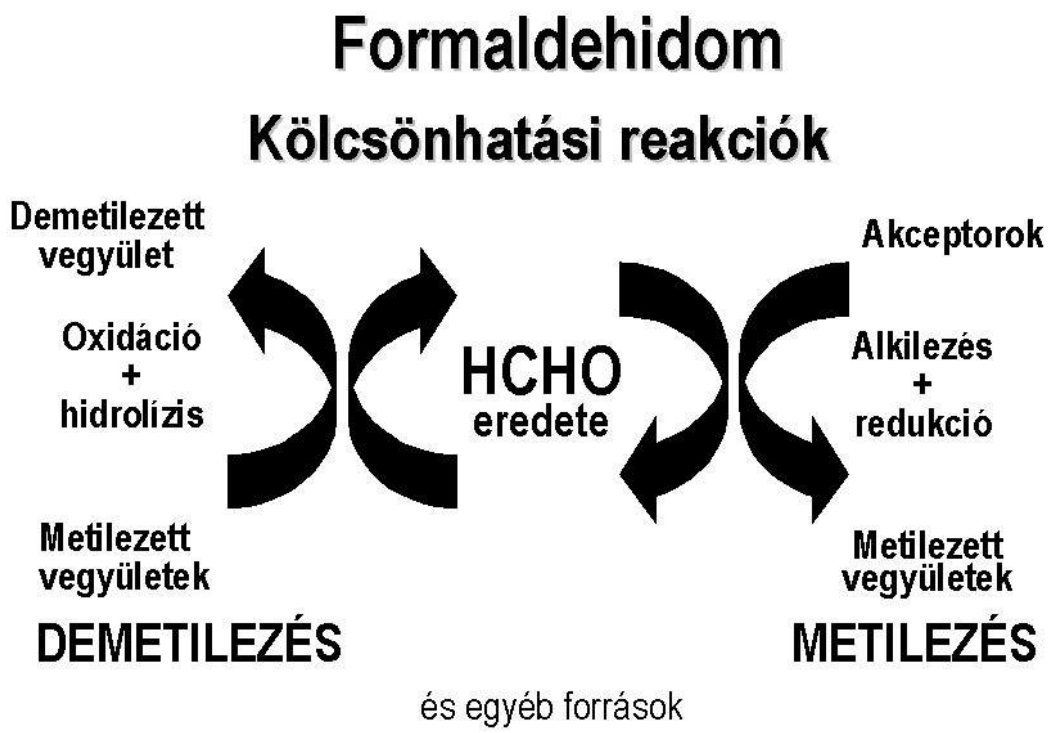
Az elmúlt évtizedben fontos biokémiai kutatások tárgyát képezte a transz-rezveratrol megismerése (Szende és mtsai 2000, Tyihák és mtsai 2003). Mára e közönséges élelmi anyaggal elért sokrétű, kedvező biológiai hatásokat két nagy csoportra oszthatjuk: kémiai védő és ölő-gátló hatásokra. A hatások értelmezésénél általában a molekula antioxidáns jellegét hangsúlyozzák. Az antitumor, s ezen belül a leukémiás sejteket szelektíven ölő hatásokat nem magyarázza az antioxidáns tulajdonság. Ezirányú kutatások szerint a transz-rezveratrol mobilizálja a labilisan kötött endogén HCHO-molekulákat, azaz befolyásolni tudja a HCHO ciklus lépéseit is (Tyihák és mtsai 1998, Tyihák és mtsai 2001, Tyihák 2006).

Az L-arginin erősen bázikus guanidincsoportja miatt jelentős szerepet játszik a biológiai rendszerekben lejátszódó molekuláris kölcsönhatásokban. Ezen reakciók közül az L-arginin és a HCHO közötti folyamat különösen érdekes és meghatározó faktor a biológiai rendszerre. A reakcióban hidroxi-metil-arginin származékok képződnek (Csiba és mtsai 1982), melyek jelentős tumorgátló és apoptózist okozó hatásúak (Bocsi és mtsai 1998, Szende és mtsai 1998, Trézl és mtsai 1998, Trézl és mtsai 2003). A hatás kialakulásában a hidroxi-metil csoportokból felszabaduló HCHO alapvető szerepet játszik. Az eddigi megfigyelésekből az is kiderül, hogy a biológiai rendszerbe adagolt L-arginin azonnal megköti a jelenlévő szabad, illetve labilis kötésben lévő HCHO molekulákat, s az így kötött állapotban lévő HCHO jelentős biológiai hatás hordozója lehet.

2.3.3. A formaldehidom elemei és jelentősége

Az egyszerűsített HCHO-körfolyamat (6.ábra) a legfontosabb biokémiai utakat foglalja össze, de nem fejezi ki teljes egészében a HCHO biológiai rendszereket átszövő szerepét, különös tekinettel az újra metilezést is magukban foglaló dinamikus metilezési-demetilezési folyamatokra. Ezért az egész élővilágra kiterjeszthető formaldehidom, mint új neologizmus bevezetése indokolt, amely bonyolult rendszert takar. Mivel megismeréséhez különleges reakcióutakat kell követni, vizsgálata módszertani újítások bevezetését igényi.

A formaldehidom tehát adott biológiai rendszer vagy egység HCHO cikus által szabályozott és nem szabályozott metil-, hidroximetil-és formil-, stb. csoportok összes reakcióúját foglalja magában, mely átfogja a nagy biológiai egységeket, mint a genom és a proteom. A 7.ábra a formaldehidom fontosabb elemeit mutatja be, ahol az enzimatikus metilezés és demetilezés lépései a meghatározók (Tyihák 2006).



7.ábra A formaldehidom alapelemei (Tyihák 2006)

2.3.4. A formaldehid toxikus hatásai

Az exogén formaldehidnek toxikus vegyületként elsősorban a légzőrendszer, de más szervek daganatos megbetegedéseinek kialakulásában is fontos szerepet tulajdonítanak (Swenberg és mtsai 1980, Casanova és mtsai 1989, Heck és mtsai 1990, Laforest és mtsai 2000, Collins és mtsai 2001). A szervezetbe került exogén HCHO DNS-DNS, valamint DNS-fehérje keresztkötéseket (DPX) alakíthat ki, melyek genotoxikus hatása pl. a DNS replikáció gátlásában nyilvánul meg (Tyihák és mtsai 1980). Fontos megjegyezni, hogy rosszindulatú daganatok keletkezésének ez a megközelítése mai napig vitatott.

Több DNS-DNS és DNS-fehérje keresztkötéseket kialakító vegyületet megvizsgálva azt találták, hogy a keresztkötések kialakításához szükséges koncentrációk egyedül a HCHO esetén maradtak a citotoxikus értékek alatt (Tyihák 2002). Mivel a sejtek a HCHO kezelés alatt megőrizték életképességüket, a kialakult keresztkötések pedig több órán át megmaradtak, így ténylegesen fennáll a DNS károsodásának lehetősége az osztódás során. Ezeket a megfigyeléseket több módszerrel is egyértelműen alátámasztották. A HCHO kezelést követően 24 órával ugyanakkor már nem sikerült kimutatni a DPX-ek jelenlétét, ami a javító mechanizmusok hatékonyságát jelzi. Azonban a HCHO esetében, mely a leghatékonyabb molekulák egyike, - így egyéb molekulákkal (pl. repair fehérjék) is reagálhat - indirekt DNS károsító hatások szintén érvényesülhetnek. Más kutatások eredményei nem találták bizonyítottnak az exogén HCHO génmutáción keresztül kialakuló karcinogén hatását (Merk és Speit 1998).

A sejteken belül HCHO képződhet számos exogén és endogén eredetű, N-, O-, vagy S-metil csoportot tartalmazó vegyületből oxidatív demetilezés során (demetilázok közreműködésével), továbbá nem kontrollált enzimatikus reakciók eredményeként (pl. SSAO [szemikarbazid érzékeny amino-oxidáz] közreműködésével), mely utóbbiak patológiás folyamatok elindításában játszanak szerepet.

A dohányfüst nagy mennyiségben tartalmaz metilamint, mely egyben a SSAO enzim endogén szubsztrátja. A nikotin metabolizmus végterméke szintén a metilamin, melynek SSAO által történő dezaminálása során HCHO, ammónia, valamint vízből hidrogén-peroxid (H_2O_2) egyaránt keletkezik. A dohányzás és a nikotin hatására felszabaduló adrenalinból monoamin-oxidáz (MAO) hatására szintén metilamin

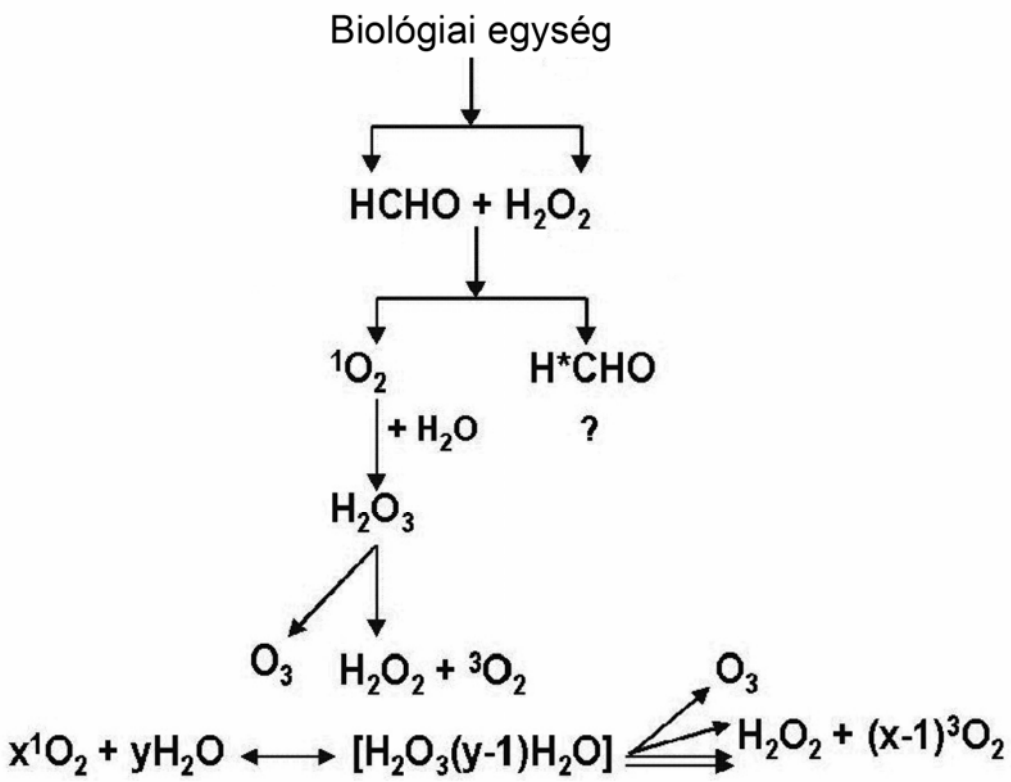
képződik. Egy vizsgálatban tríciummal jelzett nikotint (N-metil-^{3}H-nikotin) alkalmaztak egerekben a metabolizmus nyomon követése, a keletkező HCHO indirekt kimutatása céljából (Yu 1998). A szerző megállapította, hogy az alkalmazást követő radioaktivitás túlnyomó része makromolekulákban jelentkezik, melyek HCHO hidakkal összekapcsolt fehérje komplexeknek bizonyultak. A komplex kialakulása sikeresen blokkolható volt a SSAO inhibítorokkal (pl. szemikarbazid). Mivel a HCHO és H_2O_2 reakciójának eredményeként különösen reaktív singulett oxigén ($^1O_2$) és gerjesztett HCHO (H*CHO) képződik (Trézl és Pipek 1988, Tyihák és mtsai 1993, Tyihák és mtsai 1994), továbbá a dohányzás során nagyobb mennyiségben keletkező HCHO keresztkötések kialakításával károsíthatja a makromolekulákat, ezen molekuláknak alapvető szerepet tulajdonítanak a dohányzás káros hatásainak kialakulásában.

2.3.5. A szingulet oxigén és gerjesztett HCHO képződésének általános lehetősége a biológiai redszerekben

Érdekes megfigyelés, hogy a lombhullató fák levelének HCHO szintje tavasszal drámaian megemelkedik a metilezett vegyületek szintjével együtt, mely a fiatal szövetekben zajló intenzív osztódással és növekedéssel, valamint az enzimes metilezésekkel hozható összefüggésbe. Hasonlóan megnő a HCHO-szint ősszel is, de a metilezett vegyületek szintje drámaian lecsökken. Ez utóbbi esetben elsősorban a demetilezési folyamatok dominálnak. A szerzők szerint levélhulláskor a HCHO gerjesztett formában lehet jelen (Tyihák és mtsai 1998). HCHO és H_2O_2 reakciójában szingulet oxigén ($^1O_2$) és gerjesztett HCHO (H*CHO) keletkezik, mely szerepet játszhat a programozott sejthalál (pl. levélhullás) folyamatában (Trézl és Pipek 1988, Tyihák és mtsai 1994).

Wentworth és mtsai (2000) kimutatták, hogy az antitest-katalizálta vízoxidációban dihidrogén-trioxid (H_2O_3) képződik, melynek természetes bomlásakor – többek között – különösen reaktív ózon (O_3) keletkezik. A szerzők szerint ezek az oxidánsok játszhatnak szerepet az antitestek nemspecifikus baktériumölő hatásában (Babior és mtsai 2003, Wentworth és mtsai 2003).

A mára ismertnek nevezhető HCHO és H_2O_2 kölcsönhatási reakciójától így juthatunk el a különösen reaktív gáznemű ózon helyi képződéséhez, mely alapvető szerepet tölthet be a biológiai rendszerek védekezési mechanizmusában (8.ábra) (Tyihák 2006).



8.ábra A HCHO és H_2O_2 molekula feltételezett szerepének bemutatása a biológiai világ védekező mechanizmusában (Tyihák 2006)

A molekuláris oxigén nélkülözhetetlen az aerob élőlények számára, ugyanakkor potenciálisan toxikus anyag. Alapállapotban a két páratlan elektronnal rendelkező O_2 viszonylag inert molekula. Gerjesztés hatására két energiaszintjében eltérő állapot alakulhat ki, melyek közül a magasabb energiaszintű rendkívül rövid idő alatt a kisebb energiaszintű állapotba kerül, melynek hosszabb életideje lehetővé teszi, hogy különböző reakciókban vegyen részt. Ez utóbbi molekulát nevezzük szingulet oxigénnek ($^1O_2$) (Briviba és mtsai 1997). Az $^1O_2$ rendkívül reaktív molekula, mely károsítja a biomolekulákat, genotoxikus, citotoxikus hatású, továbbá szerepe van a génexpresszió aktiválásában is. Fotokémiai és kémiai úton egyaránt előállítható,

továbbá a sejtekben endogén körülmények között is létrejöhet (pl. gyulladásos folyamatok során) (Briviba és mtsai 1997).
Kísérleti eredmények azt mutatják, hogy a $^1O_2$ a H_2O_2-nál nagyságrendekkel toxikusabb molekula (Dahl és mtsai 1987). A $^1O_2$ a H_2O_2 apoptózis indukáló hatásának alaposabb vizsgálata feltárta, hogy a HL-60 sejtekben a p38 protein-kináz aktivációját mindkét molekula előidézheti, ezzel szemben a citokróm C felszabadulása a mitokondriumokból és a kaszpáz 3 aktivációja csak a $^1O_2$ hatására következik be (Kochevar és mtsai 2000, Zhuang és mtsai 2000).
Egyes eredmények arra utalnak, hogy az antitestek közvetve képesek $^1O_2$ termelésére, annak vízmolekulákkal történő reakciójával H_2O_2 előállítására. Kimutatták, hogy ezen folyamatok segítségével az antitestek képesek a baktériumok elpusztítására immunsejtek közvetítése nélkül. Antitestek szerkezetének vizsgálatával megállapították, hogy bizonyos aktív centrumok jelenléte, a különböző aminosavak elhelyezkedése lényeges a $^1O_2$ keletkezése szempontjából (Service 2001).

Összességében a sokasodó kísérleti eredményekből megállapíthatjuk, hogy a biológiai rendszerekbe kerülő exogén HCHO, valamint a kötött formában (pl. labilis hidroxi-metil csoportok) található endogén HCHO fontos szerepet tölthet be a fiziológiás és patológiás folyamatok elindításában és szabályozásában.
A legújabb biokémiai vizsgálatok alátámasztják ezeket a következtetéseket. Lin és mtsai (2005) leírták, hogy az endogén HCHO károsíthatja a patkány aorta sejteket. Shi és mtsai (2004) beszámoltak arról, hogy a hiszton-demetiláz hatására még a peptidkötésben lévő teljesen N^{ε}-metilezett lizin (N^{ε}-trimetil-L-lizin) is demetileződik, és szabad lizin, valamint 3 molekula HCHO keletkezik.
Mindezekből az következik, hogy a HCHO nem egy melléktermék hanem - nagyrészt még ismeretlen funkciókkal - alapvető és nélkülözhetetlen összetevője a a biológiai rendszereknek. Előfordulásának, reakcióinak, valamint biokémiai útjainak a megismerése segít funkcióinak jobb megértésében.

2.4. Bioautográfiától a BioArena-ig

A mikroorganizmusokkal szembeni védekezésben jelentős szerepet töltenek be az antibiotikumok. Ezeknek az anyagoknak a rendszeres használatával azonban megnőtt a rezisztens törzsek száma, ezért világviszonylatban mindinkább előtérbe kerülnek olyan védekezéstechnológiai kutatások, melyek a kórokozók antagonistáinak, vagy természetes hatóanyagoknak (pl. növényi kivonatok) a mikroorganizmussal szembeni hatásvizsgálatára irányulnak. Jelentőségük különösen környezetkímélő és egyben humán-egészségügyi szempontból fontos.

A természetes eredetű kivonatoknak többféle antimikróbás szűrővizsgálata ismert. Az egyik ilyen szűrővizsgálati módszer az un. bioautográfia, mely lehetővé teszi az antibiotikus hatás lokalizálását közvetlenül a rétegkromatogramon. Előnye, hogy komplex kivonatok vizsgálatára is alkalmas, az eljárás gazdaságos, kiértékelése könnyű. Hátránya, hogy nem alkalmas a mikróba azonosítására.

A mikróba ellenes szerek vizsgálatát sokáig nehezítette az elválasztás-tudományi technikák hiánya, melyek kifejlesztése csak az 1930-as évektől vett lendületet. A bioautográfiát kezdetben papírkromatogramon lévő antibiotikum foltok kimutatására (Goodall és Levi 1964, Fischer és Lautner 1961), majd később vékonyrétegen elválasztott komponensek vizsgálatára használták (Betina 1973). Rios és mtsai (1988) a bioautográfia három típusát különbözteti meg: kontakt-, immerziós- és direkt bioautográfiát.

Billow és Speaker (1972) egyszerű és gyors módszert írtak le, mely egyaránt használható alumínium-oxid, szilikagél, poliamid és cellulózrétegek esetében. A kromatografálás előtt a rétegeket sávokra osztották és UV fénnyel sterilizálták, majd ezt követően a sávokat szétvágták. A bioautográfiához az agar-agar oldatot két részre öntötték. Először öntötték a mikroorganizmust nem tartalmazó alapagar réteget, majd az agar felületének megszilárdulása után erre illesztették a rétegcsíkokat hordozóval felfelé, és végül rárétegezték a mikroorganizmust (*Escherichia coli, Staphylococcus aureus,* stb.) tartalmazó második agar réteget. A csíkok közé védőcsatornát vágtak a diffúzió elkerülésére, 37°C-on 24 órán át inkubálták a rétegeket, majd a felső agarréteget levágták, üveglemezre helyezték, és denzitometriás módszerrel értékelték.

Napjainkban a direkt bioautográfiás módszer az elterjedtebb, mivel komplex kivonatok antimikrobiális hatásának vizsgálatára alkalmas (Botz és mtsai 2001). A kivonat komponenseit rétegkromatográfiával választják el. A tesztelendő mikroorganizmust közvetlenül a réteg felületére juttatjuk, hogy szaporodjon. Az inkubációs idő eltelte után a gátlási zónák elhelyezkedéséből következtethetünk az elválasztott komponensek antimikróbiális hatására. A gátlási zóna megfelelő festékkel (pl. tetrazólium festék, mely dehidrogenáz aktivitást detektál) láthatóvá tehető. A direkt bioautográfia felhasználásakor több tetrazólium só sikerrel alkalmazható: MTT (3-[4,5-dimetil-tiazolil-2]-2,5-difenil- tetrazólium bromid), TTC (2,3,5-trifenil- tetrazólium klorid), TB (2,2',5,5'-tetradenil-3,3'-[dimetoxi-4,4'-bifenil]-ditetrazólium klorid). A gátlási zóna a festés után világos foltként jelentkezik a sötét háttéren.

A direkt bioautográfia eredményességét a kromatográfiás vizsgálat minősége nagymértékben befolyásolja. A következő tényezőket kell figyelembe venni:

- megfelelő oldószer használata a növényi kivonat készítésekor,
- a szorbens típusának célzott megválasztása,
- a minta koncentrált felvitele (kompakt foltokra való törekvés),
- a biológiai detektálást nem zavaró oldószer használata eluensként,
- a kifejlesztés pontos kivitelezése,
- éles felbontás elérése (1-nél nagyobb R_S érték) (Botz és mtsai 2001).

A direkt bioautográfiás vizsgálatok eredményességét további tényezők is befolyásolhatják:

- adszorbens rétegen jól szaporodó tesztmikroorganizmus kiválasztása és tenyésztése, és
- optimális hőmérséklet és idő megválasztása (Botz 2005).

A bioautográfiásan detektált kromatogramokat nem lehet hosszútávon tárolni, mert a sötét háttér idővel elhalványodik. A réteglapokat ezért kellő időben szükséges dokumentálni (Drake 1950): fényképezéssel, fénymásolással vagy szkenneléssel.

Nagy és mtsai (2002) optimalizálták a tesztmikróba életképességét vékonyrétegen bio-luminesszenciás ATP/fehérje módszer alkalmazásával.

Tyihák és mtsai (2004) a direkt bioautográfiát továbbfejlesztve megalkották a BioArena rendszert, mely újabb jelenségek megismerésére ad lehetőséget.

A BioArena komplex bioautográfiás rendszer, mely vékonyréteg kromatográfiás (TLC), ill. túlnyomásos rétegkromatográfiás (OPLC) elválasztás és bioautográfiás kimutatás

kombinálását jelenti (Tyihák és mtsai 2003). Az OPLC kompaktabb foltok nyerésére alkalmas, mely a módszer nagy előnye (Tyihák 1987 a, b, Tyihák és Mincsovics 1991, Tyihák és mtsai 1992 Mincsovics és mtsai 1999). Az elválasztott, kémiailag, valamint spektroszkópiailag jellemzett anyagok foltjait tartalmazó réteglapot mikróba tenyészetbe mártják, és tetszőleges inkubálási idő elteltével festés következik, mely a láthatóvá teszi az általuk tanulmányozott hatást (pl. antibakteriális). A réteglapon történő változásokat napokon át figyelhetjük. A BioArena vizsgálatokhoz tartozik az antimikróbiális anyag kölcsönhatási reakcióinak vizsgálata a kromatográfiás kifejlesztés után. Endogén és exogén anyagokat juttathatunk a mikróbatenyészettel együtt vagy más módon a szorbens rétegre (Tyihák és mtsai 2003, Tyihák és mtsai 2004).

A rétegrendszerű szorbenságyban végzett kölcsönhatási reakciók alapváltozatai:

- idő változtatása a mikróba tenyészetbe mártott réteg festése előtt, ill. a festési művelet után,
- exogén és endogén ko-faktorok adagolása a kulturmédiumhoz vagy a szorbenságyhoz:
    - kis molekulák: aminosavak, bio-tiolok, nyomelemek
    - nagy molekulák: hisztonok, protaminok,
- stresszorok alkalmazása:
    - biogén: más mikróbák,
    - abiogén: sugárzás, hő, kémiai anyagok (Tyihák és mtsai 2001).

A BioArena ma már széleskörű felhasználásnak örvend, mellyel számos eddig is ismert és ismeretlen jelenség kap magyarázatot.

Tyihák és mtsai (2003, 2004) vizsgálták a transz-rezveratrol antibakteriális hatását, valamint Móricz és mtsai (2003) az aflatoxinok ölő hatását tanulmányozták e módszer segítségével.

Az antibakteriális hatás mechanizmusát vizsgálva endogén HCHO megvonó anyagokat (L-arginine és glutation) juttattak a rétegre (Csiba és mtsai 1982, Huszti és Tyihák 1986, Heck és mtsai 1990), és hatáscsökkenést állapítottak meg (Tyihák és mtsai 2004, Móricz és mtsai 2003). Bizonyos nyomelemek azonban fokozták a mikróbaellenes hatást (Tyihák és mtsai 2005). A vizsgálatokból egyértelműen megállapítható volt, hogy az antibiotikus hatás kialakulásához HCHO és reakciótermékei szükségesek. Ezáltal a BioArena módszer lehetőséget ad a formaldehidom tanulmányozására is.

A *Chelidonium* alkaloidok kémiai szerkezetükből adódóan jó lehetőséget kínálnak további adatgyűjtéshez a BioArena módszert illetően. Az izokinolin alkaloidok 2.1.3. fejezetben tárgyalt jelentős mikróbaellenes hatása újabb alátámasztást nyerhet, másrészt a *Chelidonium* alkaloidok hatásmechanizmusának megértését is elősegítheti. Sokrétű hatásukat ugyanis csak részben sikerült eddig értelmezni, különös tekintettel azok hatásmechanizmusára. A vérehulló fecskefű alkaloidjai N-, illetve O-metiláltak, de jellemző a metilén-dioxi csoportok jelenléte is, tehát az alkaloidok többsége labilisan kötött endogén HCHO-et tartalmaz. A metilcsoportok metilezési és demetilezési folyamatokon keresztül szerepet játszhatnak a *Chelidonium* alkaloidok hatásmechanizmusában, azaz előzetes feltételezésünk szerint befolyásolhatják a HCHO-ciklus lépéseit. Ilyen szempontból figyelemre érdemes Iwasa és mtsainak (1996) a protoberberin-analóg alkaloidok antibakteriális hatás-szerkezet összefüggés vizsgálatai. Megállapították, hogy a kvaterner N atom, a 13-as C atom alkilszubsztituálása, valamint a 2-es és 3-as C atomhoz kapcsolódó metilén-dioxi csoport antibakteriális hatásnövekedést eredményeznek.

A *Chelidonium* alkaloidok tehát fontos szerepet tölthetnek be a fiziológiás és patológiás folyamatok elindításában és szabályozásában. Hozzájárulhatnak a *Chelidonium* drogok és készítményeik bizonyítékokon alapuló sokoldalú hatásának megismeréséhez és biztonságos alkalmazásához.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Vizsgálati anyagok

3.1.1. Növényminták

A vizsgálatokhoz saját begyűjtésű *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae) mintákat használtunk. Az analitikai módszerek kidolgozása (VRK-denzitometria, spektroszkópia és HPLC), a növény szervenkénti vizsgálata (levél, szár és generatív szerv [virágzat és becő], és gyökér), valamint a tradicionális gyógyszerkészítés szabályai szerint előállított kivonatok (főzet, forrázat, illetve 40, 70 és 90 V/V%-os alkohollal készült tinktúra) alkaloid és ásványelem tartalom meghatározása a 2004. évben Budapesten (Hűvösvölgy) (**A** minta) és Nagymaroson (**B** minta) begyűjtött növényrészek felhasználásával történt.

Az alkaloid tartalom változás vizsgálatát a vegetációs periódus alatt a 2005. április eleje és október eleje között kb. 20 naponként összesen tíz alkalommal (április 10., április 30., május 20., június 10., június 30., július 20., augusztus 10., augusztus 30., szeptember 20. és október 10.) Budapest (Hűvösvölgy) és Budakeszi területén gyűjtött herba és gyökér mintákból végeztük.

A *Chelidonium majus*-t a Semmelweis Egyetem Farmakognózia Intézetében azonosítottuk, ahol elhelyeztük a vizsgálati ellenmintákat.

A vérehulló fecskefű drogok, valamint növényrészek szárítása szobahőmérsékleten, száraz, szellős helyen történt. A mintákat közvetlenül a vizsgálatok előtt porítottuk a VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben előírt szitafinomságura. A porpreparátum készítéshez 355-ös, a vékonyréteg kromatográfiához, illetve tartalmi meghatározáshoz 710-es fonalsűrűségű szitát használtunk. A vizsgálatok előtt meghatároztuk a drogok szárazanyag tartalmát (3.2.1. fejezet).

3.1.2. Kémiai reagensek

A fitokémiai és bioautográfiás vizsgálatokhoz használt kelidonin -, szangvinarin -, keleritrin-, berberin-, és protopin-klorid tesztvegyületek, valamint a bioautográfiás vizsgálatokhoz használt festékanyag az MTT (3-[4,5-dimetil-tiazolil-2]-2,5-difenil-tetrazólium bromid), illetve a Triton X-100, L-arginin és glutation vegyületek Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország), a koptizin-klorid alkaloid tesztanyag Chromadex (Santa Ana, CA, USA) származásúak voltak. A HPLC vizsgálatokat a Farmitalia Carlo Erba (Milan, Italy) HPLC tisztaságú oldószereivel végeztük. A vékonyréteg kromatográfiás kvalitatív és kvantitatív vizsgálatokhoz Kieselgel 60 F_{254} jelzésű 20×10 cm-es (Merck, Darmstadt, Germany) alufóliás és üvegréteget használtunk. A minták elemtartalom meghatározásánál a Merck ICP tesztoldataival dolgoztunk (Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Ti, V, Zn). A vizsgálatokhoz 0,2 μm pórusátmérőjű szűrőn (Millipore, Billerica, MA, USA) tisztított vizet használtunk. A felsorolásban nem szereplő valamennyi oldószer és reagens analitikai tisztaságú volt és a Reanal Finomvegyszergyár Rt. (Budapest, Magyarország)-től került beszerzésre.

3.1.3. Mikroorganizmus és táptalaj

A bioautográfiás vizsgálatainkban alkalmazott babkórokozó *Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola* baktérium törzset a Londoni Egyetemtől kaptuk (Department of Biological Sciences, Imperial College, London University, Wye, UK). A reagens baktérium szuszpenzió elkészítéséhez a tesztbaktériumokat King's B broth táptalajon növesztettük 28°C-on folyamatos rázatással (170 rpm). Ezután egy olyan baktérium szuszpenziót állítottunk elő, melynek optikai denzitása 560 nm-en 0,7 volt, és amely kb. $1{,}5\times10^9$ sejtet tartalmazott milliliterenként. Közvetlenül a felhasználás előtt (merítés) a baktérium kultúrához 50% (V/V) friss táptalajt adtunk.

3.2. Vizsgálati módszerek

3.2.1. Drogok szárítási veszteségének meghatározása

A drogok szárítási veszteségének meghatározását a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv (2004) 2.2.32. cikkelye alapján 2-2 g, virágok esetén 0,5-0,5 g drog felhasználásával végeztük. A vizsgálat során a drognak a 105°C hőmérsékleten történő szárítás hatására bekövetkező egy tizedes számjegyü értékre kerekítve megadott tömegveszteségét (% m/m) mértük.

3.2.2. Mintaelőkészítési műveletek és extrakciós módszerek és

3.2.2.1. TRADICIONÁLIS GYÓGYSZERFORMÁK KÉSZÍTÉSE

A *Chelidonium* drogok népgyógyászati felhasználása a hagyományos gyógyszerkészítési eljárások széleskörű alkalmazásával történik. A népgyógyászat gyakorlatában leggyakrabban előállított készítmények a főzet, forrázat, valamint tinktúra gyógyszerformák.

A tradicionális gyógyszerformák készítéséhez Chelidonii herba drogot, illetve a kivonószert 1:40 arányban alkalmaztuk. Kétféle vizes kivonat mellett három tinktúrát vizsgáltunk, melyek különböző koncentrációjú etil-alkohollal készültek.

Főzet (decoctum): 5 g drogot 5 percen át forraltuk vízzel (200 ml), majd forrón szűrtük és kihűlés után térfogatát 200 ml-re egészítettük ki.

Forrázat (infusum): 5 g drog 200 ml forró vízzel történő leforrázása után lefedve 30 percig állni hagytuk, majd szűrtük és térfogatát 200 ml-re egészítettük ki.

Tinktúrák: 5 g drog 200 ml etanollal (40 V/V%, 70 V/V%, 90 V/V%) szobahőmérsékleten, 6 napon át történő áztatása után a kivonatot szűrtük, majd térfogatát 200 ml-re egészítettük ki.

3.2.2.2. LIOFILIZÁTUMOK ELŐÁLLÍTÁSA

A vizes kivonatokat (teákat: decoctum és infusum), valamint a tinktúrákat (40 V/V%, 70 V/V%, 90 V/V%) LABOR-MIM liofilező berendezéssel fagyasztva szárítottuk. Tinktúrák esetében az etanolt előzetesen vákuum desztillációval távolítottuk el. A liofilezésnél a polc hőmérséklete 60°C, a mintáké -20°C → 30°C, a szárítás időtartama 13 óra volt.
A fenti módszerekkel előállított tradicionális kivonatok különböző részleteit használtuk ásványelem tartalom, valamint HPLC-vel történő alkaloid összetétel meghatározásához.

3.2.2.3. MINTAELŐKÉSZÍTÉS HPLC VIZSGÁLATOKHOZ

Chelidonium drogok, illetve növényrészek alkaloid komponenseinek elválasztását, valamint összetételének vizsgálatát nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszerrel végeztük.
A mintákból metanolos kivonatot állítottunk elő úgy, hogy a 0,1000 g porított mintát 20 ml 0,05M sósavat tartalmazó metanollal kétszer 10 percig extraháltunk ultrahangfürdőben (Braun Labsonic U, Melsungen, Germany) (27 ± 2°C). A szuszpenziót centrifugáltuk (6000 rpm / 2500 g), majd a felülúszót alacsony nyomáson, rotációs vákuumbepárló készüléken (Rotavapor R-200, Büchi, Flawil, Switzerland) 60°C-ot meg nem haladó hőmérsékleten szárazra pároltuk. A száraz maradékot 1,25 ml 0,05M sósavat tartalmazó metanolban és 3,75 ml 0,05M n-heptánszulfonsavat (HS) tartalmazó vizes oldatban oldottuk, és szilárd fázisú extrakcióval tisztítottuk (3.2.3.4. fejezet).

3.2.2.4. GYÓGYSZERKÖNYVEK EXTRAKCIÓS MÓDSZEREI

Porított drogot (0,500 g) 12 V/V%-os ecetsavval (100 ml) vízfürdőn visszafolyó-hűtőt alkalmazva 30 percen át melegítettünk, majd lehűtöttük és leszűrtük. A szüredéket tömény ammónia-oldattal meglúgosítottunk (pH = 8-9), és 100 ml kloroformmal (DAB 10 – Módszer 1), 100 ml diklórmetánnal (Ph.Eur.5, Ph.Hg.VIII. – Módszer 2), illetve 100 ml n-butanollal (Módszer 3) 30 percig ultrahang fürdőben extraháltuk, majd

a szerves fázist vákuumbepárlón szárazra pároltuk és a maradékot 3 ml metanolban oldottuk. A fentiek szerint előállított kivonatokat használtuk a gyógyszerkönyvek spektroszkópiás vizsgálómódszereinek összehasonlítására, a növényrészek alkaloid-összetételének HPLC-s és VRK-denzitometriás módszerrel történő meghatározására, valamint a BioArena eljárással végzett antibakteriális hatás vizsgálatokra.

3.2.3. Fitoanalitikai módszerek

3.2.3.1. ALKALOID TARTALOM MEGHATÁROZÁSA

Az összalkaloid tartalom mérésére alkalmazott spektrofotometriás módszert a Német Gyógyszerkönyvben (1999) tették hivatalossá, melyet kisebb módosításokkal átvett az Európai Gyógyszerkönyv (2004) és a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv (2004).

A vizsgálati oldat 0,750 g porított droghoz adott 200 ml 12 V/V%-os (higított) ecetsavval készült. A keveréket gyakori rázogatás közben 30 percig vízfürdőn melegítettük, majd lehűtöttük és higított ecetsavval 250,0 ml-re egészítettük ki. Megszűrtük, és a szüredék első 20 ml-ét elöntöttük, majd a szűrlet 30,0 ml-ét kb. 6 ml tömény ammónia-oldattal meglúgosítottuk (pH = 8-9). A meglúgosított oldatot 100 ml kloroformmal (DAB 10 – Módszer 1), illetve 100 ml diklórmetánnal (Ph.Eur.5. és Ph.Hg.VIII. – Módszer 2), valamint n-butanollal (Módszer 3) 30 percig ultrahang fürdőben extraháltuk. Az elválasztott szerves fázisok 50,0-50,0 ml-ét 100 ml-es gömblombikban szárazra pároltuk. A maradékokat 2-3 ml etanolban enyhe melegítés közben oldottuk és 9,8%-os kénsavval 25,0 ml-re egészítettük ki. Az oldatok 5,0 ml-ét 25 ml-es mérőlombikban kromotrópsav (dinátriumsó) tömény kénsavval készült, 10 g/l töménységű oldatának 5,0 ml-ével elegyítettük és tömény kénsavval 25,0 ml-re egészítettük ki, majd a lombikot lezártuk.

Egyidejűleg kompenzáló oldatot készítettünk, melyben kromotrópsav tömény kénsavval készült, 10 g/l töménységű oldatának 5,0 ml-ét elegyítettük tömény kénsavval (25,0 ml), majd a lombikot lezártuk. Mindkét oldatot 10 percre vízfürdőre helyeztük, majd 20°C-ra hűtöttük és ha szükséges volt térfogatukat tömény kénsavval 25,0 ml-re egészítettük ki.

A vizsgálati oldatok abszorbanciáját 570 nm-en mértük a kompenzáló oldattal szemben.

Az összes alkaloid-tartalmat kelidoninban (%) kifejezve adtuk meg, a következő egyenlet segítségével számoltunk:

$$6250 \times A / A^{1\%}_{1cm} \times 3 \times m$$

A = 570 nm-en mért abszorbancia,

m = a vizsgálathoz bemért anyag tömege grammban,

$A^{1\%}_{1cm}$ = kelidonin fajlagos abszorbciós koefficiense ($A^{1\%}_{1cm}$ = 933).

3.2.3.2. VÉKONYRÉTEG-KROMATOGRÁFIÁS (VRK) VIZSGÁLATOK

Vizsgálatainkhoz az előzőekben ismertetett módon előállított kivonatokat és tesztanyagokat 0,02 - 1 mg/ml koncentrációban metanolban oldottuk, szükség szerint hígítottuk és 1-10 µl-es részleteit vittük hordozóra az alábbi körülmények között.

• Kvalitatív vékonyréteg kromatográfiás módszer:

Réteg: Kieselgel 60 F_{254} (Merck 0,2 mm) 10 × 20 cm; eluens: hangyasav : víz : n-propanol (1 : 9 : 90 V/V/V); felvitt mennyiség: 10 µl sávok formájában (3 mm), összehasonlító oldatok: kelidonin – (1 mg/ml - 5 µl), szangvinarin – (0,02 mg/ml - 2 µl), keleritrin – (0,2 mg/ml - 2 µl), berberin – (0,2 mg/ml - 3 µl), és koptizin-klorid (0,1 mg/ml - 2 µl); start: 1,2 cm, kifejlesztés: 9,2 cm fronttávolságig, szárítás levegőn. A mintafelvitelt mikrofecskendővel (Hamilton, Bonaduz, Switzerland), és felszálló kromatográfiás szétválasztást alkalmaztunk béleletlen Desaga üveg kamrában (hossz: 20,7 cm, szélesség: 7,2 cm, magasság: 20,5 cm).

Értékelés: UV (254 + 365 nm) fényben kezeletlenül, majd kálium-tetrajodo-bizmutát(III)-oldattal (Dragendorff-reagens) lepermeteztük, levegőn megszárítottuk és nappali fényben értékeltük (Wagner 1996, DAB 10, Ph.Eur.5. és Ph.Hg.VIII.).

A kromatogramok értékeléséhez megadtuk a foltok retenciós faktorát (R_f), [Rf = a folt távolsága a starttól (cm) / fronttávolság (cm)].

• Vékonyréteg kromatogramok készítése denzitometriás vizsgálatokhoz:

Réteg: Kieselgel 60 F_{254} (üveg) 10 × 20 cm; elues: diklórmetán : metanol (97 : 3 V/V) [kelidonin, szangvinarin és keleritrin alkaloidok elválasztására] és kloroform : metanol (60 : 30 V/V) [berberin és koptizin alkaloidok elválasztására]; 60 perces telítési idő,

felvitel pontokban: nyolc minta és öt tesztanyag (különböző koncentrációban - kalibráció) egymástól 13 mm-re.

A mintafelvitelt mikrofecskendővel (Hamilton, Bonaduz, Switzerland) végeztük. A kifejlesztések szobahőmérsékleten (20-24°C) történtek, 60% relatív páratartalom mellett. Felszálló kromatográfiás szétválasztást alkalmaztunk béleletlen Desaga üveg kamrában (hossz: 20,7 cm, szélesség: 7,2 cm, magasság: 20,5 cm) 90 mm-es fronttávolságig. A kromatogramokat szobahőmérsékleten szárítottuk, és UV (254 + 365 nm) fényben ellenőriztük. Minden felvitelt kétszer ismételtünk a felviteli pontosság ellenőrzésére és a kiválasztott módszerrel a kromatogramokat denzitometriás módszerrel mennyiségileg értékeltük.

Az általunk kifejlesztett módszer részletes ismertetése az „Eredmények és Megbeszélés" fejezetben (4.3.2.) kerül sor.

• Vékonyréteg kromatogramok készítése bioautográfiás (BioArena) vizsgálatokhoz:

Réteg: Kieselgel 60 F_{254} (Merck 0,2 mm) 10 × 20 cm; eluens: diklórmetán : metanol (97 : 3 V/V), kloroform : metanol (60 : 30 V/V), és n-propanol : víz (90 : 4 V/V); felvitel módja: sávok (3-5 mm) formájában felvitt mennyiség (0,02 - 1 mg/ml-es teszt-oldatokból): kelidonin-klorid (1,5 - 10 µl), szangvinarin-klorid (5 – 20 µl), keleritrin-klorid (2,5 – 10 µl), berberin-klorid (2,5 – 10 µl), és koptizin-klorid (2,5 – 10 µl), valamint kivonatokból (3.2.2.4.): 2,5 – 5 µl. A mintafelvitelt mikrofecskendővel (Hamilton, Bonaduz, Switzerland) végeztük. A kifejlesztések szobahőmérsékleten (20-24°C), 60 perces telítési időt alkalmazva történtek, 60% relatív páratartalom mellett. Felszálló kromatográfiás szétválasztást alkalmaztunk Desaga üveg kamrában (hossz: 20.7 cm, szélesség: 7,2 cm, magasság: 20,5 cm) 90 mm-es fronttávolságig. A kromatogramokat szobahőmérsékleten szárítottuk, UV (254 + 365 nm) fényben ellenőriztük, illetve denzitometriás módszerrel kvalitatíve értékeltük (λ = 305 nm).

3.2.3.3. VRK-DENZITOMETRIÁS MÉRÉSEK ÉRTÉKELÉSE

A növényrészekből előállított kivonatok (3.2.2.4.) alkaloid-összetételének meghatározására az általunk kifejlesztett VRK-denzitometriás módszert alkalmaztuk. A méréseket IBM számítógép által vezérelt Simadzu CS-9301PC (Kyoto, Japan) típusú

denzitométerrel végeztük. Az UV spektrumokat közvetlenül a rétegről vettük fel, hogy meghatározzuk a legnagyobb elnyeléshez tartozó λ értéket, mely általában a mennyiségi meghatározások optimális hullámhosszát jelenti. Ez a kelidonin alkaloid esetében, ahol a mérés reflexiós abszorbancia módban történik megfelelő módszernek bizonyult. Ahhoz, hogy fluoreszcenciás méréseknél megállapítsuk az optimális mérési hullámhosszat 280 nm és 370 nm között lemértük a tesztanyagok foltjait, és meghatároztuk a legintenzívebb emissziót biztosító gerjesztési hullámhosszat. A reflexiós fluoreszcenciás méréseknél további feladatot jelentett a megfelelő szűrő kiválasztása. Fő szempontként azt vettük figyelembe, hogy a gerjesztő fény kiszűrése mellett az emittált fénynek minél nagyobb hányadát engedje át.
A módszerfejlesztés lépéseit részletesen az „Eredmények és megbeszélés" fejezetben (4.3.2.) ismertetjük.

3.2.3.4.. NAGYHATÉKONYSÁGÚ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLAT

• Szilárd fázisú extrakció

A 3.2.2.3., valamint a 3.2.2.4. szerint előállított mintákat Supelclean LC_{18} oszlopon (500 mg, 3 ml) tisztítottuk. A műveletet egy 12 helyes vákuumkamra (LiChrolut, Merck) segítségével végeztük. Az oszlopot 5 ml acetonitrillel, 5 ml 95%-os vizes heptánszulfonsavas (0,05 M-os) metanollal, majd 5 ml vizes heptanszulfonsav-oldattal (0,05 M-os) aktiváltuk. A 0,1000 g drognak megfelelő szárazra párolt mintákat 1,25 ml 0,05M sósavat tartalmazó metanol és 3,75 ml vizes heptanszulfonsav-oldat (0,05 M-os) elegyében vettük fel és vittük az LC_{18} oszlopra. Az oszlopot 5 ml 30%-os vizes heptánszulfonsavas (0,05 M-os) metanollal mostuk, majd vákuum segítségével szárítottuk. A mintát 2,50 ml 95% vizes heptánszulfonsavas (0,05 M-os) metanollal eluáltuk 0,5 ml / perc átfolyási időt alkalmazva.

• HPLC analízis

A minták alkaloid komponenseinek elválasztása és mennyiségi mérése Surveyor (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) HPLC berendezésen történt, mely kvaterner gradiens pumpával, integrált vákuum gázmentesítővel, automata mintaadagolóval és

fotodiódás detektorral volt ellátva. Az adatok gyűjtése, elemzése és kiértékelése Thermo Finnigan ChromQuest 4.0 szoftver segítségével történt.

A HPLC vizsgálatokhoz Phenomenex Luna 5 µm C_{18} fordított fázisú oszlopot (250 mm × 4,6 mm i.d., Torrance, CA, USA), valamint Phenomenex SecurityGuard C_{18}-as előtét oszlopot használtunk. Az oszlop hőmérséklete 30°C, az injektált minta mennyisége 5 µl volt. Eluensként acetonitril : metanol : 30 mM ammónium formiát (14,7 : 18 : 67,3 V/V/V) izokratikus elegye szolgált, melynek áramlási sebessége 1ml/perc volt.

A csúcsok azonosítása spektrum elemzés és standard addíció segítségével történt. A kvantitatív meghatározásokat külső standard módszerrel végeztük 280 nm-en, 1,25 – 80 µg/ml terjedelemben.

3.2.3.5. ÁSVÁNYELEM TARTALOM MEGHATÁROZÁSA ICP-OES MÓDSZERREL

A *Chelidonium* drogok, illetve a tradicionális gyógyszerkészítés szabályai szerint előállított kivonatok ásványelem tartalom meghatározását induktíven csatolt plazma emissziós spektrofotometriás (ICP-OES) módszerrel végeztük.

A vizsgált elemek (Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Ti, V, Zn) mennyiségeinek meghatározása a kivonatokban induktíven csatolt plazma emissziós spektrométerrel történt az őrölt drog kivonását, illetve a bepárolt minták (0,5 g drog vagy 50 ml szárazra párolt minta) feltárását követően (5 ml 65%-os salétromsav és 3 ml 30%-os H_2O_2 elegyével MARS X mikrohullámú készülékben).

Az elemtartalom mérésére Atom Scan 25 (Thermo Jarrell Ash) ICP-OES-t használtunk, melyben 2 kW teljesítményű radiófrekvenciás generátor (27,12 MHz) által indukált 8000-10000°K-os argonplazma gerjesztődik. Optikai rendszerébe Czernyi-Turner vákuum-monokromátort és két fotoelektron sokszorozót (R 427 és R 889) építettek be, optikai rács: 2400 és 1200 vonal / mm.

A készülék standardizálásához a mintákból készített oldatok hasonló összetételű és mátrixú Merck atomabszorpciós és ICP standardokból készült oldatokat használtunk. Két pontos kalibrálást, 3 × 3 másodperces integrálási időt, háttérkorrekciót és automatikus vakleolvasást alkalmaztunk. Minden minta esetében három párhuzamos mérés történt. A vizsgálatok paramétereit a 2.táblázat tartalmazza.

2.táblázat Az ásványelem tartalom meghatározás körülményei

Elem	Hullámhossz (nm)	Plazma teljesítmény (W)	Kimutatási határ (mg/l)	Alkalmazott koncentráció (mg/l)
Al	396,152	1350	0,020	10
B	249,773	1350	0,002	10
Ba	455,403	1150	0,002	10
Ca	393,366	950	0,0005	10
Co	228,616	1550	0,003	2
Cr	267,716	1750	0,004	2
Cu	324,754	1150	0,002	2
Fe	259,940	1750	0,002	20
K	766,490	1150	0,100	100
Li	349,231	1150	0,002	10
Mg	279,553	1150	0,0005	50
Mn	257,553	1150	0,001	5
Mo	327,665	1350	0,004	20
Na	589,592	1150	0,010	5
Ni	471,743	1150	0,002	10
P	185,943	1350	0,010	35
S	185,943	1750	0,030	33,33
Ti	334,941	1350	0,002	2
V	266,719	1150	0,001	2
Zn	206,200	1350	0,002	2

3.2.4. Antibakteriális hatásvizsgálat BioArena módszerrel

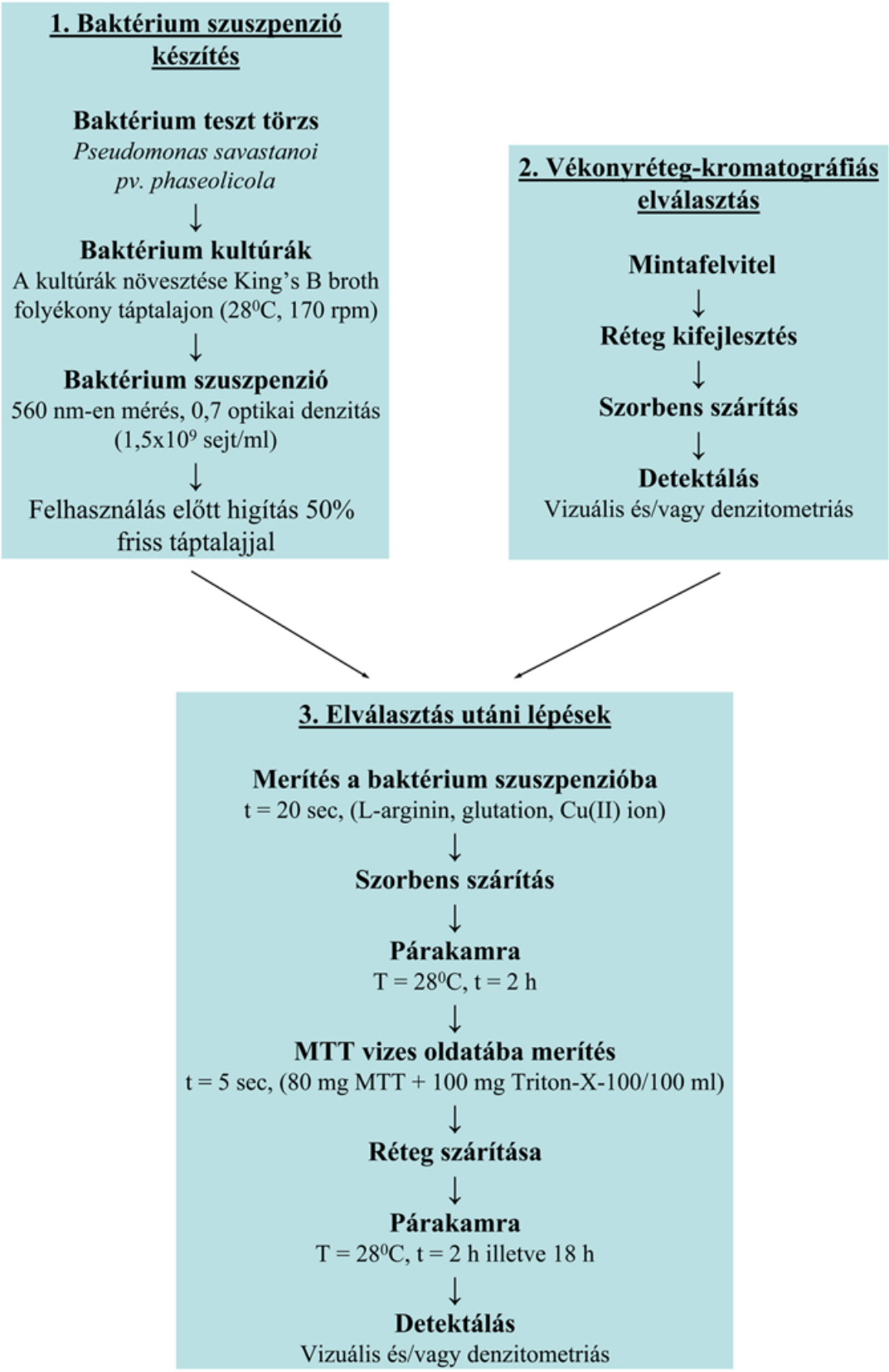
Az antibakteriális hatás vizsgálatát az „Irodalmi áttekintés” (2.7.) fejezetben ismertetett BioArena módszerrel a 9.ábrán összefoglaltak szerint végeztük. A bioautográfiás módszerhez hasonlóan a szárított vékonyrétegeket (3.2.3.2.) 20 ml reagens baktérium szuszpenzióba mártottuk 20 másodpercre, majd párakamrában inkubáltuk 2 órán át (100% relatív páratartalom, 28°C hőmérséklet). Inkubálás után a réteglapokat MTT (3-[4,5-dimetil-tiazolil-2]-2,5-difenil- tetrazólium bromid) vizes oldatával (80 mg MTT és 100 mg Triton X-100 100 ml vízben oldva) festettük (merítés 5 másodpercre), hogy a gátlási zónát láthatóvá tegyük. Az élő baktérium sejtek a sárga MTT-t kék színű MTT-formazánná redukálják (Beuge és Kline 1972, Hamburger és Cordell 1987):

$$\text{NADH} + \text{tetrazólium só (MTT)} \xrightarrow{\text{NADH-dehidrogenáz}} \text{formazán} + \text{NAD}^+$$

A Triton X-100 használta az MTT egyenletesebb eloszlását biztosítja az oldatban, valamint stabilizálja a MTT-formazánt (Stowe és mtsai 1995).
A szárítást követően a festett rétegeket párakamrában inkubáltuk 2, illetve 18 órán át. Ezt követően a rétegeket látható fényben vizuálisan értékeltük és szkenneléssel dokumentáltuk.
A alkaloid komponensek antibiotikus hatásának igazolását denzitometriás módszerrel végeztük. Az elválasztott komponenseket a kifejlesztés után (λ = 305 nm), majd a réteg festését követően (λ = 590 nm) denzitometráltuk.
Az *Chelidonium* alkaloidok hatásmechanizmusának tanulmányozásához L-arginin (2, 5 mg/ml), glutation (2, 5 mg/ml), valamint különböző koncentrációjú réz(II)-szulfátot (4, 6, 8 mg/100 ml) adtunk a baktérium szuszpenzióhoz.

3.3. Statisztikai analízis

A vizsgálatok eredményeit három, illetve öt párhuzamos mérés átlaga és szórása alapján értékeltük. Két mérés átlaga szignifikánsan különbözött, ha a $p<0,05$ volt. A mérési eredmények matematikai-statisztikai értékeléséhez regresszió analízist, valamint a Student-féle egy- és kétmintás t-próbát alkalmaztuk ANOVA statisztikai programcsomag felhasználásával. A táblázatokban a mérési eredmények átlaga és szórása ($x \pm SD$), illetve a relatív standard deviáció (RSD) értékek láthatók, az ábrákon minden esetben az átlag és szórás értékek szerepelnek.
Eredményeink statisztikai kiértékeléséhez Microsoft Excel 2003, valamint az egyenesek egyenletének és a korrelációs koefficiensek kiszámításához Origin 2003 programcsomagokat használtunk.



9.ábra A BioArena módszer folyamatábrája

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. *A Chelidonii herba vizsgálata a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv szerint*

A VIII. Magyar Gyógyszerkönyv a Chelidonii herba-t a vérehulló fecskefű – *Chelidonium majus* L. - virágzó állapotban gyűjtött egész vagy aprított, szárított föld feletti hajtásaként definiálja (Ph.Hg.VIII. 2004).
Vizsgálataink megkezdésekor minősítettük a saját begyűjtésből származó növénymintákat (Herba **A** és **B**) a Ph.Hg.VIII. Chelidonii herba-ra vonatkozó cikkely szerint (3.táblázat).

3.táblázat A gyűjtött Chelidonii herba drogok jellemzői

	Gyűjtés helye	Gyűjtés ideje	Növény állapota
Herba **A**	Budapest	2004. május 2.	virágzó
Herba **B**	Nagymaros	2004. április 30.	virágzó

Elvégeztük a herba drogok makroszkópos, mikroszkópos és vékonyréteg kromatográfiás azonosítását. Mértük a növényben található idegen anyagok mennyiségét, a szárítási veszteséget és összes hamu tartalom értékeket. Spektrofotometriás módszerrel meghatároztuk a Chelidonii herba drogok összalkaloid tartalmát.

4.1.1. Makromorfológiai vizsgálat

A hengeres, bordázott, 3-7 mm (Herba **A** – 6 mm, Herba **B** - 4 mm) átmérőjű, és kissé szőrös szár üreges, de általában összenyomódott, sárgás-zöldes-barna színű. A levelek vékony lemezűek, szabálytalanul szárnyasak, a levélszeletek alakja tojásdadtól hosszúkás szögletesig változhat, a szélük durván fogazott, a végálló levélszelet gyakran háromkaréjú; a levelek színi oldala kékeszöld és csupasz, a fonáki felszín halványabb és bolyhosan szőrős, különösen az erek felett. A virágtakaró két mélyén kiöblösödő,

könnyen lehulló csészelevélből, és négy sárga, széles-tojásdad, 8-10 mm hosszú sziromlevélből épül fel; a porzók sárgák és számosak, a felső állású magházról rövid bibeszál ered; ritkán előfordulnak hosszú, éretlen toktermések is (10.ábra).

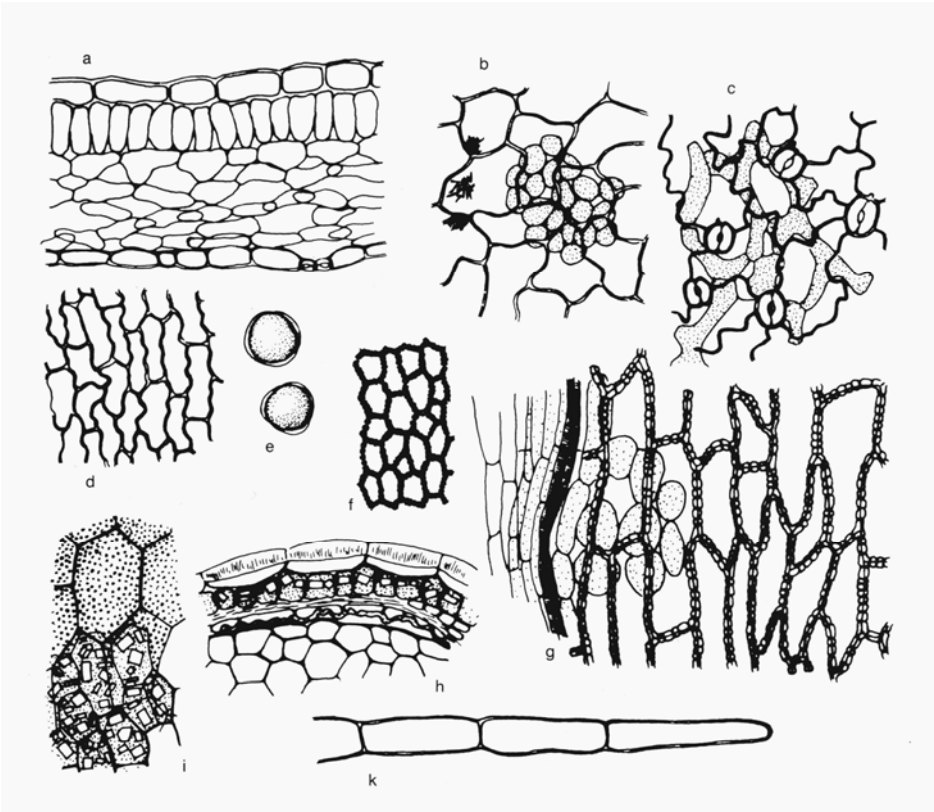
10.ábra Chelidonii herba drog

4.1.2. Mikromorfológiai vizsgálat

A gyógyszerkönyvekben a mikroszkópos vizsgálatokhoz ajánlott klorál-hidrát-oldattal történő lecseppentés helyett, a szintén általánosan alkalmazott kálium-hidroxidos derítést használtuk. Észrevételeinket a gyógyszerkönyvi leírással vetettük össze.

A drogpor sötét szürkészöld-barnászöld színű, benne - mikroszkóp alatt - számos levéltöredék észlelhető, felülnézetben hullámos falú bőrszöveti sejtekkel; anomocitikus sztóma apparátusokat csak a fonáki epidermisz tartalmaz; láthatók még hosszú egysoros, gyakran darabokra töredezett fedőszőrök is. A levélből vagy a szárból származó szállítószövet rostok, illetve a gödörkés és spirális sejtfalvastagodású edények csoportosan jelennek meg. Ezekhez szorosan kapcsolódnak a sárgásbarna anyagot tartalmazó tejcsövek. Ritkán a sziromlevelek töredékei is jelen lehetnek, vékony falú és részben papillás felszínű sejtekkel, melyek halványsárga olajcseppeket tartalmaznak. A

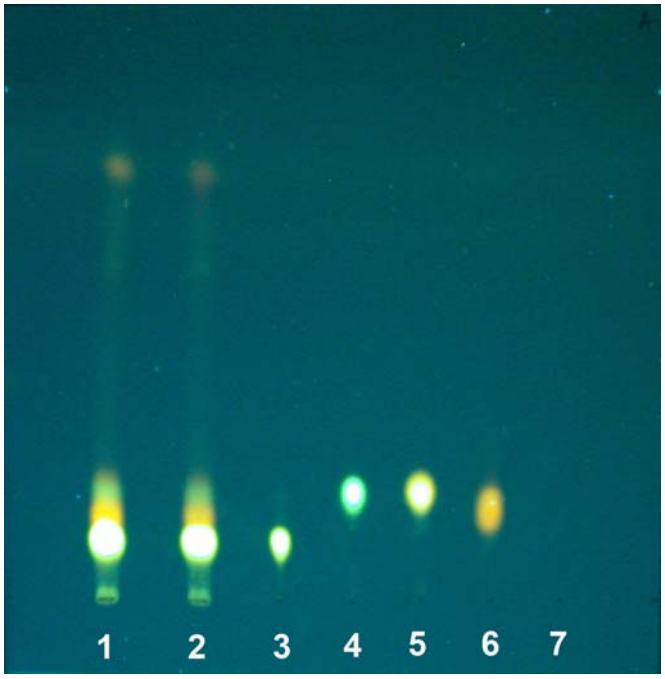
pollenszemek gömb alakúak, átmérőjük 30-40 µm, három csírakapu jellemzi és az exin finoman gödörkés (11.ábra).



11.ábra A Chelidonii herba porpreparátuma (a – levéltöredékek keresztmetszete; b – színi epidermisz töredék; c – fonák epidermisz gázcserenyílásokkal; d – sziromlevél töredék; e – pollenszemek; f – magház szövet; g – termésfal; h – maghéj keresztmetszete; i - maghéj töredék kristálytartó sejtjei, k - fedőszőr)

4.1.3. Vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálat

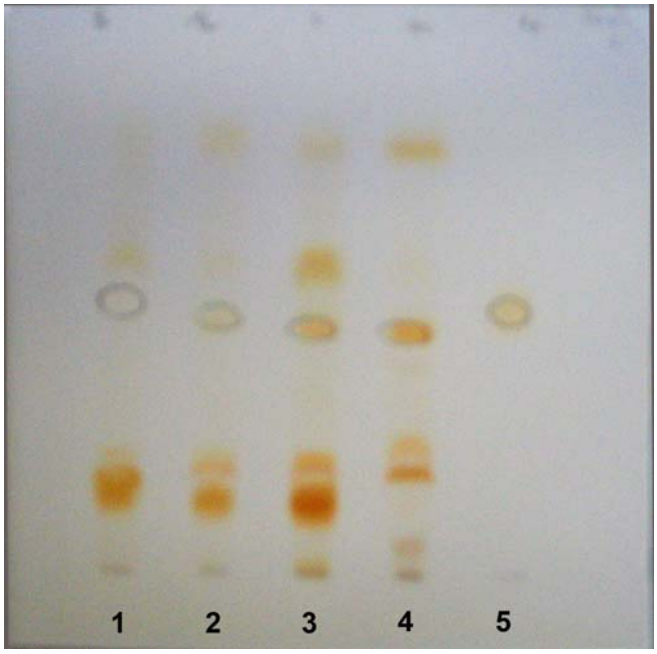
A VIII. Magyar Gyógyszerkönyv előírásainak megfelelően az „Anyag és módszer" fejezetben leírtak szerint (3.2.2.4. és 3.2.3.2.) a vérehulló fecskefű Herba **A** és **B** mintáiból készített kivonatokat vékonyréteg kromatográfiás analízisnek vetettük alá. A gyógyszerkönyvek által ajánlott papaverin-hidroklorid és metilvörös oldatok helyett kelidonin-, szangvinarin-, keleritrin-, berberin-, és koptizin-klorid tesztvegyületek metanolos oldatát vittünk a rétegre összehasonlítóként és UV fényben, 365 nm-en vizsgáltuk az elválasztott komponenseket (12.ábra).



1. Herba **A** minta
2. Herba **B** minta
3. Koptizin
4. Berberin
5. Keleritrin
6. Szangvinarin
7. Kelidonin

12.ábra A *Chelidonium majus* herbájának vékonyréteg kromatográfiás vizsgálata UV fényben (365 nm); eluens: hangyasav : víz : n-propanol (1 : 9 : 90 V/V/V), hordozó: Kieselgel F_{254}

A referencia vegyületek zónájával megegyező magasságban (koptizin $R_f \times 100 = 12$, berberin $R_f \times 100 = 22$, keleritrin $R_f \times 100 = 23$, szangvinarin $R_f \times 100 = 20$) a vizsgált kivonatokban narancssárgán (szangvinarin), sárgán (koptizin és keleritrin) és zölden (berberin) fluoreszkáló vegyületek foltjai jelentek meg. A kelidonin ezen a hullámhosszon nem azonosítható. A május elején gyűjtött Herba **A** és **B** drogok kevés kelidonint tartalmaznak, ezért Dragendorff reagenssel történő előhívás után sem adtak jól látható foltot a rétegen. Ezért a növényrészekből előállított kivonatok vékonyréteg kromatogramján mutatjuk be a kelidonin kálium-tetrajodo-bizmutát(III)-oldat hatására barnára színeződött foltjait ($R_f \times 100 = 54$), hiszen míg a herba kevés, addig a generatív szerv, illetve a gyökér jelentős mennyiségű kelidonin alkaloidot tartalmaznak (13.ábra).



1. *Chelidonium* levél minta
2. *Chelidonium* szár minta
3. *Chelidonium* generatív szerv minta
4. *Chelidonium* gyökér minta
5. Kelidonin

13.ábra A *Chelidonium majus* szerveinek vékonyréteg kromatográfiás vizsgálata Dragendorff reagenssel történő előhívás után; eluens: hangyasav : víz : n-propanol (1 : 9 : 90 V/V/V), hordozó: Kieselgel F_{254}

4.1.4. Tisztasági vizsgálat

4.1.4.1. IDEGEN ANYAG

A Ph.Hg.VIII. Chelidonii herba-ra vonatkozó cikkelye legfeljebb 10% idegen anyag jelenlétét engedélyezi, mely származhat a növény egyéb részeiből (anyanövényből származó, de nem a drogként meghatározott anyagok), illetve idegen eredetű szennyezésből (nem az anyanövényből származó, növényi vagy ásványi eredetű anyagok).

Az idegen anyag jelenléte egyik mintában sem haladta meg a 0,5%-ot.

4.1.4.2. SZÁRÍTÁSI VESZTESÉG

A vonatkozó cikkely a szárítási maradékra előírt mennyiséget 1,000 g porított drog 100-150°C-on 2 órán át tartó szárítást követően határoztatja meg. Az előírat alapján a szárítási vesztesége nem lehet több, mint a drog kiindulási tömegének 10,0%-a.

Mindkét vizsgált drog megfelelt a követelménynek (Herba **A** = 6,45%; Herba **B** = 7,23%).

4.1.4.3. ÖSSZES HAMU TARTALOM

A Ph.Hg.VIII. előirata szerint 1,00 g drog platinatégelyben tömegállandóságig történő izzítást (600 ± 25°C) követően a visszamaradt hamu mennyisége nem haladhatja meg a 13,0%-ot.
Mindkét drog hamutartalma az előírt határértéken belül volt: Herba **A** = 6,8%; Herba **B** = 6,2%.

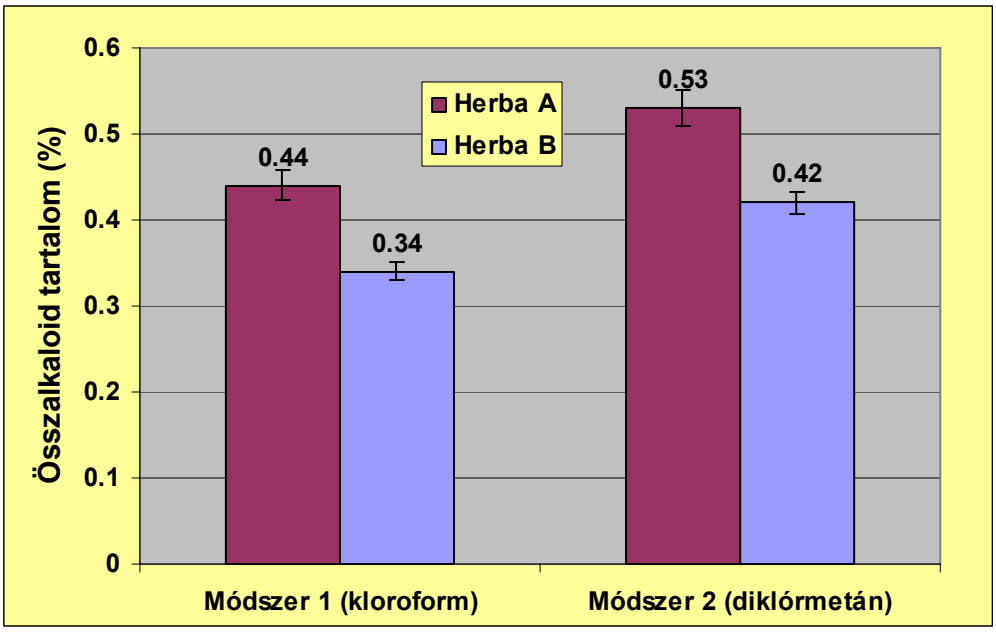
4.1.5. Tartalmi meghatározás

Az összalkaloid tartalom spektrofotometriás mérését a Német Gyógyszerkönyvben tették hivatalossá (Módszer 1), melyet a kivonószer módosításával (kloroform helyett diklórmetán) átvett az Európai Gyógyszerkönyv és a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv (Módszer 2). Gyógyszerkönyvi minőségű az a Chelidonii herba drog, melynek összes alkaloid tartalma légszáraz drogra vonatkoztatva, kelidoninban kifejezve legalább 0,6% (m/m).
A Ph.Hg.VIII. szerint meghatározott összalkaloid tartalom értékeket összehasonlítottuk a DAB 10 módszerével kapott eredményekkel.
A spektrofotometriás mérés analítikai hátterét az „Irodalmi áttekintés" fejezetben tárgyaltuk (5.ábra; 2.2.2.fejezet). Az összalkaloid tartalom mérések a 3.2.3.1. fejezetben leírtak szerint történtek. Az összalkaloid tartalom meghatározására alkalmas spektofotomertiás módszerek közötti eltérés a savas kivonást követő meglúgosított oldat szerves oldószerbe történő folyadék-folyadék extrakciójánál a szerves oldószer megválasztásában van (4.táblázat).
A saját begyűjtésből származó Chelidonii herba drogok különböző gyógyszerkönyvek (DAB 10 – Módszer 1; Ph.Hg.VIII.; Ph.Eur.5. – Módszer 2) alapján mért összalkaloid tartalom értékeit légszáraz drogra vonatkoztatva, kelidoninban kifejezve a 14.ábrán mutatjuk be.

4.táblázat Az összalkaloid tartalom meghatározására alkalmas módszerek szerves oldószer választása a fáziscseréhez

	Forrás	Szerves oldószer
Módszer 1	DAB 10	Kloroform
Módszer 2	Ph.Hg.VIII.; Ph.Eur.5.	Diklórmetán

A két begyűjtési helyről származó, teljes virágzás állapotában lévő herba drogok összalkaloid tartalom értékei alatta maradtak a gyógyszerkönyvi elvárásnak. A Német Gyógyszerkönyv (Módszer 1) előirata alapján alacsonyabb összalkaloid értékeket mértünk (Herba **A** = 0,44%, Herba **B** = 0,34%), mint a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv módszerével (Módszer 2) (Herba **A** = 0,53%, Herba **B** = 0,42%). A kloroform (Módszer 1) helyett diklórmetánnal végzett fáziscsere (Módszer 2) többször megismételt modellkísérleteinkben mindig 20-24%-kal magasabb alkaloid tartalom adatot eredményezett.



14.ábra A saját begyűjtésből származó Chelidonii herba drogok összalkaloid tartalom meghatározása (g/100g) a gyógyszerkönyvek spektrofotometriás módszerével (n =5)

A VIII. Magyar Gyógyszerkönyv (Ph.Hg.VIII.) előírásai alapján értékelve a Herba **A** és Herba **B** jelzéssel ellátott drog mintákról a következőket állapítottuk meg:
Az elvégzett mikro- és makromorfológiai, valamint vékonyréteg kromatográfiás vizsgálatok eredményeként mindkét drogot Chelidonii herba-ként azonosítottuk. A vonatkozó cikkely követelményeinek a drogok az összalkaloid tartalom kivételével megfeleltek, azonban egyik drog alkaloid tartalma sem érte el a Ph.Hg.VIII.-ban megkívánt értéket (Herba **A** = 0,53%; Herba **B** = 0,42%).

4.2. Összalkaloid tartalom meghatározás kritikai értékelése és a módszer módosítása

A Chelidonii herba jelentősen eltérő báziserősségű alkaloidjainak egyidejű jelenléte miatt részletesebben is megvizsgáltuk a fáziscserére alkalmazott szerves oldószer szerepét. A Herba **A** és **B** minták Ph.Hg.VIII. szerinti spektrofotometriás tartalmi mérésekor a diklórmetános extrakció után visszamaradt vizes fázist vékonyréteg-kromatográfiásan vizsgáltuk. A vizes fázissal nem elegyedő, de a diklórmetánnál polárosabb oldószerrel, n-butanollal extrahálva a herbák kivonatait a bepárlás után nyert maradékok jelentős alkaloid tartalmat jeleztek a réteglapon. Ezért a vizsgálatokat kvantitatív spektrofotometriás módszerrel is megvizsgáltuk. Eredményeinket az 5.táblázatban foglaltuk össze.

5.táblázat Az oldószerek összalkaloid tartalom kioldódására gyakorolt hatása (g/100g)

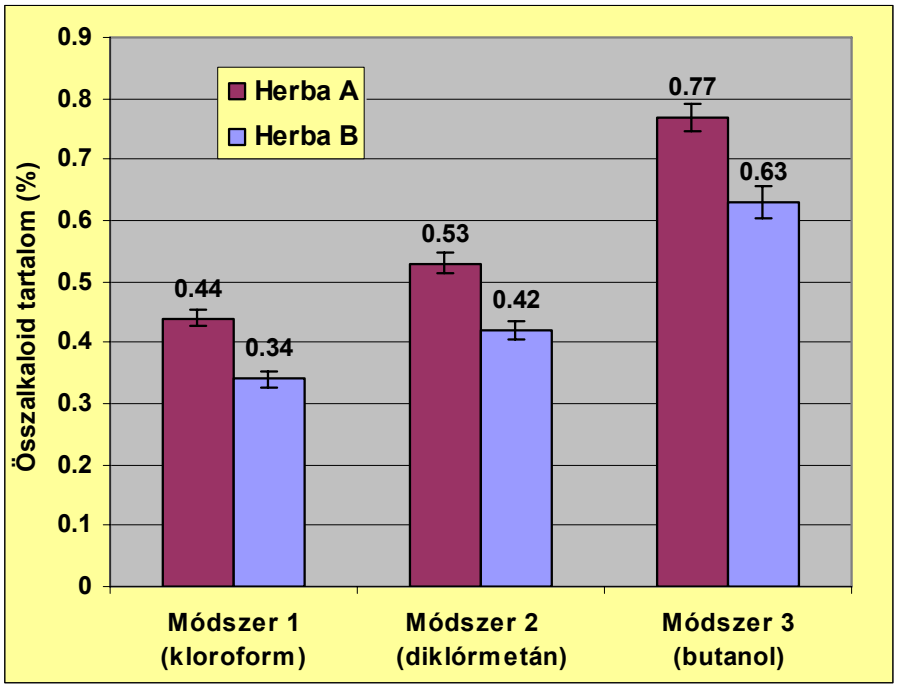
	Kelidoninban kifejezett összalkaloid tartralom (g/100g)	
Folyadék-folyadék extrakció	Herba **A**	Herba **B**
Diklórmetán	0,53 ± 0,03	0,42 ± 0,02
Diklórmetánt követően n-butanol	**0,28** ± 0,01	**0,25** ± 0,01
Összesen	0,81	0,67

± a szórás értékei, n = 5

A táblázatból jól látható, hogy a diklórmetánnal végzett folyadék-folyadék extrakció után még jelentős mennyiségű alkaloid volt a vizes fázisban, melyet n-butanollal történő fáziscserét követően spektrofotometriás módszerrel meghatároztunk (Herba **A** = 0,28%; Herba **B** = 0,25%; m/m).

Elvégeztük a Herba **A** ás **B** minta gyógyszerkönyvi összalkaloid tartalom mérését úgy, hogy a diklórmetánnal történő fáziscsere helyett közvetlenül n-butanollal extraháltuk a vizes kivonatot (Módszer 3) és összehasonlítottuk a Ph.Hg. VIII. (Módszer 2) és DAB 10 módszerével (Módszer 1) kapott értékekkel (15.ábra).

Az összalkaloid tartalom meghatározására használt különböző előiratokat értékelve megállapítottuk, hogy az általunk javasolt módszerrel (Módszer 3) kapjuk a legmagasabb alkaloid tartalom értékeket (Herba **A** = 0,77%; Herba **B** = 0,63%; m/m). A Német Gyógyszerkönyv módszerével (Módszer 1) a herbák alkaloid tartalmának mindössze 54-57%-át mértük az általunk javasolt meghatározás eredményéhez (Módszer 3) képest. A diklórmetán (Módszer 2) helyett n-butanollal végzett fáziscsere (Módszer 3) 45-50%-kal több alkaloid meghatározását tette lehetővé.



15.ábra A különböző módszerekkel meghatározott Chelidonii herba minták (Herba **A** és **B**) összalkaloid tartalom értékei (g/100g) kelidoninban kifejezve (n = 5)

A fenti megállapítások mélyebb megismeréséhez további méréseket végeztünk. Modellként a Herba **A** jelzésű mintát használtuk. HPLC módszer segítségével meghatároztuk a minta alkaloid összetételét diklórmetánnal (Módszer 2) és n-butanollal (Módszer 3) végzett fáziscsere után (6.táblázat).

6.táblázat A különböző oldószerek alkaloid komponensek kioldódására gyakorolt hatása (mg/100g)

	Protopin	**Kelidonin**	**Koptizin**	**Szangvinarin**	**Berberin**
Módszer 2 (Diklórmetán)	**46,7** ± 3,1	**31,6** ± 1,8	**251,9** ± 9,5	**62,6** ± 2,1	**12,7** ± 0,9
Módszer 3 (n-Butanol)	**58,4** ± 3,7	**45,8** ± 2,2	**432,2** ± 12,9	**88,5** ± 3,3	**16,8** ± 1,1

± a szórás értékei, n = 3

Az általunk javasolt n-butanolos fáziscserével (Módszer 3) mind az öt fő alkaloid esetében magasabb koncentrációkat mértünk. A legnagyobb eltérés a herba fő komponensénél, a koptizinnél figyelhető meg. A diklórmetános szerves fázisban a domináns alkaloid (koptizin) mindössze 58%-át mértük. A tercier alkaloid kelidonint és protopin előnyösebben, 70-80%-ban oldódott ki diklórmetánnal a n-butanolos extrakcióhoz képest.

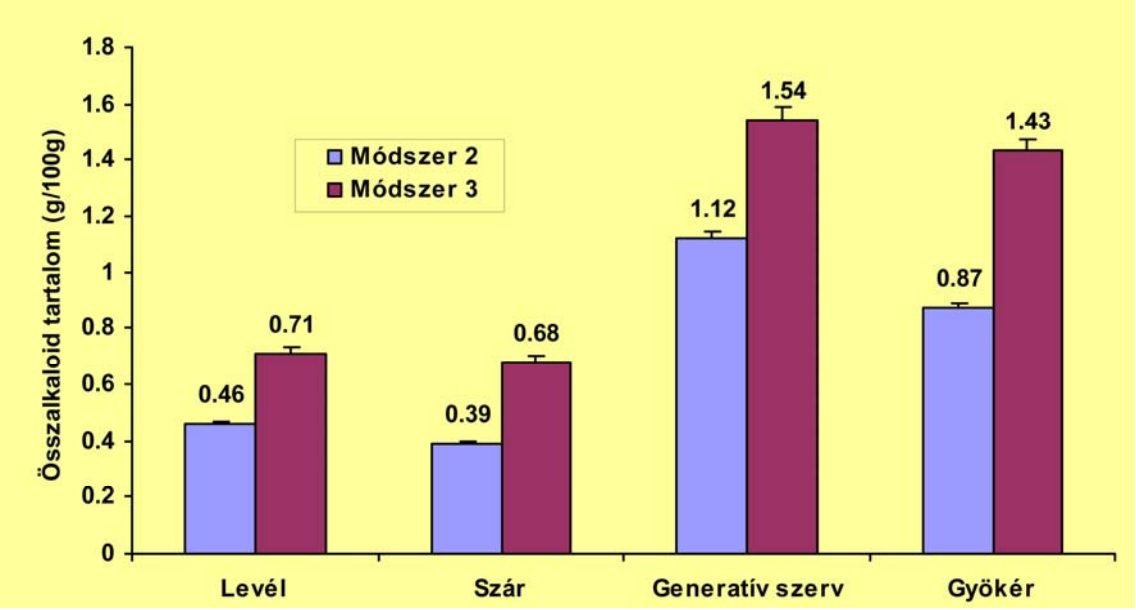
A Herba **A** ás **B** minták összalkaloid tartalom, illetve alkaloid komponensek megoszlás vizsgálatakor nyert eredményeinket összegezve megállapítjuk, hogy bár a Ph.Hg.VIII. / Ph.Eur.5. (Módszer 2) előirata alapján magasabb alkaloid tartalom értékek mérésére nyílt lehetőség, mint a DAB 10 módszerével (Módszer 1), még jelentős mennyiségű alkaloid marad megméretlenül a vizes fázisban. A pontosabb összalkaloid tartalom meghatározásra a folyadék-folyadék extrakcióhoz egy polárisabb szerves oldószer, a n-butanol használatát javasoljuk. A sperkrofotometriás módszerrel történő meghatározás során a fáziscseréhez a n-butanol használatát a kontrollként alkalmazott HPLC vizsgálatok alapján elsősorban a herbában legnagyobb mennyiségben előforduló alkaloid, a koptizin jobb kinyerése indokolja.

4.3. Növényrészek vizsgálata

A kereskedelemben kapható Chelidonii herba drog eltérő mennyiségben tartalmazhatja a levelet, szárat és generatív szerveket. A föld feletti részbe került gyökérdarabok, a szárítás, eltartás során lemorzsolódó levél miatt feldúsuló szárrészek a herba drog minőségét jelentősen megváltozhathatják. Ez nem közömbös a belőle előállított készítmények szempontjából sem. Az alkaloidok aránya jelentősen különbözhet a nyersanyagok függvényében (Schilcher 1995). Ebből következik, hogy gyógyszerészeti és terápiás minőség szempontjából fontos kérdés az alkaloid komponensek mennyiségi megoszlása az egyes drogokban, illetve az azt alkotó növényi szervekben. Ezért megvizsgáltuk a *Chelidonium majus* szerveinek összalkaloid tartalmát, illetve alkaloid összetételét.

4.3.1. Összalkaloid tartalom meghatározás a növényrészekben

Vizsgálatainkhoz a 2004. május elején Budapesten gyűjtött, majd szervekre bontott (levél, szár, generatív szerv és gyökér) vérehulló fecskefüvet használtuk. A generatív szerv megjelölés a generatív hajtástengellyel együtt a virágot, illetve a termést jelenti.
A szárított növényrészek összalkaloid tartalom meghatározását a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv (Módszer 2) és a korábban ismertetett módosított spektrofotometiás módszerrel (Módszer 3) végeztük. Eredményeinket a 16.ábrán foglaltuk össze.
A magasabb alkaloid tartalom értékeket minden szerv esetében az általunk ajánlott módszer (Módszer 3) használatával kaptuk, mely előiratban a fáziscseréhez használt oldószer a n-butanol volt.
A vizsgált növényminták alkaloid tartalmának szervenkénti megoszlását tanulmányozva megállapítottuk, hogy a legtöbb hatóanyagot a generatív szerv (1,54%) tartalmazta, melyet kis különbséggel a gyökér (1,43%) követett. A levélben (0,71%), illetve szárban (0,68%) meghatározott alkaloidok mennyisége messze elmaradt a generatív szervben mérttől.



16.ábra A *Chelidonium majus* L. növényrészeinek alkaloid tartalma (g/100g) (n = 5)

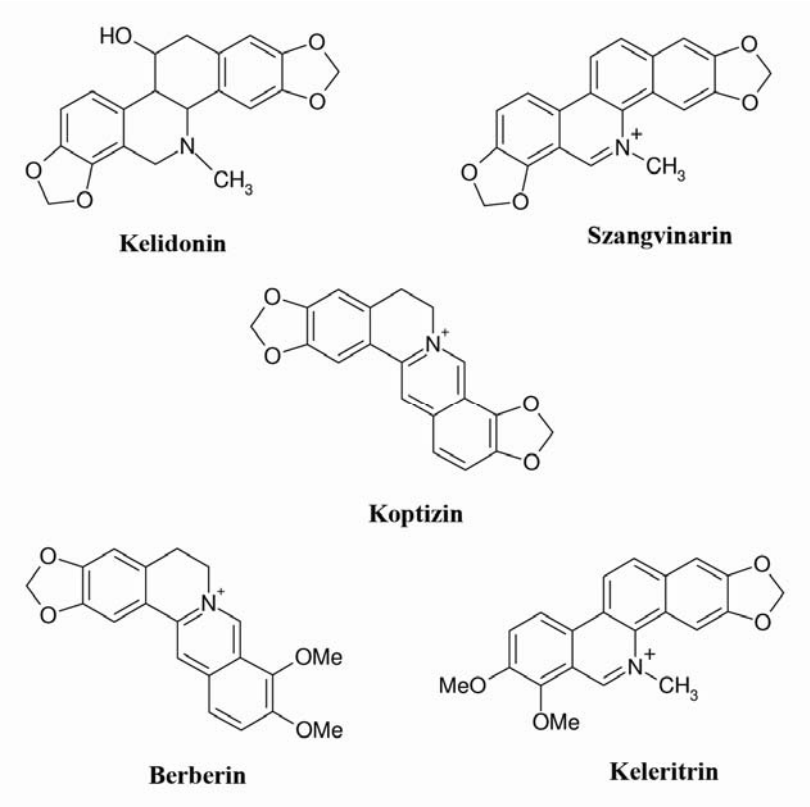
4.3.2. VRK-denzitometriás módszer kidolgozása az alkaloid összetétel meghatározására

A gyógyszerkönyvekben az összalkaloid tartalom meghatározására előírt spektrofotometriás mérés nem alkalmas az alkaloid összetétel meghatározására.

A természetes vegyületek vizsgálatára napjainkban a különböző kromatográfiás módszerek a legáltalánosabban használtak. A növényminták kvantitatív összetételének meghatározására nélkülözhetetlenné vált a gázkromatográfia és a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC). Széleskörű elterjedésükkel alkalmazásuk korlátai is felszínre kerültek és új módszerek alkalmazását, valamint növényi készítményekre történő optimalizálását tette szükségessé. Munkánk célkitűzései között szerepelt olyan hatékony, gyors és kielégítő pontosságú vizsgáló módszer kidolgozása, amely különböző fitotechnológiai eljárások hatékonyságának, valamint az elkészült növényi kivonatok minőségének ellenőrzésére alkalmazható.

A HPLC módszerek a nagy pontosság mellett idő és munkaigényesek, tehát nagyszámú minta sorozatvizsgálatára kevésbé alkalmasak. Ezért egy VRK-denzitometriás módszert fejlesztettünk ki a vérehulló fecskefű gyökér, levél, szár, generatív szervei fő alkaloid komponenseinek (kelidonin, keleritrin, szangvinarin, koptizin és berberin) mennyiségi

mérésére (17.ábra). Az eljárás egyszerű, gazdaságos és nagyszámú minta rutin meghatározására ad lehetőséget.



17.ábra A *Chelidonium* minták VRK-denzitometriás módszerrel meghatározott alkaloid komponensei

4.3.2.1. A DENZITOMETRIÁS MÉRÉST MEGELŐZŐ VÉKONYRÉTEG KROMATOGRÁFIÁS MÓDSZER KIKIDOLGOZÁSA

A denzitometriás vizsgálatok két jól elkülöníthető munkafázisra tagolódnak. Az első a VRK analízis, melyet az elkészített réteg műszeres mérése követ. Megbízható eredményekhez csak megfelelően elválasztott komponensek és jó minőségű vékonyréteg kromatogramok esetén juthatunk. Az utóbbi követelmények között tartjuk számon a lapok gyártási minőségén túl a kifejlesztés és esetleges előhívás utáni

homogén hátteret, stabil színeket, a mérendő foltok kellő intenzitását, valamint megfelelő R_f érték különbségeket.

A fent említett bizonytalansági tényezők mellett a VRK-denzitometria alkalmazásával számos előnyhöz is jutunk. Egyszerre több minta analízisére nyílik lehetőség, melyek legtöbbször minden előtisztítás nélkül a kivonatból közvetlenül felvihetők a rétegre. Ily módon nem csak a hatóanyag veszteség kerülhető el, de a vizsgálat is egyszerűbb, gyorsabb és olcsóbb lesz. További előny még, hogy a mérendő vegyületek bizonyos különleges tulajdonságai is kihasználhatóak, pl. fluoreszencia, mely igen nagy érzékenységet biztosíthat, ezáltal minor mennyiségek detektálását is lehetővé teszi (~ 1 ng).

A gyógyszerkönyvekben (DAB 10, Ph.Eur.5. és Ph.Hg.VIII.) előírt vékonyréteg kromatográfiával történő elválasztás (szilikagél rétegen, hangyasav : víz : n-propanol - 1 : 9 : 90 V/V/V kifejlesztő rendszerrel) alkalmas a *Chelidonium* alkaloidok kvalitatív vizsgálatára, azonban az alkaloid komponensek közeli $R_f \times 100$ értékei miatt a kvantitatív mérés denzitometriával nem végezhető el (pl. berberin $R_f \times 100 = 22$; keleritrin $R_f \times 100 = 23$). Az öt jellemző alkaloid komponens megfelelő elválasztására ezért új mozgófázist fejlesztettünk ki.

Az öt alkaloid denzitometriás mérés szempontjából is megfelelő elválasztására két rendszer adott megoldást. A koptizin és berberin alkaloid komponensek jó elválást mutattak a kloroform : metanol (60 : 30 V/V) mozgó fázis alkalmazásakor, azonban a másik három alkaloid a frontra futott. A kelidonin, kelerirtin és szangvinarin elválasztása nehezebb feladat volt, megoldására több kifejlesztő rendszert is alkalmaztunk (7.táblázat).

Az **A** rendszerben a kelidonin és szangvinarin alkaloid túl közeli R_f értékkel rendelkezett, közeli volt az R_f értéke a **B** kifejlesztő rendszerben a kelidonin és keleritrin alkaloidoknak is. A **C** mozgófázis alkalmazásánál az alkaloidok foltjai közel estek a fronthoz, és nem voltak kellően kompaktak denzitometriás méréshez.

Igy az alkalmazott **A-B-C-D** kifejlesztő rendszerekkel végzett kísérletek közül a **D** eluens (diklórmetán : metanol; 97 : 3 V/V) bizonyult az elválasztás hatásfoka alapján a legjobbnak (46.ábra). E rendszerben a berberin és koptizin alkaloidok foltja a starton maradt, a kelidonin, szangvinarin és keleritrin viszont kompakt, denzitometriás módszerrel jól mérhető foltokat eredményeztek.

7.táblázat Kifejlesztő rendszerek (V/V) kelidonin, keleritrin és szangvinarin alkaloidok elválasztására; a hatékonyság jellemzése R_f értékek alapján

	Mozgó fázis	$R_f \times 100$ kelidonin	$R_f \times 100$ keleritrin	$R_f \times 100$ szangvinarin
A	n-Propanol : víz (96 : 4)	74	49	76
B	Toluol : metanol (95 : 5)	46	48	77
C	Diklórmetán : metanol : hexán (85 :7,5 : 7,5)	80	76	91
D	Diklórmetán :metanol (97 : 3)	**48**	**24**	**68**

4.3.2.2. A DENZITOMETRIÁS VIZSGÁLAT OPTIMALIZÁLÁSA

Általánosságban elmondható, hogy a különböző hatóanyagok rutinszerű denzitometriás mérését minden esetben optimalizálásnak kell megelőznie. Ennek célja a megfelelő reprodukálhatóságot és pontosságot biztosító paraméterek kidolgozása.

A denzitometriás módszertani vizsgálataink a következő szempontok tanulmányozására terjedtek ki:

- optimális mérési hullámhossz
- színstabilitás
- kalibrációs görbék linearitása
- érzékenység
- reprodukálhatóság

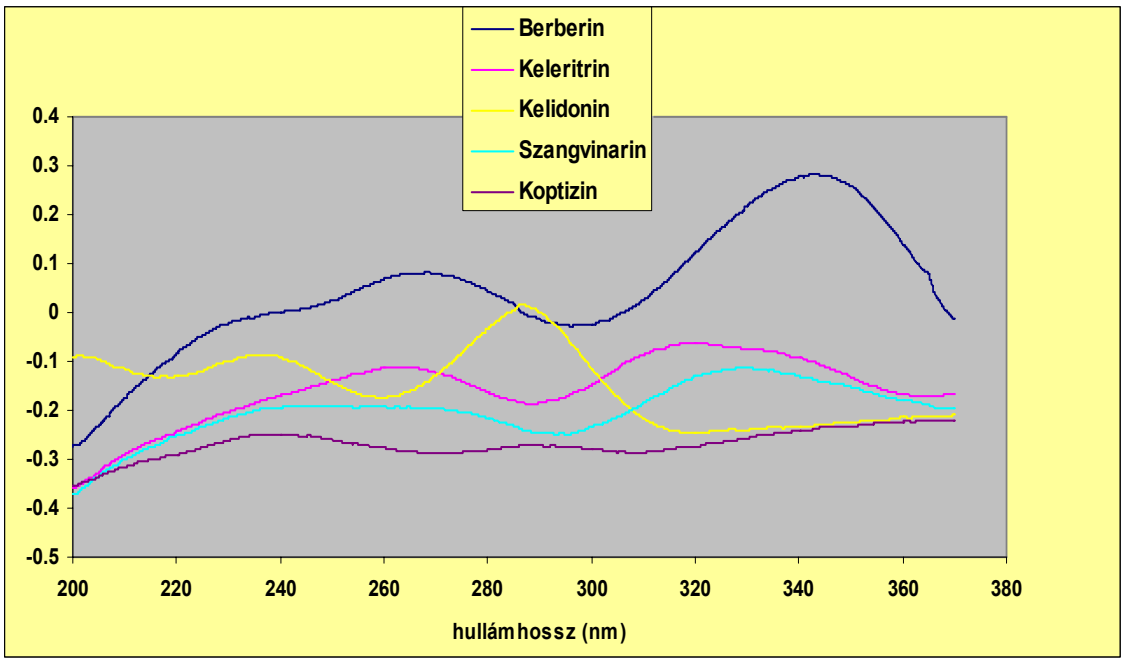
4.3.2.2.1. Mérési hullámhossz meghatározása

A mennyiségi meghatározásokat – figyelembe véve a *Chelidonium* alkaloidok UV-fényben tapasztalható fluoreszkáló tulajdonságát - fluoreszenciás üzemmódban volt célszerű végezni.

Az optimális gerjesztési hullámhossz megállapítása céljából, ismerve a mérendő alkaloidok UV-spektrumát (18.ábra), 280 nm és 370 nm közötti tartományban 5 nm-enként lemértük a tesztanyagok foltjait. E módszer segítségével meghatároztuk a legintenzívebb emissziót biztosító gerjesztési hullámhosszat.

A fluoreszcenciás méréseknél további feladatot jelentett a megfelelő szűrő kiválasztása. Fő szempontként azt kellett figyelembe venni, hogy a gerjesztő fény kiszűrése mellett az emittált fénynek minél nagyobb hányadát engedje át.

Tercier *Chelidonium* alkaloidok nem mutatnak jelentős fluoreszenciát: a kelidonin alkaloid abszorbancia reflexiós módban mért csúcs alatti területe magasabb volt a fluoreszenciás reflexiós módban mértnél. Ezért a kelidonin pontos mennyiségi meghatározására alkalmasabbnak látszott a reflexiós módban történő abszorbancia mérés.



18.ábra A vizsgált *Chelidonium* alkaloidok UV-spektruma

A *Chelidonium* alkaloidok VRK-denzitometriás mérésére kidolgozott vizsgálati körülményeket a 8.táblázatban foglaltuk össze.

8.táblázat A denzitometriás mérés paraméterei

	Mérési hullámhossz (nm)	Szűrő	Mérési mód	Szkennelés módja	Ablak méret (mm)
Koptizin	360	III.	fluoreszenciás	linear	0.4×5
Berberin	340	II.	fluoreszenciás	linear	0.4×5
Keleritrin	320	III.	fluoreszenciás	linear	0.4×10
Szangvinarin	330	III.	fluoreszenciás	linear	0.4×5
Kelidonin	286	~	abszorbanciás	zig-zag	0.4×0.4

4.3.2.2.2. Színstabilitási vizsgálat

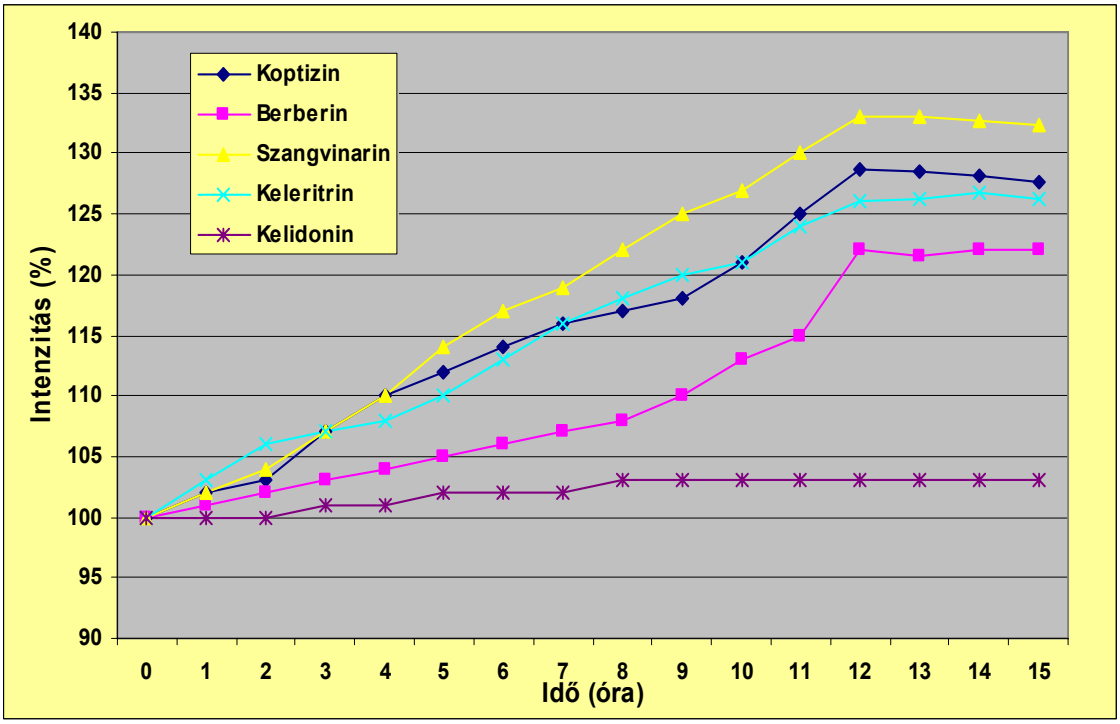
Színstabilitási vizsgálat során azt a rétegek műszerbe történő behelyezésétől számított időintervallumot kerestük, melynek során a foltok színintenzitása legfeljebb elhanyagolható mértékben változik. Ellenkező esetben a mérések reprodukálhatósága nem biztosított.

Ugyanannak a mintának a denzitometriás mérését a kifejlesztést követő 10 perc száradási idő letelte után (0. óra) 15 órán át óránként megismételtük. A mért intenzitás fluoreszencia értékek %-os változását az idő függvényében a 19.ábrán mutatjuk be.

Tapasztalataink szerint a kifejlesztés után a fluoreszenciás módban mérendő vegyületek foltjainál intenzitás növekedés lépett fel, ezzel mintegy tovább javítva a vizsgálat érzékenységét. Mivel a fenti jelenség a meghatározás szempontjából mindenképp előnyösnek tekinthető, várakozási időt iktattunk be a műszeres mérés megkezdése előtt.

A kifejlesztett rétegeket 12 óra sötétben tárolás után denzitometráltuk.

A reflexiós módban mért kelidonin esetében nem tapasztaltunk lényeges eltérést (100-103%) a különböző időpontokban történő denzitometriás mérések során (19.ábra), így a kelidonin alkaloid vékonyrétegre vitt foltjait is 12 óra sötétben tárolás után mértük VRK-denzitometriás módszerrel.



19.ábra A *Chelidonium* alkaloidok fluoreszencia intenzitás változása (%) az idő függvényében

4.2.2.2.3. A kalibrációs görbék felvétele

Az eltérő koncentrációjú tesztoldatokból (0,005 mg/ml koptizin- és szangvinarin-klorid tesztoldatokból, illetve 0,01 mg/ml berberin- és keleritrin-klorid tesztoldatokból, valamint 2 mg/ml kelidonin-klorid tesztoldatból egységesen 1 → 10 µl) két-két párhuzamos felvitel történt a réteglapokra.

A réteglapokra felvitt alkaloidok mennyisége és a mért területértékek lineáris kapcsolatát jól mutatták a 0,993 - 0,999 közé eső korrelációs koefficiens értékek (9.táblázat).

9.táblázat A kalibrációs egyenesek paraméterei a vizsgált alkaloidokra

Alkaloidok	Kalibrációs intervallum (ng)	Regressziós egyenes egyenlete [a]y = ax + b	Korrelációs koefficiens
Koptizin	5-50	y = 17,44x + 10.4	0,999
Berberin	10-100	y = 45,66x + 77	0,997
Keleritrin	10-100	y = 32x + 65,5	0,996
Szangvinarin	5-50	y = 35,34x + 60	0,997
Kelidonin	200-2000	y = 1,76x + 80,7	0,993

[a]y = terület, x = mennyiség (ng)

4.2.2.2.4. A legkisebb detektálható mennyiség megállapítása

A módszer érzékenységének eldöntésére a kalibrációs görbék felvételéhez elkészített mennyiségi sorok ugyancsak elegendő információt szolgáltatnak.

A legkisebb, denzitometriásan még detektálható anyagmennyiség értéke függ a detektálás módjától. A vizsgált alkaloidok fluoreszkáló sajátsága igen kis mennyiségek pontos és jól reprodukálható mérését is lehetővé teszi. Modellvizsgálataink szerint a koptizin és szangvinarin alkaloidok esetében az 1-1 ng, míg a keleritrin és berberin vegyületek esetében a 2-2 ng a legkisebb detektálható mennyiség. A reflexiós módban mért kelidonin alkaloid 100 ng mennyiségtől detektálható.

4.2.2.2.5. A mérések reprodukálhatósága

A VRK-denzitometriás meghatározás reprodukálhatóságának vizsgálatát a gyökér kivonatból már ismertetett módon készített réteg hatszor ismételt denzitometriás mérésével végeztük (10.táblázat). A jó reprodukálhatóságot a számított 0,67 – 1,24% közötti relatív standard deviációs értékek megfelelően bizonyították.

10.táblázat A VRK-denzitometriás meghatározás reprodukálhatóságának vizsgálata gyökér kivonatból

	Mennyiség (mg/100g)				
	Koptizin	Kelidonin	Keleritrin	Szangvinarin	Berberin
1	279	391	163	321	97
2	281	383	166	316	96
3	283	387	165	318	99
4	282	392	167	322	98
5	283	382	166	319	96
6	285	383	165	319	98
Átlag	282,2	386,3	165,3	319,2	97,3
RSD (%)	0,72	1,13	0,83	0,67	1,24

RSD – relatív standard deviáció

4.2.2.3. A VRK-DENZITOMETRIÁS MEGHATÁROZÁS ISMÉTELHETŐSÉG VIZSGÁLATA NÖVÉNY MINTÁN

A VRK-denzitometriás meghatározás ismételhetőségének vizsgálatát a gyökér kivonat alkaloid komponenseinek mérésével végeztük. A Chelidonii radix kivonat ötször ismételt kromatográfiás kifejlesztését követő mérés eredményeit a 11.táblázat mutatja be.

Az ismételhetőségi vizsgálatok relatív standard deviációs értékei (3,3 – 4,8%) a módszert alkalmassá teszik a *Chelidonium* minták fő alkaloid komponenseinek meghatározására.

11.táblázat A Chelidonii radix alkaloid komponensek VRK-denzitometriás mérés eredményeinek ismételhetőség vizsgálata

Ismétlések száma	Mennyiség (mg/100g)				
	Koptizin	Kelidonin	Keleritrin	Szangvinarin	Berberin
1	264	379	171	315	98
2	277	369	162	307	87
3	291	399	173	334	97
4	285	366	168	314	93
5	282	403	157	325	97
Átlag	279	383	166	319	94
RSD (%)	3,8	4,4	4,0	3,3	4,8

RSD – relatív standard deviáció

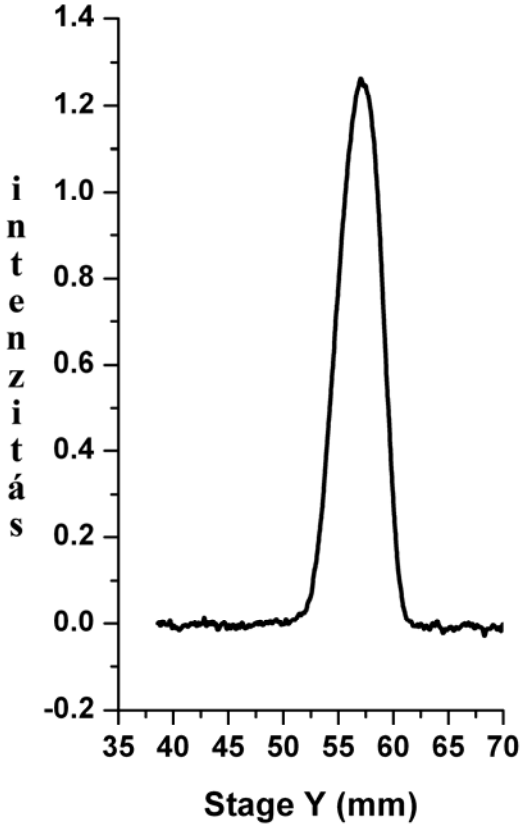
4.3.3. Alkaloid összetétel meghatározása VRK-denzitometriás módszerrel

A vérehulló fecskefű növényrészek alkaloid összetételének mérésére az általunk kifejlesztett és optimalizált VRK-denzitometriás eljárást alkalmaztuk. A meghatározáshoz a 2004. május 2-án, Budapesten (**A** minta) gyűjtést követően szervekre elkülönített mintákat használtuk.

A minta előkészítést a 3.2.2.4. fejezetben leírtak szerint végeztük, a folyadék-folyadék fáziscseréhez n-butanolt használva (Módszer 3). A vékonyréteg kromatogramok elkészítése a 3.2.3.2. fejezetben ismertetett módon történt.

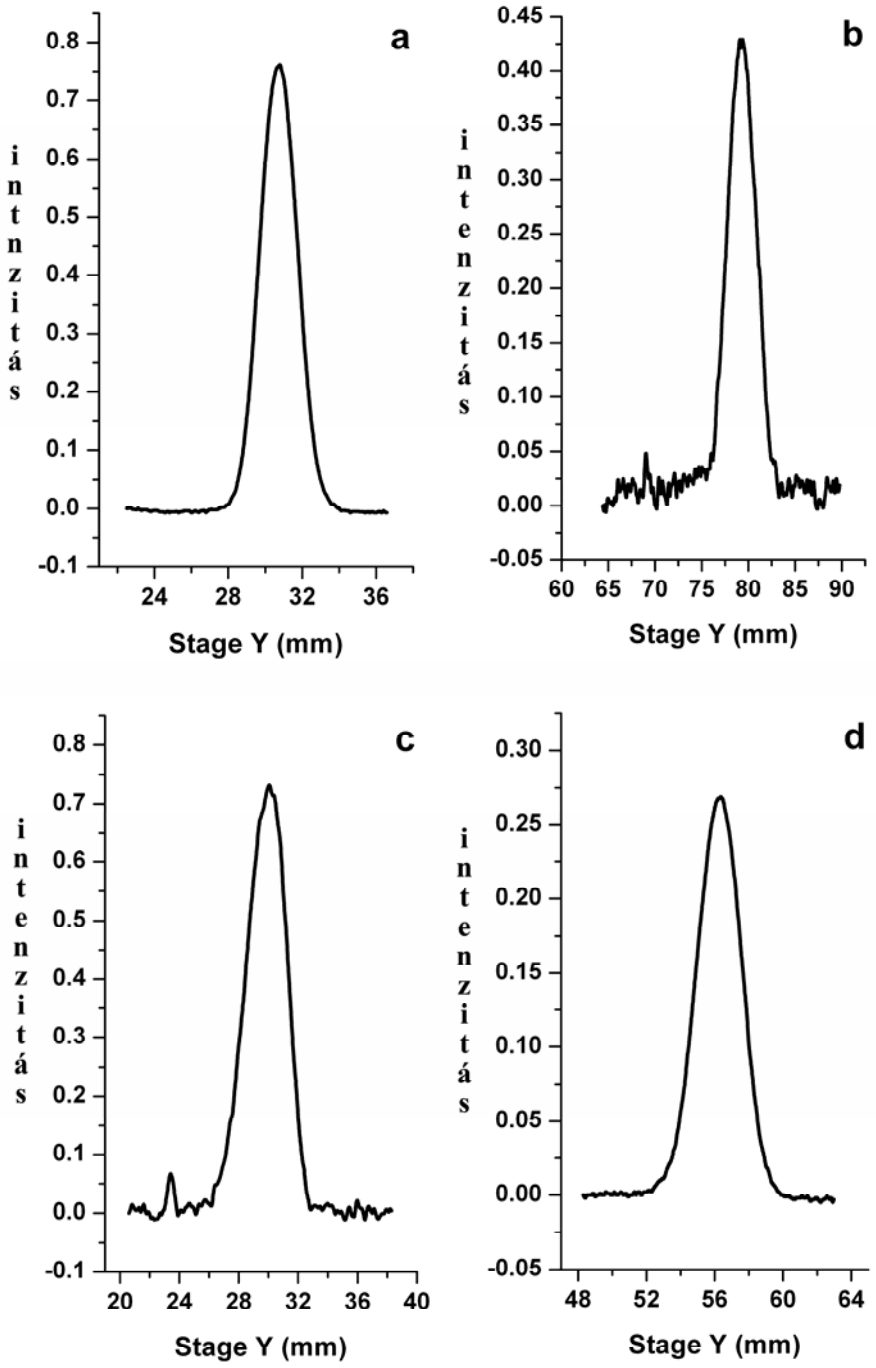
Az öt vizsgált *Chelidonium* alkaloid közül a kelidonin (tercier alkaloid) mennyiségi mérésére abszorbanciás reflexiós módot alkalmaztuk. A gyökér kivonat vékonyréteg-kromatográfiás kifejlesztését követően felvett kelidonin denzitogramját a 20.ábra mutatja be.

A kvaterner alkaloidok (koptizin, berberin, szangvinarin, keleritrin) meghatározása fluoreszcens reflexiós módban történt, a gyökér kivonatból felvett denzitogramjaikat a 21.ábra szemlélteti.



20.ábra Az abszorbanciás reflexiós módban (286 nm) mért kelidonin folt denzitogramja gyökér kivonatból [1,85 mg/ml; 2 µl]

Törekedtünk arra, hogy a kifejlesztett VRK-denzitometriás módszer alkalmazhatóságáról még biztosabb képet nyerjünk, ezért eredményeinket összevetettük a HPLC módszerrel meghatározott értékekkel. Eredményeinket a 12.táblázat összegzi.



21.ábra A fluoreszcens reflexiós módban mért (keleritrin: 320 nm, szangvinarin: 330 nm, koptizin: 360 nm, berberin: 340nm) alkaloidok denzitogramjai *Chelidonium* gyökér kivonatból (**a** – keleritrin [0,185 mg/ml; 2 µl], **b** – szangvinarin [0,037 mg/ml; 4 µl], **c** – koptizin [0,148 mg/ml; 2 µl], **d** – berberin [0,37 mg/ml; 2 µl])

12.táblázat A *Chelidonium majus* növényrészek alkaloid összetétele HPLC és VRK-denzitometriás módszerrel (mg/100g)

	Levél		Szár		Generatív szerv		Gyökér	
	HPLC	VRK-denzitometria	HPLC	VRK-denzitometria	HPLC	VRK-denzitometria	HPLC	VRK-denzitometria
Koptizin	**509,0** ± 18,5	**491,3** ± 21,1	**289,3** ± 11,2	**275,3** ± 11,6	**970,7** ± 33,4	**945,3** ± 37,6	**284,7** ± 11,2	**277,3** ± 12,0
Kelidonin	**17,7** ± 1,0	>k.h.	**78,2** ± 3,6	**85,5** ± 5,1	**45,8** ± 2,5	**51,4** ± 3,5	**376,3** ± 17,2	**385,7** ± 22,1
Keleritrin	n.d.	>k.h.	n.d.	**27,3** ± 2,0	n.d.	>k.h.	n.d.	**168,7** ± 9,0
Szangvinarin	**18,4** ± 0,8	**16,2** ± 1,1	**107,9** ± 4,1	**94,5** ± 5,1	**88,4** ± 3,2	**76,1** ± 4,4	**335,7** ± 11,4	**312,0** ± 15,1
Berberin	**25,4** ± 1,0	**21,3** ± 1,4	**20,3** ± 0,9	**17,4** ± 1,1	**61,3** ± 2,7	**51,9** ± 3,3	**101,7** ± 4,2	**90,7** ± 5,1

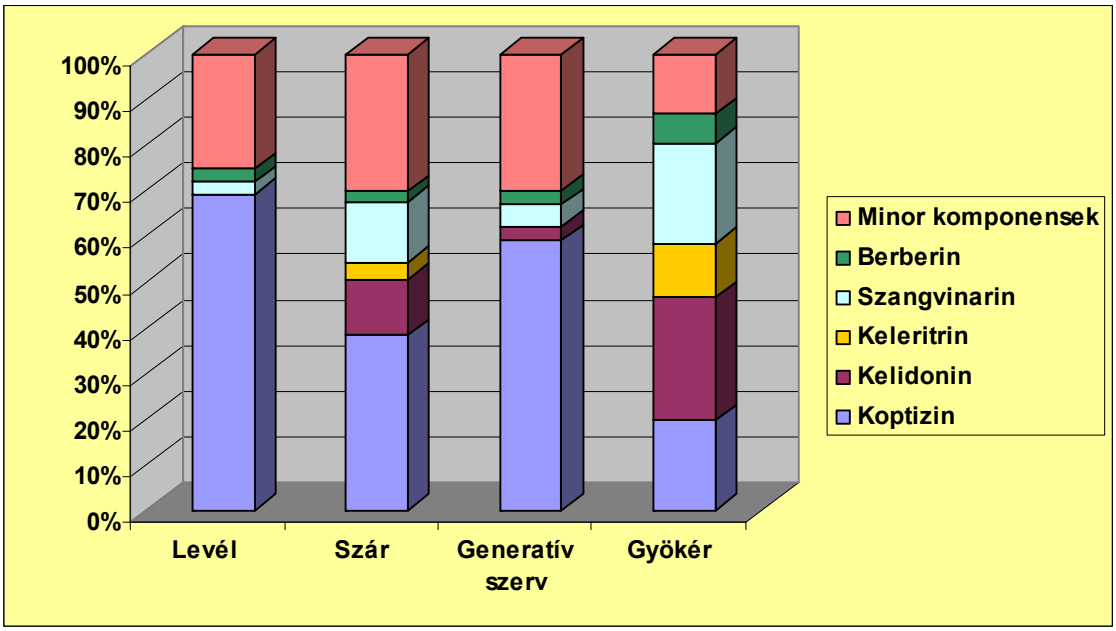
± a szórás értékei, n = 3; <k.h. = kimutatási határ alatt; n.d. = nem detektált

A két módszerrel is megerősített mérési eredmények alapján megállapítottuk, hogy a *Chelidonium majus* szervenkénti alkaloid összetétele szignfikánsan különbözik.

A föld feletti részek (levél, szár, generatív szerv) fő alkaloidja a koptizin. A levél és generatív szerv alkaloid összetételében a fő komponens koptizin mellett a többi alkaloid igen kis mennyiségben van jelen. A szárban mért koptizin koncentráció alacsonyabb, de jelentős komponensek a kelidonin és szangvinarin is.

A gyökérben a kelidonin található legnagyobb mennyiségben, ezt követi a szangvinarin és koptizin magas koncentrációja, de jelentős a föld alatti szerv keleritrin és berberin tartalma is.

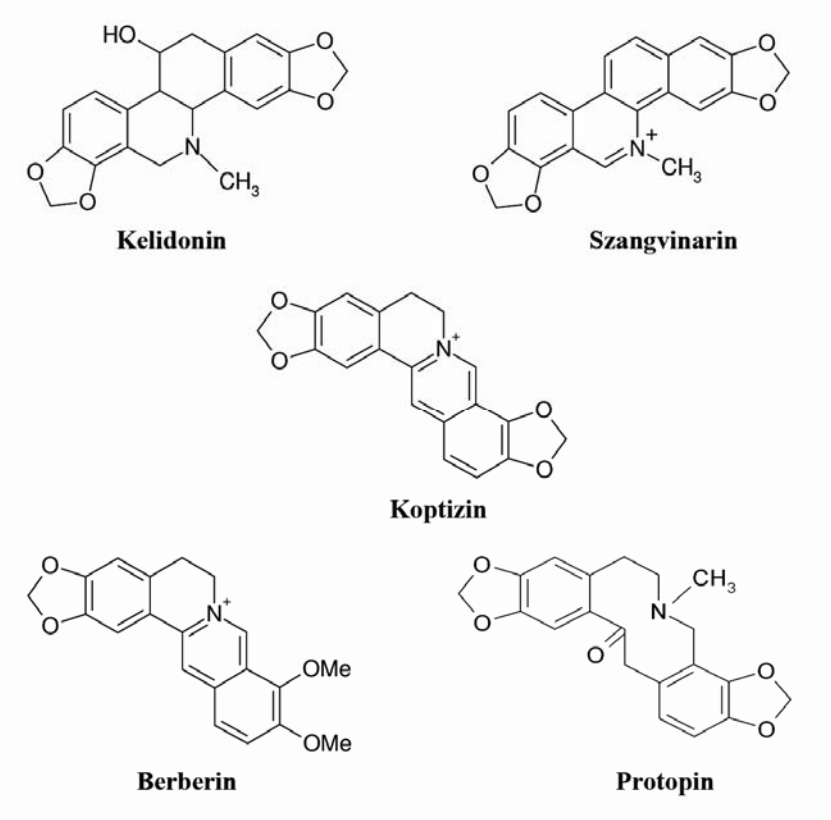
A növényrészek vizsgálata fejezetben (4.3.1.) meghatározott összalkaloid tartalom eredményeit is figyelembe véve a VRK-denzitometriás módszerrel mért *Chelidonium* alkaloid komponensek adatai alapján meghatározható a további (minor) alkaloid komponensek összmennyisége is az egyes szervekben (22.ábra).



22.ábra *Chelidonium* alkaloidok felhalmozódása a növény különböző szerveiben (VRK-denzitometriás és összalkaloid mérés alapján)

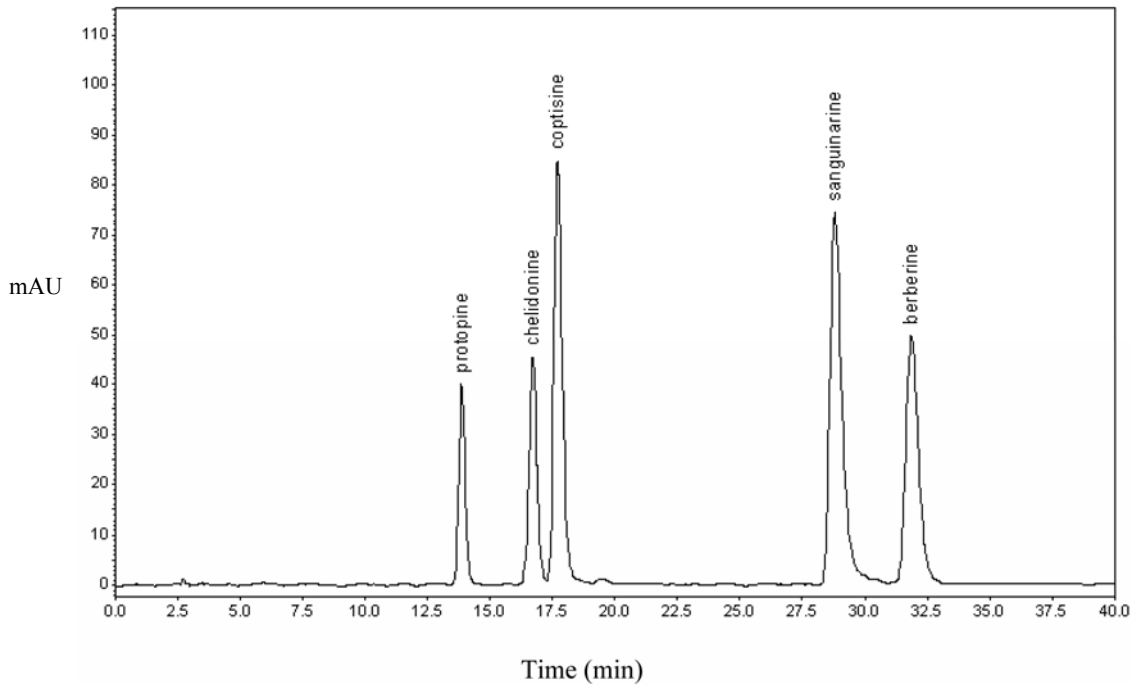
4.3.4. Alkaloid összetétel meghatározása HPLC módszerrel

A 3.2.3.4. fejezetben ismertetett izokratikus, fordított fázisú HPLC módszert alkalmaztuk az öt alkaloid komponens elválasztására és kvantitatív mérésére a vérehulló fecskefűből előállított kivonatokban (23.ábra).



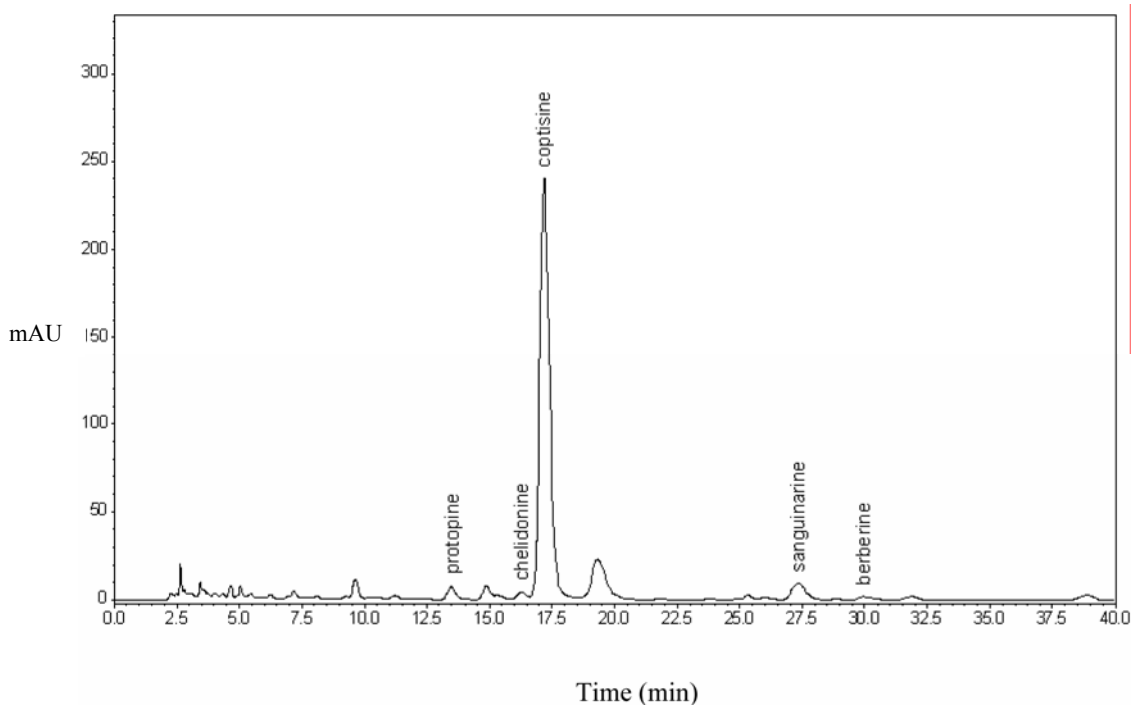
23.ábra A *Chelidonium* minták HPLC módszerrel meghatározott alkaloid komponensei

Mint már ott is kiemeltük, a módszer tercier (kelidonin, protopin)- és kvaterner (koptizin, berberin és szangvinarin)- alkaloidok egyidejű meghatározására is alkalmas (24.ábra). A VRK-denzitometriás módszerrel összevetve érdemes hangsúlyozni, hogy a *Chelidonium majus*-ban minor komponensként előforduló tercier alkaloid: protopin mérésére is alkalmas, ugyanakkor nem ad lehetőséget a VRK-denzitometriával meghatározható keleritrin feldúsulásának jellemzésére. Ilyen szempontból a két eljárás ki is egészíti egymást.

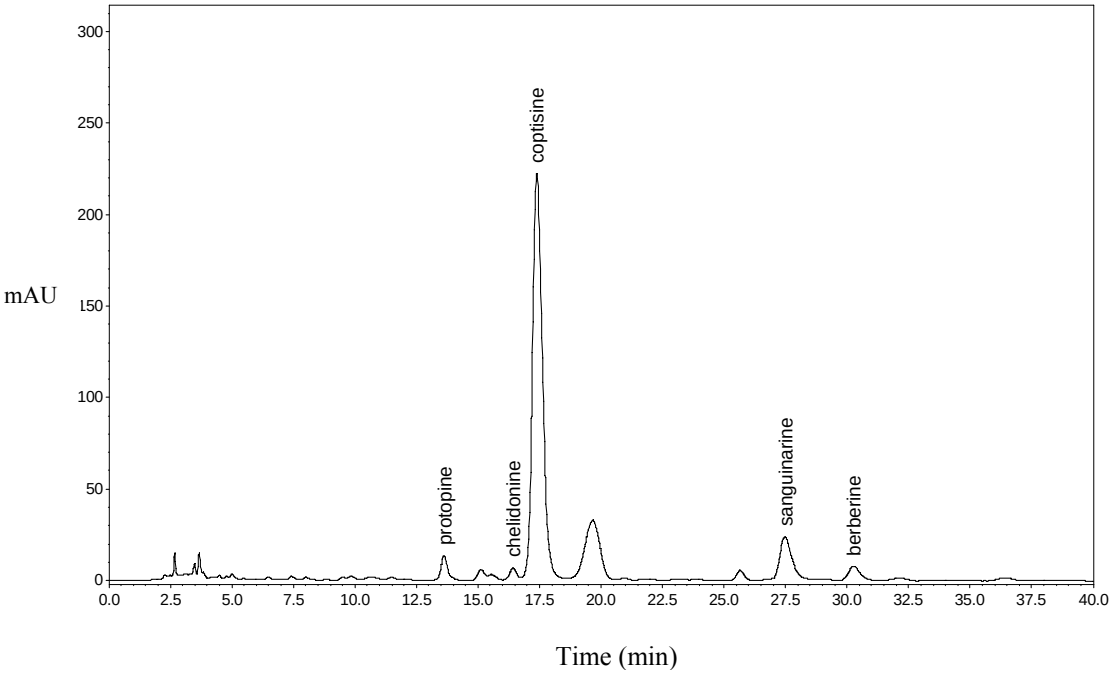


24.ábra *Chelidonium* alkaloidokat tartalmazó tesztoldat HPLC kromatogramja

A 25. és 26.ábrán bemutatott levél és generatív szerv kivonatok HPLC kromatogramjai jól mutatják, hogy a fő komponens koptizin mennyire domináns a mintákban (12.táblázat).

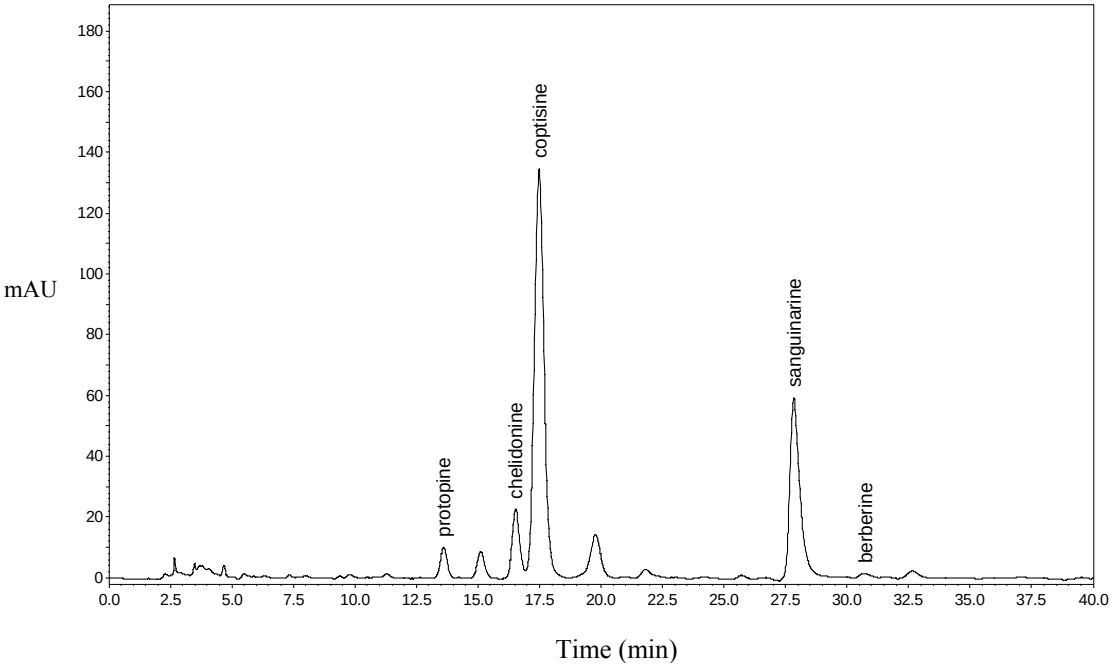


25.ábra *Chelidonium majus* levél kivonat HPLC kromatogramja

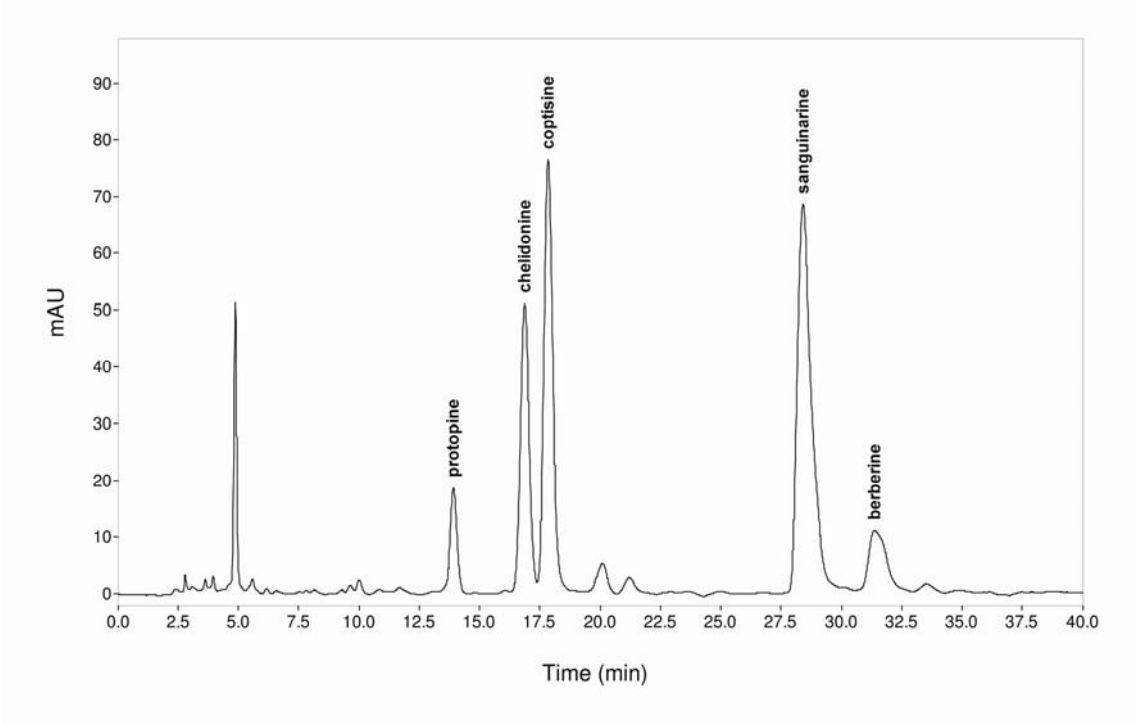


26.ábra *Chelidonium maju*s generatív szerv kivonat HPLC kromatogramja

A szárban mért koptizin mennyisége alacsonyabb, de jelentős a kelidonin és szangvinarin előfordulása is (12.táblázat; 27.ábra). A gyökérben egyenletesebb eloszlást mutatnak a különböző alkaloidok (12.táblázat; 28.ábra).

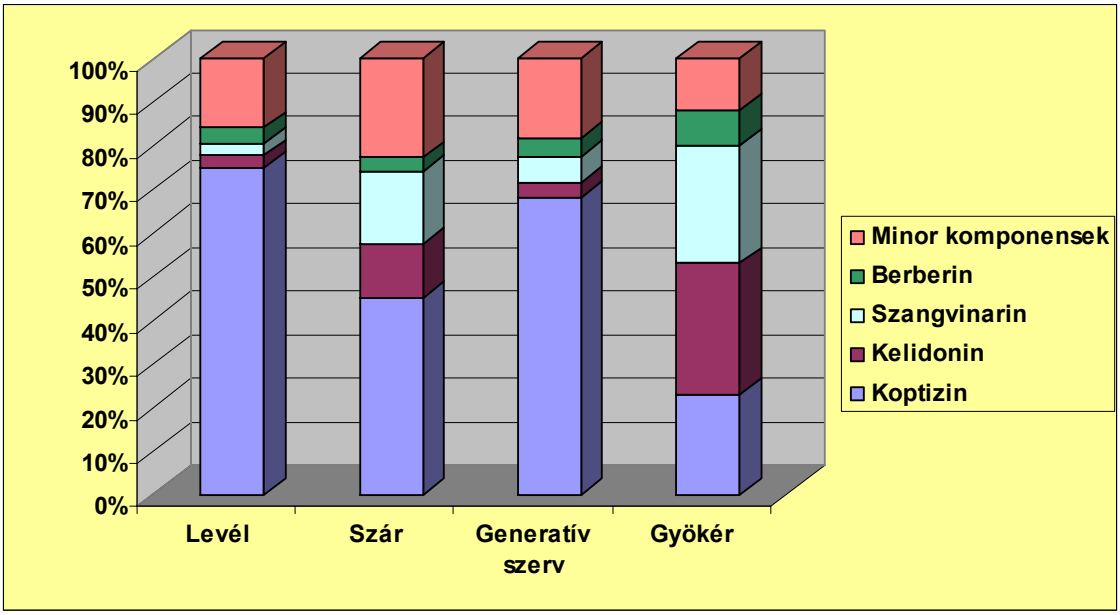


27.ábra *Chelidonium maju*s szár kivonat HPLC kromatogramja



28.ábra *Chelidonium maju*s gyökér kivonat HPLC kromatogramja

A növényrészek vizsgálata fejezetben (4.3.1.) mért összalkaloid tartalom meghatározás eredményeit összevetve az általunk HPLC módszerrel mért *Chelidonium* alkaloid komponensek adataival meghatározható a további (minor) alkaloid komponensek összmennyisége az egyes szervekben (29.ábra).



29.ábra *Chelidonium* alkaloidok felhalmozódása a növény különböző szerveiben (HPLC mérés és összalkaloid alapján)

4.3.5. VRK-denzitometriás és HPLC módszer összehasonlítása

A *Chelidonium majus* gyökér, levél, szár, generatív szervek alkaloid összetétel meghatározását mind az előzőek szerint kidolgozott VRK-denzitometriás, mind HPLC módszerrel elvégeztük. Az eredmények jó egyezést mutattak a két módszer összehasonlításakor (13.táblázat).

A VRK-denzitometriás módszerrel mért tercier kelidonin alkaloid mennyisége magasabb a HPLC méréssel meghatározott értékeknél (103-110%). A kvaterner alkaloidok (koptizin, keleritrin, szangvinarin, berberin) esetében a HPLC módszer alkalmazásával mértük a nagyobb értékeket (12. és 13.táblázat).

A két módszerrel mért koptizin értékei mutatták a legkisebb eltérést. A pontosabb HPLC méréshez viszonyítva a VRK-denzitometriás meghatározással 95-97%-osan sikerült a koptizin mennyiségének meghatározása. Tekintve, hogy a föld feletti szervekben fő alkaloid komponensről, a gyökérben pedig jelentős arányban előforduló alkaloidról van szó, a kidolgozott VRK-dentitometriás módszer alkalmazhatósága vitathatatlan a kivonatok rutin analízisében.

A szangvinarin mennyiségi meghatározásánál a VRK-dentitometriás módszer 86-94%-os, míg a berberin esetében 84-89%- pontossággal mérhető denzitometriásan a HPLC módszerrel meghatározott eredményeket 100%-nak tekintve.

A két módszer összehasonlítása során a gyökér eredményei mutatják a legjobb egyezést (koptizin: 97%; kelidonin: 103%; szangvinarin: 93%; berberin: 89%), melyet a nagyobb alkaloid tartalom pontosabb meghatározhatóságával magyarázunk.

Összegezve eredményeinket megállapíthatjuk, hogy az általunk kidolgozott VRK-denzitometriás módszer nagyszámú növényminta rutin mérésére gyorsan, olcsón, megfelelő érzékenységgel, jó reprodukálhatósággal és kielégítő pontossággal alkalmazható.

13.táblázat A *Chelidonium majus* növényrészek HPLC és VRK-denzitometriás módszerrel meghatározott alkaloid összetételének összehasonlítása (%)*

	Levél		Szár		Generatív szerv		Gyökér	
	HPLC/VRK-denzitometria (mg/100g)	Összeha-sonlítás (%)	HPLC/VRK-denzitometria (mg/100g)	Összeha-sonlítás (%)	HPLC/VRK-denzitometria (mg/100g)	Összeha-sonlítás (%)	HPLC/VRK-denzitometria (mg/100g)	Összeha-sonlítás (%)
Koptizin	509 / 491	**96**	289 /275	**95**	970 / 945	**97**	285 / 277	**97**
Kelidonin	18 / <k.h.	**-**	78 /85	**109**	46 /51	**110**	376 / 386	**103**
Szangvinarin	18 / 16	**89**	108 /95	**88**	88 / 76	**86**	336 / 312	**93**
Berberin	25 / 21	**84**	20 / 17	**85**	61 / 52	**85**	102 / 91	**89**

<k.h. = kimutatási határ alatt

* HPLC módszer eredményei: 100%

4.4. Chelidonium alkaloidok tradicionális gyógyszerformákba való kioldódásának vizsgálata

Ahhoz, hogy a hatóanyagok a szervezet számára hasznosíthatóak legyenek, a kivonási eljárással fel kell szabadulniuk a növényi sejtből. A kivonás lényegében diffúziós folyamat, amely során az aprított és szárított drogból oldószer alkalmazásával kivonjuk a ható- és kísérőanyagokat.

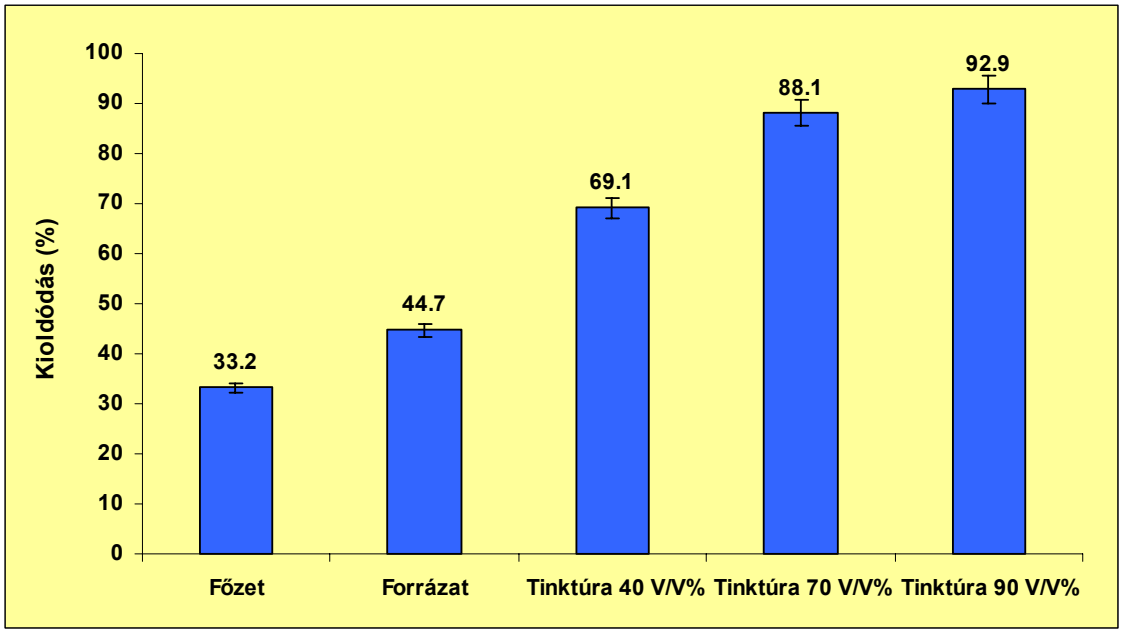
A nyers drog feldolgozásával általában arra törekszünk, hogy a megfelelő technológiával előállított termék hatóanyag tartalma magasabb, összetétele optimális, míg a kísérő anyagok (általában csekély terápiás hatással rendelkező komponensek) előfordulása alacsonyabb legyen, mint a kiindulási mintában.

A népgyógyászatban leggyakrabban alkalmazott gyógynövény kivonat a tea, melyet főzet vagy forrázat készítéssel állítanak elő. Egyszerű, házilag is kivitelezhető kivonatkészítési eljárásnak tekintjük még a különböző etanol-tartalmú tinktúrák készítését. Vizes (főzet és forrázat) és alkoholos (40 V/V% 70 V/V% és 90 V/V% etanollal készült tinktúra) kivonatok (tradicionális gyógyszerformák; 3.2.2.1. fejezet) alkaloid kioldódás vizsgálatának tanulmányozásával adatokat kívántunk szolgáltatni a gyógyszerészeti és terápiás minőség szempontjából egyaránt jelentős alkaloid összetételre. Méréseinket spektrofotometriás (összalkaloid tartalom meghatározás) és HPLC (alkaloid összetétel meghatározás) módszerekkel végeztük.

4.4.1. Alkaloidok kioldódásának vizsgálata spektrofotometriás összalkaloid tartalom meghatározással

A Nagymaroson gyűjtött Chelidonii herba drog (Herba **B** minta) (3.1.1. fejezet) a Ph.Hg.VIII.-ban hivatalos összalkaloid tartalom meghatározással 4,2 mg/g, kelidoninban kifejezett alkaloid tartalmú (0,42%; m/m). Az összalkaloid tartalom különböző technológiával készült kivonatokba történő kioldódását a 30.ábra foglalja össze.

A mérési eredények azt mutatják, hogy a kivonatok minőségét (más paraméterek változatlansága mellett) főként a kivonószer tulajdonsága, a hőmérséklet és a kivonás időtartama befolyásolta.



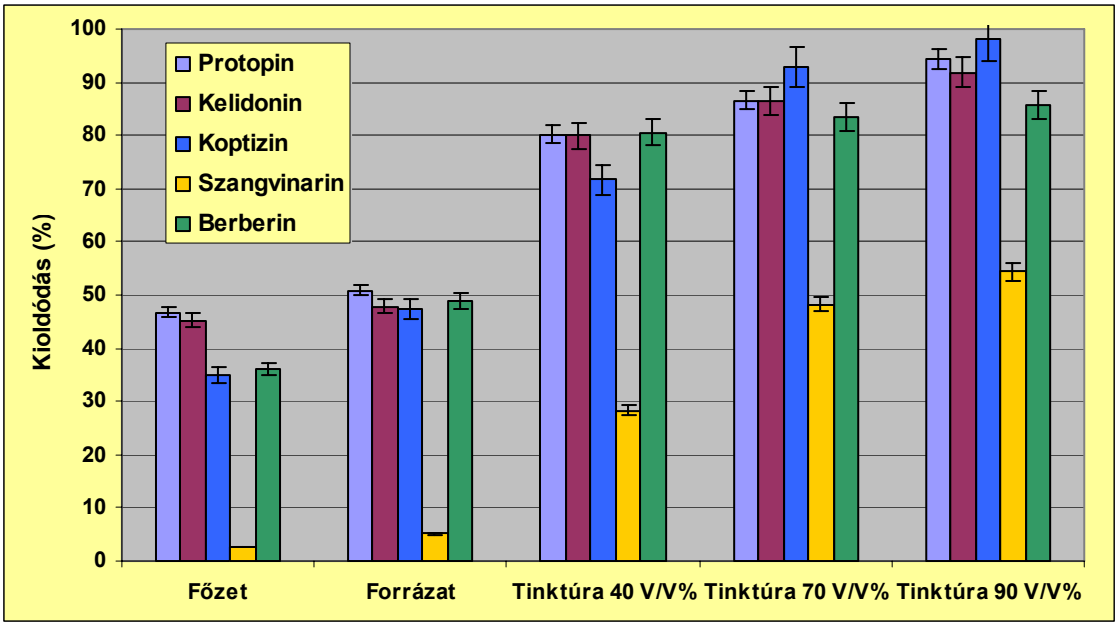
30.ábra Alkaloidok kioldódása (%) a Chelidonii herba különböző technológiával készült kivonataiban (spektrofotometriás mérés alapján) (n = 5) [100% = herba összalkaloid tartalma]

A kivonatkészítési eljárástól függően jelentősen eltérő alkaloid tartalom értékeket kaptunk (0,14 – 0,39%; m/m). A legmagasabb alkaloid tartalmú készítmény a 90 V/V% alkohollal előállított tinktúra volt (0,39 g/100g). Az alkaloidok kioldódása a különböző gyógyszerformákba 33,2% (főzet) és 92,9% (90 V/V% alkohol tartalmú tinktúra) között változott. A tinktúrák kioldódási értékei alátámasztják a *Chelidonium* alkaloidok jó oldékonyságát szemipoláros oldószerekben (69,1 – 92,9%).

A vizes gyógyszerformák közül a forrázat alkaloid tartalma (0,19 g/100g) bizonyult magasabbnak. Ebben az esetben minden bizonnyal a kivonatkészítés időtartama a legfőbb befolyásoló tényező, hiszen a főzet készítésének mindössze 5-7 percével (az elegy felmelegítésének időtartamát is beleszámolva), a forrázatkészítés 30 perce áll szemben. Bár a főzet esetében magasabb hőfokon történt a kivonás (100°C), a forrázat készítése során a forró elegy szobahőmérsékletre történő lehűlése jóval hosszabb időt vett igénybe, mint a forrásban tartás 5 perce, tehát hosszabb diffúziós idővel számolhattunk. Az aprítás során sérült növényi sejtekből szabad-, az ép sejtekből gátolt diffúzióval történik a kioldódás. Hosszabb időtartamú kivonatkészítési eljárással elérhetjük a diffúziós egyensúly állapotát, mely magasabb hatóanyag tartalmú készítményt eredményez.

4.4.2. Alkaloidok kioldódásának vizsgálata HPLC módszerrel

Elvégeztük a Chelidonii herba drog valamint a drogból tradicionális fitotechnológiai módszerekkel készült kivonatok alkaloid összetételének vizsgálatát HPLC módszerrel. Az extrakció és mintaelőkészítés az „Anyag és Módszer" fejezetben (3.2.2.3. és 3.2.3.4.) leírtak szerint történt. Az eredményeket a 13.táblázat foglalja össze. A herba és tradicionális kivonatai HPLC ujjlenyomatait a 31/a és 31/b.ábra, az egyes alkaloidok kioldódás jellemzőit (%) a 32.ábra mutatja be.

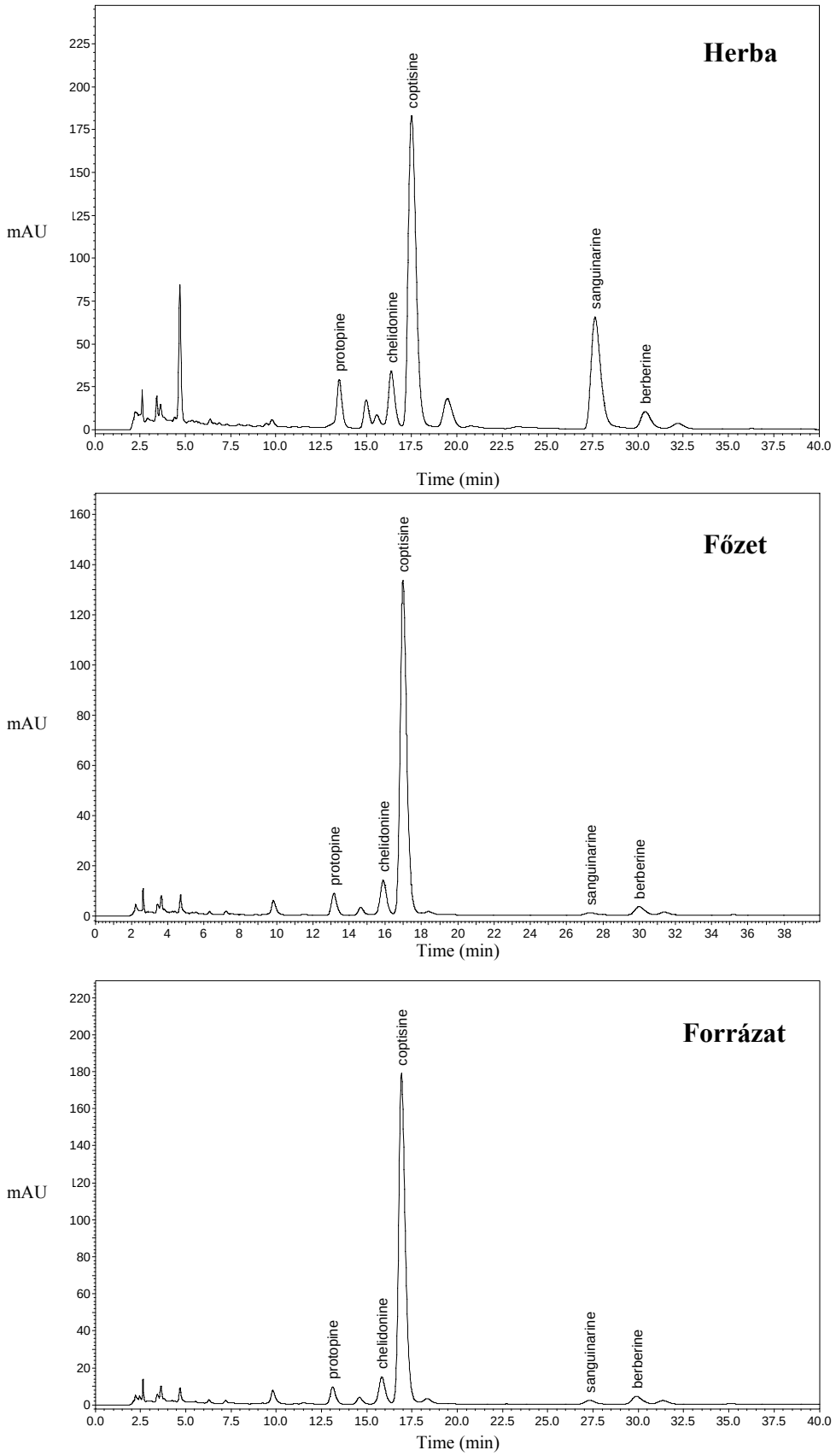


32.ábra Alkaloidok kioldódása (%) a Chelidonii herba különböző technológiával készült kivonataiban (HPLC mérés alapján) (n = 3) [100% = herba alkaloid komponensei]

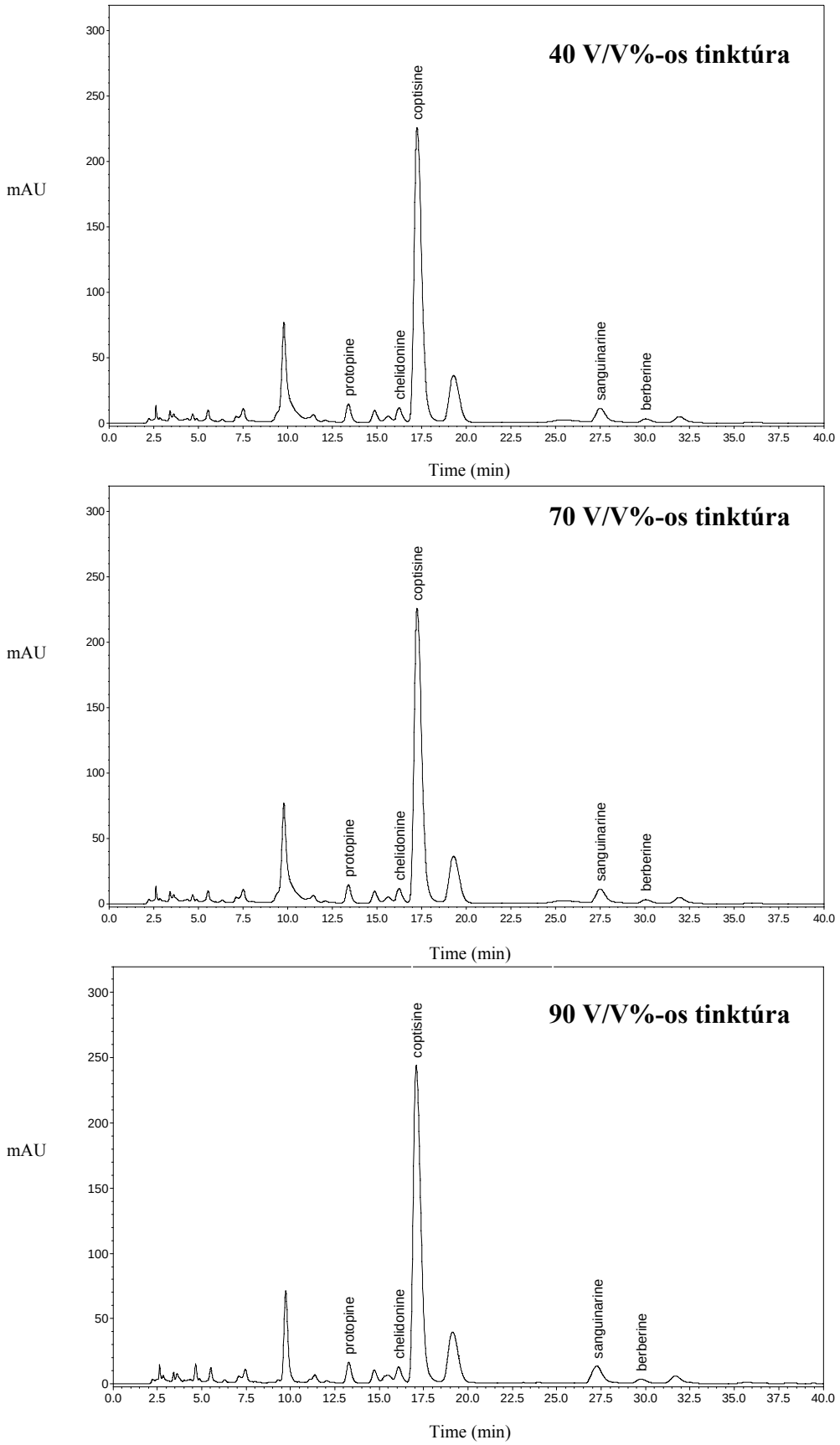
A minták fő komponenseként a koptizint azonosítottuk, melyet a vizes és alkoholos kivonatok eltérő mennyiségben tartalmaztak (126,5 – 354,1 mg/100g). A kioldódás értékek ismeretében megállapíthatjuk, hogy legnagyobb mennyiségben a 90V/V% alkohollal készült tinktúrába oldódott ki a koptizin (98%). Jó kioldódást mutatnak a tinktúrák esetében a tercier kelidonin (79,9 – 91,9%) és protopin alkaloidok (80,2 – 94,2%), valamint a kvaterner berberin is (80,5 – 85,7%). A szangvinarint azonban a 90V/V%-os tinktúra is csak 54,4%-ban oldotta ki. 37%-kal jobb kiodódást mutat a

koptizin a 90V/V%-os alkohollal készült, mint a 40V/V%-os alkohollal előállított tinktúrába. Kétszer annyi szangvinarin oldódott ki a 90V/V% alkoholtartalmú tinktúrába, mint a 40V/V% alkohollal készültbe.
A vizes kivonatok (főzet és forrázat) kevesebb alkaloidot oldanak ki, mint a tinktúrák. A vizes gyógyszerformák közül a forrázat készítés mind az öt általunk tanulmányozott alkaloid komponens tekintetében jobb kivonatkészítési eljárásnak bizonyult. A kelidonin (főzet: 45,3%; forrázat: 47,9%) és protopin (főzet: 46,7%; forrázat: 50,9%) alkaloidok vizes kivonatokba történő kiolódásértékei kisebb eltérést mutatnak, tehát a kivonási idő és alkalmazott hőmérséklet kevésbé befolyásolja a kioldódásukat, mint a kvaterner koptizin (főzet: 35,0%; forrázat: 47,5%) és berberin (főzet: 36,1%; forrázat: 48,8%) esetében. A szangvinarin kioldódás vizes kivonatokba meglepően alacsony értéket mutat (főzet: 2,7%; forrázat: 5,1%).

Összességében megállapítottuk, hogy a tintúrákba történő kioldódást a kioldandó vegyület szerkezete mellett főként az oldószer molekuláris sajátságai befolyásolták. Az egyes alkaloidok kioldódása vizes gyógyszerformákba a növényi sejtben uralkodó viszonyoktól nagymértékben függ. Esetünkben a hosszabb kioldódási idő (forrázat) jobb kinyerést tett lehetővé, mint a magasabb hőmérséklet alkalmazása (főzet).
A kvaterner alkaloidok (ionos állapot) esetében a vizes kivonatokban mért kioldódás értékek elmaradtak az általunk várt értékekhez képest, melyet a nagy hidrofób molekulaszerkezetükkel magyarázhatunk.
A szangvinarin vizes kivonatban mért drasztikusan alacsony kioldódás értékeire (főzet: 2,7%; forrázat: 5,1%) magyarázatot adhat az irodalomból ismert semleges pH-n kialakuló pszeudobázis (karbinolamin) forma, mely szerkezet a koptizin és berberin alkaloidok esetében csak magasabb pH viszonyok mellett alakul ki (Haberlein és Tschiersch 1994, Nakanishi és mtsai 1999).



31/a.ábra A Chelidonii herba és kivonatainak HPLC kromatogramja



31/b.ábra A Chelidonii herba és kivonatainak HPLC kromatogramja

14.táblázat A Chelidonii herba és a drogból készült kivonatok alkaloid összetétele mg/100g koncentrációban (kiolódása %-ban)

	Herba	**Főzet**	**Forrázat**	**Tinktúra 40 V/V%**	**Tinktúra 70 V/V%**	**Tinktúra 90 V/V%**
Protopin	**43,4** ± 1,9	**20,3** ± 0,7 **(46,7%)**	**22,1** ± 1,4 **(50,9%)**	**34,8** ± 2,5 **(80,2%)**	**37,6** ± 1,6 **(86,6%)**	**40,9** ± 1,7 **(94,2%)**
Kelidonin	**30,9** ± 0,9	**14,0** ± 0,6 **(45,3%)**	**14,8** ± 0,7 **(47,9%)**	**24,7** ± 1,6 **(79,9%)**	**26,7** ± 0,8 **(86,4%)**	**28,4** ± 2,5 **(91,9%)**
Koptizin	**361,3** ± 8,4	**126,5** ± 8,7 **(35,0%)**	**171,6** ± 9,9 **(47,5%)**	**259,2** ± 18,6 **(71,7%)**	**335,4** ± 10,7 **(92,8%)**	**354,1** ± 18,2 **(98,0%)**
Szangvinarin	**41,0** ± 1,6	**1,1** ± 0,1 **(2,7%)**	**2,1** ± 0,2 **(5,1%)**	**11,6** ± 0,7 **(28,3%)**	**19,8** ± 1,5 **(48,3%)**	**22,3** ± 0,8 **(54,4%)**
Berberin	**13,3** ± 0,7	**4,8** ± 0,2 **(36,1%)**	**6,5** ± 0,3 **(48,8%)**	**10,7** ± 0,5 **(80,5%)**	**11,1** ± 0,5 **(83,5%)**	**11,4** ± 0,6 **(85,7%)**
Összesen	**489,9** ± 19,0	**166,7** ± 11,3	**217,1** ± 14,1	**341,0** ± 23,2	**431,2** ± 27,4	**457,1** ± 23,1

± a szórás értékei, n = 3

4.5. A Chelidonium drogok és a tradicionális kivonatok ásványelem tartartalmának vizsgálata

A szakirodalom tanulmányozásakor megállapítottuk, hogy egyedül Tölgyesi (1969) közöl adatokat a vérehulló fecskefű ásványelem tartalmáról (kolorimetriás módszerrel). Mivel antibakteriális hatásvizsgálatainknál felvetődött a növényben található makro- és mikroelemek hatást módosító szerepének lehetősége, ezért célkitűzéseink közé soroltuk a *Chelidonium* drogok, illetve a herbából a tradicionális gyógyszerkészítés szabályai szerint előállított vizes (főzet, forrázat) és alkoholos (tinktúrák) kivonatok ásványi elemtartalmának korszerű módszerrel való feltárását.

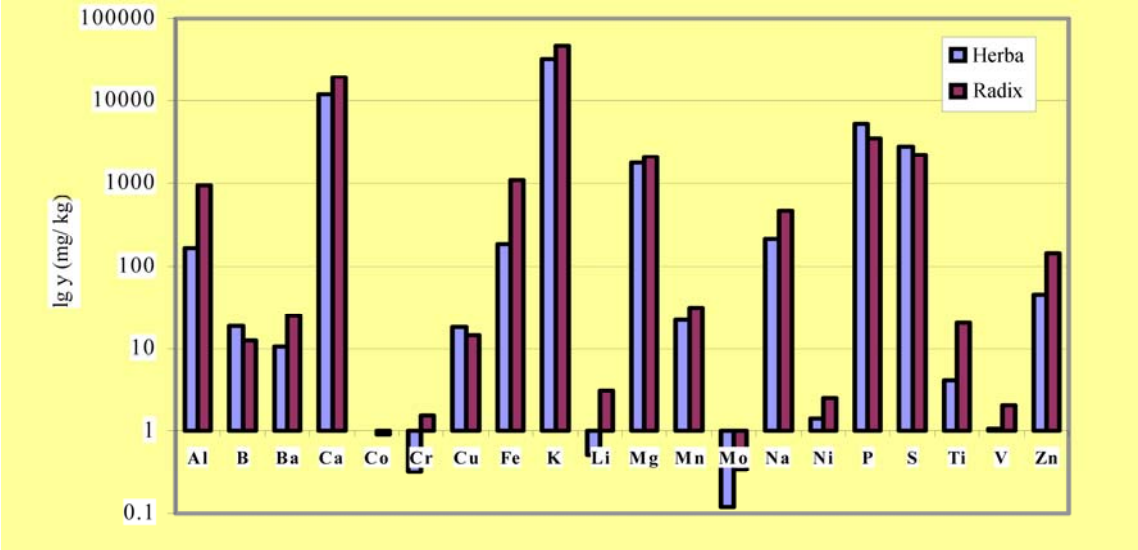
A vizsgálatainkat a 2004. április 30-án Nagymaroson gyűjtött Chelidonii herba (**B** minta) és radix drogmintákból induktíven csatolt plazma emissziós spektrofotometriás (ICP-OES) módszerrel végeztük. Méréseink a következő 24 elemre terjedtek ki: Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Ti, V, Zn.

4.5.1. A Chelidonii herba és radix ásványelem tartalmának vizsgálata

A *Chelidonium* drogok (herba és radix) elemtartalma más gyógynövényekhez hasonlóan rendkívül összetett. A drogok és a herbából készült kivonatok ezirányú értékelését irodalmi adatok alapján az ásványi elemek növényvilágban előforduló átlagos mennyiségeinek (Szentmihályi és mtsai 1999a, Szentmihályi és mtsai 1999b, Szentmihályi és Then 2000, Máday és mtsai 2000, Lemberkovics és mtsai 2002), valamint a US Recommended Dietary Allowances (RDA 1989) által meghatározott emberi szervezet számára szükséges napi mennyiségek, illetve ugyanezen forrás az egyes táplálékokkal külön-külön történő ásványi elemfelvételre vonatkozó ajánlásai alapján végeztük el.

A *Chelidonium* drogok ásványelem tartalom meghatározásának mérési eredményeit a 15.táblázatban foglaltuk össze, valamint a könnyebb áttekinthetőség kedvéért a 33.ábrán is bemutatjuk.

Mérési adataink nagyságrendileg jó egyezést mutattak az irodalomban a fecskefűről közölt adatokkal (Tölgyesi 1969), és összhangban vannak más szerzők egyéb növényekben mért értékeivel (Mengel 1976, Guil-Guerrero 1998, Kataba-Pendias és mtsai 2000, Then és mtsai 2000). A toxikus elemek (arzén, kadmium, higany és ólom) koncentrációja egyik drog esetében sem érte el a detektálható szintet, valamint a herba esetében a kobalt mennyisége is a kimutatási határ alatt volt.



33.ábra Ásványi elemek felhalmozódása a Chelidonii herba és radix drogokban

A két drogot összehasonlítva jól látható, hogy a gyökérben négy elem (bárium, réz, foszfor és kén) kivételével magasabb az ásványelem tartalom. Jelentős koncentrációt ér el a gyökérben az alumínium, kálcium, vas, kálium, foszfor és kén, ugyanakkor a legmagasabb foszfor (5383 mg/kg) és kén (2850mg/kg) tartalmat a herbában határoztuk meg. Az alumínium (964,7 mg/kg), vas (1088 mg/kg) és lítium (3,17 mg/kg) koncentráció a gyökérben hatszor magasabb a herbáénál (165,4 mg/kg, 188 mg/kg, 0,52 mg/kg).

Mind a herba (45,5 mg/kg), mind a gyökér (141,2 mg/kg) magas cink tartalommal rendelkezik más növényekkel összehasonlítva (Szentmihályi és Then 2000), és ennek szerepe lehet a növény gyulladásgátló és sebgyógyulást elősegítő hatásában. A Chelidonii herba (18,12 mg/kg) és radix (14,34 mg/kg) réz felhalmozódása jelentős más drogok ICP módszerrel mért réztartalmával összehasonlítva (Cichorii herba: 8,8 mg/kg;

Equiseti herba: 8,74 mg/kg; Myrtilii folium: 5,48 mg/kg; Chamomillae herba: 3,45 mg/kg és Chamomillae radix: 6,91 mg/kg). (Szentmihályi és Then 2000, Máday és mtsai 2000, Lemberkovics és mtsai 2002) A növényvilágban ritkán előforduló lítium előfordulása *Chelidonium* drogokban különös figyelmet érdemel. A gyökérben mérhető magas alumínium, króm, vas és titán mennyiség a talaj szennyezettségére utal.

15.táblázat A Chelidonii herba és radix drogminták elemtartalma (mg/kg)

	Herba	Radix
Al	**165,4** ± 11,3	**964,7** ± 15,4
B	**18,7** ± 2,25	**12,39** ± 0,26
Ba	**10,4** ± 0,41	**24,95** ± 0,37
Ca	**11871** ±111	**19240** ± 1407
Co	<k.h.	**0,92** ± 0,02
Cr	**0,32** ± 0,02	**1,53** ± 0,54
Cu	**18,12** ±0,65	**14,34** ± 0,56
Fe	**188** ±3,2	**1088** ± 69
K	**33054** ± 610	**46733** ± 570
Li	**0,5**2 ± 0,16	**3,17** ± 0,64
Mg	**1785** ± 17	**2148** ± 39
Mn	**22,4** ± 0,78	**31,02** ± 0,65
Mo	**0.12** ± 0,02	**0,33** ± 0,05
Na	**214,5** ± 5,42	**484,3** ± 16,2
Ni	**1,42** ± 0,08	**2,51** ± 0,25
P	**5383** ± 77	**3609** ± 72
S	**2850** ± 43	**2265** ± 55
Ti	**4,13** ± 0,48	**20,24** ± 7,6
V	**1,05** ± 0,17	**2,07** ± 0,51
Zn	**45,5** ± 2,7	**141,2**± 7,55

± a szórás értékei, n = 3; <k.h. = kimutatási határ alatt

4.5.2. Ásványi elemek kioldódásának vizsgálata a Chelidonii herbából készült tradicionális gyógyszerformákba

A legáltalánosabban alkalmazott kivonási módszer a teakészítés, melynek során nemcsak a szerves hatóanyagok, hanem a szervetlen anyagok jelentős része is a vizes oldatba kerül. Emésztés (epefolyás) elősegítésére, görccsel járó gyomorpanaszokra régóta alkalmazzák a növényből készített teákat. Számos gyógyszerkönyvben és monográfiában is találunk Chelidonii herba-t tartalmazó teakeveréket (pl. FoNo VII. 2003).

Fontos leszögezni, hogy a *Chelidonium* készítményeket erős hatású alkaloidjaik terápiás hatásáért, nem élelmi értékükért fogyasztják. A drogokhoz képest a kivonatokban az ásványelemek mindig alacsonyabb koncentrációban vannak jelen. Ez a megállapítás vizsgálataink szerint igaz a Chelidonii herbából előállított tradicionális készítményekre is (16.táblázat).

A szignifikancia vizsgálatot (ANOVA teszt) elvégezve az öt különböző kivonat esetében minden elem koncentrációja szignifikáns eltérést ($p < 0,05$) mutatott. Magasabb szignifikancia szinten ($p < 0,001$) a kivonatokban mért ásványelem koncentrációk három elem kivételével – réz ($P = 0,0132$), mangán ($P = 0,0286$), nátrium ($P = 0,0194$) - megfeleltek az elvárásnak.

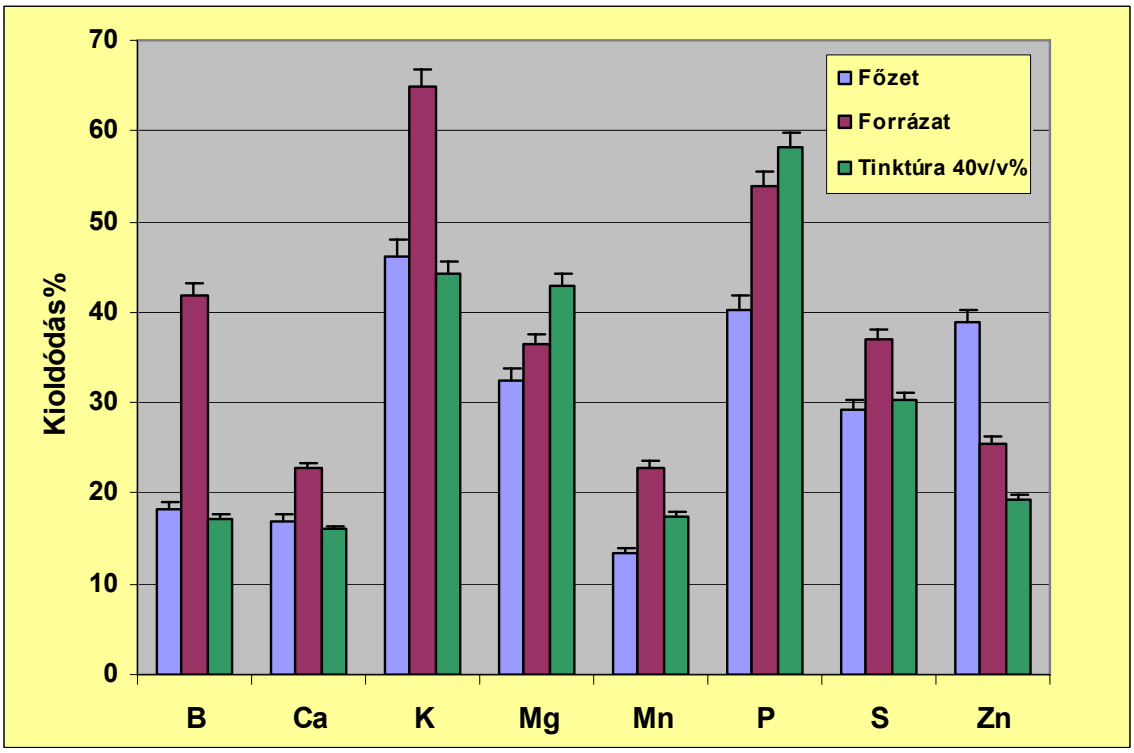
A várakozásnak megfelelően a vizes kivonatok ásványelem tartalma általában meghaladta az alkoholos kivonatokban mérhető mennyiségeket. Legnagyobb koncentrációban az elemeket a forrázat tartalmazta. A vas (0,175 mg/l) és a cink (0,41 mg/l) legnagyobb mennyiségben a főzetben volt, míg a legtöbb magnéziumot (19,2 mg/l), foszfort (78,3 mg/l) és titánt (0,006 mg/l) a 40 V/V% alkohollal készült tinktúrában mértük.

A vizsgálatok alapján a 90 V/V% alkoholtartalmú tinktúra minősült az ásványi elemek legrosszabb forrásának. A 70 V/V% és 90 V/V% alkohollal készült tinktúrákban egyik elem sem volt jelentős koncentrációban mérhető.

Igen kedvező, hogy a Chelidonii herbából készített teákban és tinktúrákban egyetlen toxikusnak nevezett elem (arzén, kadmium, higany és ólom) sem volt kimutatható. A mikroelemek közül a króm, lítium, molibdén, nikkel és vanádium koncentrációja nem érte el a detektálható mennyiséget.

Kiváncsiak voltunk arra is, hogy a mért elemtartalmak milyen mértékben dúsulnak fel a *Chelidonium* drogokból előállított készítményekben (teák és tinktúrák). Eredményeinket a 17.táblázat foglalja össze.

A vizes kivonatok kioldódás értékei 10% – 65% között változtak, míg a tinktúrák esetében 1,3% - 58,1% közötti kioldódás értékeket mértünk. A legjobban kioldódó formában a kálium (35,7% - 64,9%), valamint a foszfor (29% - 58,1%) van jelen. A kálium legjobban a forrázatba (64,9%), míg a foszfor a 40 V/V% alkoholtartalmú tinktúrába (58,1%) oldódik ki. A magas kioldódási értékű elemekre vonatkozó adatokat a 34.ábra mutatja be. Az alumínium, réz, vas, nátrium és titán elemek vízben rosszul oldódó vegyületek formájában vannak jelen (10% alatti kioldódás); 20-40% közötti a magnézium, kén és cink kioldódása. A 90 V/V% alkohollal készült tinktúrába oldódott ki legkevésbé a vas, de jelenléte minden kivonatban alacsony volt (1,8% - 3,7%). Az alkoholos kivonatokban rosszul kioldódó elem még a réz (3,35 – 4,6%) a nátrium (4,3% - 5,8%) és a titán (2,9% - 5,8%). Általánosan megállapíthatjuk, hogy növekvő alkohol koncentrációval csökken az ásványelemek kioldódása a tinktúrákba.



34.ábra Ásványelemek kioldódása a Chelidonii herbából a tradicionális kivonatokba (%) (n = 3)

16.táblázat A különböző technológiával készült Chelidonii herba kivonatok ásványelem tartalma (mg/l)

	Főzet	Forrázat	Tinktúra 40 v/v%	Tinktúra 70 v/v%	Tinktúra 90 v/v%
Al	**0,32**±0,07	**0,45**±0,05	**0,30**±0,06	**0,22**±0,05	**0,19**±0,04
B	**0,085**±0,005	**0,195**±0,011	**0,080**±0,013	**0,075**±0,008	**0,069**±0,007
Ba	**0,023**±0,002	**0,038**±0,007	**0,025**±0,006	**0,016**±0,002	**0,011**±0,003
Ca	**50,3**±2,5	**67,4**±3,6	**47,5**±4,1	**42,7** ±4,2	**38,4**±3,7
Co	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.
Cr	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.
Cu	**0,025**±0,007	**0,035**±0,008	**0,021**±0,007	**0,018**±0,001	**0,015**±0,006
Fe	**0,175**±0,025	**0,120**±0,014	**0,102**±0,021	**0,085**±0,002	**0,061**±0,007
K	**382**±25,2	**537**±21,4	**365**±14,8	**327**±31,1	**295**±22,4
Li	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.
Mg	**14,7**±0,8	**16,3**±1,7	**19,2**±2,2	**12,5**±0,6	**10,8**±0,7
Mn	**0,075**±0,015	**0,125**±0,014	**0,098**±0,034	**0,075**±0,023	**0,065**±0,023
Mo	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.
Na	**0,35**±0,08	**0,47**±0,13	**0,31**±0,09	**0,25**±0,02	**0,23**±0,06
Ni	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.
P	**54,2**±2,11	**72,4**±1,17	**78,3**±2,47	**45,0**±3,24	**39,1**±3,8
S	**20,8**±0,15	**26,4**±0,85	**21,6**±0,41	**18,7**±0,42	**16,3**±0,34
Ti	**0,002**±0,0001	**0,003**±0,0004	**0,006**±0,0007	**0,003**±0,0008	<k.h.
V	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.
Zn	**0,41**±0,04	**0,29**±0,13	**0,22**±0,05	**0,17**±0,015	**0,13** ±0,05

± a szórás értékei, n = 3; <k.h. = kimutatási határ alatt

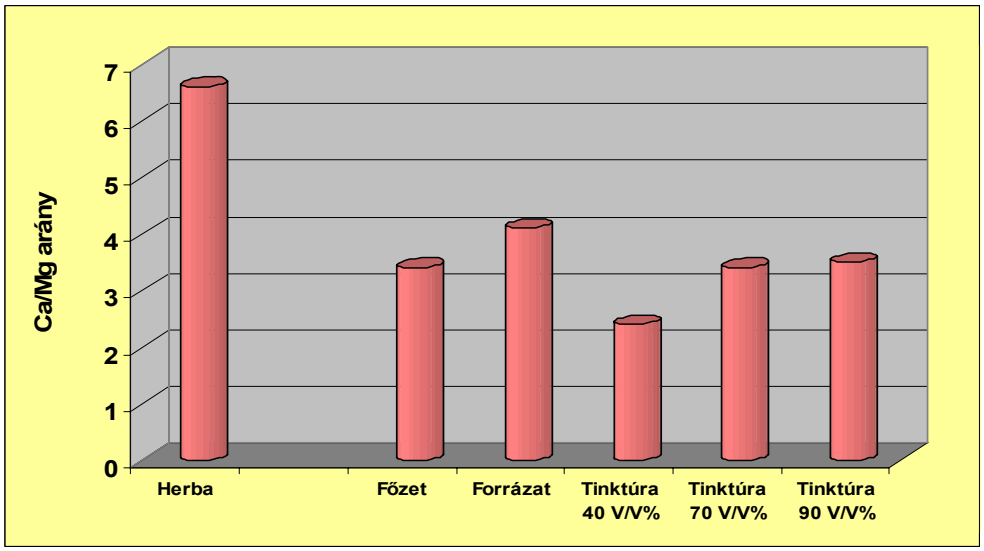
17.táblázat A különböző technológiával készült Chelidonii herba kivonatok ásványelemeinek kioldódása (%)

	Főzet	Forrázat	Tinktúra 40 v/v%	Tinktúra 70 v/v%	Tinktúra 90 v/v%
Al	**7,7%**	**10,8%**	**7,30%**	**5,3%**	**4,6%**
B	**18,2%**	**41,9%**	**17,1%**	**16,0%**	**14,8%**
Ba	**8,9%**	**14,6%**	**9,6%**	**6,2%**	**4,2%**
Ca	**16,9%**	**22,7%**	**16,0%**	**14,4%**	**12,9%**
Co	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.
Cr	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.
Cu	**5,5%**	**7,7%**	**4,6%**	**3,9%**	**3,3%**
Fe	**3,7%**	**2,30**	**2,1%**	**1,8%**	**1,3%**
K	**46,2%**	**64,9%**	**44,2%**	**39,5%**	**35,7%**
Li	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.
Mg	**32,4%**	**36,5%**	**43,0%**	**28,0%**	**24,2%**
Mn	**13,4%**	**22,9%**	**17,5%**	**13,4%**	**11,6%**
Mo	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.
Na	**6,5%**	**8,5%**	**5,8%**	**4,7%**	**4,3%**
Ni	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.
P	**40,3%**	**53,8%**	**58,1%**	**33,4%**	**29,0%**
S	**29,2%**	**37,1%**	**30, 3%**	**26,3%**	**22,9%**
Ti	**1,9%**	**2,9%**	**5,8%**	**2,9%**	<k.h.
V	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.	<k.h.
Zn	**38,8%**	**25,5%**	**19,3%**	**14,9%**	**11,4%**

<k.h. = kimutatási határ alatt

Gyakran többet mond az elemek abszolút mennyiségének megadása helyett egyes elempárok arányának értékelése (pl. szinergista hatás). Nagyszámú vizsgálatunk alapján néhány ilyen érdekes arányra vonatkozó eredményünket ismertetjük a továbbiakban.

A kálcium-magnézium aránya helyes táplálkozás mellett 3 : 1 (Bíró és Lindner 1995). A vérehulló fecskefű herba drogban ez az érték 6,6 : 1, a kivonatokban pedig 2,4-4,1 : 1 értékre csökken (35.ábra), mely megfelel a helyes táplálkozásban ajánlott aránynak. A cink és a réz arány átlagos táplálkozás mellett 5 : 1, az optimális arány azonban 3 : 1 (Bíró és Lindner 1995). A Chelidonii herba drogra ez az arány 2,5 : 1, mely a kivonatokban 8-16 : 1 értékre változik. A vas és a réz megfelelő aránya 10 : 1 (Bíró és Lindner 1995), ez a herba esetében igaz, de a kivonatokban 5-7 : 1 -re csökken.



35.ábra Kálcium-magnézium arány a Chelidonii herbában és kivonataiban

A terápiás felhasználás szempontjából értékelve az eredményeket, lényeges tapasztalat, hogy sem a vérehulló fecskefű föld feletti része és a gyökere, sem a herbából a tradicionális gyógyszerkészítés szabályai szerint készített kivonatok (főzet, forrázat, tinktúrák) nem tartalmaztak mérhető mennyiségben toxikus elemeket (ártalmatlanság).

A Chelidonii herba és radix drogokban jelentős a réz felhalmozódás, mely elemnek a fecskefű alkaloidjaira jellemző antibakteriális aktivitásra gyakorolt hatását a 4.7.5. fejezetben vizsgáltuk.

4.6. A vérehulló fecskefű összalkaloid tartalmának és alkaloid összetételének változása a vegetációs periódus alatt

A *Chelidonium majus* életciklusa viszonylag rövid. A növény első virágzása április-május hónapban van, majd nyár-ősz folyamán többszöri virágzás jellemzi.

Irodalmi adatokat tanulmányozva az optimális begyűjtési idő meghatározására eltérő információkat találtunk. Kustrak és mtsai (1982) szerint a herba és gyökér összalkaloid tartalma az első virágzás idején a legalacsonyabb (herba: 0,58%, radix: 0,88%, m/m). A másodvirágzás idején (augusztus vége – szeptember eleje) mérték a legmagasabb alkaloid tartalom értékeket mind a herbában (1,48%), mind a gyökérben (1,86%). Az első- és másodvirágzás közötti időszakból azonban nem közölnek összalkaloid tartalomra vonatkozó adatokat. Bugatti és mtsai (1987) a tavasszal gyűjtött friss gyökér alkaloid összetételét határozták meg (0,33% keleritrin, 0,38% szangvinarin, 0,07% berberin; m/m). Niu és He Kína területén július hónapban gyűjtött gyökér minták összalkaloid tartalom értékeit közölték (0,86% - 1,94%; m/m).

A Hagers Handbuch (1993) Chelidonii herba monográfiája optimális gyűjtési időnek a virágzás végét tekinti, ezért a termés érésekor történő gyűjtést javasolja. Ajánlását nem támasztja alá mérési eredményekkel.

Fulde és Wichtl (1994) július és december között vizsgálták a *Chelidonium* levél és gyökér összalkaloid tartalom változásának dinamikáját. A legmagasabb értékeket október közepén mérték mindkét növényi rész esetében, de július előtti mérési eredményeket nem közöltek.

Az érvényes gyógyszerkönyvek nem definiálják a pontos begyűjtési időt, valamint az irodalomból megismert ajánlások pedig nincsenek megfelelő eredményekkel alátámasztva. Ezért fontosnak éreztük, hogy az összalkaloid tartalom és a terápiás hatás szempontjából lényeges alkaloid arányokra korszerű kromatográfiás módszerekkel is alátámasztott adatokat szolgáltassunk a helyes gyűjtési idő kiválasztásához.

A vérehulló fecskefű alkaloid tartalma változásának tanulmányozására a vegetációs periódus alatt két gyűjtési hely kijelölésével (Budapest - Hűvösvölgy és Budakeszi) 2005. április 10. és 2005. október 10. között kb. 20 naponként összesen tíz alkalommal gyűjtöttük a növény föld feletti részét, illetve a gyökerét (18.táblázat).

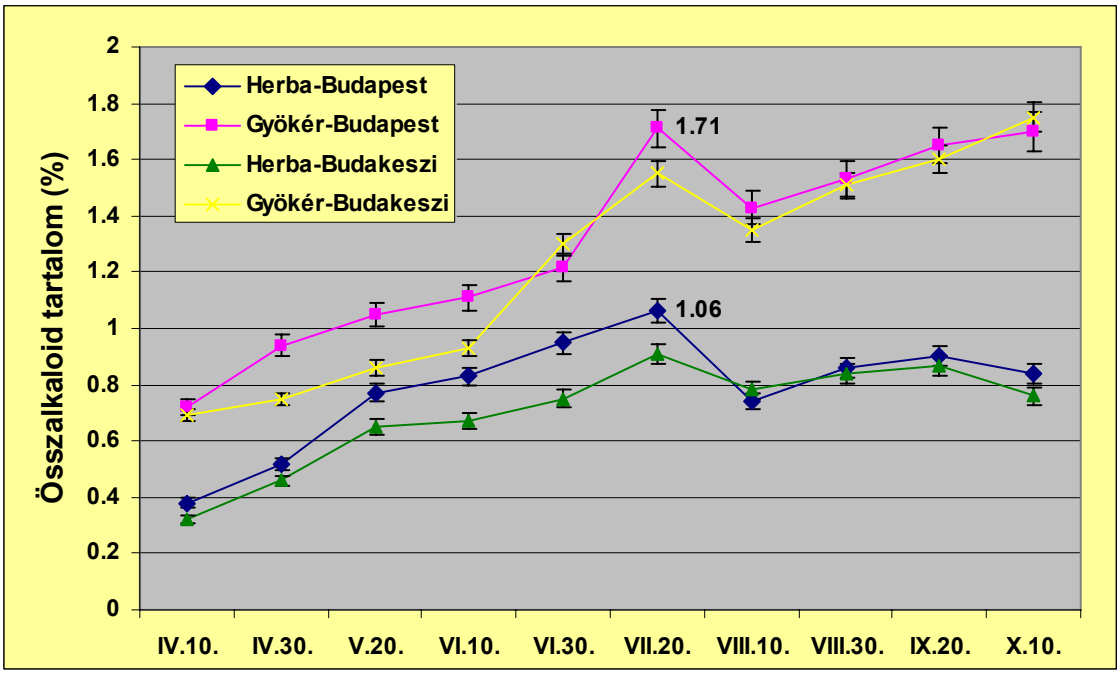
18.táblázat Gyűjtési időpontok és a herba fenotípusa a vegetációs periódus alatt (Budapesten, illetve Budakeszin begyűjtött minták)

Minta száma	Gyűjtés időpontja	Herba fenotípusa
1.	Április 10.	Virágzás kezdete, bimbós állapot
2.	Április 30.	Teljes virágzás
3.	Május 20.	Termésérés
4.	Június 10.	Termés elszáradása, magok széthullása
5.	Június 30.	Nyugalmi állapot
6.	Július 20.	Nyugalmi állapot
7.	Augusztus 10.	Másodvirágzás kezdete
8.	Augusztus 30.	Másodvirágzás
9.	Szeptember 20.	Termésérés
10.	Október 10.	Termés elszáradása, magok széthullása

A szárított növényrészek (herba és radix) összalkaloid tartalom változását a vegetációs periódus alatt a 36.ábra mutatja be. A mérést a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv által előírt spektrofotometriás módszerrel végeztük (3.2.3.1. fejezet).

A május 20. és október 10. között a két helyről begyűjtött herba drogok minden esetben megfeleltek a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv előírásának (összalkaloid tartalom: 0,65-1,06%), azonban az április 30-án teljes virágzást mutató herba drog összes alkaloid tartalma (0,46-0,52%) alatta maradt a gyógyszerkönyvi elvárásnak (0,6%).

A július 20-án Budapesten gyűjtött herba (1,06%) és gyökér (1,71%) drogokban kiemelkedő összalkaloid tartalom értékeket mértünk. Szeptember 20. után az alkaloid tartalom értékek herba drogokban csökkenést, míg gyökér drogokban emelkedő értékeket mutattak.



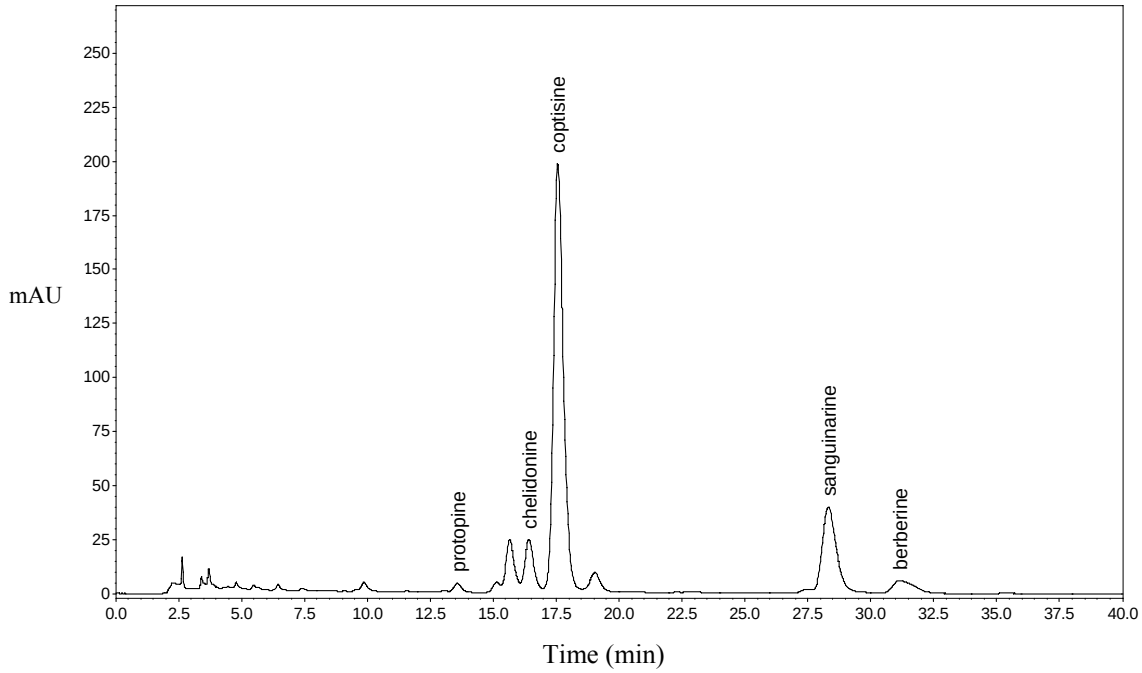
36.ábra A két begyűjtési helyről származó herba és gyökér drogok összalkaloid tartalom változása a vegetációs periódus alatt (g/100g; n = 3)

Mivel az összalkaloid tartalom változások tendenciája a vegetációs periódus alatt alapvetően azonos volt, részletes alkaloid összetétel vizsgálatot csak a Budapesten gyűjtött mintákból végeztünk.

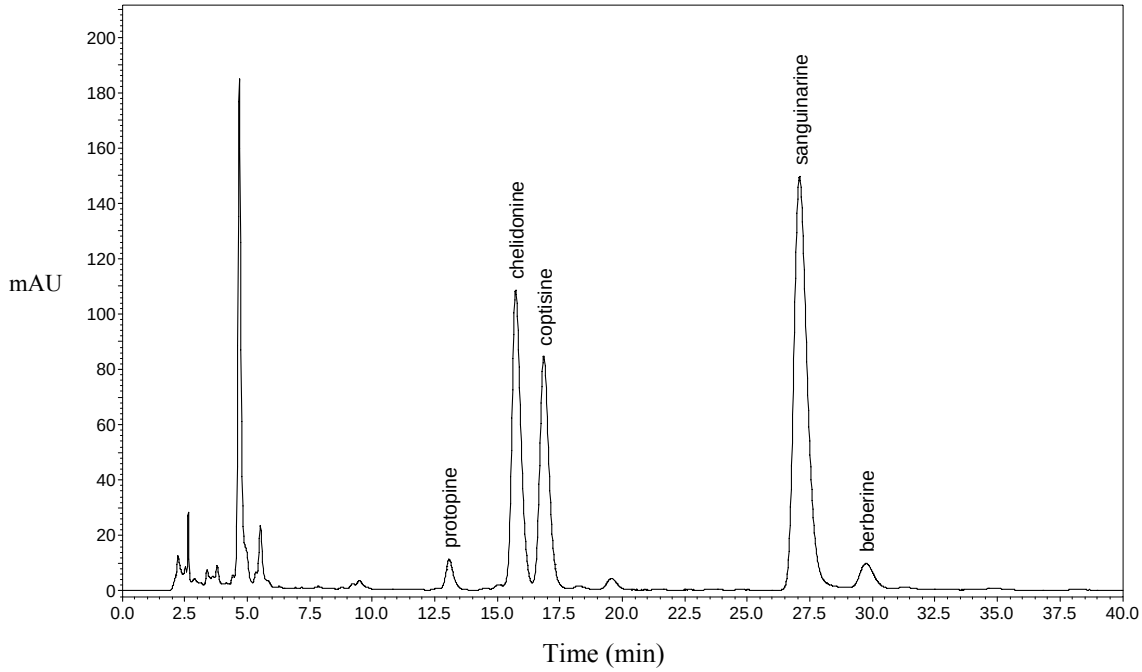
A herba és gyökér kivonatok elkészítése a 3.2.2.3. fejezet szerint történt, a tisztítást és mérést a 3.2.3.4. pontban ismertetett módon folyadékkromatográfiás módszerrel végeztük.

A legnagyobb összalkaloid tartalommal rendelkező herba és gyökér minták HPLC kromatogramjait a 37. és 38.ábra mutatja be.

A Budapesten gyűjtött vérehulló fecskefű herba és gyökér minták alkaloid összetétel változását a vegetációs periódus alatt a 19. és 20.táblázat foglalja össze.



37.ábra A július 20-án Budapesten gyűjtött (legnagyobb összalkaloid tartalommal rendelkező) Chelidonii herba HPLC kromatogramja



38.ábra A július 20-án Budapesten gyűjtött (legnagyobb összalkaloid tartalommal rendelkező) Chelidonii radix HPLC kromatogramja

19.táblázat A vegetációs periódus alatt gyűjtött herba minták alkaloid összetétele (mg/100g)

Gyűjtés időpontja	Protopin	Kelidonin	Koptizin	Szangvinarin	Berberin
Április 10.	**35,2** ± 2,0	**33,6** ± 1,4	**320,3** ± 9,3	**61,2** ± 2,5	**16,8** ± 1,0
Április 30.	**57,4** ± 3,1	**45,8** ± 2,0	**418,9** ± 14,7	**87,3** ± 4,1	**25,3** ± 1,5
Május 20.	**72,2** ± 3,2	**77,3** ±2,9	**638,3** ± 19,8	**100,9** ± 4,2	**34,9** ± 2,1
Június 10.	**80,7** ± 3,8	**125,1** ± 4,8	**631,0** ± 18,3	**126,6** ± 6,2	**32,7** ± 1,9
Június 30.	**41,7** ± 2,1	**207,2** ± 6,0	**680,9** ± 17,0	**171,4** ± 6,5	**44,3** ± 2,7
Július 20.	**42,6** ± 2,5	**275,3** ± 8,8	**840,5** ± 21,8	**152.7** ± 6,0	**51,3** ± 3,0
Augusztus 10.	**38,4** ± 2,2	**177,4** ± 6,2	**525,8** ± 14,7	**110,5** ± 4,9	**35,2** ± 2,2
Augusztus 30.	**40,7** ± 2,5	**192,6** ± 7,3	**631,4** ± 19,6	**130,1** ± 5,1	**37,4** ± 2,3
Szeptember 20.	**41,6** ± 2,1	**259,5** ± 8,9	**625,7** ± 20,7	**175,4** ± 7,2	**39,3** ± 2,4
Október 10.	**29,1** ± 1,7	**230,4** ± 6,9	**531,6** ± 13,3	**165,1** ± 7,8	**29,8** ± 1,9

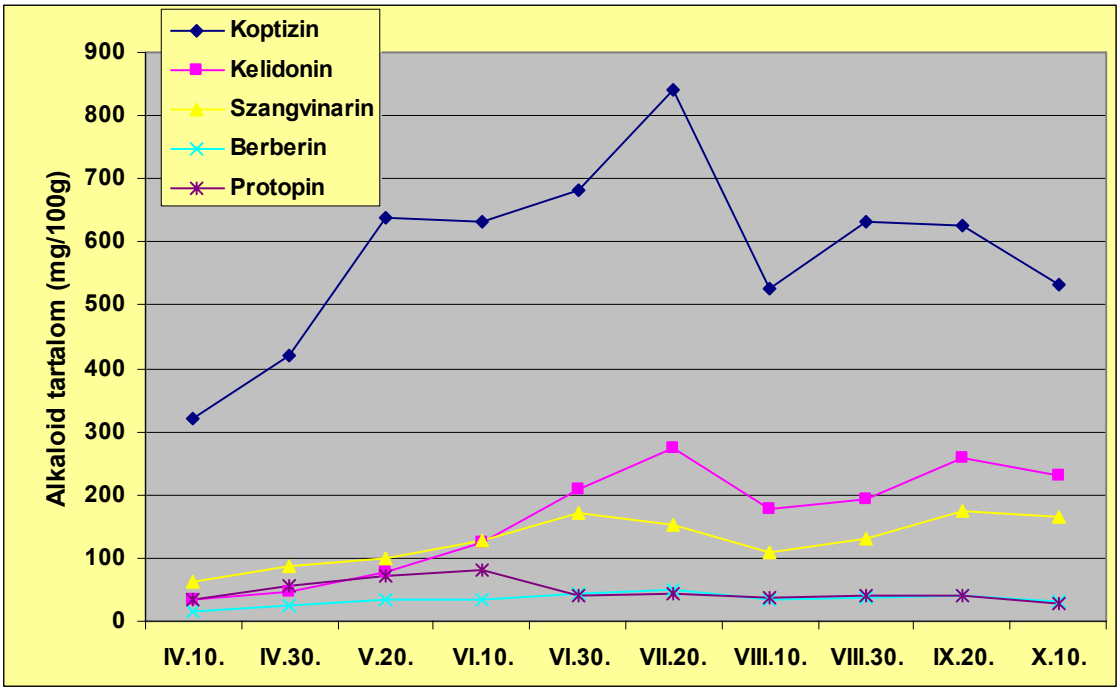
± a szórás értékei, n = 3

20.táblázat A vegetációs periódus alatt gyűjtött gyökér minták alkaloid összetétele (mg/100g)

Gyűjtés időpontja	Protopin	Kelidonin	Koptizin	Szangvinarin	Berberin
Április 10.	**137,4** ± 7,1	**245,9** ± 7,9	**217,4** ± 6,2	**216,1** ± 10,2	**120,7** ± 6,6
Április 30.	**158,7** ± 9,5	**370,3** ± 11,5	**282,1** ± 7,6	**336,4** ± 15,1	**101,2** ± 5,4
Május 20.	**161,4** ± 8,1	**431,5** ± 15,9	**210,3** ± 7,2	**418,8** ± 17,2	**90,6** ± 5,3
Június 10.	**162,3** ± 8,6	**537,8** ± 17,4	**151,7** ± 4,3	**475,3** ± 20,4	**60,4** ± 3,6
Június 30.	**167,2** ± 9,3	**570,4** ± 19,4	**198,4** ± 6,2	**536,2** ± 21,0	**55,7** ± 3,2
Július 20.	**110,1** ± 6,6	**1247,2** ± 36,2	**342,1** ± 8,1	**469,3** ± 19,2	**65,5** ± 4,0
Augusztus 10.	**75,5** ± 4,7	**897,7** ± 29,6	**244,6** ± 7,1	**437,1** ± 20,5	**62,4** ± 3,9
Augusztus 30.	**111,7** ± 5,2	**947,6** ± 34,1	**304,1** ± 7,9	**464,6** ± 19,9	**61,7** ± 3,6
Szeptember 20.	**117,0** ± 5,8	**1057,7** ± 32,8	**247,8** ± 6,7	**512,6** ± 23,6	**70,6** ± 3,9
Október 10.	**121,3** ± 6,3	**1136,2** ± 37,5	**213,4** ± 4,9	**557,1** ± 20,6	**91,5** ± 5,6

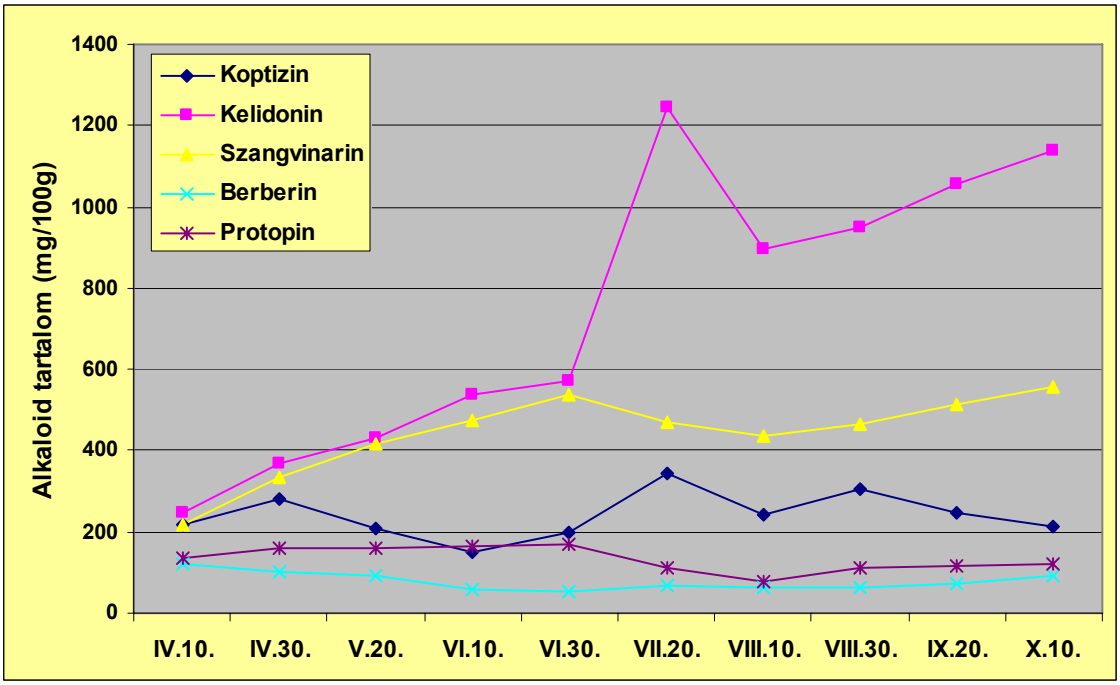
± a szórás értékei, n = 3

A 19.táblázat adataiból szerkesztett 39.ábrán jól látható, hogy a tíz különböző időpontban begyűjtött herba minta mindegyikében a koptizin alkaloid dominál. A legmagasabb koptizin mennyiséget a július 20-án (nyugalmi állapot) begyűjtött mintában mértük (840,5 mg/100g). A 300mg/100g koncentrációt egyetlen további alkaloid sem haladta meg egyetlen vegetációs állapotban sem. A kelidonin és szangvinarin alkaloidok viszonylag nagyobb koncentrációban, míg a protopin és berberin alkaloidok alacsonyabb koncentrációban vannak jelen az egyes mintákban. A vegetációs periódust végig tekintve az öt mért alkaloid komponens közül a berberin (16,8 – 51,3 mg/100g) található legkisebb mennyiségben a herba mintáiban. Az első virágzás és termésérés alatt a szangvinarin mennyisége meghaladta a minták kelidonin tartalmát, míg a másodvirágzás alatt a kelidonin mennyisége jóval magasabb volt, mint a szangvinariné. Az áprilisban gyűjtött (virágzás kezdete, virágzás) herba minták közel azonos koncentrációban tartalmazták a kelidonin és protopin alkaloidokat. A nagyobb mennyiségben jelenlévő alkaloidokról elmondható, hogy előfordulásuk hasonló időpontokban mutatott növekedést, illetve csökkenést, melynek mértéke eltérő volt.



39.ábra A vegetációs periódus alatt Budapesten gyűjtött *Chelidonium* herba minták alkaloid összetétel (mg/100g) változása

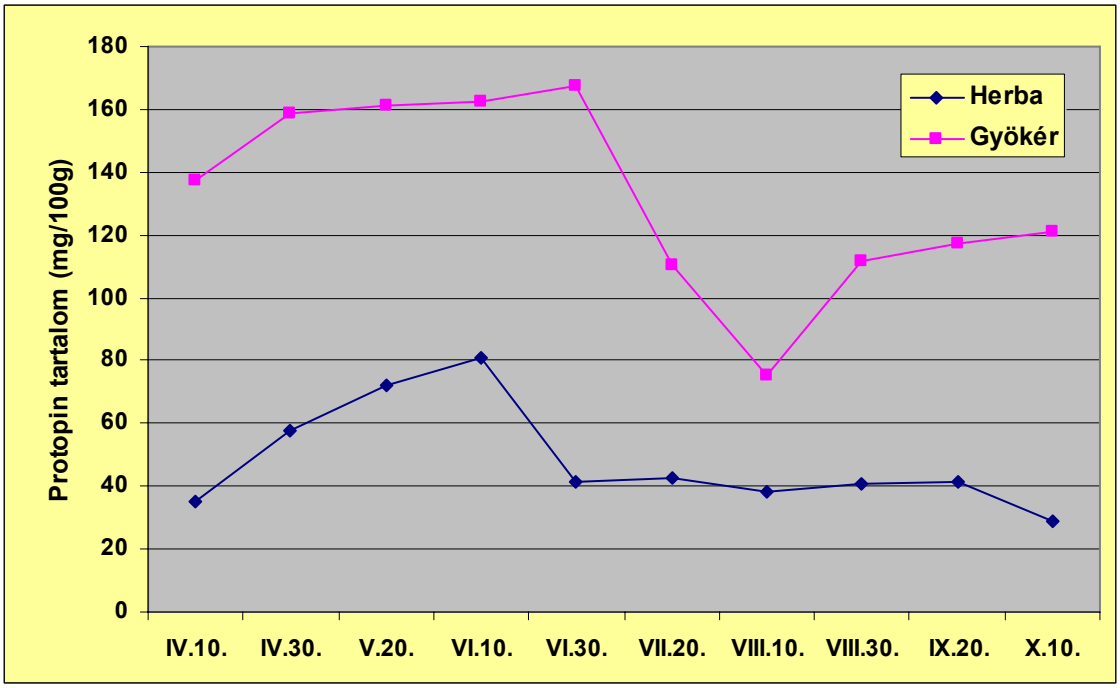
A vegetációs periódus alatt gyűjtött gyökér minták alkaloid összetétel (mg/100g) változását szemlélteti a 40.ábra. Jól látható, hogy a tíz különböző időpontban begyűjtött gyökér minta mindegyikében a kelidonin alkaloid található legnagyobb mennyiségben, dominans alkaloid komponensnek azonban csak a július 20-án, illetve utána begyűjtött mintákban tekinthetjük. A legnagyobb kelidonin koncentrációt a herba mintákhoz hasonlóan a július 20-án gyűjtött gyökérben mértük (1247,2 mg/100g). A kelidonin és szangvinarin koncentrációja együtt növekedett az első virágzás és termésérés alatt (közel azonos értékeket mértünk), a másodvirágzásnál az együtt növekedés hasonlóan megfigyelhető, de a kelidonin mennyiségi értékei jóval meghaladják a mért szangvinarin értékeket. A gyökér mintákban a herbában domináns koptizin az első virágzáskor alig marad el a kelidonin és szangvinarin mögött, viszont a másodvirágzásnál arányát tekintve jelentéktelen a kelidoninhoz képest. A vegetációs periódust végig tekintve az öt mért alkaloid komponens közül a berberin (55,7 - 120,7 mg/100g) található legkisebb mennyiségben a gyökér mintáiban is.



40.ábra A vegetációs periódus alatt Budapesten gyűjtött *Chelidonium* gyökér minták alkaloid összetétel (mg/100g) változása

Az egyes alkaloidok mennyiségi viszonyait megvizsgáltuk a *Chelidonium* herba és gyökér drogokban a vegetációs periódus alatt.

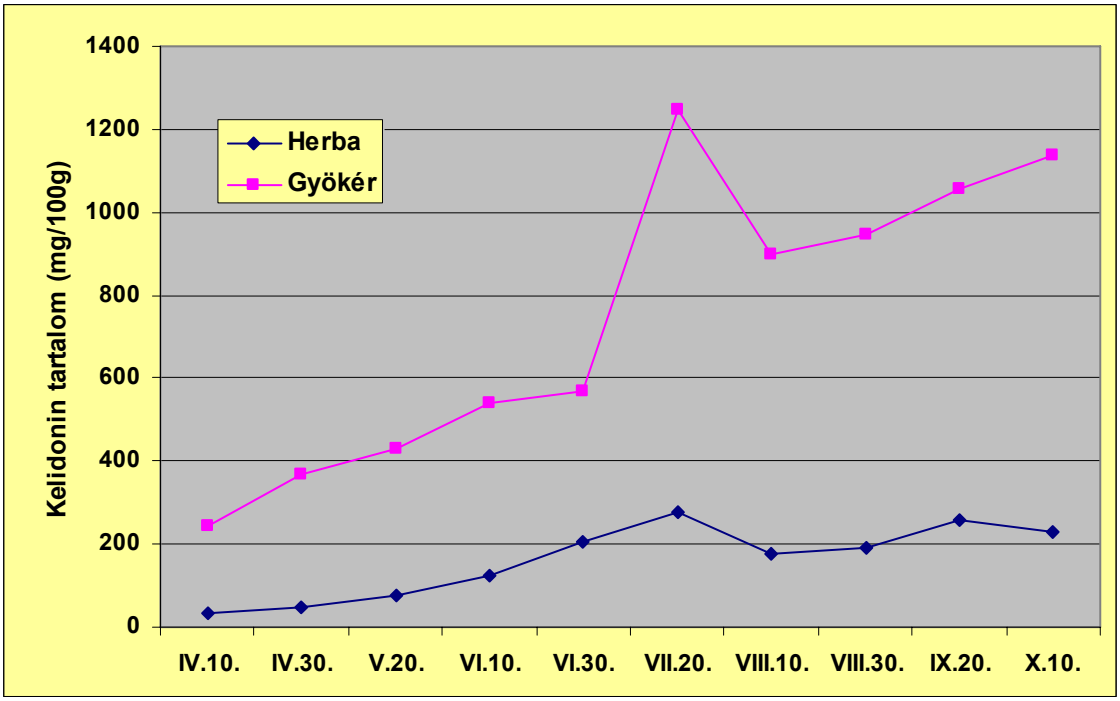
A 41.ábrán jól látható, hogy a protopin jóval magasabb koncentrációban van jelen a gyökérben, mint a herba mintáiban. Érdekes, hogy amíg az összalkaloid értékek maximumot mutatnak (július 20-án gyűjtött herba és gyökér), addig a protopin szint a herbában június eleje után nem emelkedik, illetve a gyökérben június vége után csökkenés mutat, majd augusztusi minimum érték után mérsékelten emelkedik.



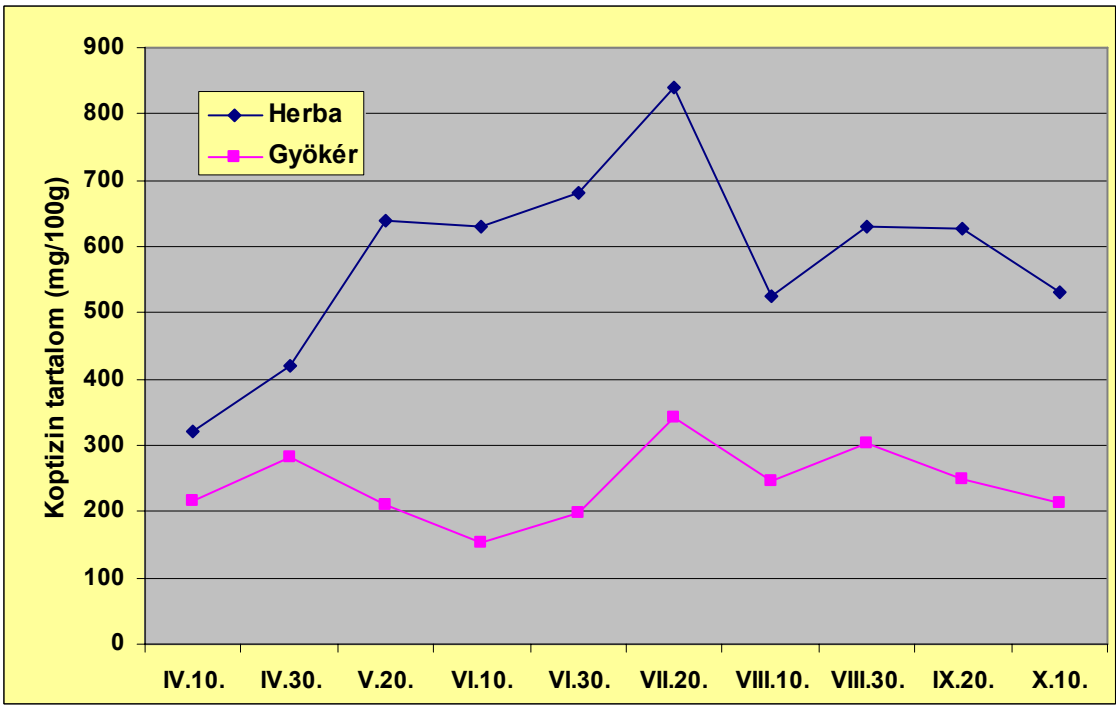
41.ábra Protopin koncentrációk (mg/100g) a vegetációs periódus alatt Budapesten gyűjtött *Chelidonium* herba és gyökér mintákban

A kelidonin mennyiségi viszonyait vizsgálva a vegetációs periódus alatt gyűjtött herba és gyökér mintákban látható, hogy a maximum értékek mind a gyökér, mind a herba esetében a nyugalmi fázis idejére esnek (július 20-án gyűjtött minta). A nyugalmi fázisban a gyökérben mért kelidonin tartalom (1247,2 mg/100g) négy és félszer annyi, mint a herba esetében (275,3 mg/100g) (42.ábra).

Az alkaloidok közül egyedül a herbában mért koptizin koncentrációk haladják meg a gyökérben meghatározott értékeket. A legmagasabb koptizin értékeket hasonlóan a kelidoninhoz mind a gyökér (342,1 mg/100g), mind a herba (840,5 mg/100g) esetében a növény nyugalmi fázisában mérhettük (43.ábra).

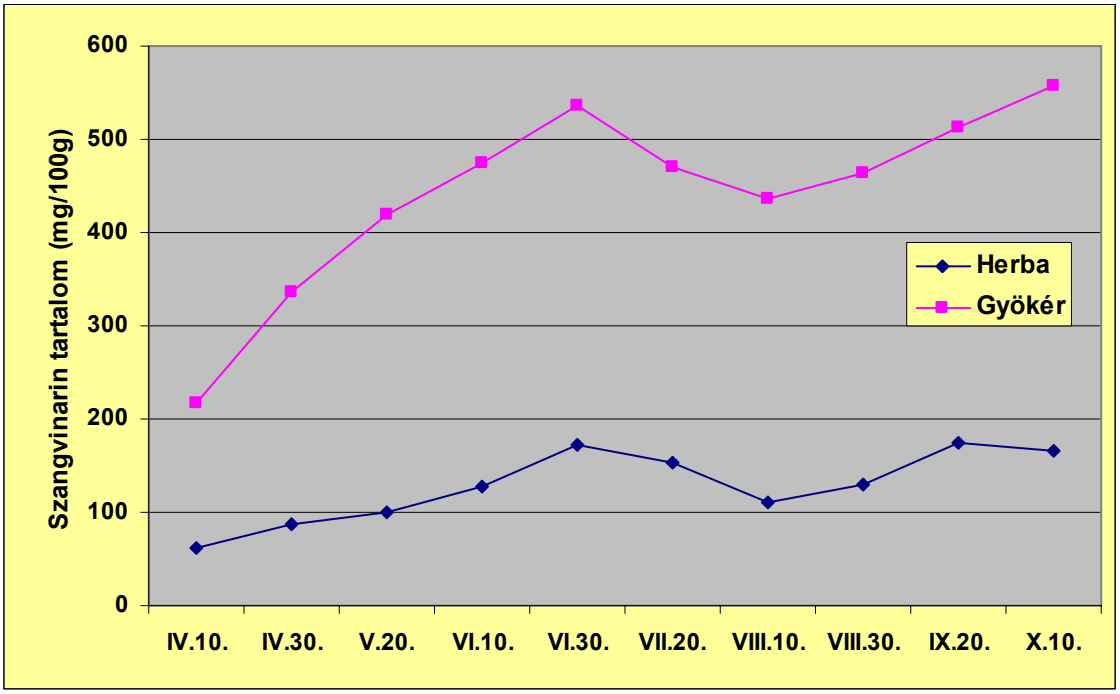


42.ábra Kelidonin koncentrációk (mg/100g) a vegetációs periódus alatt Budapesten gyűjtött *Chelidonium* herba és gyökér mintákban



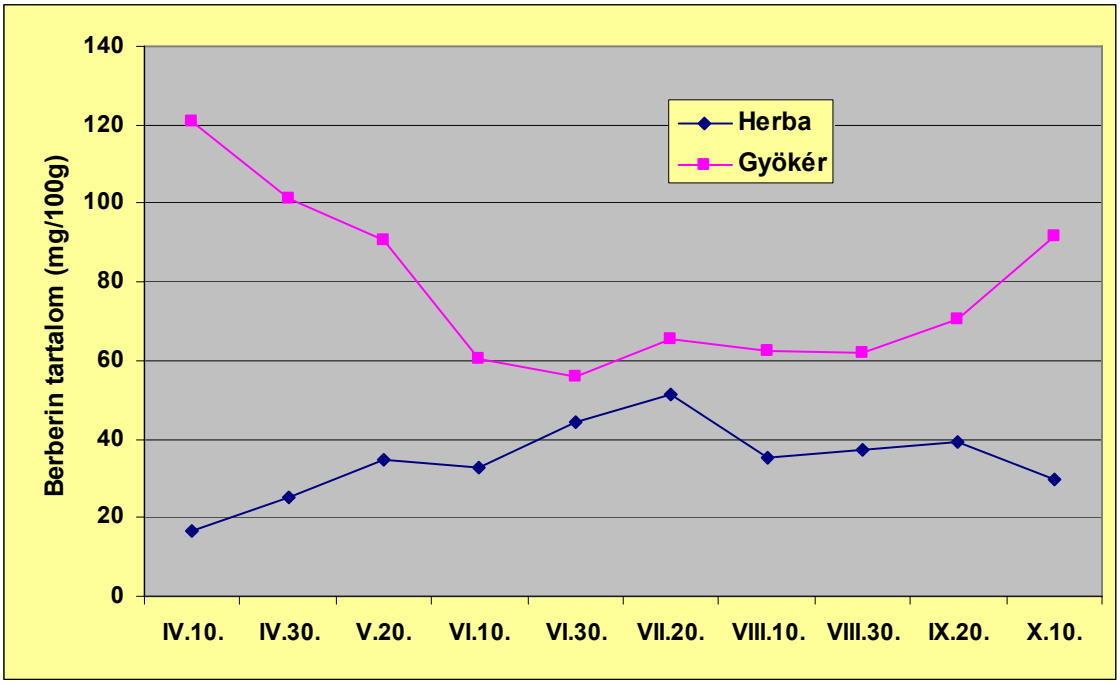
43.ábra Koptizin koncentrációk (mg/100g) a vegetációs periódus alatt Budapesten gyűjtött *Chelidonium* herba és gyökér mintákban

A szangvinarin alkaloid feldúsulása hasonló viselkedést mutat a *Chelidonium* gyökér, illetve herba mintákban (44.ábra). Első és másodvirágzás, illetve terméséréskor növekvő szangvinarin mennyiségeket mértünk de értékeik jelentős eltérést mutatnak a két drogban mért alkaloid tartalom összehasonlításakor. A szangvinarin koncentráció maximumát mindkét drog (herba: 171,4 mg/100g; gyökér: 536,2 mg/100g) esetében a nyugalmi fázisban (június 30.), de nem az összalkaloid tartalom maximumát mutató herba, illetve gyökér mintákban mértük (július 20.).



44.ábra Szangvinarin koncentrációk (mg/100g) a vegetációs periódus alatt Budapesten gyűjtött *Chelidonium* herba és gyökér mintákban

A herbában, illetve gyökérben mért berberin alkaloid értékeket összehasonlítva szokatlan eredményeket kaptunk (45.ábra). A két drogban a berberin alkaloid felhalmozódása eltérő a vegetációs periódus alatt. A gyökér berberin tartalma a nyugalmi fázis eléréséig folyamatosan csökken, majd a másodvirágzás alatt lassan emelkedik. A herbát vizsgálva megállapítottuk, hogy a nyugalmi fázis végéig folyamatosan emelkedő, majd a másodvirágzás alatt szinte állandó berberin tartalom jellemzi.



45.ábra Berberin koncentrációk (mg/100g) a vegetációs periódus alatt Budapesten gyűjtött *Chelidonium* herba és gyökér mintákban

Összegezve a vegetációs periódus tanulmányozása során nyert eredményeinket megállapíthatjuk, hogy a legmagasabb összalkaloid értékeket a növény nyugalmi periódusában (két virágzás között) gyűjtött drogokban mértük. Ez az idő egyaránt alkalmas a herba és gyökér begyűjtésére.

A VIII. Magyar Gyógyszerkönyv előírásának az általunk 2005. május 20-án és azt követően október 10-ig Budapesten és Budakeszin gyűjtött herba minták mindegyike megfelelt az összalkaloid tartalom tekintetében.

A HPLC mérés eredményei jó egyezést mutattak a VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben hivatalos spektrofotometriás meghatározással a legmagasabb alkaloid tartalom vonatkozásában és lehetőséget adtak az alkaloid összetétel pontos tanulmányozására, így az egyes alkaloid komponensek előfordulási maximumainak, illetve felhalmozódási dinamikájának megismerésére.

4.7. A Chelidonium alkaloidok antibakteriális hatásának vizsgálata BioArena módszerrel

A növekvő számú antibiotikum-rezisztens törzs megjelenése miatt növényi eredetű kivonatok és azok komponenseit egyre nagyobb arányban vizsgálják patogén mikroorganizmusok ellen. A természetes eredetű kivonatoknak ilyen egyre szélesebb körben alkalmazott szűrővizsgálati módszere az un. bioautográfia, mely lehetővé teszi az antibiotikus hatás lokalizálását közvetlenül a kifejlesztett rétegkromatogramon. Előnye, hogy komplex kivonatok vizsgálatára alkalmas, az eljárás viszonylag olcsó, kiértékelése egyszerű.

Kísérleteinket indokolta a *Chelidonium* alkaloidok, valamint a fecskefűből készült kivonatok az irodalomból széleskörben megismert mikróbaellenes hatása. A vérehulló fecskefű izokinolin vázas alkaloidjai N-, illetve O-atomjukon könnyen lehasadó metil-csoportokat tartalmaznak, így potenciális formaldehid-adó molekuláknak tekinthetők. A metilcsoportok metilezési és demetilezési folyamatokon keresztül szerepet játszhatnak a *Chelidonium* alkaloidok hatásmechanizmusában, azaz előzetes feltételezésünk szerint befolyásolhatják a HCHO-ciklus lépéseit.

A *Chelidonium* alkaloidok antibakteriáis hatásának, valamint az általunk feltételezett demetilálódást követő formaldehiden keresztül kialakuló hatás mechanizmusának tanulmányozására a konvencionális bioautográfia egy továbbfejlesztett változatát, a BioArena módszert használtuk.

4.7.1. A vékonyréteg-kromatogramok kifejlesztése

A direkt bioautográfiás vizsgálat során ügyelni kellett arra, hogy a kromatogramok kifejlesztésekor alkalmazott oldószerek a miroorganizmusokra kifejtett gátló hatásuk révén befolyásolhatják az eredményt. Az irodalomból ismeret, hogy az 5%-os kénsav, 5%-os sósav, a tetrahidrofurán és az 5%-os ammónium-hidroxid közvetlen hatásuk miatt módosíthatják a mikrobiológiai hatásosságot egyes baktériumok esetében (Botz és mtsai 2001). Ezért bioautográfiás rendszerünkben első lépésként megvizsgáltuk azokat az oldószereket, melyeket a kifejlesztések során alkalmazni terveztünk. Ezek a

következők voltak: kloroform, toluol, metanol, etanol, n- és izo-propanol, butanol, diklórmetán és hangyasav.

Eredményeink alapján kerülnünk kellett a hangyasavat tartalmazó kifejlesztő elegyeket, mivel e kémiai anyag önmagában is gátolta a baktériumok növekedését. A gyógyszerkönyvek (DAB 10, Ph.Eur.5. és Ph.Hg.VIII.) a Chelidonii herba azonosító vizsgálataként ismertetett vékonyréteg kromatográfiás eljárásának kifejlesztő rendszere [hangyasav : víz : n-propanol (1 : 9 : 90 V/V/V)] mindössze 1% hangyasavat tartalmaz ugyan, de kísérletileg is igazoltuk, hogy a BioArena rendszerben az előbb említett okok miatt nem használható.

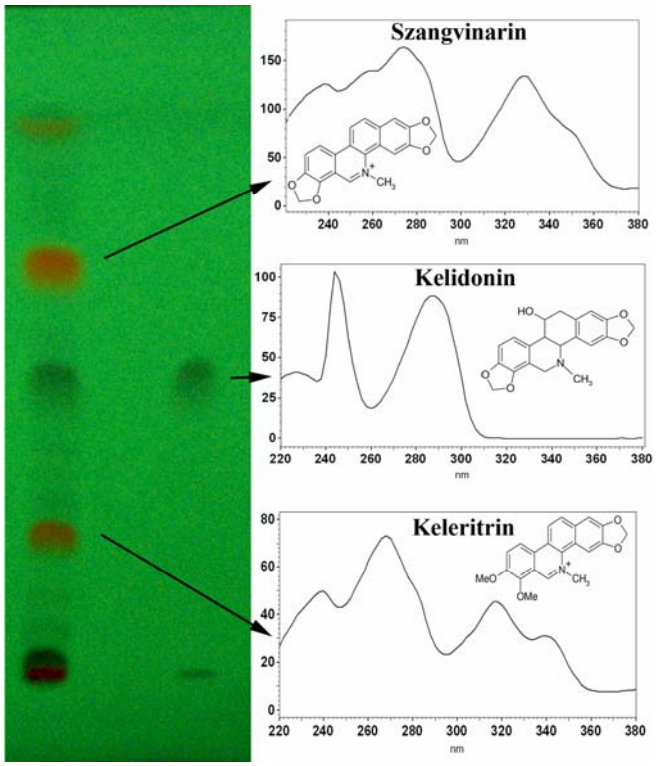
A kelidonin, keleritrin, szangvinarin alkaloidok egyenként történő vizsgálatánál a hangyasavat elhagyva, a víz : n-propanol arány egyszerű módosításával (4 : 90 V/V) megfelelő eluenshez jutottunk.

A kivonatok esetében ez a megoldás nem bizonyult megfelelőnek, mert az alkaloidok elválása nem volt kielégítő további bioautográfiás vizsgálatra. A denzitometriás mérésekre kifejlesztett rendszerek (4.3.2.1. fejezet) nem befolyásolták a biológiai értékmérést és megfelelő elválást biztosítottak a *Chelidonium* alkaloidok kivonatokban való vizsgálatára is (Sárközi és mtsai 2006). A kelidonin, keleritrin, szangvinarin alkaloidok elválasztására a diklórmetán : metanol (97 : 3 V/V) volt a megfelelő mozgó fázis (46.ábra), ez esetben a berberin és koptizin a starton maradt; míg a berberin és koptizin alkaloidok a kloroform : metanol (60 : 30 V/V) kifejlesztő rendszerben - amikor a többi alkaloid a frontra futott – megfelelően elkülönült foltokat eredményeztek.

4.7.2. A *Chelidonium* alkaloidok antibakteriális hatásának vizsgálata

A kifejlesztett rétegeket az „Anyag és módszer” fejezetben (3.2.4.) leírtak szerint antibakteriális hatásvizsgálatnak veztettük alá.

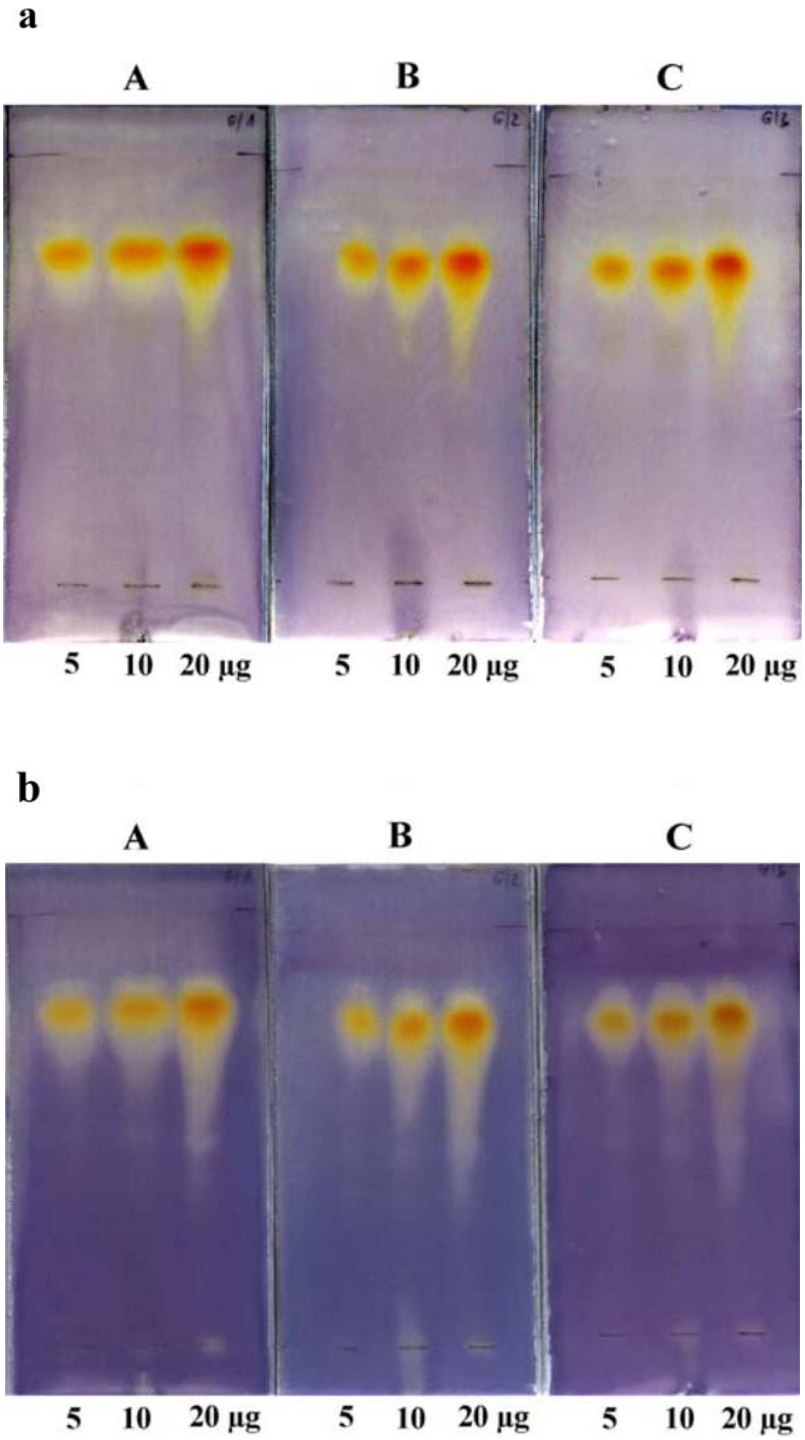
A vérehulló fecskefű kelidonin, keleritrin, szangvinarin, berberin és koptizin alkaloidjainak bioautográfiával történő tanulmányozásánál megállapítottuk, hogy valamennyi markáns antibiotikus hatással rendelkezik a *Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola* baktérium sejtekre.



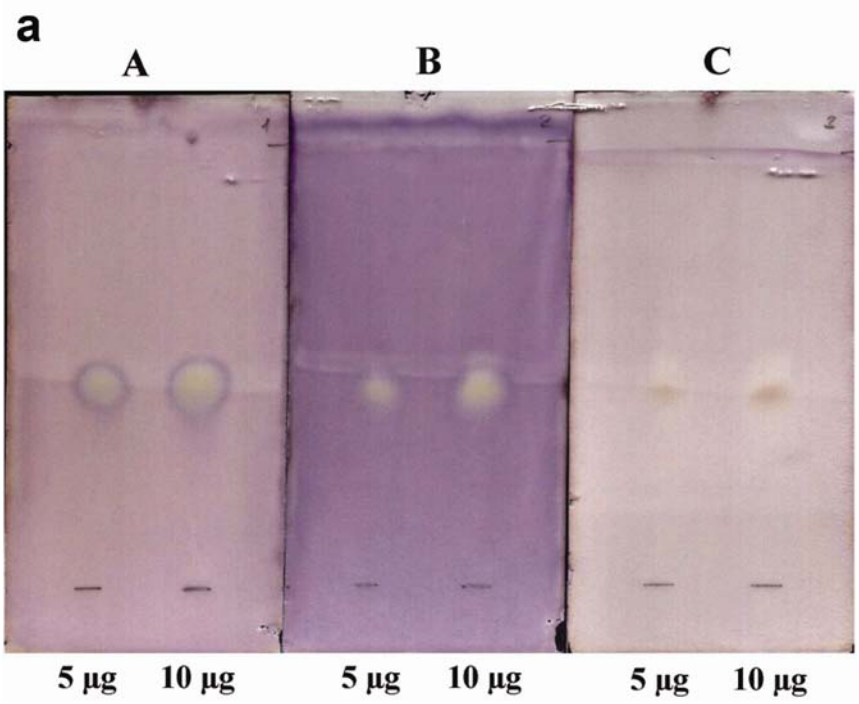
46.ábra A *Chelidonium* gyökér kivonat és a kelidonin teszt vékonyréteg-kromatogramja UV spektrumokkal. Eluens: diklórmetán : metanol (97 : 3 V/V); Detektálás: UV fényben(254nm)

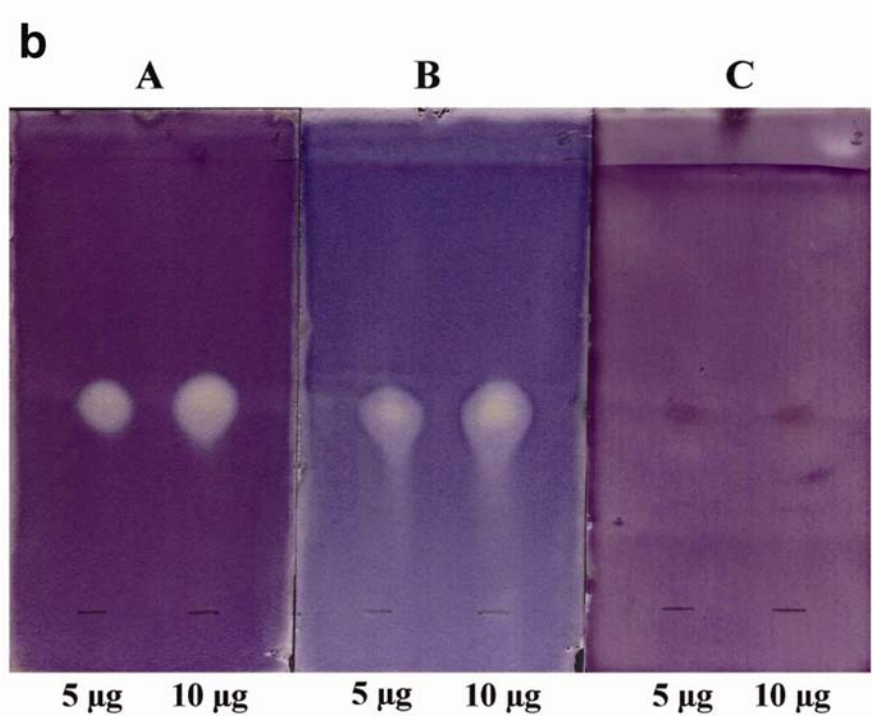
A 47.ábrán **A** jelzéssel ellátott kromatogramokon a kvaterner N-t tartalmazó szangvinarin, míg a 48.ábrán **A** jelzéssel ellátott kromatogramokon a tercier N-t tartalmazó kelidonin *Pseudomonas savastanoi* baktériumra gyakorolt antibiotikus hatását demonstráljuk 2, illetve 18 órával a festés után. Az **A** jelzésű kromatogramokon jól látható az alkaloidok jelentős antibakteriális hatása.

A gátlási zóna a festés után világos foltként jelentkezik a sötét háttéren. A bioautográfiás vizsgálat során ugyanis az élő baktérium sejtek a sárga MTT-t kék színű MTT-formazánná redukálják (Beuge és Kline 1972, Hamburger és Cordell 1987), míg a fehér foltok az élő baktériumok számának drasztikus csökkenését mutatják.



47.ábra 2 mg/ml L-arginin (**B**) és 2 mg/ml glutation (**C**) hatása a szangvinarin által okozott antibiotikus aktivitásra. **A** – a kontrol kromatogram (a szangvinarin *Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola* baktériumra gyakorolt antibakteriális hatása); **a** – 2 óráva, **b** – 18 órával a festés után



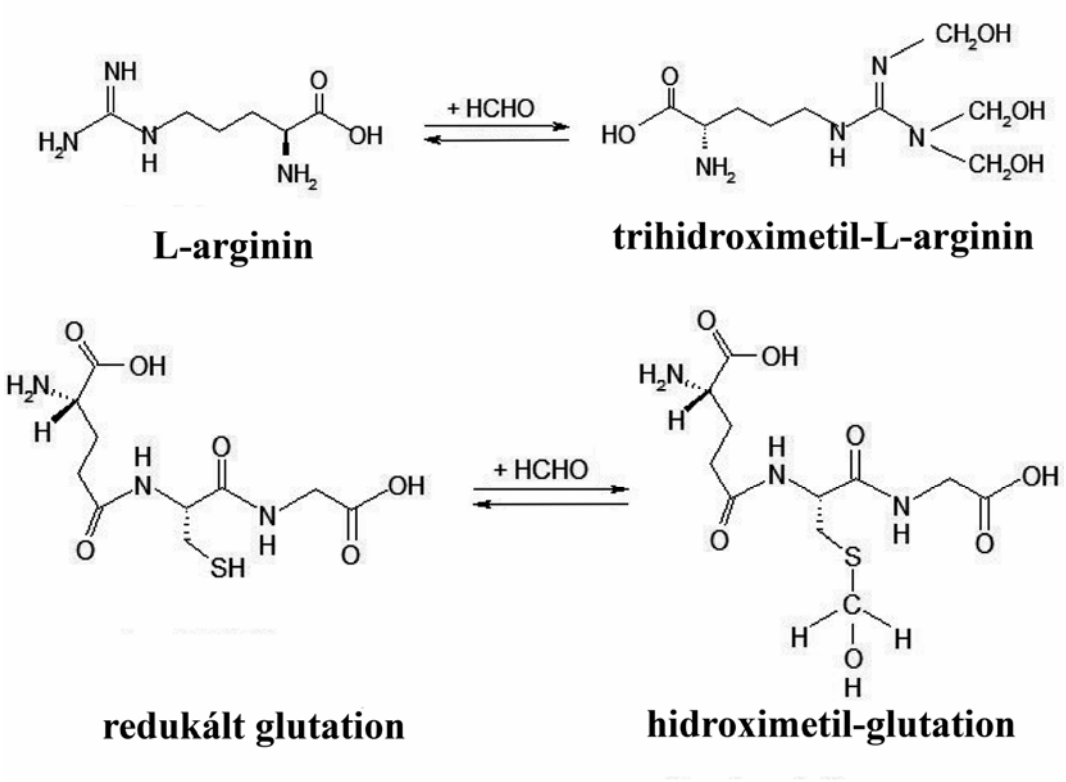


48.ábra 5 mg/ml L-arginin (**B**) és 5 mg/ml glutation (**C**) hatása a kelidonin által okozott antibiotikus aktivitásra. **A** – a kontrol kromatogram (a kelidonin *Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola* baktériumra gyakorolt antibakteriális hatása);
a – 2 óráva, **b** – 18 órával a festés után

4.7.3. A *Chelidonium* alkaloidok antibakteriális hatásmechanizmusának vizsgálata

Bár a *Chelidonum* alkaloidok mikróba ellenes hatása eddig is ismert volt (2.3.1. fejezet), bioautográfiás módszerrel ezt mindezidáig nem vizsgálták. Nem találtunk irodalmat az izokinolin alkaloidok antibiotikus hatásmechanizmusának vizsgálatára és igazolására sem.

Az általunk feltételezett hatásmód bizonyítására L-arginin és glutation vegyületeket használtunk, melyek endogén formaldehid-befogó molekulák (Csiba és mtsai 1982, Heck és mtsai 1990) (49.ábra).



49.ábra A HCHO és HCHO-befogó molekulák (L-arginin és glutation) között lejátszódó reverzibilis reakciók

A HCHO-befogó vegyületeket (L-arginin és glutation) a baktérium szuszpenzióhoz adagolva a festést követően mindkét alkaloid vizsgálatakor (47. és 48.ábrán **B** és **C** rétegek) az antibakteriális hatás csökkenését tapasztaltuk. A festés után 2 órával történő megfigyelés szerint az L-arginin kevésbé, míg a glutation erősebben csökkentette a kontrol, **A** jelzésű vékonyrétegen látható antibiotikus hatást, melyet a kisebb gátlási

zóna jelez. A festés utáni 18. órában az L-arginin formaldehid-befogó hatása csökkenést mutat, és ismét kialakul az alkaloidok erős antibakteriális hatása (reverzibilis reakció), ugyanakkor a glutation szinte teljesen megszüntette az alkaloidok antibiotikus hatását. A formaldehid-befogó molekulák koncentrációit emelve drasztikusabb antimikróbás hatáscsökkenést regisztrálhattunk.

Ez a kísérlet alátámasztotta a korábbi megfigyeléseinket, miszerint a formaldehid jelenlétének speciális szerepe van a mikróba ellenes, valamint mérgező hatások kialakulásában (Kátay és mtsai 2002, Móricz és mtsai 2004, Tyihák és mtsai 2004).

4.7.4. A *Chelidonium* gyökér kivonat antibakteriális hatásának vizsgálata

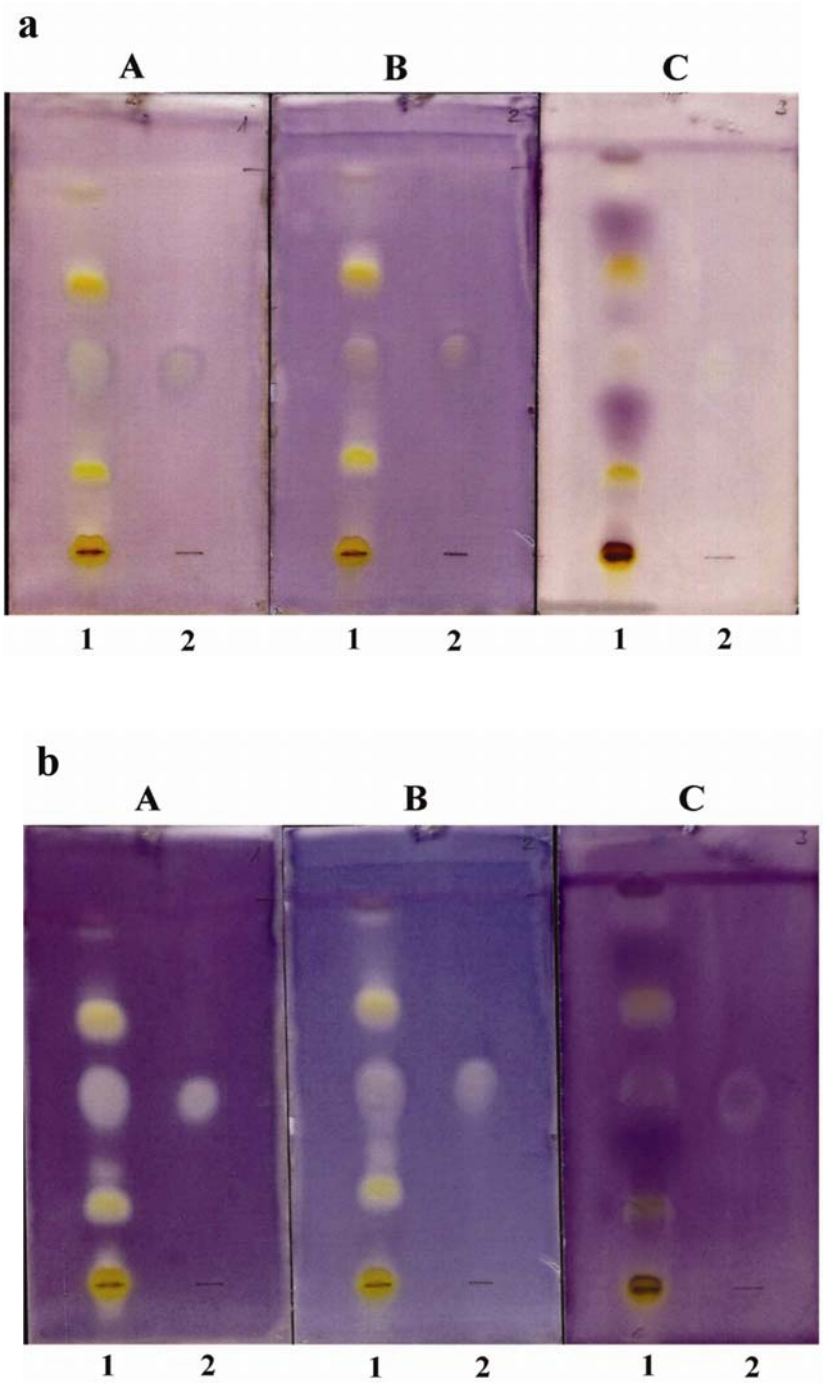
Mivel a kvaterner N atomot tartalmazó *Chelidonium* alkaloidok színesek nehezebb a színreakció megfigyelése. Ezért a kivonatok vizsgálatánál az összehasonlítás a kelidoninra történt, mely alkaloidnál az antibakteriális hatás egyértelműen észlelhető.

Az 50.ábra a *Chelidonium* gyökérből előállított kivonat antibakteriális aktivitását, illetve a formaldehid-befogó molekulák (L-arginin, glutation) hatást módosító szerepét mutatja.

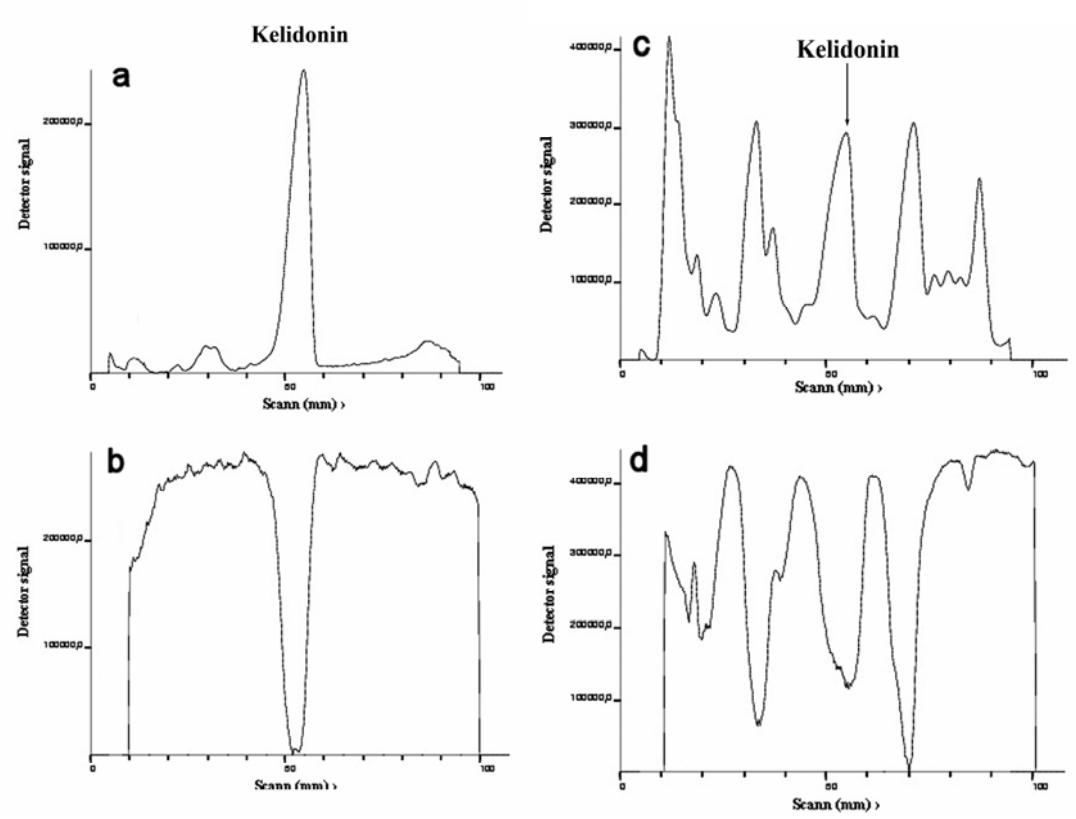
A kivonat alkaloid komponenseit megfigyelve hasonló antibakteriális hatáscsökkenést észleltünk, mint korábban az egyes alkaloidok esetében (**A** kromatogramokon). A *Chelidonium* alkaloidok antibiotikus hatásához szükséges HCHO az alkaloidok N-, illetve O-metil csoportjairól hasadhatnak le demetilezési reakció során, valamint szabad formában jelen lehet a baktérium sejtekben is. A **B** és **C** rétegeken jól megfigyelhető az L-arginin és glutation reverzibilis formaldehid-fogó tulajdonsága, mely igazolást adhat a formaldehiden keresztül történő antimikróbás hatás kialakulására.

A vékonyréteg-kromatogramon elválasztott alkaloid komponensek antibiotikus hatását a kifejlesztés után (λ = 305 nm), majd a réteg baktérium szuszpenzióba történő merítését és festését követően (λ = 590 nm) denzitometriás módszerrel igazoltuk (51.ábra).

Az **a** és **c** denzitogramok csúcsai pontos tükörképei lettek a „negatív” denzitogramokon látható „negatív” csúcsoknak (**b** és **d**).



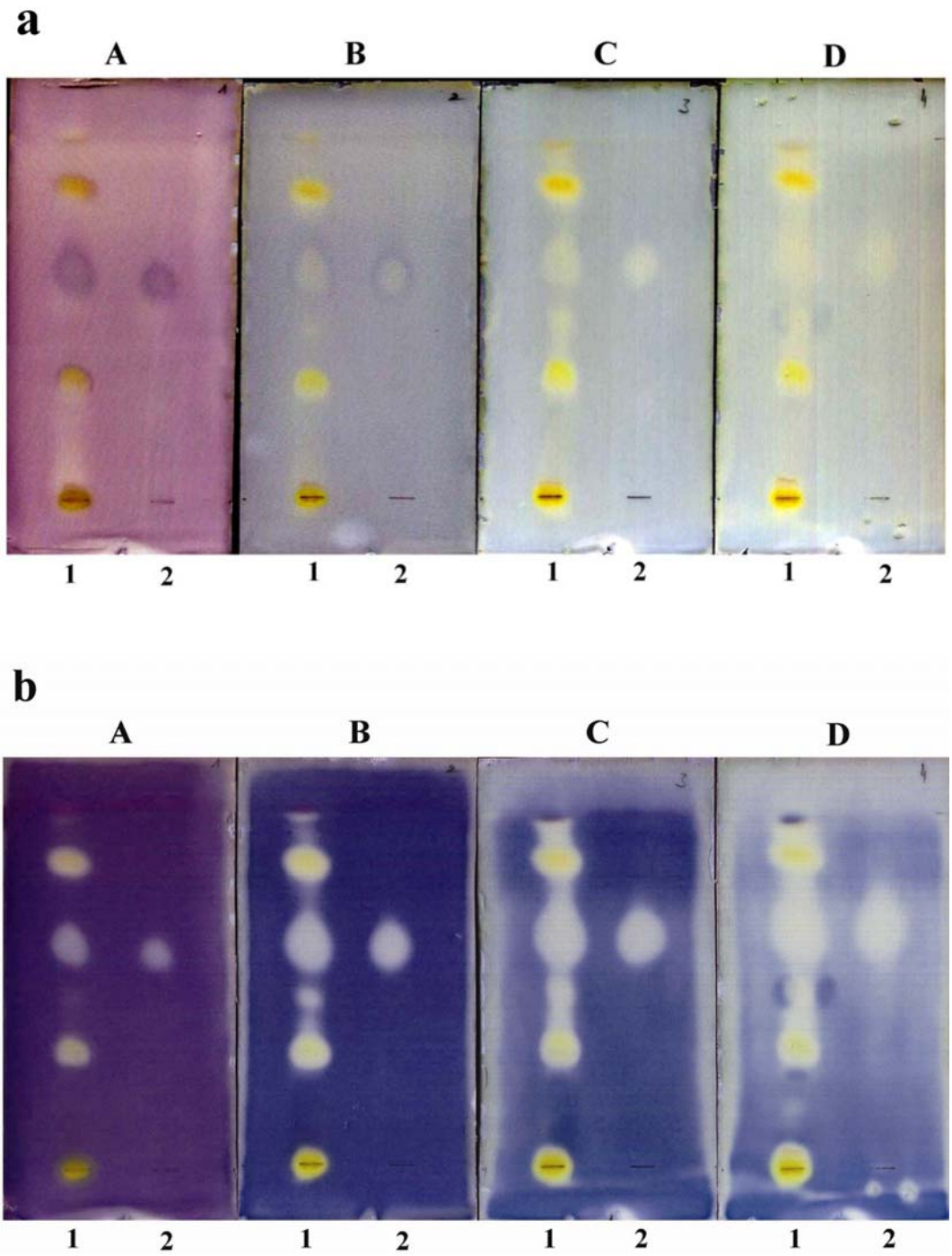
50.ábra 5 mg/ml L-arginin (**B**) és 5 mg/ml glutation (**C**) hatása 5 µl *Chelidonium* gyökér kivonat (**1** – 2,5 µl) és 3 µg kelidonium teszt alkaloid (**2** – 1,5µl) által okozott antibiotikus aktivitásra. **A** – a kontrol kromatogram (*Chelidonium*alkaloidok *Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola* baktériumra gyakorolt antibakteriális hatása); **a** – 2 óráva, **b** – 18 órával a festés után



51.ábra A kelidonin teszt alkaloid (a,b) és a *Chelidonium* gyökér kivonat (c,d) denzitogramja bioautográfia előtt λ = 305 nm-en (a,c) és után (b, d) λ = 590 nm-en

4.7.5. A Cu(II)-ion hatása a *Chelidonium* alkaloidok antibakteriális aktivitására

A továbbiakban a Cu(II) ion *Chelidonium* alkaloidok által okozott antibiotikus aktivitásra gyakorolt hatását vizsgáltuk a vérehulló fecskefű gyökeréből előállított kivonatában. A Cu(II) ion köztudottan nélkülözhetetlen eleme a biológiai rendszereknek. Eredményeink az mutatják, hogy a baktérium szuszpenzióhoz adagolt réz(II)-szulfát oldat (4, 6 és 8 mg/100 ml koncentrációban) drámai (három-négyszeres) antibakteriális hatásnövekedést mutatott (52.ábra). Megfigyeléseink összhangban vannak a fitoalexin transz-rezveratrol, illetve a mikotoxinok (aflatoxinok, ochratocin A) esetében tapasztalt Cu(II) ionok által közvetített hatásnövekedéssel (Tyihák és mtsai 2005).



52.ábra 4, 6 és 8 mg/100 ml koncentrációjú (**B**, **C**, **D**) $CuSO_4$ oldatok hatása a *Chelidonium* gyökér extraktum (1 - 2,5 µl), illetve a kelidonin tesztanyag (2 - 1,5 µl) által kiváltott antibiotikus aktivitásra. **A** – a kontrol kromatogram (*Chelidonium* alkaloidok *Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola* baktériumra gyakorolt antibakteriális hatása);
a – 2 óráva, **b** – 18 órával a festés után

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A gyógynövények kizárólag hagyományokra támaszkodó, népgyógyászati felhasználása helyett egyre nagyobb hangsúlyt kell kapnia a tudományos tényeken alapuló fitoterápiának. A vérehulló fecskefű ősidők óta alkalmazott gyógynövény, mely tárgyát képezi a ma folyó kutatásoknak is. Sajátos aktualitást ad a növény újraértékelésének a Chelidonii herba drog hivatalossá válása Magyarországon a 2006-ban életbe lépett VIII. Magyar Gyógyszerkönyv révén.

Célkitűzéseink között szerepelt gyors és könnyen kivitelezhető módszerek kidolgozása a tradicionális alkalmazását tekintve Európa-szerte jelentős felhasználású *Chelidonium majus* drogjainak és készítményeinek fitokémiai és farmakológiai vizsgálatára.

A gyógynövények és készítményeik biztonságos felhasználásának egyik kritikus pontja az alapanyag minősége. A begyűjtésből származó *Chelidonium* drogok felhasználása mindig több bizonytalanságot rejt magában, mint a termesztett drog-alapanyag alkalmazása. A globalizálódó világpiac és hazánk Európai Unióhoz történő csatlakozása Magyarországon is számos *Chelidonium* készítmény megjelenését teszi lehetővé. Ezzel párhuzamosan egyre több népszerűsítő anyag juthat el a felhasználókhoz is, mely ugrásszerűen megnövelheti az érdeklődést a vérehulló fecskefű és készítményei iránt. Munkánkkal szeretnénk hozzájárulni a vérehulló fecskefűvel kapcsolatos adatbázis teljesebbé tételéhez, valamint adatokat szolgáltatni a Magyarországon is hozzáférhető *Chelidonium* készítmények megalapozott terápiás felhasználásához nélkülözhetetlen bizonyítékok feltárásához. A különböző fitoanalítikai módszerek alkalmazási lehetőségeit vizsgálva igyekeztünk olyan egyszerű, költség-hatékony tesztrendszert összeállítani, amely a drogminősítés folyamatában eredményesen alkalmazható.

Az általunk gyűjtött herba minták (**A** és **B**) makro- és mikromorfológiai azonosítása után elvégeztük az előírt tisztasági, szárítási veszteség és összes hamutartalom, valamint a tartalmi anyagokat vizsgáló kvalitatív vékonyréteg-kromatográfiás és a megkövetelt kvantitatív alkaloid tartalmi meghatározást.

A vonatkozó cikkely követelményeinek a drogok az összalkaloid tartalom kivételével megfeleltek. Az alkaloid tartalom meghatározás alapján viszont egyik drog sem érte el a Ph.Hg.VIII. előiratában szereplő értéket (Herba **A** = 0,53%; Herba **B** = 0,42%).

A Chelidonii herba jelentősen eltérő báziserősségű alkaloidjainak egyidejű jelenléte miatt részletesebben is megvizsgáltuk a spektrofotmetriás összalkaloid mérés során a fáziscserére alkalmazott szerves oldószer szerepét. A gyógyszerkönyvben hivatalos alkaloid tartalom meghatározás során a folyadék-folyadék extrakcióhoz használt oldószer megváltoztatásaival nyert módszereket [Módszer 1 - kloroform (DAB 10); Módszer 2 - diklórmetán (Ph.Eur.5., Ph.Hg.VIII.); Módszer 3 – n-butanol (általunk javasolt módosítás)] összehasonlítottuk.

Megállapítottuk, hogy a bár a Ph.Hg.VIII. / Ph.Eur.5. (Módszer 2) előirata alapján magasabb alkaloid tartalom volt mérhető, mint a DAB 10 módszerével (Módszer 1), még jelentős mennyiségű alkaloid maradt megméretlenül a vizes fázisban. A pontosabb összalkaloid tartalom meghatározásra a folyadék-folyadék extrakcióhoz egy polárosabb szerves oldószer, a n-butanol használatát javasoltuk (Módszer 3). A spektrofotometriás módszerrel történő meghatározás során a fáziscseréhez a n-butanol használatát a kontrollként alkalmazott HPLC vizsgálatok alapján elsősorban a herbában legnagyobb mennyiségben előforduló alkaloid, a koptizin jobb kinyerése indokolta.

A minőségi drog előállítását Schilcher (1995) és más szerzők nyomatékos figyelem felhívása alapján is alapvetően befolyásolhatja a növényrészek aránya. Különösen igaz lehet ez a *Chelidonium majus* drogjai esetében. A nagyszámú alkaloid egymáshoz viszonyított aránya ugyanis jelentős mértékben lehet eltérő a nyersanyag függvényében. A hatóanyagok szintézise, transzlokációja, felhalmozódási dinamikája miatt fontos kérdés az egyes növényrészek egymástól elkülönült vizsgálata is.

A növényminták összalkaloid tartalmának szervenkénti megoszlását tanulmányozva megállapítottuk, hogy a legtöbb hatóanyagot a generatív szerv (1,54%) tartalmazta, melyet kis különbséggel a gyökér (1,43%) követett. A levélben (0,71%), illetve szárban (0,68%) meghatározott alkaloidok mennyisége messze elmaradt a generatív szervben mérttől.

Mivel a gyógyszerkönyvekben az összalkaloid tartalom meghatározására előírt spektrofotometriás mérés nem alkalmas az alkaloid összetétel meghatározására, munkánk célkitűzései között szerepelt olyan hatékony, gyors és kielégítő pontosságú vizsgáló módszer kidolgozása, amely az alkaloid komponensek külön-külön történő meghatározásán kívül a különböző fitotechnológiai eljárások hatékonyságának, valamint az elkészült növényi kivonatok minőségének ellenőrzésére is alkalmazható.

A HPLC módszerek a nagy pontosság mellett idő és munkaigényesek, tehát nagyszámú minta sorozatvizsgálatára kevésbé alkalmasak. Ezért egy VRK-denzitometriás módszert fejlesztettünk ki a vérehulló fecskefű gyökér, levél, szár, generatív szervei fő alkaloid komponenseinek (kelidonin, keleritrin, szangvinarin, koptizin és berberin) mennyiségi mérésére.

Az öt alkaloid denzitometriás mérés szempontjából is megfelelő vékonyréteg kromatográfiás elválasztására két kifejlesztő rendszer adott megoldást. A koptizin és berberin alkaloid komponensek jó elválást mutattak a kloroform : metanol (60 : 30 V/V) mozgó fázis alkalmazásakor, azonban a másik három alkaloid a frontra futott. A kelidonin, keleritrin, szangvinarin alkaloidok elválasztására a diklórmetán : metanol (97 : 3 V/V) volt a megfelelő kifejlesztő rendszer, ez esetben a berberin és koptizin a starton maradt. A kvaterner N-t tartalmazó alkaloidok esetében fluoreszcens reflexiós, míg a tercier kelidonin pontos mennyiségi meghatározására alkalmasabbnak látszott a abszorbanciás reflexiós módban történő mérés. A megfelelő detektálási mód kiválasztását követően megállapítottuk az optimális mérési hullámhosszakat (keleritrin: 320 nm, szangvinarin: 330 nm, koptizin: 360 nm, berberin: 340 nm, kelidonin: 286 nm). A kifejlesztés után a fluoreszenciás módban mérendő vegyületek foltjainál intenzitás növekedés lépett fel, ezzel mintegy tovább javítva a vizsgálat érzékenységét, ezért a kifejlesztett rétegeket 12 óra sötétben tárolás után denzitometráltuk. A kalibrációs görbék felvételekor a réteglapokra felvitt alkaloidok mennyisége és a mért területértékek lineáris kapcsolatát jól mutatták a 0,993 - 0,999 közé eső korrelációs koefficiens értékek. Modellvizsgálataink szerint a koptizin és szangvinarin alkaloidok esetében az 1-1 ng, míg a keleritrin és berberin vegyületek esetében a 2-2 ng a legkisebb detektálható mennyiség. A abszorbanciás reflexiós módban mért kelidonin alkaloid 100 ng mennyiségtől detektálható pontosan. Ugyanazon folt hatszor ismételt denzitometriás mérésének adataiból számított 0,67 – 1,24% közötti relatív standard deviációs értékek bizonyították a műszeres mérések megfelelő reprodukálhatóságát. Az ismételhetőségi vizsgálatok relatív standard deviációs értékei (3,3 – 4,8%) a módszert alkalmassá tették a *Chelidonium* minták fő alkaloid komponenseinek meghatározására.

Hogy a kifejlesztett VRK-denzitometriás módszer alkalmazhatóságáról még biztosabb képet nyerjünk, eredményeinket összevetettük a HPLC módszerrel meghatározott értékekkel. Az alkalmazott HPLC eljárás a *Chelidonium majus*-ban minor

komponensként előforduló tercier alkaloid: protopin mérésére is alkalmas, ugyanakkor nem ad lehetőséget a VRK-denzitometriával meghatározható keleritrin feldúsulásának jellemzésére. Ilyen szempontból a két eljárás ki is egészíti egymást. Megállapítottuk, hogy az általunk kidolgozott VRK-denzitometriás módszer nagyszámú növényi minta rutin mérésére gyorsan, olcsón, megfelelő érzékenységgel, jó reprodukálhatósággal és kielégítő pontossággal alkalmazható. A kifejlesztett VRK-denzitometriás mérés tehát alternatív lehetőség a HPLC mellett a *Chelidonium* drogok, illetve készítmények alkaloid összetételének vizsgálatában.

A két módszerrel (VRK-denzitometria és HPLC) is megerősített mérési eredmények alapján megállapítottuk, hogy a föld feletti részek (levél, szár, generatív szerv) fő alkaloidja a koptizin (levél: 509 mg/100g, szár: 289,3 mg/100g, generatív szerv: 970 mg/100g). A levél és generatív szerv alkaloid összetételében a fő komponens koptizin mellett a többi alkaloid igen kis mennyiségben van jelen. A szárban mért koptizin koncentráció alacsonyabb, de jelentős komponensek a kelidonin (78,2 mg/100g) és szangvinarin (107,9 mg/100g) is. A gyökérben a kelidonin található legnagyobb mennyiségben (376,3 mg/100g), ezt követi a szangvinarin (335,7 mg/100g) és koptizin (277,3 mg/100g) magas koncentrációja, de jelentős a föld alatti szerv keleritrin (168,7 mg/100g) és berberin (90,7 mg/100g) tartalma is.

A biológiai hatás élő szervezetben történő kialakulásának számos feltétele van, melyek között legfontosabb szerepe a gyógyszerformába történő kioldódásnak, a biohasznosulásnak, valamint a vegyület és szervezet kölcsönhatásainak van.

Az alkalmazott gyógyszerforma hatóanyag-tartalmát jelentős mértékben befolyásolja a gyógyszerkészítés alkalmazott technológiája. Az aktív komponensek mennyiségeinek ellenőrzése a technológiai folyamat során ideális hatóanyag-tartalmú készítmények elkészítését teszi lehetővé. Munkánk során a gyógynövények hagyományos alkalmazásának módszereire való tekintettel három különböző gyógyszerformát vizsgáltunk (főzet, forrázat és tinktúra). A különböző fitotechnológiai módszerek alkalmazásával lehetőség nyílt a Chelidonii herából a tradicionális gyógyszerkészítés szabályai szerint előállított kivonatok hatóanyag-tartalom változásának vizsgálatára a kivonási eljárás paramétereinek függvényében. Méréseinket spektrofotometriás (összalkaloid tartalom meghatározás), HPLC (alkaloid összetétel meghatározás) és ICP-OES (ásványelem tartalom meghatározás) módszerekkel végeztük.

A kivonatkészítési eljárástól függően jelentősen eltérő összalkaloid tartalom értékeket kaptunk (0,14 – 0,39%; m/m). A legmagasabb összalkaloid tartalmú készítmény a 90 V/V% alkohollal előállított tinktúra volt (0,39 g/100g). Az alkaloidok kioldódása a különböző gyógyszerformákba 33,2% (főzet) és 92,9% (90 V/V% alkohol tartalmú tinktúra) között változott. A tinktúrák kioldódási értékei alátámasztják a *Chelidonium* alkaloidok jó oldékonyságát szemipoláros oldószerekben (69,1 – 92,9%). A vizes gyógyszerformák közül a forrázat alkaloid tartalma (0,19 g/100g) bizonyult magasabbnak. Eredményeink alapján feltételeztük, hogy a hosszabb kioldódási idő (forrázat) okozza a jobb kioldódást, és a magasabb hőmérséklet (főzet) szerepe kisebb.

A herba drogból előállított tradicionális készítmények fő alkaloid komponenseként a koptizint azonosítottuk, melyet a vizes és alkoholos kivonatok eltérő mennyiségben tartalmaztak (126,5 – 354,1 mg/100g). A kioldódás értékek ismeretében megállapítottuk, hogy legnagyobb mennyiségben a 90V/V% alkohollal készült tinktúrába oldódott ki a koptizin (98%). Jó kioldódást mutatnak a tinktúrák esetében a tercier kelidonin (79,9 – 91,9%) és protopin (80,2 – 94,2%), valamint a kvaterner berberin is (80,5 – 85,7%). A szangvinarint azonban a 90V/V%-os tinktúra is csak 54,4%-ban oldotta ki. 37%-kal jobb kiodódást mutat a koptizin a 90V/V%-os alkohollal készült, mint a 40V/V%-os alkohollal előállított tinktúrába. Kétszer annyi szangvinarin oldódott ki a 90V/V% alkoholtartalmú tinktúrába, mint a 40V/V% alkohollal készültbe.

A vizes kivonatok (főzet és forrázat) alkaloid tartalma alacsonyabb. Közülük a forrázat készítés mind az öt általunk tanulmányozott alkaloid komponens tekintetében jobb kivonatkészítési eljárásnak bizonyult. A kelidonin (főzet: 45,3%; forrázat: 47,9%) és protopin (főzet: 46,7%; forrázat: 50,9%) alkaloidok vizes kivonatokba történő kiolódásértékei kisebb eltérést mutatnak, tehát a kivonási idő és alkalmazott hőmérséklet kevésbé befolyásolja a kioldódásukat, mint a kvaterner koptizinét (főzet: 35,0%; forrázat: 47,5%) és berberinét (főzet: 36,1%; forrázat: 48,8%). A szangvinarin kioldódása vizes kivonatokba drasztikusan alacsony értéket mutatott (főzet: 2,7%; forrázat: 5,1%).

A kvaterner alkaloidok (ionos állapot) vizes kivonatokban mért kioldódási értékei elmaradtak az általunk vártaktól, melyet a nagy hidrofób molekulaszerkezetükkel magyarázhatunk. A szangvinarin vizes kivonatban mért meglepően alacsony kioldódás értékeire (főzet: 2,7%; forrázat: 5,1%) magyarázatot adhat az irodalomból ismert

semleges pH-n kialakuló pszeudobázis (karbinolamin) forma, mely szerkezet a koptizin és berberin alkaloidok esetében csak magasabb pH viszonyok mellett alakul ki (Haberlein és Tschiersch 1994, Nakanishi és mtsai 1999).

Vizes (főzet és forrázat) és alkoholos (40 V/V% 70 V/V% és 90 V/V% etanollal készült tinktúra) kivonatok alkaloid kioldódás vizsgálatának tanulmányozásával adatokat kívántunk szolgáltatni a gyógyszerészeti és terápiás minőség szempontjából egyaránt jelentős alkaloid összetételre.

Mivel antibakteriális hatásvizsgálatainknál felvetődött a növényben található makro- és mikroelemek hatást módosító szerepének lehetősége, és a vérehulló fecskefűre vonatkozó részletes ásványelem meghatározást nem találtunk az irodalomban, ezért célkitűzéseink közé soroltuk a *Chelidonium* drogok, illetve a herbából a tradicionális gyógyszerkészítés szabályai szerint előállított kivonatok ásványelem tartalmának korszerű ICP-OES módszerrel való feltárását.

A várakozásnak megfelelően a vizes kivonatok ásványelem tartalma általában meghaladta az alkoholos kivonatokban mérhető mennyiségeket. Legnagyobb koncentrációban az elemeket a forrázat tartalmazta. A vizes kivonatok kioldódás értékei 10% – 65% között változtak, míg a tinktúrák esetében 1,3% - 58,1% közötti kioldódás értékeket mértünk. A legjobban kioldódó formában a kálium (35,7% - 64,9%), valamint a foszfor (29% - 58,1%) van jelen. A kálium legjobban a forrázatba (64,9%), míg a foszfor a 40 V/V% alkoholtartalmú tinktúrába (58,1%) oldódik ki. Az alumínium, réz, vas, nátrium és titán elemek vízben rosszul oldódó vegyületek formájában vannak jelen (10% alatti kioldódás); 20-40% közötti a magnézium, kén és cink kioldódása. Általánosan megállapíthatjuk, hogy növekvő alkohol koncentrációval csökken az ásványelemek kioldódása a tinktúrákba.

A terápiás felhasználás biztonsága szempontjából értékelve az eredményeket lényeges tapasztalat, hogy sem a vérehulló fecskefű föld feletti része és a gyökere, sem a herbából a tradicionális gyógyszerkészítés szabályai szerint készített kivonatok (főzet, forrázat, tinktúrák) nem tartalmaztak mérhető mennyiségben toxikus elemeket.

Úgy gondoljuk, hogy a kivonatok alkaloid és ásványelem kioldódás vizsgálatának eredményei segítséget nyújthatnak a Chelidonii herba drog eredményesebb felhasználásához. A vizsgálatok tapasztalatai felhasználhatók a további gyógyszerfejlesztéshez is.

A monográfiák pontatlan begyűjtési idő megjelölései, valamint az irodalmi adatok sokfélesége miatt további vizsgálatainkban választ kerestünk a Chelidonii herba és - radix optimális gyűjtési idejére.

Vizsgálataink szerint a május 20. és október 10. között két helyről begyűjtött herba drogok minden esetben megfeleltek a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv előírásának (összalkaloid tartalom: 0,65-1,06%), azonban az április 30-án teljes virágzást mutató herba drog összes alkaloid tartalma (0,46-0,52%) alatta maradt a gyógyszerkönyvi elvárásnak (0,6%).

A július 20-án Budapesten gyűjtött herba (1,06%) és gyökér (1,71%) drogokban kiemelkedő összalkaloid tartalom értékeket mértünk. Szeptember 20. után az alkaloid tartalom értékek herba drogokban csökkenést, míg gyökér drogokban emelkedő értékeket mutattak. A vegetációs periódus alatt gyűjtött herba és gyökér mintáinkban az összalkaloid tartalom mellett az egyes alkaloid komponensek változását is nyomon követtük. A legmagasabb koptizin mennyiséget a július 20-án begyűjtött herba mintában mértük (840,5 mg/100g). A 300mg/100g koncentrációt egyetlen további alkaloid sem haladta meg egyetlen vegetációs állapotban sem a Chelidonii herba vizsgálata során. A kelidonin (33,6 – 275,3 mg/100g) és szangvinarin (61,2 – 171,4 mg/100g) alkaloidok viszonylag nagyobb koncentrációban, míg a protopin (29,1-80,7 mg/100g) és berberin (16,8 – 51,3 mg/100g) alkaloidok alacsonyabb koncentrációban voltak jelen a herba mintákban.

Gyökérben a legnagyobb kelidonin koncentrációt a herbához hasonlóan a július 20-án gyűjtött mintában mértük (1247,2 mg/100g). A kelidonin (254,9 – 537,8 mg/100g) és szangvinarin (216,1 – 475,3 mg/100g) koncentrációja együtt növekedett az első virágzás és termésérés alatt (közel azonos értékeket mértünk), a másodvirágzásnál az együtt növekedés hasonlóan megfigyelhető, de a kelidonin mennyiségi értékei (897,7 - 1136,2 mg/100g) jóval meghaladják a mért szangvinarin értékeket (437,1 – 557,1 mg/100g). A gyökér mintákban a herbában domináns koptizin az első virágzáskor alig marad el a kelidonin és szangvinarin mögött, a másodvirágzásnál viszont arányát tekintve jelentéktelen a kelidoninhoz képest. A vegetációs periódust végig tekintve az öt mért alkaloid komponens közül a berberin (55,7 -120,7 mg/100g) található legkisebb mennyiségben a gyökér mintáiban is.

Az összalkaloid tartalom és a terápiás hatás szempontjából lényeges alkaloid arányok korszerű kromatográfiás módszerekkel is alátámasztott adatokat szolgáltatnak a helyes gyűjtési idő kiválasztásához. Összegezve a vegetációs periódus tanulmányozása során nyert eredményeinket megállapítottuk, hogy a legmagasabb összalkaloid értékeket a növény nyugalmi periódusában (két virágzás között) gyűjtött drogokban mértük. Ez az idő egyaránt alkalmas a herba és gyökér begyűjtésére.

Az antibiotikumok rendszeres használatával megnőtt a rezisztens mikróbatörzsek száma, ezért világviszonylatban mindinkább előtérbe kerülnek olyan védekezéstechnológiai kutatások, melyek természetes hatóanyagoknak a mikroorganizmusokkal szembeni hatásvizsgálatára irányulnak. A *Chelidonium* alkaloidok, valamint kivonatok antivirális, antibakteriális és antifungális hatása széleskörben ismert az irodalomban. A vérehulló fecskefű izokinolin vázas alkaloidjai N-, illetve O-atomján könnyen lehasadó metil csoportokat tartalmaznak, így potenciális formaldehid-adó molekuláknak tekinthetők, melyek a metilezési és demetilezési folyamatokon keresztül szerepet játszhatnak a *Chelidonium* alkaloidok hatásmechanizmusában. A *Chelidonium* alkaloidok antibakteriális hatásának, valamint az általunk feltételezett demetilálódást követő formaldehiden keresztül kialakuló hatás mechanizmusának tanulmányozására a konvencionális bioautográfia egy továbbfejlesztett változatát, a BioArena módszert használtuk.

A vérehulló fecskefű kelidonin, keleritrin, szangvinarin, berberin és koptizin alkaloidjai markáns antibiotikus hatással rendelkeznek a *Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola* baktérium sejtekre.

A HCHO-befogó vegyületeket (L-arginin és glutation) a baktérium szuszpenzióhoz adagolva az antibakteriális hatás csökkenését tapasztaltuk. A festés után 2 órával történő megfigyelés szerint az L-arginin kevésbé, míg a glutation erősebben csökkentette az antibiotikus hatást. A festés utáni 18. órában az L-arginin formaldehid-befogó hatása csökkent, és ismét kialakult az alkaloidok erős antibakteriális hatása (reverzibilis reakció), ugyanakkor a glutation szinte teljesen megszüntette az alkaloidok antibiotikus hatását. Eredményeink alátámasztják azt a feltételezést, hogy az alkaloidok antibakteriális hatásának kialakulásában a demetilálódást követő formaldehid képződésen keresztül megvalósuló hatás mechanizmus érvényesül.

6. IRODALOMJEGYZÉK

Abourashed, A.E., Khan, I.A. (2001): High performance liquid chromatography determination of hydrastine and berberine in dietary supplements containing goldenseal. Journal of Pharmaceutical Sciences, 90, 817-822.

Adams, R.L., Burdon, R.H. (1985): Molecular Biology of DNA Methylation. Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo.

Adler, M., Appel, K., Canal, T., Corvi Mora, P., Delfino, R., Gennaro, R., Gritzko, K., Pascolo, L, Ruzzier, F., Tiribelli, C., Wallner, B., Schulze, J. (2006): Effects of *Chelidonium majus* extracts in human hepatocytes in vitro. Toxicology Letters, 164, S210-S211.

Amoros, M., Fauconnier, B., Girre, L. (1977): Antiviral effects of some plant extracts. Annales Pharmaceutiques Francaises, 35, 371-376.

Arzneibuch der Demokratischen Republik, 2.Ausgabe, Akademie Verlag, Berlin, 1975, Bd. 4.

Babior, M.B., Takeuchi, C., Ruedi, J., Gutierrez, A., Wentwort, P. (2003): Investigating antibody-catalized ozone generationby human neutrophils. Proceedings of the National Academy of Science USA, 100, 3031-3034.

Baird, A.W., Taylor, C.T., Brayden, D.J. (1997): Non-antibiotic anti-diarrhoeal drugs: factors affecting oral bioavailability of berberine and loperamide in intestinal tissue. Advanced Drug Reviews, 23, 111-120.

Bast, A., Chandler, R.F., Choy, P.C., Delmulle, L.M., Gruenwald, J., Halkes, S.B., Keller, K., Koeman, J.H., Peters, P., Przyrembel, H., De Ree, E.M., Renwick, A.G., Vermeer, I.T. (2002): Botanical health products, positioning and requirements for effective and save use. Environmental Toxicology and Farmacology, 12, 195-211.

Baumann, J.C., Heintze, K., Muth, H.W. (1971): Klinisch-experimentelle Untersuchungen der Gallen- Pancreas- und Magensaftsekretion unter den phytocholagogen Wirkstoffen einer Carduus marianus-Chelidonium-Curcuma Suspension. Arzneim-Forsch., 21, 98-101.

Begue, W.J., Kline, R. M. (1972): The use of tetrasolium salts in bioautographic procedures. J. Chromatogr.A, 64, 182-184.

Benninger, J., Schneider, T.H., Schuppan, D., Krirchner, T., Hahn, E.G. (1999): Acute hepatitis induced by greater celandine (*Chelidonium majus* L.). Gastroenterology, 117, 1234-1237.

Betina, V. (1973): Bioautography in paper and thin layer chromatography and its scope in the antibiotic field. J. Chromatogr., 78, 41-51.

Bilow, J., Speaker, T.J. (1972): Bioautography of antibiotic compounds: a simplification and improvement. J. Chromatogr. A, 67, 191-192.

Bíró, B., Lindner, K. (1995): Tápanyagtáblázat (12. átdolgozott, bővített kiadás) Medicina Könyvkiadó, Budapest. pp.25.

Bocsi, J., Nagy, K., Tyihák, E., Trézl, L., Szende, B. (1998): Reduction of apoptosis of in vitro cultured lymphocytes of HIV-positive persons by N-hydroxy-methylated-L-arginine and 1'-methyl-ascorbigen. Acta Biol. Hung., 49, 331-337.

Bocharova, O.A., Karpova, R.V., Kasatkina, N.N., Polunina, L.G., Komarova, T.S., Lygenkova, M.A. (1999): The antiproliferative activity for tumor cells is important to compose the phytomixture for prophylactic oncology. Farm. Vestn, 50, 378-379.

Boegge, S.C., Kesper, S., Verspohl, E.J., Nahrstedt, A. (1996): Reduction of Ach-induced contraction of rat isolated ileum by coptisine, caffeoylmalicacid, Chelidonium majus and Corydalis lutea extracts. Planta Med., 62, 173-174.

Bone, K. (2000): Adverse reaction reports: hepatitis induced by greater celandine. Phytother., 5, 11-16.

Botz, L., Nagy, S., Kocsis, B. (2001): Detection of microbiologically active compounds. In: Planar Chromatography, Nyiredy, Sz. (ed.), Springer, Budapest, pp. 489-516.

Botz, L. (2005): Bioassays: Microbial Tests: Bioautography. In: Encyclopedia of Analytical Science, Worsford, R.,m Townshed, A., Poole, C. (eds), Elsevier Academic Press, Vol.1., pp. 271-277.

Boyko, V.N., Voltchek, I.V., Petrov, A.S., Bubnov, V.P. (1996): Action of Ukrain, a cytostatic and immunomodulating drug on effectsof irradiation. Drugs Exptl. Clin Res., 22, 167-171.

Briviba, K., Klotz, L.O., Sies, H. (1997): Toxic and signaling effect of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems. Biol. Chem., 378, 1259-1265.

Brüller, W. (1992): Studies concerning the effect of Ukrain in vivo and in vitro. Drugs Exptl. Clin. Res., 18 (suppl.), 13-16.

Bugatti, C., Colombo, M.L., Tome, F. (1987): High-performance liquid chromatographic separation of quaternary alkaloids of *Chelidonium majus* L. roots. J. Chromatogr. A, 393, 312-316.

Burgyán, J., Szarvas, T., Tyihák, E. (1982): Increased formaldehyde production from L-methionine by crude enzym of TMV infected tobaccos. Acta Phytopath. Acad, Sci. Hung., 17, 11-15.

Capasso, R., Izzo, A.A., Pinto, L., Titobello, C., Mascolo, N. (2000): Phytotheraphy and quality of herbal medicines. Fitoterápia, 71, S58-S65.

Casanova, N., Deyo, D.F., Heck, D.H. (1989): Covalent binding of inhalated formaldehyde to DVA in the nasal musose of Fischer 344 rats- Analysis of formaldehyde and DNA by high-performance liquide chromatography and provisional pharmacokinetic interpretation. Fund. Appl. Toxicol., 12, 197-417.

Cerny, E., Gulda, O., Parma, R. (1970): The influence of chelidonine on changes in the liver caused by carbon tetrachloride. Scripta Medica, 43, 77-82.

Chandra, R.K. (1988): Essential and toxic trace elements in human health and disease. Alan R. Liss Inc., NewYork, pp. 337-346.

Chang, J. (2000): Medicinal Herbs: Drugs or Dietary Supplements? Biochemical Pharmacology, 59, 211-219.

Chizzola, R., Franz, C. (1996): Metalic trace elements in medicinal and aromatic plants from Austria. Angew. Bot., 70 (1/2), 52-26

Ciebiada, I., Korczak, E., Nowicky, J.W., Denys, A. (1996a): Estimation of direct influence of Ukrain preparation on influenza viruses and the bacteria E.coli and S.areus. Drugs Exptl. Clin. Res., 22, 219-223.

Ciebiada, I., Korczak, E., Nowicky, J.W., Denys, A. (1996b): Does the Ukrain preparation protect mice against lethal doses of bacteria? Drugs Exptl. Clin. Res., 22, 207-211.

Collins, J.J., Esmen, N.A., Hall, T.A. (2001): A review and meta-analysis of formaldehyde exposure and pancreatic cancer. Am. J. Int. Med., 336-345.

Colombo, M.L., Bosisio, E. (1996): Pharmacological activities of *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae). Pharmacological Research, 33, 127-134.

Cordes, N., Plasswilm, L., Bamberg, M., Rodemann, H.P. (2002): Ukrain, an alkaloid thiophosphoric acid derivative of Chelidonium majus L. protects human fibroblasts but not human tumour cells in vitro against ionizing radiation. International Journal of Radiation Biology, 78, 17-27.

Council Directive 65/65/EEC. Ont he approximation of provisions laid down by law, regulation or administrative action relating to proprietary medicinal products. January 1965.

Craig, W.J. (1999): Health promozing properies of common herbs. American Journal of Clinical Nutrition, 70, 491S-499S.

Csiba, A., Trézl, L., Tyihák, E., Graber, H., Vári, É., Téglás, G., Rusznák, I. (1982): Assumed role of L-arginine in mobilization of endogenous formaldehyde. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 59, 35-41.

Dahl, T.A., Midden, W.R., Hartman, P.E. (1987): Pure singlet oxygen cytotoxicity for bacteria. Photochemistry and Photobiology, 46, 345-352.

Dános, B. (1997): A gyógynövénytan alapjai. Farmakobotanika, Arumentum, Budapest, pp. 212.

Dános, B. (1998): Gyógynövényismeret III., Farmakobotanika, Semmelweis Kiadó, pp. 33, 43.

De Rosa, S., Di Vincenso, G. (1992): Isochelidonine, a benzophenanthridine alkaloid from *Chelidonium majus*. Phytochemistry, 31, 1085-1086.

Deutsches Arzneibuch (DAB 10), Schöllkraut-Chelidonii herba (1999).

Deutschmann, F., Hohmann, B., Sprecher, E., Stahl, E. (1979): Drogenanalyse I: Morphologie und Anatomie, Pharmazeutische Biologie, pp. 150-151.

Drake, N.A. (1950): Photography of antibiotic papergrams. J. Amer. Chem. Soc., 72, 3803.

Dzido, T. (1988): Modification of retention of some alkaloid sin the system silanized silica/methanol + water + di(2-ethylhexyl)ortophosphoric acid. J. Chromatogr. A, 439, 257-266.

Dzink, J.L., Socransky, S.S. (1985): Comperative in vitro activity of sanguinarine against oral microbial isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 27, 663-665.

Ernst, E, Weihmayr, T. (1998): Phytotherapie (Schöllkraut). Fortschritte dr Medizin, 17, 37-39.

Ernst, E., Schmidt, K. (2005): Ukrain - a new cancer cure? A systematic review of randomised clinical trials. BMC Cancer, 69, 251-157.

ESCOP monographs ont he medicinal uses of plant drugs./ Chelidomii herba. European Scientific Cooperative on Phytoteraphy (1996).

European Pharmacopoeia (2004) (Ph.Eur.5.) Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France, pp 1690.

Fik, E., Gozdzicka-Jozefiak, A., Kfdzia, H. (1995): Isolation and characterisation of glycoproteins frpm milky juice leaves and roots of *Chelidonium majus* L. Herba Pol., 41, 241-253.

Fik, E., Wolun-Cholewa, M., Kistowska, M., Warchol, J.B., Gozdzicka-Jozefiak, A. (2001): Effect of lectin from Chelidonium majus L. on normal and cancer cells in culture. Folia Histochemica et Cytobiologica, 39, 215-216.

Fischer, R., Lautner, H. (1961): On the paper chromatographic detection of penicillin preparations. Arch. Pharm., 66, 1-7.

Formulae Normales VII. (OGYI), Melania Könyvkiadó, Budapest, 2003.

Franz, C., Fritz, D. (1979): Experience with the cultivation of Chelidonium majus L. Planta Med., 41, 246-247.

Freile, M.L., Giannini, F., Pucci, G., Sturniolo, A., Rodero, L., Pucci, O., Balzareti, V., Enriz, R.D. (2003): Antimicrobial activity of aqueous extracts and of berberine isolated from *Berberis heterophylla*. Fitoterapia, 74, 702-705.

Freytag, W.E. (1980): Directe Dünnschichtchromatographie Bestimmung von Chelidonium-Alkaloiden. Planta Med. 40, 278-283.

Freytag, W.E. (1986): Quantitative Bestimmung der Alkaloide Chelidonin, Chelerythrin und Sanguinarin in *Chelidonium majus* L. durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie. (HPLC). Dtsch. Apoth. Ztg. 126, 1113-1117.

Fulde, G., Wichtl, M. (1994): Analytik von Schöllkraut. Deutscher Apotheker Zeitung, 135, 1031-1035.

Furusawa, E., Furusawa, S., Kroposki, M., Cutting, W. (1970): Higher plants as a source of antiviral agents. Prog. Antimicrob. Anticancer Chemother., 2, 810-817.

Gansauge, F., Ramadani, M., Pressmar, J., Gansague, S., Muehling, B., Stecker, K., Cammere, G., Leder, G, Beger, H.G. (2002): NSC-631570 (Ukrain) in the palliative treatment og pancreatic cancer. Results of a phase II trial. Langenbeck's Arch. Surg., 386, 570-574.

Gelencer, M., Turecek, P.L., Kistner, O., Mittere, A., Savidis-Dacho, H., Barrett, N.P. (2006): In vitro and in vivo anti-retroviral activity of the substance purified from the aqueous extract of Chelidonium majus L. Antiviral Research, 72, 153-156.

Gibbons S., Leimkugel, J., Oluwatuyi, M., Heinrich, M. (2003): Activity of *Zanthoxylum clava-herculis* extracts against multi-drug resistant methicillin-resisitant *Staphylococcus aureus* (mdr-MRSA). Phytother.Res., 17, 274-275.

Goodall, R.R., Levi, A.A. (1946): A microchromatographic method for the detection and approximate determination of the different penicillins in the mixture. Nature, 158, 675-676.

Ghosh, A.K., Rakshit, M.M., Ghosh, D.K. (1983): Effect of berberine chloride on *Leishmania donovani*. Indian Journal of Medicinal Research, 78, 407-416.

Ghosh, A.K., Bhattacharyya, F.K., Ghosh, D.K. (1985): *Leishmania donovani* amastigote inhibition and mode of action of berberine. Experimental Parasitology, 60, 404-413.

Golkiewicz, W., Gadzikowska, M., Kuczynski, J., Jusiak, L. (1993): Micropreparative chromatography of some alkaloids from the roots of *Chelidonium majus* L. J. Planar Chromatogr., 6, 382-385.

Golkiewicz, W., Gadzikowska, M. (1999): Isolation of some quaternary alkaloids from the extract of roots of Chelidonium majus L.by column and thin layer chromatography. Chromatographia, 50, 52-56.

Golkiewicz, W., Blazewicz, A., Jozwiak, G. (2001): Isolation of milligram quantities of sanguinarine and chelerithrine from the roots of *Chelidonium majus* L. by zonal micropreparative TLC. J. Planar Chromatogr., 14, 95-99.

Greenberg, J.M., Zhao, N.S., Hage, J. (1989): Chemical evolution of interstellar dust, comets and the origins of life. Ann.Phys. Paris, 14, 103-131.

Greving, I., Meister, V., Monnerjahn, C., Müller, K.M., May, B. (1998): Chelidonium majus: A rare reason for severe hepatotoxic reaction. Pharmacoepidemiology and Drug Safety, 7, S66-S69.

Guil-Guerrero, J.L., Giménez Martinez.J.J., Torija Isasa, M.E. (1998): Mineral nutrient composition of edible wide plants. Journal of Food Composition and Analysis, 11, 322-328.

Gyógytermék Vademecum ’95, ’96, ’97. Primex-Pharma, Budapest, 1995-1997.

Haberlein, H., Tschiersch, K.P., Boonen, G., Hiller, K.O. (1996): *Chelidonium majus* L.: Components with *in vitro* affinity for the $GABA_A$ receptor. Positive cooperation of alkaloids. Planta Med., 62, 227-231.

Habrich, C. (1993): Das Schöllkraut. Münch. Med. Wschr., 135, 68-69.

Hagers Handbuch der pharmaceutischen Praxis. Springer Berlin- Heidelberg- New York, 5. Auflage. Bd. 4, 836-848. (1993).

Hahn-Deinstrop, E. (1994): Schöllkraut- Dünnschichtchromatographie Untersuchungen. Deutscher Apoteker Zeitung, 134, 4449-4454.

Halmai, J., Novák,I. (1963):Farmakognózia. Medicina Könyvkiadó, Budapest, pp. 220-222.

Hambuger, M.O., Cordell, G.A. (1987): A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. J. Nat. Prod., 50, 19-22.

Hamler, F., Hiesmayr, W., Korsh, O., Melnyk, A. (1996): Ukrain monotherapy in malignant melanoma (case report). Drugs Exptl. Clin. Res., 22, 235-237.

Hahn, R., Narhrstedt, A. (1993): Hydroxycinnamic acid derivatives, caffeoylaldonic acid esters from Chelidonium majus. Planta Med., 59, 71-75.

Han, L.F., Nowicky, W., Gutmann, V. (1991): Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of tertiary and quaternary alkaloids from *Chelidonium majus* L. J. Chromatogr. A, 543, 123-128.

Han, L.F., Linert, W., Gutmann, V. (1992): Temperature dependence of the capacity factors of alkaloids in reversed-phase liquid chromatography. Journal of Chromatographic Science, 30, 142-146.

Heck, H., Casanova, M., Starr, T.B. (1990): Formaldehyde toxicity- new understanding. Crit. Rev. Toxicol., 2, 397-426.

Hejmankova, N., Wlterova, D., Preninger, V. (1984): Antifungal activity of quaternary benzophenanthridine alkaloids from Chelidonium majus. Fitoterapia, 55, 291-294.

Hiller, K.O., Ghorbani, M., Schilcher, H. (1998): Antispasmodic and relaxant activity of chelidonine, protopine, coptisine and Chelidonium majus extracts on isolated guinea-pig ileum. Planta Med., 64, 758-760.

HMPWP – Ad hoc Working Group on Herbal Medicinal Products of The European Agecy for Evaluation of medicinal products (EMRA) a 65/65EEC és 75/31EEC rendeletekre vonatkozó végső kiegészítései EMEA/HMPWP/8/1999-1999.január 28.

Houghton, P.J. (1995): The role of plants in traditional medicine and current therapy. Journal of Alternative Complementary Medicine, 1, 131-143.

Huszti, S, Tyihák, E. (1986): Formation of formaldehyde from S-adenosyl-L-(methyl-^{3}H) methionine during enzymic transmethylation of histamine. FEBS Lett., 209, 362-366.

IARC (Internal Agency of Research on Cancer) (1995): Monographs on the evaluation of carciogenic risk to humans, Vol. 62, Wood dust and formaldehyde (World Health Organisation , Geneva, Switzerland)

Ivanovska, N., Philipov, S. (1996): Study on the anti-inflammatory action of *Berberis vulgaris* root extract, alkaloid fractions and pure alkaloids. Int. J. Immunopharmac., 18, 553-561.

Iwasa, K., Kamigauchi, M., Ueki, M., Taniguchi, M. (1996): Antibacterial activity and structure-activity relationships of berberine analogs. Eur. J. Med. Chem., 30, 469-478.

Jagekko-Wojtowicz, E., Kleinrok, Z., Nowicky, J.W., Jablonski, M., Gorzelak, M., Chodkowska, A, Feldo, M., Matuszek, B. (1996): Effect of six-month treatment with Ukrain on

early osteoporosis induced by ovariectomy in rats. Part I: Preliminary studies of bone parameters. Drugs Exptl. Clin. Res., 22, 173-176.

Jain, L., Shahoo, R.K., Sondhi, S.M. (1992): Analysis for mineral elements of some medicinal plants. Indian Drugs, 29(4), 187-190.

Jang, S.I., Kim, B.H., Lee, W.Y., An, S.J., Choi, H.G., Jeon, L.H., Chung, H.T., Rho, J.R., Kim, Y.J., Chai, K.Y. (2004): Stylopine from Chelidonium majus inhibits LSP-induced inflammatory mediators in Raw 264.7 cells. Archives of Rharmacol. Res. (Seoul), 27, 923-929.

Juszkiewicz, T., Minta, M., Wlodarczkyk, B., Biernacki, B. (1992): Teratological evaluation of Ukrain in hamsters and rats. Drugs Exptl. Clin. Res.,18 (suppl.), 23-29.

Kadan, G., Gözler, T., Shamma, M. (1990): Turkiyenine, a new alkaloid from *Chelidonium majus*. J. Natur. Prod., 53, 531-532.

Kadan, G., Gözler, T., Hesse, M. (1992): Norchelidonine from *Chelidonium majus*. Planta Med., 58, 447.

Kadan P., Korsh, O.B., Miesmyr, W. (1996): Ukrain in the treatment of urethral recurrent carcinoma. Drugs Exptl. Clin. Res., 22, 271-273.

Kaneda, Y., Torii, M, Tanaka, T., Aikawa, M. (1991): In vitro effects of berberine sulfate ont he growth and structure of *Entamoeba histolytica, Giardia lamblia, Trichomonas vaginalis.* Annals of tropical medicine and parasitology, 85, 417-425.

Kataba-Pendias, A., Pendias, H. (2000): Trace elements in soils and plants. 3.ed., CRC Press, Boca Raton, Florida

Kátay, Gy., Tyihák, E. (1998): Effect of 1'-methyl-ascorbigen on the resistance potencial plants to pathogens. Acta Biol. Hung., 49, 429-436.

Kátay, Gy., Adrian-Romero, M., Németh, Zs.I.,Blunden, G, Tyihák, E., Albert, L. (2002): Specroscopic and OPLC identification and measurement of formaldehyde and potential formaldehyde generators in macroscopic fungi. J. Planar Chromatogr., 15, 28-33.

Kedvessy, Gy. (1978): Gyógyszertechnológia, Medicina Kiadó, Budapest.

Kéry, Á., Horváth, J., Nász, I, Verzár-Petri, G., Kulcsár, G. (1987): Antiviral alkaloids in Chelidonium majus L. Acta Pharm. Hung., 57,19-25.

Kim, H.K., Farnsworth, R.N., Blomster, R.N., Fong, H.H. (1969): Biological and phytochemical evaluation of plants V: Isolation of two cytotoxic alkaloids from Chelidonium majus. J. Pharm. Sci., 58, 372-374.

Kochevar, I.E., Lynch, M.C., Zhuang, S., Lambert, C.R. (2000): Singlet oxygen, but not oxydizing radicals, induces apoptosis in HL-60 cells. Photochemistry and Photobiology, 72, 548-553.

Kokoska, L., Polesny, Z., Rada, V., Nepovim, A., Vanek, T (2002): Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. J. Ethnopharmacol., 82, 51-53.

Kommission-E Monograph: Chelidonium majus. Bundesanzeiger No. 190.a., 10. 10. 1985.

Kniebel, R., Urlacher, W. (1993): Therapie krampfartigen Abdominalschmerzen. Hochdosierter Schöllkraut extract bei krampfartigen Abdominalschmerzen. Z. Allg. Med., 69, 680-684.

Ko, F.N., Wu, T.S., Lu, S.T., Wu, Y.C., Huang, T.F., Teng, C.M. (1992): Ca-chanel blockade in rat thoracicaotra by protopine isolated from Corydalis tubers. Jap. J. Pharmacol., 58, 1-9.

Kosina, P., Walterova, D., Ulrichova, J., Lichnovsky, V., Stiborova, M., Rydlova, H., Vicar, J., Krecman, V., Brabec, M.J., Simanek, V. (2003): Sanguinarine and chelerythrine: assesment of safety on pigs in ninetydays feeding experiment. Food and Chemical Toxicilogy, 41, 85-91.

Kroiss, T., Melnyk, A, Korsh, O.B. (1996): Ukrain treatment in carcinoma of the cervix (case report). Drugs Exptl. Clin. Res., 22, 255-257.

Kuo, C.L., Ch, C.W., Liu, T.Y. (2004): The anti-inflammatory potencial of berberine in vitro and in vivo. Cancer Letters, 203, 127-137.

Kursinszki, L., Sárközi, Á., Kéry, Á., Szőke, É. (2006): Improved RP-HPLC method for analysis of isoquinoline alkaloid sin extracts of *Chelidonium majus*. Chromatographia, 63, S131-S135.

Kustrak, D., Petricic, J., Kalodera, Z, Holik, L. (1982): Sesonal changes of alkaloid contents in celandine (Chelidonium majus L.). Acta Pharm. Jugosl., 32, 225-230.

Laduron, P.M., Verwimp, M.F., Janssen, P.F., Gommeren, W.R. (1975): tisue fractination in rat brain, kidney and liver. Intracellular localization of a 5-methyltetrahydrofolic acid requiring enzyme. Biochimie, 57, 253-260.

Laforest, L., Luce, D., Goldberg, P., Lee, R.W., Akimenco, M.A. (2000): Laringeal and hypopharingeal cancers and occuptional exposure to formaldehyde and various dust: a case-control study in France. Occup. Environ, Med., 57, 767-773.

Lemberkovics, É., Czinner, E., Szentmihályi, K., Balázs, A., Szőke, É. (2002): Comparative evaluation of *Helichrysi flos* herbal extracts as dietary sources of plant polyphenols, and macro- and microelements. Food Chem., 78, 119-127.

Lenfeld, J., Kroutil, M., Marsalek, E., Slavik, J., Preninger, V., Simanek, V. (1981): Antiinflammatory activity of quaternary benzophenanthridine alkaloids from Chelidonium majus. Planta Med., 43, 161-165.

Liepins, A., Nowicky, J.W. (1996): Modulation of immune errector cell cytolytic activity and tumour growth inhibition in vivo by Ukrain (NSC 631570). Drugs Exptl. Clin. Res., 22, 103-113.

Lin , H., Hollenberg, P.F. (2001): N-nitrosodimetilamin-mediated formation of oxidized and methylated DNA bases in a cythocrome P450 2E1 expressing cell line. Chem. Res. Toxicol., 14, 562-566.

Lin Z., Lou, W., Li, H., Zhang, Y. (2005): The effect of endogenous formaldehyde on the rat aorta endothelial cells. Toxicology Letters, 159, 134-143.

Lin, W.C., Chang, H.L. (1995): Relaxant effects of berberine on the rat fundus. Res. Commun. Molec. Pathol. Pharmacol., 90, 333-346.

Lohninger, A., Hamler, F. (1992): Chelidonium majus L. (Ukrain) in the treatment of cancer patients. Drugs Exptl. Clin. Res., 18 (suppl.), 73-77.

Lohninger, A., Korsh, O.B., Melnyk, A. (1996): Combined terapy with Ukrain and chemotherapy in ovarian cancer (case report). Drugs Exptl. Clin. Res., 22, 259-262.

Lozjuk, R.M., Lisnyak, O.I., Lozjuk, L.V. (1996): Theoretical grounds and experimental confrmation of the antiviral effect of the preparation Ukrain. Drugs Exptl. Clin. Res., 22, 213-217.

Lozyuk, L.V. (1977): Antiviral properies of some compounds of plant origin. Mikrobiol. Zh. (Kiev), 39, 343-348.

Lund, B. M., Lyon, G.D. (1975): Detection of inhibitors of *Erwinia carotovora* and *E. herbicola* on thin-layer chromatograms. J. Chromatogr., 110, 192-196.

Luo, X., Chen, B., Yao, S. (2004): High performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometry for rapid and sensitive determination of sanguinarine and chelerythrine in exogenously contaminated honey. Chromatographia, 60, 347-351.

VIII. Magyar Gyógyszerkönyv (Ph. Hg. VIII.) (2004) Medicina Kiadó, Budapest, pp. 1512-1513.

Máday, E., Szentmihályi, K., Then, M., Szőke, É. (2000): Mineral element content of chamomile. Acta Alimentaria, 29, 51-57.

Mahady, G.B., Pendland, S.L., Stoia, A., Chadwick, L.R. (2003): In vitro susceptibility oh Helicobacter pylori to isoquinoline alkaloids from *Sanguinaria canadensis* and *Hydrastis canadensis.* Phytoter. Res., 17, 217-221.

Mahajan, V.M., Sharma, A., Rattan, A. (1982): Anti-mycotic activity of berberine sulfate – an alkaloid from an indian medicinal herb. Sabouraudia – Journal of Medical and Veterinary Mycology, 20, 79-81.

Malinowska, I., Gadzikowska, M., Waksmundzka-Hajnos, M., Kramek, A. (2005): Mobile phase velocity – a tool for separation of alkaloids by OPLC. J. Planar Chromatogr., 18, 176-180.

Matos, O.C., Baeta, J., Silva, M.J., Pinto Ricardo, C.P. (1999): Sensitivity of Fusarium stains to Chelidonium majus L. extracts. J. Ethnopharmacol., 66, 151-158.

Matysik, G., Jusiak, L. (1990): Stepwise gradient in thin layer chromatography of Chelidonium alkaloids. J Chromatogr A., 518, 273-276.

Meier, B. (1991): The extraction strength of ethanol/water mixtures commonly used for the processing of herbal drugs. Planta Med., 57, A26.

Mengel, K. (1976): A növények táplálkozása és anyagcseréje. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest

Merk, O., Speit, G. (1998): Significance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks for mutagenesis. Environmental and Molecular Mutagenesis, 32. 260-268.

Mills, S., Bone, K. (2000): Principles and practise of phytoteraphy-Modern herbal medicine. Churchill Livingstone, London, pp. 335-340.

Mincsovics, E., Garami, G., Kecskés, L., Tapa, B (1999):Personal Overpressured-Layer Chromatography (OPLC) Basic System 50, Flexible Tool in Analytical and Semipreparative Work. Journal of AOAC International, 82, 587-598.

Mitra, S., Sur, R.K., Roy, A., Mukherjee, A.S. (1996): Effect of Chelidonium majus L. on experimental hepatic tissue injury. Ohytotherapy Research, 10, 354-356.

Mitscher, L.A., Park, Y.H., Clark, D, Clark, G.W., Hammesfahr, P.D., Wu, W.N., Beal, J.L. (1978): Antimicrobial agents from hiher plants. An investigation of Hunnemannia fumariaefolia pseudoalcoholates of sanguinarine and chelerythrine. Lloyda, 41, 145-149.

Móritz, Á., Otta, K.H., Ott, P.G., Tyihák, E. (2003): Separation and detection of aflatoxins using overpressured layer chromatography and bioautography. J. Planar Chromatogr., 16, 417-420.

Musumeci, R., Speciale, A., Costanzo, R., Annino, A., Ragusa, S., Rapisarda, A., Pappalardo, M.S., Iauk, L. (2003): *Berberis aetnensis* C. Presl. Extracts: antimicrobial properies and interaction with ciprofloxacin. International Journal of Antimicrobial Agents, 22, 48-53.

Nagy, S., Kocsis, B., Dolgos, B., Kőszegi, T., Botz, L. (2002): Optimalised detection conditions for direct bioautography. In: Proceedings of the International Symposium on Planar Separation, Hévíz, pp. 329-335.

Nakanishi, T., Suzuki, M., Saimoto, A., Kabasawa, T. (1999): Structural considerations of NK109, an antitumor benzophenanthridine alkaloid. J. Nat. Prod., 62, 864-867.

Nikolic, M., Arsic, N., Velijkovic, V. (2002): Detemination of chelidonine in celandine (*Chelidonium majus* L) oily extracts. Medical Plant Report, 9, 28-30.

Niu, C.Q., He, L.Y. (1991): Determination of isoquinoline alkaloids in Chelidonium majus L. by ion-pair high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A, 542, 193-199.

Nowicky, J.W., Greif, M., Hamler, F., Hiesmayr, W., Staub, W. (1987): Biological activity of Ukrain in vitro and in vivo. Drugs Exptl. Clin. Res., 13 151-156.

Nowicky, J.W., Staniszewski, A., Zbroja-Sontag, W., Slesak, B., Nowicky, W., Hiesmayr, W. (1991): Evaluation of thiophosphoric acid alkaloid derivatives from *Chelidonium majus* L. („Ukrain") as an immunostimulant in patients with various carcinomas. Drugs Exptl.Clin. Res., 17, 139-143.

Nowicky, J.W., Manolakis, G., Meijer, D., Vatanasapt, V., Brzosko, W.J. (1992): Ukrain both as an anti cancer and immunregulatory agent. Drugs Exptl. Clin. Res., 18 (suppl.), 51-54.

Nowicky, W., Han, L.F., Nowicky, W., Gutmann, V., Linert, W. (1992): Reversed-phase liquid chromatography of alkaloids: masking effects of inorganic salts. Talanta, 39, 1437-1442.

O'Hara, M., Keifer, D., Farrell, K., Kemper, K. (1998): A review of 12 commonly used medicinal herbs. Arch. Farm. Med., 7, 523-536.

Országos Gyógyszerészeti Intézet (OGYI): Gyógyszernek nem minősülő gyógyhatású készítmények. Kulturtrade Kiadó, Budapest, 2004.

Padayatty, S.J., Levine, M. (2000): Reevaluation of ascorbate in cancer treatment: Emerging evidence, open mindes and serendipity. Journal of the American College of Nutrition, 19, 423-425.

Padayatty, S.J., Levine, M. (2000): Vitamin C and myocardial infarction: the heart of the matter. American Journal of Clinical Nutrition, 71, 1027-1028.

Pápai Páricz F. (1984): Pax corporis. Jubileumi Kiadvány, Magvető Kiadó, Budapest, pp. 66.

Parmar, V.S., Gupta, A.K., Jha, H.N., Varma, P.N., Lohar, D.R. (1993): Metal content of the medicinal plants: *Agave americana, Sambucus nigra* and *Sylibum marianum.* Int. J. Pharmacogn., 31, 324-326.

Pathak, S. R.: Homeopátiás Gyógyszerkönyv, Remedium Kft., Nagykovácsi, 1996.

Petri G. (1991): Gyógynövény- és drogismeret. Medicina Kiadó, Budapest, pp. 109-114.

Petruczynik, A., Waksmundzka-Hajnos, M., Hajnos, M.L. (2005): The effect of chromatographic conditions on the separation of selected alkaloids on silica layers. J. Planar Chromatogr., 18, 78-84.

Pietta, P.G., Mauri, P.L., Gardana, C., Colombo, M.L., Tome, F. (1995): Capillary electrophoresis of isoquinoline alkaloids from *Chelidonium majus* L. Phytochemical Analysis, 6, 196-202.

Piacente, S., Capasso, A., De Tomassi, N, Jativa, C., Pizza Sorrentino, L. (1997): Different effects of some isoquinoline alkaloids from Argemone mexicana on electrically induced contractions of isolated guinea-pig ileum. Phytoterapy Res., 11, 155-157.

Pitea, M., Margineanu, C. (1972): Correlations between chemical structure and antibacterial activity of berberine. Clujul. Med., 45, 465-469.

Preziosi, P., Galan, P., Herbeth, B., Valeix, P., Roussel, A.M., Malvy, D., Paul-Dauphin, A., arnaud, J., Richard, M.J., Briancon, S., Favier, S., Hercberg, S. (1998): Effects of supplementation with combination of antioxidant vitamins and trace elements, at nutritional dosis, on biochemical indicatorsand markers of the antioxidant system inadult subject. J. Am. Coll. Nutr., 17, 244-249.

RDA (1989): Recommende Dietary Allowances 10th ed., National Acadamy Press, NW., Washington DC.

Rey, J.P., Levesque, J., Pousset, J.L. (1993): Analytical studies of *dl*-stylopine in *Chelidonium majus* L. using high-performance liqide chromatography. J. Chromatogr. A, 641, 180-183.

Rios, J.L., Recio, M.C., Villar, A. (1988): Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literatute. J. Ethnopharmacol., 23, 127-149.

Ritter, R., Schatton, W.F., Gessner, B., Willems, M. (1993):Clinical trial on standardised celandine extract in patients with functional epigastric complaints: results of a placebo-controlled double-blind trial. Complementary Theraphies in Medicine, 15, 189-193.

Rogelj, B., Popovic, T., Ritonja, A., Strukelj, B., Brzin, J. (1998): Chelidocystatin, a novel phytocystatin from Chelidonium majus. Phytochemistry, 49, 1645-1649.

Rote Liste (2006): Arzneimittelverzeichnis für Deutschland, Edicio Cantor Verlag, Frankfurt.

Saglam, H., Arar, G. (2003): Cytotoxic activity and quality control determinations on *Chelidonium majus*. Fititerapia, 74, 127-129.

Sakalo, V. S., Korsh, O. B., Melnyk, A. (1996): Ukrain treatment in a patient with non-seminomatous germ-cell tumout of the testis. Drugs Exptl. Clin. Res., 22, 263-265.

Santavy, F. (1970): Neue Alkaloidgruppen der Papaveraceen. Planta Med., 19, 119-137.

Sárközi, Á., Janicsák, G., Kursinszki, L., Kéry, Á. (2006) Alkaloid Composition of *Chelidonium majus* L. by Using Different Chromatographic Techniques *Chromatographia* 63, 81-86.

Schilcher, H. (1995): Pharmazeutische Aspekte pflanzlicher Gallenterapeutika. Zeitschrift für Phytotherapie, 16, 211-222.

Schilcher, H. (1997): Schöllkraut – *Chelidonium majus* L. Zeitschrift für Phytotherapie, 18, 356-366.

Schilcher, H., Kammerer, S. (2000): Leitfaiden Phytotherapie, Urban & Fischer Verlag, München, Jena.

Schramm, E., Nowicky, J.W., Godysh, Y. (1996): Biophysiological effects of Ukrain terapy in a patient with breast cancer. Drugs Exptl. Clin. Res., 22, 247-254.

Selmeczi, B. (1994): Kivonással készülő gyógyszerformák. In: Gyógyszer-technológia. Gyógyszerformatan. Rácz, I., Selmeczi, B. (eds.), Medicina, Budapest.

Service, R.F. (2001): Body's secret weapon: burning water?, News of the week, Science, 293, 174.

Sethi, L.M. (1985): Comparison of inhibition of reverse transciptase and antileukemic activitiesw exhibited by protoberberine and brnzophenanthridine alkaloids and structure-activity relationships. Phytochemistry, 24, 447-454.

Sevcik, J., Vicar, J., Ulrichova, J., Valka, I., Lemr, K., Simanec, V. (2000): Capillary electrophoretic determination of sanguinarine and chelerythrine in plant extracts and pharmaceutical preparations. J. Chromatogr. A, 866, 293-298.

Shaffiee, A., Jafarabadi, A.H. (1998): Corydine and ncorydine from *Chelidonium majus*. Planta Med., 64, 489.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., Shi, y. (2004): Histone demethylation mediated by nuclear amine oxidase homolog LSD1. Cell, 119, 941-953.

Sigel, A., Sigel, H. (1999): Manganese and its role in biological processes. Metalions Biol. Syst. 37, 1-788.

Siro, B., Lakatos, B., Szelkovszky, S., Szatmári E. (1990): Multifaceted role of trace elements int he pathogenesis of chronic arthritis. In: Matkovics, B., Halász, H. Radicals, ions and tissue damage. Akadémia Kiadó, Budapest.

Siro, B., Lakatos, B., Szelkovszky, S. (1995): A nyomelemek komplex szerepe az idült ízületi gyulladások kórfolyamataiban. (The complex role of trace elements in the pathogenesis of chronic arthritis.) Magyar Reumatológia, 36, 77-85.

Sokoloff, B., Saelhof, C.C., Takeuchi, Y., Powella, R. (1964): The antitumor factors present in *Chelidonium majus* L. I. Chelidoniun and protopine. Growth, 28, 225-231.

Sokoloff, B. (1968): The oncostatic and onkolytic factors present in certain plants. Oncology, 22, 49-60.

Song, J.Y., Yang, H.O., Pyo, S.N., Jung, I.S., Yi, S.Y., Yun, Y.S. (2002): Immunomodulatory acivity of protein-bound polysaccharide extracted from Chelidonium majus. Arch. Pharm. Res., 25, 158-164.

Song, J.Y., Yang, H.O.,Shim, J.Y., Ahn, J.Y., Jung, I.S., Yun, Y.S. (2003): Radiationprotective effect of an extract from Chelidonium majus. Int. J. Hematol., 78, 226-232.

Soó, R. (1973): A magyar flóra és vegetáció redszertani- növényföldrajzi kézikönyve. Akadémia Kiadó, Budapest, pp. 267-268.

Srabuc, B., Benedicic, D. (1996): Ukrain with chemoteraphy in malignant melanoma (case report). Drugs Exptl. Clin. Res., 22, 231-233.

Stahl, E., Schild, W. (1981): Pharmazeutische Biologie. Drogenanalyse II: Inhaltsstoffe und Isoleirungen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, pp. 69-73.

Staniszewski, A., Slesak, B., Kolodziej, J, Harlozinska-Szmyrka, A., Nowicky, J.W. (1992): Lymphocyte subsets in patients with lung csncer treated with thiophpsphoric acid alkaloid derivatives from Chelidonium majus L. (Ukrain). Drugs Exptl. Clin. Res., 18 (suppl.), 63-67.

Stermitz, F., Larson, K.A., Kim, D.K. (1973): some stuctural relationships among cytotoxic an antitumor benzophenanthridine alkaloid derivatives. J. Med. Chem., 16, 939-940.

Stowe, R.P., Koenig, D.W., Mishra, S.K., Pierson, D.L. (1995): Nondestructive and continous spectrophotometric measurement of cell respiration using a tetrazolium-formazan microemulsion. Journal of Microbial Methods, 22, 283-292.

Stuppner, H., Ganzera, M. (1995): Application of β-ciklodextrin for the analysisof the main alkaloids from Chelidonium majus by capillary electrophoresis. J. Chromatogr. A, 717, 271-277.

Sturm, S., Stuppner, H. (1998): Analysis of isoquinoline alkaloid sin medical plants by capillary electrophoresis - mass spectrometry. Electrophoresis, 19, 3026-3032.

Szarvas, T., János, É., Gáborjányi, R., Tyihák, E. (1982): Increased formaldehyde formation-an early event of TMV infection in hypersensitive host. Acta Phytopath. Acad, Sci. Hung., 17, 7-10.

Szende, B., Tyihák, E., Szókán, Gy., Kátay Gy. (1995): Possible role of formaldehyde in the apoptotic and mitotic effect of 1'-methyl-ascorbigen. Path. Oncol. Res., 1, 38-42.

Szende, B., Tyihák, E.,Trézl., L., Szőke, É., László, I., Kátay, Gy., Király-Véghely, Zs. (1998): Formaldehyde generators and capturers as influencing factors of mitotic and apoptotic processes. Acta Biol. Hung., 49, 323-329.

Szende, B., Tyihák, E., Király-Véghely, Zs. (2000): Dose-dependent effect of resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumor cell cultures. Exp. Mol. Med., 32, 88-92.

Szendrei., K., Varga, E. (2005): A vérehulló fecskefűről – gyógyszerészeknek. Gógyszerészet, 49, 363-373.

Szentmihályi, K., Then, M., Lakatos, B., Sándor, Z., Vikler, P., Kéry, Á. (1999a): A csipkebogyó (*Rosa canina* L. áltermés) elemtartalmának vizsgálata a fitoterápiás felhasználás szempontjából. Fitoterápia, 4, 194-197.

Szentmihályi, K., Kéry, Á. Lakatos, B., Sándor, Z., Then, M., Petri, G., Vikler, P. (1999b):Bioaktív anyagok és fémek magyarországi eredetű cikória drogokban. Olaj, Szappan, Kozmetika, 48, 74-77.

Szentmihályi, K., Then, M. (2000): Teas of *Equiseti herba, Myrtilli folium* and *Salviae folium.* Acta Alimentaria, 29, 43-49.

Szumilo, H., Flieger, J. (1999): Application of differently modified silica gel in the TLC analysis of alkaloids. J. Planar Chromat., 12, 466-470.

Suau, R., Cabezudo, B., Valpuesta, M., Posadas, N., Diaz, A., Torres, G. (2005): Identifications and quantification of isoquinoline alkaloid sin the genus *Sarcocapnos* by GC-MS. Phytochemical Analysis, 16, 322-327.

Swenberg, J.A., Kerns, W.D., Mitchell, R.I., Gralla, E.J., Pavkov, K.I. (1980): Induction of squamous cell carcinomas of the rat nasal cavity by inhalation exposure to formaldehyde vapor. Cancer Res., 4, 3398-3402.

Táborska, E., Bochoráková, H., Paulová, H., Dostál, J. (1994): Separation of alkaloids in *Chelidonium majus* by reversed phase HPLC. Planta Med., 60, 380-381.

Tan G.T., Pezzuto, J., Kinghorn, A.D. (1991): Evaluation of natural products as inhibitors of human immundeficiency virus types I (HIV-1) reverse transcriptase. J. Nat. Prod., 54,143-154.

Taylor, C.T., Winter, D.C., Skelly, M.M., O'Donoghue, D.P., O'Sullivan, C.G., Harvey, B.J., Baird, A.W. (1999): Berberine inhibits ion transport in human colonic epithelia.

Taylor, D. (1996): Herbal medicine at a cross roads. Environ. Health Perspect., 104, 924-933.

Then, M., Szentmihályi, K., Sárközi, Á., Illés, V., Forgács, E. (2000): Effect of sample handling on alkaloid and mineral content of aqueous extracts of greater celandine (*Chelidonium majus* L.). J. Chromatogr. A, 889, 69-74.

Thorndike, J., Beck, W.S. (1977): Production of formaldehyde from N^5-methyltetrahydrofolate by normal and leukemic leukocytes. Cancer Res., 37, 1125-1132.

Trézl, L., Pipek, J. (1988): Formation of excited formaldehyde in model reactions simulating real biological systems. J. Mol. Struct., 170, 213-223.

Trézl, L., Hullán, L., Szarvas, T., Csiba, A., Szende, B. (1998): Determinations of endogenous formaldehyde in plants (fruits) bound to L-arginine and its relation to the folate cycle, photosynthesis and apoptosis. Acta Biol. Hung. 49, 253-263.

Trézl, L., Hullán, L., Jászay, Z.M., Szarvas, T., Petneházy, I., Szende, B., Bocsi, J., Takáts, Z., Vékey, K, Tőke, L. (2003): Antagonistic reactions of arginine and lysine against formaldehyde and their relation to cell proliferation, apoptosis, folate cycle and photosyntesis. Mol. Cell. Biochem., 244, 167-176.

Tome, F., Colombo, M.L. (1995): Distribution of alkaloids from the Chelidonium majus factors affecting their accumulation. Phytochemistry, 40, 37-39.

Tóth, L. (2005): Gyógynövények, Drogok, Fitoterápia. Kossuth Egyetemi Kiadó, Debrecen, pp. 306-327.

Tölgyesi, Gy. (1969): A növények mikroelem-tartalma és ennek mezőgazdasági vonatkozásai. (Microelement content of plants and their relation in agriculture.) Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, pp.29.

Tyihák, E., Ball, J., Gáborjányi, R., Balázs, E. (1978): Increased free formaldehyde level in crude extract of virus infected hypersensitive tobaccos. Acta Phytopath. Acad, Sci. Hung., 13, 29-31.

Tyihák, E., Trézl, L., Rusznák, I. (1980): Spontaneous N-methylation of L-lysine by formaldehyde. Pharmazie, 35, 18-20.

Tyihák, E. (1987a): Overpressured layer chromatographic method int he study of the formaldehyde cycle in biological systems. Trends Anal. Chem., 6, 90-94.

Tyihák, E. (1987b): Overpressured layer chromatography and its applicability in pharmaceutical and biochemical analysis. J. Pharmaceut. Biomed., 5, 191-203.

Tyihák, E. (1987c): Is there a formaldehyde cycle inbiological systems? In: Tyihák, E., Gullner, G. (eds): Proc. of 2nd Intern. Conf. On the Role of Formaldehyde in Biological Systems, Keszthely, Hungary, SOTE Press, Budapest, pp. 137-144.

Tyihák, E.,Gullner, G., Trézl, L. (1993): Formaldehyde cycle and possibility of formation of singlet oxygen in plant tissues.In: Mózsik, G., Emerit L. Fehér J., Matkovics, B., Vincze, Á. (eds): Oxygen free radicals and scavangers int he natural science. Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 21-28.

Tyihák, E., Rozsnyai, Zs., Sárdi ,É., Gullner, G., Trézl, L., Gáborjányi, R. (1994): Possibility of formation of excited formaldehyde and singulet oxygen in biotic and abiotic stress situations. Acta Biol. Hung., 45, 3-10.

Tyihák, E., Szőke, É. (1996): Measurement of formaldehyde and some fully N-methylated substances in cultures of *Datura innoxia*. Plant Growth Regulation, 20, 317-320.

Tyihák, E., Albert L., Németh, Zs.I., Kátay, Gy., Király-Véghely, Zs., Szende, B. (1998a): Formaldehyde cycle and the natural formaldehyde generators and capturers. Acat Biol. Hung., 49, 225-238.

Tyihák, E., Trézl, L., Szende, B. (1998b): Formaldehyde cycle and the phases of stress syndrome. Annals of the New York Academy of Science, 851, 259-270.

Tyihák, E.,Bocsi, J., Timár, F., Rácz, G., Szende, B. (2001): Formaldehyde promotes and inhibits the proliferation of cultured tumor and endothelial cells. Cell. Proliferat., 34, 135-141.

Tyihák, E. (2002): Formaldehid ciklus az élővilágban. Biokémia, 26, 2-9.

Tyihák, E., Kátay, Gy., Király-Véghely, Németh, Zs.I., Albert L., Szende, B (2003): Vitis vinifera as medicinal plant. Acta Hort., 597, 159-165.

Tyihák, E., Botz, L., Ott, P., Nagy, S., Kocsis, B., Király-Véghely, Zs., Mincsovics, E. (2003): A combination of the overpressure layer chromatography and bioautography and its application to the analysis of molecules influencing cell proliferation. Chem, Anal. (Warsaw), 48, 543-553.

Tyihák, E., Ott, P.G., Móritz, Á., Kátay, Gy., Király-Véghely, Zs. (2004): Antibiosis, antibiotics and the formaldehyde cycle: The unique importance og planar chromatographic techniques to progress in this fields. J. Planar Chromatogr., 17, 84-88.

Tyihák, E., Móritz, Á., Ott, P.G., Kátay, Gy., Király-Véghely, Zs. (2005): The potential of BioArena in the study of the formaldehydome. J. Planar Chromatogr., 18, 67-72.

Tyihák, E. (2006): Double immune response of plants to pathogens and its biochemical basis. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology, (Ed.: J. A. Teixeria da Silva) Vol 3, 380-387.

Uglyanitsa, K.N., Nefodov, L.I., Doroshenko, Y.M., Nowicky, J.W., Volchek, I.V., Brzosko, W.J., Hodysh, Y.J. (2000): Ukrain: A novel antitumor drug. Drugs Exptl. Clin. Res., 26, 341-356.

Üstünes, L., Laekeman, C.M., Cozier, B., Vlietinck, A.J., Özer, A., Herman, A.G. (1988): In vitro study of the anticholirgic and antihistaminic activities of protopine and some derivatives. J. Nat. Prod., 51, 1021-1022.

Yu, P.H. (1998): Increase of formation of methylamine and formaldehyde in vivo after administration of nicotine and potential cytotoxicity. Neurochem. Res., 23, 1205-1210.

Yuan, R, Grunwald, J. (1997): Germany moves to the forefront on the european herbal medicine industry. Genet. Eng. News April 15, pp 14.

Vahlensieck, U., Hahn, R., Winterhoff, H., Gumbinger, H.G., Nahrstedt, A., Kemper, F.H. (1995):The effect of the Chelidonium majus herb extract on choleresis in the isolated perfused rat liver. Planta Med.,61, 267-270.

Vavreckova, C., Gawlik, I., Müller, K. (1996): Benzophenanthridine alkaloids of Chelidonium majus; II. Potent inhibitory action against the growth of human keratinocytes. Planta Med., 62, 491-494.

Voltchek, I.V., Liepins, A., Nowicky, J.W., Brzosko, W.J. (1996): Potencial therapeutic efficiacy of Ukrain (NSC 631570) in AIDS patients with Kaposi's sarcoma. Drugs Exptl. Clin. Res., 22, 263-266.

Vukusic, I., Pepljinak, S., Kustrac, D., Grungold, D. (1991): Investigation of the antimycotic of *Chelidonium majus* extracts. Planta Med., 57 (suppl. 2), A46.

Vyas, J.J., Jain, V.K. (1996): Ukrain treatment in carcinoma of the oesophagus. Drugs Exptl. Clin. Res., 22, 267-269.

Wagner, H., Bladt, S (1996): Plant Drug Analysis, Springer Verlag, Berlin, Heidelber, Germany, pp. 41-42, 360.

Waksmundzka-Hajnos, M., Gadzikowska, M., Golkiewicz, W. (2000): Special modes of developement of *Chelidonium majus* L. alkaloids in systems of the type polar adsorbent-multicomponent mobile phase by TLC. J. Planar Chromatogr., 13, 205-209.

Waksmundzka-Hajnos, M., Gadzikowska, M., Hajnos, M.L. (2000): Strategy for preparative separation of quaternary alkaloids fom *Chelidonium majus* L. by thin layer chromatography. J. Planar Chromatogr., 13, 205-209.

Walker, J.K: (1964): Formaldehyde. Kieger, R.E. Publ. Co., Huntington, New York.

Walterova, D., Preninger, V., Simanek, V. (1984): Planta Med., 49, 149-151.

Wei, G.M., Yukiharu, F., Satoshi, T., Toshihiko, O. (2000): Fungitoxic alkaloids from Hokkaido Papaveraceae. Fitoterapia, 71, 527-534.

Wentworth, P., Wentworth, A.D.,Zhu, X., Janda K.D., Eschenmoser, A., Lerner, R.A. (2003): Evidence of the production of trioxygenspecies during antibody-catalyzed ozone chemical modification of antigens. Proceedings of the National Academy of Science USA, 100, 1490-1493.

Wichtl, M. (1994): Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: Chelidonii herba - Greater celandine. Scientific Publishers, Stuttgart, pp. 143-145.

WHO monographs on selected medicinal plants. Vol. 3. Herba Chelidonii. WHO, Geneva (2006 in press).

Wolf, J. (1996): Mikro-Dünnschichtchromatographie-Schöllkraut. Pharmazie, 141, 51.

Wong, M.K., Tan, P. & Wee, Y.C. (1993): Heavy metals in some Chinese herbal plants. Biol. Trace Elem. Res., 36(2), 135-142.

Zbierska, J., Kowalewski, Z. (1979): Anticancer and antibiotic properties of N-methylchelidonin methyl sulfate. Herba Pol, 25, 311-316.

Zbierska, J., Kowalewski, Z. (1980): Antineoplastic and antibiotic properties of chelidonine N-oxid. Herba Pol, 26, 61-66.

Zhuang, S., Demirs, J.T., Kochevar, I.E. (2000): p38mitogen activated protein kinase mediates bid cleavage, mithocondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singulet oxygen, but not by hidrogen peroxide. The J. of Biol. Chem., 275, 25939-25948.

8. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Közlemények az értekezés témájában:

Sárközi, Á., Móricz, Á.M., Ott, P.G., Tyihák, E., Kéry, Á. (2006) Investigation of *Chelidonium* Alkaloids of a Complex Bioautographic System. *J. Planar Chromatogr.* 19, 267-272. (If: 0,667/2005)

Sárközi, Á., Janicsák, G., Kursinszki, L., Kéry, Á. (2006) Alkaloid Composition of *Chelidonium majus* L. by Using Different Chromatographic Techniques *Chromatographia* 63, 81-86. (If: 0,959/2005)

Kursinszki, L., **Sárközi, Á**., Kéry, Á., Szőke, É. (2006) Improved RP-HPLC Method for Analysis of Isoquinoline Alkaloids in Extracts of *Chelodonium majus*. *Chromatographia* 63, 131-135. (If: 0,959/2005)

Sárközi, Á., Then, M., Szentmihályi, K. (2005) Mineral element content of greater celandine (*Chelidonium majus* L.). *Acta Alimentaria* 34, 113-120. (If: 0,274)

Sárközi, Á., Móricz, M.Á., Ott, P.G., Tyihák E., Kéry, Á. (2005) Investigation of alkaloids of *Chelidonium majus* L. by BioArena system. Proceedings of the International Symposium on Planar Separations, Milestones in Instrumental TLC pp. 279-590.

Sárközi, **Á.,** Then, M,. Szentmihályi, K., Szőke, É.(2003) Mineral element content of Chelidonii herba obtained by different technologies. 3rd International Symposium on Natural Drugs Proceedings pp. 303-306.

Marczal Gabriella, **Sárközi Ágnes** (2001) Toxikus és mérsékelten mérgező növények 6. (*Chelidonium majus* L.-Vérehulló fecskefű) *Fitoterápia* 5, 92.

Az értekezés témájához részben kapcsolódó közlemények:

Then, M., Szentmihályi, K., **Sárközi**, **Á.,** Szőllősi-Varga, I. (2003) Examination on antioxidant activity in the greater celandine (*Chelidonium majus* L.) extract by FRAP method. *Acta Biol. Szeged.* 47, 115-117.

Then, M., Szentmihályi, K., **Sárközi**, **Á.,** Illés, V., Forgács, E. (2000) Effect of sample handling on alkaloid and mineral content of aqueous extracts of greater celandine (*Chelidonium majus* L.) *J. Chromatogr. A* 889 69-74. (If: 2,)

Sárközi, **Á.,** Then, M., Illés, V., Szentmihályi, K. (2000) Comparative study on the supercritical fluid and microwave extraction of greater celandine (*Chelidonium majus* L.) Proceedings of the 7th Meeting on Supercritical Fluids Materials and Natural Products Processing II. pp. 687-692.; ISBN: 2-905-267-33-10

Folyóiratban megjelent idézhető előadás-kivonatok:

Sárközi, Á., Móricz, M.Á., Ott, P.G., Tyihák E., Kéry, Á. (2005) Antimicrobial activity of Chelidonium alkaloids investigated by BioArena system *Scientia Pharmaceutica,* 73 (2): 92.

Sárközi Á., Then M., Szentmihályi K., Szőke É. (2003) Comparing the element content of teas and tinctures obtained from Chelidonii herba *Magnesium Research*, 16: 334-335. (If: 0,667)

Sárközi Á., Then M., Szőke É. (2001) A Chelidonium majus L. kivonatainak összehasonlító vizsgálata Gyógyszerészet, 45, 257-258.

Abstract kötetben megjelent összefoglalók:

Then, M., Szentmihályi, K., **Sárközi**, **Á.,** Illés, V., Forgács, E.: Phytochemical extraction of different solvents of *Chelidonium maju*s L. (Traditional and supercritical methods), The 9th Symphosium on Handling of Environment and Biological Samples in Chromatography, October 10-13, 1999, Porto, Portugal.

Sárközi Á., Then M., Szentmihályi K., Szőke É.: A Chelidonium majus L. növényi részeinek fitokémiai összehasonlító értékelése, Lippay János - Vas Károly Tudományos Ülésszak; Gyógynövénytudományi Szekció, 2000. nov. 6-7, Budapest.
Abstract kötet pp. 230-231.

Sárközi, **Á.,** Then, M., Illés, V., Szentmihályi, K.: Comparative study on the supercritical fluid and microwave extraction of greater celandine (*Chelidonium maju*s L.), 7th Meeting on Supercritical Fluids, December 6-8, 2000, Antibes, France.

Sárközi, **Á.,** Then, M., Illés, V., Szentmihályi, K.: Coptisine and berberine content in extracts of greater celandine (*Chelidonium majus* L.*)* World Conference on Medicinal and Aromatic Plants, 8-11 July, 2001, Budapest.
Book of Abstracts, pp. 188.

Varga, I., **Sárközi**, **Á.,** Illés, V., Szentmihályi, K., Then, M.: Study on the alkaloid content and antioxidant effect of *Chelidonium majus* L.*,* 5th International Congress on Cosmetics and Household Chemicals, 17-19, April, 2002, Budapest.
Book of Abstracts, pp. 63.

Sárközi, **Á.,** Then, M., Illés, V., Szentmihályi, K.: Comparative study on different extracts of greater celandine (*Chelidonium majus* L.), Ph.D. Tudományos Napok 2002, ápr. 7-8, Budapest.
Abstract kötet pp. 80.

Sárközi Á., Then M., Illés V., Szentmihályi K.: A Chelidonii herba kivonatainak jellemzése, Gyógynövények kutatása és felhasználása 2002, nov. 13-15, Kecskemét.
Program és előadásösszefoglalók pp. 118, 219.

Sárközi, **Á.,** Then, M,. Szentmihályi, K., Szőke, É.: Mineral element content of greater celandine (*Chelidonium majus* L.), Ph.D. Tudományos Napok 2003, ápr. 10-11, Budapest.
Abstract kötet pp. 94.

Sárközi Á., Then M., Szentmihályi K., Illés, V.,Szőke É.: A Chelidonii herba kivonatainak értékelése alkaloid tartalmuk és ásványelemeik alapján, Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XII., 2003. máj. 8-10, Budapest.
Összefoglaló: Gyógyszerészet 2003, Kongresszusi különszám pp. 87.

Sárközi Á., Then M., Szentmihályi K., Szőke É.: A Chelidonii herbaból készített teák és tinktúrák ásványelem tartalmának összehasonlító vizsgálata, 8. Magyar Magnézium Szimpózium, 2003. május 29-30, Hajdúszoboszló.
Program és összefoglalók pp. 43-44.

Sárközi, **Á.,** Then, M,. Szentmihályi, K., Szőke, É.: Mineral element content of Chelidonii herba obtained by different technologies, 3rd International Symposium on Natural Drugs, October 2-4, 2003, Naples, Italy.
Book of Abstracts, pp. 135.

Sárközi, **Á.,** Then, M,. Szentmihályi, K., Szőke, É.: Comparing the element content of teas and tinctures obtained from Chelidonii herba, Semmelweis Symposium, November 6-7, 2003, Budapest.

Sárközi, Á., Móricz, M.Á., Ott, P.G., Tyihák E., Kéry, Á.: Investigation of alkaloids of *Chelidonium majus* L. by BioArena system, Planar Chromatography 2005, May 29-31, Siófok.

Sárközi, Á., Móricz, M.Á., Ott, P.G., Tyihák E., Kéry, Á.: Antimicrobial activity of *Chelidonium* alkaloids investigated by BioArena system, Joint Meeting on Medicinal Chemistry, June 20-23, 2005, Vienna, Austria.

Sárközi, Á., Janicsák, G., Kursinszki, L., Kéry, Á.: Alkaloid composition of Chelidonium majus L. by using different chromatographic technics, 6th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, September 7-9, 2005, Siófok.
Book of Abstracts, P-124.

Kursinszki, L., **Sárközi, Á**., Kéry, Á., Szőke, É.:Improved RP-HPLC method for the analyses of isoquinoline alkaloids in Chelidonii herba and prepatarions, 6th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, September 7-9, 2005, Siófok.
Book of Abstracts, P-38.

Kursinszki, L., **Sárközi, Á**., Kéry, Á., Szőke, É.:Új RP-HPLC módszer kidolgozása izokinolin alkaloidok meghatározására a Chelidonii herba-ban és fitoterápiás készítményeiben, XI. Magyar Gyógynövény Konferencia, 2005, okt.13-15, Dobogókő
Program és előadásösszefoglalók pp. 55.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom **Prof. Szőke Évának**, a biológiai tudományok doktorának, a Semmelweis Egyetem Farmakognózia Intézetének igazgatójának, hogy lehetőséget biztosított számomra doktori értekezésemmel kapcsolatos kutatómunka az Intézetben történő végzéséhez, valamint hálával tartozom hasznos tanácsaiért és a tudományos életben való eligazodást segítő nélkülözhetetlen irányításáért.

Őszinte hálával tartozom **Prof. Kéry Ágnes** c. egyetemi tanárnak, tudományos munkám végzése során nyújtott önzetlen és őszinte segítségéért, aki értékes tanácsaival, hasznos útmutatásaival és áldozatkész támogatásával dolgozatom elkészüléséhez felbecsülhetetlen és nélkülözhetetlen segítséget nyújtott.

Köszönet illeti **Dr. Then Máriát**, a Semmelweis Egyetem Farmakognózia Intézetének tudományos főmunkatársát, aki bátorított a doktori képzésben való részvételre, és útbaigazítást adott kutatómunkám kezdeti szakaszában.

Köszönettel tartozom **Dr. Kursinszki Lászlónak**, a Farmakognózia Intézet docensének, aki munkám során nélkülözhetetlen segítséget nyújtott a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszerrel végzett méréseknél.

Köszönetet szeretnék mondani **Dr. Marczal Gabriellának**, a Farmakognózia Intézet tudományos szaktanácsadójának, aki felbecsülhetetlen segítséget nyújtott a német nyelvű szakirodalom feldolgozásában.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani **Prof. Tyihák Ernőnek,** a kémiai tudományok doktorának, a Magyar Tudományos Akadémia Növényvédelmi Kutatóintézete tudományos főmunkatársának, a biológiai kísérletek megtervezésében és kiértékelésében adott segítségéért, támogatásáért. Köszönöm **Móricz Ágnesnek** és **Dr. Ott Péternek** a biológiai vizsgálatok elvégzésében nyújtott nélkülözhetetlen segítséget.

Köszönettel tartozom **Dr. Szentmihályi Klárának** az MTA Kémiai Kutatóközpont, Kémiai Intézet tudományos főmunkatársának az elemtartalmi meghatározások során kapott útmutatásért.

Rendkívüli köszönet illeti **Dr. Janicsák Gábort**, az MTA Botanikai Kutatóintézetének tudományos főmunkatársát, a denzitometriás mérések kivitelezésében, valamint tudományos eredményeim publikálásához nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért.

Köszönetet szeretnék mondani a Semmelweis Egyetem Farmakognózia Intézetében dolgozó valamennyi **munkatársamnak**, akik munkámat mindvégig önzetlen támogatásukkal segítették.

Végül, de nem utolsó sorban, végtelen hálával tartozom családomnak: **férjemnek**, **szüleimnek**, **testvéreimnek**, hogy kitartó megértéssel, türelemmel, szeretettel támogatták kutatómunkámat és disszertációm elkészítését.