



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar

Tudományos Diákköri dolgozat

***Ginkgo biloba* kivonatok vér-agy gát specifikus permeabilitási profiljának vizsgálata**

PAMPA-BBB/LC-MS segítségével



Készítette: Rendes Kata

Témavezető: Dr. Balogh György Tibor,- Richter Gedeon Nyrt. Szintézistámogató
Laboratórium, osztályvezető, c. egyetemi docens

Konzulens: Könczöl Árpád,- Richter Gedeon Nyrt. Szintézistámogató Laboratórium,
kutató-fejlesztő

2013.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Balogh György Tibornak a lehetőségért, hogy a Richter Gedeon Nyrt. Szintézistámogató Laboratóriumában dolgozhattam. Köszönöm neki és Könczöl Árpádnak a sok segítséget és türelmet. Köszönöm a támogatást, tanácsokat és a szakmai útmutatást, mellyel munkámat, tanulmányaimat segítették. Köszönöm témavezetőimnek és az osztályon dolgozóknak, hogy munkájukkal hozzájárultak ahhoz, hogy hasznos szakmai tapasztalatot szerezhsek.

Szeretném megköszönni Kéry Ágnes és Szőke Éva professzor asszonyoknak a méréseinkhez használt mintákat.

Köszönöm az osztály többi dolgozójának is, hogy mindig fordulhattam hozzájuk kérdéseimmel és készségesen segítettek nekem.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
1.1. Előzmények.....	4
1.2. Vér-agy gáton való felszívódás modellezése: a PAMPA-BBB rendszer	5
1.3. <i>Ginkgo biloba</i>	7
1.3.1. Kémiai összetétel és minősítő analitika.....	7
1.3.2. Élettani hatás.....	9
2. Célkitűzés.....	12
3. Anyagok és módszerek	13
3.1 Felhasznált anyagok	13
3.2. Módszerek.....	15
3.2.1. PAMPA-BBB	15
3.2.2. HPLC-QQQ MS.....	16
4. Vizsgálatok, eredmények	18
4.1. <i>Ginkgo biloba</i> kivonatok permeabilitási profilja	18
4.2. Ginkgotoxin azonosítása, mennyiségi meghatározása	25
4.3. <i>Ginkgo biloba</i> növényi készítmények összehasonlítása	26
5. Összefoglalás.....	29
6. Irodalomjegyzék	30

1. Bevezetés

1.1. Előzmények

A hagyományos gyógyászat egyik legfontosabb eszköze különböző növényi kivonatok alkalmazása. Napjaink gyógyszerkutatásában az analitikai technikák nagyléptékű fejlődésének köszönhetően az eddig ismert hatóanyag keresési módszerek mellett, újra előtérbe kerültek a növényi hatóanyagokat vizsgáló irányzatok. Az egyik ilyen kurrens terület a központi idegrendszerre (CNS) hatást kifejtő vegyületek kutatása, amely a már ismert, CNS-hatású növényi extraktumok komponenseinek vizsgálatára is kiterjed [1].

Világszerte az egyik legnagyobb forgalmú, CNS-kórképekben alkalmazott gyógynövény-készítmény a *Ginkgo biloba* (páfrányfenyő, **(1. ábra)**) levelének kivonat [2].



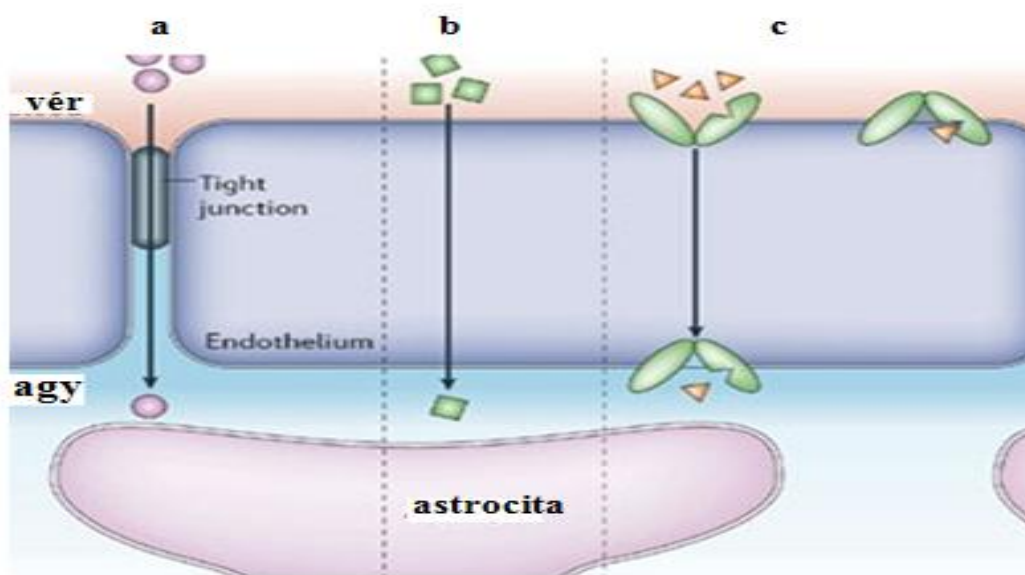
A kivonat CNS-hatásért felelős komponenseinek azonosítása, hatásmechanizmusuk feltérképezése és vér-agy gáton (blood-brain barrier (BBB)) való átjutásuk igazolása azonban máig nem teljesen megoldott. Ennek elsődleges oka, hogy a *G. biloba* kivonatok nehezen analizálható, rendkívül komplex anyagkeverékek [3]. A *G. biloba* leveléből készített

1. ábra *Ginkgo biloba* levele
standard kivonat (EGb 761) fitokémiailag hosszú ideje és alaposan vizsgált növényi extraktum, de komponenseinek egzakt elemzése még számtalan analitikai kihívást tartogat (megfelelő elválasztás technikai módszer fejlesztése, komponensek detektálhatósága). Még a széles körben alkalmazott standard kivonat teljes felbontása sem megoldott napjainkban (az eddigi legeredményesebb felbontás során 77 db komponenst detektáltak és azonosítottak) [4-5]. Az EGb 761 hatását klinikai vizsgálatok során nem sikerült szignifikáns eredménnyel alátámasztani, illetve komplett farmakokinetikai profilt leírni. A biológiailag aktívnak vélt terpén és flavonoid komponensek felszívódása és penetrációja még máig élénk kutatás tárgyát képezi [6-8].

Fentiek tükrében, tudományos diákköri munkám során célul tűztük ki a *G. biloba* összetételéről, CNS-hatásért felelős komponenseiről alkotott kép pontosítását. Törekedtünk egy átfogóbb vér-agy gát specifikus permeabilitási profil megadására a standard kivonat és különböző *G. biloba* növényi készítmények jellemzésén, összehasonlításán keresztül.

1.2. A vér-agy gáton való felszívódás modellezése: a PAMPA-BBB rendszer

A vér-agy gát (BBB) a központi idegrendszer védelmét szolgáló összetett sejtszisztéma, mely a legtöbb exogén molekula bejutását hatékonyan meggátolja az agyba. A molekulák transzportját illetően a BBB-t alkotó endotél (hám) sejteknek különösen fontos a szerepe (2. ábra). Felépítésüket tekintve eltérnek a szervezet többi hámsejtjétől (pl.: bélhámsejtektől). Membránszisztémájuk sokkal szorosabb illeszkedésű (tight junction), speciálisan kapcsolódnak egymással, kevesebb membránszűrőt tartalmaznak, ezáltal egy szigorúbb kémiai és mechanikai szűrőszisztémát hoznak létre. A kis méretű, lipofil molekulák (CO_2 , O_2) átdiffundálnak az endotél sejtek között. A sejtek számára fontos glükóz, aminosavak, nukleozidok transzportfehérjéken keresztül jutnak a központi idegrendszerbe [9-10]. A legtöbb exogén molekula, illetve gyógyszer hatóanyag azonban passzív diffúzió útján jut át a vér-agy gát endotél sejtjein [9-12].



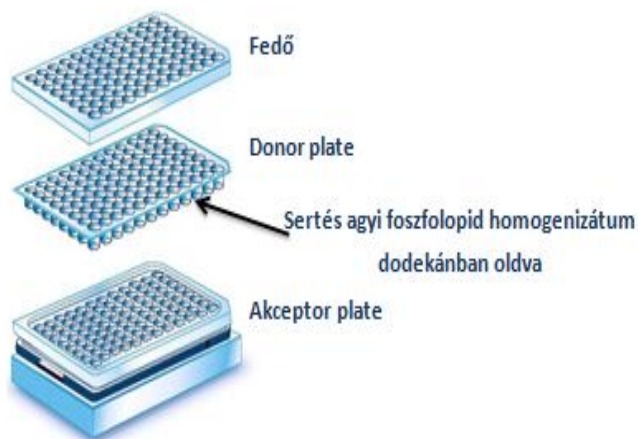
2. ábra A vér-agy gát endotél sejtjein keresztül lejátszódó transzportfolyamatok. a) paracelluláris transzport. b) passzív transzcelluláris transzport (CNS-hatóanyagok többsége). c) transzportfehérjével történő aktív transzport [13].

A vér-agy gáton keresztül megvalósuló transzportfolyamatokat *in silico*, *in vitro* és *in vivo* modellekkel vizsgálják [1; 9]. Az *in silico* technikák prediktív ereje csekély, az eredményes *in vivo* BBB specifikus modellek alacsony áteresztőképességük és magas költségvonzatuk miatt komplex mintákra, mint a növényi kivonatok nem praktikusak [1].

Ezek mellett kompromisszumos megoldást jelent a Kansy által kifejlesztett *in vitro*, nagy áteresztőképességű analitikai tesztrendszer a PAMPA (Parallel Artificial Membrane

Permeability Assay) modell, ami a vizsgált vegyületek passzív felszívódási útját képes modellezi mesterséges lipid rétegen (membránfehérjék nélkül) keresztül történő diffúzió vizsgálatával. A PAMPA rendszer előnye, hogy a mérések jól reprodukálhatóak, megbízhatóak, viszonylag alacsony költségűek és a modell több paramétere is könnyen változtatható [1; 11-12; 14]. A PAMPA-BBB (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay for Blood-Brain Barrier) vér-agy gát specifikus, effektív permeabilitás mérésére szolgáló továbbfejlesztett modell, amely sokkomponensű minták esetén is megőrzi szelektivitását, így az egyik legfontosabb vizsgálati módszer a CNS kutatás korai fázisában [1].

A modell egy 96 lyukú szendvics plate-rendszerből áll (**3. ábra**). A felső szűrővel ellátott plate-re kerül a vizsgálni kívánt vegyület vagy, kivonat dimetil-szulfoxid oldata vizes pufferrel hígítva (pH= 7,4), ez az ún. donor oldal, ami megfelel az agyi kapillárisok belépési oldalának. Az alsó plate-re, ún. fogadó oldalra az intracelluláris (idegsejtek plazmája) közegnek megfelelő 7,4-es pH-jú puffert tesznek. A két plate-et szűrőmembránra rétegzett, valamilyen inert szerves oldószerben (pl. *n*-dodekánban) feloldott sertés agyi foszfolipid homogenizátum (BBB specifikusság) választja el [12; 14].

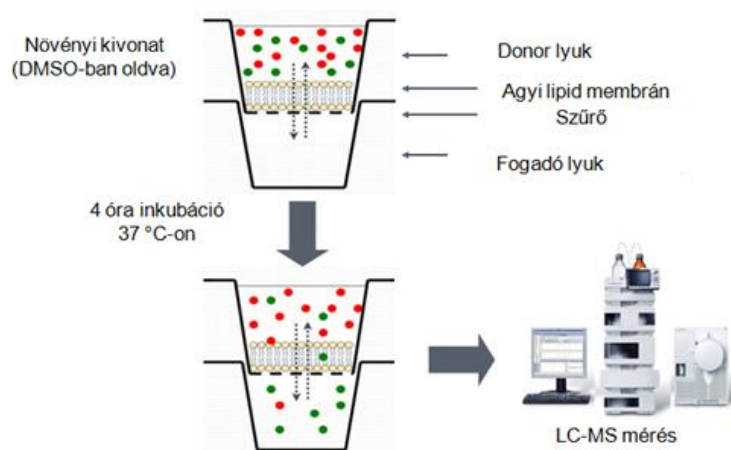


3. ábra A PAMPA-BBB rendszer felépítése [15].

A plate-ek összeillesztése és lefedése után inkubáljuk a rendszert. Ezalatt játszódik le a koncentráció gradiensnek megfelelő passzív diffúzió. Szétszedve a plate-eket a fogadó, illetve a donor oldalon lévő komponensek koncentrációját különböző analitikai módszerrel (UV spektrofotométer, LC/DAD/MS) mérve számítható ki a vegyület penetrációs képességét, sebességét jellemző effektív permeabilitási érték ($\log P_e$) [12; 14].

A $\log P_e$ értékkel jellemezhető egy adott molekula vér-agy gáton passzív diffúzióval megvalósuló transzportjának mértéke [1; 14]. Azok a molekulák, melyek $\log P_e$ értéke nagyobb -6,0-nál jobb hatékonysággal képesek átjutni a vér-agy gáton (BBB+), a -6,0-nál kisebb értékeknél ez a valószínűség csekély (BBB-) [1; 12].

A PAMPA-BBB rendszer HPLC-MS technikával kapcsolva a donor, illetve fogadó oldalon kialakuló anyagkoncentráció meghatározására, összetett minták esetén, mint a növényi kivonatok, a komponensek azonosítására is alkalmassá tehető (4. ábra) [1].



4. ábra PAMPA-BBB/HPLC-MS módszerek összekapcsolásának működési sémája [1]

A módszer lényege, hogy a PAMPA modellrendszer alapú szűrés szelektívvé és érzékenyvé teszi a komponensek detektálhatóságát. A donor oldalon és a fogadó oldalon lévő komponenseket, külön HPLC/MS módszerek fejlesztésével érzékenyen lehet detektálni. Így a PAMPA nem csak egy membránspecifikus (BBB) elválasztást, hanem egy az összetett minták esetén detektálást segítő elválasztást, szelektálást is biztosít.

1.3. *Ginkgo biloba*

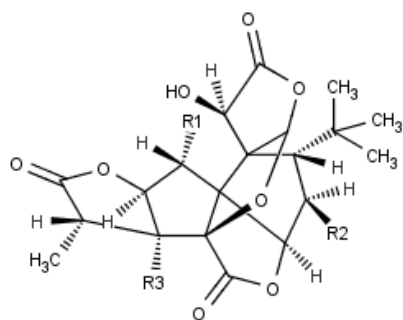
1.3.1 Kémiai összetétel

A *G. biloba* a *Ginkgoaceae* család egyetlen tagja. „Élő kővület”, őse a földtörténeti Jura korszakban jelent meg 170 millió évvel ezelőtt. Ma már nincsenek közeli, élő rokonai. Tradicionálisan Kínában, Japánban gyógyszerként (szív- és tüdő panaszokra) és táplálékként is hasznosították (gyökerét, magját, levelét) [2, 16-17].

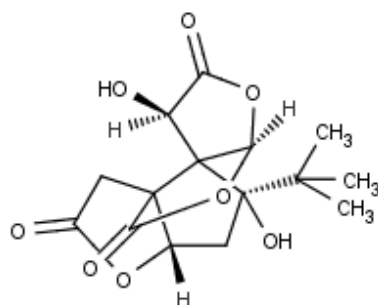
A levél komponensei a terpének (monoterpének; diterpének: ginkgolid A, B, C, J és szeszkviterpén: bilobalid), szteroidok, fitoszterolok (sztigmaszterol, kampeszterol),

karotinoidok, nagy mólsúlyú polimerek, flavonol glikozidok és flavonoid aglikonok (quercetin, kaempferol, apigenin, luteolin, myricetin, isorhamnetin), biflavonok (bilobetin, ginkgetin, isoginkgetin, sciadopitysin), proantocianidinek (prodelfinidin, procianidin), alkilfenolok (ginkgol és kardol típusú vegyületek, ginkgolsavak), hosszú láncú zsírsavak, N-tartalmú komponensek (4-O-metilpiridoxin, 6-hidroxi-kinurénsav), karbonsav származékok, szervesetlen savak és egyéb szervesetlen komponensek (5. ábra) [18-20].

Terpének

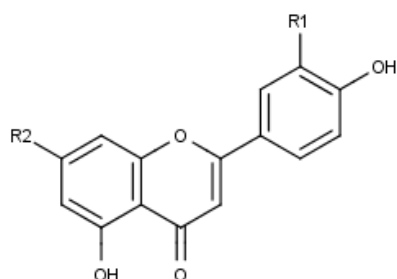


R1	R2	R3	
H	H	OH	ginkgolid A
OH	H	OH	ginkgolid B
OH	OH	OH	ginkgolid C
H	OH	OH	ginkgolid J

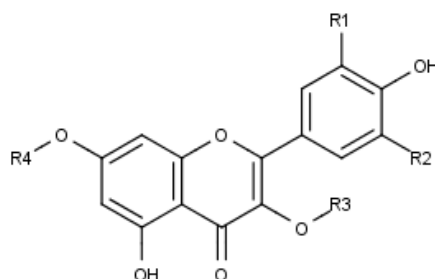


bilobalid

Flavonoidok

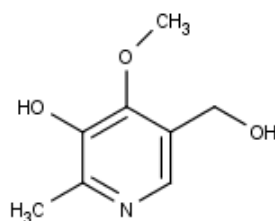


R1	R2	
H	OH	apigenin



R1	R2	R3	R4	
H	H	H	H	kaempferol
OH	H	H	H	quercetin
OCH3	H	H	H	isorhamnetin

Nitrogén tartalmú komponens



ginkgotoxin

5. ábra *G. biloba* fontosabb komponensei [18-20].

A *G. biloba* a nyugati világba 1965 körül Dr. Willmar Swabe és német cége által jutott el Tebonin néven. Swabe egy francia vállalattal, a Beaufour- Ipsen-nel együtt standardizálta a *G. biloba* kivonatot, ami EGb 761 néven került klinikai kipróbálásra forgalomba. Az EGb 761 szárított, zöld levelekből készül többlépéses extrakcióval (aceton/víz eleggyel). A standard kivonatot 6% terpén (3,1 % ginkgolidok, 2,9 % bilobalid) 24-27 m/m% flavonoid tartalomra optimalizálják [2]. Összetételét az alábbi táblázat tartalmazza [18].

1.táblázat A standard kivonat (EGb 761) fitokémiai összetétele [18]

EGb 761 fitokémiai összetétele	
Komponens osztály	%
Flavonol glikozidok	24
Terpén trilaktonok	6
Egyéb, nem flavonol glikozidok	20
Karbonsav származékok	13
Katekinek	2
Proantocianidinek	7
Nagyobb molsúlyú komponensek (polimerek)	4
Szervetlen	5
Víz, oldószer maradvány	3
Alkilfenolok	< 5 ppm
Egyéb változó	3
Ismeretlen	13

A *G. biloba* extraktum gyógyszerkönyvi minősítése során a standardizálásnál meghatározott 22-27 m/m% közti flavonoid mennyiségre, ezen belül is a flavonoidok/ flavonoid glikozidok arányára figyelnek. Vizsgálják még a terpének mennyiségét és a ginkolsavak megengedett koncentrációját (5ppm). Az előírások a *G. biloba* kivonatot tartalmazó gyógynövényi készítményekre is kiterjednek [21-22].

1.3.2. Élettani hatás

Terápiás felhasználása elsődlegesen központi idegrendszeri kórképekben történik. Memória zavarok, demencia, Alzheimer-kór esetén, illetve antioxidánsként, vérkeringés javításának céljából alkalmazzák [2, 16-17]. Gátolja a vérlemezkék aggregációját, csökkenti a kapillárisok permeabilitását, ezáltal fokozhatja a vérkeringést. Gyulladások, asztma, migrén kezelésére is alkalmazzák [16-17].

A CNS-hatást az unikális terpén és a flavonoid vegyület családoknak tulajdonítják, noha eddig még nem közöltek szignifikáns klinikai eredményt (Alzheimer betegek tüneteinek változását vizsgálva), illetve nem sikerült komplett farmakokinetikai profilt sem leírni. A biológiailag aktívnek vélt komponensek felszívódása és penetrációja mindmáig kutatás tárgyát képezi [6-8].

In vitro, sejtes modellekkel, így: Caco-2 (felszívódás a bélhámsejtekben) és MDR1-MDCK (agyi penetráció) rendszerekkel is, vizsgálták az EGb 761 standard kivonatból izolált ginkgolidok (A, B, C) és a bilobalid transzportját. A koncentrációk meghatározása HPLC-MS technikával történt. A bélből való felszívódást modellezésénél arra a következtetésre jutottak, hogy a transzportfolyamatok pH függőek. Mindkét modell estén a bilobalid bizonyult a legjobb permeabilitású vegyületnek. Fontos azonban megjegyezni, hogy jelentős efflux transzportot tapasztaltak a komponensek penetrációs mechanizmusának feltérképezése során [6].

Két *in vivo* farmakokinetikai vizsgálat körülményeit, eredményeit a **2. táblázat** tartalmazza. Az egyik vizsgálat során (Ude és mtsi, 2011) a terpének koncentrációját HPLC-(APCI)-MS módszerrel, a másik esetben (Rangel-Ordóñez és mtsi, 2010) a flavonoidok koncentrációját HPLC-FD (fluoreszcens detektálás) módszerrel határozták meg patkányokban [7-8]. A vizsgálatok során azt tapasztalták, hogy jobb a felszívódása a standard kivonatnak, mint az izolált komponensekből összeállított keveréknek [16]. Az agyban alacsonyabb koncentrációkat találtak, mint a plazmában [7-8].

2.táblázat *In vivo* farmakokinetikai vizsgálat körülményei, eredményei [7-8]

Forrás	EGb 761 adagolása patkány esetén (mg/kg)	Adagolás módja	Vizsgált komponens	Plazma szintek (ng/ml)	Agyi szintek (ng/g fehérje az agyban)
Ude és mtsi, 2011 [7]	600	orális	Bilobalid	2860	98
			Ginkgolid A	1007	55
			Ginkgolid B	388	40
			Ginkgolid C	-	-
Rangel- Ordóñez és mtsi, 2010 [8]	600	orális	Qercetin	176	-
			Kaepmferol	341	291
			Isorhamnetin	183	161

-: nem volt detektálható

Klinikai vizsgálatokban EGb 761 orális adagolása esetén 120-240 mg/nap dózis alkalmazásakor tapasztaltak javulást a kognitív tünetekben [23]. A legtöbb vizsgálat során azonban a 240 mg/nap dózis bizonyult a leghatásosabbnak [2; 7; 16]. Időszakosan jelentkező panaszok esetén 120 mg/nap illetve 160 mg/nap dózis is elegendőnek bizonyult. Depresszió, vérkeringési zavarok, Alzheimer-kór korai fázisában 240 mg/nap esetén tapasztaltak pozitív hatásokat [16].

A *G. biloba*ban toxikus komponensek is találhatóak. A ginkolsavak allergiás reakciót váltanak ki a kaukázusi rassznál, ezért mennyiségüket a standardizálás során maximum 5 ppm-ben maximalizálják [16; 23].

Nagyobb mennyiségű *G. biloba* mag elfogyasztása kapcsán több esetben ételmérgezésről számoltak be, melyért a ginkgotoxin (B6-vitamin antagonist) a felelős komponens [2; 23-26]. A mintegy 70 mérgezéses eset 27 %-a volt letális, főként a második világháborút követő időszakban, Japánban (1930 és 1996 között), amikor az élelem nem volt elegendő [25]. A ginkgotoxin epilepsziához hasonló tüneteket okoz, így izomgörcsöket, eszméletvesztést, hányást, tudatzavaros állapot kialakulását írtál le. Állatkísérletek során izomgörcsöket tudtak kiváltani patkányokban 400-600 mg/kg ginkgotoxin adagolása esetén. Az LD₅₀ érték nyulakon végzett kísérletben 30 mg/kg-nak adódott [25]. Feltehetően a ginkgotoxin átjut a vér-agy gáton és GABA inhibitorként működve fejti ki hatását, azonban farmakokinetikai sajátosságai feltáratlanok, agyi penetrációját nem igazolták kísérletesen [24-25].

A ginkgotoxin maximális koncentrációját mind a levélben (7 µg/levél), mind a magban (85 µg/mag) augusztus elejére éri el. A *G. biloba* levelének kivonatát (EGb 761) tartalmazó készítmények (kapszulák, teák) toxin tartalma, a vegyület jó vízoldhatósága és meglehetősen stabil volta miatt jelentős veszélyeket rejt magában [25]. Két vizsgálat során határoztak meg ginkgotoxin koncentrációkat 3-3 *G. biloba* standard kivonatot tartalmazó készítményben [25-26]. A kapszulák toxin tartalma 11.4-58.62 µg/g-nak [25] és 17-64 µg/g-nak [26] adódott.

2. Célkitűzés

Tudományos diákköri munkám során célul tűztük ki a fent bemutatott komplex növényi kivonatként (EGb 761), CNS-kórképekben alkalmazott gyógynövény-készítményként forgalomba kerülő *G. biloba* hatóanyagainak azonosítását, illetve vér-agy gáton való átjutásuk jellemzését, igazolását.

A komponensek felszívódása keverékként hatásosabbnak bizonyult, mint izolált formában [16], ezért méréseink során *G. biloba* kivonatokat (standard kivonatot, levelekből készített metanollal, illetve kloroformmal extrahált kivonatot) kívántuk összehasonlítani PAMPA-BBB/ HPLC-QQQ-MS kapcsolt analitika rendszer segítségével.

Több esetben számoltak be egyéb gyógyszerek és *G. biloba* kivonatot tartalmazó készítmény együttes alkalmazása esetén mellékhatásokról is [16], ezért vizsgálatainkkal törekedtünk egy átfogóbb vér-agy gát specifikus permeabilitási profil, illetve a *G. biloba* összetételéről alkotott teljesebb kép megadására.

Az utóbbi években nagymértékben megnőtt a *G. biloba* standard kivonatát tartalmazó különböző növényi gyógyszerek, illetőleg étrend-kiegészítő készítmények eladása, fogyasztása [27]. Ezért a hazai patikákban kapható termékeket is kívántuk jellemezni, különös tekintettel a levélben, és így a standard kivonatban is megtalálható [28] neurotoxikus hatású ginkgotoxin (4-O-metilpiridoxin) jelenlétére.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Felhasznált anyagok

Kivonatok: száraz, sárga *G. biloba* levelekből metanollal extrahált kivonat- 5,41 g
száraz, sárga *G. biloba* levelekből kloroformmal extrahált kivonat- 12,8 g
standard kivonat- EGb 761- (Gy.sz.: 11/00590)- 40g
„A” kapszula- 3.767 g
„B” kapszula- 5.68 g
„C” kapszula- 4.527 g

A száraz, sárga levelekből (2012. szeptemberében begyűjtött) a kivonatok a következő recept alapján készültek. Dörzsmozsárban elporított levelek (57.58 g) + 300 ml kloroform, 30 perc kevertetés, szűrőpapíron leszűrtük majd megismételtük a műveletet. A nyers kivonatot bepároltuk (40 °C, 4 óra). A kloroformos extrahálást követően a megmaradt száraz anyagra 150 ml metanolt öntöttünk. 30 perc kevertetés után szűrőpapíron leszűrtük, majd megismételtük a műveletet. A nyers kivonatot bepároltuk (40 °C, 4 óra).

A kivonatokból 50 mg/ml-es DMSO-ban (dimetil-szulfoxidban) oldott törzsoldatokat készítettünk, a felhasznált anyagmennyiségeket az alábbi táblázat tartalmazza.

3. táblázat *G. biloba* kivonatok DMSO törzsoldatai

Kivonat	Felhasznált kivonat (mg)	DMSO (μl)
EGb 761	47.11	942
Metanolos levél	43.45	869
Kloroformos levél	42.35	847
„A” kapszula	49.26	986
„B” kapszula	49.81	997
„C” kapszula	48.24	965

A törzsoldatokat 0.2 μm pórusméretű PTFI (Millipore) fecskendőszűrőn keresztül leszűrtük.

A komponensek azonosításához használt standardok a PhytoLab-tól kerültek beszerzésre:

ginkgotoxin sósav sója- (Gy.sz.: 5459)- 10.04 mg
isorhamnetin- (Gy.sz.: 6330)- 25.30 mg
luteolin- (Gy.sz.: 5846)- 25.29 mg
kaempferol- (Gy.sz.: 6327)- 25.30 mg

A referenciaként, illetve az azonosításhoz használt standardokból 1 mg/ml-es DMSO-ban, a ginkgotoxin esetén vízben oldott törzsoldatokat készítettünk az alábbi táblázat szerint.

4. táblázat Standard törzsoldatok

Standard	Felhasznál mennyiség (mg)	DMSO (μl)
isorhamnetin	1.0	1000
luteolin	0.99	990
kaempferol	1.15	1150
ginkgotoxin-sósav sója	1.31	1310*

*Víz (μl)

A ginkgotoxin kivonatokban kialakult koncentrációjának meghatározásához kalibrációt végeztünk a vásárolt standarddal. A kalibrációhoz hígítási sort készítettünk az 1 mg/ml-es törzsoldatból kiindulva, tizedelő és ötödölő pontokkal váltakozva. A kalibrációhoz használt oldatok koncentrációja rendre: 500 μg/ml, 50 μg/ml, 10 μg/ml, 1 μg/ml, 0.2 μg/ml, 0.02 μg/ml.

A kivonatok, törzsoldatok elkészítéshez használt oldószerek: a metanol, kloroform, DMSO, víz a Sigma-Aldrich Kft.-től kerültek beszerzésre.

A PAMPA során használt n-dodekán, koleszterin a Merck Kft.-től származott. A felhasznált 7,4-es pH-jú puffer összetétele: 1 l ioncserélt víz + 1 tasak izotóniásan kiegyensúlyozott foszfát puffer (PBS) só keverék (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4; Sigma Aldrich Kft., 028K8214). A sertés agyból izolált poláris lipidfrakciót (PBL, polar brain lipide) az Avanti Polar Lipid Inc.-től vásároltuk.

A HPLC-QQQ MS készülékben minden eluensben használt oldószer (acetonitril) HPLC-tisztaságú volt. A felhasznált vizet Millipore MilliQ[®] víztisztító berendezésből nyertük, (a víz ellenállása 18 mΩ volt).

3.2. Módszerek

3.2.1. PAMPA-BBB

A PAMPA vizsgálatokhoz 96-cellás polipropilén mérőtálcákat (angolszász elnevezése plate (Agilent Technologies)), 96-cellás polikarbonát alapú, szűrő donor-tálcákat (MultiscreenTM-IP, MAIPN4510, pórusméret 0.45µm; Millipore) és 96-cellás teflon fogadó tálcát (Multiscreen Acceptor Plate, MSSACCEPTOR; Millipore) használtunk.

Kiindulási oldatokként hígítást végeztünk a törzsoldatokból. 180 µl DMSO-hoz 20-20 µl-t pipettáztunk a törzsoldatokból. A donor oldal előkészítésénél 180 µl 7,4-es pH-jú PBS pufferhez 20-20 µl-t adtunk a törzsoldatokból, majd az így előállt oldatokból 150 µl került át a donor plate-re. A fogadó plate celláit 300 µl 7,4-es pH-jú PBS pufferrel töltöttük fel. A folyadékok kimérésére Eppendorf többcsatornás automata pipettákat, pipettahegyeket használtunk. Minden minta esetén 3-3 párhuzamos mérést végeztünk. A plate-ek összeillesztése után nedvesített papírtörülőt és fedőt tettünk a donor plate-re, hogy megakadályozzuk a párolgást az inkubáció alatt.

Az inkubáció mérőtálca-rázó inkubátorban (Heidolph Titramax 1000) zajlott 4 órán keresztül, 37 °C-on.

Az inkubáció után szétszedtük a plate-eket. Mindkét oldalról (fogadó, donor) a mérni kívánt oldatokat átpipettáztuk egy 96-cellás polipropilén mérőtálcára. A donor oldalhoz 50-50 µl DMSO-t adtunk, hogy biztosítsuk a kivonatok oldatstabilitását.

A tálcákban kialakuló anyagkoncentráció meghatározására HPLC-QQQ MS technikát használtunk.

Az effektív permeabilitási érték kiszámolásához az alábbi képletet használtuk:

$$P_e = \frac{-2,303}{A \cdot (t - \tau_{ss})} \cdot \frac{(V_A \cdot V_D)}{(V_A + V_D)} \cdot \lg \left[1 - \left(\frac{V_A + V_D}{(1-R) \cdot V_D} \right) \cdot \left(\frac{C_D(t)}{C_D(0)} \right) \right]; \quad \left[\frac{cm}{s} \right] \quad (3.2.1.1.)$$

$$R = 1 - \frac{C_D(t)}{C_D(0)} - \frac{V_A \cdot C_A(t)}{V_D \cdot C_D(0)} \quad (3.2.1.2.)$$

Ahol P_e az effektív permeabilitás (cm/s), A : szűrőfelület (0.3 cm²), V_a : fogadó oldalon lévő térfogat (0.15 cm³), V_d : donor oldalon lévő térfogat (0.15 cm³), t : inkubációs idő (s), τ_{ss} : az az idő, amíg eléri a rendszer a steady-state (egyensúlyi) állapotot, R : membránretenció,

$C_d(t)$: t időpontban a komponens donor oldalon lévő koncentrációja, $C_d(0)$: 0 időpontban a komponens donor oldalon lévő koncentrációja, $C_A(t)$: t időpontban a komponens fogadó oldalon lévő koncentrációja, $C_A(0)$: 0 időpontban a komponens fogadó oldalon lévő koncentrációja [29].

3.2.2. HPLC-QQQ MS

A kísérleteinket egy Agilent 1200 folyadékkromatográfiás készüléken végeztük összekapcsolva egy 6410 QQQ-MS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) vákuumos gázmentesítővel, bináris pumpával, autosamplerrel, oszlop-termosztáttal, diódasoros detektorral felszerelt készülékkel. A mérések 40 °C-on, Ascentis Express C18 kolonnán (5 cm x 3 mm, 2.7 μ m) zajlottak. A mozgó fázis térfogatárama 1.1 ml/perc volt. Az A eluens 100% víz, a B eluens acetonitril:víz elegy (95:5. v/v %) volt. A gradiens programok kivonatonként optimalizáltuk, a beállításokat az alábbi táblázat (5. táblázat) tartalmazza.

Az injektált térfogat minden esetben a PAMPA szűrést követő mérésnél a donor és a fogadó oldal esetén és a ginkgotoxin kalibrációs mérésénél 8 μ l, a kiindulási oldat esetén 4 μ l volt. Az injektálások között 1,8 perces ekvilibrációs idő lett beállítva. Az UV-VIS spektrumokat 190 és 400 nm között vettük fel. A regisztrált kromatográfiás profilokat 220, 240, 280, 290 és 300 nm-en rögzítettük.

5.táblázat Gradiens programok

Minta	Idő (min)	B eluens (%)
•EGb 761, •metanolos levél, •ginkgotoxin kalibráció*	0	0
	2	0
	19	30
	20	55
	20,01	0
•kloroformos levél	0	25
	9	100
	12	100
	12,01	25

*a gradiens programot 3,01 percig futattuk

QQQ-MS üzemi paraméterei a PAMPA szűrést követő mérések esetén a következők voltak: ESI pozitív ionizáció, szkennelési üzemmód, a szárító gáz hőmérséklete 350 °C, a nitrogén áramlási sebessége 13 l/perc.

QQQ-MS üzemi paraméterei a Neutral Loss mérés során: ESI pozitív ionizáció, a szárító gáz hőmérséklete 350 °C, a nitrogén áramlási sebessége 13 l/perc., neutral loss: 146 (ramnóz), 162 (glükóz), 306 (diglikozid: glükóz+ramnóz), 454 (triglikozid: ramnóz+ramnóz+glükóz). A scannelés módja MS szkennelés, illetve MS1-MS2 szkennelési rendre: 400-1000, 400-1000, 500-1000, 700-1000. A fragmentor feszültség 135 V, ütközési energia 8 V.

Fragmentálás során alkalmazott QQQ-MS üzemi paraméterei: ESI pozitív ionizáció, a szárító gáz hőmérséklete 350 °C, a nitrogén áramlási sebessége 13 l/perc. MS1 szkennelési üzemmód, MS2 product ion üzemmód. A fragmentor feszültség 135 V, az ütközési energia vegyület csoportonként (kis molekulájú komponensek, terpének, flavonoidok/flavonoid glikozidok és a biflavonok) rendre: 10 V, 15 V, 30 V, 45V.

4. Vizsgálatok, eredmények

4.1. *Ginkgo biloba* kivonatok permeabilitási profilja

A *G. biloba* kivonatok komplex keverékek. Elemzésük a vegyületsaládok számossága, a komponensek eltérő koncentrációja miatt nehéz analitikai feladat [3]. Ahhoz, hogy minél több komponenst tudjunk detektálni a mintákban a PAMPA-BBB/HPLC-QQQ MS kapcsolt analitikai tesztrendszerrel végzett mérések során, tömény törzsoldatokat (50 mg/ml) kellett készítenünk.

A gradiens programok végső beállítása az irodalmi adatok alapján feldolgozott mérésekből, a komponensek fizikai kémiai tulajdonságaiból adódtak [4-5; 18-19]. A megfelelő elválasztás, felbontás eléréséhez a standard, levélből metanollal extrahált kivonatok (mind poláros és apoláros komponenseket is tartalmaznak) esetén az eluensek arányát úgy választottuk meg, hogy először a vízzeloldhatóbb (polárosabb) komponensek eluálódjanak. A levélből kloroformmal extrahált kivonat esetén abból indultunk ki, hogy a minta inkább apolárosabb komponenseket tartalmaz. Ennek megfelelően, nem volt szükség hosszú lefutási időre, a lipofil vegyületek elválasztására kellett ügyelni.

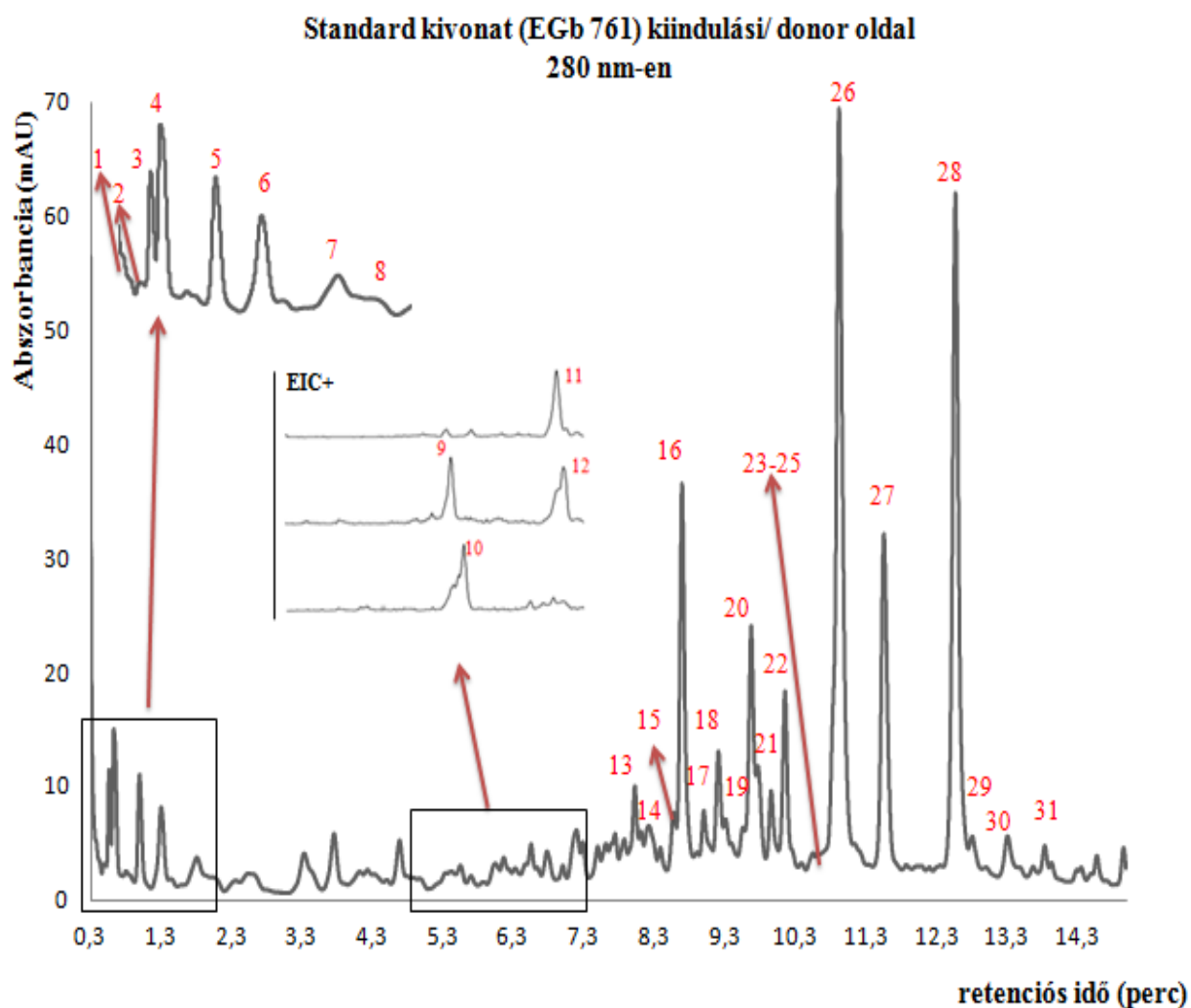
A rögzített hullámhosszak közül 280 nm-en detektáltunk a legérzékenyebben. A legtöbb komponens maximális UV elnyelése ehhez a hullámhosszhoz esik a legközelebb [4; 24; 30-31]. A terpének UV detektálása kis abszorbanciájukból adódóan nehéz analitikai feladat, jó ionizálhatóság miatt a tömegspektrum alapján való azonosítás elterjedtebb [32].

A komponensek azonosítása tömegspektrumaik alapján történt. Irodalmi adatok alapján a flavonoidok jobban ionizálódnak negatív mérési módban (általános meghatározási módszer) [31, 33-34; 35], azonban a minták összetettsége, a többi komponens azonosítása miatt pozitív ionizációt választottunk [4-5; 32]. A flavonoid aglikonokat, a ginkgotoxint a vásárolt standardokkal retenciós idők (egyazon gradiens programot használva) és a tömegspektrumok alapján igazoltuk.

Azonosítás utolsó lépése az egyes komponensek QQQ-MS készülékben történt elfragmentálása volt. Irodalmi adatok és szerkezeti tulajdonságok alapján állítottuk be vegyület csoportokként az ütközési energiákat. A legnagyobb ütközési energiára a biflavonoidok esetén volt szükség a C-C kötések és az aromás gyűrűk felhasításához [30, 34-35]. A fragmensek alapján határoztuk meg és azonosítottuk a mintáinkban megtalálható komponenseket irodalmi adatokkal összevetve [4-5; 24; 30-34].

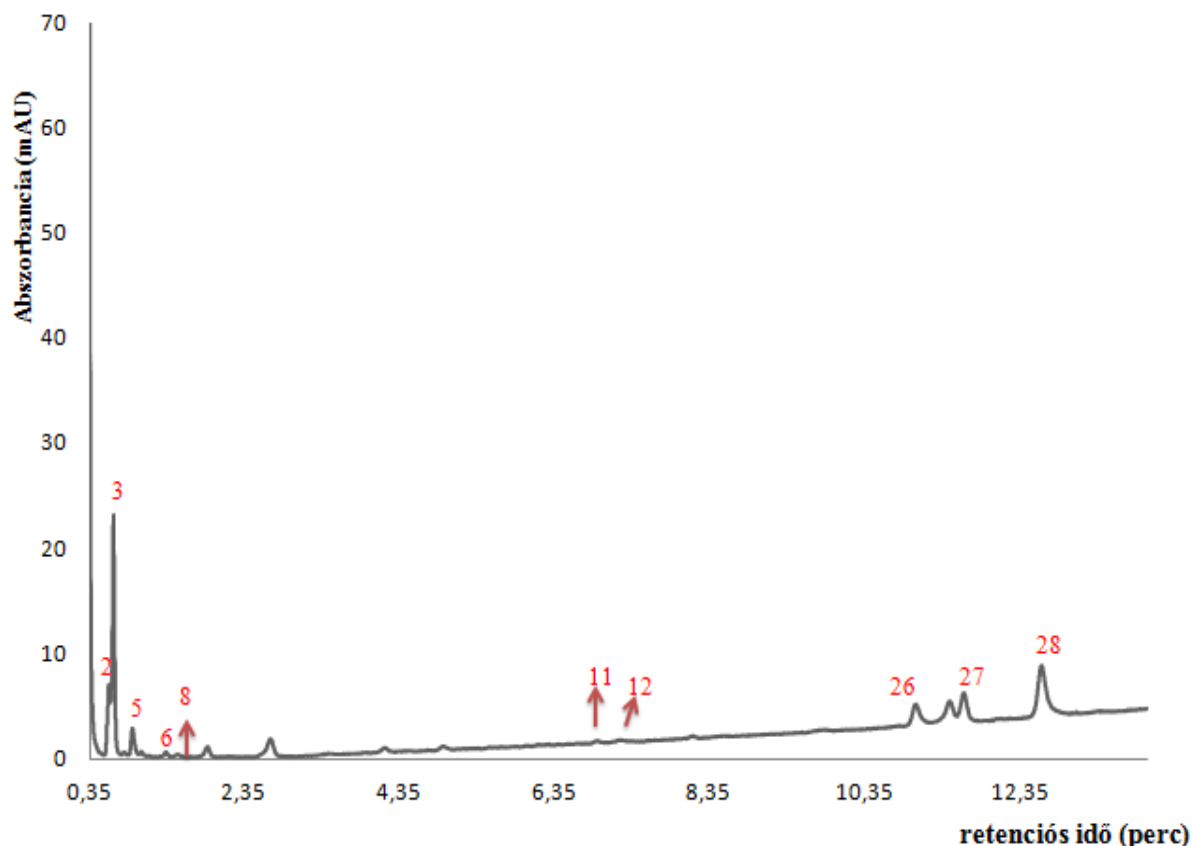
A kivonatok összetételének meghatározása után kívántuk vizsgálni az agyi penetrációra vonatkozó tulajdonságokat. Ehhez a már bemutatott PAMPA-BBB módszert használtuk. A PAMPA szűrést követően a szendvics plate-rendszer szétszedése után a kivonatok rossz vízoldhatósága, telítődése miatt szükség volt a donor oldal DMSO-val való oldatstabilizálására. A fogadó oldalon a komponensek kisebb száma és alacsonyabb koncentráció biztosította az oldat homogenitását (nem történt anyagkiválás).

Az alábbi ábrákon (6. ábra, 7. ábra) láthatóak a standard kivonat kiindulási, donor illetve fogadó oldatainak kromatográfiás profilja.



6. ábra A standard kivonat kiindulás/donor oldatának kromatográfiás profilja

Standard kivonat (EGb 761) fogadó oldala 280 nm-en

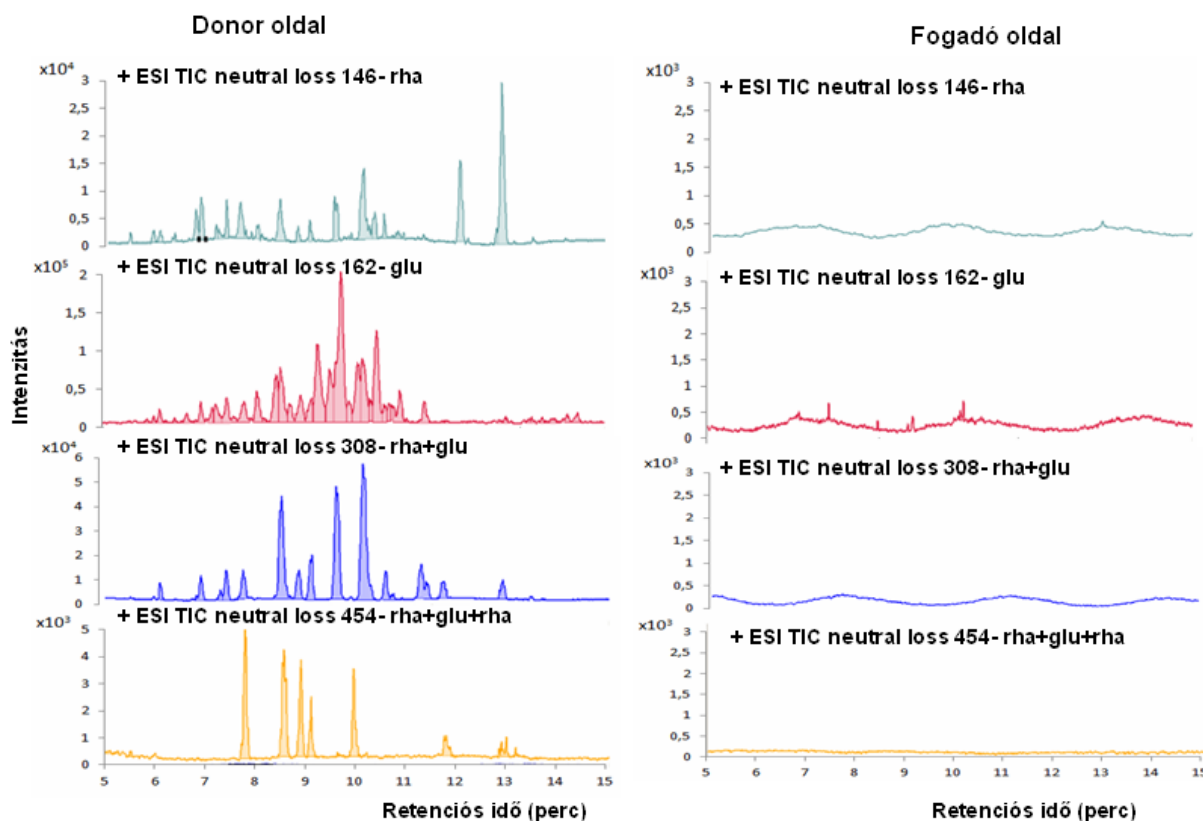


7.ábra A standard kivonat fogadó oldali oldatának kromatográfiás profilja

A standard kivonat vizsgálata során azonosítottuk a legtöbb komponenst. Az minta legnagyobb arányban flavonoidokat/ flavonoid glikozidokat (számozás:13-31) tartalmazott. A terpének (számozás: 9-12) elégtelen UV abszorbanciájuk miatt a tömegspektrumuk jeleit (EIC+) kiemelve, külön bemutatjuk a kromatogramon. A PAMPA-BBB módszer előnye, hogy nagy szelektivitást, tisztulást tesz lehetővé a komplex növényi minták esetén. A PAMPA-BBB szűrést követően a donor oldalon detektált és azonosított 31 db komponensből, a fogadó oldalon 10 db vegyületet detektáltunk.

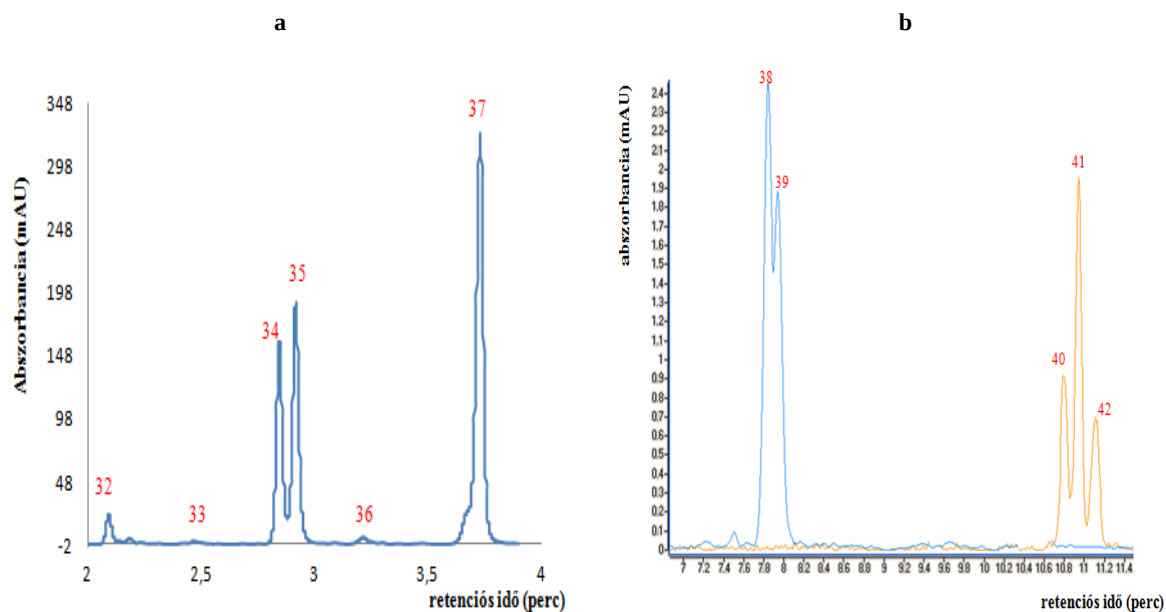
A fogadó oldalon a flavonoid glikozidokat tartalmazó régió (sorszám 13-31) tisztul a legnagyobb mértékben, mert a fokozott polaritású cukor ligandummal rendelkező komponensek nem képesek átjutni a vér-agy gáton passzív diffúzióval [1]. Ennek igazolására alkalmaztuk a HPLC-MS mérés során a neutral loss beállítást. Az MS készülékben a hőmérséklet, fragmentor feszültség hatására a cukor komponens lehasad az alap flavonoid vázról. Ezeket a tömegvesztéseket (m/z :146 (ramnóz); 162 (glükóz), 308 (diglikozid), 454 (triglikozid)), illetve azokat a komponenseket tudjuk detektálni, amelyek elvesztik ezeket a

cukor részleteket [4; 33-34]. A következő ábrán (**8. ábra**) látható, hogy a donor oldat esetén detektáltunk ilyen komponenseket (mérhető a tömegvesztés), míg a fogadó oldatban már nem. Ezzel az egy méréssel is igazoltuk, hogy a vér-agy gáton nem képesek átjutni a cukor részt tartalmazó komponensek. Másrészt a beállítás előnye, hogy egyetlen mérés alapján lehet detektálni, a mintában jelen lévő flavonoid glikozidokat.



8. ábra Neutral loss. a) donor oldat. b) fogadó oldat

A levélből metanollal extrahált kivonat hasonlít a standard kivonathoz összetételben és kromatográfiás profilját tekintve is. Néhány komponenst azonosítottunk a standard kivonatban megtalálható komponenseken felül. A levélből kloroformmal extrahált kivonat tartalmazza a biflavonokat, melyek az EGb 761-ben nem találhatók meg. Ez a különbség az extrakció során használt oldószerekből és az alapanyagból is adódik (száraz, sárga levelek terpéneket, flavonoid glikozidokat alig tartalmaznak) [2]. A kiindulási, donor oldatokban detektált komponensek az alábbi kromatogramok részletein láthatóak (**9. ábra**).



9. ábra Száraz levélből készített kivonatok kiindulási/donor oldata . **a**kloroformos kivonat. **b** metanolos kivonat

A kivonatokban detektált és azonosított komponenseket (42 db) és a PAMPA-BBB/HPLC-MS mérésekből kapott *G. biloba* profilját pontosító jellemzőket (effektív permeabilitási érték) az alábbi táblázat foglalja össze, mely a következő oldalon folytatódik.

6.táblázat *G. biloba* permeabilitási profilja

Sorszám	Komponens	t_R (perc)	MS ([M+H] ⁺ , m/z)	log P_e (10 ⁻⁶ cm/s)	Agyi penetrációra vonatkozó adat
1	adenozin	0,39	268	-	-
2	nem azonosított	0,49	166	-4,91	-
3	ginkgotoxin	0,56	184	-5,05	? [23-25]
4	ginkgotxin-5'-glükózid	0,65	346	-	-
5	nem azonosított	0,99	194	-5,36	-
6	nem azonosított	1,34	383	-5,95	-
7	6-hidroxi-kinurén sav	1,81	206	-	-
8	bilobalid	1,91	327	-6,01	+ (in vitro,in vivo) [6; 7]
9	ginkgolid J	4,96	426	-	+ (in vitro,in vivo) [6; 7]
10	ginkgolid C	5,26	442	-	+ (in vitro,in vivo) [6; 7]
11	ginkgolid A	7,19	409	-6,17	+ (in vitro,in vivo) [6; 7]
12	ginkgolid B	7,29	426	-6,17	+ (in vitro,in vivo) [6; 7]
13	rutin	8,02	611	-	+ (in vitro) [1]
14	quercetin-triglikozid	8,58	303,465,709	-	-
15	quercetin-triglikozid	8,69	303,465,611	-	-
16	nem azonosított	8,9	247,449	-	-
17	isorhamnetin-triglikozid	9,0	317,479,625,793	-	-
18	patuletin-monoglikozid	9,1	333,540	-	-

19	patuletin-diglikozid	9,21	333,451,641	-	-
20	kaempferol-diglikozid	9,58	287,449,603	-	-
21	kaempferol-diglikozid	9,68	287,449,595	-	-
22	isorhamnetin-diglikozid	10,17	317,479,625	-	-
23	isorhamnetin-monoglikozid	10,39	317,555	-	-
24	syringentin-diglikozid	10,55	347,437,677	-	-
25	kaempferol-diglikozid	10,72	287,493,617	-	-
26	quercetin	10,92	303	-5,42	+ (<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>) [1; 8]
27	apigenin	11,56	271	-5,65	+ (<i>in vitro</i>) [1]
28	kaempferol	12,57	287	-5,43	+ (<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>) [1; 8]
29	apigenin-diglikozid	12,81	271,635,779	-	-
30	isorhamnetin	13,31	317	-	+ (<i>in vivo</i>) [8]
31	kaempferol-triglikozid	13,86	287,763	-	-
32	bilobetin	2,09	553	-	-
33	sitosterol	2,49	415	-	-
34	ginkgetin	2,84	567	-	-
35	isoginkgetin	2,92	567	-	-
36	nem azonosított	3,25	570	-	-
37	sciadopytisin	3,73	581	-	-
38	myricetin-glukozid	7,82	319,481	-	-
39	myricetin-glukozid	7,92	319,481,627	-	-
40	syringentin-glukozid	10,79	347,463,635	-	-
41	syringentin	10,89	347	-	-
42	syringentin-glukozid	10,91	347,509,655	-	-

-: sem *in vitro*, sem *in vivo* agyi felszívódásra vonatkozó farmakokinetikai adat nem áll és/ vagy fizikai kémiai megfontolások alapján nem várható agyi penetráció

+: *in vitro* és/vagy *in vivo* kísérletekben detektálták a komponenst

?: nincs farmakokinetikai adat, de CNS hatást kapcsoltak a vegyülethez

A legtöbb komponensre vonatkozóan eddig még nem közöltek farmakokinetikai adatokat, ezért törekedtünk nemcsak a biológiailag aktívnak vélt komponensek (terpének, flavonoidok), hanem az összes általunk azonosított komponens azonosítására, jellemzésére is. A méréseink során kapott log P_e értékek alapján a vér-agy gáton jó hatékonysággal átjutó komponensek (BBB+): ginkgotoxin, quercetin, kaempferol, apigenin, ginkgolidok (A, B), továbbá három nem azonosított komponens (m/z : 166, 194, 383). Nem jutnak át a vér-agy gáton (BBB-) a flavonoid glikozidok, a biflavonok és a detektált komponensek legnagyobb része sem. A ginkgolid C, J, és az isorhamnetin a fogadó oldalon nem volt detektálható az UV kromatogramok alapján. EIC+ alapján ugyan sikerült azonosítani ezeket a komponenseket a fogadó oldalon, azonban a kapott donor és fogadó oldali csúcsterületek arányai a TIC-ből arra

utalnak, hogy az adott koncentráció tartományban nem mutatnak lineáris összefüggést, így a kapott AUC értékeket nem lehet felhasználni az ismertetett $\log P_e$ számítási módszerrel. Ily módon egzakt effektív permeabilitási értéket nem tudunk megadni erre a három biológiailag aktívnek vélt komponensre. A *G. biloba* összetételét tekintve kevés az a komponens, amely képes bejutni a központi idegrendszerbe tisztán passzív diffúzió révén, és a BBB+ komponensek sem tartoznak a nagyon jó penetrációjú vegyületek közé ($\log P_e$ értékük -6 közeli).

Az általunk detektált komponensek közül a ginkgotxin rendelkezik az egyik legmagasabb effektív permeabilitási értékkel. Figyelemre méltó, hogy a CNS-hatást tulajdonító komponensek $\log P_e$ értékénél is nagyobb értéket kaptunk. Méréseink alapján nagyobb, vagy legalábbis azonos mértékű lehet az agyi penetrációja (fogadó oldali csúcs alapján is) mint az eddig széles körben, szinte kizárólagosan vizsgált terpén és flavonoid vegyületcsaládoknak.

4.2. Ginkgotoxin azonosítása, mennyiségi meghatározása

A ginkgotoxin azonosításához az irodalmi adatokat [24; 26; 36-37] vásárolt standardot használtuk referenciaként. A standard és a kivonatban megtalálható toxin retenciós idejét, a tömegspektrumokat és a fragmenseket összevetve igazoltuk a mintáinkban lévő ginkgotoxin jelenlétét.

Mennyiségi meghatározás céljából lineáris kalibrációt végeztünk (3-3 párhuzamos minden mérési pontban). A ginkgotoxin HPLC-MS vizsgálatához a standard mintát vízben oldottuk stabilitásának megőrzése, illetve a DMSO zavaró abszorbanciájának és a várható közeli eluálódásuk elkerülése miatt. A rögzített spektrumok közül a 280 nm-en történt felvételt használtuk a kalibrációhoz a maximális UV abszorbancia helyett (290 nm) [36-37], ahol a csúcsok jelalakja a telítésbe hajlás miatt nem volt megfelelően kiértékelhető a nagyobb koncentrációk esetén.

A koncentrációkhoz tartozó csúcsterületeket az alábbi táblázat tartalmazza.

7. táblázat Ginkgotoxin kalibráció

x- törzsoldat konc. (ug/ml)	y ₁ -csúcsterület ₁	y ₂ -csúcsterület ₂	y ₃ -csúcsterület ₃	y _a -átlag
0,02	0	0	0	0
0,2	1,7	1,66	2,56	1,973
1	7,24	6,25	6,46	6,650
10	55,25	57,64	55,92	56,270
50	275,56	276,12	275,53	275,737
500	2755,56	2763,48	2754,42	2757,820

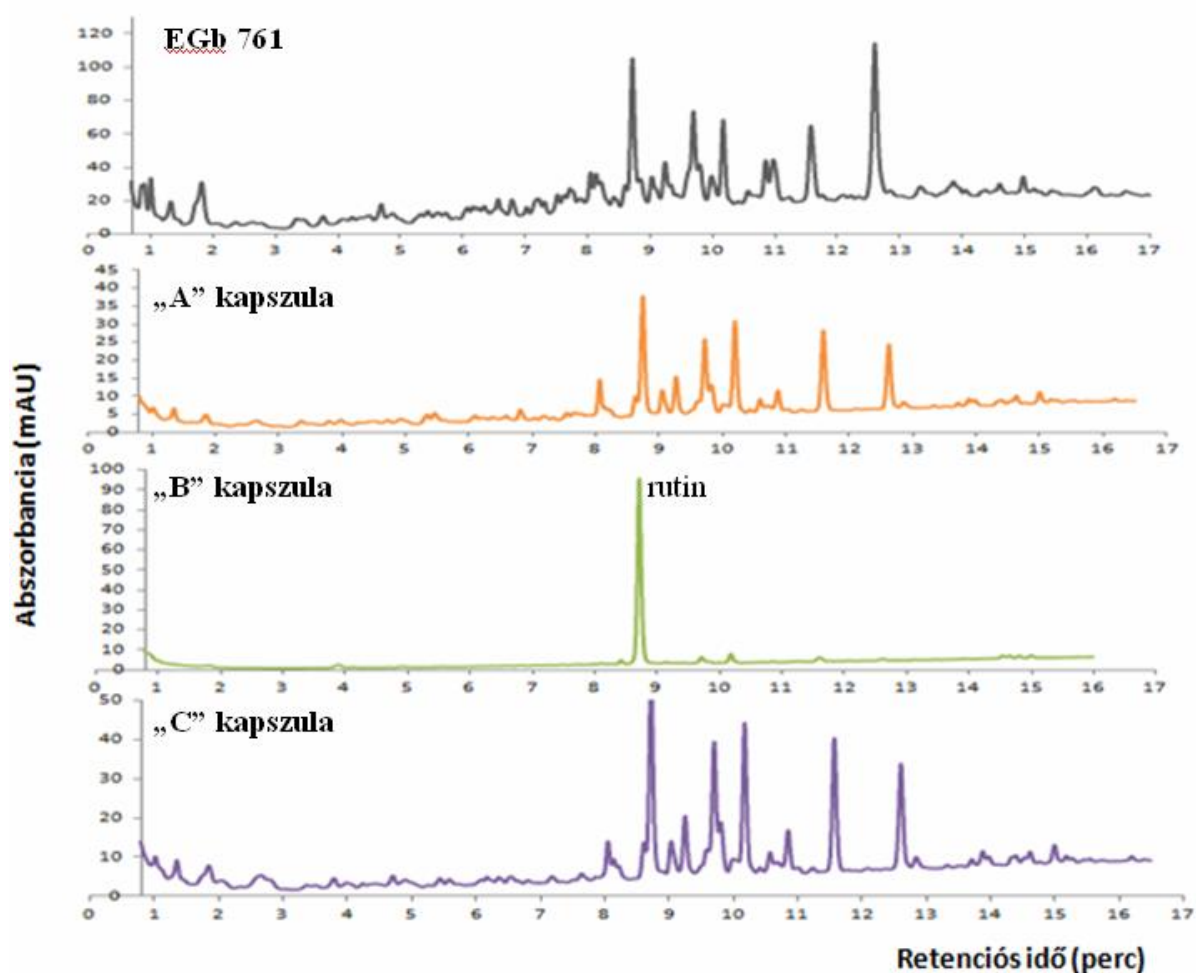
A meghatározott kalibrációs egyenes egyenlete ($r^2=1$):

$$y = 5.5143x + 0.6185 \quad (4.2.1)$$

4.3. *Ginkgo biloba* növényi készítmények összehasonlítása

A *G. biloba* standard kivonata az egyik legnagyobb forgalmú növényi készítmény [27]. A gyógyszerkönyvi minősítés a forgalomba kerülő kapszulák, tabletták estén a standardizálás során optimalizált komponens tartalomra (22-27 % flavonoid, 4-8 % terpén, maximum 5 ppm ginkolsavak) vonatkozik [21-22]. A ginkgotoxin mennyiségét nem határozzák meg készítményben, noha a levél, így a kapszulákba, tablettákba kerülő EGb 761 is tartalmaz [26].

Méréseink során három, hazai patikában kapható *G. biloba* terméket és a standard kivonatot hasonlítottuk össze. A kapszulák oldatairól 280 nm-en, a fent bemutatott módszerekkel készült kromatogramok az alábbi ábrán láthatóak.



10. ábra *G.biloba* növényi készítmények kromatogramjai

A kapszulák csomagolásán feltüntetett adatok alapján az „A” kapszula 48 mg (11,52 mg flavon glikozid, 2,88 mg terpén lakton), a „B” kapszula 40 mg; a „C” kapszula 80 mg *G. biloba* kivonatot tartalmaz kapszulánként. Az „A” és „C” kapszulák kromatográfiás profilja hasonló, mint a standard kivonaté. Legnagyobb arányban a flavonoid glikozidok találhatók

meg ebben a 3 kivonatban. A „B” kapszula profilja eltér a standard kivonat profiljától. A flavonoid glikozidok közül egy komponens (rutin, $t_R=8,02$ perc) jelentős mértékben dúsítva (EGb 761 kivonat rutin tartalmához képest) van jelen a kivonatban és a többi komponens arányait tekintve sem felel meg a standard kivonat komponensarányinak. Az eredmény nagy valószínűséggel termékhamisításra utal.

Közös jellemző, hogy mindegyik kapszula kivonatában detektáltuk a ginkgotoxint. A kivonatok oldatáról 3-3 párhuzamos mérést végeztünk. 280 nm-en határoztuk meg a ginkgotoxin csúcsterületeit a kivonatokban. Mennyiségének meghatározásához a kalibráció során leírt egyenletet használtuk (4.2.1).

8. táblázat Ginkgotoxin mennyiségi meghatározása készítményekben

Kivonat	csúcsterület	toxin koncentráció ($\mu\text{g/ml}$)
„A” kapszula	7,99	1,34
	7,72	1,29
	7,79	1,30
„B” kapszula	12,91	2,23
	12,61	2,17
	12,43	2,14
„C” kapszula	83,40	15,01
	80,08	14,41
	83,07	14,95
EGb 761	16,20	2,83
	17,30	3,03
	16,56	2,89

Figyelembe véve a bemért anyagmennyiséget (50 mg) és készített törzsoldatok koncentrációját (50 mg/ml) kapszulák ginkgotoxin tartalma a következő:

„A” kapszula: $26,2 \pm 0,5 \mu\text{g/g}$

„B” kapszula: $43,6 \pm 0,9 \mu\text{g/g}$,

„C” kapszula: $295,8 \pm 6,6 \mu\text{g/g}$,

Standard kivonat (EGb 761): $58,3 \pm 2,0 \mu\text{g/g}$.

Az eddigi klinikai vizsgálatok során eredményesnek mondható 240 mg/nap orális dózis alkalmazása esetén a toxin mennyisége a vizsgált kapszulákra és standard kivonatra:

„A” kapszula: $6,3 \pm 0,1 \mu\text{g/nap}$

„B” kapszula: $10,5 \pm 0,2 \mu\text{g/nap}$

„C” kapszula: $70,8 \pm 1,6 \mu\text{g/nap}$

Standard kivonat (EGb 761): 14,2 +/- 0,5 µg/nap

A kapott értékek alapján a ginkgotoxin mennyisége a napi bevitelre vonatkozóan, a leírt neurotoxikus hatásokból adódó kockázatok miatt [22-23] nem hagyható figyelmen kívül a *G. biloba* készítmények gyógyszerkönyvi minősítése során. Figyelembe véve a mérési eredményeink során kapott effektív permeabilitási értékét, a CNS- hatásért felelős komponensekkel is összevetve még nagyobb veszélyeket rejt a *G. biloba* toxin tartalma.

5. Összefoglalás

A hagyományos gyógyászatban alkalmazott növényi kivonatok, gyógynövényi készítmények használata napjaink gyógyszerfelhasználásában is előtérbe került. Az egyik legnagyobb forgalmú, első sorban CNS-kórképekben alkalmazott gyógynövényi készítmény a *G. biloba* levelének kivonata [27].

A gyógyszerkutatás egyik kiemelt területe a CNS-re ható vegyületek keresésével (vér-agy gáton való átjutás vizsgálata), azonosításával foglalkozik, mely az elmúlt években a növényi hatóanyagok elemzésére is kiterjedt az analitikai technikák nagyléptékű fejlődésének köszönhetően. A növényi extraktumok hatóanyagainak azonosítására jól alkalmazható az *in vitro*, vér-agy gát specifikus, nagy áteresztőképességű PAMPA-BBB/ HPLC-QQQ MS kapcsolt analitikai technika [1].

Vizsgálataink során törekedtünk a *G. biloba* összetételéről, CNS-hatásért felelős komponenseiről alkotott kép pontosítására. Több olyan hatóanyagot is sikerült azonosítanunk, amelyek mért permeabilitása jó egyezést mutat a *G. biloba* farmakokinetikai leírásával. Bizonyítottuk továbbá, hogy a kivonatok glikozilált komponensei nem képesek passzív diffúzióval átjutni a modellmembránon. Ezen felül tesztrendszerünk segítségével sikerült rámutattunk az ismert neurotoxikus hatású ginkgotoxin fokozott agyi felszívódásával és a kivonatokban lévő mennyiségével összefüggő kockázatra is.

A *G. biloba* kivonatot tartalmazó készítmények kromatográfiás profiljainak összehasonlításával rámutattunk arra, hogy a PAMPA-BBB/ HPLC- QQQ MS tesztrendszer minősítő analitikai eljárás eszközeként is alkalmazható lehet. Eredményeink hozzájárulhatnak készítmények gyógyszerkönyvi minősítésének módosításához.

Továbbiakban a még nem azonosított, jó effektív permeabilitású komponensek azonosítását valamint; a ginkgotoxin agyi penetrációs mechanizmusának részletes (esetleg aktív transzport mechanizmus) vizsgálatát tűztük ki célul.

6. Irodalomjegyzék

- [1] Könczöl Árpád, Müller Judit, Földes Emília, Béni Zoltán, Végh Krisztina, Kéry Ágnes, Balogh György Tibor.(2013) Applicability of a blood-brain barrier specific artificial membrane permeability assay at the early stage of natural prodduct-based CNS drug discovery. J Nat Prod.
- [2] Kristian Srómgraad, Koji Nakamishi.(2004) Chemistry and biology of terpene trilactones from *Ginkgo biloba*. Angew Chem Int Edit. 43: 1640-1658
- [3] Vilas Kumar. Potential Medicinal plants for CNS disorders: an overview. (2006) Phytother Res. 20: 1023-1035
- [4] Long-Ze Lin, Pei Chen, Mustafa Ozcan, James M. Harnly.(2008) Chromatographic profiles and identification of new phenolic components of *Ginkgo biloba* leaves and selected products. J Argic Food Chem. 56: 6671-6679
- [5] S. Ding, E. Dubley, S. Plummer, J. Tang, RP. Newton, AG. Brenton. (2008) Fingerprint profile of *Ginkgo biloba* nutritional supplements by LC/ESI-MS/MS. Phytochemistry. 69: 1555-1564
- [6] Vamsi L.M. Magdula, Bharathi Avula, Young-Beob Yu, Yan-Hong Wang, Flaubert Tchantchou, Scott Fisher, Yuan Luo, Ikhlas A. Khan, Shabana I. Khan.(2010) Intestinal and blood-brain barrier permeability of ginkgolides and bilobalide: *in vitro* and *in vivo* approaches. Planta Med. 76: 599-606
- [7] Chriastian Ude, Alexander Paulke, Michael Nölder, Manfred Schubert-Zsilavecz, Mario Wurglics. (2011) Plasma and brain levels of terpene trilactones in rats after an oral singel dose of standardized *Ginko biloba* extract EGb 761®. Planta Med. 77: 259-264
- [8]- Laura Rangel-Ordóñez, Michael Nöldner, Manfred Schubert-Zsilavecz, Mario Wurglics. (2010) Plasma levels and distribution of flavonoids in rat brain after single and repeated doses of standardized *Ginkgo biloba* extract EGb 761®. Planta Med. 76: 1683-1690
- [9] Filipa Lourenco, Cardoso, Dora Brites, Maria Alexandra Brito. (2010) Looking at the blood-brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. Brain Res Rev. 64: 328-363
- [10] Praveen Ballabh, Alex Braun, Maiken Nedergaard. (2004) The blood–brain barrier: an overview structure, regulation, and clinical implications. Neurobil Dis. 16: 1-13
- [11] Kiyohiko Sugano, Manfred Kansy, Per Artursson, Alex Avdeef, Stefanie Bendels, Li Di, Gerhard F. Ecker, Bernard Faller, Holger Fischer, Grégori Gerebtzoff, Hans Lennernaes,

- Frank Senner. (2010) Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nat Rev Drug Discov.* 9: 597-614
- [12] Li Di, Edward H. Kerns, Kristi Fan, Oliver J. McConnell, Guy T. Carter. (2003) High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier *Eur J Med Chem.* 38: 223-232
- [13] N. Joan Abbot, Lars Rönnbäck, Elisabeth Hansson. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 7:41-53
- [14] Balogh György Tibor. Permeabilitás- PAMPA és Caco2 modellek. Keserű György Miklós. A gyógyszerkutatás kémiája. 2011- Akadémiai Kiadó
- [15] D. Lynch. J. MultiScreen™ Permeability Plates, Millipore application note
- [16] Po-Chuen Chan, Qingsu Xia, Peter P. Fu.(2007) Ginkgo Biloba Leave Extract: Biological, medicinal and toxicological effects. *J Environ Sci Heal C.* 25: 211-244
- [17] Bikram Singh, Pushpinder Kaur, Copichand, R.D. Singh, P.S. Ahuja. (2008) Biology and chemistry of *Ginkgo biloba*. *Fitoterapia.* 79: 401-418
- [18] Teris A. van Beek. (2002) Chemical analysis of ginkgo biloba leaves and extracts. *Journal of Chromatogr A.* 967: 21-25
- [19] Teris A. van Beek, Paola Montoro. (2009) Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts and phytopharmaceuticals. *J Chromatogr A.* 1216: 2002-2032
- [20] Andreas Hasler. (2000) Chemical constituents of *Ginkgo biloba*. Zeller Ltd. Herbal Remedies. CH-8590 Romanshorn, Switzerland
- [21] United States Pharmacopeial Convention, United States Pharmacopeia and National Formulary (USP36-NP31). Rockville. MD. 2013
- [22] British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia, The Stationary Office. London. 2012
- [23] Varro E. Tyler. Herbs affecting the central nervous system.
- [24] Gang-Hui Lee, Shian-Ying Sung, Wen-Ni Chang, Tseng-Ting Kao, Hung-Chi Du, Tsun-Hsien Hsiao, Martin K. Safo, Tzu-Fun Fu. (2012) Zebrafish larvae exposed to ginkgotoxin exhibit seizure-like behavior that is relieved by pyridoxal-5'-phosphate, GABA and anti-epileptic drugs. *Disease Models & Mechanisms.* 5: 785-795
- [25] Eckhard Leistner, Christel Drewke. (2010) *Ginkgo biloba* and Ginkgotoxin. *J Nat Prod.* 73:1
- [26] Peter M. Scott, Benjamin P.-Y. Lau, Guillaume A. Lawrence, David A. Lewis. (2000) Analysis of *Ginkgo biloba* for the presence of Ginkgotoxin and Ginkgotoxin-5'-Glucoside. *J AOAC Int.* 83:6

- [27] By Ashley Lindstrom, Carla Ooyen, Mary Ellen Lynch, and Mark Blumenthal. (2013) Herb supplement sales increase 5.5% in 2012: Herbal supplement sales rise for 9th consecutive year; turmeric sales jump 40% in Natural Channel. American Botanical Council. 99: 60-65
- [28] Ansgar Arenz, Matthias Klein, Katrin Fiehe, Julia Groß, Christel Drewke, Thomas Hemscheidt, Eckhard Leistner. (1996) Occurrence of neurotoxic 4'-O-methylpyridoxine in *Ginkgo biloba* leaves, *Ginkgo* medications and Japanese *Ginkgo* food. Plant Med. 62: 548-551
- [29] Avdeef, A. Permeability and charge state. absorption and drug development solubility. 2003. pION, Inc. John Wiley & Sons
- [30] Yi-Xuan Zhang, Qiu-Yue Li, Li-Li Yan, Yue Shi. (2011) Structural characterization and identification of biflavones in *Selaginella tamariscina* by liquid chromatography-diode-array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 25:2173-2186
- [31] Xiao-Ping Ding, Jin Qi, Yan-Xu Chang, Ling-Li Mu, Daan-Ni Zhu, Bo-Yang Yu. (2009) Quality control of flavonoids in *Ginkgo biloba* leaves by high-performance liquid chromatography with diode array detection and on-line radical scavenging activity detection. J Chromatogr A. 1216: 2204-2210
- [32] Daniela Iuliana Sora, Venera Stefanescu, Victor David, Andrei Medvedovici. (2009) Validation of an LC-MS/MS assay of terpene trilactones in *Ginkgo biloba* extracts and pharmaceutical formulations through standard addition method. J Pharmaceut Biomed. 50: 459-468
- [33] M.-J. Dubber, V. Sewram, N. Mshicileli, G.S. Shephard, I. Kanfer. (2005) The simultaneous determination of selected flavonol glycosides and aglycones in *Ginkgo biloba* oral dosage forms by high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry. J Pharmaceut Biomed. 37: 723-731
- [34] Saiko Kazuno, Mitsuaki Yanagida, Noriki Shindo, Kimie Murayama. (2005) Mass spectrometric identification and quantification of glycosyl flavonoids, including dihydrochalcones with neutral loss scan mode. Anal Biochem. 347: 182-192
- [35] Blazics Balázs. Mass spectrometry of flavonoid aglycones. Analysis of medicinal plant phenoloids by coupled tandem mass spectrometry. 2010. 20-28
- [36] Guillaume A. Lawrence, Peter M. Scott. (2005) Improved extraction of ginkgotoxin (4'-O-methylpyridoxine) from *Ginkgo biloba* products. J AOAC Int. 88: 26-29
- [37] Teruki Yoshimura, Nobuyoshi Udaka, Junskue Morita, Zhang Jinyu, Keiko Sasaki, Daisuke Kobayashi, Keji Wada. (2006) High performance liquid chromatographic

determination of ginkgotoxin and ginkgotoxin-5'-glucoside in *Ginkgo biloba* seeds. J Liq Chromatogr R T. 29:605-616