

## A pompás zsoltina ekdiszteroidjai

LIKTOR-BUSA Erika,<sup>a,\*</sup> SIMON András,<sup>b</sup> TAKÁCS Mária,<sup>c</sup> TÓTH Gábor<sup>b</sup> és BÁTHORI Mária<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Farmakognóziái Intézet, Szegedi Tudományegyetem, Eötvös u 6., 6720 Szeged, Magyarország

<sup>b</sup> Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Szt. Gellért tér 4., 1111 Budapest, Magyarország

<sup>c</sup> Gyógyszerészeti Kémiai Intézet, Semmelweis Egyetem, Hőgyes Endre u 9., 1092 Budapest, Magyarország

### 1. Bevezetés

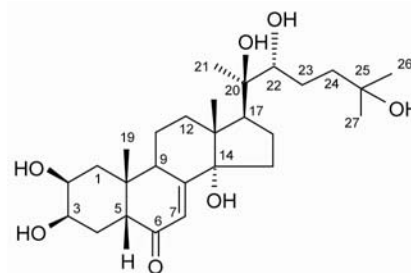
A szegedi Farmakognóziái Intézetben a szteránvázás vegyületek egy speciális csoportjának, az ekdiszteroidoknak a kutatása évtizedes múltra tekint vissza. Ez a vegyületsalád a gerinces szteroid hormonok és a növényi növekedési hormonok (brassinoidok) mellett a szteránvázás hormonok harmadik, egyben legelterjedtebb csoportja. Az ekdiszteroidokat előfordulásuk szempontjából két csoportra különítjük el: állati eredetű zoоекdiszteroidokra és növényi származású fitoekdiszteroidokra.<sup>1</sup> A zoоекdiszteroidok a nagy fajszámú ízeltlábú törzsön kívül számos egyéb rendszertani egységben (férgék, puhatestűek, tüskésbőrűek) megtalálhatók.<sup>2</sup>

A fitoekdiszteroidokat több mint 120 növény családban mutatták ki a törzsfajlás alacsony fokán álló osztályokban (gombák, algák) éppúgy, mint a virágos növények számos családjában. A növények az ekdiszteroidok leggazdagabb nyersanyagforrásai, mivel nagyságrendekkel nagyobb mennyiségben (0,1-3 % száraz tömegre vonatkoztatva) bioszintetizálják ezeket a molekulákat, mint a rovarok.<sup>3-4</sup> Az ekdiszteroid-tartalmú fajok eloszlása nagy változékonyságot mutat a családokon és a genusokon belül is. Négy növény családjában a Caryophyllaceae, az Amaranthaceae, a Chenopodiaceae és az Asteraceae azonban kiemelhető, mint ekdiszteroid tartalmú fajokban gazdag családok.<sup>5</sup>

A növények nemcsak kiváló forrásai az ekdiszteroidoknak, hanem nagy szerkezeti változatosságban bioszintetizálják ezeket a vegyületeket. Ezt az is bizonyítja, hogy míg a zoоекdiszteroidok száma kb. 80, addig már közel 300 fitoekdiszteroid izolálásáról számoltak be.<sup>6</sup> Az ekdiszteroidok közös szerkezeti jellemzője az alapváz B gyűrűjében található 7-én-6-on kromofór csoport, a 14-es helyzetű  $\alpha$ -, a 3-as helyzetű  $\beta$ -hidroxilcsoport. A 17-es helyzetben hosszabb-rövidebb oldallánc kapcsolódik a szteránvázhhoz. Jellegzetes a gyűrűk anellációjára az A/B gyűrű kapcsolódása rendszerint cisz, a C/D gyűrűé mindig transz (1. Ábra). Az ekdiszteroidok szerkezeti diverzitása a vázhoz kapcsolódó hidroxilcsoportok eltérő számából, helyzetéből, orientációjából illetve a származékok (glikozid, észter, éter) nagy számából adódik; továbbá a C17-es helyettesítők sokfélesége, az A/B gyűrű sztereokémiai variációja is hozzájárul a szerkezeti változatossághoz.

Az ekdiszteroidok rovarokban betöltött élettani szerepe feltárt. Ekdiszteroid magreceptorokon keresztül szabályozzák az ízeltlábúak fejlődését, növekedését, azonban

fiziológiás dózis felett olyan mértékű deformitást okoznak, amely az egyed pusztulásához vezet.<sup>7</sup> A nagyszámú ekdiszteroid izolálása biztosította a szerkezet-hatás összefüggések megismerését, a valószínű receptor kötőhelyek feltárását. Mindez lehetővé tette aktív, de kedvezőbb kinetikájú szintetikumok, ún. diacil-hidrazinok, például a kromafenozid előállítását.<sup>8</sup> Speciális hatásmechanizmusuk, szelektivitásuk és környezetbarát voltuk miatt ezek a vegyületek fontos szerepet töltenek be a növényvédelemben.



1. Ábra. A fő fitoekdiszteroid, a 20-hidroxiiekdisziton szerkezete az ekdiszteroidok klasszikus szerkezeti jellemzőivel.

Az ekdiszteroidok speciális receptorkötését a XXI. század tudománya, a genetika is felhasználja ún. ekdiszteroid indukálta génexpressziós rendszerekben. A génaaktiváló rendszer alapja az, hogy egy módosított ekdiszteroid receptor (EcR) dimért a célszervezetbe juttatva egy alkalmas ekdiszteroiddal indukálnak, ez transzkripciót vált ki és egy promoteren keresztül egy másik gént aktivál. Az állatkísérletek eredményei alapján az ekdiszteroid indukálta génexpresszó bazális aktivitása alacsony, az induktorral dózis-függően jól szabályozható és a gerinces szteroidok nem aktiválják. A fenti előnyök miatt humán terápiás célú kontrollált génexpressziós rendszerekben is ígéretes lehet.<sup>9-11</sup>

A humán felhasználás előtt azonban tisztázni kell az ekdiszteroidok farmakológiai hatásait, hatásmechanizmusát, metabolizmusát. Az ekdiszteroidok legfontosabbnak tartott biológiai hatása a fehérje-szintézis fokozása, amely nem jár együtt a gerinces szteroid anabolikumokra jellemző hormonális mellékhatásokkal.<sup>12-13</sup> Állatkísérletekben igazolt az ekdiszteroidok ginzenozidokhoz hasonló normalizáló, vérnyomás, vércukor-lipidszint csökkentő aktivitása.<sup>14</sup> Az ekdiszteroidok fontos előnye elhanyagolható mértékű toxicitásuk (egéren a 20-hidroxiiekdisziton LD<sub>50</sub> értéke: 6,4 g/kg i.p és 9 g/kg per os).<sup>15</sup>

\* Liktör-Busa Erika. Tel.: (62)-546455; fax: (62)-545704; e-mail: liktore@pharm.u-szeged.hu.

Az ekdiszteroidok hatásmechanizmusa nem tisztázott. A tesztoszteron és a 20-hidroxiiekdizon összehasonlítva, nagy szerkezeti eltéréseket találunk, ez tehát nem magyarázza az anabolikus hatást. Receptor kötési teszteken az ekdiszteroidok nem mutattak affinitást sem az endogén szteroid receptorokhoz, sem a szteroid kötő globulinhoz.<sup>16</sup> Szerkezet-hatás vizsgálatok szerint az ekdiszteroidok szerkezeti elemei közül a tesztoszteronra nem jellemző, 11-es  $\alpha$  helyzetű hidroxilcsoport jelentős a fehérjeszintézist fokozó hatás szempontjából.<sup>17</sup> Állatokon végzett metabolizmus vizsgálatok sem nyújtottak megfelelő választ a hatásmechanizmus kérdésre. A metabolitok között 3-epi, 14-dezoxiszármazékokat azonosítottak, továbbá a 6-os helyzetű oxocsoport redukcióját és a 22-23 C atom közötti kettős kötés kialakulását tapasztalták. Azonban az oldallánc szakadását, és így a tesztoszteronhoz hasonló szerkezet létrejöttét eddig nem sikerült kimutatni az élő szervezetben.<sup>18</sup>

Az ekdiszteroid-kutatás, amely a növényvilág szűrővizsgálatát, aktív komponensek azonosítását és a lehetséges felhasználási területek tanulmányozását is magában foglalja, egy fejlődő és megújuló területe a fitokémiának. Ezen tanulmányok alapvető célja, és a farmakológiai vizsgálatok feltétele az ekdiszteroidok gazdaságos, nagy mennyiségben történő előállítása. Az ekdiszteroidok szintézise, a 20-hidroxiiekdizon kivételével nem megoldott, bár ez az út sem kivitelezhető gazdaságosan. Jelenleg az ekdiszteroidok egyedüli előállítási módja növényekből történő izolálásuk. Az alkalmas növényi forrás magas ekdiszteroid tartalommal (>1%) rendelkezik, nem igényel speciális termesztési körülményeket és biomassza produktuma jelentős. Az Asteraceae család és azon belül a *Serratula* genus fajai értékes forrásul szolgálnak ezen szteránvázas vegyületek kinyeréséhez. A genuson belül a *Serratula wolffii*, magyar nevén pompás zsoldina egy kevésbé vizsgált faj, amely azonban megfelel az ideális növényi forrással szemben támasztott követelményeknek. Az előzetes szűrővizsgálataink is azt igazolták, hogy a *Serratula wolffii* részletes fitokémiai vizsgálatra érdemes faj.

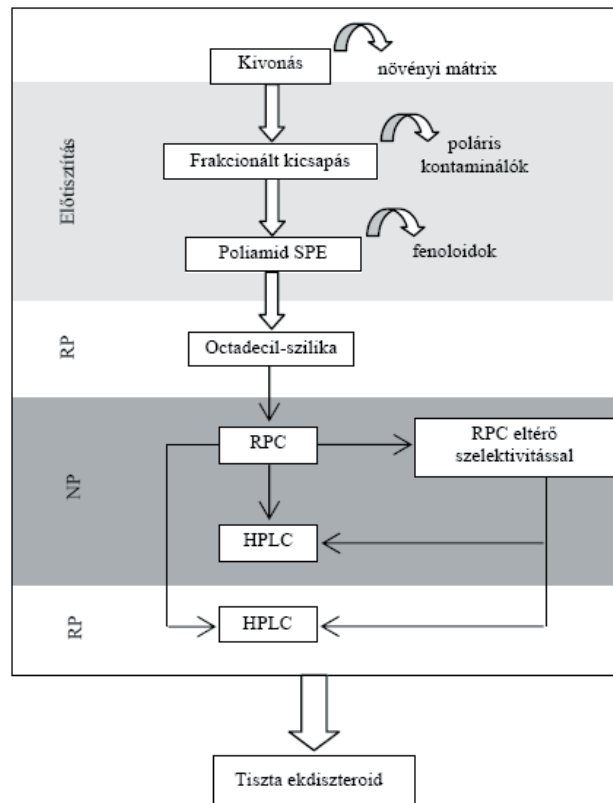
## 2. Eredmények

### 2.1. Ekdiszteroidok izolálása

A növényi nyersanyag kivonását az ekdiszteroidok polaritására való tekintettel metanollal végeztük. A metanolos kivonat előtisztítására acetonos kicsapást és poliamid oszlopon végrehajtott szilárd fázisú extrakciót alkalmaztunk. A fenti módszerekkel a hidrofil karakterű szennyezőktől és a fenolos kontamináló anyagoktól tisztítottuk meg a mintánkat. Az ekdiszteroidok izolálását az előtisztított kivonatból kromatográfiás módszerek; vákuum RP-CC (reversed-phase column chromatography), RPC (rotation planar chromatography) és HPLC optimalizált kombinálásával hajtottuk végre. A poliamid oszlopról vízzel eluálódott ekdiszteroidokban gazdag frakciót fordított fázisú oszlop-kromatográfia segítségével szeparáltuk tovább. Ezt követően a szelektivitás váltás biztosítása érdekében normál fázisú RPC-t alkalmaztunk. A fő ekdiszteroidok elválasztását sikerült megoldani az RPC kétlépéses alkalmazásával illetve kristályosítással. A minor komponensek izolálásának utolsó

lépéseként az RPC-t kiegészítve HPLC-t használtunk. Az elválasztás követésére rétegekromatográfiát alkalmaztunk. Izolálási metodikánk sémáját mutatja be a **2. Ábra**.

Jelen közleményben a *Serratula wolffii*-ből izolált vegyületeink közül legfontosabbnak tartott ekdiszteroidokról, 1 ismert és 10 új vegyületről számolunk be. Az izolált ekdiszteroidok szerkezetei az **1. Táblázatban** és a **3. Ábrán** láthatók. Az új természetes molekulákat \* jelöli.



2. Ábra. Az ekdiszteroidok izolálásának sémája.

### 2.2. Az izolált vegyületek szerkezetmeghatározása

Az ismert vegyületek azonosítása fizikai és spektroszkópiai tulajdonságaik irodalmi adatokkal való közvetlen összehasonlításán alapult. A referencia ekdiszteroidokkal történő összehasonlításukhoz normál és fordított fázisú rétegekromatográfiát illetve HPLC-t használtunk fel. Az izolált ekdiszteroidok szerkezetét spektroszkópiai vizsgálatokkal állapítottuk meg. Az alapvető információkat NMR és tömegspektrumaik elemzése nyújtotta. A szerkezetek igazolása ezen spektrumoknak a fő fitoekdiszteroid, a 20-hidroxiiekdizon megfelelő spektrumaival való összehasonlításával történt. Az új természetes vegyületek esetén azok egyéb fizikai (olvadáspont, optikai forgatóképesség) és kromatográfiás mutatóit ( $R_f$  értékek) is meghatároztuk.

## 3. Értékelés

### 3.1. A kutatás metodikai jelentősége

Az eddigiektől eltérő ekdiszteroid izolálási metodikát fejlesztettünk ki. A hatékony előtisztítást követően összehasonlítva a korábbi soklépéses, elsősorban

adszorpciós módszereken alapuló metodikával mindössze négy kromatográfias lépés alkalmazásával sikerült tiszta ekdiszteroidot nyernünk.

Az általános ekdiszteroid izolálási metodikát<sup>19</sup> a centrifugális rétegekromatográfia (RPC) bevezetésével fejlesztettük tovább. A módszer a korábban alkalmazott adszorpciós eljárásokkal összehasonlítva számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik:

- Az RPC egyszerűbben kivitelezhető, mint a klasszikus preparatív rétegekromatográfia.
- A centrifugális erő hatására bekövetkező kényszeráramlás gyorsabb és jobb elválasztást biztosít.
- A minta rövidebb ideig van kapcsolatban az állófázissal, így az állófázis okozta bomlás veszélye csökken.
- Az állófázis vastagságának, az áramlási sebességnek és

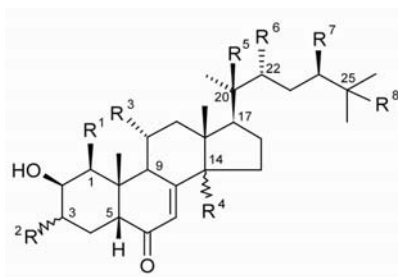
a mozgó fázis összetételének változtatásával illeszthető a módszer az adott izolálási körülményekhez.

- Az RP-CC és az RPC egymás utáni alkalmazás jelentős szelektivitás váltást biztosított.

### 3.2. Az izolált ekdiszteroidok jelentősége

#### 3.2.1. Biológiailag aktív vegyületek kinyerése

Az általunk végzett vizsgálatok is igazolják, hogy a *S. wolffii* értékes forrása a 11 $\alpha$ -hidroxiekdiszteroidoknak. Az izolált vegyületek közül kettő a 11 $\alpha$ -hidroxishidaszteron (1), és a serfuroszteron B (7) rendelkezik 11 $\alpha$ -OH csoporttal. Mindkét molekula a 11 $\alpha$ -hidroxiekdiszteroidok új tagja. A rendelkezésre álló szerkezet-hatás összefüggések alapján a 11 $\alpha$ -OH csoport az anabolikus hatás manifesztálódása szempontjából fontos.



1. Táblázat. Az izolált klasszikus 7-én-6-on ekdiszteroidok szerkezete. Az új természetes molekulákat \* jelöli.

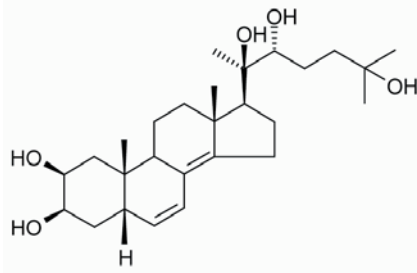
Ekdiszteroid	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	R <sup>7</sup>	R <sup>8</sup>
11 $\alpha$ -hidroxishidaszteron (1)*	H	$\beta$ OH	$\alpha$ OH	$\alpha$ OH				
2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,20R,22R,25-pentahidroxi-5 $\beta$ ,14 $\beta$ -koleszt-7-én-6-on (2)*	H	$\alpha$ OH	H	$\beta$ H	OH	OH	H	OH
2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,20R,22R,25-pentahidroxi-5 $\beta$ ,14 $\alpha$ -koleszt-7-én-6-on (3)*	H	$\alpha$ OH	H	$\alpha$ H	OH	OH	H	OH
ponaszteron A (4)	H	$\beta$ OH	H	$\alpha$ OH	OH	OH	H	H
14 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -epoxi-14,15-dihidrosztahiszteron B (5)*	H	$\beta$ OH	H		OH	OH	H	OH
serfuroszteron A (6)*	H	$\beta$ OH	H	$\alpha$ OH				OH
serfuroszteron B (7)*	H	$\beta$ OH	$\alpha$ OH	$\alpha$ OH				H
24-metilén-shidaszteron (9)*	H	$\beta$ OH	H	$\alpha$ OH				
20,22-didehidrotaxiszteron (10)*	H	$\beta$ OH	H	$\alpha$ OH				
1-hidroxi-20,22-didehidrotaxiszteron (11)*	OH	$\beta$ OH	H	$\alpha$ OH				

Számos fitoekdiszteroid aktivitását vizsgálták gén-expressziós rendszerekben. A legaktívabb rovarhormonok, az ekdizon és a 20-hidroxiekdizon sem mutatott agonista aktivitást emlős sejtekben kifejezett EcR receptoron. Ezzel szemben a ponaszteron A (4)-val kezelt sejtekben a génexpresszió növekedését tapasztalták.<sup>20</sup> A ponaszteron

A-t az Asteraceae családba tartozó fajok közül elsőként a *S. wolffii*-ből izoláltuk.

#### 3.2.2. Rendhagyó szerkezetű ekdiszteroidok

Két komponens a 2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,20R,22R,25-pentahidroxi-5 $\beta$ ,14 $\beta$ -koleszt-7-én-6-on (2) és a 2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,20R,22R,25-pentahidroxi-



3. Ábra. 2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,20R,22R,25-pentahidroxi-5 $\beta$ -koleszt-6,8(14)-dién (8)\*, a *S. wolffii*-ből izolált, dién szerkezetű szteroid.

5 $\beta$ -koleszt-6,8(14)-dién (8) ún. protoekdiszteroidok, mivel nem rendelkeznek az ekdiszteroidokra jellemző klasszikus szerkezettel. A 2 komponens a harmadikként felfedezett ekdiszteroid, melynek C/D gyűrű kapcsolódása *cisz*. Szerkezetileg rokon vegyületeket, a 14-epi-20-hidroxiiekdizon és a 14-epiponaszteron A 22-glikozidot, a *S. wolffii*-ből és a *Leuzea chartamoides*-ből izolálták.<sup>21,22</sup> A C/D gyűrű *transz* anellációját ezidáig az ekdiszteroidok egyik fő jellemzőjének tartották. Így tehát a fenti molekulák felülírják az ekdiszteroidok ezen klasszikus kémiai definícióját.

14 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -epoxi-14,15-dihidrosztahiszteron B (5) a második-ként izolált ekdiszteroid, amely 14,15-ös helyzetben epoxicsoporttal rendelkezik. Az epoxi csoport ritka az ekdiszteroidok között, eddig összesen öt 14,15- illetve 22,23-epoxi csoportot hordozó ekdiszteroidot izoláltak tengeri mikroorganizmusokból és gombákból.<sup>6</sup> Az első 14,15-epoxi-ekdiszteroid, a gymnaszteron B citotoxikus hatását limfóma sejtvonalon igazolták.<sup>23</sup>

A serfuroszteron A (6) és B (7) az első ekdiszteroidok, amelyek furán gyűrűt tartalmaznak. Szerkezetileg rokon vegyületeket, a 20-hidroxiiekdizon és az ajugaszteron C etilidén származékait korábban már más *Serratula* fajokban azonosították.<sup>24</sup>

Szabad 22-hidroxilcsoporttal nem rendelkező ekdiszteroidokat, a 20,22-didehidrotaxiszteront (10) és az 1-hidroxi-20,22-didehidrotaxiszteront (11) izoláltuk a *S. wolffii*-ből. A komponensek rovarhormon aktivitását *Acyrtosiphon pisum* (Harris) tesztrendszerben vizsgáltuk. A fő fitoekdiszteroid, a 20-hidroxiiekdizon aktivitásával (LC<sub>50</sub> = 1.07 ppm) összehasonlítva a 10 komponens inaktív (LC<sub>50</sub> > 100 ppm) bizonyult, míg a 11 komponens alacsony aktivitást (LC<sub>50</sub> = 48.5 ppm) mutatott. Vizsgálataink megerősítették azt a korábbi feltételezést, miszerint 22-es helyzetű, oxigén tartalmú funkció csoport szükséges a rovarhormon hatás kialakulásához, és ennek hiánya jelentős aktivitásbeli csökkenéshez vezet.<sup>25</sup> A fent bemutatott vegyületek az első ekdiszteroidok, amelyek az oldallánc 20(22) helyzetében kettős kötéssel rendelkeznek.

### 3.2.3. Az izolált vegyületek kemotaxonomiai értékelése és gyakorlati jelentősége

Az Asteraceae családon belül két nemzetség, a *Leuzea* és a *Serratula* nemzetség ekdiszteroid pozitív. Ezekhez tartozó néhány faj (*L. carthamoides*, *L. integrifolium*, *S. coronata*, *S. tinctoria* stb.) ekdiszteroidokban kiemelkedően gazdag.

A *Leuzea* fajok közül a *L. carthamoides* a legjelentősebb ekdiszteroid forrás. Különösen Kelet-Európában nagy állományokban természetű; fitokémiai, biológiai vizsgálatok illetve készítmény előállítás céljára egyaránt.

A *L. carthamoides* és a *S. wolffii* ekdiszteroid összetétele számos közös vonást mutat, nemcsak a fő komponensekben, hanem a minor tartalomanyagokban is. Mindkét növény kiváló forrása a magas anabolikus aktivitású 11 $\alpha$ -hidroxiekdiszteroidoknak. Számos *Leuzea* és *Serratula* ekdiszteroid rendelkezik speciális szerkezeti sajátosságokkal: 14-es helyzetű  $\beta$  térállású, illetve 3-as helyzetű  $\alpha$  anellációjú hidroxilcsoporttal és *transz* kapcsolódású A/B gyűrűvel. Mindkét növény bioszintetizál mono- és diacetonid származékokat.<sup>6</sup> A fenti molekulák a két faj kémiai markereinek tekinthetők, mivel a legtöbb vegyületet más növényi forrásból eddig még nem azonosították. Az ekdiszteroid profil hasonlósága is bizonyítja a két faj kemotaxonomiai kapcsolatát. A fenti megállapítások azt is alátámasztják, hogy a *S. wolffii* a *L. carthamoides* megfelelő helyettesítője lehet. A pompás zsoldinát alkalmas hazai ekdiszteroid forrásnak ítéljük fitokémiai és farmakológiai vizsgálatokhoz.

## 4. Kísérleti rész

### 4.1. Növényi nyersanyag

A *Serratula wolffii* (pompás zsoldina) föld alatti részét 2003. augusztusában Herencsényben, természetű állományról gyűjtöttük. A mintapéldány S94-es számon a Farmakognóziail Intézetben megtalálható.

### 4.2. Az izolálás és a szerkezetmeghatározás során alkalmazott módszerek

Az izolálási metodikánk részletes leírásáról, az alkalmazott módszerek definiálásáról közleményeink nyújtanak részletes leírást.<sup>26-29</sup> Az izolált vegyületek szerkezetmeghatározásának lépései, a szerkezet felderítéséhez alkalmazott technikák bemutatása is a fenti közleményekben olvasható.

## Hivatkozások

- Lafont, R.; Wilson, I.D. *The Ecdysone Handbook*, 2<sup>nd</sup> ed. Chromatographic Society: Nottingham, **1996**.
- Simon, P.; *In Ecdysone, from Chemistry to Mode of Action*; Koolman, J., Ed.; George Thieme Verlag: Stuttgart, **1989**; pp. 482.
- Dinan, L. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 325-339.
- Dinan, L.; Savchenko, T.; Whiting, P. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 1121-1132.
- Lafont, R. *Russ. J. Plant Physiol.* **1998**, *45*, 276-295.
- www.ecdybase.org
- Dhadialla, T.S.; Carlson, G.R.; Le, D.P. *Annu. Rev. Entomol.* **1998**, *43*, 545-569.
- Wing, K.D. *Science* **1988**, *241*, 467-469.
- Yao, T.P.; Segraves, W.A.; Oro, A.E.; McKeown, M.; Evans, R.M. *Cell* **1992**, *71*, 63-72.
- Oro, A.E.; McKeown, M.; Evans, R.M.; *Nature* **1990**, *347*, 298-301.
- Constantino, S.; Santos, R.; Gisselbrecht, S.; Gouilleux, F. *Eur. Cytokine. Netw.* **2001**, *12*, 365-367.
- Sláma, K.; Lafont, R. *Eur. J. Entomol.* **1995**, *92*, 355-377.

13. Lafont, R.; Dinan, L. *J. Insect Sci.* **2003**, *3*, 1-30.
14. Báthori, M.; Pongrácz, Z. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 153-172.
15. Dinan, L.; Lafont, R. *J. Endocrinol.* **2006**, *191*, 1-8.
16. Bathori, M.; Toth, N.; Hunyadi, A.; Marki, A.; Zador, E. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 75-91.
17. Syrov, V.N.; Saatov, Z.; Sagdullaev, Sh.; Mamatkhanov, A.U. *Pharm. Chem. J.* **2001**, *35*, 667-671.
18. Girault, J.P.; Lafont, R.; Kerb, U. *Drug. Metab. Dispos.* **1988**, *16*, 716-720.
19. Hunyadi, A.; Gergely, A.; Simon, A.; Tóth, G.; Veress, G.; Bathori, M. *J. Chrom. Sci.* **2007**, *45*, 76-86.
20. Saez, E.; Nelson, M.C.; Eshelman, B.; Banayo, E.; Koder, A.; Cho, G.J.; Evans, R.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 14512-14517.
21. Hunyadi, A.; Gergely, A.; Simon, A.; Tóth, G.; Veress, G.; Báthori, M. *J. Chromatogr. Sci.* **2007**, *45*, 76-86.
22. Budesinsky, M.; Vovac, K.; Harmatha, J.; Cvacka, J. *Steroids* **2008**, *73*, 502-514.
23. Amagata, T.; Minoura, K.; Numata, A. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3773-3774.
24. Odinokov, V.N.; Kumpun, S.; Galyautdinov, I.V.; Evrard-Todeschi, N.; Veskina, N.A.; Khalilov, L.M.; Girault, J.P.; Dinan, L.; Maria, A.; Lafont, R. *Collect. Czech. Chem. C.* **2005**, *70*, 2038-2052.
25. Dinan, L.; Hormann, R.E.; Fujimoto, T. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* **1999**, *13*, 185-207.
26. Liktor-Busa, E.; Simon, A.; Tóth, G.; Fekete, G.; Kele, Z.; Bathori, M. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 884-886.
27. Simon, A.; Tóth, G.; Liktor-Busa, E.; Kele, Z.; Takács, M.; Gergely, A.; Bathori, M. *Steroids* **2007**, *72*, 751-755.
28. Liktor-Busa, E.; Simon, A.; Tóth, G.; Bathori, M. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 1738-1740.
29. Simon, A.; Liktor-Busa, E.; Tóth, G.; Kele, Z.; Groska, J.; Bathori, M. *Helv. Chim. Acta.* **2008**, *91*, 1640-1645.

### Ecdysteroids from *Serratula wolffii*

Investigation of the methanol extract of the roots of *Serratula wolffii* resulted in several ecdysteroids. This paper deals with the isolation and characterization of eleven compounds, from which ten ecdysteroids have been discovered for the first time in a natural source. Their structures were elucidated by 1D and 2D NMR spectroscopy and mass spectrometry. Our results may be summarized as follows:

#### 1. Significance of the study from methodology aspects.

–A new isolation process has been developed. After the clean-up, the use of only four chromatographic steps proved sufficient to obtain pure ecdysteroids. The adsorption chromatographic steps employed in earlier isolation methods have been eliminated.

–RPC was introduced and successfully used in the isolation procedure to obtain pure ecdysteroids. This on-line preparative chromatographic method is an effective and inexpensive tool for the separation of ecdysteroids in complex mixtures with low solvent usage and less time consumption.

#### 2. Structures and biological significance of the isolated ecdysteroids.

–Two ecdysteroids contain an 11 $\alpha$ -OH group. C-11 hydroxylation improves the anabolic effect.

–*S. wolffii* is a new plant source of ponasterone A, which is employed in gene regulation systems.

–Two compounds (2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,20R,22R,25-pentahydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ -cholest-7-en-6-one and 2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,20R,22R,25-pentahydroxy-5 $\beta$ -cholest-6,8(14)-diene) are protoecdysteroids, because they differ from the classical ecdysteroid structure. The former molecule is the third ecdysteroid with a *cis* C/D ring junction. The surprising discovery that there are 14-epi-ecdysteroids appears to disprove the classical chemical definition of ecdysteroids.

–14 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -epoxy-14,15-dihydrostachystrone B, the second ecdysteroid with a 14,15-epoxide ring was isolated from the roots of *S. wolffii*.

–The first two ecdysteroids (serfurosterone A and B) containing a furan ring have been obtained from *S. wolffii*.

–The biological activities of 1-hydroxy-20,22-didehydrotaxisterone and 20,22-didehydrotaxisterone confirmed that the 22-oxygen function plays an important role in the moulting hormone activity.

#### 3. *S. wolffii* is a good source of ecdysteroids.

–The high ecdysteroid content of *S. wolffii* and the chemical similarity demonstrate that *S. wolffii* could be an equivalent source to *L. carthamoides*, which is one of the most important ecdysteroid-containing plants.