

Előzetes vizsgálataink alapján lucerna esetében a különböző [víz, víz-metanol (50%-50%), etil-acetát, hexán] extraktumok közül csak a vizes kivonat mutatkozott hatékonynak, és ez is csupán az *Aedes aegypti* csípőszúnyog lárváin. A nyers kivonat 0,1%-os koncentrációja 100% mortalitást okozott a 8. napon. Ezt a vizes kivonatot további 6 frakcióra bontottuk Sephadex G-25 oszlop segítségével. (Elválasztás vizes lemosással mólsúly alapján.) A frakciókat külön-külön és újra egyesítve is teszteltük szúnyog lárvákon, azonban a nyers kivonathoz képest rendkívül alacsony hatékonyságot (0,1% koncentrációban 0-10% mortalitás) tapasztaltunk. Csupán az újra egyesített frakciók és ezek is ötször nagyobb koncentrációban (0,5% koncentrációban 70% mortalitás) mutattak némi hatékonyságot. Mindez arra utal, hogy a hatékonyságért felelős vegyület(ek) vagy fennmaradt(ak) az oszlopon vagy a hatásért több vegyület együttes jelenléte szükséges, melyek esetleg az izolálás és a tárolás során elbomlottak, átalakultak. Mindezek olyan szeparálási és tesztelési nehézségeket vetítettek előre, melyektől rövidtávon nem volt siker várható. Ezért újból beemeltük projektünkbe - a szerződészkötéskor pénzhiány miatt kihagyott - *Ajuga chamaepitys* ínfű-faj vizsgálatát.

Kutatásaink tematikája két, vizsgálati módszereiben alapvetően különböző területre tagolódik, úgymint biológiai hatásvizsgálatok különböző ízeltlábúakon és kémiai-analitikai munkák (szeparálás és anyag meghatározás). Ezek a vizsgálatok párhuzamosan folytak az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetének laboratóriumaiban, a Szegedi Egyetem Farmakognóziái Intézetében, illetve a neoklerodánok meghatározása céljából méréseket végeztünk a barcelonai Egyetem Fitokémiai Laboratóriumában. A vizsgálatokhoz a növényi anyagokat az MTA NKI kísérleti telepén állítottuk elő, és itt tartottuk fenn a tesztekhez szükséges ízeltlábú fajok tenyészteteit is.

## Biológiai Hatásvizsgálatok

### Teljes növényi örlemények vizsgálata:

Az *Ajuga bracteosa* Benth., *A. chamaepitys* (L.) Schreb. és *A. reptans* var. *reptans* Linnaeus örleményeinek az aszalványmoly (*Plodia interpunctella* Hübner) posztembrionális fejlődésére gyakorolt hatásait vizsgáltuk. Az örlemények közül az *A. bracteosa* és *A. reptans* var. *reptans* ~2000 ppm, míg az *A. chamaepitys* ~100 ppm változatos összetételű fitoekdiszteroidot tartalmazott. Míg az *A. reptans* var. *reptans*-ban a 20-OH ekdizon, addig az *A. bracteosa*-ban a ciaszteron származékok voltak túlsúlyban. Az örleményeket 1, 2, 4 és 8 %-os koncentrációban az általunk kifejlesztett PI<sub>db</sub>-tápbba kevertük. A legerősebb és legsokrétűbb hatást az *Ajuga reptans* var. *reptans* mutatta, mely 8 %-os koncentrációban

( $\approx$ 160 ppm fitoekdiszteroid) – azon túl, hogy kétszeresére növelte a posztembrionális kifejlődéshez szükséges időt és csökkentette a bábok súlyát – számottevő mortalitást (77 %) is okozott. Az *A. chamaepitys* jelentős táplálkozást gátló hatást mutatott, s 8%-os koncentrációban ötödére csökkentette a bábok súlyát. (részletesen a 7. publikáció)

#### Növényi kivonatok vizsgálata vízi élő szervezeteken:

Az ínfű fajok nyers (100%) metanolos kivonatait teszteltük az *A. aegypti* csípőszúnyog faj L<sub>2-3</sub>-as lárváin, különböző koncentrációkban (0,1 – 5 %). A kivonatokat beszárítás után a kísérleti állatok víz élőközegében oldottuk fel. Az extraktumok vízzoldható komponensei topikálisan, a kültakarón felszívódva fejtik ki hatásukat, míg a vízben nem oldódó részekkel a lárvák üledékevézésük során (*per os*) kerülnek kapcsolatba. A tesztállatok mortalitását 10 napig követtük figyelemmel, azaz amíg a kontroll egyedek többsége imágóvá fejlődött. A nyers extraktumok hatékonysági sorrendje 0,1 – 0,2 %-os koncentrációban a következő volt: *A. bracteosa* (80% mortalitás) > *A. reptans* (60% mortalitás) > *A. chamaepitys* (38% mortalitás). *A. reptans* növényvel végeztünk további vizsgálatokat. A nyers kivonatot előtisztítás után Sep-Pak C<sub>18</sub> oszlopon, (10%, 60% és 100%) metanolos frakciókra választottuk szét, majd ezek hatását is vizsgáltuk szúnyoglárvákon. Megállapítottuk, hogy a 10 % és a 60 %-os frakciók nem gyakorolnak hatást az *A. aegypti*-re, míg 100 %-os frakció a nyers kivonathoz hasonló mértékű mortalitást okozott (0,1 %-os dózisban  $\sim$ 80 %-os mortalitás a 10. napon). Mivel a vizsgálataink alapján ismertté vált az *Ajuga* kivonatok csípőszúnyogokra toxikus hatása, ezért felmerült, hogy ezek a kivonatok gyakorlati alkalmazás esetén, milyen hatást gyakorolnának a nem célzott vízi életközösségekre? A három különböző ínfű faj metanolos-vizes frakcióit (10%, 60% és 100%), valamint az *Ajuga* fajok által is termelt két fitoekdiszteroid (20-hidroxi-ekdizon; Makiszteron A) tiszta hatóanyagot teszteltük a nagy vízibolhán (*Daphnia magna*). A teszteket az ISO szabvány 48-órás immobilizációs protokollja, illetve a kemolumineszcencia változásán alapuló módszer szerint végeztük. Az *Ajuga* kivonatok még extrém magas (1-5%) koncentrációban sem voltak toxikusak a 48-órás tesztekben, azonban 96-órás kitétséget követően már jelentős (85-100%) mortalitást tapasztaltunk a 10% és 60% frakciók, valamint a tiszta hatóanyagok esetében is. Ezek a vizsgálatok az eredeti és elfogadott tématerünkben nem szerepeltek. (részletesen a 3.; 4.; 5. publikációk)

#### Növényi kivonatok vizsgálata szívó szájszervű rovarokon:

A szűnyogteszthez hasonlóan a fenti ínfű fajok nyers és Sep-Pak C<sub>18</sub> oszlopon tisztított frakcióit teszteltük gyapotpoloskán, és borsó levéltetűn, a fiatal lárvák (L<sub>2</sub>) ivóvizébe illetve a levéltetvek szintetikus tápjába keverve. A levéltetű tesztben az *A. bracteosa* > *A. chamaepitys* > *A. reptans*, míg a gyapotpoloskán az *A. reptans* > *A. bracteosa* > *A. chamaepitys* hatékonysági sorrend alakult ki a nyers kivonatokat illetően. A Sep-Pak C<sub>18</sub> (10%, 60% és 100%) metanolos frakciók közül a 60%-os frakciók mutattak a nyers kivonatokhoz hasonló mértékű hatékonyságot. Ami a gyapotpoloska esetében 0,5%-os koncentráció mellett 100% (*A. reptans*), ~80% (*A. bracteosa*) és ~65% (*A. chamaepitys*) mortalitást jelentett a kezelést követő 10. napon. A borsó levéltetű esetében, 0,1% koncentráció mellett az *A. bracteosa* 100%, az *A. chamaepitys* ~85% és az *A. reptans* 60% mortalitást okozott a kezelést követő 10. napon. A 10%-os Sep-Pak frakciók hatástalanok voltak, míg a 100%-os frakciók közül egyedül az *A. chamaepitys* volt hatékony mindkét tesztállaton. Ez a gyapotpoloska esetében a 60%-os frakcióhoz hasonló (~60% mortalitást), míg a borsó levéltetűnél, annál nagyobb, (100%) mortalitást jelentett. (részletesen a 6. publikáció)

#### Tisztított fitoekdiszteroidok tesztelése:

*Serratula* sp.-ből kivont tiszta ekdiszteroidokat (20E, Ekdizon, Polipodin B, Ajugaszteron C) teszteltünk borsó levéltetűn. Ezek a hatóanyagok az *Ajuga*-fajokban is megtalálhatók. Közülük a 20E és a Polipodin B bizonyult a leghatékonyabbnak (LC<sub>50</sub> = 1,07 ppm és 0,21 ppm), míg a metanolos *Ajuga* kivonatok közül a 60% -os (metanol/víz) Sep-pak frakció mutatkozott a leghatékonyabbnak mind a borsó levéltetűn, mind a gyapotpoloskán. Ez a frakció tartalmazta a legnagyobb mennyiségben a hatékonynak mutató ekdiszteroidokat. További az *Ajuga* fajokra nem jellemző fitoekdiszteroidok (dacrychainansterone, 25-OH-dacrychainansterone, pterosterone, 22-deoxy-20-hydroxyecdysone, integristerone, isovitexirone, herkesterone, turkesterone) tesztelését is elvégeztük borsó levéltetűn. Ezek közül a dacrychainansterone bizonyult a leghatékonyabbnak (LC<sub>50</sub> a 4. napon = 0,16 ppm). Mindezek az adatok a későbbi hatás-szerkezet összefüggések feltárásában lehetnek jelentősek. (részletesen a 2. és 6. publikációk)

## KÉMIAI-ANALITIKAI VIZSGÁLATOK

### *Ajuga chamaepitys*:

A két növényi mintát eltérő módszerekkel tisztítottuk. Az *A. chamaepitys* esetében [212g] - kizárólag a neoklerodánok kinyerése céljából – egyszerűsített, ún. diklórmetános (DCM) feltárást alkalmaztunk. Az extrakciót követő beszárítás után a maradékot 50%-50%

hexán és metanol (95%), valamint víz (5%) eleggyel particionáltuk. A hexános (H1) rész és a metanolos (M1) rész szétválasztása után további particiókat végeztünk (H1+metanol és M1+hexán). Ezt követően az azonos oldószeres partíciókat egyesítettük majd N<sub>2</sub> alatt beszárítottuk. A minták további előtisztítása szilikagél oszlopon történt. A neoklerodánok meghatározását a Spanyol együttműködés keretében végeztük. Előzetes eredményeink alapján a mintáinkban deacetil-ajugarin IV, dihidro-klerodin, ajugatansin A3, ajugaorientin, clerodin, ajugatansin A1, ajugatansin A2, és ajugareptansin volt kimutatható. Ezek a vizsgálatok még nem zárultak le tekintettel arra, hogy a 2005 évi elvonásokat az utazási keret terhére számoltuk el.

### **Ajuga reptans:**

A porított *Ajuga reptans* var. *reptans* föld feletti részének [1240g] kivonását metanollal (15 L) végeztük szobahőmérsékleten perkolálással. A kivonat száraz maradéka 159,5 g volt, amit metanolban (800 ml) oldottunk, majd 800 ml acetont adtunk az oldathoz. A kivált csapadékról dekantáltuk az acetonos-metanolos oldatot, és a csapadékot 200 ml aceton-metanol 1:1 arányú eleggyével mostuk. Az oldat és a mosófolyadék bepárlása után a maradék 141,8 g volt, melyet 800 ml metanolban oldottuk és 1600 ml acetont adtunk az oldathoz. A kivált csapadékról az oldatot dekantáltuk, majd a csapadékot 300 ml aceton-metanol 2:1 arányú eleggyével mostuk. Az így nyert oldat és mosófolyadék bepárlás után 113 g száraz maradékot adott, amit 500ml metanolban oldottunk. Az oldathoz 100 ml vizet adtunk és 10x200 ml n-hexánnal kiráztuk. A vizes metanolos oldat maradéka bepárlás után 99,9 g volt. Ezt 250 g poliamidra adszorbeáltattuk, majd a poliamidra adszorbeáltatott mintát 250 g poliamid oszlopra vittük fel. A poliamidról az ekdiszteroidokat vízzel és vizes metanol különböző arányú eleggyeivel (9:1 és 8:2 v/v) eluáltuk. Az eluálásra használt víz és a víz-metanol eleggyek térfogata rendre 3L, 2L és ismét 2L volt. Az eluátumokat bepároltuk, a bepárlási maradékok 68,9g, 5,1 g és 2,7 g voltak.

A poliamid oszlopról vízzel eluálódott anyagokat (68,9 g) fordított fázisú vákuum oszlop-kromatográfiával (RP-CC) frakcionáltuk tovább. A mintát két részletben dolgoztuk fel. A 2 x 34,45 g anyagot 30 %-os metanolban (8 ml) oldva oldat formájában vittük az oszlopra (150 g). Az ekdiszteroidok eluálását gradiens elucióval hajtottuk végre víz-metanol különböző arányú (30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 % és 60 %) eleggyeivel. 200 ml-es frakciókat szedtünk. Minden egyes gradiens lépésnél 1000 ml oldószert használtunk.

Az RP-CC-vel nyert 16-18 frakció anyagát rotációs planar kromatográfiával (RPC) szeparáltuk tovább. Kétlépéses gradiens eluciót használtunk diklórmetán-metanol-benzol (50:5:3 v/v/v és 25:5:3 v/v/v) elegyekkel (minden lépésben 100 ml oldószerkeletet használtunk). A lemez regenerálását 50 ml metanollal végeztük. A mozgó fázis átfolyási sebessége 4 ml/perc volt. 10 ml-es frakciókat szedtünk. Az RPC-vel nyert 6-os frakcióból kristályosítással tiszta anyagot kaptunk (**1** jelzésű anyag).

Az RPC-vel nyert 3-4 és a 8-9 frakciók anyagait ismételt RPC elválasztásnak vetettük alá. Az elválasztásoknál izokratikus eluciót alkalmaztunk összesen 120 ml diklórmetán-metanol-benzol (50:3:2 v/v/v) eleggyel. A szeparálás körülményei a továbbiakban megegyeztek az előbbieken leírtakkal.

A 3-4 frakciókból az ismételt RPC-vel nyert 7-9 és 10-11 frakciók tiszta anyagot eredményeztek (**2** és **3** jelzésű anyag, 1,2 mg és 1,4 mg), a 18-20 frakciókból NP-HPLC tisztítással kaptuk a **4** jelzésű anyagot (1,1 mg).

Az első RPC 8-9 frakciójából az ismételt RPC-vel jutottunk az **5** jelzésű anyaghoz (7-12 frakció) (11 mg).

A poliamid oszlopról a víz-metanol 9:1 és 8:2 eleggyel nyert anyagokat (7,8 g) egyesítettük és 24 g alumínium-oxidra adszorbeáltattuk. Az alumínium-oxidra adszorbeáltatott mintát 160 g alumínium-oxidot tartalmazó oszloptöltetre vittük. Vákuum oszlopkromatográfiás körülményeket alkalmazva diklórmetánt és diklórmetán-etanol (96 %) elegyekkel (95:5, 9:1, 85:15, 8:2 és 7:3 v/v) történt az ekdiszteroidok eluálása. Gradiens lépésként 10-10 frakciót szedtünk. A frakciók térfogata 100 ml volt. Az anyagok szeparálódását rétegekromatográfiával ellenőriztük. Az azonos anyagokat tartalmazó frakciókat egyesítettük. Az egyesítés során 3 ekdiszteroidokat tartalmazó frakciót nyertünk, melyek rendre a következők voltak: 14-20 frakció 0,39 g, 21-40 frakció 0,61 g és 41-50 frakció 0,1 g.

A 21-40 frakció anyagát 40 g fordított fázisú C-18 töltetet tartalmazó oszlopon vákuum oszlopkromatográfiás körülményeket használva fracionáltuk tovább. Az oszlopra az egyesített frakciók anyagát 30 %-os vizes metanolban oldva (8 ml) vittük fel. Az anyagok eluálását a fentiekhez hasonlóan, az RP-CC-nél megadott víz-metanol elegyekkel végeztük.

A fordított fázisú oszlopkromatográfiával nyert egyesített frakcióból (6-7 frakció) RPC elválasztásánál nyert 2-6 frakciót egyesítettük és ismételt RPC-vel fracionáltuk tovább. Az ismételt RPC-vel kapott 8-as és 12-13-as frakciókból kristályosítással tiszta anyagot

nyertünk (6 és 8 jelzésű anyag, 5 mg, 4 mg). A 9-10 és a 16-20 frakciót NP-HPLC-vel tisztítottuk tovább, így nyertük a (7 és 9 jelzésű anyag, 1,7 mg, 1,1 mg).

Az RP-CC oszlop 18-22 frakciójából RPC-vel (16-17 frakció) tiszta anyagot nyertünk (10 jelzésű anyag, 1 mg) kristályosítással. (részletesen a 8. publikáció)

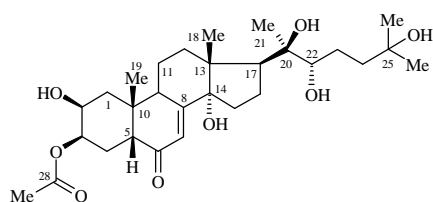
Az izolált ekdiszteroidok szerkezetének meghatározását 1D- és 2D-NMR spektroszkópiával hajtottuk végre. Összesen 10 ekdiszteroidot nyertünk az *Ajuga reptans* var. *reptans*-ból, melyek közül 7 szerkezete azonosnak bizonyult az irodalom alapján korábban már izolált ekdiszteroidokkal. Ezek a következők voltak: 20-hidroxiiekdizon 3-acetát **1**, ciaszteron 3-acetát **2**, ajugaszteron B' **4**, ajugalakton **6**, szengoszteron **8**, ciaszteron **7**, 29-nor-ciaszteron **9**. **Egy vegyület szerkezet-meghatározása folyamatban van, két vegyület a szerkezetvizsgálatok során új természetes anyagnak bizonyult. Ez utóbbiak: 23-hidroxi-kapitaszteron (5.) és a 24-etil-24,26-dihidroxi-taxiszterol 26-metilát (10.). A két új ekdiszteroid közül az utóbbi ekdiszteroid teljesen új típusú alapvázal rendelkező ekdiszteroid, egyrészt az első metilát az ekdiszteroidok között, másrészt oldallánca többszörösen hidroxilezett, mint az ismert ekdiszteroidoknak**

Az *Ajuga reptans* var. *reptans*-ból eddig izolált ekdiszteroidok közül a 29-nor-szengoszteront, a 20-hidroxiiekdizon 3-acetátot a ciaszteron 3-acetátot és a 29-nor-ciaszteront elsőként nyertük ki ebből az *Ajuga* fajból.

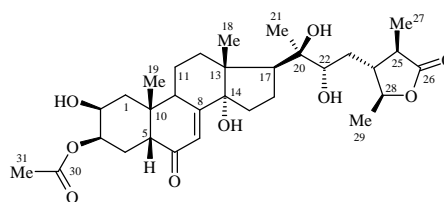
A főkomponenseket adó 20-hidroxiiekdizon tartalmát, ezen kívül a 23-hidroxi-kapitaszteron, ciaszteron, ajugalakton százalékos mennyiségét TLC/denzitometriás mérésekkel határoztuk meg. A 20-hidroxiiekdizon tartalom 0,08 %, a 23-hidroxi-kapitaszteron tartalom 0,0009 %, ciaszteron tartalom 0,0003 %, ajugalakton tartalom 0,0004 % volt.

Az eredményeinkről publikációk készítése folyamatban van.

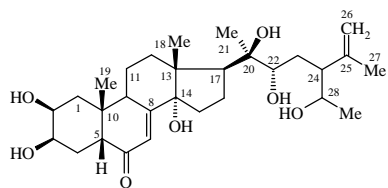
Az izolált ekdiszteroidok szerkezete:



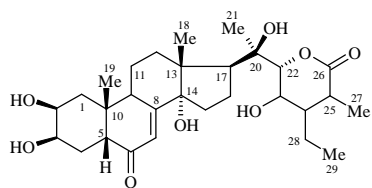
20-hidroxiiekdizon 3-acetát **1**



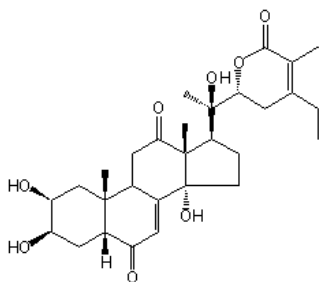
ciaszteron 3-acetát **2**



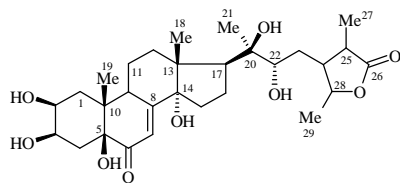
ajugaszteron B' 4



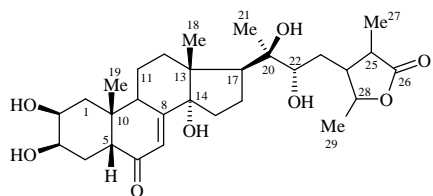
23-hidroxi-kapitaszteron 5



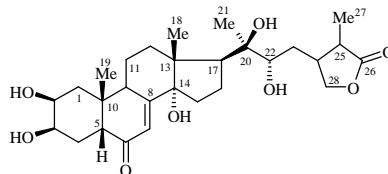
ajugalakton 6



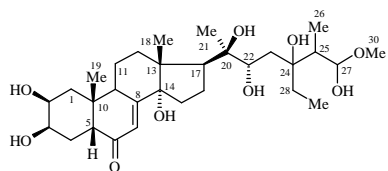
szengoszteron 7



ciaszteron 8



29-nor-ciaszteron 9



24-etil-24,26-dihidroxi-taxiszterol-26-metilát 10.