

A VITIS VINIFERA BIOLÓGIAILAG AKTIV FLAVONOIDJAINAK  
AZONOSÍTÁSA ÉS ANTIFUNGÁLIS TESZTELÉSE

Doktori dolgozat

Lovas Sándor

MTA Szegedi Biológiai Központja

"B" szintű Izotóp Laboratórium

Szeged, 1985



1. oldal .....  
 2. oldal .....  
 3. oldal .....  
 4. oldal .....  
 5. oldal .....  
 6. oldal .....  
 7. oldal .....  
 8. oldal .....  
 9. oldal .....  
 10. oldal .....  
 11. oldal .....  
 12. oldal .....  
 13. oldal .....  
 14. oldal .....  
 15. oldal .....  
 16. oldal .....  
 17. oldal .....  
 18. oldal .....  
 19. oldal .....  
 20. oldal .....  
 21. oldal .....  
 22. oldal .....  
 23. oldal .....  
 24. oldal .....  
 25. oldal .....  
 26. oldal .....  
 27. oldal .....  
 28. oldal .....  
 29. oldal .....  
 30. oldal .....





## TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	1. old.
2. IRODALMI ATTEKINTÉS A FLAVONOIDOK AZONOSÍTÁSÁRÓL SZINTÉZISÜKRŐL ÉS BIOLÓGIAI AKTIVITÁSUKRÓL.....	3. old.
2.1. A flavonoidok szerkezete és előfordulásuk.....	3. old.
2.2. A flavonoidok azonosítására és kivonására alkalmazott különböző technikák.....	4. old.
2.2.1. A növény előkészítése és extrahálása.....	4. old.
2.2.2. Az extraktum kromatográfiás elválasztása....	5. old.
2.2.3. Ultraibolya- és látható-spektroszkópia.....	10. old.
2.3. Flavonoidok szintézise.....	11. old.
2.4. A Vitis viniferaban előforduló flavonoidok....	16. old.
2.5. A flavonoidok biológiai hatása.....	18. old.
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK, KISÉRLETI EREDMÉNYEK.....	22. old.
3.1. Természetes eredetű hatóanyag izolálására vonatkozó extrakciós műveletek.....	22. old.
3.2. Vékonyréteg-kromatográfiás körülmények.....	23. old.
3.3. A flavonoid glükozidok szénhidrát komponensének kimutatása.....	24. old.
3.4. A szőlőlevél extraktum oszlopkromatográfiás feldolgozása.....	24. old.
3.5. A tiszta frakciók vékonyréteg-kromatográfiás és UV-spektroszkópiás vizsgálata.....	28. old.
3.6. Szintetikus vizsgálatok.....	33. old.
3.6.1. Kempferol előállítás.....	33. old.





3.6.2. Kvercetin-3- $\beta$ -D-glükopiranozid előállítása..	35. old.
3.6.3. 4',7-di-O-allil-kvercetin előállítása.....	36. old.
3.6.4. 7-O-benzil-kvercetin előállítása.....	37. old.
3.7. A levélfrakciók és szintetikus termékek antifungális hatásának tesztelési módszere, eredmények értékelése.....	38. old.
4. KISÉRLETI EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA, ÉRTÉKELÉSE...	50. old.
IRODALMI HIVATKOZÁSOK;.....	54. old.



## 1. BEVEZETÉS

A növényi eredetű fenolok egyik fő csoportját a flavonoidok alkotják. Előfordulásuk a természetben, kémiai szerkezetük és biológiai aktivitásuk közötti kapcsolat az elmúlt évtizedekben az érdeklődés középpontjába került.

A szőlő és a bor nagy karriert futott be az emberi táplálkozásban, ezt nemcsak a kellemes ízüknek, hanem némely esetben hasznos élettani hatásuknak köszönhetik, amelyet fenoltartalmuknak tulajdonítanak. A fenolok közül fontos szerepe van a magas flavonoid tartalmuknak. Régóta ismert tény, hogy a direkt termő szőlők a gombás és egyéb megbetegedésekkel szemben rezisztensek. Számos kutató kimutatta a vörös borok baktericid hatását. Ezeket az antibiális és rezisztens tulajdonságokat - többek között - a bennük megtalálható antociánoknak és más flavonoidoknak tulajdonítják. A kutatások nagyrésze a szőlőbogyó, illetve a bor antifungális hatású vegyületeinek felderítésével foglalkozott. Kevesebb figyelmet fordítottak a növény más részeiben, így a levélben, szárban megtalálható antifungális hatású flavonoidok azonosítására, ezért munkánk során egy direkt termő szőlő - az Othello - levelében lévő antifungális flavonoidok azonosítását és biológiai tesztelését végeztük el.

A szőlő és más növények rezisztenciájának megismerése, azaz olyan vegyületcsoportok felderítése, amelyek felelősek lehetnek ezen tulajdonságokért, nemcsak tudományos, hanem népgazdasági és környezetvédelmi szempontból is jelentősek. Megismerésükkel lehetőség nyílik olyan növényvédőszer elő-



állítására, amelyek a növények számára nem "testidegenek", tehát az ökológiai egyensúlyt kevésbé bontják meg.

Dolgozatomban a következő munkák elvégzéséről adok számot:

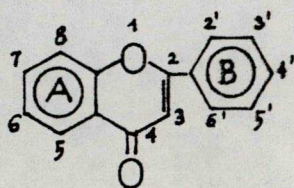
1. Az Othello szőlő leveleinek extrakciós feldolgozása.
2. A levélextraktum kromatográfiás tisztítása, a frakciók flavonoid tartalmának azonosítása.
3. Flavonoid származékok szintézise.
4. A levélfrakciók és szintetizált flavonoidok antifungális tesztelése, kémiai szerkezetük és biológiai hatásuk közötti kapcsolat vizsgálata.



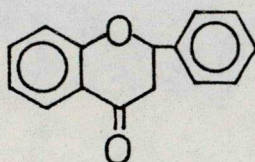
## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS A FLAVONOIDOK AZONOSÍTÁSÁRÓL, SZINTÉZISÜKRŐL ÉS BIOLÓGIAI AKTIVITÁSUKRÓL

### 2.1. A flavonoidok szerkezete és előfordulásuk:

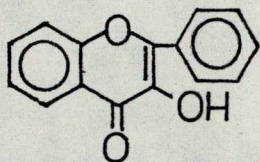
A természetben előforduló növényi fenolok egyik nagy csoportját a flavonoidok alkotják, amelyeknek az alapváza a 2-fenil-kromon. A flavonoidok az 1. ábrán bemutatott alapvegyületekből épülnek fel.



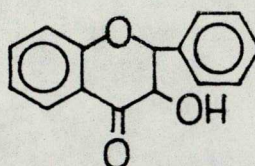
flavon  
/2-fenil-kromon/



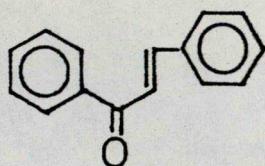
flavanon  
/2,3-dihidro-flavon/



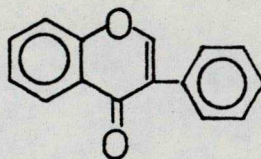
flavonol  
/3-hidroxi-flavon/



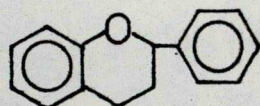
flavanonol  
/3-hidroxi-flavanon/



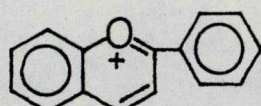
kalkon  
/bénzál-acetofenon/



izo-flavon  
/3-fenil-kromon/



flaván



flavilium-kation  
/antocianidin/

1. ábra



Az azonos alapvázból levezethető vegyületek a fenolos hidroxil-csoportok számában és helyzetében, valamint ezen csoportok metiláltságában és glükozidáltsági fokában különböznek egymástól. A cukrok általában  $C_3$ -on,  $C_7$ -en és  $C_4$ -ön helyezkednek el glükozidos kötésben. Az egyes vegyülettipusok gyakorlatilag soha nem fordulnak elő szabadon /aglükonként/, hanem valamilyen mértékig glükozidálva vannak, éppen ezért főleg a sejtnedvekben lokalizálódnak. Előfordulási helyüket tekintve - a virágsziromtól a gyökérig - a növények minden részében megtalálhatók.

## 2.2. A flavonoidok azonosítására és kivonására alkalmazott különböző technikák

### 2.2.1. A növény előkészítése és extrahálása

A növény előkészítése és a kiválasztandó módszer mindenkor attól függ, hogy milyen anyagot a növény mely részéből akarunk kinyerni. Azokban az esetekben, amikor a flavonoidok felületi olajokban, gyantákban találhatóak, egyszerűen csak le kell kaparni őket és megfelelő oldószerrel extrahálni kell ezeket az anyagokat.

Általában a növényt, illetve annak kiválasztott részét, az extrakció végrehajtása előtt apró részekre darabolva fel kell tárni. A káros enzimhatások /pl. a glükozidok hidrolizise/ kiküszöbölése érdekében a felaprított növényi anyagot forró oldószerbe kell helyezni, vagy gyors szárításnak kell alávetni. A nem kívánt lipofil anyagokat /karotenoidok, szterolok, klorofill/ petroléterrel, vagy hexánnal



előzetesen gyakran ki szokták extrahálni /1/, /2/. Ennek nagy hátránya az, hogy ilyenkor bizonyos zsiroldékony flavonoid aglükonok is elvesznek.

Az így előkészített növényből megfelelő oldószer segítségével a flavonoidok kinyerhetők. A kevésbé poláros aglükonok /izo-flavonok, flavanonok, dihidro-flavonolok, többszörösen metilált flavonok/ általában a következő oldószerekkel extrahálhatók: benzol, kloroform, etil-acetát, dimetil-éter /3/. A flavonoid glükozidok, poláros aglükonok /hidroxilált flavonok, flavonolok, kalkonok/ általában acetonos, alkoholos, vizes extrakcióval, vagy ezen oldószerek kombinációjával nyerhetők ki /4/. A legtöbb esetben a víz és metanol 1:1 arányu elegyét alkalmazzák extrahálásra, mivel ezen oldószer elegy segítségével széles skálájú extraktumot lehet kapni. Bizonyos alkalmakkor, főleg, ha antocianinok izolálása a cél nyomnyi mennyiségű sósavat is tesznek az extrahálószerbe /5/, habár ilyenkor a labilisabb glükozidok elhidrolizálhatnak.

Amikor különböző típusu flavonoidokat extrahálunk, célszerű a nyers extraktumot előzetes elválasztásnak alávetni. Ez megvalósítható különböző polaritású oldószerekkel egymásután végrehajtott extrakcióval, így el lehet választani a glükozidokat az aglükonoktól, a poláros aglükonokat az apoláros aglükonoktól /6/.

### 2.2.2. Az extraktum kromatográfiás elválasztása

A nyers növényi extraktum alkotórészeire történő szétválasztására legalkalmasabb a kromatográfiás elválasztás.



A három fő kromatográfiás módszert, az oszlopkromatográfiát, a papirkromatográfiát és a vékonyréteg-kromatográfiát külön-külön és egymással kombinálva is alkalmazzák a flavonoidok azonosításánál és tisztításánál.

#### A. Oszlopkromatográfia

Mind a mai napig az oszlopkromatográfiás módszer maradt, mint legegyszerűbben és legjobban alkalmazható technika a nagy mennyiségű nyers növényi extraktumok feldolgozásánál. A flavonoidok szétválasztására a következő adszorbenseket szokás alkalmazni: szilikagél, alumínium/III/-oxid, cellulóz, poliamid, Sephadex-gélek, ioncserélőgyanták. Ezek közül leggyakrabban a szilikagélt, a cellulózt és a poliamidot használják /6/. Az utóbbi időben egyre jobban előtérbe kerül a Sephadex-gélek alkalmazása.

A SZILIKAGÉL tölteten az eluáló szerek erősségének növekvő sorrendje a következő: petroléter, szén-tetraklorid, benzol, kloroform, dietil-éter, etilacetát, piridin, aceton, n-propanol, etanol, metanol, viz. A flavonoidok összes típusának szétválasztására alkalmas ez az adszorbens. A szilikagél víztartalmának beállításával az oszlop kötőképességét lehet változtatni. A víztartalom mellett a másik faktor, amely erősen befolyásolja a kötőképességet a fémionok jelenléte, mivel a poláros flavonoidokat erősen az adszorbenshez kötik. Ezt a kellemetlenséget egy előzetes sósavas mosással lehet elkerülni /4/.

A CELLULÓZ töltettel elvégzett kromatográfia alkalmas a flavonoidok összes csoportjának és glükozidjainak



elválasztására /6/. A szétválasztás adszorpciós és megoszlásos folyamatokon alapszik, melyek erősen függenek az eluentsól. Elvben a paprikromatográfiában alkalmazott összes eluens itt is használható, leggyakrabban a vizes alkoholt savtartalommal, vagy anélkül alkalmazzák /7/. A cellulózpor kis kapacitással rendelkezik és felbontási készsége limitált, noha ezek a hátrányok az oszlop gondos töltésével kiküszöbölhetők, mégis nagyon sokan helyette inkább a papirkromatográfiát alkalmazzák.

A legszélesebb körben elterjedt adszorbens a POLIAMID, amelyen az eluotróp sor a következő képpen alakul: viz, metanol, acetone, vizes nátrium-hidroxid, dimetil-formamid, vizes karbamid /9/. Nagy affinitással köti meg a fenolos anyagokat hidrogénhidkötések kialakításával /10/. A kötések erőssége flavonoidok esetén a fenolos hidroxil-csoportok számától függ /11/. Az elució a poliamid oszlopról attól függ, hogy az eluens képes-e helyettesíteni az oszlop kötőhelyein lévő anyagokat, vagy pedig erősebb hidrogénkötést tud kialakítani az eluálendő vegyülettel. Az adszorbens alkalmas a flavonoidok összes típusának a szétválasztására /12/. A cellulóznál nagyobb a kapacitása és a felbontóképessége. A flavonoidok egy csoportján belül a diglükozidok eluálódnak először, ezt követik a monoglükozidok és legvégül az aglükonok hagyják el az oszlopot. Az aglükonok közül - amelyek eluciójára legalkalmasabbak a nemvizes oldószerek - a kevesebb hidroxil-csoportot tartalmazók eluálódnak legelőször.



A SEPHADEX-GÉL térhálós szerkezetű dextrán-gél, amely alkalmas molekulaméret szerinti elválasztásra, itt az eluciós sorrend csökkenő molekulaméret szerinti /13/. A hidroxil-propilált dextrán - amelyet a kereskedelemben Sephadex LH-20-nak neveznek - a molekulaszűrésen túlmenően használható a flavonoidok és aromás rendszerek adszorpciós kromatográfiás elválasztására szerves, illetve szerves/víz oldószerekben /14/, /15/. A flavonoidok adszorpciója a töltethez a hidroxil-csoportok számától függ. Metanolt használva eluensként az eluciós térfogat a szabad hidroxil-csoportok számával, nem pedig ezek savasságával hozható kapcsolatba /15/.

A flavonoid glükozidok esetén nem csupán az adszorpció a meghatározó folyamat, mint az aglükonok esetén, hanem a molekulaszűrés is közrejátszik az elució sorrend kialakításában, azaz a glükozidok kisebb eluciós térfogattal eluálódnak. A Sephadex-gélek minden esetben helyettesíthetik a cellulóz töltetet, főleg akkor, ha nagy kapacitás és nagy felbontó képesség szükséges az elválasztáshoz /6/.

#### B. Vékonyréteg-kromatográfia

A vékonyréteg-kromatográfia az elmúlt időkben gyors fejlődésen ment keresztül és szinte teljes mértékben felváltotta a papirkromatográfiát mind analitikai, mind preparatív szinten. A flavonoidok elválasztásakor - hasonlóan az oszlopkromatográfiához - három fő adszorbenst a szilikagélt, a cellulózt és a poliamidot szokták alkalmazni. Az elválasztás mechanizmusa és az oldószer eluciós erőssége ugyanaz, mint az oszlopkromatográfiában, azzal a fő



előnyvel, hogy itt szélesebb körből lehet oldószereket, illetve oldószerkelegyeket választani /6/. Általában a flavonoidok a rétegen erősebben kötődnek, mint az oszlopon, ezért nagyobb polaritású oldószerek szükségesek az elválasztáshoz. A vékonyréteg-kromatográfia nagy jelentősége abban rejlik elsősorban, hogy a nyers extraktumok és az oszlop-kromatográfiával nyert frakciók komponenseinek a száma könnyen kimutatható. Ezek mellett természetesen kis anyagmennyiségek tisztítására, kinyerésére szintén kiválóan alkalmas.

A flavonoidok egy része nem látható a vékonyréteglapon, ezért valamilyen módon elő kell hívni őket. A legtöbb esetben UV-fényben /366 nm hullámhosszon/ ez megtehető  $\text{NH}_3$  jelenlétében, vagy nélküle /12/, /16/. Az UV-fénnyel történő detektálást gyakran elősegítik a réteglapokba bekevert fluoreszcens indikátorok. Ezen technikák mellett legelterjedtebben az úgynevezett lefújó-szereket alkalmazzák, amelyek speciális kémiai reakciók következtében színváltozást idéznek elő a réteglapon megkötött anyagokban. Ilyen leggyakrabban alkalmazott reagensek alumínium/III/-klorid /17/, réz/II/-szulfát /Benedict-reagens/ /18/, diazotált-para-nitro-anilin /19/, vanillin /20/.





### 2.2.3. Ultraibolya- és látható-spektroszkópia

A kromatográfiásan egyedi összetevőkre szétválasztott növényi extraktum kémiai komponenseit, szerkezetét fizikai és kémiai módszerekkel lehet meghatározni. A flavonoidok szerkezetének analizisében napjainkra az UV-spektroszkópia vált fő módszerré. Ennek több oka van, amelyek közül a legelső az a tény, hogy egy spektrum felvételéhez nagyon kis mennyiségű tiszta anyag szükséges - sokszor elegendő annyi, amennyit egy vékonyréteglapról lekapart adszorbensről ki lehet oldani. A flavonoidok UV-spektruma két fő adszorpciós maximumra osztható /12/: 300-400 nm közötti tartomány /I. sáv/, amely a B-gyűrű cinnamoil részével hozható kapcsolatba, a másik 240-285 nm /II. sáv/ között található és az A-gyűrű benzoil rendszerével kapcsolatos.

A szerkezetről nyert információk mennyisége nagyban megnövelhető specifikus reagensek /shift-reagensek/ segítségével /21/. A shift-reagensek a flavonoidok egy vagy több funkciós csoportjával reagálva jól definiálható változást okoznak az elektron-spektrumban, a karakterisztikus csúcso-  
batokróm eltolódást szenvednek. A következő shift-reagenseket szokták alkalmazni /12/:  $\text{NaOCH}_3$ ,  $\text{NaOAc}$ ,  $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$ . A nátrium-metilát, mint erős bázis a flavonoid vázon lévő összes hidroxil-csoportot ionizálja, ezért mindkét sáv eltolódik 40-65 nm-rel a hosszabb hullámhosszak felé /12/. A nátrium-acetát gyengébb bázis, mint a nátrium-metilát, ezért csak a legsavasabb hidroxil-csoportokat



ionizálja, azaz a C-3, C-7 és C-4<sup>'</sup> helyzetűeket /22/. A C-7 hidroxil-csoport ionizációja a II. sáv helyzetét befolyásolja, míg a C-3 és C-4<sup>'</sup> helyzetű hidroxil-csoportok ionizációja az I. sávban okoz batokrómtolódást. A bórsav nátrium-acetát jelenlétében az orto-dihidroxil-csoportokkal kelát-komplexeket képez, kivétel a C-5,6 pozíció, mivel ezzel nem reagál /23/. Az alumínium/III/-klorid a következő funkciós csoportokkal képez kelátokat: 5-hidroxi-4-keto, 3-hidroxi-4-keto és az orto-dihidroxi rendszerek /24/. Sósavas közegben csak a 3-hidroxi-4-keto és az 5-hidroxi-4-keto kelátok stabilak, ezért ezek jelenlétét nagy biztonsággal ki lehet mutatni.

A spektrumokat vizmentes metanolban kell felvenni, mivel pl. nyomnyi mennyiségű víz jelenléte az etil-alkoholban már megakadályozná az alumínium-komplexek kialakulását /25/.

### 2.3. Flavonoidok szintézise

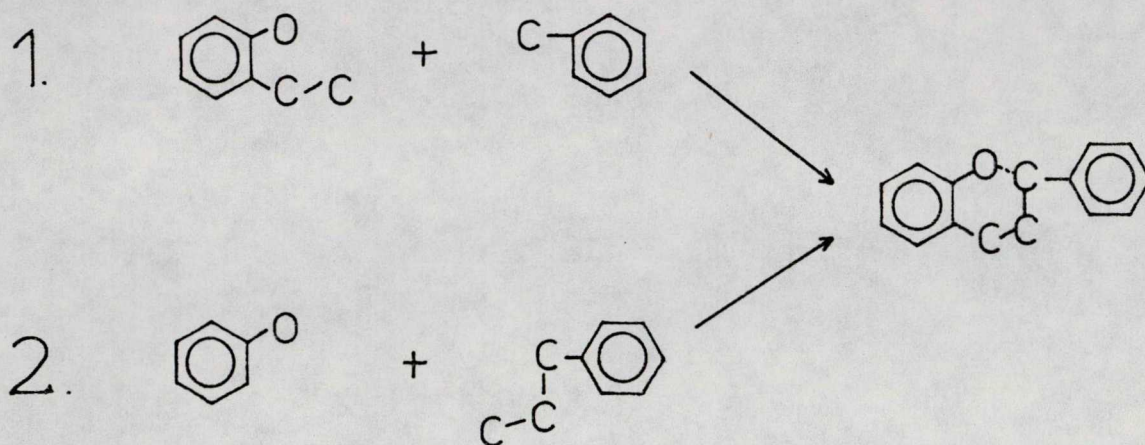
A C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> flavonoid váz kialakítására elvileg több lehetőség kínálkozik, azonban a laboratóriumi szintézisekben kettőnek van jelentősége /26/. A két szintézisút vázlatosan a 2. ábrán látható.

1. C<sub>6</sub>C<sub>2</sub> egység /2-hidroxi-acetofenonok/ kondenzációja egy C<sub>6</sub>C<sub>1</sub> egységgel /aromás aldehidek/.
2. C<sub>6</sub> egység /fenolok/ acilálása C<sub>6</sub>C<sub>3</sub> egységgel /fahéjsav és származékai/.

A második reakcióút megfelel a flavonoidok bioszintetikus előállításának. Ezek mellett az egyes vegyületet előállit-



hatók még egymás közötti átalakítással /interkonverzió/, oxidációval, részleges vagy teljes alkilálással, dealkilálással, szelektív glükózidálással.



2. ábra

#### A. Kalkon és származékai

Azon túlmenően, hogy a kalkonok a növényekben megtalálhatók nagy jelentőségük van a flavonoidok szintézisében, mint intermedierek. Az 1. sémának megfelelően sav, vagy bázis által katalizált kondenzációval állíthatók elő 2-hidroxi-acetofenonból és szubsztituált benzaldehydből. A savkatalízis elősegíti a ciklizációt flavanonná, ezért azokban az esetekben, amikor maga a kalkon származék előállítás a végcél, akkor a báziskatalízis alkalmazása a célravezető. A flavanon képződését inhibiálja a C-4 pozícióban jelenlévő szabad hidroxil-csoport /27/.



## B. Flavanonok

A flavanonok izomer vegyületek a kalkonokkal, ezért belőlük könnyen előállíthatók savkatalizált gyűrűzáródással. A gyűrűzáródás főleg akkor kedvezett, ha a kalkon C-6' pozíciójában szabad hidroxil-csoport van jelen, vagy általában floroglucin szubsztitúciós mintájú a kalkon /28/. A flavanonok másik előállítási lehetősége a flavonok hidrogénezése, azonban ezeknek nincs gyakorlati jelentőségük /27/.

## C. Flavonok

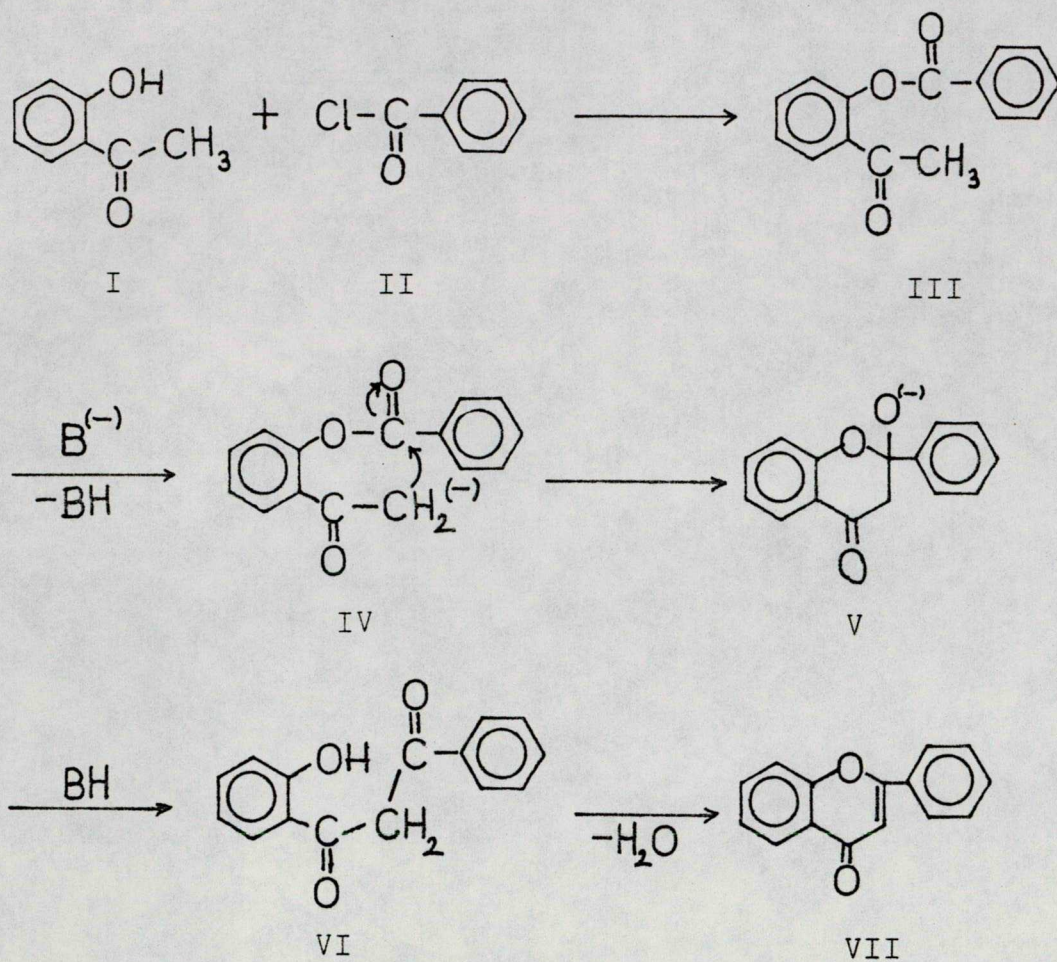
A flavonok előállíthatók flavanonokból, kalkonokból dehidrogénezéssel, vagy pedig egyszerű prekursorokból kondenzációs reakcióval /Baker-Venkataraman reakció, Allan-Robinson kondenzáció/. A hidrogénelvonásra egyik lehetőség a szelén-dioxiddal történő melegítés amid-alkoholban /27/, a másik lehetőség pedig Kostanecki klasszikus módszerén alapul /29/: a C-3 pozíció brómozása, majd pedig hidrogén-bromid kihasítása lúgos közegben.

### Baker-Venkataraman reakció /30/, /31/:

Ezzel a reakcióval lehet előállítani az orto-hidroxi-dibenzoil-metánt az orto-aroiloxi-acetofenonból báziskatalízissel. A módszer reakcióegyenlete a 3. ábrán látható.

Az orto-hidroxi-acetofenonok /I/ acilálódhatnak aromás savkloridokkal /II/ acetonban  $K_2CO_3$  jelenlétében, vagy piri-dinben; a keletkezett észter /III/ báziskatalízissel /KOH, NaH/ diketonná alakul át /VI/, majd legvégső lépésként báziskatalizált intramolekuláris Claisen-kondenzációval kialakul a flavon /VII/.





3. ábra

Allan-Robinson kondenzáció /32/:

Ezzel a reakcióval a flavonok egy lépésben állíthatók elő a következő módon: orto-hidroxi-acetofenonokat aromás savanhidridekkel reagáltatnak olajfürdőn, katalizátor-ként a sav sóját, trimetil-amint, piridint alkalmaznak. Ebben a folyamatban szintén keletkezik o-aroiloxi-acetofenon és o-hidroxi-dibenzoil-metán, azonban ezeket nem szokták izolálni. A mellékreakciók elkerülése végett az olajfürdő hőmérséklete nem lehet magasabb, mint a reaktánsok olvadáspontja.



#### D. Flavonolok

Ezt a vegyületcsoportot két módszerrel lehetséges előállítani. Az egyik az Allan-Robinson kondenzáció, a másik pedig az AFO /Algar-Flynn-Oyamada/ reakció /33/, /34/. Az Allan-Robinson kondenzációban a kiindulási anyagok

$\omega$ -metoxi, vagy  $\omega$ -benzoiloxi-acetofenonok és a megfelelő aromás-karbonsavak anhidridjei. A reakció körülményei a fent említettekkel teljesen azonosak.

Az AFO-reakcióban 2-hidroxi-kalkont oxidálnak lugos közegben egy lépésben  $H_2O_2$ -vel flavonollá.

#### E. Flavonoid glükozidok

A flavonoidok a természetben szinte csak glükozidált formában találhatók meg, ezért fontos néhány szóval beszélni a szintézisükről.

Legelső lépésként minden esetben az  $\alpha$ -acetobrómcukrot kell előállítani, mivel ez az az aktív vegyület amellyel a cukrok könnyen hozzákapcsolhatók az aglükonokhoz glükozidos kötéssel. Ha az aglükonokban több hidroxil-csoport van, akkor megfelelő módszerrel meg kell védeni azokat a csoportokat, amelyeket nem akarunk glükozidálni, a flavonoidok esetén általában védőcsoportként a benzil-csoportot alkalmazzák /35/. A glükozidálásnál lényeges szempont a hidroxil-csoportok savassága, amely pl. kvercetin esetén  $C-7 \gg C-4' > C-3 > C-5 > C-3'$  /36/, ezért ha C-7 helyzetbe akarunk beépíteni egy cukormolekulát, úgy a többit nem kell védeni, hisz a Königs-Knorr reakció körülményei között csak a C-7 hidroxil-csoport fog reagálni.



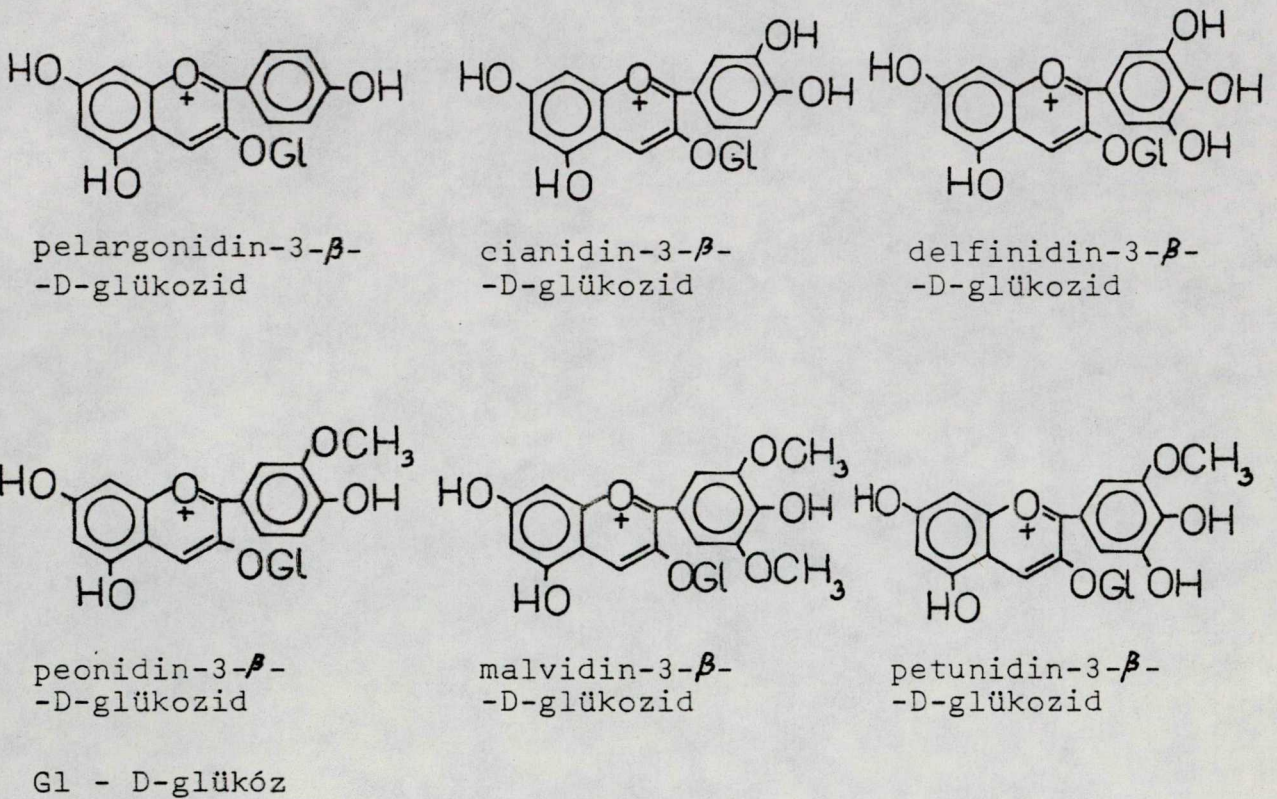
Általában elmondható, hogy a D-sorozatba tartozó  $\alpha$ -acetobrómcukrok a Königs-Knorr és Zemplén-féle flavonoid glükozid szintézis körülményei között Walden-inverzió közben  $\beta$ -D-glükozidokká alakulnak. Azonban, ha az ezüst sói helyett rézsókat alkalmazunk katalizátorként, akkor a Walden-inverzió elmarad /27/.

#### 2.4. A Vitis viniferában előforduló flavonoidok

A direkt termő szőlő gombás megbetegedésekkel szembeni rezisztenciáját - egyik okaként - a szőlők magas fenol tartalmával magyarázzák. Éppen ezért széles körben vizsgálták ezen vegyületek és főleg a flavonoidok előfordulását a szőlő különböző részeiben. Kezdetben a szőlőtermésének és terméshéjának flavonoid tartalmát tanulmányozták, mivel ezek ismerete nemcsak rezisztencia, hanem az emberi táplálkozás szempontjából is lényeges.

A Vitis vinifera termésének flavonoid tartalma nagy részt antocianinokból áll /37/. Ezek általában 3-O-monoglükozidok, egyes fajtákban 3,5-O-diglükozidok is előfordulnak. A legnagyobb mennyiségben megtalálható antocianinok: pelargonidin-, malvinidin-, cianidin-, delfinidin-, peonidin-, petunidin-3-O-glükozid. Szerkezetük a 4. ábrán látható. Némely esetben az antocianidinhez kapcsolódó D-glükóz hármas pozícióban 4-hidroxi-fahéjsavval acilálva van /38/.





4. ábra

A szőlő egyéb részeiben lévő flavonoidok azonosítására rendszeres vizsgálatokat csak az elmúlt évtizedben kezdték meg. Egger és mtsi /39/ négy *Vitis vinifera* specieszt tanulmányoztak. Legnagyobb mennyiségben kvercetin találtak, jóval kisebb mennyiségben volt jelen a kempferol és a miricetin, a negyedik flavonoidot pontosan nem tudták azonosítani, csak vékonyréteg-kromatográfiás viselkedése alapján állították róla, hogy flavonoid. Egyik vegyület sem fordult elő aglükon formában, két cukorkomponenst mutattak ki a D-glükózt és a D-glükuronsavat.

Bachmann /40/ kilencven fajta szőlő levelének fenoltartalmát vizsgálta, eredményei alapján ezeket két fő csoportra osztotta:



1. Egyszerű fenol-karbonsavak:

- a. fahéjsav származékok
- b. benzoésav származékok

2. Flavonoidok:

- a. flavonolok, flavonok
- b. antocianidinek

Antocianidinek alatt a nemhidrolizálható cserzőanyagok savkezeléséből nyert reakciótermékek mesterséges csoportját érti. Az általa kimutatott flavonoidok a következők voltak: kvercetin-3-O- $\beta$ -D-glükuronid /kvercituron/, kvercetin-3-O- $\beta$ -D-glükozid /izo-kvercitrin/, kvercetin-3-O- $\beta$ -rutinozid /rutin/, kempferol-3-O- $\beta$ -D-glükozid /ez nagyon kis mennyiségben volt jelen/, kempferol-3-O- $\beta$ -D-glükuronid, miricetin-3-O- $\beta$ -D-glükozid /ennek létét csak feltételezi, mivel aglükonként tudta csak kimutatni/. Vizsgálta ezen anyagok hatását a *Botrytis cinerea* gombára, azonban fiziológiás koncentrációban a gomba növekedésében nem tapasztalt gátlást.

2.5. A flavonoidok biológiai hatása

A flavonoidok széles körű biológiai hatással rendelkeznek. Részt vesznek a növények növekedés szabályozásában, mint növényi szinezékek a megporzási folyamatban a rovaroknak attraktánsként szerepelnek /12/, a fotoszintetizáló rendszerben energiaátvivő anyagokként vesznek részt, antibiális hatásukkal a növények egészség megővésében szerepelnek.

A flavonoidok antibiális hatásuk kifejtésekor egy, vagy több enzimre, enzimrendszerre hatnak /12/. Biológiai





hatásuk vizsgálatakor figyelembe kell venni kémiai reaktivitásukat, különböző közegekben való oldhatóságukat, adszorpciós képességüket sejtmembránok felületére. Fontos szerepet játszik a biológiai tulajdonságokban különböző fémekkel szembeni reaktivitásuk, hajlamuk kelát-komplexek képzésére /41/, amellyel a metallo-enzimek aktivitását képesek befolyásolni. Kador és mtsi /42/ az Aldóz-Reduktáz enzim inhibícióját vizsgálták különböző flavonoidokkal. Hückel-féle kvantumkémiai számításokat is végeztek az elektronszerkezet és biológiai hatás közti összefüggés vizsgálatára. Eredményeik szerint a LUMO /Lowest Unoccupied Molecular Orbital/, amely a molekula elektrofilitásáról ad számot, korrelációba hozható a biológiai hatással. Ebből a szempontból a flavonoidoknál a keto-csoport központi szerepet játszik, erősen polarizált csoport lévén, töltésátviteli kölcsönhatásokban elektrópárt képes befogadni. Ferrel és mtsi /43/ CNDO/2 kvantumkémiai számításokkal hasonló megállapításra jutottak, azaz a flavonoidok töltésátviteli kölcsönhatások kialakításával képesek bizonyos enzimek aktivitásának megváltoztatására.

Számos flavonoid ismert, mint fitoalexin. A fitoalexinek antimikrobiális metabolitok, amelyek az egészséges növényekben patogén gombák, vagy baktériumok támadása következtében nagy koncentrációban szintetizálódnak a megtámadott sejtek környezetében /44/. A fitoalexin flavonoidok nagy része izo-flavonoid vázu vegyület. Legelsőként a *Lupinus* nemzetségből izoláltak ilyen anyagot a luteont /5,7,2',4'-tetrahidroxi-6-dimetil-allil-3,3-izoflavon/ /45/. Megvizsgálták a



hatását *Helminthosporium carbonum* gomba növekedésére és 35-40  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  koncentrációban teljes növekedésgátlást tapasztaltak. A luteon mellett számos más izo-flavon is előfordul, ilyen pl. a formonometin és biochanin, azonban ezek egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációban hatékonyak.

A direkt termő szőlő gombás megbetegedésekkel szembeni rezisztenciája ismert dolog. Ez a rezisztencia kifejeződik fitoalexinek termelésében /46/, pre-infekciós faktorként jelenlétében stb. Pre-infekciós faktorként ismerik el a szőlőbogyó magas antocián tartalmát. A levélben jelenlévő flavonoidokról még nem állapították meg egyértelműen az antifungális hatást /40/.

Henke a szőlő-tetűvel szembeni rezisztenciát vizsgálta /47/, és megállapította, hogy az ellenálló fajták nem a magas flavonol tartalommal, hanem a polifenol-oxidáz és peroxidáz enzimrendszerek nagy aktivitásával jellemezhetők. Ez azért érdekes tény, mivel a növényekben fertőződés hatására az említett enzimrendszerek kinonokká oxidálhatják a flavonoidokat, amelyek így sokkal reaktívabb vegyületekké válnak. In vitro körülmények között azonban még nem vizsgálták a kinonokká oxidált flavonoidok antibiális hatását.

Bachmann/48/ nyolcvan fajta szőlő kondenzált-tannin tartalmát vizsgálta összefüggésben a gombarezisztenciával. A kondenzált tanninok kizárólag delfinidin és malvinidin alegységekből épülnek fel. Az uralkodó relativ molekula-



tömeg 4000 körül mozgott. A fungosztatikus hatás kimutatására a *Botrytis cinerea* kulturszövedékéből nyert hidrolitikus enzimek aktivitásának inhibícióját tanulmányozta. A rezisztens fajtáknak 200  $\mu\text{g/g}$  friss súly értéknél nagyobb a kondenzált-tannin tartalma.



### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK, KISÉRLETI EREDMÉNYEK

#### 3.1. Természetes eredetű hatóanyag izolálására vonatkozó extrakciós műveletek

A flavonoid hatóanyag azonosítása céljából a NIKE Füzfőgyárteleptől 15 kg Othello szőlőlevelet kaptunk. A leveleket késsel apróra vágtuk, majd háztartási turmixgépben 50 %-os vizes etanollal homogenizáltuk. Így 40 liter extraktumot kaptunk, amelyet  $-5^{\circ}\text{C}$ -on két hétig állni hagytuk. Ezt követően nagy teljesítményű háztartási centrifugában szövet-szűrő alkalmazásával a növényi maradékot elválasztottuk az oldattól, majd a kolloidális szennyeződések további centrifugálással /16000 fordulat/perc / távolítottuk el. Az így megtisztított 30 liter növényi kivonatot a jobb kezelhetőség érdekében BÜCHI rotavapor RE vákuumbepárlóval  $30^{\circ}\text{C}$ -on 5 literre bepároltuk. A kapott koncentrátumból a jelenlevő organofil komponenseket extrakcióval távolítottuk el. Egy liter oldatot  $2 \times 300 \text{ cm}^3$  40:60 arányú etil-acetát szén-tetraklorid eleggyel extraháltunk. Legvégül a hidrofil fázist WKF LO 5 készüléken 0,1 Pa nyomáson liofilizáltuk, amelynek eredményeképpen nagy viszkozitású, olajosan mozgó liofilizátumot kaptunk. Ezt az extraktumot használtuk fel az oszlopkromatográfiás elválasztáshoz.



### 3.2. Vékonyréteg-kromatográfiás körülmények

A növényi extraktum összetettségét vékonyréteg-kromatográfiásan lehet vizsgálni. Az általunk használt vékonyréteglapok: cellulóz /Merck, DC-Alufolien Cellulose/, szilikagél /Merck, DC-Fertigplatten 60 F<sub>254</sub>/, poliamid /Merck, DC-Alufolien Polyamid 11 F<sub>254</sub>/ voltak.

A cellulózlapon a n-butanol/ecetsav/víz /BAW/ 4:1:4 rendszer felső fázisát használtuk futtatószerként. Ebben a rendszerben a glükozidok kicsi, míg az aglükonok nagy R<sub>f</sub>-értékkel futnak. A cukor komponens azonosítására futtatószernek az etil-acetát/piridin/víz /EPW/ 2:1:2 felső fázisát alkalmaztuk.

A szilikagél lapon a flavonoid glükozidok poláros oldószerekkel választhatók el jól egymástól. Vizsgálataink szerint az egyik legjobb futtatószer az etil-acetát/metil-etil-ke-ton/hangyasav/víz /EBFW/ 5:3:1:1 arányu elegye. Ebben a rendszerben a glükozidok nagy, míg az aglükonok kis R<sub>f</sub>-értékekkel jellemezhetők.

A poliamid rétegen két futtatószer-t alkalmaztunk: víz/etanol/metil-etil-ke-ton/acetil-aceton 65:15:15:5 elegy /A/ , ez főleg glükozidok szétválasztására alkalmas, benzol/metil-etil-ke-ton/metanol 50:25:30 elegy /B/ pedig aglükonok szétválasztására bizonyult jó rendszernek.

A rétegeken az egyes anyagok detektálását a lapok UV-fénnyel történő besugárzásával valósítottuk meg.



### 3.3. A flavonoid glükozidok szénhidrát komponensének kimutatása

Az egyes flavonoid glükozidok szénhidrát összetevőjének kimutatását a következőképpen végeztük el/12/: a vizsgálandó anyagból 5 mg-ot mértünk ki és 2 mólos sósav oldatban oldottuk fel, majd ehhez hozzáadtunk 1 cm<sup>3</sup> metanolt. Egy órán keresztül visszafolyattuk, majd lehűtöttük és vákuumbepárló készüléken fele térfogatra bepároltuk. Ezután 10 cm<sup>3</sup> éterrel extraháltuk. A vizes fázist szárazra bepároltuk, az éteres fázist Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-on történő szárítás után szintén bepároltuk. A vizes fázisban a lehidrolizált szénhidrát, míg az éteres fázisban az aglükon található. A bepárolt vizes fázist feloldottuk, vékonyrétegen megfuttattuk és standard cukor sorozattal hasonlítottuk össze.

### 3.4. Szőlőlevél extraktum oszlopkromatográfiás feldolgozása

Előzetes vizsgálataink és az irodalmi adatok alapján a poliamid /Woelm/ töltet segítségével nagy mennyiségű extraktumot lehet szétválasztani. A művelet elvégzéséhez az 5. ábrán látható kromatográfiás elrendezést állítottuk össze.

Az oszlop mérete: 4 cmx 60 cm.

Az adszorbens tömege: 150 g.

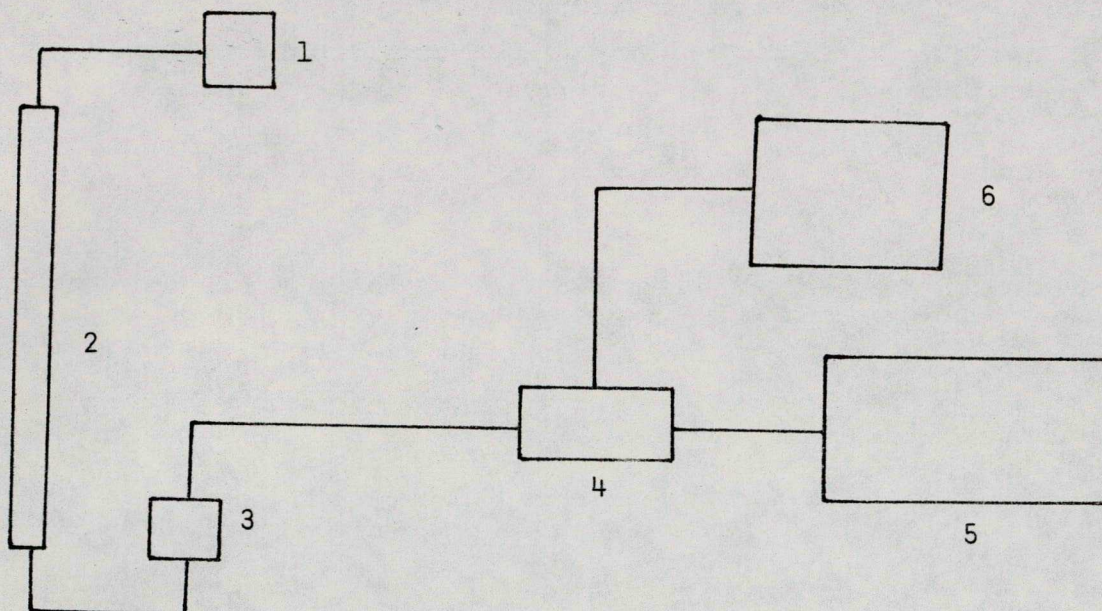
Elució: lineáris gradiens elució /desztillált víztől a 100 %-os metanolig/

Aramlási sebesség: 1,5 cm<sup>3</sup>/perc .

A felvitt minta mennyisége: 5 g

A frakciók térfogata: 10 cm<sup>3</sup>.





- 1 Gradiens edény
- 2 Az adszorbenssel megtöltött edény
- 3 LKB 12000 VARIOPERPEX perisztaltikus pumpa
- 4 UVICORD 4700 optikai egység
- 5 ULTRARAC 7000 frakció kollektor
- 6 OH-814 potenciometrikus rekorder

5. ábra

Az elució kontrollját UV-detektorral valósítottuk meg, amely 254 nm-en mérte a rajta keresztül folyó eluátum fényelnyelését. A detektorból érkező elektromos jelet egy rekorderre vezettük, amely az elució profilját rajzolta ki. A levél-extraktum nyolc frakcióra vált szét. A frakciók össztérfogata 1,8 liter volt, mindegyiket bepároltuk. Mivel egy kromatográfiás lépésben a kapott flavonoid frakciók összmenyisége nagyon kevés volt /100-200 mg/, ezért többször meg kellett ismételni az elválasztási műveletet. Minden egyes elució



végrehajtása után vörös elszíneződés maradt az oszlop te-  
tején, amelyet nem lehetett leoldani, ezért ezeket eldobtuk.  
A frakciók összetételét vékonyréteg-kromatográfiásan vizs-  
gáltuk /1.táblázat/.

1.táblázat

Frakció	Retenciós faktor					
	Cellulóz/BAW			Szilikagél/EBFW		
I.	0,052	0,478	0,635	0		0,424
II.	0,383	0,574	0,678	0,485		
III.	0,548	0,600	0,678	0,24		0,491
IV.	0,600	0,678	0,896	0,355	0,477	0,57
				0,669	0,831	
V.	0,683	0,796		0,389	0,485	0,593
				0,700		
VI.	0,683			0,509	0,618	0,77
				0,824		
VII.	0,683	0,940		0,538	0,822	
VIII.	0,599	0,676	0,965	0,512	0,813	

A táblázatból jól látható, hogy az egyes frakciók nem egy-  
komponensűek, hanem összetettek. Ezért még további oszlop-  
kromatográfiás elválasztásnak kell alávetni őket. Előzetes  
antifungális tesztelés alapján az első és a második frakció



bizonyult hatékonynak, ezért figyelmünket ezekre fordítottuk.

A frakciók újbóli szétválasztását Sephadex LH-20-gélen /Pharmacia/ valósítottuk meg. A kromatográfiás elrendezés hasonló volt az előzőhöz.

Az oszlop mérete: 60 x 1,5 cm.

Adsorbens tömege: 30 g.

Áramlási sebesség: 2,5 cm<sup>3</sup>/perc.

Elució: 100 %-os metanol.

A felvitt minta mennyisége: 0,1 g.

A poliamid oszlopkromatográfiával kapott frakciók közül elsőként az első frakciót választottuk szét, amelyek összetételét ismét vékonyréteg-kromatográfiával néztük meg /2.táblázat/.

2.táblázat

Frakció	Retenciós faktor		
	Cellulóz/BAW		
I.	0,046		
II.	0,0522		
III.	0,030	0,477	0,623
IV.	0,676		

A táblázatból látszik, hogy ezek közül csak a harmadik frakció összetett, a többi nem. A poliamid kettős frakciója három komponensre vált szét, azonban ezek közül mennyiségileg egy messze túlhaladta a másik kettőt, ennek az  $R_f$ -értéke cellulóz-lapon BAW-ban 0,75 volt.



### 3.5. A tiszta frakciók vékonyréteg-kromatográfiás és UV-spektroszkópiás vizsgálata

A legutolsó lépésben - a Sephadex LH-20 adszorben- sen - egyedi komponensekre szétválasztott levélextraktum azonosítását vékonyréteg-kromatográfiával és UV-spektroszkópiával - ahol szükséges volt, kémiai szintézissel - végeztük el. A vékonyréteg-kromatográfiás azonosítást ismert anyagokkal történő összehasonlítással oldottuk meg. Az UV-spektroszkópiához a frakciók metanolos oldatát készítettük el. A spektrumokat shift-reagensek hozzáadásával is felvettük, ezek segítségével a gyűrűk szubsztitúciójára lehet következtetni. A reagensek elkészítésének pontos leírása /12/-ben található meg. A méréseket SPECORD UV VIS készüléken végeztük el.

1. Az I-es frakció az A futtatószerben 0,03  $R_f$ -értékkel fut. Az irodalmi adatok szerint /39/ ez megfelel a flavonoidok glükuronid származékának. Ennek bizonyítására az anyagot sósavas hidrolízisnek vetettük alá. A lehidrolizált szénhidrát a D-glükuronsav volt. Az aglükon két komponensre vált szét cellulóz lemezen. A kisebb  $R_f$ -értékű /0,71/ a kvercetin volt, a nagyobb  $R_f$ -értékű /0,96/ az UV-spektroszkópiás viselkedése alapján /3.táblázat/ kempferolnak bizonyult. Ennek bizonyítására a szintézisét is elvégeztük, amely alátámasztotta feltevésünket. A két glükuronidot poliamid rétegen a B futtatószerben tudtuk szétválasztani. Lekapartuk őket a rétegről, metanollal kioldottuk és felvettük az UV-spektrumukat /3.táblázat/. A 0,05  $R_f$ -értékű a kvercetin-3- $\beta$ -D-glükuronid, a 0,01



$R_f$ -értékű pedig a kempferol-3- $\beta$ -D-glükuronid volt.

2. A II. frakciót a fentiekhez hasonló módon poliamid vékonyrétegen is megfuttattuk, ahol mind a két rendszerben egykomponensűnek bizonyult. Az  $R_f$ -értékek az A futtatószerben 0,2, a B-ben 0,19. A sósavas hidrolízis eredménye kvercetin és D-glükóz volt. Az UV-spektrum alapján /4. táblázat/ a C-3 helyzetű szubsztitúció volt a legvalószínűbb. Ennek bizonyítására elvégeztük a kvercetin-3- $\beta$ -D-glükopiranozid szintézisét, amelynek eredményeként a két anyag teljesen azonosnak bizonyult.

3. A III. frakcióban négy anyagot sikerült kimutatni. A főkomponense a rutin /több mint 90 %/. A poliamid rétegen megfuttatva  $R_f$  /A/: 0,22,  $R_f$  /B/: 0,1 értékeket kaptunk. Ezek az értékek és az UV-spektroszkópiás /4. táblázat/ viselkedése teljesen megegyezett a rendelkezésünkre álló kereskedelmi rutinnal. A szennyezésként L-ramnózt és kvercetin-3- $\beta$ -D-glükozidot mutattunk ki, amelyek valószínű, hogy a frakció kinyerése és tárolása során a rutin hidrolíziséből keletkezettek.

4. A IV. frakció vékonyrétegen tanúsított viselkedése azt mutatta, hogy hidroxil-csoportokkal többszörösen szubsztituált. Kicsi  $R_f$ -értékekkel rendelkezett a poliamid rétegen / $R_f$  /A/: 0,0, /B/: 0,22/, a cellulóz rétegen kisebb az  $R_f$ -értéke / $R_f$  /BAW/: 0,42/, mint a kvercetiné /0,71/. A sósavas hidrolízise nem eredményezett cukrot, tehát a vegyületünk aglükon. Az UV-spektroszkópiás vizsgálatok /4. táblázat/ és a rendelkezésre álló standard flavonoidok alapján ez a frakció a



miricetint tartalmazza. Habár Bachmann eredményei /40/ szerint a *Vitis vinifera*-ban a miricetint glükózidálva lehet megtalálni, de figyelembe véve a miricetin glükózidjainak savérzékenységet könnyen elképzelhető, hogy a feldolgozás során hidrolizált le a cukor a molekuláról és ezért tudtuk aglükonként azonosítani.

5. A poliamid oszlopkromatográfiával nyert második frakció tisztítását szintén Sephadex LH-20 tölteten oldottuk meg. Itt egy főkomponenst sikerült kinyernünk. Sósavas hidrolízisnek hiába vetettük alá szerkezete nem változott, szénhidrát nem hidrolizált le róla, így az anyagunk aglükon. Az UV-spektroszkópiás viselkedése alapján /4. táblázat/ megállapítható, hogy C-3 helyzet nincs hidroxilálva, mivel a spektrum nátrium-metilát hatására nem változik az idővel. A B-gyűrű o-dihidroxil-csoportját jelzi az  $\text{AlCl}_3$ -os és  $\text{H}_3\text{BO}_3$ -as batokróm-shift, ugyanakkor az  $\text{AlCl}_3$ -os spektrum nem regenerálódik HCl hatására, ezért a C-5 helyzet hidroxilálva van. A nátrium-acetát hatására bekövetkező batokróm-shift jelzi, hogy a C-7 pozícióban hidroxil-csoport van. Ezek alapján és a rendelkezésünkre álló standard flavonoidok segítségével sikerült megállapítani, hogy a kérdéses anyagunk a luteolin.





3. táblázat

Anyagok	$\lambda_{\max}$ /nm					
	metanol	CH <sub>3</sub> ONa	AlCl <sub>3</sub>	AlCl <sub>3</sub> /HCl	NaOAc	NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
I/a frakció	255, 362					
I/b frakció	258, 360					
kempferol	253 <sub>v</sub> , 266, 294 <sub>v</sub> , 322 <sub>v</sub> , 367	278, 316, 416 /d/	260 <sub>v</sub> , 268 303 <sub>v</sub> , 350, 424	269, 303 <sub>v</sub> , 348, 424,	474, 303, 387	267, 297 <sub>v</sub> , 320 <sub>v</sub> , 372
kvercetin	255, 370	247 <sub>v</sub> , 321 /d/	272, 333, 458	265, 301 <sub>v</sub> , 359, 428	254 <sub>v</sub> , 274, 329, 390 /d/	261, 388

v-a spektrumon ugynevezett "váll" található  
/d/-a spektrum idővel dekomponálódik



Anyagok	$\lambda_{\max}/\text{nm}$					
	metanol	CH <sub>3</sub> ONa	AlCl <sub>3</sub>	AlCl <sub>3</sub> /HCl	NaOAc	NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
II. frakció	257, 360, 267 <sub>v</sub> , 305 <sub>v</sub>	274, 330, 414	274, 300 <sub>v</sub> , 440	260, 300 <sub>v</sub> , 365 <sub>v</sub> , 403	270, 325 <sub>v</sub> , 378	263, 297 <sub>v</sub> , 382
kvercetin-3- -glükózid	257, 360, 267 <sub>v</sub> , 305 <sub>v</sub>	274, 330, 414	274, 300 <sub>v</sub> , 440	260, 300 <sub>v</sub> , 365 <sub>v</sub> , 403	270, 325 <sub>v</sub> , 378	263, 297 <sub>v</sub> , 382
III. frakció	259, 265 <sub>v</sub> , 300 <sub>v</sub> , 359	272, 327, 410	275, 303 <sub>v</sub> , 435	271, 300, 364 <sub>v</sub> , 405	271, 325, 393	261, 298, 387
IV. frakció	255, 272 <sub>v</sub> , 301 <sub>v</sub> , 374	262 <sub>v</sub> , 285 <sub>v</sub> , 322, 423 /d/	271, 316, 450	265, 271 <sub>v</sub> , 307 <sub>v</sub> , 360 <sub>v</sub> 429	269, 335	258, 305 <sub>v</sub> , 392
luteolin	243 <sub>v</sub> , 255, 266, 296 <sub>v</sub> 350	266 <sub>v</sub> , 329 <sub>v</sub> , 401	274, 300 <sub>v</sub> , 328, 428	266 <sub>v</sub> , 275, 294 <sub>v</sub> , 355, 385	269, 326 <sub>v</sub> , 384	259, 301 <sub>v</sub> , 370, 430 <sub>v</sub>

v-a spektrumon ugynevezett "váll" található  
/d/-a spektrum idővel dekomponálódik

4. táblázat

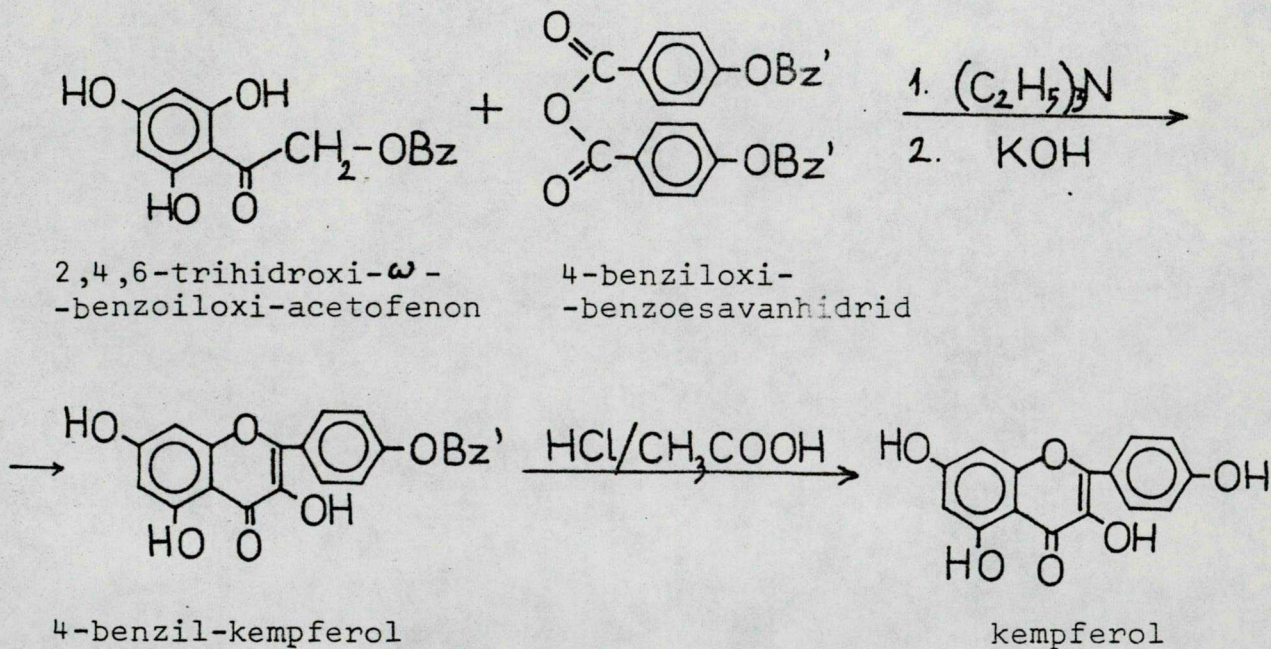


### 3.6. Szintetikus vizsgálatok

A levélextraktum flavonoid tartalmának azonosításához két anyagot szintetizáltunk. Az egyik vegyület a kempferol /3,4',5,7-tetrahydroxi-flavon/, a másik pedig a kvercetin-3- $\beta$ -D-glükopiranozid /izo-kvercitrin/ volt. Az antifungális teszteléshez meglévő vegyületek mellé még két kvercetin-származékot a 4',7-di-O-allil-kvercetint és a 7-O-benzil-kvercetint állítottuk elő.

#### 3.6.1. Kempferol előállítása

A szintézist 2,4,6-trihidroxi- $\omega$ -benzoiloxi-acetfenon és 4-benziloxi-benzoeshidrid módosított Allan-Robinson kondenzációjával /49/ valósítottuk meg, amelyet az alábbi reakció-sor szemléltet.



Bz - benzoil-csoport  
 Bz' - benzil-csoport



2,4,6-trihidroxi- $\omega$ -benzoiloxi-acetofenon:

A vegyületet Heap és Robinson módszerével /50/ állítottuk elő.

70 cm<sup>3</sup> éterben feloldottunk 10 g /0,062 mól/ benzoiloxi-acetonitrilt és 8,6 g /0,068 mól/ floroglucint, majd jég-hűtés mellett 5 órán keresztül HCl-gázt áramoltattunk át rajta. A sósav gáz átvezetése után 12 óráig állni hagytuk. A kivált sárga színű csapadékot leszűrtük és éterrel átmostuk. 200 cm<sup>3</sup> 50 %-os vizes etanolban feloldottuk és 21 órán keresztül visszafolyattuk. Ezután az alkoholt vákuumbepárlón lepároltuk, a vizes oldatot lehűtve a termékünk kivált, leszűrtük és melegvizzel mostuk, majd szárítottuk. Vizes metanolból kristályosítottuk át, 6,7 g terméket kaptunk.

Olvadáspont: 233-235°C.

Kitermelés: 36 %.

4-benziloxi-benzoeshavanhidrid /51/:

25,9 g /0,098 mól/ 4-benziloxi-benzoeshavkloridhoz hozzáöntöttünk 50 cm<sup>3</sup> /0,6 mól/ piridint, majd 100°C-on 5 percig forraltuk. Ezután 100 g darabos jégre öntöttük és hozzáadtunk 50 cm<sup>3</sup> koncentrált sósavat. A jég megolvadása után a savanhidrid kivált az oldatból. Vákuumszűrőn leszűrtük és 15 cm<sup>3</sup> metanollal, majd 15 cm<sup>3</sup> vizmentes benzollal mostuk. Vizmentes benzolból átkristályosítottuk, 20 g terméket kaptunk.

Olvadáspont: 116-117°C.

Kitermelés: 93,1 %.



Kempferol:

2,0 g /0,007 mól/ 2,4,6-trihidroxi- $\omega$ -benzoiloxi-acetofenon és 12,5 g /0,029 mól/ 4-benziloxi-benzoésavan-hidrid és 4 cm<sup>3</sup> trietilamin elegyét 3 órán keresztül visszafolyattuk. Ezután 200 cm<sup>3</sup> metanolból és 8 cm<sup>3</sup> 60 %-os vizes KOH-ból álló elegybe öntöttük és további 3 óráig visszafolyattuk. Miután eltelt a 3 óra 200 cm<sup>3</sup> vízbe öntöttük és vákuumban, 30°C-on a metanolt lepároltuk. További egy liter vizet adtunk hozzá, a kivált csapadékot leszűrtük és az anyagot CO<sub>2</sub> gáz átbuborékolatásával semlegesítettük. A keletkezett csapadékot leszűrtük és megszáritottuk. Feloldottuk 2 cm<sup>3</sup> metanolban és 60 x 1,5 cm-es Sephadex LH-20-géllel töltött oszlopon megtisztítottuk. A keletkezett 4-benziloxi-kempferolról a benzil-csoportot jégecetes közegben sósavas hidrolizissel távolítottuk el. Etanolból átkristályosítottuk, 242 mg sárga tű alakú kristályokat kaptunk.

Olvadáspont: 277-279°C.

Kitermelés: 12,1 %.

UV-spektroszkópia,  $\lambda_{\max}$ : 265 nm, 365 nm.

3.6.2. Kvercetin-3- $\beta$ -D-glükopiranozid előállítása

Fox és munkatársainak hidrolitikus módszerét /52/ alkalmaztuk, melynek az a lényege, hogy a rutin /kvercetin-3- $\beta$ -rutinozid/ diszacharid részéről savas hidrolizissel az L-ramnózt eltávolítják. Természetesen a másik glükozidos kötés is hasad, ezért rutinból, kvercetinből, izo-kvercitrinből és cukrokból álló reakcióelegy keletkezik, amelyből oszlop-kromatográfiás eljárással lehet kinyerni a kívánt anyagot.



10 g rutint feloldottunk 225 cm<sup>3</sup> forrásban lévő ciklohexanonban. A visszafolyó hűtőn keresztül hozzáadtunk 75 cm<sup>3</sup> 85 %-os hangyasavat olyan gyorsan, ahogy csak lehetett, de vigyázva arra, nehogy kifusson. Ezután állandó keverés mellett, 102-107°C-on 10 órán keresztül visszafolyattuk. Egyórás időközönként mintát vettünk és szilikagél rétegen etil-acetát/metil-etil-ke-ton/hangyasav/viz 5:3:1:1 futtatószerrel követtük a hidrolízis előrehaladtát. 10 óra elteltével - ekkorra a rutin nagy része elhidrolizált - vákuumban bepároltuk a reakcióelegyet sűrű sziruppá, felvettük egy kevés metanolban. 80 x 4 cm-es méretű Sephadex LH-20-géllel töltött oszlopon kromatografáltuk, eluensként metanolt használtunk. Az izo-kvercitrin tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük és bepároltuk. Etanol - viz elegyből átkristályosítottuk, 1,2 g termék keletkezett.

Olvadáspont: 228-229°C.

Kitermelés: 15,8 %.

UV-spektroszkópia;  $\lambda_{\max}$ : 258 nm, 360 nm.

### 3.6.3. 4',7-di-O-allil-kvercetin /53/

8 g kvercetin-pentaacetátot /54/ feloldottunk 100 cm<sup>3</sup> vízmentes acetonban és hozzáadtunk 16 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-ot és 50 cm<sup>3</sup> allil-bromidot, majd állandó keverés mellett 24 órán át visszafolyattuk. A K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-ot leszűrtük, az acetont vákuumban 30°C-on lepároltuk. A nyers terméket benzol-hexán elegyből átkristályosítottuk. A 4',7-di-O-allil-3',3,5-tri-O-acetil-kvercetin fehér tükrisztályok formájában kristályosodott ki.

Olvadáspont: 120-121°C.



A termék tömege: 5,5 g.

Kitermelés: 63 %.

Az 5,5 g 4',7-di-0-allil-3',3,5-tri-0-acetil-kvercetint feloldottuk 25 cm<sup>3</sup> etanolban és hozzáadtunk 3 cm<sup>3</sup> koncentrált sósavat, ezután 2 órán keresztül visszafolyattuk, majd végül 20 cm<sup>3</sup> vizet öntöttünk hozzá. A kivált sárga színű nyers terméket acetón-metanol elegyből átkristályosítottuk, 2,7 g sárga tükrisztályokat kaptunk.

Olvadáspont: 160-161°C.

Kitermelés: 14,7 %.

UV-spektroszkópia,  $\lambda_{\max}$ : 257nm, 374nm.

#### 3.6.4. 7-0-benzil-kvercetin /53/

10 g kvercetin-pentaacetátot, 1,0 g KI-ot és 10 cm<sup>3</sup> benzil-kloridot feloldottunk 150 cm<sup>3</sup> vizmentes acetónban és hozzáadtunk 25 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-ot. Húsz órán keresztül, állandó keverés közben visszafolyattuk. Ezután leszűrtük és vákuumbepárlón, 30°C-on olajos anyagig bepároltuk; majd benzol-hexán elegyből átkristályosítottuk. A szintelen kristályokat 100 cm<sup>3</sup> metanolban és 35 cm<sup>3</sup> 10 %-os NaOH oldatban szuszpendáltuk, majd vízfürdőn, 100°C-on 5 percig forraltuk. Ezután 300 cm<sup>3</sup> vizet és 20 cm<sup>3</sup> koncentrált sósavat adtunk hozzá. Sárga színű csapadék vált ki, amelyet megszáritottunk és 2 x 100 cm<sup>3</sup> forró benzollal extraháltuk. Az oldhatatlan anyagot átkristályosítottuk etil-acetátból, majd acetón-metanol elegyből, 2,9 g sárga tükrisztályokat kaptunk.

Olvadáspont: 252-253°C. Kitermelés: 37,9 %.

UV-spektroszkópia,  $\lambda_{\max}$ : 258 nm, 373 nm.



### 3.7. A levélfrakciók és szintetikus termékek antifungális hatásának tesztelési módszere, eredményekértékelése

Az antifungális hatás tesztelésére a lyukasztott agar-lemez módszert alkalmaztuk /55/. Petri-csészébe öntött táptalajt a megfelelő gombával beoltjuk és steril dugófúróval lyukakat vágunk bele. Ezekbe a lyukakba változó koncentrációban 200-300  $\mu$ l mennyiségű tesztelendő anyagot mérünk be. Az agarban szétdiffundáló anyag a hatékonyságától és a koncentrációjától függő mértékben hozza létre a kioltási zónákat. A közeg hatásának kiküszöbölésére kontrollként csak tiszta oldószert mérünk be egy lyukba.

A táptalaj összetétele a következő volt:

5 g	élesztő hidrolizátum /Oxoid/
10 g	D-glükóz
20 g	Bacto agar /Difco/
<hr/>	
1000 cm <sup>3</sup>	vizes oldatban

A táptalaj sterilizálását hőkezeléssel oldottuk meg. A lombikba mért táptalajt kuktába helyeztük, amelybe negyed részéig vizet öntöttünk. Attól kezdve, hogy a kuktában felforrt a víz 30 percig tartottuk benn a lombikot. Amikor lehült a táptalaj, Petri-csészékbe öntöttük.

A táptalajok beoltását a megfelelő gombák spórájából, vagy micélium szövedékéből készült desztillált vizes szuszpenzió felvitelével valósítottuk meg.

A teszteléshez használt gombákat a JATE Növényélettani Tanszékétől kaptuk.





- A. Penészgombák: *Mucor racemosus*  
*Aspergillus nidulans*
- B. Patogéngombák: *Botrytis cinerea* 0036  
*Alternaria tenuis* 0048  
*Fusarium oxysporum* 0609
- C. Élesztőgombák: *Kloeckera apiculata* 1027  
*Candida tropicalis* 0787

Két vizsgálat között a gombatörzseket steril paraffinolaj alatt, 4°C-on tároltuk.

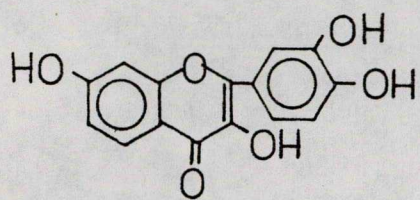
Az inkubációs hőmérséklet a *Botrytis cinerea* és az *Alternaria tenuis* törzsek esetén 20°C, a többi gombánál 30°C volt.

Az inkubációs idő 48 óra volt.

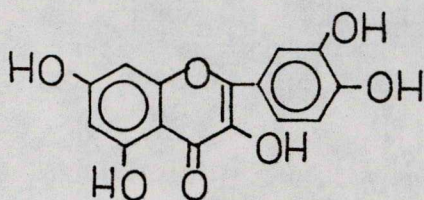
Az azonosított levélfrakciókon és az általunk szintetizált vegyületeken kívül még további tizenöt flavonoidszármazék /6. ábra/ tesztelését végeztük el. A vizsgált anyagokat 2000 mg/dm<sup>3</sup> és 1000 mg/dm<sup>3</sup> koncentrációban 10 %-os és 5 %-os vizes acetonban oldottuk fel. Az antifungális hatás erősségére a kioltási zónák átmérőjéből következtettünk. A kontrollként alkalmazott oldószer kioltási zónaátmérőjét levontuk az adott anyagra mért átmérőből.

Eredményeinket az 5.-12. táblázatokban tüntettük fel. A kioltási zónák átmérőjét centiméterben adtuk meg. K<sub>1</sub> az 5 %-os vizes acetont a K<sub>2</sub> pedig a 10 %-os vizes acetont jelenti. Az "xx" a fungicid, az "x" a fungosztatikus hatást jelzi. Ahol nem tapasztaltunk antifungális hatást, azt "- " jellel jelöltük.





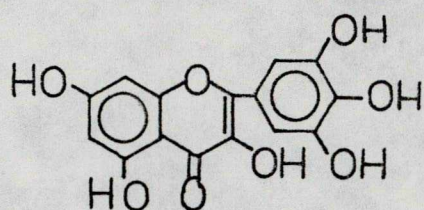
fizetin



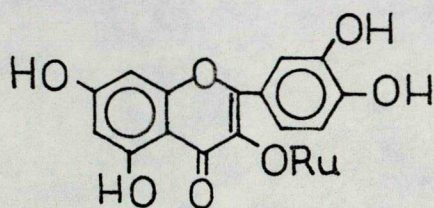
kvercetin



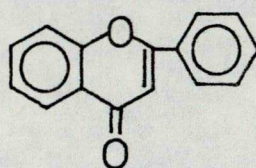
morin



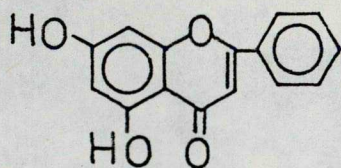
miricetin



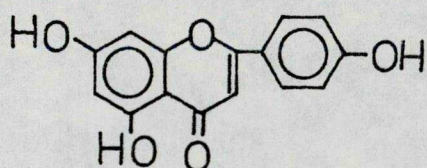
rutin



flavon



krizin

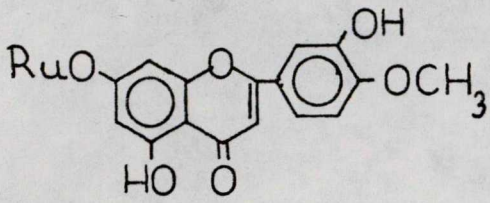


apigenin

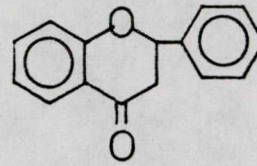
6. ábra

Antifungálisan tesztelt flavonoid származékok

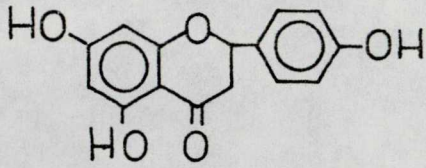




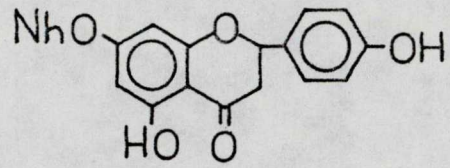
diozmin



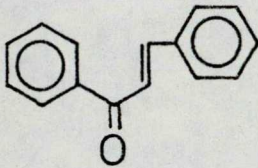
flavanon



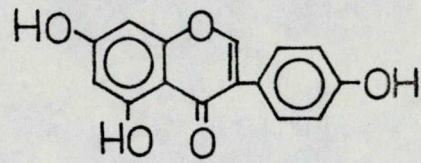
naringenin



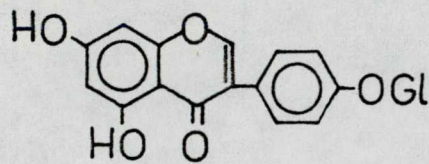
naringin



kalkon



genistein



sophorikozid

Gl - D-glükóz  
 Ru - rutinóz  
 Nh - neoheszperidóz

6. ábra folytatása

Antifungálisan tesztelt flavonoid származékok



Törzsek	I. frakció				II. frakció				III frakció			
	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>
Mucor racemosus	-	2,1 <sup>x</sup>	0,7 <sup>x</sup>	-	3,7 <sup>x</sup>	-	-	0,8 <sup>x</sup>	3 <sup>xx</sup>	2 <sup>xx</sup>	1,1 <sup>xx</sup>	1,3 <sup>xx</sup>
Aspergillus nidulans	3,5 <sup>xx</sup>	2,1 <sup>xx</sup>	0,9 <sup>xx</sup>	0,8 <sup>xx</sup>	2,0 <sup>x</sup>	2,5 <sup>x</sup>	1 <sup>x</sup>	-	2,8 <sup>xx</sup>	2,5 <sup>xx</sup>	1,4 <sup>xx</sup>	0,6 <sup>xx</sup>
Botrytis cinerea 0036	-	-	-	-	1,5 <sup>x</sup>	-	-	-	-	-	-	-
Alternaria tennis 0048	-	-	-	-	2,5 <sup>x</sup>	1,8 <sup>x</sup>	-	-	-	-	-	-
Fusarium oxysporum 0609	2,1 <sup>x</sup>	0,3 <sup>x</sup>	0,7 <sup>x</sup>	0,8 <sup>x</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
Kloeckera apiculata 1027	1,5 <sup>xx</sup>	-	-	-	2,0 <sup>xx</sup>	1,5 <sup>xx</sup>	-	-	-	-	-	-
Candida tropicalis 0787	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5. táblázat



Törzsek	IV. frakció				luteolin				rutin			
	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>
Mucor racemosus	-	-	-	-	1,9 <sup>x</sup>	-	-	1,5 <sup>x</sup>	1,1 <sup>x</sup>	0,8 <sup>x</sup>	0,7 <sup>x</sup>	0,7 <sup>x</sup>
Aspergillus nidulans	-	-	-	-	1,5 <sup>x</sup>	-	-	-	-	-	-	-
Botrytis cinerea 0036	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alternaria tennis 0048	-	-	-	-	2,0 <sup>x</sup>	-	-	-	-	-	-	-
Fusarium oxysporum 0609	-	-	-	-	1,0 <sup>x</sup>	1,0 <sup>x</sup>	0,5 <sup>x</sup>	0,5 <sup>x</sup>	6,4 <sup>xx</sup>	5 <sup>xx</sup>	-	-
Kloeckera apiculata 1027	1,4 <sup>xx</sup>	1,0 <sup>xx</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Candida tropicalis 0787	-	-	-	-	0,5 <sup>x</sup>	-	-	0,5 <sup>x</sup>	-	-	-	-

6. táblázat



Törzsek	izo-kvercitrin				kvercetin				4,7-di-O-allil- -kvercetin			
	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>
Mucor racemosus	-	-	-	-	2,2 <sup>xx</sup>	1,4 <sup>x</sup>	-	-	1,0 <sup>x</sup>	-	0,8 <sup>x</sup>	0,8 <sup>x</sup>
Aspergillus nidulans	2,4 <sup>xx</sup>	2,0 <sup>xx</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Botrytis cinerea 0036	1,8 <sup>xx</sup>	-	-	-	2,0 <sup>xx</sup>	1,8 <sup>x</sup>	-	-	-	-	-	-
Alternaria tennuis 0048	2,7 <sup>x</sup>	1,8 <sup>x</sup>	-	-	1,6 <sup>x</sup>	1,3 <sup>x</sup>	-	-	-	-	-	-
Fusarium oxysporum 0609	2 <sup>x</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kloeckera apiculata 1027	2,1 <sup>xx</sup>	1,0 <sup>x</sup>	-	-	1,8 <sup>x</sup>	1,3 <sup>x</sup>	-	-	3,7 <sup>xx</sup>	1,2 <sup>xx</sup>	-	0,8 <sup>x</sup>
Candida tropicalis 0787	-	-	-	-	1,3 <sup>xx</sup>	-	-	-	-	-	-	-

7. táblázat



Törzsek	7-0-benzil-kvercetin				fizetin				morin			
	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>
Mucor racemosus	-	-	-	-	3,1 <sup>x</sup>	1,7 <sup>x</sup>	0,5 <sup>x</sup>	0,3 <sup>x</sup>	-	-	-	-
Aspergillus nidulans	-	1,8 <sup>x</sup>	-	-	-	-	-	-	0,7 <sup>xx</sup>	0,2 <sup>xx</sup>	-	-
Botrytis cinerea 0036	-	-	-	-	2,5 <sup>x</sup>	-	0,5 <sup>x</sup>	0,5 <sup>x</sup>	1,0 <sup>xx</sup>	0,8 <sup>x</sup>	-	-
Alternaria tenuis 0048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fusarium oxysporum 0609	-	-	-	-	2,1 <sup>x</sup>	-	-	-	1,0 <sup>x</sup>	0,5 <sup>x</sup>	-	-
Kloeckera apiculata 1027	-	-	-	-	2,3 <sup>xx</sup>	1,4 <sup>xx</sup>	0,6 <sup>xx</sup>	0,6 <sup>xx</sup>	0,6 <sup>x</sup>	0,3 <sup>x</sup>	-	-
Candida tropicalis 0787	-	-	-	-	1,5 <sup>x</sup>	-	-	0,5 <sup>x</sup>	0,4 <sup>xx</sup>	0,2 <sup>xx</sup>	-	-

8. táblázat



Törzsek	miricetin				flavon				apigenin			
	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>
Mucor racemosus	2,8 <sup>xx</sup>	2,0 <sup>xx</sup>	-	-	1,0 <sup>xx</sup>	1,0 <sup>xx</sup>	0,4 <sup>xx</sup>	0,2 <sup>xx</sup>	-	-	-	-
Aspergillus nidulans	-	-	-	-	0,6 <sup>xx</sup>	0,4 <sup>xx</sup>	0,4 <sup>xx</sup>	0,2 <sup>x</sup>	-	-	-	-
Botrytis cinerea 0036	-	-	-	-	0,9 <sup>xx</sup>	0,7 <sup>xx</sup>	0,4 <sup>xx</sup>	0,2 <sup>x</sup>	1,8 <sup>xx</sup>	1,5 <sup>xx</sup>	-	-
Alternaria tennis 0048	3,0 <sup>x</sup>	1,5 <sup>x</sup>	-	0,4 <sup>x</sup>	0,7 <sup>xx</sup>	0,5 <sup>xx</sup>	2,5 <sup>xx</sup>	0,4 <sup>xx</sup>	-	-	-	-
Fusarium oxysporum 0609	-	-	-	-	1,0 <sup>x</sup>	0,7 <sup>x</sup>	0,4 <sup>xx</sup>	0,2 <sup>xx</sup>	-	-	-	-
Kloeckera apiculata 1027	1,4 <sup>xx</sup>	1,0 <sup>xx</sup>	-	-	0,5 <sup>x</sup>	0,4 <sup>x</sup>	0,4 <sup>x</sup>	0,3 <sup>x</sup>	1,2 <sup>x</sup>	1,0 <sup>x</sup>	-	-
Candida tropicalis 0787	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

9. táblázat



Törzsek	krizin				diozmin				kalkon			
	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>
Mucor racemosus	0,8 <sup>xx</sup>	0,6 <sup>xx</sup>	-	-	-	-	-	-	1,4 <sup>xx</sup>	0,5 <sup>xx</sup>	0,4 <sup>xx</sup>	0,2 <sup>xx</sup>
Aspergillus nidulans	-	-	-	-	2,1 <sup>x</sup>	-	-	-	1,0 <sup>xx</sup>	0,2 <sup>xx</sup>	4 <sup>xx</sup>	2 <sup>xx</sup>
Botrytis cinerea 0036	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2 <sup>xx</sup>	1,0 <sup>xx</sup>	0,4 <sup>xx</sup>	0,2 <sup>xx</sup>
Alternaria tennis 0048	1,0 <sup>x</sup>	0,8 <sup>x</sup>	-	-	2,9 <sup>x</sup>	-	-	-	0,5 <sup>xx</sup>	0,4 <sup>xx</sup>	-	-
Fusarium oxysporum 0609	-	-	-	-	3,0 <sup>x</sup>	2,5 <sup>x</sup>	0,5 <sup>x</sup>	1,0 <sup>x</sup>	0,6 <sup>xx</sup>	0,1 <sup>xx</sup>	0,5 <sup>xx</sup>	0,3 <sup>xx</sup>
Kloeckera apiculata 1027	-	-	-	-	-	1,9 <sup>x</sup>	-	-	0,4 <sup>x</sup>	0,3 <sup>x</sup>	0,4 <sup>x</sup>	0,3 <sup>x</sup>
Candida tropicalis 0787	-	-	-	-	1,0 <sup>x</sup>	0,5 <sup>x</sup>	0,5 <sup>x</sup>	1,0 <sup>x</sup>	-	-	-	-

10. táblázat



Törzsek	flavanon				naringenin				naringin			
	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>
Mucor racemosus	1,4 <sup>xx</sup>	1,0 <sup>xx</sup>	-	-	-	-	-	-	0,5 <sup>xx</sup>	0,4 <sup>xx</sup>	0,5 <sup>xx</sup>	0,4 <sup>xx</sup>
Aspergillus nidulans	-	-	-	-	0,5 <sup>xx</sup>	0,2 <sup>xx</sup>	-	-	-	-	-	-
Botrytis cinerea 0036	1,2 <sup>xx</sup>	1,0 <sup>xx</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alternaria tennis 0048	1,0 <sup>x</sup>	0,8 <sup>x</sup>	5 <sup>x</sup>	4 <sup>x</sup>	0,8 <sup>xx</sup>	0,6 <sup>xx</sup>	0,8 <sup>xx</sup>	0,4 <sup>xx</sup>	0,8 <sup>xx</sup>	0,6 <sup>xx</sup>	0,8 <sup>xx</sup>	0,4 <sup>xx</sup>
Fusarium oxysporum 0609	-	-	-	-	1,0 <sup>x</sup>	0,7 <sup>x</sup>	1,0 <sup>x</sup>	0,7 <sup>x</sup>	1,0 <sup>x</sup>	0,7 <sup>x</sup>	1,0 <sup>x</sup>	0,7 <sup>x</sup>
Kloeckera apiculata 1027	1,0 <sup>xx</sup>	0,6 <sup>xx</sup>	-	-	0,5 <sup>x</sup>	0,4 <sup>x</sup>	0,5 <sup>x</sup>	0,4 <sup>x</sup>	0,5 <sup>x</sup>	0,4 <sup>x</sup>	0,5 <sup>x</sup>	0,4 <sup>x</sup>
Candida tropicalis 0787	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

11. táblázat



Törzsek	kempferol				genistein				sophorikozid			
	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	2000	1000	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>
Mucor racemosus	-	1,1 <sup>x</sup>	0,5 <sup>x</sup>	0,2 <sup>x</sup>	0,8 <sup>x</sup>	0,2 <sup>x</sup>	0,5 <sup>x</sup>	0,5 <sup>x</sup>	-	-	-	-
Aspergillus nidulans	1,5 <sup>x</sup>	0,8 <sup>x</sup>	0,9 <sup>x</sup>	1,0 <sup>x</sup>	3,8 <sup>x</sup>	2,0 <sup>x</sup>	-	-	-	0,8 <sup>xx</sup>	1,6 <sup>xx</sup>	-
Botrytis cinerea 0036	-	-	-	-	3,9 <sup>xx</sup>	3,5 <sup>xx</sup>	-	-	0,5 <sup>x</sup>	-	-	-
Alternaria tennis 0048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fusarium oxysporum 0609	1,1 <sup>x</sup>	0,5 <sup>x</sup>	0,4 <sup>x</sup>	0,6 <sup>x</sup>	-	-	-	-	1,0 <sup>x</sup>	2,1 <sup>xx</sup>	-	-
Kloeckera apiculata 1027	-	-	-	-	3,4 <sup>x</sup>	1,6 <sup>x</sup>	-	-	-	-	-	-
Candida tropicalis 0787	-	-	-	-	-	1,0 <sup>x</sup>	0,5 <sup>x</sup>	0,5 <sup>x</sup>	-	-	-	-

12. táblázat





Az eredmények alapján az alábbi következtetések vonhatók le a megvizsgált flavonoidszármazékok antifungális hatására.

1. A levélfrakciók közül egyik sem volt hatásos a *Candida tropicalis* gombával szemben /5., 6. táblázat/. A I., II. és III. frakciók közel azonos erősséggel gátolták a *Mucor racemosus* és *Alternaria tenuis* gombák növekedését. A három patogéngombával szemben az I. és II. frakció volt aktív. A szőlő levélből azonosított luteolinnak volt a legkisebb az aktivitása. A III. frakció hatásereossége nagyobb, mint a tiszta kereskedelmi rutiné, ugyanez mondható el a II. frakcióról és az általunk előállított izo-kvercitrinről. Ennek magyarázata az lehet, hogy a levélfrakciókban hidrolízis miatt szennyezésként jelenlévő aglükonok növelik az antifungális hatásukat.
2. A szintetikus flavonolok közül a kvercetin és a kvercetin-3-D-glükozid a leghatékonyabb /6., 7., 8., 9., és 12. táblázat/. A kvercetinre C-4' és C-7 helyekre beépített allil-csoport, illetve C-7 helyzetbe beépített benzil-csoport szinte nullára csökkentette az antifungális hatást. Habár ezek a csoportok megnövelik a molekula lipofilitását, de leblokkolják a szabad hidroxil-csoportokat és ezzel csökkentik az antifungális hatást. A szabad C-7 és C-4' hidroxil-csoportok mellett a nagyobb aktivitás eléréséhez még szükséges a C-3' hidroxil-csoport jelenléte, mivel a fizetin, kvercetin, izo-kvercitrin hatékonyabb a kempferolnál. A B-gyűrűn az orto-dihidroxil-csoport ak-



tivabb vegyületet eredményez, mert a morin hiába tartalmaz két hidroxil-csoportot a B-gyűrűn, mégis kevésbé aktív. Ugyanakkor a B-gyűrűn a három szabad hidroxil-csoport lerontja az antifungális hatást, a miricetin sokkal kevésbé aktív az orto-dihidroxil-csoportokat tartalmazó anyagoknál. A C-3 helyzetű glükózidálás nem befolyásolja az antifungális hatást, kivételt képez a rutin /lásd I., II. levélfrakció, izo-kvercitrin/.

3. A flavonok közül /6., 9., 10. táblázat/ maga az alapvegyület csak a *Candida tropicalis* gombával szemben nem hatékony. Az apigenin és a krizin gyakorlatilag inaktívak. A luteolin a flavonnál erősebben gátolja a gombák növekedését /nagyobbak a zónaátmérők/, tehát a B-gyűrűn az orto-dihidroxil-csoport növeli az antifungális hatást. A luteolinban a C-4<sup>h</sup> hidroxil-csoport metilálása és a C-7 glükózidálása /diozmin/ nem csökkenti az aktivitást.
4. A flavanonok közül az alapvegyület kevésbé antifungális hatása, mint a naringin és a naringenin /11. táblázat/. A naringeninben a C-7 helyzetű glükózidálás nem változtatja meg az aktivitást. A kalkon antifungális hatása összemérhető a három flavanonszármazék hatásával /10. táblázat/. A két izo-flavonoid vegyület közül a genisteinnek erősebb az antifungális hatása, amelyet a C-4<sup>h</sup> helyzetű glükózidálás /sophorikozid/ lecsökkent /11. táblázat/. A megvizsgált összes flavonoidszármazék közül a flavanonok és a kalkon gátolják legkevésbé a gombák növekedését.



#### 4. KISÉRLETI EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA, ÉRTÉKELÉSE

A *Vitis vinifera* gombás megbetegedésekkel szembeni rezisztenciájának jobb megismerése céljából az Othello szőlőlevél flavonoidjainak azonosítását valósítottuk meg. Mivel az irodalomban még nem írták le a levélextraktumok antifungális hatásának rendszeres vizsgálatát, ezért elvégeztük a biológiai tesztelésüket. Ennek érdekében a szőlőlevél extrakciós feldolgozása után a nyers növényi extraktumot oszlopkromatográfiás technikával választottuk szét. Első lépésként poliamid adszorbenst alkalmaztunk, amelyen nagy mennyiségű extraktumot lehetett szétválasztani. Az így kapott frakciókat - amelyek még több komponensűek voltak - Sephadex LH-20 tölteten további szeparálásnak vetettük alá. Ennek eredményeként egyedi összetevőkre választottuk szét az extraktumot.

A megtisztított levélextraktumok flavonoid tartalmának azonosítását UV-spektroszkópiával és vékonyréteg-kromatográfiával valósítottuk meg. A vegyületek azonosításához két flavonoid származék kémiai szintézisét végeztük el. Ez a két vegyület a kempferol /3,4',5,7-tetrahidroxi-flavon/ és az izo-kvercitrin /kvercetin-3- $\beta$ -D-glükopiranozid/ volt.

A szőlőlevél-extraktumból hat flavonoid származékot azonosítottunk, amelyek a következők voltak: kvercetin-3- $\beta$ -D-glükopiranozid, kvercetin-3- $\beta$ -D-glükuronid, kempferol-3- $\beta$ -D-glükuronid, rutin, miricetin és luteolin. Az általunk azonosított flavonol-glükozidok ugyan-



azok, mint amelyeket Bachmann /40/ leirt, kivételt képez a miricetin, mivel ezt aglükon formában azonosítottuk.

Egy flavon származékot is sikerült kimutatnunk az Othello szőlő levelében - a luteolint. Noha Nutsbidze /56/ beszámolt arról, hogy a szőlők levelében a luteolin megtalálható, azonban a Vitis viniferában sem Bachmann, sem Egger és munkatársai /39/ nem mutatták ki.

Megvizsgáltuk a levélfrakciók antifungális hatását hét gombatörzsre. Mivel az irodalomban még nem irtak le rendszeres vizsgálatokat a flavonoidok antifungális hatása és kémiai szerkezetük közötti kapcsolatáról, ezért a levélfrakciókon kívül további tizenöt kereskedelmi és általunk szintetizált négy flavonoid származék antifungális tesztelését végeztük el. A 7-O-benzil-kvercetin és a 4,7-di-O-allil-kvercetin szintézisét azért végeztük el, hogy tanulmányozzuk a hidroxil-csoportok szerepét az antifungális hatás kifejtésében.

A levélfrakciók közül az izo-kvercitrin, a kvercetin-3- $\beta$ -D-glükuronid és a kempferol-3- $\beta$ -D-glükuronid tartalmuk a legaktívabbak, mindegyik gátolta a patogén gombák növekedését. A szőlő leveléből azonosított flavon származéknak, a luteolinnak volt a legkisebb az antifungális hatása.

A szintetikus flavonolok közül a kvercetin és az izo-kvercitrin a leghatékonyabbak. Azokban az esetekben,



amikor a B-gyűrűn orto-dihidroxil-csoport van jelen sokkal erősebb az antifungális hatás, mint akkor, ha nincs dihidroxil-csoport, vagy nem orto-helyzetűek /kvercetin a kempferolnál és a morinnál sokkal hatékonyabb/. Az antifungális hatás kifejtésében alapvető szerepe van a szabad C-7 hidroxil-csoportnak, ha leblokkoljuk /7-O-benzil-kvercetin/ megszűnik az antifungális hatás. A C-3 hidroxil-csoport glükozidálása nem befolyásolja a flavonolok fungicid, illetve fungosztatikus hatását /kivételet képez a rutin, amelynek antifungális hatása jóval kisebb, mint a kvercetiné/.

A megvizsgált flavonok közül a luteolin a legaktívabb, amely szintén alátámasztja azt az eredményt, hogy az antifungális hatás kifejtésében fontos szerepe van a B-gyűrűn elhelyezkedő orto-dihidroxil-csoportnak. A flavon származékok kevésbé hatékony vegyületek, mint a flavonolok.

A flavanonok és a kalkon rendelkezik a leggyengébb antifungális hatással a tesztelt vegyületek közül.

Összevetve a levélfrakciók és szintetikus flavonoid származékok antifungális tesztelési eredményeit, megállapítható, hogy a flavonolok rendelkeznek a legerősebb antifungális hatással. Ez alátámaszotta azt az előzetes feltevésünket, hogy direkt termő szőlők gombás megbetegedésekkel szemben mutatott rezisztenciájában - a fi-



toalexin termelése és kondenzált-tannin tartalma mellett - a levél flavonol tartalmának is fontos szerepe van.

Eddigi vizsgálataink nem elégségesek annak eldöntésére, hogy a flavonoidok milyen mechanizmus szerint gátolják a gombák növekedését. A továbbiakban meg fogjuk vizsgálni hatásukat a gombák hidrolitikus enzimjeire /pektinázok, cellulázok/. Specifikus enzimekkel orto-kinonokká oxidáljuk őket, hogy bizonyítsuk azt a feltételezést, hogy a flavonoidok a növényekben ilyen formában fejtik ki hatásukat.



IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. S.P.Bhutani, S.S.Chibber, T.R.Seshadri: Indian. J. Chem. 7, 210 /1967/
2. J.W.Clark-Lewis, L.J.Porter: Aust. J. Chem. 25, 1943 /1972/
3. S.K.Mukerjee, S.C.Sarkar, T.R.Seshadri: Tetrahedron 25, 1063 /1969/
4. W.Bottomley, H.Smith, W.Galston: Phytochemistry 5, 117 /1966/
5. J.W.Wallace, T.J.Mabry, R.E.Alston: Phytochemistry 8, 93 /1969/
6. J.B.Harborne, T.J.Mabry, H.Mabry: The Flavonoids, Chapman and Hall, London, 1975
7. B.V.Chandler, K.A.Harper: Nature 181, 131 /1958/
8. J.B.Harborne: Comparative Biochemistry of the Flavonoids, Academic Press, London, 1967
9. R.A.Andersen, J.A.Sowers: Phytochemistry 7, 293 /1968/
10. V.Carelli, A.M.Liquori, A.Mele: Nature 176, 70 /1955/
11. D.Strack, R.L.Manser: J. Chrom. 109, 325 /1975/
12. T.J.Mabry, K.R.Markham, M.B.Thomas: The Systematic Identification of Flavonoids, Springer-Verlag, Berlin, 1970
13. J.Porath: Nature 218, 834 /1968/
14. C.A.Streuli: J. Chrom. 56, 219 /1971/
15. K.M.Johnston, D.J.Stern, A.C.Waiss, Jr.: J. Chrom. 33, 539 /1968/
16. H.C.Dass, G.M.Weaver: J. Chrom. 34, 425 /1972/
17. T.G.Gage, C.D.Douglas, S.H.Wender: Anal. Chem. 23, 1582 /1951/



18. H.Reznik, K.Egger: Z. Anal. Chem. 183, 196 /1961/
19. C.F.Van Sumere, G.Wolf, H.Teuchy, J.Kint: J. Chrom. 20, 48 /1965/
20. S.K.Sarkar, R.E.Howarth: J. Agric. Food Chem. 24, 317 /1976/
21. L.Jurd: The Chemistry of Flavonoid Compounds /Ed.: T.A.Geissman/ p. 107, McMillan Company, New York, 1962
22. L.Jurd, R.M.Horowitz: J. Org. Chem. 22, 1618 /1957/
23. L.Jurd, K.Stevens, G.Manners: Tetrahedron Letters 2149 /1972/
24. L.Jurd, T.A.Geissman: J. Org. Chem. 21, 1395 /1956/
25. J.A.Mears, T.J.Mabry: Phytochemistry 11, 411 /1972/
26. J.Gripenberg: The Chemistry of Flavonoid Compounds /Ed.: T.A.Geissman/ p. 409, McMillan Company, New York, 1962
27. H.Wagner, L.Farkas: The Flavonoids /Ed.: J.B.Harborne, T.J.Mabry, H.Mabry/ p. 129, Chapman and Hall, London, 1975
28. Zemplén G., Farkas L., Rakusa R.: Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 14, 471 /1958/
29. S.Kostanecki, R.Levi, J.Tambor: Ber. 32, 326 /1899/
30. W.Baker: J. Chem. Soc. 1381 /1933/
31. H.S.Mahal, K.Venkataraman: J. Chem. Soc. 1767 /1934/
32. J.Allan, R.Robinson: J. Chem. Soc. 125, 2192 /1924/
33. J.Algar, J.P.Flynn: Proc. Roy. Irish Acad. 42B, 1 /1934/



34. T.Oyamada: J. Chem. Soc. Japan 55, 1256 /1934/
35. L.Jurd: J. Org. Chem. 27, 1294 /1962/
36. C.T.Davis, T.A.Geissman: J. Am. Chem. Soc. 76, 3507 /1954/
37. A.H.Bockian, R.E.Kepuer, A.D.Webb: J. Agric. Food Chem. 3, 695 /1955/
38. J.B.Harborne: Comparative Biochemistry of the Flavonoids, p. 171, Academic Press, London, 1967
39. K.Egger, J.Reichling, R.Ammann-Schweizer: Vitis 15, 24 /1976/
40. O.Bachmann: Vitis 17, 234 /1978/
41. W.E.Detty, B.O.Heston, S.H.Wender: J. Am. Chem. Soc. 77, 162 /1955/
42. P.F.Kador, N.E.Sharpless: Molecular Pharmacology 24, 521 /1983/
43. J.E.Ferrel, P.D.G.Chang Sing, G.Loew, R.King, J.M.Mansour, T.E.Mansour: Molecular Pharmacology 16, 556 /1979/
44. J.Kuc: Ann. Rev. Phytophatology 10, 207 /1972/
45. J.B.Harborne, J.L.Ingham, L.King, H.Payne: Phytochemistry 15, 1485 /1976/
46. P.Langcake: Physiological Plant. Phathology 18, 213 /1981/
47. O.Henke: Phytopathologische Z. 32, 149 /1958/
48. O.Bachmann, R.Blaich: Vitis 18, 106 /1979/
49. H.Wagner, H.Danninger, O.Seligmann, M.Nógrádi, L.Farkas, N.Farnsworth: Chem. Ber. 103, 3678 /1970/
50. T.Heap, R. Robinson: J. Chem. Soc. 2336 /1926/



51. E.C.Horning: Org. Synth. Coll. Vol. 3, p. 28 /1955/  
52. D.W.Fox, W.L.Savage, S.H.Wender: J. Am. Chem. Soc.  
75, 2504 /1953/  
53. L.Jurd: J. Org. Chem. 27, 1294 /1962/  
54. K.Freudenberg: Liebig's Annalen 433, 230 /1923/  
55. Ubrizsy Gábor: Növénykórtan /I/, 163 o., Akadémia  
Kiadó, Budapest, 1965  
56. N.N.Nutsubidze, D.I.Gulbani: Chemical Abstracts 62,  
9463 /1965/



Köszönetemet fejezem ki Dr. Sirokmán Ferencnek  
az értekezés témájának kijelöléséért és a munka  
elvégzése során mindenre kiterjedő támogatásáért.

