

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

**ÚJABB ÍGÉRETES DITERPÉNALKALOID-FORRÁS:
A *SPIRAEA* NEMZETSÉG**

CANK KRISTÓF BENCE

gyógyszerészhallgató

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar

Farmakognóziai Intézet

Témavezetők:

KISS TIVADAR

egyetemi tanársegéd

DR. CSUPOR DEZSŐ

egyetemi adjunktus

Szeged

2015.

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
BEVEZETÉS	3
I. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
I. 1. A <i>SPIRAEA</i> NEMZETSÉG BOTANIKÁJA ÉS MAGYARORSZÁGI ELŐFORDULÁSA	4
I. 2. A DITERPÉN-ALKALOIDOK ELŐFORDULÁSA, BIOSZINTÉZISE ÉS JELENTŐSÉGE	4
I. 3. A DITERPÉN-ALKALOIDOK FARMAKOLÓGIAI JELENTŐSÉGE	6
I. 4. A <i>SPIRAEA</i> FAJOK DITERPÉNALKALOID-TARTALMÁNAK FITOKÉMIAI VIZSGÁLATA	6
I. 5. A <i>SPIRAEA</i> DITERPÉN-ALKALOIDOK KIVONÁSA	7
II. ANYAG ÉS MÓDSZER	9
II. 1. NÖVÉNYI NYERSANYAG	9
II. 2. KIVONÁSI MÓDSZER KIDOLGOZÁSA	9
II. 3. <i>SPIRAEA CHAMAEDRYFOLIA</i> ALKALOIDOK KIVONÁSA, FRAKCIONÁLÁSA	10
II. 4. FARMAKOLÓGIAI VIZSGÁLATOK	12
III. EREDMÉNYEK	14
III. 1. ALKALOID SZŰRŐVIZSGÁLAT EREDMÉNYE	14
III. 2. ALKALOIDKIVONÁSI MÓDSZER	14
III. 3. ANTIBAKTERIÁLIS AKTIVITÁS	16
III. 4. XANTIN-OXIDÁZ ENZIMGÁTLÓ AKTIVITÁS	16
ÖSSZEFOGLALÁS	17
FELHASZNÁLT IRODALOM	18

BEVEZETÉS

A diterpén-alkaloidok a növények másodlagos anyagcseretermékei közé tartoznak. A bonyolult szerkezetű molekulákból álló népes vegyületcsalád bioszintézise arra a fotoszintézisre vezethető vissza, amely során a növény kisméretű és egyszerű szerves vegyületekből bonyolult szerkezetű szerves vegyületeket állít elő ($6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ O}_2$). A növények olyan vegyi üzemek, amelyek egyszerű anyagokból a diterpén-alkaloidokhoz hasonló komplex vegyületek előállítására is képesek, s ehhez az energiaszükségletet a fény szolgáltatja.

A növények másodlagos anyagcseretermékei közül számos vegyület biológiai aktivitással rendelkezik az emberi szervezetben, több közülük sikeresen alkalmazható a gyógyászatban. Ezek a szekunder metabolitok azonban sokszor kis koncentrációban fordulnak elő a növényekben, így kinyerésük komoly kémiai kihívás. A diterpén-alkaloidok is erős biológiai aktivitással rendelkeznek. Míg némelyek erősen toxikusak, addig mások szívritmuszavar kezelésére sikeresen alkalmazhatóak. A lappakonitin ma is forgalomban lévő gyógyszer Allapinin[®] néven. [1], [2] Farmakológiai vizsgálatok a diterpén-alkaloidok antibakteriális, gyulladáscsökkentő és központi idegrendszeri hatását is leírták. [3]–[7]

A diterpén-alkaloidok csoportja változatos szerkezetű és kémiájú vegyületeket foglal magába, a növényvilágban való előfordulásuk néhány taxonra korlátozódik. Míg a boglárkafélék nemzetségeiben jelenlétük általános, ezen kívüli előfordulásuk kuriózumnak számít. A vegyületek ígéretes farmakológiai vizsgálatai azonban új, változatos szerkezetű vegyületek iránt támasztanak igényt, így a kuriózumnak számító taxonok szűrővizsgálata és tiszta vegyületeinek izolálása kémiai, gyógyászati és kemotaxonómiai szempontból is perspektivikus. A gyöngyvessző (*Spiraea*) nemzetség egyike ezen taxonoknak, amelyek Magyarországon is honosak és növénykémiai feldolgozottságuk csupán a nemzetség néhány fajára korlátozódik.

Jelen dolgozatban hét *Spiraea* fajt felölelő (*Spiraea creanata* L., *Spiraea media* Schmidt., *Spiraea salicifolia* L., *Spiraea nipponica* Maxim., *Spiraea* × *vanhouttei* Zab., *Spiraea* × *bilbordii* hort. ex. K. Koch és *Spiraea chamaedryfolia* L.) szűrővizsgálat eredményét ismertetjük, valamint egy új alkaloid-kivonási módszert, amelyet a *Spiraea chamaedryfolia* L. esetében alkalmaztunk.

I. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

I. 1. A *Spiraea* nemzetség botanikája és magyarországi előfordulása

A *Spiraea* nemzetségbe 80-100 faj tartozik. Jellemzően az északi félteke mérsékelt égövétől a szubtrópusi hegyvidékig fordulnak elő. [8] A fajok könnyen hibridizálnak egymással. [9] Egyes fajok változatait és hibridjeit dísznövényként ültetik, ennek következtében sok helyen találkozhatunk kivadult állományokkal is. [10] A gyöngyvessző fajok külső megjelenésre 1,5-2 m magas cserjék. Az apró virágok fehér, rózsaszín és pirosas színűek, takaróleveleire jellemző az ötös tagszám. A virágban jellemzően 3×10 porzót találunk és az öt termőlevélből korikarp termőtáj alakul ki. A virágok zárt buga, vagy összetett ernyő virágzatot alkotnak. Termésük sokmagvú tüzőtermés, amely jellemzően tüzőcsokorban fordul elő. [11]

Európában 20 *Spiraea* faj fordul elő [12], amelyből Magyarországon hetet találunk meg [13]. A magyarországi fajok közül három védett. [14] **(1. táblázat)**

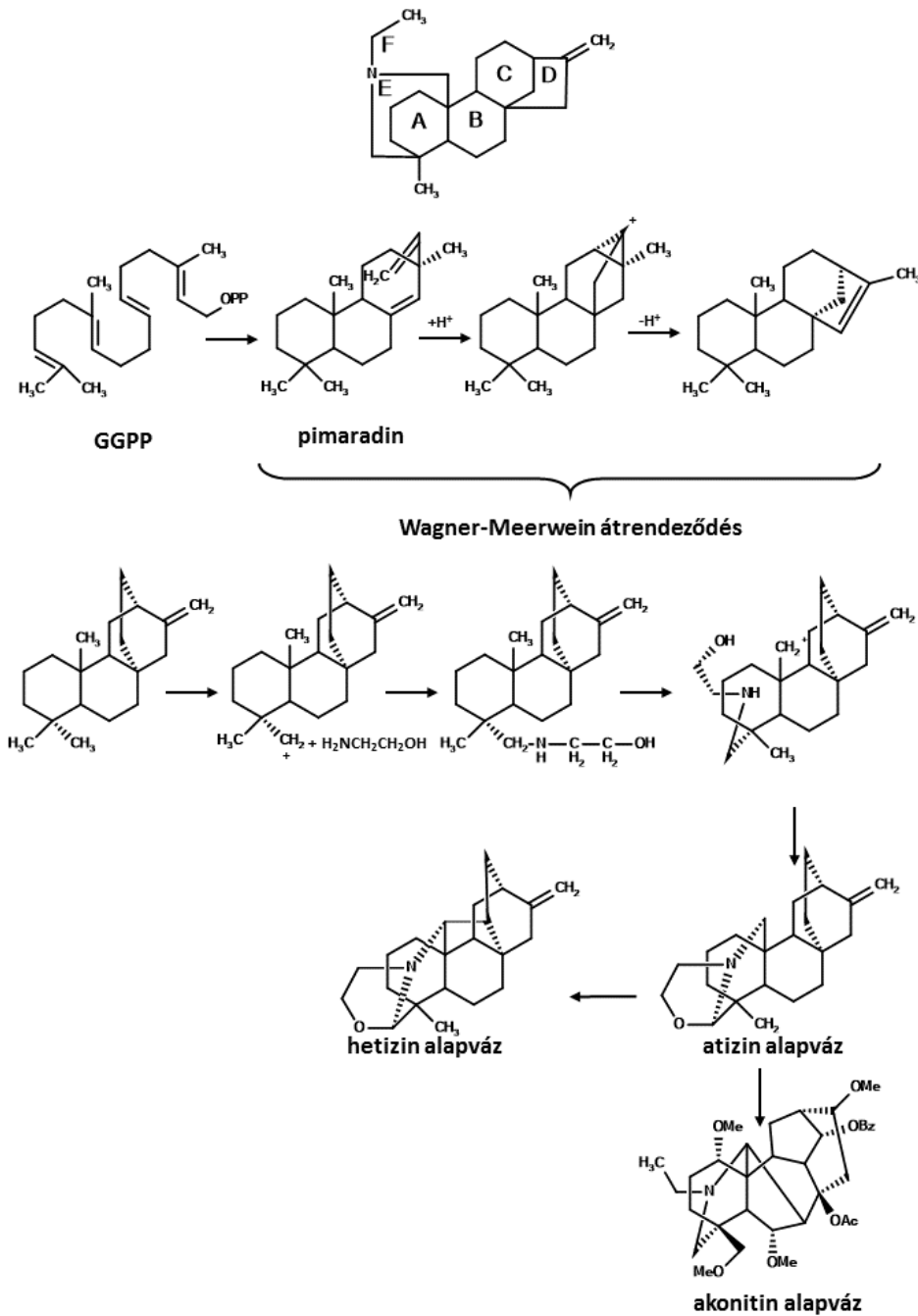
I. 2. A diterpén-alkaloidok előfordulása, bioszintézise és jelentősége

A növények országában a diterpén-alkaloidok előfordulása csupán néhány taxonra korlátozódik. A taxonok nagy részét a Ranunculaceae család nemzetségei (*Delphinium*, *Aconitum*, *Consolida*) teszik ki, ezen kívül csupán néhány más taxonból (Garryaceae, Escalloniaceae, Asteraceae és Rosaceae) mutatták ki ezt a vegyületcsoportot, így az utóbbiak kemotaxonomiai szempontból kuriózumnak számítanak. [15]–[17]

A Ranunculaceae diterpén-alkaloidokat az alapváz szénatomszáma alapján bisznor- (C_{18}), nor- (C_{19}) és diterpén-alkaloidok (C_{20}) csoportjába sorolhatjuk. A *Spiraea* nemzetségből izolált 65 diterpén-alkaloidok mindegyike C_{20} diterpén-alkaloid és atizin-, vagy hetizin-típusú alapvázal rendelkezik. **(2. táblázat)**

A vegyületcsoport növényekben történő bioszintézise a szakirodalomban nem tisztázott, csupán az egyes vegyületek totálszintéziséből származó információk alapján felállított hipotézis magyarázza a vegyületek lehetséges keletkezését. A diterpén-alkaloidok bioszintézise során először az alapváz épül fel. A kiinduló vegyület a gerano-geranil-pirofoszfát, amelyből *Wenker* szerint pimaridin keletkezik. A pimaridin 8,14 kettős kötésének protonálódásával, majd Wagner-Meerwein átrendeződésével alakul ki a C és a D gyűrű. A gyűrűk nem klasszikus gyűrűs karbokationokon keresztül is történhet. A diterpén-alkaloidok pszeudo-alkaloidok, mivel a nitrogén nem aminosavakból, hanem más nitrogén-tartalmú vegyületekből származik és beépülésük a bioszintézis késői szakaszában történik. A nitrogéntartalmú vegyület és a

reaktív aldehid-csoportokat tartalmazó alapváz között kondenzációs, majd reduktív lépéssel beépül a nitrogén. A kötések átrendeződésével először atizin, majd hetizin és egyéb alapvázak alakulnak ki. (1. ábra) [18]–[23]



1. ábra Diterpén-alkaloidok bioszintézise

I. 3. A diterpén-alkaloidok farmakológiai jelentősége

A diterpén-alkaloidok erős biológiai aktivitással rendelkeznek az emberi szervezetben. Míg egyesek erősen toxikusak, addig mások kedvező élettani hatást fejtenek ki. Eddigi farmakológiai vizsgálatok alapján a diterpén-alkaloidok több ioncsatornán (GIRK, hERG, Na_v1.2, GABA_A) [1]–[3], [24]–[27] kedvező aktivitással, valamint enzimgátló (COX-1, COX-2, 5-LOX) aktivitással [4], [5], [28] és antibakteriális aktivitással [6], [7] rendelkeznek. A vegyületcsoporton belül nagy szerkezeti változatosságot figyelhetünk meg. A növényi taxonok célzott fitokémiai elemzésével újabb és újabb diterpén-alkaloidok kerülnek leírásra, amely kemotaxonómiai és gyógyászati szempontból is nagy jelentőséggel bír.

I. 4. A *Spiraea* fajok diterpénalkaloid-tartalmának fitokémiai vizsgálata

A gyöngy vessző nemzetség csupán néhány fajának diterpénalkaloid-tartalma ismert. A legtöbb vegyületet a *Spiraea japonica* L. fajból és különböző változataiból izolálták, míg a *Spiraea fritschiana* C.K. Schneid. fajból kettő, a *Spiraea formosana* hort. ex Lavallegé és *Spiraea koreana* Nakai fajok esetében egy-egy alkaloidot izoláltak. A *Spiraea* nemzetségen belül tehát csupán néhány faj került feldolgozásra, a többi faj növénykémiai elemzése még várat magára, beleértve a magyarországi fajok legnagyobb részét. (1. táblázat)

Latin fajnév	Magyar	FE	HU	V	DA (db)	Irodalom
<i>Spiraea salicifolia</i> L.	Fűzlevelű gyöngy vessző	x	x	x		
<i>Spiraea alba</i> Duroi, Harbk, Baumz.		x				
<i>Spiraea douglasii</i> Hooker		x				
<i>Spiraea tormentosa</i> L.		x				
<i>Spiraea decumbens</i> Koch in Röhlting		x				
<i>Spiraea japonica</i> L.	Japán gyöngy vessző	x	x		64	[18], [29]–[58]
<i>Spiraea corymbosa</i> Rafin.		x				
<i>Spiraea hypericifolia</i> L.		x				
<i>Spiraea crenata</i> L.	Csipkés gyöngy vessző	x	x	x		
<i>Spiraea x vanhouttei</i> Zab.	Közönséges gyöngy vessző	x	x			
<i>Spiraea chamaedryfolia</i> L.	Hegyi gyöngy vessző	x	x			
<i>Spiraea media</i> Fr. Schm.	Sziklai gyöngy vessző	x	x	x		
<i>Spiraea cana</i> Waldst. & Kit.		x	x			

Latin fajnév	Magyar	FE	HU	V	DA (db)	Irodalom
<i>Spiraea trilobata</i> L.	Karéjos gyöngyvessző					
<i>Spiraea fristchiana</i> C.K. Schneid					2	[31], [35]
<i>Spiraea koreana</i> Nakai					1	[59]
<i>Spiraea formosa</i> hort. ex. Lavallesc					1	[60]

1. táblázat A *Spiraea* fajok fitokémiai feldolgozottsága (FE: Flora Europaea [12]; H: Magyarországi előfordulás [13]; V: védett faj [14]; DA: diterpén-alkaloid)

I. 5. A *Spiraea* diterpén-alkaloidok kivonása

Az alkaloidok nitrogéntartalmuk miatt bázikus karakterrel rendelkeznek. A nitrogén nemkötő elektronpárja miatt gyenge bázisok. A növényekben szabad bázis formában, vagy szerves savakkal képzett só formájában fordulnak elő. Ezen tulajdonságuk miatt az alkaloidok kivonására három módszer kínálkozik:

- 1) Híg ásványi savakkal kiszorítjuk a növényben lévő gyenge savval képzett sójából, így az alkaloidok só formában vízdékonyak és más vízdékony anyagokkal együtt vízzel kivonhatók a növényből. Utóbbiaktól fáziscserével szabadulunk meg, ugyanis lúgosítást követően az alkaloidok bázis formába alakulnak, és szerves oldószerrel kirázhatók.
- 2) Lúggal (cc. NH₃) átnedvesítjük a drogot, így az alkaloidok szabad bázissá alakulnak és szerves oldószerrel más lipofil anyagokkal együtt kivonjuk. Az alkaloidokat híg ásványi savval ismét só formára alakítjuk, vízdékonnyá tesszük és kirázzuk szerves oldószerrel. Ezután általában lúgosítást követően szerves oldószerrel kirázzuk a bázis formában lévő alkaloidokat.
- 3) Neutrális oldószerrel (metanol, etanol) végezzük a kivonást (általában perkolálással), majd fáziscserével, vagy pH gradiens alkalmazásával nyerjük ki az alkaloidokat. [61]

A *Spiraea* fajokból a diterpén-alkaloidok kivonására a neutrális oldószerrel való kivonással találkozhatunk (a drogot metanollal, vagy etanollal perkolálták/áztatták), majd savazás után petroléter-benzol, vagy éterrel kirázták. A visszalúgosítás (a lúgosítást cc. NH₃, vagy NaOH végezték) általában éterrel, vagy kloroformmal rázták ki az alkaloidokat. Az alkaloidkivonatot oszlopkromatográfiával SiO₂, Al₂O₃ állófázisok alkalmazásával fracionálták és változatos kromatográfiás módszerekkel tisztították. [29]–[32], [34], [35], [59]

II. ANYAG ÉS MÓDSZER

II. 1. Növényi nyersanyag

A vizsgálatunkhoz használt nyersanyagot Magyarországon és Lettországból gyűjtötték (**3. táblázat**). A fajok azonosítását Jakab Gusztáv (Szent István Egyetem, Tessedik Campus Környezettudományi Intézet), Németh Anikó (Szegei Tudományegyetem, Fűvészkert) és Santa Rutkovska (Daugavpils University, Faculty of Nature Sciences and Mathematics, Lettország) végezték. A növényeket gyűjtés után megszáritottuk és felhasználás előtt ledaráltuk.

Faj	Drog	Gyűjtési hely	Botanikus	Bizonyító példány (helye, száma)
<i>Spiraea crenata</i> L.	herba	Alsórákos	Jakab	SZTE Farmakognózia 850
<i>Spiraea media</i> Schmidt.	herba, radix	Daugavpils	Rutkovska	DAU 0 31 147 009
<i>Spiraea chamaedryfolia</i> L.	herba, radix	Daugavpils	Rutkovska	DAU 0 31 145 023
<i>Spiraea salicifolia</i> L.	herba	Sepsibükkszád	Jakab	SZTE Farmakognózia 851
<i>Spiraea nipponica</i> Maxim.	radix	Szeged, Fűvészkert	Németh	SZTE Farmakognózia 852
<i>Spiraea x vanhouttei</i> (Briot) Zabel	radix	Szeged, Fűvészkert	Németh	SZTE Farmakognózia 853
<i>Spiraea x billardii</i> hort. ex K. Koch	radix	Szeged, Fűvészkert	Németh	SZTE Farmakognózia 854

3. táblázat A vizsgálat *Spiraea* fajok

II. 2. Kivonási módszer kidolgozása

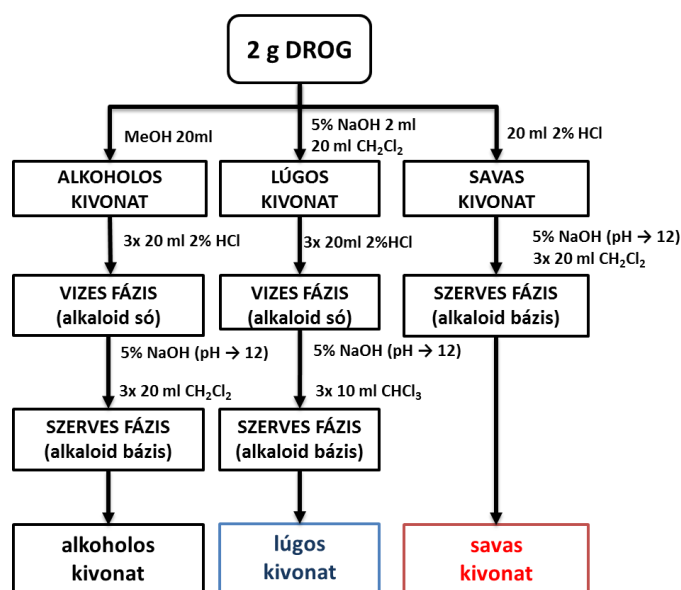
A hét gyöngyvessző faj diterpénalkaloid-tartalmának szűrővizsgálatához a szakirodalomban leggyakrabban előforduló neutrális oldószerrel való kivonás mellett a savas és lúgos kivonási módszert is alkalmaztuk (vö. I. 5.).

A metanolos kivonást 2 g szárított, porított drog felhasználásával és 20 ml metanollal (UH fürdőben 10 percig) végeztük, majd ezt követően az alkaloidok feldúsítására fáziscserét végeztünk. A drog szűrése után a szűrlethez 20 ml 2%-os sósavat adtunk, majd 3x20 ml diklórmétánnal kiráztuk. A szerves fázist bepároltuk (**MI**). A vizes fázis kémhatását 5%-os NaOH oldattal pH 12-re állítottuk be, majd 3x20 ml diklórmétánnal kiráztuk. A szerves fázist rotációs vákuumbepárlón bepároltuk (**MII**).

A *savas kivonást* 2 g drog felhasználásával 20 ml 2%-os sósavval (UH fürdőben 10 percig) végeztük. A drog szűrése után a szűrlet kémhatását 5%-os NaOH oldattal pH 12-re állítottuk be, majd 3x20 ml diklórmetánnal kiráztuk. A szerves fázist rotációs vákuumbepárlón bepároltuk (SI). A vizes fázis kémhatását 2%-os sósavval visszasavanyítottuk, majd 3x20 ml diklórmetánnal kiráztuk. A szerves fázist bepároltuk (SII).

A *lúgos kivonását* 2 g drogot 5%-os NaOH oldatban duzzasztottuk, majd 20 ml diklórmetánnal (UH fürdőben 10 percig) kivontuk. A drog szűrése után a szűrletet 3x20 ml 2%-os sósavval kiráztuk. A szerves fázist a kirázás után bepároltuk (LI). A vizes fázis pH-ját 12-re állítottuk 5%-os NaOH oldattal, majd 3x20 ml diklórmetánnal kiráztuk. A szerves fázist rotációs vákuumbepárlón bepároltuk (LII).

A különböző kivonatok alkaloidtartalmát vékonyréteg-kromatográfiával (Silica gel 60 F₂₅₄, Merck; futtató elegy: toluol-aceton-etanol-cc.NH₃ 70:50:16:4,5; előhívás Dragendorff-reagens + 5% NaNO₂-oldattal két lépésben) vizsgáltuk.



2. ábra Kivonatok készítése a szűrővizsgálatokhoz

II. 3. *Spiraea chamaedryfolia* alkaloidok kivonása, frakcionálása

II. 3. 1. Kivonatok készítése

A 4,0 kg tömegű szárított és darált gyökérdrogot 500 grammos részletekben dolgoztuk fel. A drogot három lépésben vontuk ki. Először 2x2,5 liter metanollal vontuk ki (UH fürdőben 15

percig), majd a drogot szűrtük és megszáritottuk. A szüredéket (metanolos kivonat) bepároltuk és további feldolgozásig félretettük.

A megszáradt drogot 5%-os NaOH-oldattal duzzasztottuk és 2,5 liter diklórmetánnal vontuk ki (UH fürdőben 15 percig). A drogot ismét szűrtük. A szüredék (lúgos kivonat) feldolgozását a szűrés után azonnal megkezdtük.

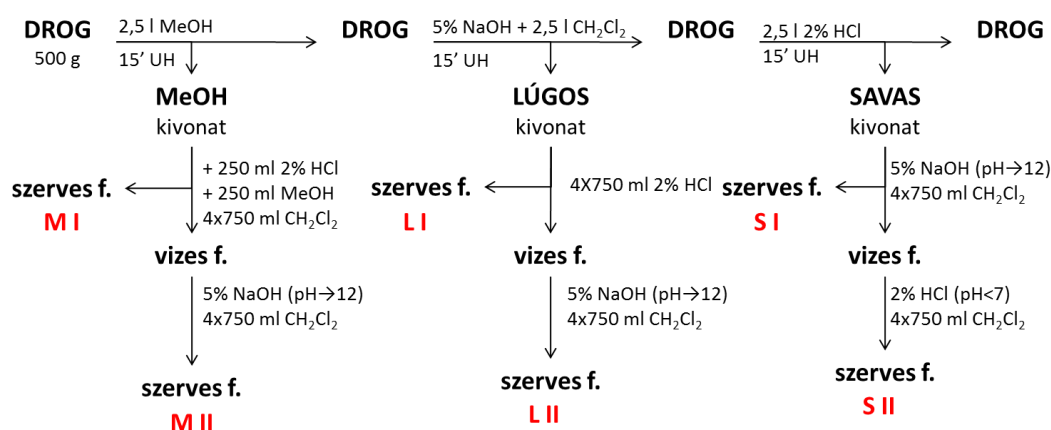
A lúgos kivonás utáni drogot azonnal 2%-os sósavval megsavanyítottuk és további 2,5 liter 2%-os sósavat adtunk hozzá a kivonáshoz (UH fürdőben 15 percig). A drogot ismét megszürtük és a szüredék (savas kivonat) feldolgozását azonnal megkezdtük.

II. 3. 2. Alkaloidok kinyerése fáziscserével

A bepárolt metanolos kivonatot 500 ml MeOH-2% HCl (1:1) feloldottuk és 4x750 ml diklórmetánnal kiráztuk. A szerves frakciót gyűjtöttük és bepároltuk (**MI**). A vizes fázist 5% NaOH-dal lúgosítottuk (pH 12) majd ismét 4x750 ml diklórmetánnal kiráztuk. A szerves fázist bepároltuk (**MII**).

A lúgos kivonatot 3x750 ml 2% sósavval kiráztuk. A szerves fázist bepároltuk (**LI**). A vizes frakciót 5% NaOH-dal lúgosítottuk (pH 12) és 3x750 ml diklórmetánnal kiráztuk. A szerves fázist bepároltuk (**LII**).

A savas kivonatot 5% NaOH-dal lúgosítottuk (pH 12) 3x750 ml diklórmetánnal kiráztuk. A szerves fázist bepároltuk (**SI**). A vizes fázist 2%-os sósavval vissza savanyítottuk, majd 3x750 ml diklórmetánnal kiráztuk. A szerves fázist bepároltuk (**SII**).



3. ábra A *Spiraea chamaedryfolia* gyökérdrog kivonása

A kivonatok alkaloidtartalmát vékonyréteg-kromatográfiával ellenőriztük.

II. 3. 3. A kivonatok polaritás szerinti szétrázása

A nagyobb tömegű kivonatok (MI, MII, LI, SII) polaritás szerinti szétrázáshoz szárazra párolt kivonatok 500 ml 50%-os metanolban feloldottuk, majd 4x750 ml *c*-hexánnal, 4x750 ml etil-acetáttal, 4x750 ml diklórmetánnal szétráztuk. A szerves fázisokat és a metanolos-vizes maradékot is szárazra pároltuk és alkaloidtartalmukat ellenőriztük vékonyréteg-kromatográfiával.

II. 4. Farmakológiai vizsgálatok

A II. 3. 3. fejezetben leírt frakciók antibakteriális és xantin-oxidáz enzimgátló aktivitását vizsgáltuk.

II. 4. 1. Antibakteriális aktivitás

Az antibakteriális aktivitás vizsgálatához *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619), *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19613) *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) Gram-pozitív törzseket, valamint *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Moraxella catarrhalis* (ATCC 25238) Gram-negatív törzseket és meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC 43300) törzseket vontuk be. A baktériumtenyészetet Columbia agar + 5% birkavér (COS) táptalajon 37 °C-on inkubáltuk 24 órán.

A növényi kivonatok hatását korongdiffúziós módszerrel vizsgáltuk. [62] A baktérium kolóniát 24 órás tenyészetből nyertük ki, a baktériumokat steril izotóniás sóoldatban szuszpendáltuk 1-2 x 10⁸ CFU/ml koncentrációban és a táptalajra szélesztjük. A 6 mm átmérőjű, steril korongokat átitattuk a kivonatokkal (a 20 µl 50 mg/ml töménységű oldatot a növényi kivonat 40% etanolban való oldásával kaptuk), majd miután megszáradt a táptalajra helyeztük. Negatív kontrollként 20 µl oldószerrel átitatott korongot alkalmaztunk. A táptalajt ezután 24 órán át inkubáltunk 37 °C-on. Az inkubálás után gátlási zónák méretét mértük és feljegyeztük (korongméret + gátlási zóna mm-ben).

II. 4. 2. Xantin-oxidáz (XO) enzimgátló-hatás vizsgálat

Az *in vitro* XO-gátló hatás méréséhez a Sigma-Aldrich által kidolgozott protokollt módosítottuk az általunk használt spektrofotométer specifikációinak figyelembe vételével. A mérés elméleti háttere a xantin-húgysav átalakuláson alapszik, amelynek katalizátora a XO enzim. A referenciaként alkalmazott allopurinol az egyetlen forgalomban lévő XO-gátló hatású

vegyület, amelyet a gyógyászatban alkalmaznak. A vizsgált kivonat, illetve vegyület a XO-gátláson keresztül a húgysav termelődését gátolja, így csökkentve az abszorbanciát. A detektálás 290 nm-en 3 percig történt, FluoSTAR OPTIMA (BMG LABTECH) spektrofotométer használatával. A tesztelt anyagok hatékonyságát az idő-abszorbancia tengelyen felvett görbe meredekségének változása jelzi. Az eredmények kiértékelése GraphPad 5.04 (GraphPad Software Inc.) szoftver segítségével történt. Alap mérési paraméterek a vizsgálat során: kálium-foszfát puffer-oldat: 33 mM, pH 7,5 (140 μ L), xantin-oldat: 0,05 mM, pH 7,5 (100 μ L), xantin-oxidáz: 0,0065 U/mL (50 μ L), vizsgálandó anyag: mikrodilúció (400-1,56 μ g/mL) (10 μ L); végtérfogat: 300 μ L, mérés: 96 mintahelyes UV microplate. [63]

III. EREDMÉNYEK

III. 1. Alkaloid szűrővizsgálat eredménye

A hét *Spiraea* fajból (*Spiraea creanata*, *Spiraea media*, *Spiraea salicifolia*, *Spiraea nipponica*, *Spiraea vanhouttei*, *Spiraea bilbordii* és *Spiraea chamaedryfolia*) készített kivonatok alkaloidtartalmát vizsgáltuk. A hét faj esetében egyedül a *Spiraea chamaedryfolia*ból mutattunk ki alkaloidokat.

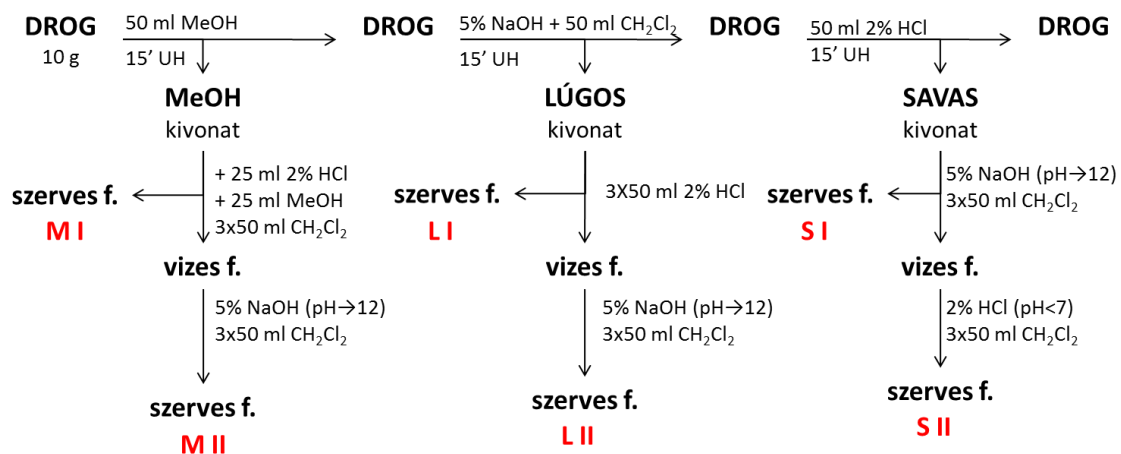
III. 2. Alkaloidkivonási módszer

A *Spiraea* alkaloidok kivonására a szakirodalomban leggyakrabban neutrális kivonást alkalmaznak, az alkaloid dús frakciókat fáziscserével nyerik. Próbakivonásaink során azt tapasztaltuk, hogy a neutrális, lúgos és savas kivonással eltérő alkaloidprofilú kivonatokot nyerünk. Ezért indokoltnak tartottuk, hogy a drogot több lépésben mindhárom kivonással vonjuk ki (**6. ábra**). A 4 kg drogból ezért neutrális, lúgos és savas kivonással hat kivonatot nyertünk (MI, MII, LI, LII, SI, SII). A kivonatok alkaloidtartalmát vékonyréteg-kromatográfiával ellenőriztük (SiO₂, futató elegy: toluol-aceton-etanol-cc.NH₃ 70:50:16:4,5). Előhívóként Dragendorff-reagenst alkalmaztunk. Annak ellenére, hogy ezt a reagenst széleskörűen használják alkaloidok esetén, fals pozitív reakciót is adhat. [64] Ezen fals pozitív vegyületeket kizárása érdekében a Dragendorff-reagenssel előhívott lemezeket megszáritottuk és 5% NaNO₂-oldatot alkalmaztunk előhívó oldatként (**7. ábra**). Így a Dragendorff fals pozitív komponensek eltűnnek, az alkaloidok viszont barna színű foltokként megmaradtak. [65]

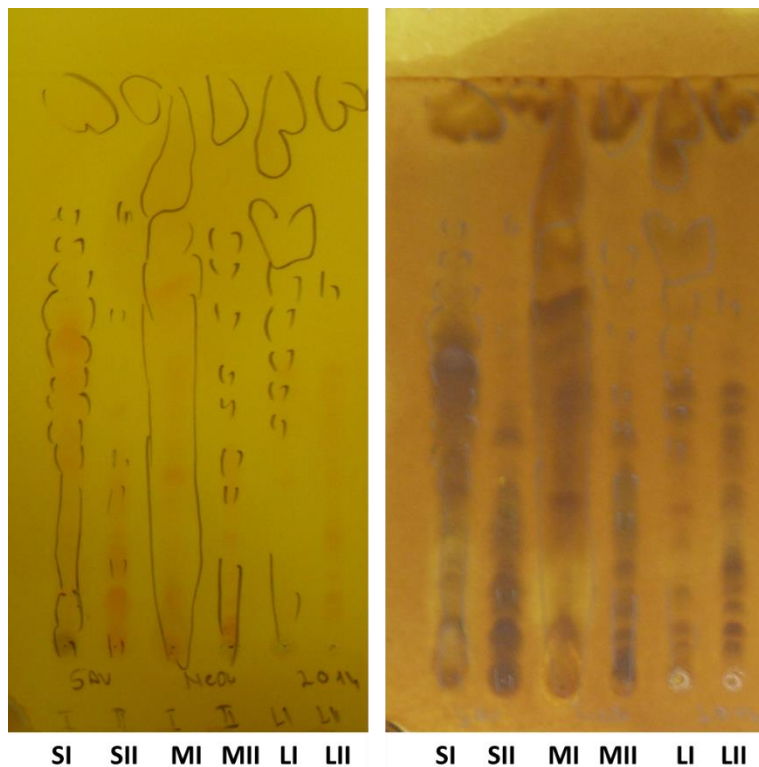
A kivonatok mindegyike tartalmazott alkaloidokat (**7. ábra**), a kivonatok tömegét az **4. táblázatban** tüntettük fel.

Kivonat	Tömeg
MI	24,9 g
MII	4,3 g
LI	60,9 g
LII	1,4 g
SI	0,9 g
SII	1,8 g

4. táblázat A kivonatok tömegei



4. ábra A próbakivonás menete



5. ábra A *Spiraea chamaedryfolia* kivonatok vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálata

Az alkaloidok és egyéb komponensek elválasztása érdekében növekvő polaritású oldószerekkel (*c*-hexán, etil-acetát, diklórmetán) ráztuk ki a kivonatokat. Az alkaloidok az etil-acetát, diklórmetán fázisban és a metanolos-vizes maradékban dúsultak fel (5. táblázat).

	c-hexán	etil-acetát	diklórmetán	metanol
MI	-	+	+	+
	13,50 g	3,72 g	196,7 mg	334,7 mg
MII	-	+	+	-
	3,39 g	1,05 g	10,44 mg	332,12 mg
LI	-	+	+	+
	7,58 g	215,4 mg	125,72 mg	490,64 mg
SII	-	+	-	-
	0,36 g	549,38 mg	30,35 mg	560,50 mg

5. táblázat Kivonatok alkaloidtartalma (+: van alkaloid, -: nincs alkaloid) és a kivonatok tömege

III. 3. Antibakteriális aktivitás

A kivonatok antibakteriális hatását kilenc baktériumtörzsön vizsgáltuk. Három *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) Gram-pozitív törzsek, és a meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC 43300) törzs esetében tapasztaltunk antibakteriális hatást (gátlási zóna > 11 mm). (6. táblázat)

Kivonat	B. subtilis ATCC6633	S. aureus ATCC 29213	Str. pneumoniae ATCC 49619	M. catarr. ATCC 43617	MRSA ATCC 43300
MI-EtOAc	9,6±0,6	11,3±1,2	11,7±1,7	8±0	11,0±0
LI-MeOH	-	-	-	13,7±0,6	-
SII-EtOAc	12,0±0	12,7±0,6	13,0±1	9,3±0,6	12,6±0,6

6. táblázat A kivonatok antibakteriális aktivitása

III. 4. Xantin-oxidáz enzimgátló aktivitás

A xantin-oxidáz enzimgátló aktivitást akkor tekintettük jelentősnek, ha az meghaladta a 70%-os gátlást. Három esetben mértünk 85% feletti aktivitást, az eredményeket az 7. táblázatban foglaltuk össze.

Kivonat	gátlás%
MI-EtOAc	96,6±6,4
LI-EtOAc	85,0±2,8
SII-EtOAc	87,4±5,3

7. táblázat Xantin-oxidáz enzimgátló aktivitás

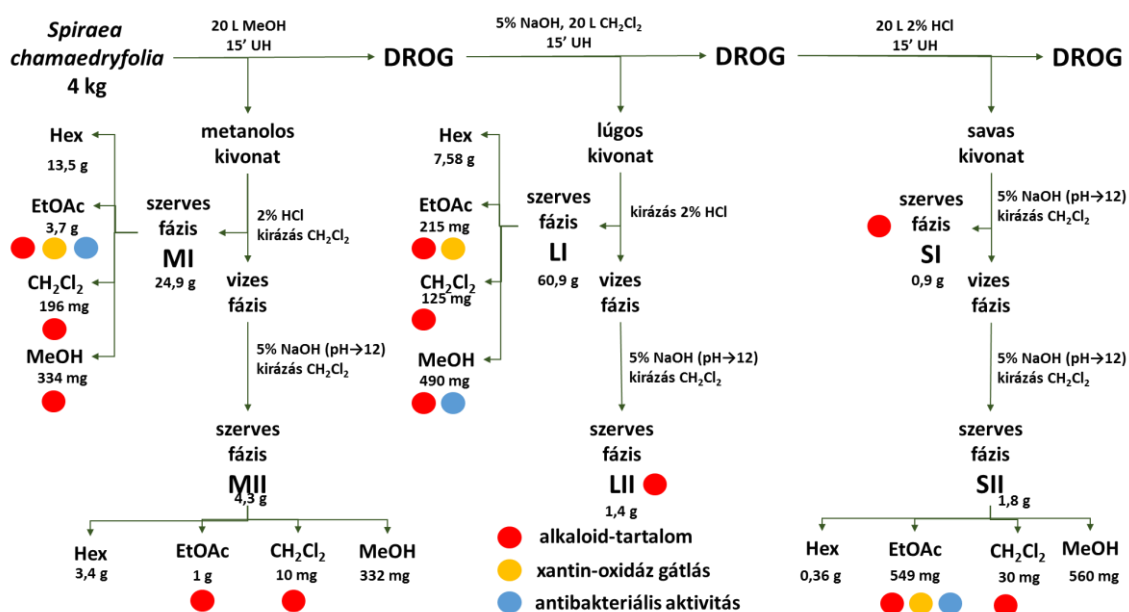
ÖSSZEFOGLALÁS

A diterpén-alkaloidok kedvező farmakológiai aktivitása miatt ígéretesnek bizonyul újabb, kevésbé kutatott diterpén-alkaloidokat tartalmazó növényi taxonok vizsgálata. A *Spiraea nemzetség* 80-100 fajából eddig csupán négyet vizsgáltak, azokból 65 diterpén-alkaloidot izoláltak. Ezért újabb, még nem kutatott fajok vizsgálata indokoltnak tűnik.

Jelen munkánkba hét *Spiraea* fajt (*Spiraea creanata*, *Spiraea media*, *Spiraea salicifolia*, *Spiraea nipponica*, *Spiraea vanhouttei*, *Spiraea bilbordii* és *Spiraea chamaedryfolia*) vontunk be. Szűrővizsgálatunkban, amelyben az alkaloid tartalomra fókuszáltunk, úgy tapasztaltuk, hogy csak a *Spiraea chamaedryfolia* tartalmaz alkaloidokat.

A *Spiraea* taxonok diterpén-alkaloidtartalma – ellentétben a széles körben kutatott Ranunculaceae fajokkal – rendkívül alacsony, ezért kivonásuk és izolálásuk komoly feladat. A hatékony alkaloidkivonás érdekében megvizsgáltuk, hogy a szakirodalomban általánosan alkalmazott neutrális alkaloidkivonás mellett a savas és lúgos kivonás hatékonyságát. Mivel azt tapasztaltuk, hogy a három kivonási módszer három eltérő alkaloidprofil eredményez, ezért olyan – a szakirodalomban a *Spiraea* fajok esetében még nem közölt – módszert dolgoztunk ki, amely során a drogot három lépésben mindhárom módszer alkalmazásával vontuk ki az alkaloid-tartalmat.

A kivonatokkal végzett farmakológiai vizsgálatok során úgy tapasztaltuk, hogy a kivonatok közepes antibakteriális aktivitással, valamint jelentős xantin-oxidáz enzimgátló aktivitással rendelkeznek. Jelenleg is folyó munkánk célja a tiszta vegyületek kinyerése, szerkezetük meghatározása és biológiai hatásaik vizsgálata.



6. ábra A *Spiraea chamaedryfolia* kivonatainak alkaloidtartalma és farmakológiai aktivitása

FELHASZNÁLT IRODALOM

- [1] S. F. Sokolov, S. A. Bakalov, N. A. Mironova, M. M. Rogova, T. A. Malkina, and S. P. Golitsyn, "Efficiency and safety of allapinin in short- and long-term treatment of patients with normal heart and ventricular premature beats," *Kardiologija*, vol. 54, no. 1, pp. 20–6, 2014.
- [2] Y. V. Vakhitova, E. I. Farafontova, R. Y. Khisamutdinova, V. M. Yunusov, I. P. Tsypysheva, and M. S. Yunusov, "A study of the mechanism of the antiarrhythmic action of Allapinin," *Russ. J. Bioorganic Chem.*, vol. 39, no. 1, pp. 92–101, Jan. 2013.
- [3] X.-Y. Zhao, Y. Wang, Y. Li, X.-Q. Chen, H.-H. Yang, J.-M. Yue, and G.-Y. Hu, "Songorine, a diterpenoid alkaloid of the genus *Aconitum*, is a novel GABA(A) receptor antagonist in rat brain.," *Neurosci. Lett.*, vol. 337, no. 1, pp. 33–6, Jan. 2003.
- [4] B. Borcsa, U. Widowitz, D. Csupor, P. Forgo, R. Bauer, and J. Hohmann, "Semisynthesis and pharmacological investigation of lipo-alkaloids prepared from aconitine.," *Fitoterapia*, vol. 82, no. 3, pp. 365–8, Apr. 2011.
- [5] H. Hikino, H. Takata, M. Fujiwara, C. Konno, and K. Ohuchi, "Mechanism of inhibitory action of mesaconitine in acute inflammations.," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 82, no. 1–2, pp. 65–71, Aug. 1982.
- [6] P. González, C. Marín, I. Rodríguez-González, A. B. Hitos, M. J. Rosales, M. Reina, J. G. Díaz, A. González-Coloma, and M. Sánchez-Moreno, "In vitro activity of C20-diterpenoid alkaloid derivatives in promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum*.," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 25, no. 2, pp. 136–41, Feb. 2005.
- [7] Atta-ur-Rahman, A. Nasreen, F. Akhtar, M. S. Shekhani, J. Clardy, M. Parvez, and M. I. Choudhary, "Antifungal diterpenoid alkaloids from *Delphinium denudatum*.," *J. Nat. Prod.*, vol. 60, no. 5, pp. 472–4, May 1997.
- [8] L. Lingdi and C. Alexander, "1. SPIRAEA Linnaeus, Sp. Pl. 1: 489. 1753.," *Flora of China*, vol. 9, pp. 47–73, 2003.
- [9] M. K. Huh, "Phylogenetic Relationships in the Genus *Spiraea* (Rosaceae) Inferred from the Chloroplast DNA Region, trnL-trnF," *Am. J. Plant Sci.*, vol. 03, no. 05, pp. 559–566, 2012.
- [10] S. Rutkovska, I. Pučka, and I. Novicka, "Analysis of invasive flora in cemetery territories of the city of daugavpils," *Vide. Tehnol. Resur. - Environ. Technol. Resour.*, vol. 2, no. 1999, pp. 344–351, 2011.

- [11] A. Bohridi, *A zárwatermők fejlődéstörténeti rendszertana*. Budapest: Nemzeti Tankönyvkiadó, 1998.
- [12] T. G. Tutin, Ed., “Spiraea L.,” in *Flora Europaea : ROSACEAE, TO UMBELLIFERAE*, Cambridge: University Press, 1968, pp. 4–6.
- [13] T. Simon, *A magyarországi edényes flóra határozója*, 5th ed. Budapest: Nemzeti Tankönyvkiadó, 2004.
- [14] 13/2001. (V. 9.) KöM rendelet a védett és a fokozottan védett növény- és állatfajokról, a fokozottan védett barlangok köréről, valamint az Európai Közösségben természetvédelmi szempontból jelentős növény- és állatfajok közzétételéről. 2001.
- [15] X. Hao, Y. Shen, L. Li, and H. He, “The Chemistry and Biochemistry of *Spiraea japonica* Complex,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 10, no. 21, pp. 2253–2263, Nov. 2003.
- [16] S. W. Pelletier, “Studies in the Chemistry of Natural Products: Rearrangement Reactions of Diterpenoid and Norditerpenoid Alkaloids,” *J. Nat. Prod.*, vol. 55, no. 1, pp. 1–24, Jan. 1992.
- [17] M. E. Wall, M. C. Wani, and H. Taylor, “Plant antitumor agents, 27. Isolation, structure, and structure activity relationships of alkaloids from *Fagara macrophylla*,” *J. Nat. Prod.*, vol. 50, no. 6, pp. 1095–9.
- [18] L. Fan, Z. Zhang, Y. Shen, and X. Hao, “Five diterpene alkaloids from *Spiraea japonica* (Rosaceae),” *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 32, no. 1, pp. 75–78, Jan. 2004.
- [19] Y. Ichinohe, “No Title,” *Kagaku no Lyoiki*, vol. 32, p. 27, 1978.
- [20] X. Hao, “Chemical and biological study of *Spiraea japonica* complex,” *Prog. Chem.*, vol. 21, no. 1, pp. 84–99, 2009.
- [21] K. Mothes, Ed., *Biosynthese der Alkaloide*. Deutscher Verlag der Wissenschaften VEB, 1969.
- [22] K. M. Peese and D. Y. Gin, “Nominine,” in *Total Synthesis of Natural Products*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012, pp. 1–24.
- [23] M. N. Sultankhodzhaev and A. A. Nishanov, “Proposed biogenesis of diterpenoid alkaloids,” *Chem. Nat. Compd.*, vol. 31, no. 3, pp. 283–298, 1996.

- [24] B. Borcsa, L. Fodor, D. Csupor, P. Forgo, A. Molnár, and J. Hohmann, "Diterpene Alkaloids from the Roots of *Aconitum moldavicum* and Assessment of Nav 1.2 Sodium Channel Activity of *Aconitum* Alkaloids," *Planta Med.*, vol. 80, no. 02/03, pp. 231–236, Jan. 2014.
- [25] T. Kiss, P. Orvos, S. Bánsághi, P. Forgo, N. Jedlinszki, L. Tálosi, J. Hohmann, and D. Csupor, "Identification of diterpene alkaloids from *Aconitum napellus* subsp. *firmum* and GIRK channel activities of some *Aconitum* alkaloids," *Fitoterapia*, vol. 90, pp. 85–93, Oct. 2013.
- [26] P. Forgo, B. Borcsa, D. Csupor, L. Fodor, R. Berkecz, A. Molnár V, and J. Hohmann, "Diterpene alkaloids from *Aconitum anthora* and assessment of the hERG-inhibiting ability of *Aconitum* alkaloids.," *Planta Med.*, vol. 77, no. 4, pp. 368–73, Mar. 2011.
- [27] Z. Kőszegi, T. Atlasz, D. Csupor, K. Szabadfi, J. Hohmann, and I. Hernádi, "Aconitum alkaloid songorine acts as a potent GABA(A) receptor agonist in the rat brain in vivo," *Acta Physiol. Hung.*, vol. 94, no. 4, pp. 367–368, 2007.
- [28] B. L. Borcsa, "Investigations of diterpene alkaloids isolated from *Aconitum anthora* L. and *A. moldavicum* L., and of aconitine-derived lipo-alkaloids," Szegedi Tudományegyetem, Szeged, Hungary, 2014.
- [29] G. Y. Zuo, H. P. He, X. Hong, W. M. Zhu, Y. M. HU, X. S. Yang, and X. J. Hao, "New diterpenoid alkaloids from *Spiraea japonica* var. *ovalifolia*," *Chinese Chem. Lett.*, vol. 12, no. 2, pp. 147–150, 2001.
- [30] G. Y. Zuo, H. P. He, X. Hong, W. M. Zhu, X. S. Yang, and X. J. Hao, "New spiramines from *Spiraea japonica* var. *ovalifolia*," *Heterocycles*, vol. 55, no. 3, pp. 487–493, 2001.
- [31] M. Li, X. B. Du, Y. M. Shen, B. G. Wang, and X. J. Hao, "New Diterpenoid Alkaloids from *Spiraea fritschiana* var. *parvifolia*," *Chinese Chem. Lett.*, vol. 10, no. 10, pp. 155–156, 1999.
- [32] L.-M. FAN, H.-P. HE, Y.-M. SHEN, and X.-J. HAO, "Two New Diterpenoid Alkaloids from *Spiraea japonica* L. f. var. *fortunei*(Planchon) Rehd.," *J. Integr. Plant Biol.*, vol. 47, no. 1, pp. 120–123, Jan. 2005.
- [33] V. D. Gorbunov, V. I. Sheichenko, and A. I. Ban'kovskii, "New alkaloid from *Spiraea japonica*," *Khimiya Prir. Soedin.*, no. 1, pp. 124–125, 1976.
- [34] G. Goto, K. Sasaki, N. Sakabe, and Y. Hirata, "The alkaloids obtained from *Spiraea*

- japonica L.," *Tetrahedron Lett.*, vol. 11, no. 1, pp. 1369–73, 1968.
- [35] F.-P. Wang and X.-T. Liang, "C20-diterpenoid alkaloids," in *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, G. A. Cordell, Ed. Amsterdam, Boston, London, New York, Oxford, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Academic Press, 2002, pp. 1–280.
- [36] M. Toda and Y. Hirata, "The structures of spiradines F and G from *L. fil.*," *Tetrahedron Lett.*, vol. 9, no. 53, pp. 5565–5568, Jan. 1968.
- [37] G. Goto and Y. Hirata, "The structure of spiradine D," *Tetrahedron Lett.*, vol. 9, no. 25, pp. 2989–2992, Jan. 1968.
- [38] X. Yang and X. Hao, "The diterpenoid alkaloids from *Spiraea japonica* var. *glabra.*," *Acta Metallurgica Sinica*, vol. 15, no. 4, pp. 421–423, 1993.
- [39] X.-J. Hao, B.-G. Wang, L. Li, X.-S. Yang, Z.-H. Chen, and X.-J. Hao, "Three New Diterpene Alkaloids from *Spiraea japonica*," *Heterocycles*, vol. 53, no. 6, p. 1343, 2000.
- [40] Y. M. Shen, H. P. He, Y. S. Zhang, B. G. Wang, and X. J. Hao, "Spiramide, a new diterpene amide from the roots of *Spiraea japonica* var. *acuta.*," *Chinese Chem. Lett.*, vol. 11, no. 9, pp. 789–792, 2000.
- [41] H. Liu, W. Ni, C. Chen, Y. Di, and X. Hao, "Two New Diterpenoid Lactams from *Spiraea japonica* var. *ovalifolia.*," *Helv. Chim. Acta*, vol. 92, no. 6, pp. 1198–1202, 2009.
- [42] X. Hao, M. Node, T. Taga, Y. Miwa, J. Zhou, S. Chen, and K. Fuji, "The structures of four new diterpene alkaloids, spiramines A, B, C, and D.," *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).*, vol. 35, no. 4, pp. 1670–1672, 1987.
- [43] J.-L. Nie and X.-J. Hao, "Spiramilactone B, a new diterpenoid from *Spiraea japonica* var. *stellaris.*," *Acta Bot. Yunnanica*, vol. 18, no. 2, pp. 226–228, 1996.
- [44] M. Node, X. Hao, J. Zhou, S. Chen, T. Taga, Y. Miwa, and K. Fuji, "Spiramines A, B, C, and D, new diterpene alkaloids from *Spiraea japonica* var. *acuminata* Franch.," *Heterocycles*, vol. 30, no. 1, Spec. Issue, pp. 635–643, 1990.
- [45] C. Yan, L. Huang, H.-C. H. Liu, D.-Z. Chen, H.-C. H. Liu, X.-H. Li, Y. Zhang, M.-Y. Geng, Q. Chen, and X.-J. Hao, "Spiramine derivatives induce apoptosis of Bax^{-/-}/Bak^{-/-} cell and cancer cells," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 24, no. 8, pp. 1884–1888, Apr. 2014.
- [46] X. Hao, J. Zhou, S. Chen, K. Fuji, and M. Node, "New diterpene alkaloids from *Spiraea*

- japonica var. acuminata.," *Yunnan Zhiwu Yanjiu*, vol. 13, no. 4, pp. 452–454, 1991.
- [47] X. Hao, M. Node, J. Zhou, S. Chen, and K. Fuji, "The chemical structures of spiramine H, I and O.," *Acta Bot. Yunnanica*, vol. 16, no. 3, pp. 301–304, 1994.
- [48] X. Hao, J. Zhou, K. Fuji, and M. Node, "The chemical structures of spiramine J, K, L and M," *Acta Bot. Yunnanica*, vol. 14, no. 3, pp. 314–318, 1992.
- [49] Z. Shen, L. Zhang, P. Chen, and L. Duan, "Spiramine N-6, a novel agent of antiplatelet and anti-platelet-neutrophil interactions.," *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*, vol. 16, no. 2, pp. 138–142, 2004.
- [50] L. Li, J. Nie, Z. Shen, W. Wu, Z. Chen, and X. Hao, "Neuroprotective Effects in Gerbils of Spiramine T from *Spiraea japonica* var. *acuta*," *Planta Med.*, vol. 67, no. 2, pp. 142–145, 2001.
- [51] L. Li, Y. Shen, X. Yang, W. Wu, B. Wang, Z.-H. Chen, and X.-J. Hao, "Effects of spiramine T on antioxidant enzymatic activities and nitric oxide production in cerebral ischemia–reperfusion gerbils," *Brain Res.*, vol. 944, no. 1–2, pp. 205–209, Jul. 2002.
- [52] X. Hao, J. Nie, H. Chen, Z. Zhen, Z. Shen, and L. Li, "Preparation and application of atisine type diterpene alkaloid from *Spiraea japonica*," 08-Apr-1998.
- [53] B.-G. Wang, X. Hong, G.-Y. Zuo, and X.-J. Hao, "Structural revision of four spiramine diterpenoid alkaloids from the roots of *Spiraea japonica*," *J. Asian Nat. Prod. Res.*, vol. 2, no. 4, pp. 271–281, 2000.
- [54] B.-G. B. Wang, B. Liu, G.-Y. G. Zuo, H. Xiaojiang, and X. Hao, "A new minor diterpenoid alkaloid from *Spiraea japonica* var. *acuta*," *Acta Metall. Sin.*, vol. 22, no. 2, pp. 209–213, 2000.
- [55] S. Fang, L. Xiao-tian, Y. Dequan, X. Chang-fu, and J. Clardy, "The structures of spirasine V and spirasine VI," *Tetrahedron Lett.*, vol. 27, no. 3, pp. 275–278, Jan. 1986.
- [56] F. Sun, D. Yu, and X. Liang, "Structure of spirasine III.," *Bopuxue Zazhi*, vol. 7, no. 4, pp. 415–422, 1990.
- [57] F. Sun, X. T. Liang, and D. Q. Yu, "The Structures of Four New Diterpene Alkaloids: Spirasines XII-XV," *J. Nat. Prod.*, vol. 51, no. 1, pp. 50–53, Jan. 1988.
- [58] V. D. Gorbunov, A. I. Ban'kovskii, M. E. Perel'son, and O. S. Chizhov, "Structure of spirein.," *Khimiya Prir. Soedin.*, vol. 5, no. 5, p. 454, 1969.

- [59] K. D. Jin, "Studies on the Constituents of *Spiraea Koreana* Nakai," *The Daehan Hwhak Hwoejee*, vol. 11, no. 3, pp. 111–116, 1967.
- [60] T.-S. Wu, C.-C. Hwang, P.-C. Kuo, T.-H. Kuo, A. G. Damu, and C.-R. Su, "New Neolignans from *Spiraea formosana*," *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, vol. 52, no. 10, pp. 1227–1230, 2004.
- [61] S. W. Pelletier, B. S. Joshi, and H. K. Desai, "Techniques for isolation of alkaloids," in *Advances in Medicinal Plant Research*, A. J. Vlietnick and R. A. Dommissie, Eds. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1985, pp. 153–195.
- [62] A. W. Bauer, W. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck, "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 45, no. 4, pp. 493–6, Apr. 1966.
- [63] A. Ványolós, O. Orbán-Gyapai, and J. Hohmann, "Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Hungarian Wild-Growing Mushrooms," *Phyther. Res.*, vol. 28, no. 8, pp. 1204–1210, Aug. 2014.
- [64] A.-A. M. Habib, "False-positive alkaloid reactions," *J. Pharm. Sci.*, vol. 69, no. 1, pp. 37–43, Jan. 1980.
- [65] Y. Nakamura, K. Yomura, T. Kammoto, M. Ishimatsu, Y. Kikuchi, K. Niitsu, S. Terabayashi, S. Takeda, H. Sasaki, K. Arimoto, M. Okada, S. Sekita, M. Satake, and Y. Goda, "Physicochemical quality evaluation of natural compounds isolated from crude drugs," *J. Nat. Med.*, vol. 60, no. 4, pp. 285–294, Oct. 2006.