



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar

Szerves Kémia és Technológia Tanszék

# Tudományos diákköri dolgozat

**Flavonoidok humán szérum albuminhoz való kötődésének vizsgálata nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszerrel.**



RICHTER GEDEON

Készítette: **Domokos András**

Témavezetők: **Dr. Balogh György Tibor**

Richter Gedeon Nyrt.,

Szintézistámogató Laboratórium, osztályvezető

címzetes egyetemi docens

**Dr. Riethmüller Eszter**

Richter Gedeon Nyrt.,

Szintézistámogató Laboratórium, kutató-fejlesztő

**2014.**

# Tartalomjegyzék

|      |                                                        |    |
|------|--------------------------------------------------------|----|
| 1.   | Köszönetnyilvánítás .....                              | 3  |
| 2.   | Rövidítésjegyzék .....                                 | 4  |
| 3.   | Bevezetés .....                                        | 5  |
| 4.   | Irodalmi összefoglaló.....                             | 5  |
| 4.1. | Gyógyszerek plazmafehérje-kötődésének jelentősége..... | 5  |
| 4.2. | A humán szérum albumin.....                            | 7  |
| 4.3. | A plazmafehérje-kötődés vizsgálómódszerei.....         | 9  |
| 4.4. | Flavonoidok.....                                       | 14 |
| 5.   | Célkitűzés .....                                       | 17 |
| 6.   | Anyagok és módszerek.....                              | 17 |
| 7.   | Eredmények .....                                       | 19 |
| 8.   | Diszkusszió .....                                      | 25 |
| 9.   | Összefoglalás .....                                    | 32 |
| 10.  | Irodalomjegyzék .....                                  | 34 |
| 11.  | Ábrajegyzék .....                                      | 40 |

## **1. Köszönetnyilvánítás**

Szeretnék mindenekelőtt köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Riethmüller Eszternek, és Dr. Balogh György Tibornak, hogy lehetőséget adtak, hogy a Szintézistámogató Laboratóriumban dolgozzam. Támogatásuk és tanácsaik nélkül nem sikerült volna elvégeznem a kijelölt munkát, illetve megírni a dolgozatot.

Köszönöm!

## 2. Rövidítésjegyzék

|                     |                                                                    |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------|
| ACN                 | acetonitril                                                        |
| BSA                 | szarvasmarha szérum albumin                                        |
| CD                  | cirkuláris dikroizmus                                              |
| DAD                 | diódasoros detektor                                                |
| HPLC                | nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia                             |
| HSA                 | humán szérum albumin                                               |
| k                   | kapacitásfaktor                                                    |
| K                   | a fehérjéhez kötött és a szabad vegyületforma egyensúlyi állandója |
| log <i>D</i>        | adott pH-n vett lipofilitás                                        |
| log <i>P</i>        | víz-n-oktanol megoszlási hányados                                  |
| MS                  | tömegspektrometria                                                 |
| NH <sub>4</sub> OAc | ammónium-acetát                                                    |
| NMR                 | mágneses magrezonancia                                             |
| PPB%                | százalékos fehérjekötődés                                          |
| RSD%                | relatív standard deviáció                                          |
| t <sub>0</sub>      | holtidő                                                            |
| TFA                 | trifluor-ecetsav                                                   |
| t <sub>R</sub>      | retenció idő                                                       |
| UV                  | ultraibolya                                                        |

### 3. Bevezetés

Az utóbbi évtizedben a modern gyógyszerkutatásban a kombinatorikus kémia és nagy áteresztőképességű, biológiai aktivitás alapján szűrő (high throughput screening, HTS) módszerek szerepe nagymértékben nőtt. Ennek köszönhetően gyorsan, nagyszámú molekula biológiai aktivitása vizsgálható a célzott receptoron, enzimen, vagy egyéb farmakológiai célponton. Ez azonban maga után vonja az új gyógyszerjelölt molekulák egyre nagyobb hányadánál a rossz vízoldhatóságot és magas lipofilitást ( $\log P > 5$ ).<sup>[1]</sup> Egyes becslések szerint ez az arány elérheti a 40%-ot is az új gyógyszerjelölt vegyületek között.<sup>[2][3]</sup>

### 4. Irodalmi összefoglaló

#### 4.1. Gyógyszerek plazmafehérje-kötődésének jelentősége

A szájon át (*per os*) adagolt gyógyszerek hatékony formulációból való felszabadulásának és felszívódásának előfeltétele a megfelelő oldhatóság vízben. Következésképp az elégtelen vízoldhatósággal együtt járó magas lipofilitás ronthatja a szájon át adagolt gyógyszerek biohasznosulását. Fontos viszont megemlíteni, hogy a lipofil vegyületek passzív transzporttal könnyebben áthatolnak a különböző membránokon, emellett a hatóanyagok fokozott lipofil jellege a vérben jelenlévő plazmafehérjékhez való kötődés esélyét is megnöveli. Ez utóbbi is elősegítheti a hatóanyagok felszívódását, mivel a vérben a hatóanyag kötött állapotba kerül, csökken a szabad gyógyszerhányad, így a nagyobb koncentráció gradiens által nő a passzív diffúzió hajtóereje.<sup>[4]</sup>

A gyógyszerek megoszlásának igen fontos tényezője a gyógyszerek plazmafehérje-kötődése (1.ábra), mivel a kevésbé oldódó, lipofilebb molekulák számára lehetővé teszi a szisztémás keringés által történő eljutást a célszövethez.<sup>[4]</sup> A terápiás hatás kialakulásához azonban a vérben a gyógyszer szabad formájának megfelelően magas koncentrációjának elérése szükséges, hiszen a hatóanyag csak ebben a formában képes átjutni az egyes szöveti/sejtes belépési kapukon (membránokon) és így eljutni a célszövetekbe, ahol kifejtheti a szükséges hatást. A plazmafehérjékhez kötött molekulák a szisztémás keringésben maradnak, így metabolizmusuk mértéke is csökkenhet, valamint kiválasztódásuk is akadályozva van.<sup>[4]</sup>

|                                                                                                                |                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Szabad gyógyszer                                                                                               | Vékonybél,<br>gasztrointesztinális<br>rendszer |
| $\downarrow$<br>Szabad gyógyszer $\rightleftharpoons$ Plazmafehérjéhez<br>kötött gyógyszer                     | Vér, szisztémás<br>rendszer                    |
| $\downarrow$ $\rightleftharpoons$ Szöveti kötődés<br>$\downarrow$<br>Célfehérje<br>(Receptor/Enzim)<br>kötődés | Célszövet/szerv                                |

1. ábra: A fehérjekötődés hatása gyógyszerhatóanyagok útjára a szervezetben

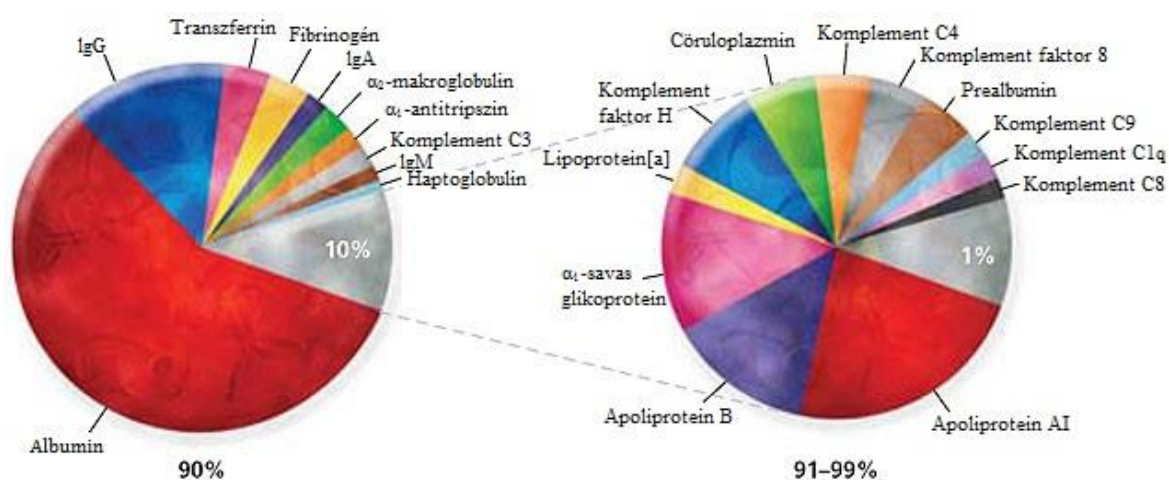
A fehérjéhez kötött és a szabad gyógyszerforma között dinamikus egyensúly alakul ki, a két forma aránya állandó, és az adott molekula fehérjekötődési sajátossága határozza meg. <sup>[4]</sup> (1.ábra) A szabad gyógyszerforma koncentrációjának csökkenésekor az egyensúly eltolódik és kötött hányadból történő felszabadulással áll be újra. A gyógyhatás kialakulását ez viszont lassíthatja, mivel csak az egyensúlynak megfelelő gyógyszer mennyiség található szabad formában. <sup>[4]</sup>

A fehérjéken található kötőhelyek telítődhetnek, ekkor a szabad gyógyszerforma koncentrációjának ugrásszerű növekedése következhet be, ami akár a toxikus szintet is elérheti. <sup>[1]</sup> Ez bekövetkezhet egy gyógyszer túl nagy dózisának beadolásakor, emellett a plazmafehérje-kötődés mértéke változhat az életkor előrehaladtával, egyes betegségek, élethelyzetek esetén, úgy mint a csecsemő- vagy időskor, terhesség, fizikai megterhelés, pajzsmirigy túlműködés, daganatos betegségek, vesebetegségek, szívbetegségek, reumás betegségek, sebészeti beavatkozások, sérülés, májbetegségek, gyomor-bélrendszeri betegségek, cukorbetegség, alultápláltság, törések, égések, dohányzás és stressz. <sup>[5]</sup> Ezekben az élethelyzetekben a fehérjekötődést megváltoztathatja a plazmafehérjék koncentrációjának csökkenése, a gyógyszerek affinitásának csökkenése a fehérjék felé azok konformáció-változása miatt (pl. a cukorbetegség esetében a plazmafehérjék könnyen glikozidálódnak), illetve a keringésben jelenlévő számos egyéb vegyület (esetleg egyidejűleg szedett, egyéb gyógyszerek), melyek a gyógyszerhatóanyagokkal versengenek a kötőhelyekért. <sup>[5]</sup> Főleg keskeny terápiás indexű gyógyszerek alkalmazásakor, illetve nagy plazmafehérje-kötődésű vegyületek esetében szükséges kiemelt figyelmet fordítani erre a veszélyre. <sup>[1]</sup>

Elmondható tehát, hogy a magas lipofilitású hatóanyagok esetében míg a gyógyszerformából történő felszabadulás csökkent jelleget mutat, addig ezen vegyületek passzív diffúzióját és ezzel együtt a felszívódását a membránt alkotó lipidekkel való kedvezőbb kölcsönhatásuk, illetve a nagyobb mértékű plazmafehérje-kötődésük segíti. A hatóanyagok eloszlásában a plazmafehérjék transzporter funkciót tölthetnek be, illetve elősegítik a lipofilebb molekulák vérben való oldását. A vegyületek fokozott plazmafehérje-kötődése viszont a plazma szabad gyógyszer koncentrációjának csökkenésével a célszövetekbe való bejutás hatékonysága is csökkenhet. [4]

#### 4.2.A humán szérum albumin

A fehérjekötődésért a vérben található plazmafehérjék a felelősek. Hozzávetőleg 60 különböző fehérje befolyásolja a vérben a molekulák megkötését, de a legfontosabbak az albumin (humán szérum albumin, HSA), az  $\alpha_1$ -savas glikoprotein (AAG) és a lipoproteinek. [4] (2.ábra)

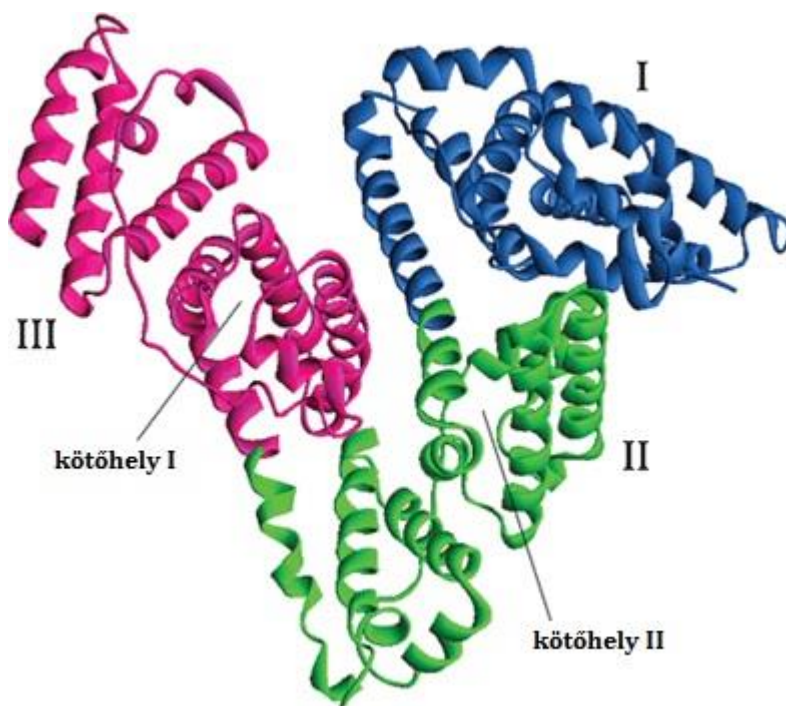


2. ábra: A plazmafehérjék megoszlása [6]

Legnagyobb mennyiségben a HSA található meg a plazmában (5g/100ml) [7], így a gyógyszermolekulák megkötéséért elsősorban ez a fehérje a felelős. [7][8] A HSA felezési ideje a keringésben 19 nap. Kristályszerkezete egyetlen polipeptid láncból áll, ami három homológ  $\alpha$ -hélix domént tartalmaz, melyek a kiterjedt diszulfid-híd rendszer által szív-alakba rendeződnek. (3.ábra) A humán szérum albumin molekulatömege mintegy 66 kDa, 585 aminosavból áll, 17 tirozin és 1 triptofán egységgel a 214-es pozícióban, mely a IIA aldoménben található. [7]

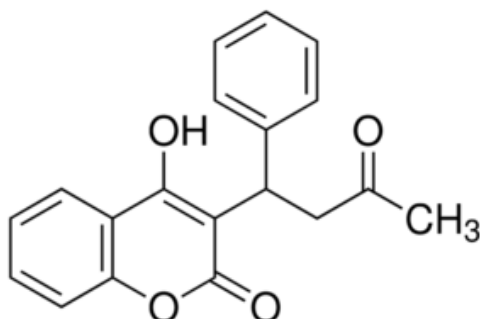
Az albuminhoz savas és bázikus gyógyszermolekulák is kötődhetnek van der Waals típusú diszperziós erőkkel, hidrofób- és hidrogén-kötéssel, valamint ionos kölcsönhatással. [5]

Meg kell azonban említeni, hogy a vegyületek lipofilitása kiemelkedő szerepet játszik a HSA-hoz való kötődésben. <sup>[5]</sup>



3. ábra: A humán szérum albumin szerkezete <sup>[9]</sup>

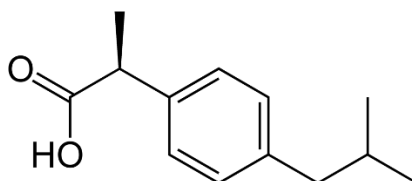
A fehérje két kötőhelyet tartalmaz, melyek nagy affinitással kötnek meg aromás és heterociklikus molekulákat. <sup>[4]</sup> Ezeket kötőhely I és kötőhely II névvel látták el, és a IIA, valamint a IIIA aldoménekből találhatók. (3.ábra) A két kötőhely topológiailag hasonló, de az alakjuk, méretük és polaritásuk szempontjából megkülönböztethetőek, ez magyarázatot ad a különböző kötési tulajdonságukra. Az említetteken kívül számos másodlagos kötőhely található a fehérjén. <sup>[10][11][12][1]</sup> A kötőhely I leginkább hidrofób, kiterjedt, heterociklusos molekulák megkötésére képes, melyek a molekula közepén tartalmaznak negatív töltést (pl. a warfarin (4.ábra), fenilbutazon kötődik ezen a kötőhelyen specifikusan).



4. ábra: A warfarin szerkezete <sup>[13]</sup>

A kötőhely II főleg aromás karbonsavakat képes komplexálni, negatív töltéssel a molekula egyik végén, elkülönülve a molekula fennmaradó, hidrofób szerkezetétől (pl. a

diazepamot, ibuprofént (5.ábra) köti specifikusan). <sup>[10][11]</sup> Egyes gyógyszerhatóanyagok mindkét kötőhelyhez képesek kötődni. <sup>[4]</sup>



5. ábra: Az ibuprofen szerkezete <sup>[14]</sup>

A HSA élettani szerepe a vér kolloidikus ozmózis nyomásának fenntartása mellett, ahogy azt korábban említettük, a különböző biogén anyagok reverzibilis megkötése, oldatban tartása és a szervezet különböző részeibe való szállítása. Összességében, bármely gyógyszer affinitása a szérum albuminhoz egy igen fontos paraméter, mely jelentős mértékben meghatározza annak farmakokinetikáját. <sup>[7]</sup>

#### 4.3.A plazmafehérje-kötődés vizsgálómódszerei

Fentiek alapján már a gyógyszerkutatás korai szakaszában számos *in vitro* és *in vivo* módszert alkalmaznak a gyógyszerjelölt molekulák plazmafehérje-kötődésének vizsgálatára. <sup>[15]</sup> Ezek az esetek túlnyomó többségében nagy áteresztőképességű kromatográfiás, valamint spektroszkópiás módszerek. Az utóbbi vizsgálatok esetében a vizsgált komponensek jellemző hullámhosszon történő UV elnyelését (pl.: HSA: 280nm <sup>[7]</sup>) (UV spektroszkópia), vagy a kötés létrejöttét kísérő konformációváltozást használják ki, mivel a HSA triptofán, tirozin és fenilalanin aminosav egységei nagy fluoreszcens aktivitással rendelkeznek <sup>[7]</sup> (fluoreszcencia) <sup>[17]</sup>. További alkalmazott spektroszkópiás módszerek az NMR <sup>[18]</sup>, CD <sup>[19]</sup>, és a felületi plazmon rezonancia <sup>[20]</sup>, amikkel a komplex létrejötte és szerkezete vizsgálható. <sup>[7][16]</sup>

Az *in vitro* vizsgálatok általában tartalmazzak egy elválasztási lépést, ami során a kötött és a szabad gyógyszerformát elkülönítik, ez történhet ultraszűréssel, ultracentrifugálással vagy egyensúlyi dialízissel. <sup>[16]</sup>

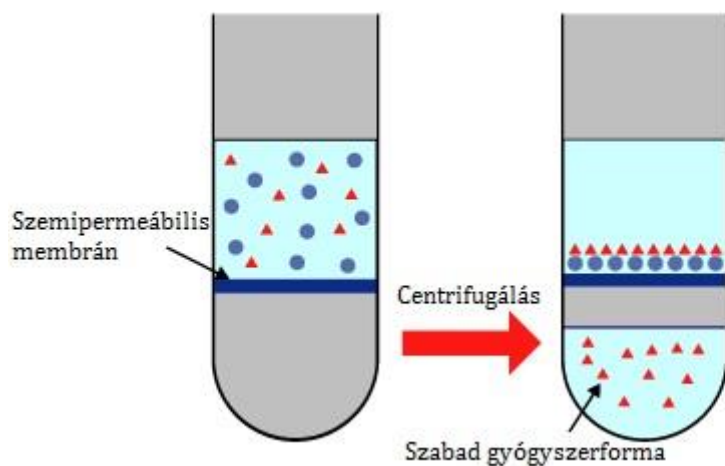
A fehérjekötődés számítása céljából az elválasztást követően először meg kell határozni a szabad gyógyszerforma koncentrációját. A kötött forma mennyisége a teljes és a szabad gyógyszerforma különbségéből adódik. A százalékos fehérjekötődés (Plasma Protein Binding%, PPB%) a következő képlet segítségével számítható ki:

$$PPB\% = \frac{[B] - [A]}{[B]} * 100\%$$

1. egyenlet: A PPB% számítása

ahol [B] a teljes gyógyszer-koncentráció, míg [A] a szabad gyógyszerforma koncentrációja. <sup>[21]</sup>

Az ultraszűrés során a szabad és a kötött gyógyszerformát tartalmazó elegyből egy szelektív, szemipermeábilis membránon keresztül vákuum, pozitív nyomás vagy centrifugálás segítségével a szabad gyógyszerforma kinyerhető/elválasztható. (6.ábra) A módszer előnye, hogy a 96 lyukú mikrotiter tálca egyszerű, gyors mérést tesz lehetővé. <sup>[22][23][24]</sup> Hátránya a komponensek adszorpciójának lehetősége a membránon, illetve az eszközön magán, valamint a fehérje szivárgása a szűrletbe, ami nagy fehérjekötődésű anyagok vizsgálatakor a szabad frakció hibás meghatározásához vezethet. <sup>[16]</sup>



6. ábra: Ultraszűrés centrifugálás segítségével <sup>[25]</sup>

Az ultracentrifugálás során  $10^5G$  nagyságú centrifugális erő segítségével választható el a vizes fázis a fehérjét tartalmazó anyagtól. <sup>[26]</sup> Membrán hiányában a módszerrel minimalizálható a membránon történő nem specifikus kötődés, és elhanyagolható mértékűre csökkenti az ozmotikus térfogat ingadozását. Hátránya, hogy nagy mennyiségű plazmára van szükség a vizsgálathoz (2ml/minta), és 12-16 órát is igénybe vehet egy mérés. Új problémák léphetnek fel, mint az ülepedés, visszadiffundálás és a viszkozitás, melyek ronthatják az elválasztás hatásfokát, lassítják a folyamatot, emellett fenn áll a lehetősége a plazma-víz határreteg lipoproteinnel történő szennyezésének. <sup>[27]</sup>

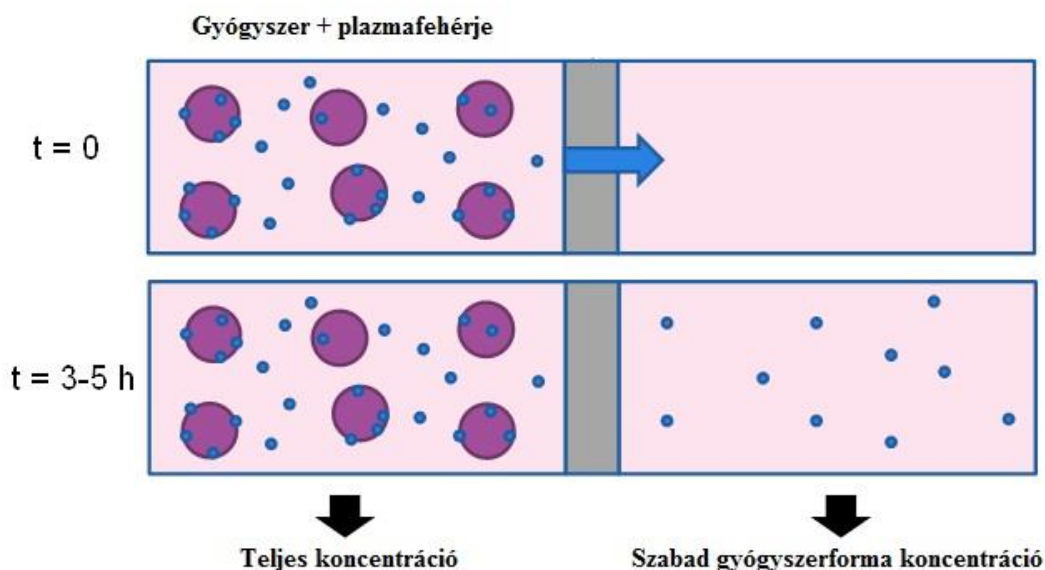
Egyensúlyi dialízis <sup>[28][29][30]</sup> esetén két kamrát választanak el egy szelektív szemipermeábilis membránnal. Az egyik kamra tartalmazza a plazma „retentátot”, a másik a „dializátot”. A gyógyszert és a plazmát a „retentát” oldali kamrába adagolják, és különböző

ideig (6-24h) inkubálják, fiziológiásan releváns hőmérsékleten (37°C). Ezt követően a két kamrából mintát véve meghatározzák a kialakult hatóanyag koncentrációkat. (7.ábra) Előnye nagy áteresztőképessége, amit a 96 lyukú mikrotiter tálca biztosít. <sup>[16]</sup> A túl hosszú inkubálási idő megghamisíthatja a mérési eredményeket, mivel a plazma degradálódhat, illetve az instabil gyógyszermolekulák kémiai átalakulása is bekövetkezhet, <sup>[31]</sup> továbbá a pH esetleges változása is hatással lehet a fehérjekötődésre. <sup>[32][33]</sup> A membrán-adszorpció és a nem-specifikus kötődés szintén befolyásolja az egyensúlyt. Hosszú inkubálás során a víz ozmózisnyomás miatti vándorlása a szemi-permeabilis membránon keresztül térfogat eltolódást okozhat. Így a retentát oldal hígul, ami a pH és az ionerősség változása miatt hatással lehet a fehérje kötődésre is. <sup>[16]</sup> A térfogatváltozás okozta hiba a Boudinot egyenlet <sup>[16]</sup> segítségével korrigálható.

$$fu_p = 1 - \frac{(C_{plazma} - C_{puffer}) * \left( \frac{V_{plazma}^{végső}}{V_{plazma}^{kezdeti}} \right)}{(C_{plazma} - C_{puffer}) * \left( \frac{V_{plazma}^{végső}}{V_{plazma}^{kezdeti}} \right) + C_{puffer}}$$

2. egyenlet: Boudinot-egyenlet

Töltéssel rendelkező fehérjék befolyásolhatják a kis molekulatömegű ionok vándorlását, ami ezek egyenetlen eloszlását okozza a membrán két oldalán. Izotóniás pufferek használatával ez a hiba korrigálható. <sup>[16]</sup> Számos kísérletet tettek az egyensúlyi dialízis áteresztőképességének növelésére, ezek eredményeként fejlesztették ki a gyors egyensúlyi dialízist (rapid equilibrium dialysis, RED), mely módszer rövidebb kísérleti időt és irányítható automatizálást tesz lehetővé. A dialízis cella megnövekedett felülete a térfogatához képest nemcsak lerövidíti a méréseket, hanem a térfogatváltozás hibáját is minimalizálja. <sup>[34]</sup>



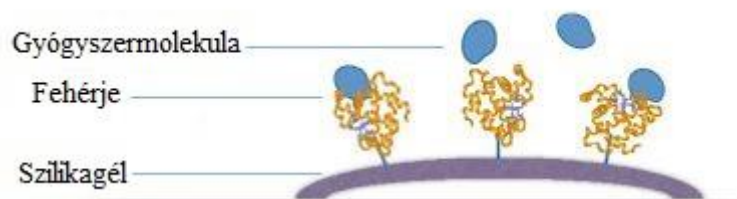
7. ábra: Egyensúlyi dialízis <sup>[35]</sup>

A korábban leírt módszereket helyettesítő nagy áteresztőképességű kromatográfiás módszerekről számos irodalmi adat áll rendelkezésre. <sup>[36][37]</sup> Ezeknél a méréseknél a vizsgálni kívánt fehérje (HSA, AAG) szilikagél állófázishoz kötve, immobilizált állapotban van. (8.ábra) A mérés során az úgynevezett kromatográfiás retenciós faktor, vagy kapacitásfaktor értékét vizsgáljuk, mely közvetlen kapcsolatban van az álló-, illetve a mozgófázisban lévő molekulák arányával.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

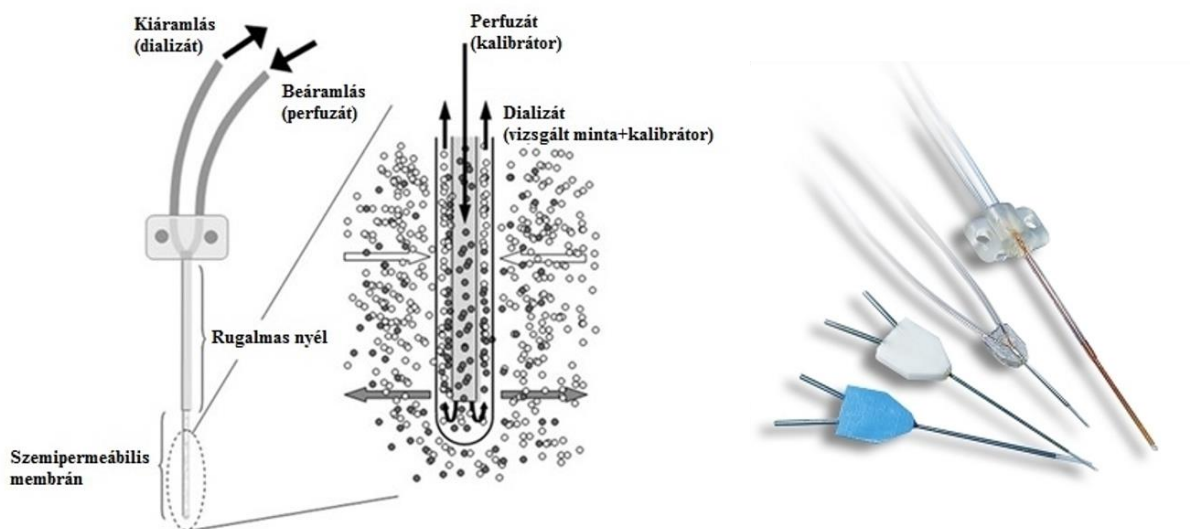
3. egyenlet: A kapacitásfaktor számítása izokratikus mérési körülmények között

Így ebből az értékből a vizsgált molekula adott fehérjéhez való kötődése számítható. A mérés hitelessége azon a feltételezésen alapszik, hogy az immobilizált fehérje megőrzi kötőspecifitását és konformációs mobilitását. Ezt igazolandó, a mérések előtt kalibrálni szükséges az oszlopot. Mérési hibát okozhat, hogy lehetőség van a szabad szilanol csoportokkal nem-specifikus kötődésre a szilikagél állófázisához. Annak ellenére, hogy ez a mérési módszer nem tartalmazza a teljes plazmát, csak egyetlen fehérjét vizsgál, valamint módszertől függően nagy koncentrációkban alkalmazhat (akár 30%) szerves oldószereket, a humán szérum albuminnal módosított állófázisok alkalmazásával jó korrelációt tapasztaltak a mért fehérjekötődés és az irodalmi kötődési adatok között. <sup>[15][38]</sup>



8. ábra: A szilikagél állófázison immobilizált fehérjék [39]

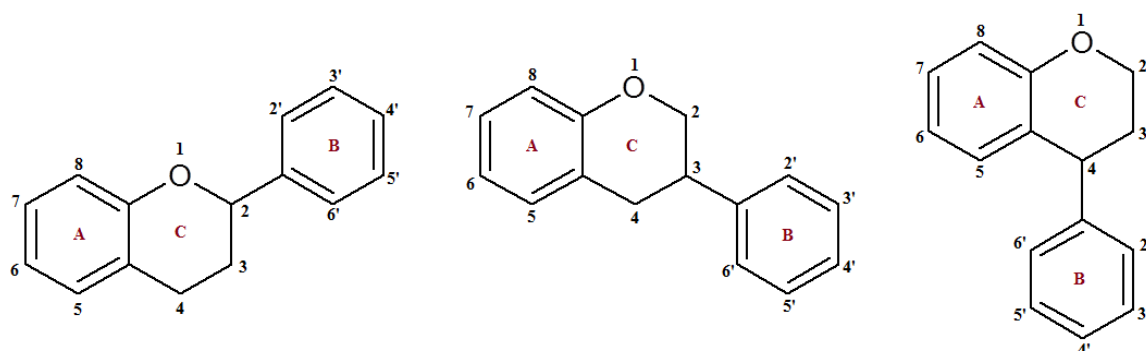
A szabad gyógyszerhányad pontos *in vivo* meghatározása összetett és bonyolult feladat, de mikrodialízissel ezen a téren is sikerült jó eredményeket elérni. A mikrodialízis alkalmazásakor a vizsgálni kívánt szövetbe egy üreges rostból készült szondát helyeznek, mely permeabilis a víz és kis mólsúlyú molekulák számára. A perfúzió során kétirányú áramlás történik. (9.ábra) A dializát minták hagyományos HPLC-MS módszerekkel vizsgálhatók. A hagyományos vérből vett mintákkal szemben a módszer előnye a fehérjementes minták gyűjtésének lehetősége, mely lehetővé teszi a szabad gyógyszerforma koncentrációjának meghatározását. A hagyományos vérből vett minták és a mikrodialízis együttes alkalmazásával a szabad és a teljes gyógyszer mennyiség meghatározható. A gyógyszerkutatásban nem elterjedt módszer, mivel hiába ad pontos eredményt *in vivo* körülményekre, túlságosan komplex a hagyományosnak mondható *in vitro* vizsgálatokhoz képest. [40][41]



9. ábra: A mikrodialízis folyamata, és eszköze [42][43]

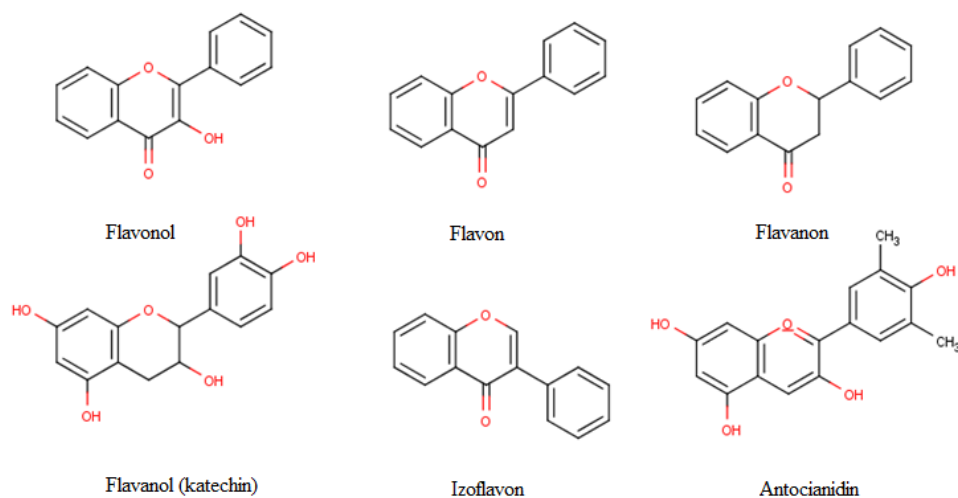
#### 4.4.Flavonoidok

A flavonoidok a magasabb rendű növények majdnem minden családjában előforduló szekunder metabolitok, melyek számos előnyös farmakológiai hatása ismert. Nagy szerkezeti diverzitást mutatnak, több mint 6000 különböző flavonoid vegyületet írtak le ez idáig. [7] Kémiai szerkezetüket tekintve oxigéntartalmú heterociklusos vegyületek, amelyek a 2-fenilbenzopiron gyűrűrendszer származékai. A B-gyűrű elhelyezkedése alapján három szerkezeti izomert különböztetünk meg: izoflavonoidok, neoflavonoidok és flavonoidok. [44] (10.ábra)



10. ábra: A flavonoid, izoflavonoid és neoflavonoid vegyületek váza [45]

A szűkebb értelemben vett flavonoidok közé a flavonok, flavonolok (3-hidroxi-flavonok), flavanonok (2,3-dihidro-flavonok), flavanonolok (3-hidroxi-2,3-dihidro-flavonok) tartoznak. [44] (11.ábra) Ezen csoportokon belül megkülönböztethetünk glikozidokat és aglikonokat, attól függően, hogy tartalmazznak-e cukor szubsztituenst. Glikozidok esetében a glikozid csoport, mely lehet L-ramnóz, D-glükóz, glükoramnóz, galaktóz vagy arabinóz, az aglikon váz 3-as vagy a 7-es pozícióját foglalja el. [46]

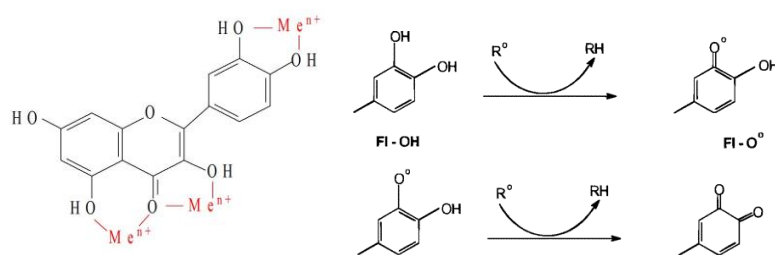


11. ábra: Flavonoid osztályok [47]

A zöldségek és gyümölcsök bőségesen tartalmazzák flavonoid vegyületek széles szerkezeti körét. A teljesség igénye nélkül néhány növény, melyben nagyobb mennyiségben megtalálható valamely flavonoid származék: japánakác, pohánka, rutafű, legyezőfű, kökényvirág, nyírfalevél, vadárvácska, aranyvessző, bodza, homoki szalmagyopár, akácvirág, körömvirág, ginkgo biloba, tövises iglice; valamint néhány jelentős flavonoid tartalmú zöldség és gyümölcs: alma, sárgabarack, fekete áfonya, cseresznye, fekete ribizke, szőlő, körte, szilva, narancs, hagyma, burgonya, paradicsom. Általánosságban elmondható, hogy a zöldségek és gyümölcsök nagy mennyiségben tartalmazzák a flavonoid vegyületek számos fajtáját. [50]

A flavonoidok a növényekben elsősorban glikozidok formájában vannak jelen. A glikozidok vízzoldhatóak, a sejtek belsejében raktározódnak, vagyis a növényi szövet szerves részét képezik. A szabad aglikon forma ritkán fordul elő, bizonyos növény családokra korlátozódik: rutafélék, árvacsalánfélék, fűzfafélék, gyömbérfélék, vassfűfélék, őszirózsafélék. A flavonoidok gyógyhatásáért jellemzően a glikozidokból felszabaduló aglikonok felelősek. [50]

Ezen hatások alapvetően szerkezetfüggőek, úgy mint a flavonoid osztálya, hidroxil csoportok és egyéb szubsztituensek száma, konjugáció és polimerizációs fok. [51] Gyógyhatásaik közé tartozik a májvédő [52], antibakteriális [53][54][55][56], gyulladás-csökkentő [57][58], rákellenes [54][59] és vírusölő [60] tulajdonságok, valamint az egyik legfontosabb, az antioxidáns [51][61] hatás, amit a keringésbe kerülve fejtenek ki: képesek kelátkomplexet képezni a fémionokkal, illetve elreagálnak a szabad gyökökkel. [62][63] (12.ábra)



12. ábra: Flavonoidok antioxidáns hatása [64][65]

A flavonoidok felszívódása a szervezetben fizikai-kémiai tulajdonságaiktól függ, mint a molekulatömeg, konfiguráció, lipofilitás, oldhatóság,  $pK_a$ . Az aglikonok passzív diffúzió útján legnagyobb mennyiségben a vékonybélben képesek felszívódni, míg ezen a helyen a glikozidok csak a cukorcsoport enzimkatalizált hidrolízisét követően, vagy a  $Na^+$ -glükóz kotranszporter segítségével abszorbeálódhatnak. [66][67] Kisebb mennyiségben, de a vastagbél enzimszere által lebontva is átjuthatnak a bél hámsejtjein. [68] A felszívódást követően a flavonoidok a keringésbe kerülnek, ahol megemelik a vér antioxidáns szintjét. [69]

A flavonoid aglikonok oldhatósága a terápiás hatékonyságban játszhat nagy szerepet. Alacsony oldódásuk vízben a gasztrointesztinális rendszerben való rövid tartózkodással párosítva alacsonyabb abszorpciót eredményezhet, ami megvédi a fogyasztót a flavonoidok akut toxicitásától, a ritkán tapasztalható allergiát kivéve. Gyenge vízdoldhatóságuk gyógyszerként való felhasználásuk egyik jelentős problémája. Ebből kifolyólag félszintetikus, vízdoldható flavonoid származékokat állítottak elő, mint például inozitol-2-foszfátquercetin, a magas vérnyomás kezelésére, a diosmin (módosított heszperidin, Detralex®) és a monoxerutin (hidroxietil-rutozid, Venoruton®), melyek érvédő hatású gyógyszerek hatóanyagai. [70][68]

A flavonoidoknak tulajdonítható számos gyógyhatásnak köszönhetően az utóbbi években exponenciálisan nőtt a fellelhető irodalmi adat ebben a témában [71][72]. A szintetikus gyógyszerek életképes alternatívái lettek a szervezetre gyakorolt széleskörű jótékony hatásuknak köszönhetően. [52][70][73][74] Ezek a hatások, illetve más gyógyszerekkel történő esetleges kölcsönhatások a plazma transzportfehérjéihez való kötődésüktől nem elhanyagolható mértékben függenek, ezért a flavonoidok fehérjekötődésének paramétereit és mechanizmusát rendkívül fontos megismerni. [75][76]

A fehérjekötődés a gyógyhatáshoz hasonlóan szerkezetfüggő. A szerkezet bizonyos elemei jól meghatározhatóan befolyásolják a szérum albuminhoz való kötődést, és ezáltal a gyógyhatás kialakulását. Ezek az elemek a hidroxil-csoportok száma és pozíciója az A, B, és C gyűrűben, a metoxi-csoportok száma és pozíciója, a glikozid-csoportok minősége, mennyisége, és pozíciója, valamint a C gyűrűben a C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> kettős kötés jelenléte, vagy hiánya. Ezen motívumok hatásáról a HSA kötődésre rendelkezésre állnak irodalmi adatok. [77][78]

Az A gyűrű a 7-es pozíciójában megjelenő első hidroxil-csoport nagyban növeli a kötődést, azonban további hidroxil-csoportok csökkentik azt. [77][78][79][80] Minden esetben nő a fehérjekötődés erőssége a B gyűrűn található hidroxil-csoportok számának növekedésével. [77][79][80][81] A C gyűrűben csak a 3-as pozícióba kapcsolódhat a molekulához hidroxil-csoport, ez befolyásolja a B gyűrű rotációját, ezzel megváltoztatja az albuminkötődés erősségét. [79][82][83][84] A hidroxil-csoportok metiláltsága növeli a szérum albuminhoz való kötődés erősségét. [85][77][79][86] A glikozid csoportok hatása az albuminhoz való kötődés erősségére nem egységes, függ a cukor-csoport típusától és pozíciójától, de összességében csökkenti a kötődés mértékét. A szakirodalomban a flavonoid-glikozidok fehérjekötődésével kapcsolatban csak BSA (bovine serum albumin) kötődésre vonatkozó adatok találhatók. [77][81][87] A C gyűrűben található C<sub>2</sub> és C<sub>3</sub> szénatomok közötti kettős kötés jelenléte

befolyással van a molekula konjugációjára, aminek köszönhetően a kötés erőssége a fehérjéhez növekszik. [79][88]

A gyógyszerkutatás késői szakaszában a gyógyszerjelölt molekulák jelentős lemorzsolódása miatt a felszívódási, eloszlási, és egyéb farmakokinetikai tulajdonságok vizsgálatára komoly hangsúlyt fektetnek a kutatás korai szakaszában. Ezért szükség van nagy áteresztőképességű mérőmódszerekre a fizikai tulajdonságok, a membrán-interakció és a plazmafehérje-kötődés vizsgálatára. A kutatás ezen fázisában a paraméterek pontos meghatározása nem alapvetően fontos, de a vegyületek mért értékeinek reprodukálható rangsorát szükséges felállítani. Ez lehetővé teszi a farmakokinetikai paraméterek fejlesztését a molekula elsődleges biológiai aktivitásának csökkentése nélkül. [15] A flavonoidok HSA-hoz való kötődéséről, illetve a szerkezeti elemek kötődésre gyakorolt hatásáról szóló irodalmi adatok azonban nem egységesek, hiányosak. Minthogy ezek a vegyületek számos gyógyhatással rendelkeznek, felszintetikus gyógyszerhatóanyagok előállításának kiinduló pontjai, valamint étrend kiegészítők, gyógynövény alapú készítmények, élelmi növények fontos összetevői lehetnek, farmakokinetikájuk, ezen belül plazmafehérje-kötődésük ismerete kiemelkedően fontos, mind terápiás hatásuk, mind az esetleges gyógyszer interakciók szempontjából.

## 5. Célkitűzés

Célunk egy olyan nagy áteresztőképességű HPLC módszer validálása volt, mellyel a flavonoid vegyületek albuminhoz való kötődése gyorsan, reprodukálhatóan mérhető. Az eredmények segítségével a flavonoidok humán szérum albuminhoz való kötődésének a molekulák szerkezetével való összefüggését kívántuk feltárni.

## 6. Anyagok és módszerek

A referenica vegyületeket a Sigma Aldrich-tól (St. Louis, USA) rendeltük.

A mérések megkezdése előtt a referenciavegyületek és a vizsgálandó flavonoidok  $\log P$  és  $\log D$  (pH=7,0; 7,2; 7,4), értékeire, molekulatömegére, és szerkezeti képletére vonatkozó adatokat MarvinSketch (ChemAxon Kft.) program segítségével gyűjtöttük össze. A mintákat 0,5mg/ml koncentrációban, 50mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$  és 2-propanol 1:1 arányú keverékében oldva készítettük el. [15]

A vegyületek integritását a következő HPLC-MS módszer segítségével vizsgáltuk:

- **Műszer:** Agilent 1100 HPLC-SQ6120

- **Oszlop:** KINETEX-XB C18 50mm x 2,1 mm ; 2,6  $\mu$ m; 40 °C
- **Áramlási sebesség:** 0,75 ml/perc
- **Eluens:** A=0,1% TFA/víz B=95% ACN-5% víz, 0,1% TFA
- **Gradiens:**

|          |      |   |
|----------|------|---|
| 0 min    | 0%   | B |
| 4 min    | 100% | B |
| 7 min    | 100% | B |
| 7,01 min | 0%   | B |

- **MS:** pozitív ion mód;  $m/z$  100-800; Fragmentor feszültség: 50 V, szárítógáz: 12 l/min N<sub>2</sub>; 350 °C; p=60 psi
- **DAD:**
  - ❖ A: 240  $\pm$  25 nm
  - ❖ B: 290  $\pm$  25 nm
  - ❖ C: 340  $\pm$  25 nm
  - ❖ UV Spektrum: 200-400 nm

A fehérjekötődés vizsgálata során az állófázison immobilizált Humán Szérum Albumin (HSA) oszlopot használtunk. A mozgófázis pH=7,4 puffert tartalmazott (ami a 2-propanol koncentrációjától függően pH=7,4-7,9 tartományban mozgott), aminek segítségével a fiziológiás körülményeket szerettünk volna közelíteni. Gyors gradienst alkalmaztunk 30% 2-propanolig, mivel a flavonoidok albuminkötődését a magas tartományba vártuk. Az UV detektálás a flavonoidokra jellemző 254 nm-en történt. A post time 10 perc volt.

- **Műszer:** Agilent 1100 HPLC-SQ6120
- **Oszlop:** Chromtech CHIRAL-HSA 50 mm x 3,0 mm ; 5,0  $\mu$ m; 30 °C
- **Áramlási sebesség:** 0,75 ml/perc
- **Eluens:** A: 50 mM ammónium-acetát (pH=7,4) B: 2-propanol
- **Gradiens:**

|              |       |   |
|--------------|-------|---|
| 0→1 min      | 0%    | B |
| 1→4 min      | 0→30% | B |
| 4→20 min     | 30%   | B |
| 20→20,01 min | 30→0% | B |

- **MS:** pozitív ion mód;  $m/z$  100-800; Fragmentor feszültség=50 V, szárítógáz: 12 l/min N<sub>2</sub>; 350 °C; p=60 psi

- **DAD: 254 nm**
- **Fehérjekötődés számítása:**

$$PPB\% = \frac{101 * 10^{\log K}}{1 + 10^{\log K}}$$

4. egyenlet: A fehérjekötődés számítása

A flavonoidok HSA-kötődésének mérésére alkalmas módszerünket egy, az irodalomból ismert mérőmódszer módosításával dolgoztuk ki. [15] Növeltük a szerves oldószer arányát a mozgófázisban, alacsonyabb áramlási sebességet állítottunk be, és más gradienssel dolgoztunk annak érdekében, hogy a módszer az általunk mérni kívánt vegyületekre legyen specializálva. A hatóanyagok fehérjekötődését (Plasma Protein Binding, PPB) irodalmi adatokból gyűjtöttük össze. [15]

- **A kapacitásfaktor logaritmusának (logk) számítása:**

$$\log k = \log \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

5. egyenlet: A logk számítása az izokratikus szakaszokon

$$\log k = \left( t_R - \frac{t_0}{b} \log(2,3b) - t_0 - t_D \right) \frac{b}{t_0} \quad b = \frac{V_m \Delta \phi S}{t_{GF}}, \text{ ahol}$$

- ❖ logk: a kapacitásfaktor logaritmus
- ❖  $T_R$ : retenciós idő
- ❖  $t_0$ : holtidő
- ❖  $V_m$ : kolonna holtterfoglata (0,247ml)
- ❖  $\Delta \phi$ : vizes eluens térfogatarányának változása a mozgó fázisban a gradiens szakasz alatt (0,3)
- ❖ S: konstans (4,2)
- ❖  $t_G$ : a gradiens szakasz ideje (3perc)
- ❖ F: áramlási sebesség (0,75ml/perc)
- ❖  $t_D$ : gradiens késleltetési idő (2,8perc)

6. egyenlet: A logk számítása a gradiens szakaszon [89]

## 7. Eredmények

A flavonoidok humán szérum albuminhoz való kötődésének vizsgálata előtt a fejlesztett módszer validálására volt szükség. Ehhez 10 darab ismert *in vivo* HSA kötődésre vonatkozó adattal rendelkező gyógyszerhatóanyagot választottunk ki. A kiválasztás során több szempontot is figyelembe vettünk: a fehérjekötést, a  $\log P$  és a  $\log D_{pH7,4}$  értékeket széles spektrumon

szerettük volna vizsgálni, ugyanakkor 90%-os kötődés felett több mérést is végeztünk, mivel a flavonoidok fehérjekötését ebbe a tartományba vártuk. <sup>[77]</sup> Ezeken kívül savas, semleges és bázikus vegyületeket is igyekeztünk a vizsgálandó vegyületcsoportban összegyűjteni.

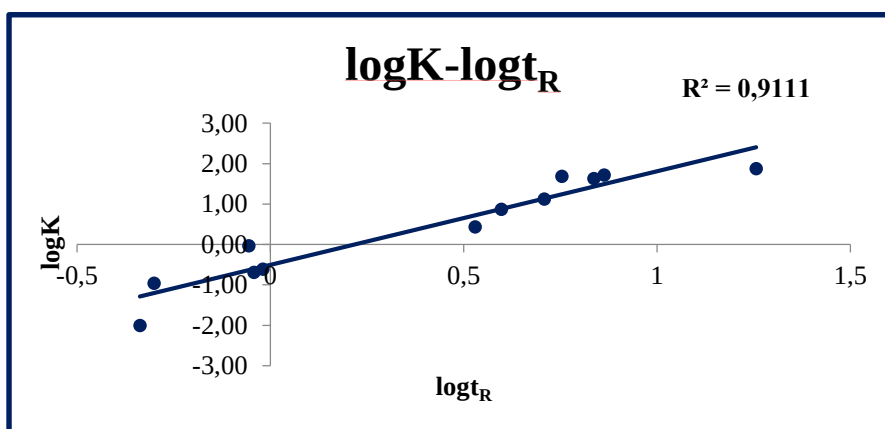
A kiválasztott gyógyszermolekulák integritás vizsgálatát is elvégeztük a fehérjekötődésük vizsgálata előtt, megfelelő eredménnyel, vagyis az összes hatóanyag tisztasága 95% fölötti volt.

A validálás során minden mérést három párhuzamossal végeztünk. A validálás eredménye az 1. táblázatban látható (\*3 párhuzamos mérés alapján).

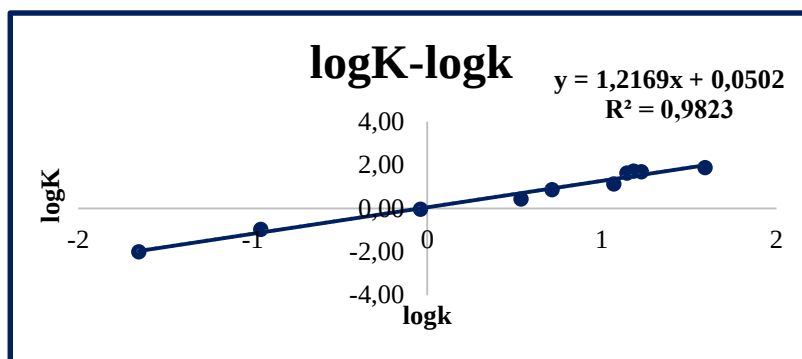
1. táblázat: A validálás eredménye

|              | $t_R$ átlag* | RSD% | logk  | log $t_R$ | logK (lit.) | clogP | clogD (pH=7,4) |
|--------------|--------------|------|-------|-----------|-------------|-------|----------------|
| aspirin      | 0,88         | 0,00 | -0,04 | -0,06     | -0,03       | 1,24  | -2,16          |
| fluoxetine   | 5,11         | 0,00 | 1,07  | 0,71      | 1,13        | 4,17  | 1,83           |
| naproxen     | 18,05        | 0,75 | 1,59  | 1,26      | 1,88        | 2,99  | -0,05          |
| warfarin     | 5,68         | 0,10 | 1,23  | 0,75      | 1,69        | 2,74  | 1,65           |
| ketoprofen   | 6,87         | 0,08 | 1,14  | 0,84      | 1,63        | 3,61  | 0,39           |
| carbamazepin | 3,39         | 0,00 | 0,54  | 0,53      | 0,44        | 2,77  | 2,77           |
| isoniazid    | 0,46         | 0,00 | -1,65 | -0,34     | -2,00       | -0,69 | -0,69          |
| phenytoin    | 3,96         | 0,00 | 0,72  | 0,60      | 0,87        | 2,15  | 2,14           |
| quercetin    | 7,31         | 1,84 | 1,18  | 0,86      | 1,72        | 2,16  | 1,14           |
| metronidazol | 0,50         | 0,00 | -0,95 | -0,30     | -0,96       | -0,46 | -0,46          |

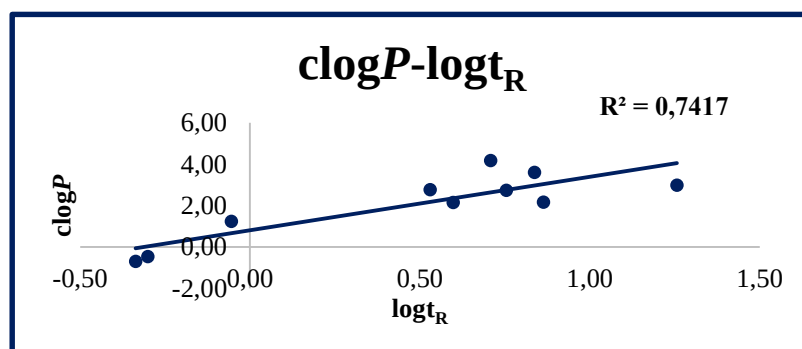
Az adatok kiértékelése során az összefüggéseket az irodalmi fehérjekötődés (logK), a clogP és clogD<sub>pH7,4</sub> értékek, és az általunk mért retenciós idők logaritmusai (log $t_R$ ), valamint az ebből számolt kapacitásfaktor logaritmusai között vizsgáltuk. (1.-6. diagram)



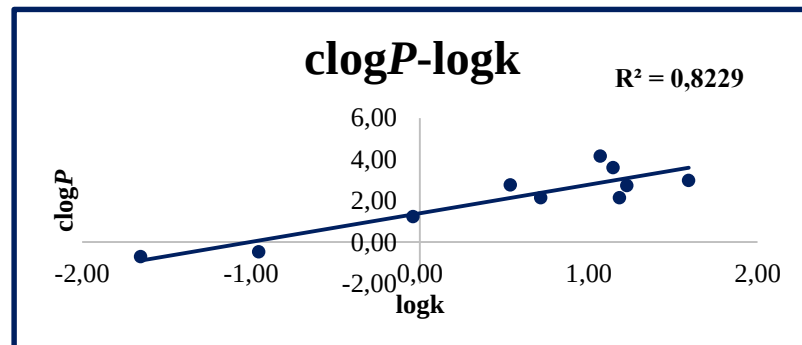
1. diagram: A fehérjekötődés és a retenciós idők logaritmusának kapcsolata



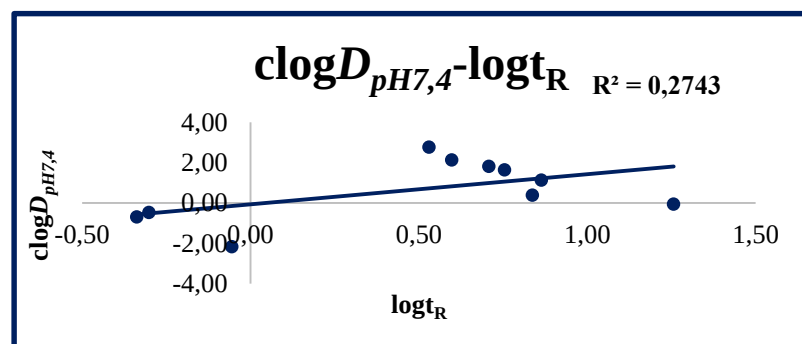
2. diagram: A fehérjekötődés és a kapacitásfaktor logaritmusának kapcsolata



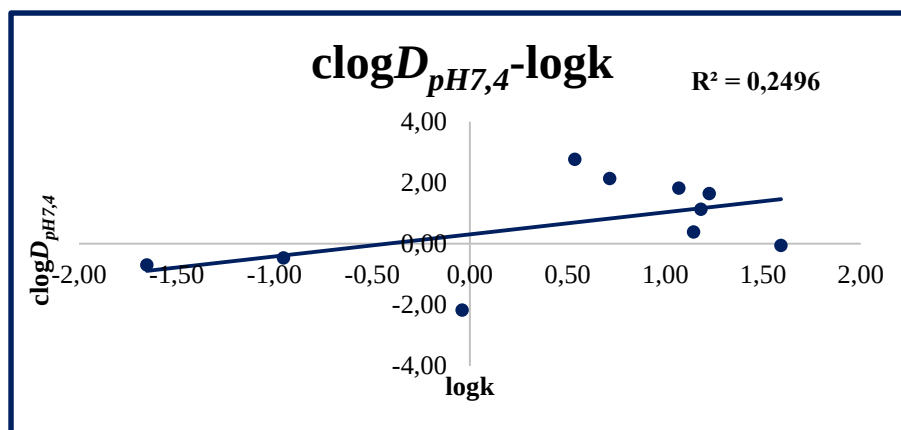
3. diagram: A clogP és a retenciós idők logaritmusának kapcsolata



4. diagram: A clogP és a kapacitásfaktor logaritmusának kapcsolata



5. diagram: A clogD<sub>pH7,4</sub> és a retenciós idők logaritmusának kapcsolata



6. diagram: A  $clogD_{pH7,4}$  és a kapacitásfaktor logaritmusának kapcsolata

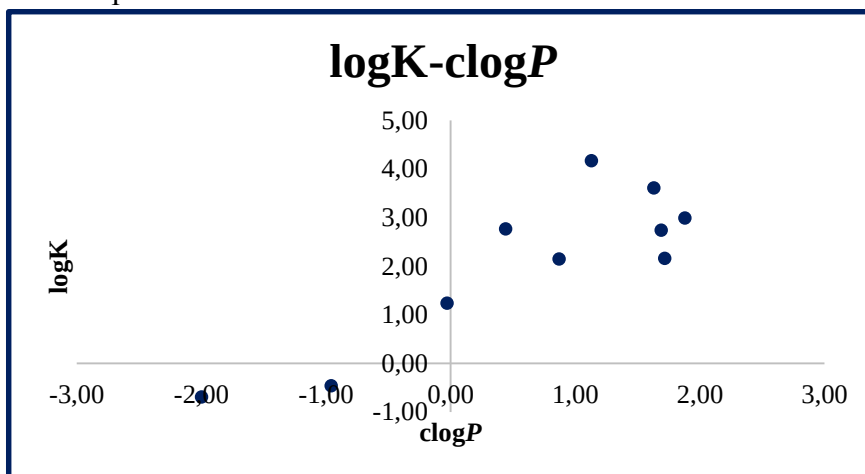
A mérési eredmények kiértékelése során jó összefüggést sikerült azonosítani az irodalmi adatok és a saját mérési adataink között. A legjobb korrelációt a  $\log k$ - $\log K$  összefüggés mutatta, ezért a továbbiakban ezt használtuk fel.

$$y=1,2169x+0,0502$$

$$R^2=0,9823$$

7. Egyenlet: A HSA-kötődés számítására használt egyenlet

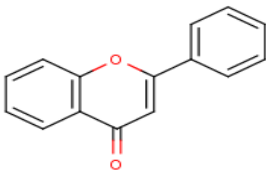
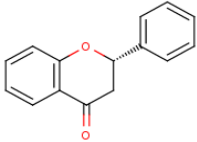
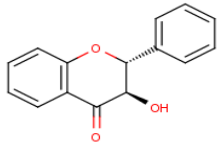
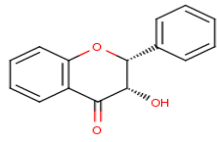
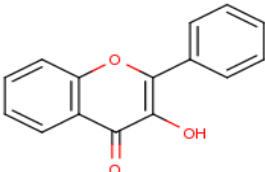
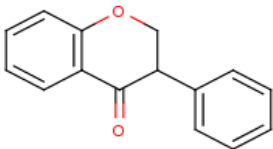
A  $clogP$  és  $clogD_{pH7,4}$  értékekkel az általunk mért értékek nem mutattak jó korrelációt, de észre kell venni, hogy a  $clogP$  értékek növekedésével a fehérjekötés erőssége is növekszik. (7.diagram) Előbbi összefüggés alátámasztja a szilárd hordozóhoz kötött HSA és a hatóanyagok között kialakuló komplex kölcsönhatás kialakulását.



7. diagram: A fehérjekötődés és a lipofilitás kapcsolata

A sikeres kalibrációt követően megkezdtük a flavonoid vegyületek vizsgálatát. 25 db különböző flavonoidot gyűjtöttünk össze. (2.táblázat) Vizsgálatainkban igyekeztünk szerkezetileg minél diverzebb vegyületekört kiválasztani. Néhány esetben az aglikonok glikozidjai is rendelkezésünkre álltak, így vizsgálni tudtuk a cukor típusú csoportok hatását is a flavonoidok HSA kötődésére.

2. táblázat: A vizsgált flavonoid vegyületek

| flavonoid csoport | általános szerkezet                                                                 | név                          | clogP | clogD (pH=7,4) |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-------|----------------|
| flavon            |    | <b>luteolin</b>              | 2,40  | 1,56           |
|                   |                                                                                     | <b>luteolin-7-O-glükozid</b> | 0,14  | 0,08           |
|                   |                                                                                     | <b>apigenin</b>              | 2,71  | 1,87           |
|                   |                                                                                     | <b>apigenin-7-O-glükozid</b> | 0,44  | 0,39           |
|                   |                                                                                     | <b>acacetin</b>              | 2,85  | 2,03           |
|                   |                                                                                     | <b>baicalin</b>              | 0,76  | -2,47          |
|                   |                                                                                     | <b>apiin</b>                 | -0,84 | -0,89          |
|                   |                                                                                     | <b>krizin</b>                | 3,01  | 2,19           |
|                   |                                                                                     | <b>amentoflavon</b>          | 5,09  | 3,09           |
| flavanon          |    | <b>heszperetin</b>           | 2,68  | 2,56           |
|                   |                                                                                     | <b>naringenin</b>            | 2,84  | 2,72           |
| flavanonol        |   | <b>taxifolin</b>             | 1,82  | 1,67           |
| flavan-3-ol       |  | <b>katechin</b>              | 1,80  | 1,78           |
| flavonol          |  | <b>kvercetin</b>             | 2,16  | 1,14           |
|                   |                                                                                     | <b>kvercitrin</b>            | 0,90  | -0,11          |
|                   |                                                                                     | <b>kempferol</b>             | 2,46  | 1,44           |
|                   |                                                                                     | <b>galangin</b>              | 2,76  | 1,78           |
|                   |                                                                                     | <b>rutin</b>                 | -0,87 | -1,88          |
|                   |                                                                                     | <b>izoramnetin</b>           | 2,30  | 1,31           |
|                   |                                                                                     | <b>izokvercitrin</b>         | -0,14 | -1,16          |
|                   |                                                                                     | <b>ramnetin</b>              | 2,30  | 2,21           |
|                   |                                                                                     | <b>miricetin</b>             | 1,85  | 0,78           |
|                   |                                                                                     | <b>miricitrin</b>            | 0,60  | -0,46          |
| izoflavon         |  | <b>genistein</b>             | 3,08  | 2,22           |
|                   |                                                                                     | <b>daidzein</b>              | 2,73  | 1,77           |

A HSA-kötődés mérésének megkezdése előtt a flavonoid minták integritását is vizsgáltuk, így tisztasági problémák miatt az izoramnetint, acetint és a ramnetint el kellett hagynunk a vizsgálandó vegyületek közül. A többi vegyület tisztasága 95% fölötti volt, így alkalmasak voltak a mérésre.

Végül 21 különböző flavonoid vegyület retencióját mértük a HSA-val töltött oszlopon. (3.táblázat) A retenciós idők segítségével számolt fehérjekötődési adat egy kivétellel minden esetben 90% fölött volt, így helyesnek bizonyult a flavonoidok fehérjekötődésére vonatkozó feltevésünk a kalibráció során.

3. táblázat: Flavonoidok HSA kötődése

|            | <b>név</b>                   | <b>t<sub>R,átlag</sub>*</b> | <b>RSD%</b> | <b>logk</b> | <b>logK</b> | <b>%PPB</b>        |
|------------|------------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------------|
| flavon     | <b>luteolin</b>              | 6,48                        | 0,47        | 1,13        | 1,32        | <b>96,40±0,03%</b> |
|            | <b>luteolin-7-O-glükozid</b> | 5,89                        | 1,58        | 1,08        | 1,27        | <b>95,82±0,09%</b> |
|            | <b>apigenin</b>              | 6,16                        | 0,09        | 1,10        | 1,29        | <b>96,10±0,01%</b> |
|            | <b>apigenin-7-O-glükozid</b> | 4,72                        | 0,00        | 0,95        | 1,10        | <b>93,65±0,00%</b> |
|            | <b>apiin</b>                 | 4,31                        | 0,13        | 0,82        | 0,95        | <b>90,82±0,01%</b> |
|            | <b>baicalin</b>              | 7,46                        | 0,54        | 1,19        | 1,40        | <b>97,14±0,01%</b> |
|            | <b>amentoflavon</b>          | 11,96                       | 0,32        | 1,41        | 1,66        | <b>98,85±0,03%</b> |
|            | <b>krizin</b>                | 8,07                        | 0,14        | 1,23        | 1,45        | <b>97,50±0,01%</b> |
| flavonol   | <b>kvercetin</b>             | 7,31                        | 1,84        | 1,18        | 1,39        | <b>97,04±0,13%</b> |
|            | <b>kvercitrin</b>            | 5,22                        | 0,62        | 1,10        | 1,29        | <b>96,11±0,03%</b> |
|            | <b>kempferol</b>             | 6,52                        | 0,09        | 1,13        | 1,32        | <b>96,43±0,01%</b> |
|            | <b>galangin</b>              | 7,47                        | 0,08        | 1,19        | 1,40        | <b>97,15±0,01%</b> |
|            | <b>rutin</b>                 | 4,21                        | 0,00        | 0,79        | 0,91        | <b>90,03±0,00%</b> |
|            | <b>izokvercitrin</b>         | 5,34                        | 0,19        | 1,14        | 1,34        | <b>96,55±0,01%</b> |
|            | <b>miricitrin</b>            | 5,75                        | 1,48        | 1,27        | 1,49        | <b>97,84±0,00%</b> |
| flavanon   | <b>naringenin(1.e.nant.)</b> | 5,64                        | 0,00        | 1,23        | 1,45        | <b>97,53±0,00%</b> |
|            | <b>naringenin(2.e.nant.)</b> | 5,78                        | 0,00        | 1,28        | 1,50        | <b>97,91±0,00%</b> |
|            | <b>hesperetin(1.e.nant.)</b> | 5,32                        | 0,00        | 1,13        | 1,33        | <b>96,48±0,00%</b> |
|            | <b>hesperetin(2.e.nant.)</b> | 5,52                        | 0,10        | 1,19        | 1,40        | <b>97,16±0,01%</b> |
| flavanonol | <b>taxifolin</b>             | 4,98                        | 0,12        | 1,03        | 1,20        | <b>95,05±0,01%</b> |
| izoflavon  | <b>genistein</b>             | 5,83                        | 0,17        | 1,29        | 1,52        | <b>98,04±0,01%</b> |
|            | <b>daidzein</b>              | 5,37                        | 0,00        | 1,15        | 1,35        | <b>96,66±0,00%</b> |
| flavanol   | <b>katechin</b>              | 3,88                        | 1,19        | 0,69        | 0,79        | <b>86,89±0,01%</b> |

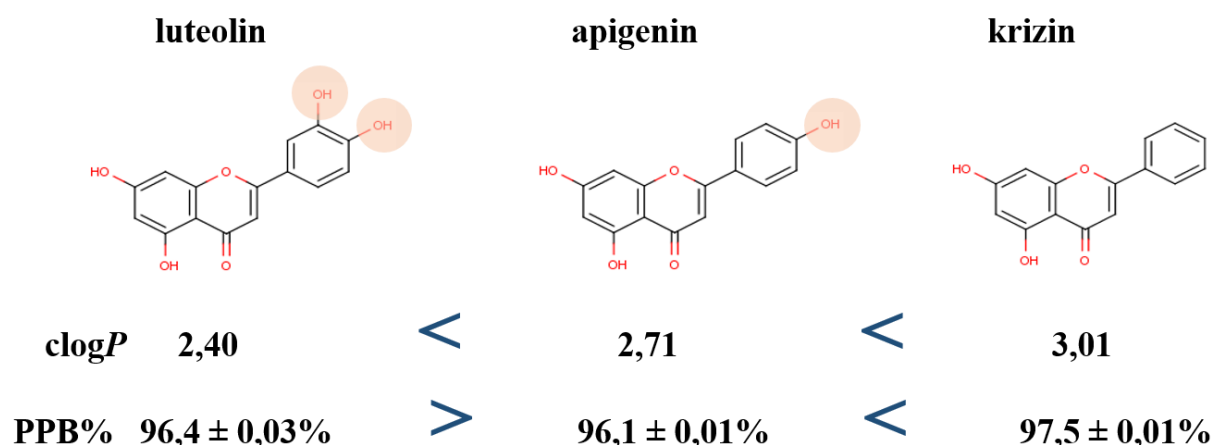
Ebben az esetben is minden mérést három párhuzamossal végeztünk, és a retenciós idők átlagából számolt kapacitás faktor logaritmusát használtuk fel a fehérjekötődés (logK, PPB%) meghatározásához (4-6. egyenlet). A mérések relatív szórása hibahatáron (RSD%=5%) belül volt.

## 8. Diszkusszió

Ahogy korábban említettük, a vizsgált flavonoidok különböző fehérjekötődését (illetve eltérő retencióját a HSA oszlopon) eltérő szerkezetük okozza. Az egyes szerkezeti elemek kötődésre gyakorolt hatását részben már leírták <sup>[77][78]</sup>, így lehetőségünk volt az eredményeink hitelességének ellenőrzésére. A kötés erősségét a magas  $\log P$  érték is növeli, így erősen lipofil vegyületek vizsgálata során ennek hatását is figyelembe kell venni. <sup>[5]</sup> Az ábrákon a mérési eredményeink alapján számolt fehérjekötődési értékek (HSA,%) szerepelnek.

Az A, B, és C gyűrűben található hidroxil csoportok száma befolyásolja a fehérjekötés erősségét. <sup>[77][78][79][80][81][82][83][84]</sup> A B gyűrűben található hidroxil csoportok hatását tudjuk legtöbb példával illusztrálni, illetve bemutatni a  $\log P$  és a hidroxil csoportok összetett befolyását a HSA-hoz való kötődésre, így a szerkezeti elemek tárgyalását ezzel kezdjük.

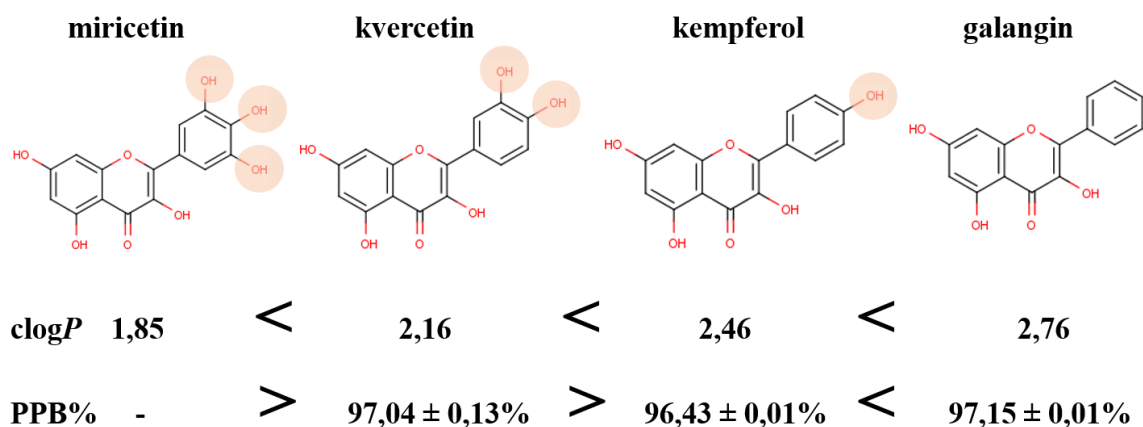
A flavonok közül a luteolin, az apigenin és a krizin retencióját mértük a HSA oszlopon. (13.ábra) Kizárólag a B gyűrű hidroxiláltságát figyelembe véve a fehérjekötődésnek ebben a sorrendben csökkennie kellene. Látható azonban, hogy mindhárom vegyület lipofilitása igen magas, így ennek következtében a vegyületek  $\log P$  értéke erősen befolyásolhatja a HSA-kötődést. A luteolin tartalmazza a B gyűrűben a legtöbb hidroxil csoportot, de fehérjekötődése alig magasabb a lipofilebb apigeninnél. A krizin nem tartalmaz szubsztituenst a B gyűrűben, így a lipofilitásból eredő fehérjekötődés válik dominánssá. Ezzel összhangban a luteolinnál is nagyobb PPB% értéket kaptunk.



13. ábra: A B gyűrű hidroxil csoportjainak hatása a HSA-kötődésre a flavonok esetében

A flavonol vegyületeken a B gyűrű hidroxiláltságának hatását a humán szérum albumin-kötődésre a miricetin, kvercetin, kempferol és a galangin összehasonlításával mutathatjuk be. (14.ábra) A miricetin HSA-kötődése az összegyűjtött vegyületek közül a

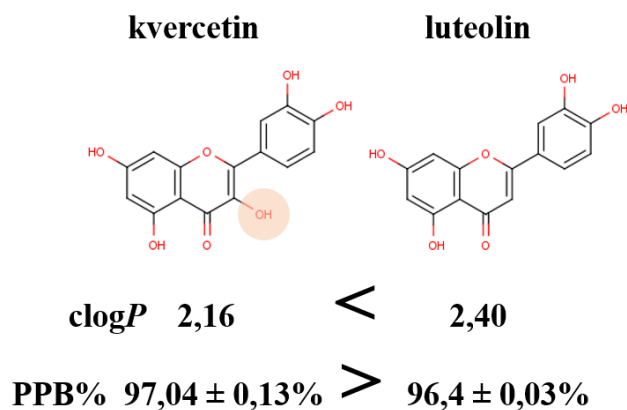
legnagyobb <sup>[7]</sup>, ebből kifolyólag retenciója olyan nagy volt, hogy az alkalmazott módszer nem tette lehetővé a vizsgálatát. A többi vegyület esetén nem jelentkezett ilyen probléma. Ez a flavonoid osztály is a flavonokhoz hasonlóan viselkedett: a hidroxil csoportok számának csökkentésével  $\text{clog}P=2,7$  közelébe növelve a lipofilitást ennek a paraméternek a hatása válik hangsúlyossá a vegyületek fehérjekötődésében. Így a galangin HSA-kötődése méréseink szerint a kvercetinénél is magasabb.



14. ábra: A B gyűrű hidroxil csoportjainak hatása a HSA-kötődésre a flavonolok esetében

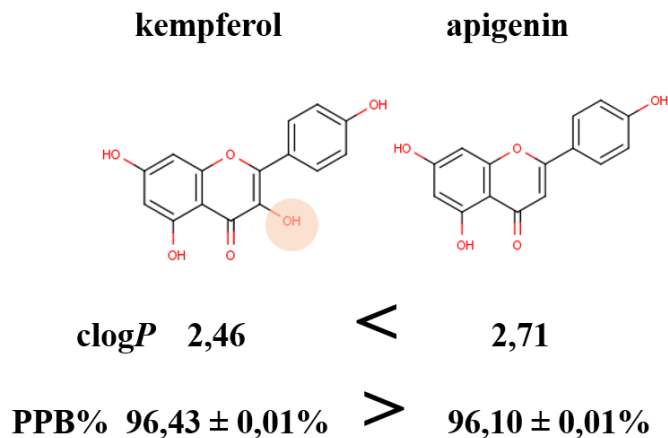
A C gyűrűben csak a 3-as pozícióban van lehetőség hidroxil csoport beépülésére. Ez befolyással van a B gyűrű rotációjára, ezzel megváltoztatva, növelve a plazmafehérjékhez való affinitást. Az előzőekben bemutatott flavonok és flavonolok összehasonlításával lehet ennek a szerkezeti elemnek a humán szérum albuminhoz való kötődésre gyakorolt hatását értelmezni.

A vegyületeket megfelelően párosítva látható, hogy a flavonokhoz képest a C gyűrűben eggyel több hidroxil csoportot tartalmazó flavonolok  $\text{clog}P$  értékei kisebbek. A kvercetin és a luteolin is két-két hidroxil csoportot tartalmaz a B gyűrűben. (15.ábra) A két vegyület  $\text{clog}P$  értéke nem éri el azt a tartományt, ahol a lipofilitás hatása a fehérjekötődésre meghatározó lenne, így az eggyel több hidroxil csoportot tartalmazó kvercetin HSA-kötődése magasabb.



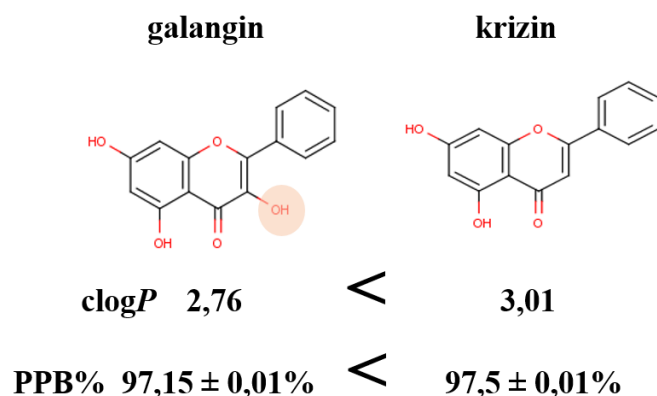
15. ábra: A C gyűrű hidroxil csoportjainak hatása a HSA-kötődésre

A kempferolt és az apigenint vizsgálva látható, hogy mivel a B gyűrűben eggyel kevesebb a hidroxil csoport, mint az előző vegyületepárnál, mindkét vegyület clogP értéke magasabb. (16.ábra) Azonban nem elég magas ahhoz, hogy a lipofilitás határozza meg egyértelműen a fehérjekötődést, hanem ezt a hatást a különböző szerkezeti elemekkel párhuzamosan befolyásolják. Így a flavonol osztályba tartozó kempferol humán szérumban albuminhoz való kötődése kisebb mértékben, de magasabb az apigeninénél, hasonlóan a luteolin-apigenin vegyületepárhoz a flavonoknál.



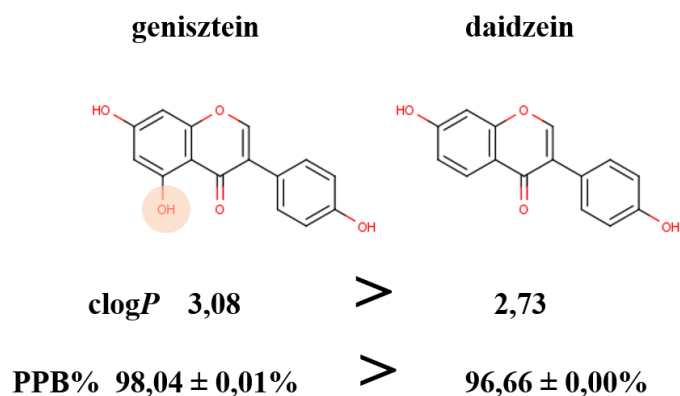
16. ábra: A C gyűrű hidroxil csoportjainak hatása a HSA-kötődésre

Végül a galangin és krizin vegyületepárost megvizsgálva szintén látható, hogy a flavonol vegyületnek (galangin) alacsonyabb a clogP értéke a flavon vegyületnél (krizin). (17.ábra) A B gyűrűben egyik vegyület sem tartalmaz hidroxil-típusú szubsztituenst, így három vegyületepár közül ebben az esetben tapasztalható a legmagasabb lipofilitás, mely olyan magas, hogy egyértelműen meghatározza a fehérjekötődést. Így a magasabb clogP értékkel rendelkező krizin humán szérumban albumin-kötődése lesz nagyobb, hiába hiányzik a C gyűrű 3-as pozíciójából a hidroxil csoport.



17. ábra: A C gyűrű hidroxil csoportjainak hatása a HSA-kötődésre

A kötés erősségének változását az A gyűrűben található hidroxil csoportoknak köszönhetően, az izoflavonoidok közé tartozó genisztein és a daidzein példáján tudjuk szemléltetni. (18.ábra)

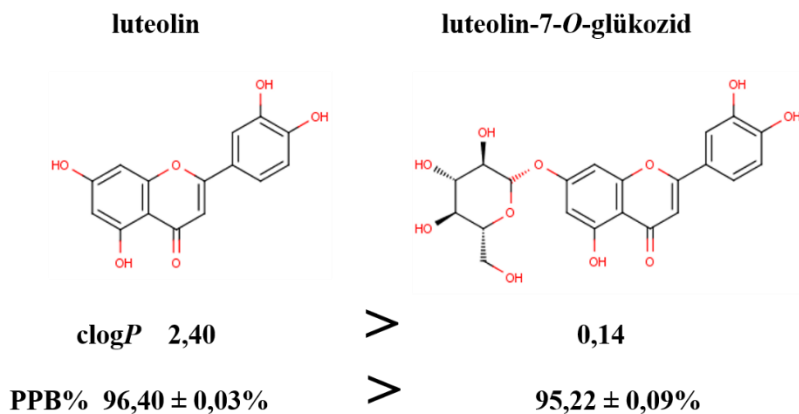


18. ábra: Az A gyűrű hidroxil csoportjainak hatása a HSA-kötődésre

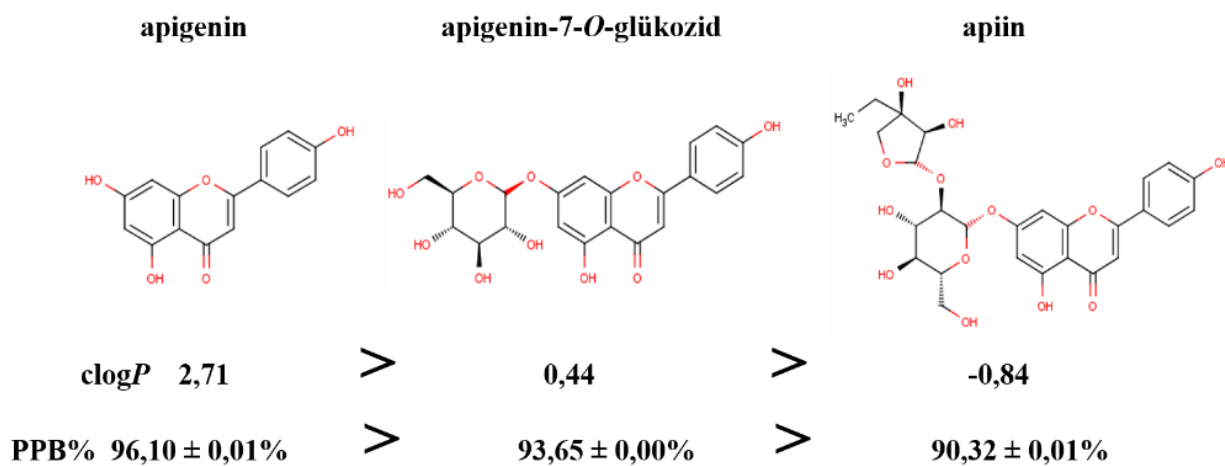
Mindkét vegyület meglehetősen magas clogP értékkel rendelkezik, így ennek hatására a lipofilebb genisztein kötődik jobban a humán szérum albuminhoz. Az A gyűrűben, a 7-es pozícióban található hidroxil csoporton felül további csoportok csökkentenék a fehérjekötődést, de ez ebben a clogP tartományban háttérbe szorul.

A flavonoidokon található glikozid csoportok is hatással vannak a plazmafehérjékhez (HSA-hoz) való kötődésre. A szakirodalomban csak BSA kötődésre találtunk adatokat.<sup>[77][81][87]</sup> Ezek alapján megállapítható, hogy a cukor típusú csoport hatása függ a csoport helyzetétől és minőségétől is, de általánosságban csökkenti a fehérjékhez való affinitást.

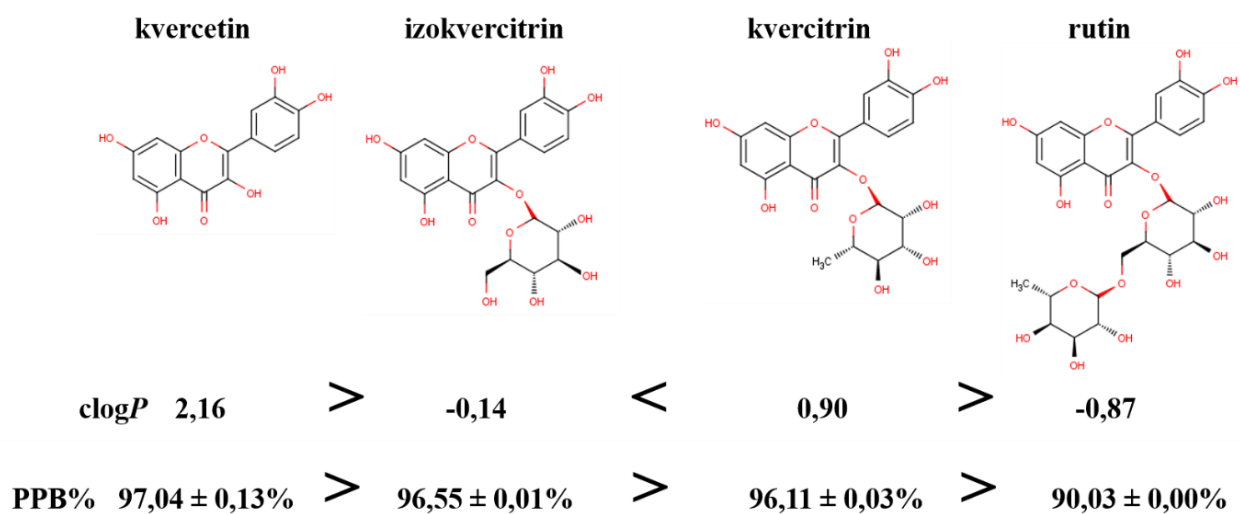
Ezen állítások helyességét a HSA kötődésre nézve luteolin- (19.ábra), apigenin- (20.ábra), és kvercetin-glikozidok (21.ábra) vizsgálatával igazoltuk.



19. ábra: A luteolin glikozidáltságának hatása a HSA-kötődésre



20. ábra: Az apigenin glikozidáltságának hatása a HSA-kötődésre

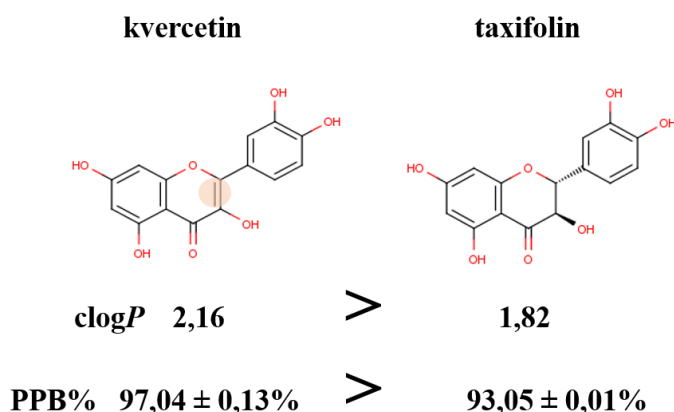


21. ábra: A kvercetin glikozidáltságának hatása a HSA-kötődésre

Mérési eredményeink összecsengenek az irodalmi adatokkal, azaz a glikozid csoportok minden esetben csökkentik a  $clogP$  értékeket, valamint a HSA-kötődés erősségét is az aglikonokhoz képest. Utóbbi mind az alacsonyabb lipofilitással, mind sztérikus okokkal magyarázható. A kvercitrin (kvercetin-3-O- $\alpha$ -L-ramnozid) és az izokvercitrin (kvercetin-3-O- $\beta$ -D-glükózid) példáján látható, hogy a különböző cukor-csoportok eltérő szerkezetük miatt nem egyforma mértékben csökkentik az aglikon vegyület humán szérum albuminhoz való kötődését. A kvercitrin  $clogP$  értéke magasabb az izokverctrinnél, de ilyen alacsony  $clogP$  tartományban a kötés erősségét a szerkezeti elemek határozzák meg. Ebben az esetben a glikozid csoport minősége, így az izokvercitrin kötődik jobban a vizsgált fehérjéhez. A glikozid-csoport méretének növelése tovább csökkenti a HSA-hoz való affinitást, ez látható a rutin (kvercetin-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranozil-(1 $\leftrightarrow$ 6)-D-glükózid) és az apiin (apigenin-7-O- $\beta$ -D-glükopiranozil-2-O-furanozil) a többi vegyülethez képest alacsony fehérjekötődésén. Összességében kijelenthető, hogy a flavonoidokon található cukor típusú csoportok a HSA-kötődésre hasonló befolyással vannak, mint a BSA-kötődésre.

A C gyűrűben található 2-es és 3-as szénatom telítetlensége is hatással van a fehérjekötődésre. <sup>[79][88]</sup> A kettős kötéssel növekszik a konjugáció a B és C gyűrű között, és ennek köszönhetően a fehérjekötődés erőssége is növekszik.

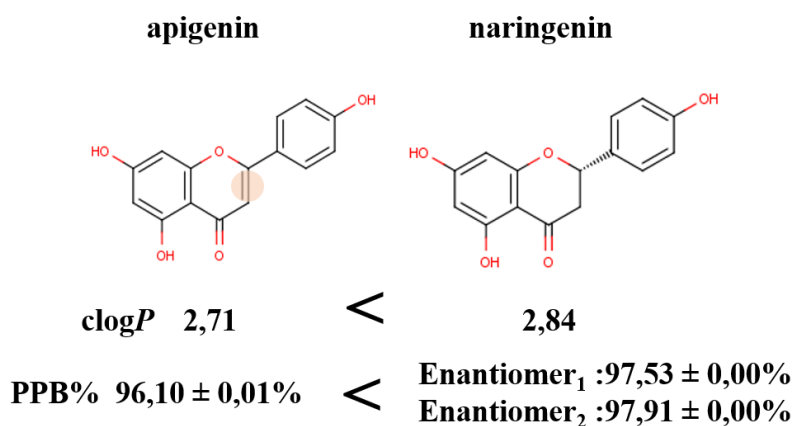
Ennek a szerkezeti elemnek a hatását jól szemlélteti a kvercetin és a taxifolin összehasonlítása. (22. ábra) A két vegyület  $clogP$  értéke nem éri el azt a tartományt ( $clogP \sim 2,7$ ), ahol a korábbi példákban a szerkezeti elemek helyett a lipofilitás dominált a fehérjekötődés erősségének befolyásolásában. Így a kvercetinben található C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> kettős kötésnek köszönhetően nagyobb a humán szérum albumin-kötődése, mint a taxifolinnak.



22. ábra: A C gyűrű telítetlenségének hatása a HSA-kötődésre

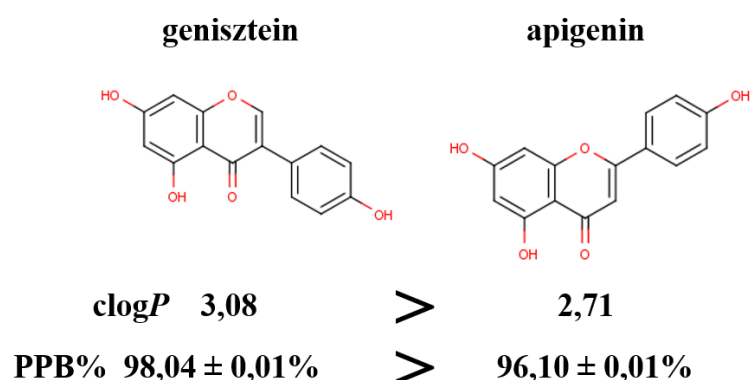
A vizsgált kettős kötés jelenléte, illetve hiánya a szerkezeti különbség az apigenin és a naringenin között is. (23. ábra) Ebben az esetben azonban a vegyületek  $clogP$  értéke elég magas

ahhoz, hogy a lipofilitás határozza meg döntően a fehérjekötődés mértékét, így hiába nagyobb az apigeninen belül a konjugáció, a lipofilebb naringenin erősebben kötődik a humán szérumban albuminhoz.



23. ábra: A C gyűrű telítettségének hatása a HSA-kötődésre

Nem találtunk irodalmi adatokat a B gyűrű helyzetének a fehérjekötődésre való befolyásáról. Mérési eredményeinket alapul véve ezt a kérdést a genisztein és az apigenin HSA-kötődésének összehasonlításával tárhatjuk fel. (24.ábra)

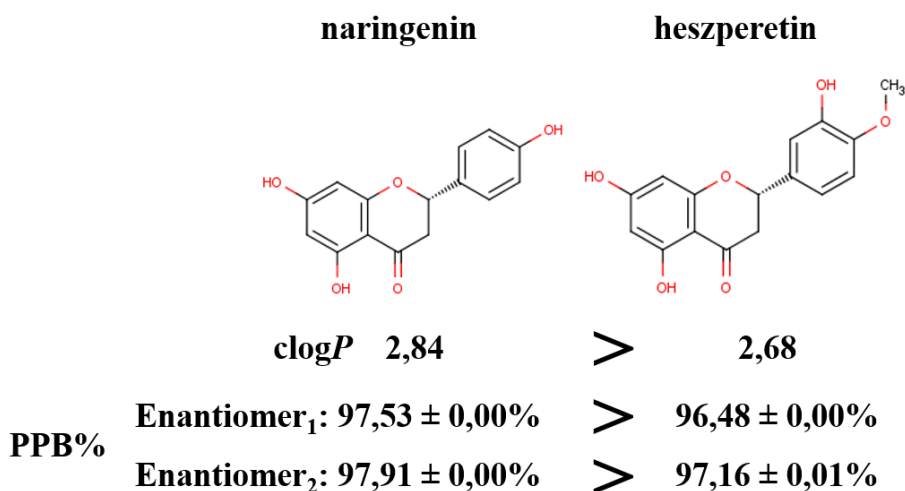


24. ábra: A B gyűrű helyzetének hatása a HSA-kötődésre

Azt találtuk, hogy a B gyűrű C gyűrűhöz való kapcsolódási helyének megváltozása a 2-es szénatomról a 3-as szénatomra növeli a fehérjekötődés erősségét. Elképzelhető, hogy ennek a szerkezeti változásnak következtében a humán szérumban albumin egyik kötőhelyéhez való affinitás is növekszik, azonban nem lehet figyelmen kívül hagyni a lipofilitási értékeket. Mindkét vegyület clogP értéke igen magas, a korábban vizsgált esetek alapján ebben a tartományban már döntően a vegyületek lipofilitása határozza meg a fehérjekötődést. Összességében a B gyűrű helyzetének megváltozása növelheti, vagy csökkentheti az affinitást a humán szérumban albumin valamely kötőhelyéhez, azonban a szerkezetváltozást követő

lipofilitás-növekedés hatására az izoflavonoidok HSA-kötődése nagyobb lesz a flavonoidokénál.

A flavanonok közül a heszperetin és a naringenin retencióját mértük a HSA oszlopon, és a fehérjekötődésre az irodalmi adatoknak <sup>[7]</sup> megfelelő eredményeket kaptunk. (25.ábra)



25. ábra: A flavanonok HSA-kötődése

A két vegyület szerkezetét tekintve több motívumban is különböznek, így az egyes szerkezeti elemek hatása a HSA-kötődésre nem becsülhető meg pontosan. Emellett a naringenin és a heszperetin clogP értéke elég magas ahhoz, hogy meghatározza humán szérum albumin-kötődésüket, így a lipofilebb naringenin nagyobb retenciója az oszlopon a mérés helyességét igazolja. Ki kell emelni, hogy királis vegyületekről van szó, és a minták mindkét enantiomert tartalmazták. Az állófázison immobilizált humán szérum albumint tartalmazó oszlop használatával ezen enantiomerek kromatográfiás elválasztása megvalósítható volt ( $R > 1,5$ ).

## 9. Összefoglalás

Egy, az irodalomból ismert metódus módosításával dolgoztunk ki természetes eredetű flavonoidok szérum albuminkötődésének vizsgálatára alkalmas HPLC módszert, amit 10 db ismert plazmafehérje-kötődésű gyógyszerhatóanyagra validáltuk. Vizsgáltuk a vegyületek retenciójának összefüggését lipofilitási mutatóikkal és plazmafehérje-kötődésükkel. A 21 db flavonoid aglikon ill. glikozid szérum albuminkötődését prediktáltuk. Vizsgáltuk, és sikeresen azonosítottuk a különböző flavonoid származékok esetén az egyes szerkezeti elemek (az A, B, és C gyűrű hidroxiláltsága, a glikozid típusú szubsztituensek, a C gyűrű telítetlensége, a B

gyűrű helyzete), és a molekula lipofilitásának komplex hatását a humán szérum albuminhoz való kötődésre.

Az egyes flavonoidok kötődési helyének *in silico* szintű azonosítása a humán szérum albuminon folyamatban van. A jövőben az általunk kidolgozott módszer felhasználási körét szeretnénk kiterjeszteni egyéb, természetes eredetű polifenol vegyületekre.

## 10. Irodalomjegyzék

- [1] Gyires Klára, Fürst Zsuzsanna (szerk.), Farmakológia. Medicina könyvkiadó, Budapest, 2007.
- [2] Dahan A, Hoffman A., Rationalizing the selection of oral lipid based drug delivery systems by an in vitro dynamic lipolysis model for improved oral bioavailability of poorly water soluble drugs. *Journal of Control Release* **129**,1-10, 2008.
- [3] Waring, M., Lipophilicity in drug discovery. *Expert Opinion on Chemical Biology.*, **5**, 235-248, 2010.
- [4] Gachályi Béla (szerk.), A testidegen anyagok szervezeten belüli sorsa in Bevezetés a klinikai farmakológiába: Testidegen anyagok sorsa a szervezetben. Genetikai tényezők és betegségek szerepe a gyógyszerek hatásában. *Springer Hungarica Kiadó Kft.*, Budapest, Magyarország, 1992.
- [5] Antonia Kotsiu, Christine Tesseromatis, Protein Binding of Drugs in Ming Hu, Xiaoling Li (szerk.), Oral Bioavailability. John Wiley&Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 2011.
- [6] Jeffrey J. Porter, Justin Wildsmith, Christopher D. Melm, Mark D. Schuchard, Kevin M. Ray, Dian Er Chen, and Graham B.I. Scott, Absolute Quantification of the Lower Abundance Proteome Through Immunoaffinity Depletion of the Twenty Most Abundant Proteins in Human Serum. *Sigma-Aldrich Biotechnology*, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, US HUPO 2006.
- [7] Sandip Pal, & Chabita Saha, A review on structure-affinity of dietary flavonoids with serum albumins, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, **vol.32**, no. 7, 1132-1147, 2013.
- [8] Kragh-Hansen, U., Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacological Reviews*, **33**, 7-53, 1981.
- [9] Susan W. Sarsam, David R. Nutt, Katja Strohfeldt, and Kimberly A. Watson, Titanocene anticancer complexes and their binding mode of action to human serum albumin: A computational study. *Metallomics*, **3**, 152-161, 2011.
- [10] Sudlow, G., Birkett, D.J., and Wade, D.N., The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Molecular Pharmacology*, **11**(6), 824-832, 1975.
- [11] Wanwimolruk, S., Birkett, D.J., and Brooks, P.M., Structural requirements for drug binding to site II on human serum albumin. *Molecular Pharmacology*, **24**(3), 458-463, 1983.
- [12] Ghuman, J., Zunszain, P.A., Petitpas, I., Bhattacharya, A.A., Otagiri, M., Curry, S., Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *Jorunal of Molecular Biology*, **353**, 38-52, 2005.
- [13] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/a2250?lang=hu&region=HU>
- [14] <http://www.thomasbondphysio.blogspot.hu/2013/05/the-risks-of-ibuprofen.html>
- [15] Klara Valko, Shenaz Nunhuck, Chris Bevan, Micheal H. Abraham, Derek P. Reynolds, Fast Gradient HPLC Method to Determine Compounds Binding to Human Serum Albumin. Relationships with Octanol/Water and immobilized Artificial Membrane Lipophilicity, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol.**92**, no.11, 2003.
- [16] Bernard Faller, Laszlo Urban (szerk.), Hit and Lead Profiling, Wiley, Weinheim, 2009.

- [17] Chignell, C.F., Optical studies of drug-protein complexes II. Interaction of phenylbutazone and its analogues with human serum albumin. *Molecular Pharmacology*, **5**, 244-252, 1969.
- [18] Liu, M., Nicholson, J.K., Parkinson, J.A. and Lindon, J.C., Measurement of biomolecular diffusion coefficients in blood plasma using two-dimensional  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  diffusion-edited total-correlation NMR spectroscopy. *Analytical Chemistry*, **69**, 1504-1509, 1997.
- [19] Bertucci, C., Salvadori, P., and Domenici, E., The Impact of Stereochemistry on Drug Development and Use. Wiley, New York, pp. 521-543, 1997.
- [20] Frostell-Karlsson, A., Remaeus, A., Roos, H., Andersson, K., Borg, P., Hämäläinen, M., and Karlsson, R., Biosensor analysis of the interaction between immobilized human serum albumin and drug compounds for prediction human serum albumin binding levels. *Journal of Medicinal Chemistry*, **43**, 1986-1992, 2000.
- [21] Jérôme Barré, Jean Marie Chamouard, Georges Houin, and Jean Paul Tlement, Equilibrium Dialysis, Ultrafiltration, and Ultracentrifugation Compared for Determining the Plasma-Protein-Binding Characteristics of Valproic Acid. *Clinical Chemistry* **31/1**, 60-64, 1985.
- [22] Bowers, W.F., Fulton, S., and Thompson, J., Ultrafiltration vs equilibrium dialysis for determination of free fraction. *Clinical Pharmacokinetics*, **9** (S1), 49-60, 1984.
- [23] Fung, E.N., Chen, Y.H. and Lau Y.Y., Semi-automatic high-throughput determination of plasma protein binding using a 96-well plate filtrate assembly and fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **795**, 187-194, 2003.
- [24] Zhang, J. and Musson, D.G., Investigation of high-throughput ultrafiltration for determination of an unbound compound in human plasma using liquid chromatography and tandem mass spectrometry with electrospray ionization. *Journal of Chromatography B*, **843**, 47-55, 2006.
- [25] <http://www.cyprotex.com>
- [26] Richards, E.G. and Schachman, H.K., A differential ultracentrifuge technique for measuring small changes in sedimentation coefficients. *Journal of the American Chemical Society*, **79**, 5324-5325, 1957.
- [27] Simon, N., Dailly, E., Combes, O., Malaurie, E., Lemaire, M., Tillement, J.P., and Urien, S., Role of lipoproteins in the plasma binding of SDZ PSC 833 a novel multidrug resistance-reversing cyclosporin. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **45**, 173-175, 1998.
- [28] Banker M.J., Clark, T.H. and Williams, J.A., Development and validation of a 96-well equilibrium dialysis apparatus for measuring plasma protein binding. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **92**, 967-974, 2003.
- [29] Kariv, I., Cao, H. and Oldenburg, K.R., Development of a high throughput equilibrium dialysis method. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **90**, 580-587, 2001.
- [30] Wan, H., Rehngren, M., High-throughput screening of protein binding by equilibrium dialysis combined with liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, **1102**, 125-134, 2006.
- [31] Guentert, T.W., and Oie, S., Factors influencing the apparent protein binding of quinidine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **71**, 325-328, 1982.
- [32] Hinderling, P.H. and Hartmann, D., The pH dependency of the binding of drugs to plasma proteins in man. *Therapeutic Drug Monitoring*, **27**, 71-85, 2005.

- [33] Kochansky, C.J., McMasters, D.R., Lu, P., Koeplinger, K.A., Kerr, H.H., Shou, M. and Korzekwa, K.R., Impact of pH on plasma protein binding in equilibrium dialysis. *Molecular Pharmacology*, **5**, 438-448, 2008.
- [34] Huang, T.-N., Dialysis device for equilibrium dialysis U.S. Pat. Appl. Publ. 13 pp. US 2006102547, 2006.
- [35] <http://www.farmfak.uu.se/farm/udopp/assay.html>
- [36] Domenici, E., Bertucci, C., Salvadori, P., Motellier, S. and Wainer, I.W., Immobilized serum albumin: Rapid HPLC probe of stereoselective protein-binding interactions. *Chirality*, **2**, 263-268, 1990.
- [37] Aubry, A.F., Markoglou, N., Descorps, V., Wainer, I.W. and Félix, G., Evaluation of chiral stationary phase based on mixed immobilized proteins. *Journal of Chromatography. A*, **685**, 1-6, 1994.
- [38] Singh, S.S., and Mehta, J., Measurement of drug-protein binding by immobilized human serum albumin-HPLC and comparison with ultrafiltration. *Journal of Chromatography B*, **834**, 108-116, 2006.
- [39] <http://www.lifescience.ca/2-75-chromatography-brand-chiral-chromatography-chiralpakhsa.html>
- [40] Höcht, C., Opezzo, J.W., and Taira, C., Validation of a new intra-arterial microdialysis shunt probe for the estimation of pharmacokinetic parameters. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **31**, 1109-1117, 2003.
- [41] Höcht, C., Opezzo, J.A.W., and Taira, C.A., Microdialysis in drug discovery. *Current Drug Discovery and Technology*, **1**, 269-285, 2004.
- [42] <http://www.microdialysis.se/us/products/probes/cma-custom-made>
- [43] [http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=Microdialysis&lang=1](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Microdialysis&lang=1)
- [44] E. J. Middleton, Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol.**439**, pp.175-182, 1998.
- [45] <http://metabolights.blogspot.hu/2013/03/a-new-look-for-new-century.html>
- [46] E. Middleton, The flavonoids, *Trends in Pharmacological Sciences*, vol.**5**, pp. 335-338, 1984.
- [47] [http://www.akspublication.com/paper05\\_jul-dec2007.htm](http://www.akspublication.com/paper05_jul-dec2007.htm)
- [48] L. H. Yao, Y. M. Jiang, J. Shi et al., Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, vol.**59**, no.3, pp.113-122, 2004.
- [49] Filip Cuyckens and Magda Claeys, Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids, *Journal of Mass Spectrometry*, **39**, 1-15, 2004.
- [50] Szőke Éva (szerk.), Farmakognózia-fítokémia. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2012.
- [51] E. H. Kelly, R. T. Anthony, and J. B. Dennis, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol.**13**, no.10, pp.572-584, 2002.
- [52] A. R. Tapas, D. M. Sakarkar, and R. B. Kakde, Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol.**7**, pp.1089-1099, 2008.
- [53] A. Mishra, S. Kumar, and A. K. Pandey, Scientific validation of the medicinal efficacy of *Tinospora cordifolia*. *The Scientific World Journal*, vol.**2013**, Article ID 292934, 2013.
- [54] A. Mishra, A. K. Sharma, S. Kumar, A. K. Saxena, and A. K. Pandey, *Bauhinia variegata* leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant and anticancer activities. *Biomedical Research International*, vol.**2013**, Article ID 915436, 10 pages, 2013.

- [55] A. Mishra, S. Kumar, A. Bhargava, B. Sharma, and A. K. Pandey, “Studies on *in vitro* antioxidant and antistaphylococcal activities of some important medicinal plants. *Cellular and Molecular Biology*, vol.**57**, no.1, pp.16–25, 2011.
- [56] A. K. Pandey, A. K. Mishra, A. Mishra, S. Kumar, and A. Chandra, Therapeutic potential of *C. zeylanicum* extracts: an antifungal and antioxidant perspective, *International Journal of Biological and Medical Research*, vol.**1**, pp.228–233, 2010.
- [57] M. H. Pan, C. S. Lai, and C. T. Ho, Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food and Function*, vol.**1**, no.1, pp.15–31, 2010.
- [58] E. Middleton and C. Kandaswami, Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochemical Pharmacology*, vol.**43**, no.6, pp.1167–1179, 1992.
- [59] C. T. Ho, T. Osawa, M. T. Huang, and R. T. Rosen, Food Phytochemicals for Cancer Prevention II. Teas, Spices, and Herbs. *American Chemical Society*, Oxford University Press, 1994.
- [60] B. Gerdin and E. Srenso, Inhibitory effect of the flavonoid on increased microvascular permeability induced by various agents in rat skin. *International Journal of Microcirculation, Clinical and Experimental*, vol.**2**, no.1, pp.39–46, 1983.
- [61] A. K. Pandey, A. K. Mishra, and A. Mishra, Antifungal and antioxidative potential of oil and extracts derived from leaves of Indian spice plant *Cinnamomum tamala*. *Cellular and Molecular Biology*, vol.**58**, pp.142–147, 2012.
- [62] S. Kumar, A. Mishra, and A. K. Pandey, Antioxidant mediated protective effect of *Parthenium hysterophorus* against oxidative damage using *in vitro* models. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol.**13**, article 120, 2013.
- [63] S. Kumar and A. K. Pandey, Phenolic content, reducing power and membrane protective activities of *Solanum xanthocarpum* root extracts. *Vegetos*, vol.**26**, pp.301–307, 2013.
- [64] <http://www.intechopen.com/books/lipid-peroxidation/liposomes-as-a-tool-to-study-lipid-peroxidation>
- [65] <http://dc341.4shared.com/doc/6VkJSAV9Y/preview.html>
- [66] P. C. H. Hollman, M. N. C. P. Buijsman, Y. van Gameren, P. J. Cnossen, J. H. M. de Vries, and M. B. Katan, The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Research*, vol.**31**, no.6, pp.569–573, 1999.
- [67] A. J. Day, F. J. Canada, J. C. Diaz et al., Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters*, vol.**468**, no.2-3, pp.166–170, 2000.
- [68] R. R. Scheline, Metabolism of foreign compounds by gastrointestinal microorganisms. *Pharmacological Reviews*, vol.**25**, no.4, pp.451–532, 1973.
- [69] I.F.F. Benzie, Y.T. Szeto, J.J.Strain, and B. Tomlison, Consumption of green tea causes rapid increase in plasma antioxidant power in humans. *Nutrition and Cancer*, vol.**34**, no. 1, pp. 83-87, 1999.
- [70] B. H. Havsteen, The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, vol.**96**, no.2-3, pp.67–202, 2002.

- [71] Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouysegu, L., Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, **50**, 586-621, 2011.
- [72] Andersen, O.M., Markham, K.R. (Eds.), Flavonoids chemistry, biochemistry and applications. *CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton*, 2006.
- [73] Ghasemzadeh, A., Ghasemzadeh, N., Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plant Research*, **5**, 6697-6703, 2011.
- [74] Xiao, Z.P., Peng, Z.Y., Peng, M.J., Yan, W.B., Ouyang, Y.Z., Zhu, H.L., Flavonoids health benefits and their molecular mechanism. *Mini Reviews on Medicinal Chemistry*, **11**, 169-77, 2011.
- [75] Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E.C, Boelens, P.G., van Norren, K., van Leeuwen, P.A.M., Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Americial Jorunal of Clinical Nutrition*, **74**, 18-425, 2001.
- [76] Hernandez, I., Alegre, L., Van Breusegem, F., Munne-Bosch, S., How relevant are flavonoids as antioxidnants in plants? *Trends in Plant Science*, **14**, 125-132, 2008.
- [77] Xiao, J., Chen, T., Cao, H., Chen, L., Yang, F., Molecular property-affinity relationship of flavonoids and flavonoids for HSA in vitro. *Molecular Nutrition & Food Research*, **55**, 310-317, 2010.
- [78] Xiao, J., Cao, H., Wang, Y., Yamamoto, K., Wei, X., Structure-affinity relationship of flavones on binding to serum albumins: Effect of hidroxyl groups on ring A. *Molecular Nutrition & Food Researh*, **54**, S253-S260, 2010.
- [79] Shi, J., Cao, H., Molecular structure-affinity relationship of dietary flavonoids for bovine serum albumin. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **21**, 594-600, 2011.
- [80] Xiao, J., Kai, G., Yang, F., Liu, C., Xu, X., Yamamoto, K., *Molecular Nutrition & Food Researh*, **55**, S86-S92, 2011.
- [81] Cao, H., Wu, D., Wang, H., Xu, M., Effect of the glycosylation of flavonoids on interaction with protein. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **73**, 972-975, 2009.
- [82] Xiao, J., Cao, H., Che, T., Yang, F., Liu, C., Xu, X., Molecular property-binding affinity relationship of flavonoids for common rat plasma protein sin vitro (CRPP). *Biochimie*, **93**, 134-140, 2011.
- [83] Antonczak, S., Electronic description of four flavonoids revisited by DFT method. *Journal of Molecular Structure*, **856**, 38-45,2008.
- [84] Aparicio, S., A systematic computational study on flavonoids. *International Journal of Molecular Science*, **11**, 2017-2037, 2010.
- [85] Dufour, C., Dangles, O., Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1721**, 164-173, 2005.
- [86] Xiao, J., Kai, G., A review of dietary poliphenol-plasma protein interactions: Characterization, influence on the bioactivity, and structure-affinity relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **52**, 85-101, 2012.
- [87] Xiao, J., Suzuki, M., Jiang, X., Chen, X., Yamamoto, K., Ren, F., Xu, M., Influence of B-ring hydroxylation on interactions of flavonols with bovine serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 2350-2356, 2008.

- [88] Xiao, J., Zhao, Y., Wang, H., Yuan, Y., Yang, F., Zhang, C., Yamamoto, C., Noncovalent interaction of dietary polyphenols with common human plasma proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 10747-10754, 2011.
- [89] Snyder LR, Dolan JW., Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development I. Use of a starting gradient run. *Journal of Chromatography A*, **721**, 3–14, 1996.

## 11. Ábrajegyzék

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. ábra: A fehérjekötődés hatása gyógyszerhatóanyagok útjára a szervezetben .....           | 6  |
| 2. ábra: A plazma fehérjéinek megoszlása <sup>[6]</sup> .....                               | 7  |
| 3. ábra: A humán szérumbalbumin szerkezete <sup>[9]</sup> .....                             | 8  |
| 4. ábra: A warfarin szerkezete <sup>[13]</sup> .....                                        | 8  |
| 5. ábra: Az ibuprofen szerkezete <sup>[14]</sup> .....                                      | 9  |
| 6. ábra: Ultraszűrés centrifugálás segítségével <sup>[25]</sup> .....                       | 10 |
| 7. ábra: Egyensúlyi dialízis <sup>[35]</sup> .....                                          | 12 |
| 8. ábra: A szilikagél állófázison immobilizált fehérjék <sup>[39]</sup> .....               | 13 |
| 9. ábra: A mikrodialízis folyamata, és eszköze <sup>[42][43]</sup> .....                    | 13 |
| 10. ábra: A flavonoid, izoflavonoid és neoflavonoid vegyületek váza <sup>[45]</sup> .....   | 14 |
| 11. ábra: Flavonoid osztályok <sup>[47]</sup> .....                                         | 14 |
| 12. ábra: Flavonoidok antioxidáns hatása <sup>[64][65]</sup> .....                          | 15 |
| 13. ábra: A B gyűrű hidroxil csoportjainak hatása a HSA-kötődésre a flavonok esetében ..... | 25 |
| 14. ábra: A B gyűrű hidroxil csoportjainak hatása a HSA-kötődésre a flavonolok esetében ..  | 26 |
| 15. ábra: A C gyűrű hidroxil csoportjainak hatása a HSA-kötődésre .....                     | 27 |
| 16. ábra: A C gyűrű hidroxil csoportjainak hatása a HSA-kötődésre .....                     | 27 |
| 17. ábra: A C gyűrű hidroxil csoportjainak hatása a HSA-kötődésre .....                     | 28 |
| 18. ábra: Az A gyűrű hidroxil csoportjainak hatása a HSA-kötődésre .....                    | 28 |
| 19. ábra: A luteolin glikozidáltságának hatása a HSA-kötődésre .....                        | 29 |
| 20. ábra: Az apigenin glikozidáltságának hatása a HSA-kötődésre .....                       | 29 |
| 21. ábra: A kvercetin glikozidáltságának hatása a HSA-kötődésre .....                       | 29 |
| 22. ábra: A C gyűrű telítetlenségének hatása a HSA-kötődésre .....                          | 30 |
| 23. ábra: A C gyűrű telítetlenségének hatása a HSA-kötődésre .....                          | 31 |
| 24. ábra: A B gyűrű helyzetének hatása a HSA-kötődésre .....                                | 31 |
| 25. ábra: A flavanonok HSA-kötődése .....                                                   | 32 |