



Az Ehető Virágok Antioxidáns Hatóanyagainak Komplex Fitokémiai Vizsgálata

Prof. dr. Jurca Tünde
Nagyváradai Egyetem
Orvosi és Gyógyszerészeti Kar

Gyógyszerészeti szak





Domus Hungarica senior ösztöndíj

- 2012 ősz : Nyomelemek és nehézfémek meghatározása ICP-OES módszerrel gyógynövényekben és gyógynövény-készítményekben
- 2014 tavasz : Gyógynövények és gyógynövény-készítmények antioxidáns kapacitásának meghatározása
- 2014 ősz : A sarkantyúvirág extraktum (*Tropaeolum majus*) polifenol, mikroelemtartalmának és antioxidáns kapacitásának meghatározása

Témavezető: Prof. Dr. Tóth Imre

Vizsgálatainkat 2016 február-június között végeztük a Debreceni Tudományegyetem Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszékén.

Ételed legyen orvosságod, orvosságod legyen ételed!" Hippokratész (Kr.e.:460-359)

A Journal of Food Science:

- leggyakoribb ehető virágokat élelmiszer adalékként lehetne felhasználni,
- ehető virágokat ételek ízesítésére, vagy egyszerűen köretként is fel lehet használni
- egyes növények kiváló antioxidáns tulajdonságokkal is rendelkeznek, ami azt jelenti, hogy segítségükkel megelőzhető az élelmiszerek levegővel való érintkezés következtében bekövetkező elszíneződése
- számos népszerű mesterszakács, köztük **Delia Smith** és **Gordon Ramsay** is javasolja az ehető virágok használatát a főzéshez.

Felhasznált növények



1. *Viola odorata* - Szagos
ibolya

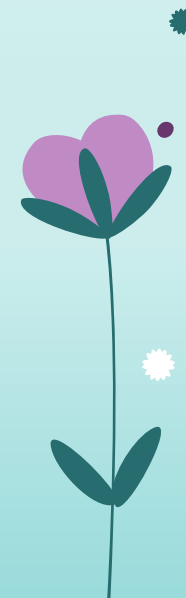
2. *Robinia* – Fehér akác

3. *Primula veris* - Tavaszi
kankalin

4. *Syringa vulgaris*- Orgona

5. *Viola wittrockiana*-
Árvácska

6. *Viola tricolor*-Vadárvácska



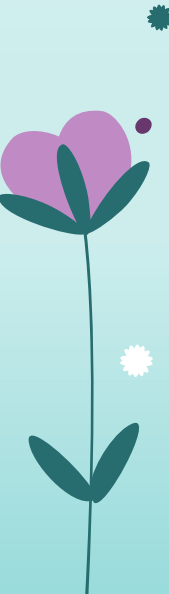
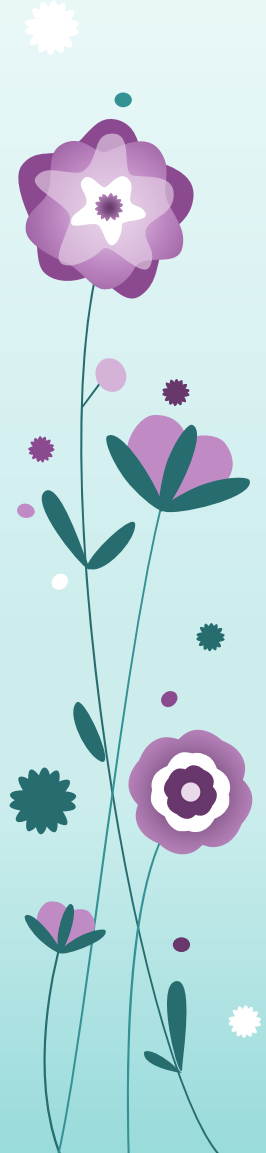
- A kutatás egységei olyan virágok melyek könnyen hozzáférhetőek réteken és mezőkön
- A Nagyváradai Egyetem Gyógyszerészeti szakán tanuló hallgatók a Növénytani szakkörön, tanári felügyelettel, az idén gyűjtötték be.

Működési mechanizmusuk szerint az antioxidánsokat két csoportba soroljuk:

- elsődleges antioxidánsok, melyek képesek láncreakciót megszakítani (C-vitamin és a húgysav)
- másodlagos, azaz védő antioxidánsok, például a transzferin vagy a polifenolos vegyületek. Ezek a vegyületek képesek a szabadgyökök kialakulását meggátolni vagy a már kialakult gyököket megkötni.

Az antioxidánsok egyes típusait a szervezet is elő tudja állítani, ilyenek az enzimek, de számos molekulát nem tudunk szintetizálni (aszcorbinsav, flavonoidok), ezekhez táplálékbevitel útján tudunk hozzájutni.

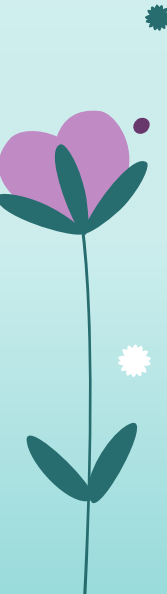
- Működésüket jellemzi a szinergikus, egymást erősítő hatás, azaz a többféle típusú antioxidáns hatékonyabban védi a szervezetet a káros folyamatokkal szemben, mint külön-külön.
- Fontos megjegyezni, hogy a túlzott bevitel is káros lehet, mivel az antioxidáns molekula prooxidánssá válhat, mely a szabadgyökökhöz hasonlóan káros folyamatokat eredményezhet.





Illatos ibolya (*Viola odorata*)

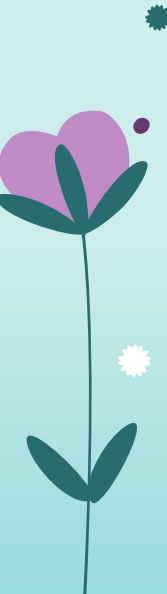
- leggyakrabban használt „része” nem más, mint ellenállhatatlan, édes illata miatt a virága
- Dél-Franciaországban és Olaszországban olajat készítenek (sajtolással vagy enflourage technikával), mely a világ egyik legdrágább illóolaja.
- Szaponin tartalma miatt nyugtató hatású főzet készíthető az ibolyából
- Pakisztánban egy kutatócsoport bebizonyította, hogy az ibolya lázcsillapító hatása az aszpirinéhez igen hasonló
- Indiában az ibolya a mandulagyulladás hagyományos gyógyszere
- A- és C-vitaminban gazdag hatóanyagai miatt bőrnedvesítő és hidratáló arckrémek alapjául is szolgál



Az akácvirág (*Robinia pseudacacia*):

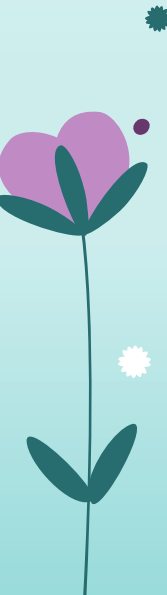


- kellemes illatú, bódító, légiesen könnyed, és ha megkóstoljuk finom is
- leginkább az emésztőszervi megbetegedések kezelésére alkalmas (reflux, a gyomorhurut, a gyomorbélfekély, a székrekedés vagy az irritábilis bélszindróma)
- a tea hatékony stressz, álmatlanság, pánikroham, depresszió kezelésére



Orgona (*Syringa vulgaris*)

- bármely része – rügy, virág, levél, kéreg – jó szolgálatot tehet egészségünknek
- megfázás, influenza ellen is lehet gyógyír az orgona levele
- orgonarügy tinktúrája segíthet diabétesz, ízületi gyulladás esetén is – tinktúra és a kenőcs
- köszvény, meszesedés

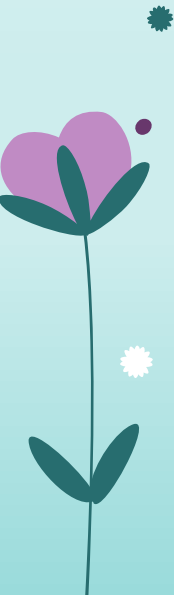
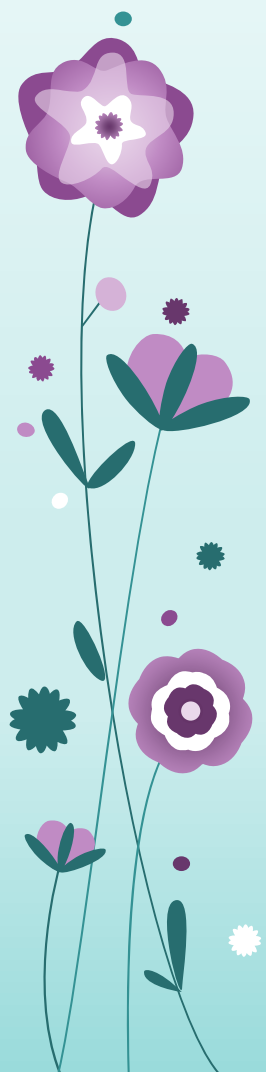


Minta előkészítés

1. Extrakció (70 %-os Etil-alkohol)
2. Oldószerfázis bepárlása
3. Liofilizálás
4. Szilárd minta (kb. 50 mg) oldása
 - a) Semleges oldószeres kezelés
 - b) Savas oldószeres kezelés
5. Bepárlás
6. Visszaoldás (oldószer: 1 ml dimetil- szulfoxid)
7. Kromatográfias minta előkészítés: 200 μ l minta + 800 μ l ACN: H₂O (40:60)

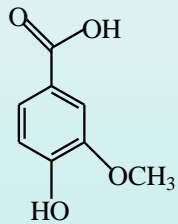


- A polifenolok ritkán találhatók meg aglikonként a növényekben, többségük cukorhoz kötötten, ritkábban észterezett vagy polimer formában van jelen.
- A minta-előkészítési módszer tervezésekor, a vizsgálandó komponensek polaritása döntő szerepet játszik az alkalmazandó kivonószer megválasztásakor.
- A kevésbé poláris flavonoidok (flavononok, metilezett flavonoidok) szelektív kivonásához akár apoláris szerves oldószereket is használhatunk (például kloroform, etil-acetát).
- Az egyik leggyakrabban alkalmazott műszeres analitikai technika polifenolok elválasztására, minőségi és mennyiségi meghatározásra a fordított fázisú kromatográfia, melyhez általában UV-VIS vagy tömegspektrometriás detektálást alkalmaznak.
- A virágok extraktumából az összantioxidáns, flavonoid és összpolidenol tartalmat meghatározzuk FRAP, TPC, TEAC, DPPH, Cuprac módszerekkel.
- A gyógynövényextraktumokból nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával HPLC azonosítjuk a polifenolokat standardok segítségével.

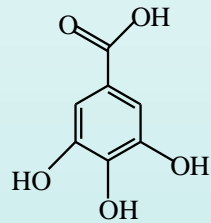


Vizsgált antioxidánsok

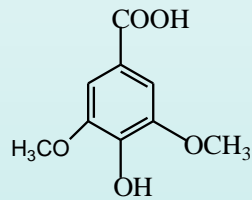
14 standard



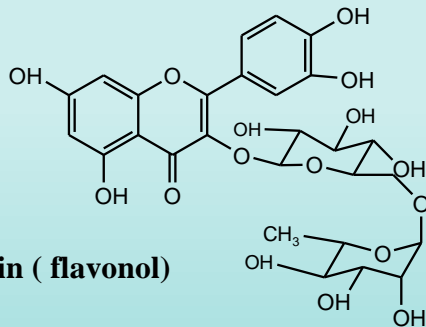
Vanillinsav
(hidroxibenzoészav
származék)



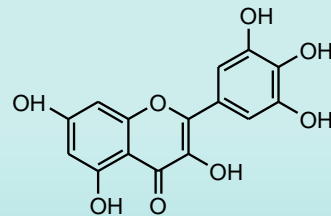
Galluszsav
(hidroxibenzoészav
származék)



Sziringénsav
(hidroxibenzoészav
származék)

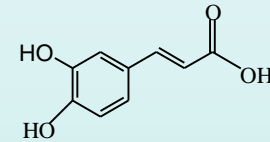


Rutin (flavanol)

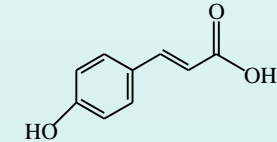


Miricetin
(flanol)

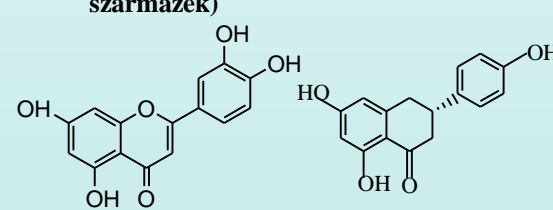
Flavonoidok és fenolos savak



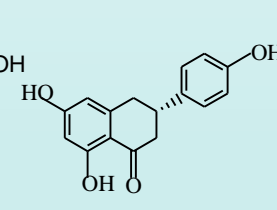
**Kávéssav (hidroxifahéjsav
származék)**



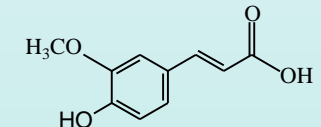
**p-kumársav (hidroxifahéjsav
származék)**



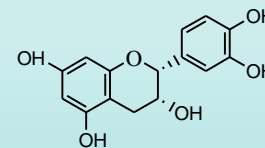
Luteolin (flavon)



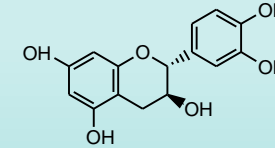
Naringenin (flavanon)



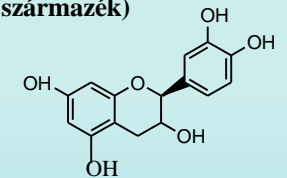
Ferulasav
(hidroxifahéjsav
származék)



Epikatechin
(flanol)



(+)-katechin (2R, 3S)
(flanol)



(-)- catechin(2S, 3R)

A minták elemzése

- A liofilizált mintákból két speciális extrakció előkészítése történt (savas és semleges) a polifenolok kimutatására: etil acetátot és sósavat használva oldószerként.

Extrakciós módszerek

- Két különböző extrakciós módszerrel dolgoztam fel a mintákat, egy semleges és egy savas extrakciós módszerrel
- Az összehasonlítás érdekében mindkét esetben készítettem belső standard (naringerin) hozzáadásával és belső standard hozzáadása nélküli mintákat.
- A savas extrakció során a glikozid lebontható aglikonra és cukor molekulára.

Semleges extrakció

- 50 mg liofilizált szilárd minta
- 90 %-os metanol: 0,5 %-os ecetsav: 9,5 % desztillált vizet tartalmazó oldatból 2 ml valamint 10 μ l 10 mM naringerin belső standard oldatot.
- 3 percen keresztül ultrahangos fürdőbe tettem, hogy minden szilárd minta feloldódjon.
- Rotációs vákuumbepárlóval szárazra pároltam.
- A száraz mintát két részletben (800 μ l + 200 μ l) 1000 μ l dimetil-szulfoxidban oldottam fel.

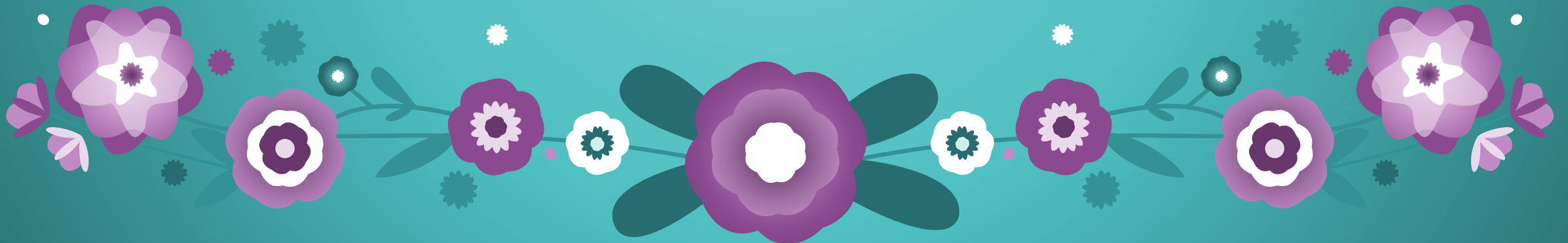
Savas extrakció

- 50 mg liofilizált minta
- 4 ml 25%-os metanolt, 1 ml 6 M-os sósavat és 10 μ l (10 mM belső standard) naringerin oldatot
- 3 percig ultrahangos fürdőben kezeltem.
- 85-90 °C-os vízfürdőbe 2 órán át
- 2,5 ml etil-acetáttal elegyítettem és rotációs vákuumbepárlóval szárazra pároltam.
- A száraz mintát két részletben 1000 μ l dimetil-szulfoxidban oldottam fel.

A folyadékkromatográfia

- Kis nyomású gradiens módszer
- Fordított fázisú kromatográfia
- Eluens összetétel
- A eluens: víz:hangyasav (0,05 v/v%) elegy
- B eluens: ACN:hangyasav (0,05 v/v%) elegy
- Alkalmazott kolonna: Kinetex 250x4,6 mm C18

Idő (perc)	A eluens v/v%	B eluens v/v%
1	98	2
25	50	50
31	50	50
32	98	2
35	98	2



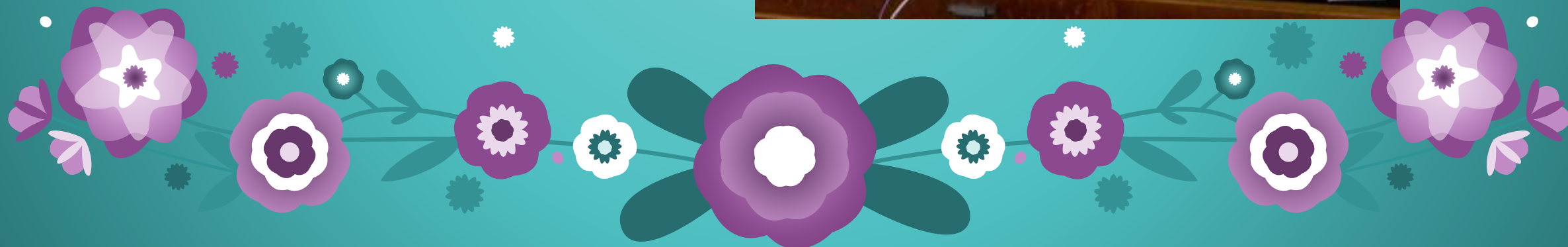
Semleges
oldószerkezelés

Metil-alkohol:
ecetsav: víz
(90: 0,5: 0,5)

Savas
oldószerkezelés

25 %-os metil-
alkohol
6 M sósav
Etil-acetát

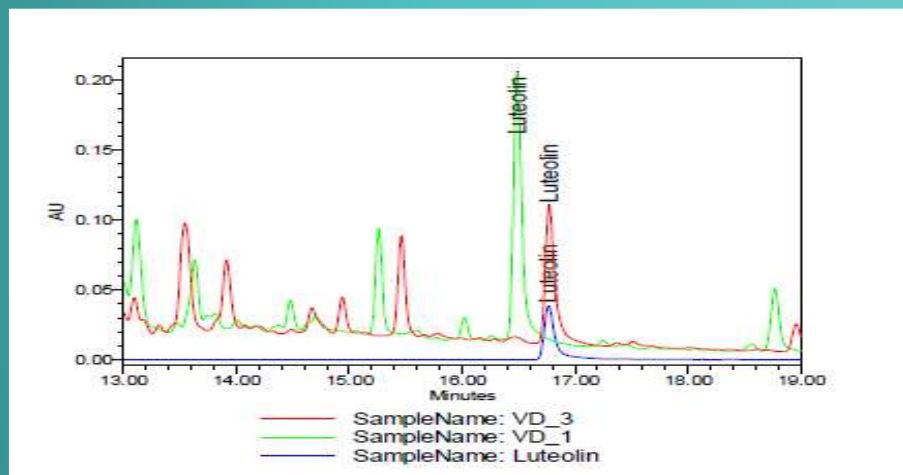
10mM naringenin belső standardoldat



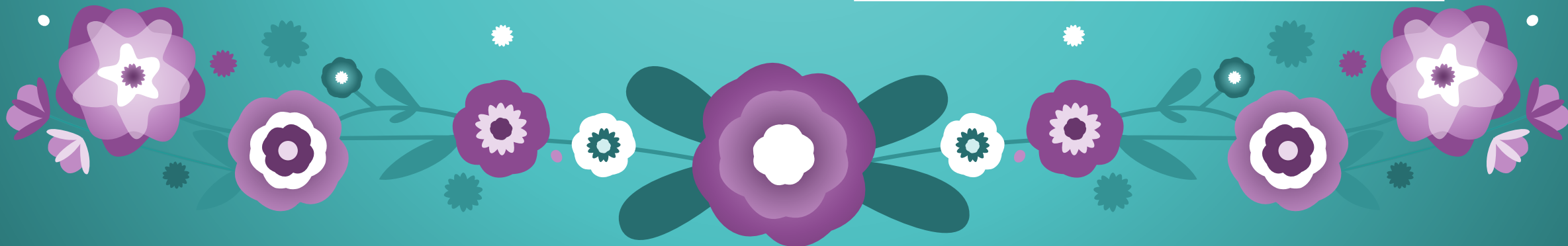
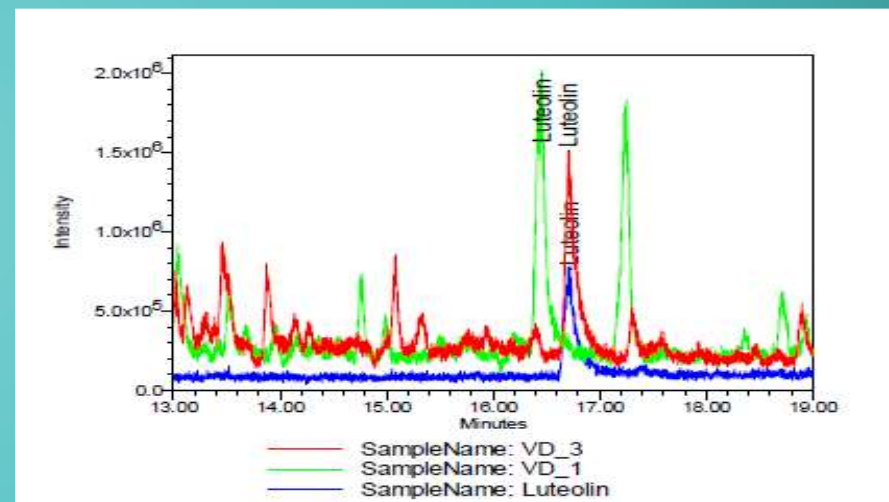
Az elsődleges minőségi azonosítás a retenciós idő alapján történik

A kromatográfiás paraméterek megfelelő változtatásával el lehet érni, hogy minden komponens jól elváljon, illetve lehetőség szerint ideális alakú (gauss görbe) csúcsként legyen detektálható

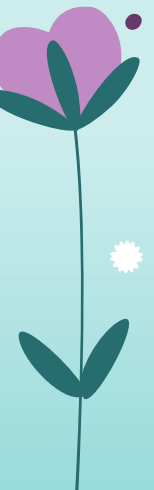
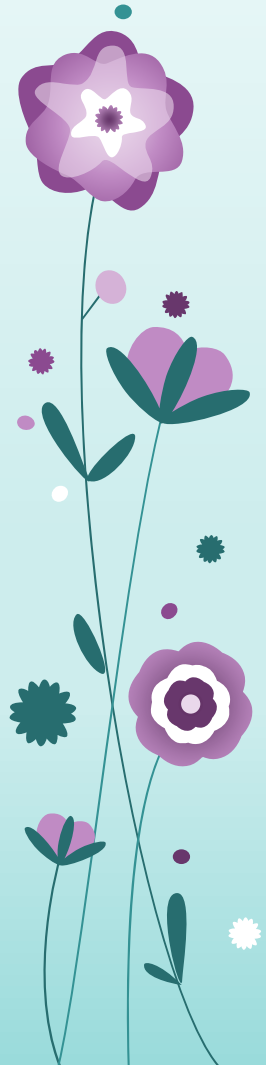
A tavaszi kankalin és a luteolin kromatogramja



A luteolin és a tavaszi kankalin tömegspektruma



- ❖ Az azonosítást alátámasztja a tömegspektrum is.
- ❖ A totál ion kromatogramban is megjelenik az időbeli eltérés, de a tömegek azonosak. Azzal, hogy a retenciós idő, az UV spektrumok és a tömegspektrumok is megegyeznek, biztosan állítható, hogy a tavaszi kankalin minta tartalmaz luteolint.
- ❖ Azokat az anyagokat, amelyből standard állt rendelkezésemre és egyértelműen tudtam azonosítani, azokból mennyiségi kiértékelést is végeztem.
- ❖ A meghatározáshoz külső standard módszert alkalmaztam és a standard maximumán végeztem a kiértékelést.
- ❖ A standard mintákhoz tartozó területekből és a gyógynövény mintákhoz tartozó területekből történt a mennyiségi meghatározás és a mennyiségi meghatározás értékei a liofilizátumra vonatkozó adatok.
- ❖ A következő táblázat foglalja össze a minőségi és mennyiségi meghatározás értékeit.

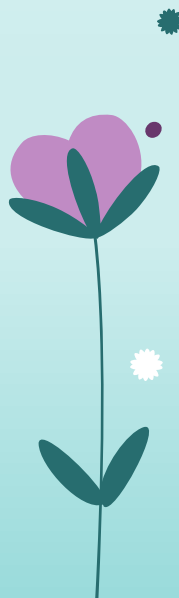


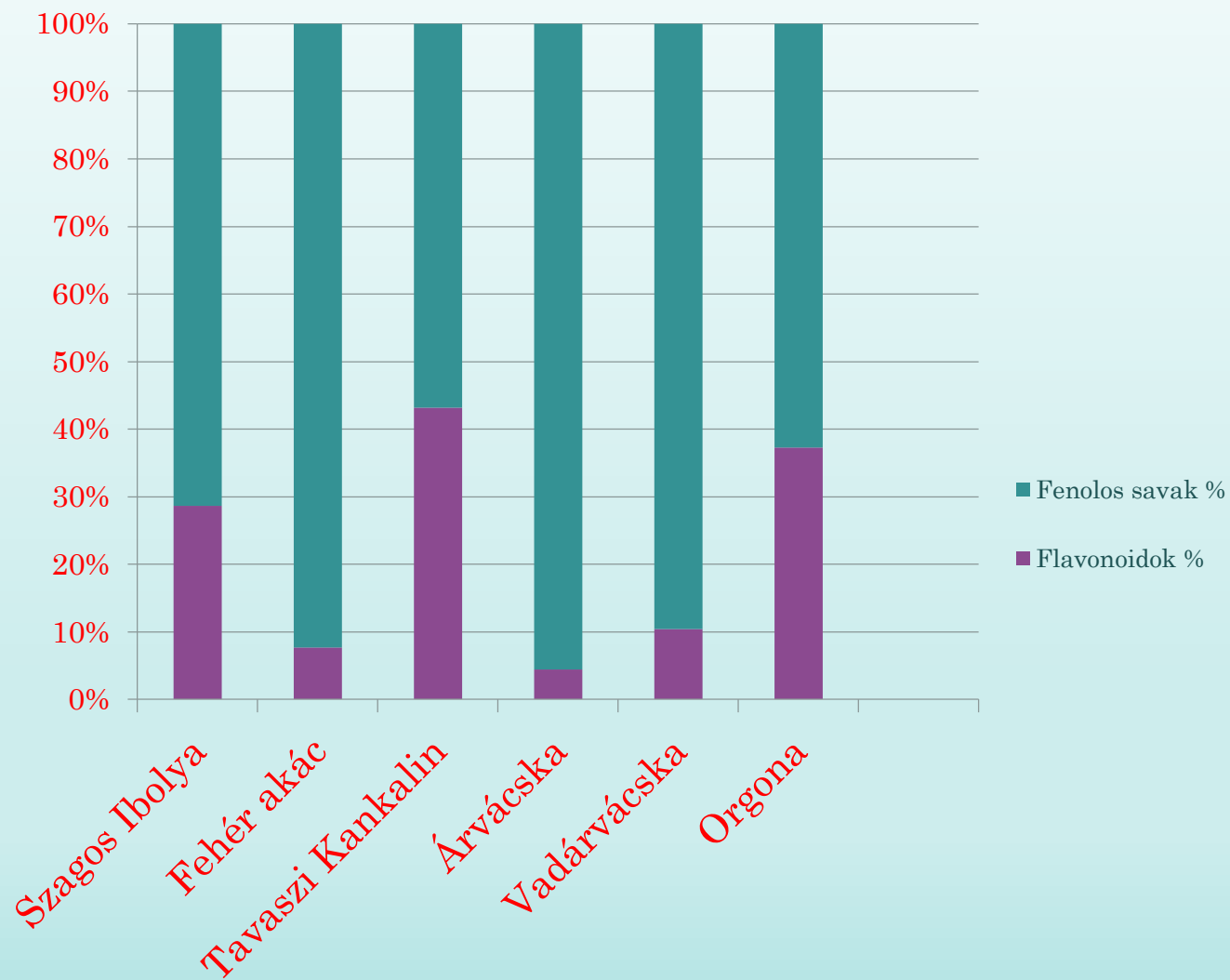
Flavonoidok mennyisége (mg/kg)

Növény neve	Kezelés típusa	Cathecin	Epicatechin	Rutin	Naringenin	Myricetin	Luteolin	Quercetin
Szagos ibolya	Semleges	11.23	879.88	112.21	13.67	34.67	10.32	0.00
	Savas	231.11		34.12	8.98	68.92	43.12	234.78
Fehér akác	Semleges	0.00	0.00	56.90	6.89	34.89	7.98	0.00
	Savas	0.00	0.00	11.21	1.23	44.76	23.45	45.89
Tavaszi kankalin	Semleges	1125.6	112.45	46.11	12.22	0.00	8.21	0.00
	Savas	653.01	34.67	8.35	8.72	0.00	39.11	85.34
Árvácska	Semleges	0.00	0.00	89.12	5.45	11.24	22.34	0.00
	Savas	0.00	0.00	0.00	9.21	24.32	89.12	112.04
Vad-árvácska	Semleges	0.00	0.00	169	5.77	33.63	37.66	0.00
	Savas	0.00	0.00	0.00	10.41	44.02	122.45	233.86
Orgona	Semleges	12.34	0.00	48.12	3.82	22.56	409.44	0.00
	Savas	33.34	0.00	0.00	0.00	37.87	1379.88	134.23

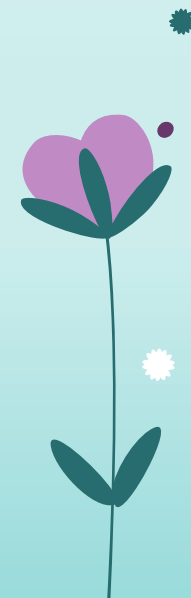
Fenolos savak mennyisége (mg/kg)

Növény neve	Kezelés típusa	p-Coumaric acid	Gallic acid	Caffeic acid	Ferulic acid	Sinapic acid	Syringic acid	Vanillic acid
Szagos ibolya	Semleges	960.57	112.32	67.89	0.00	56.78	345.67	153.15
	Savas	257.21	456.56	93.43	0.00	112.34	35.67	283.27
Fehér akác	Semleges	1100.12	345.67	0.00	0.00	67.89	101.26	0.00
	Savas	123.78	856.67	0.00	0.00	114.78	95.25	0.00
Tavaszi kankalin	Semleges	785.78	23.45	265.25	245.23	34.48	56.78	85.43
	Savas	345.67	546,34	152.14	98.45	101.61	21.34	23.45
Árvácska	Semleges	2398.56	0.00	1256.32	564.23	0.00	116.56	93.23
	Savas	675.45	1581.79	783.23	231.89	0.00	78.98	34.56
Vad-árvácska	Semleges	1896.78	0.00	945.34	409.24	0.00	105.64	87.45
	Savas	568.56	876.56	453.89	185.61	0.00	93.45	33.78
Orgona	Semleges	1167.89	145.42	7.43	345.34	0.00	132.89	0.00
	Savas	986.56	456.78	65.12	116.45	0.00	76.45	0.00





A flavonoidok és fenolos savak % tartalmának arányos összefüggése



Alkalmazott spektrofotometriás módszerek a polifenolok és flavonoidok, valamint az antioxidáns kapacitás kimutatására

FRAP módszer: a ferri-ionokat (Fe^{3+}) az antioxidánsok ferro-ionokká (Fe^{2+}) redukálják.

- A reakció során a TPTZ (2,4,6-tripiridil-S-triazin) komplexképző segítségével oldatban tartott ferroionok keletkeznek, ami kék színű terméket képez.
- A színváltozás spektrofotometriásan ($\lambda=593$ nm-en) nyomon követhető
- A módszer előnye, hogy gyors, egyszerű, olcsó, reprodukálható
- Hátránya azonban, hogy a vasionok rossz oldékonysága miatt a reakció jóval a fiziológiai pH (enyhén savas, közel semleges) alatti tartományban zajlik, így a technika nem érzékeny a tiol típusú antioxidánsokra (pl. glutation)
- A karotinoidok sem rendelkeznek vasredukáló képességgel, egyes komponensek (pl. kávésav, ferulasav) reakcióideje hosszabb az általánosan alkalmazottnál, ezért azokat a FRAP nem méri

A Folin- Ciocalteu módszer:

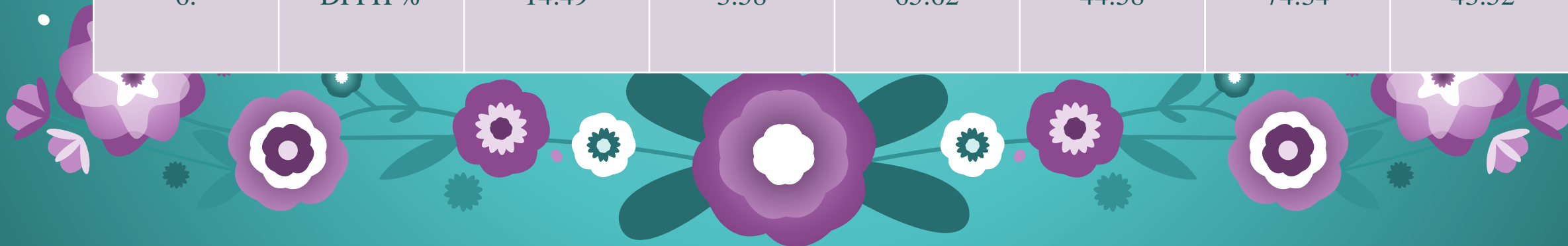
- ❖ A reagens sárga színű Mo(VI) anionja a vizsgált mintában található antioxidánsoktól elektront vesz fel, és kék színű Mo(V) anionná redukálódik.
- ❖ A keletkező kék színű termék spektrofotométerrel ($\lambda=765$ nm-en) detektálható.
- ❖ Előnye, hogy egyszerű, olcsó, reprodukálható
- ❖ Hátránya hogy lúgos (nem fiziológiás) pH-n zajlik a reakció és nem szelektív a polifenolokra

A DPPH módszer:

- ❖ Gyök megkötésén alapuló antioxidáns kapacitást mérő módszer
- ❖ A reakció a következőképpen zajlik: a sötétlila színű gyök antioxidánsokkal reagálva elveszíti színét.
- ❖ Széles körben alkalmazzák, mert a molekula kereskedelmi forgalomban kapható, stabil, kevésbé reakcióképes, és kevésbé agresszív
- ❖ Hátránya ugyanez a stabilitás, vagyis hogy reakcióképessége a sejtben normál anyagcsere során keletkező gyököktől jelentősen eltérő
- ❖ . Fény-, oxigén-, pH- és oldószerfüggő.
- ❖ További problémát jelent a szerkezetből adódó rossz hozzáférhetőség. A kis molekulák jobban odaférnek a DPPH gyökhöz, így nagyobb antioxidáns kapacitás értéket mutatnak.
- ❖ A mérés hullámhosszán (517 nm-en) a karotinoidok és az antocianinok interferenciája is számottevő lehet

Az összes polifenol, flavonoid és antioxidáns kapacitás meghatározása
A Cuprac és DPPH spektrofotometriás módszereket alkalmaztam az antioxidáns kapacitás meghatározására.

Nr.	Polifenolok	Szagos ibolya	Fehér akác	Tavaszi kankalin	Árvácska	Vadárvácska	Orgona
2.	FRAP mg TE/ml	17.147	2.147	117.323	214.099	114.717	13.635
3.	Polifenol-tartalom mg GAE/100DW	334.148	311.925	535.411	415.481	545.037	536.531
4.	Flavonoidok mgQE/ml	1.409	0.427	1.531	3.962	2.692	3.252
5.	CUPRAC mmol Trolox/100 g	1.720	0.673	5.648	3.222	6.688	3.245
6.	DPPH %	14.49	3.58	65.62	44.58	74.34	43.52



A munkám során tavaszi növények hatóanyagainak kinyerésére és mennyiségi meghatározására végeztem kísérleteket.

A liofilizált növénytípusokat a hatékony kinyerés céljából egy semleges és egy savas oldószerkezelési módszernek vetettem alá.

A mintákat és a standard oldatokat a teljes spektrális tartományban mértem, de a kiértékelést az adott standardra jellemző hullámhosszokon végeztem.

A kiértékelés során a liofilizátumra mennyiségi meghatározást végeztem, amelyekhez különböző flavonoid illetve fenolsav szerkezetű standard mintákat használtam.

A semleges és a savas oldószerkezelés során eltérő komponenseket találtam a gyógynövényekben.

Az egyes komponensek azonosítása azonos retenciós idő, UV spektrum, valamint tömegspektrum egyezés alapján történt.

Egyes flavonoid típusú vegyületek a semleges kezelésű mintákban megjelentek, míg a savas hidrolízis során eltűntek, ez a cukoregység elhidrolizálásával magyarázható.

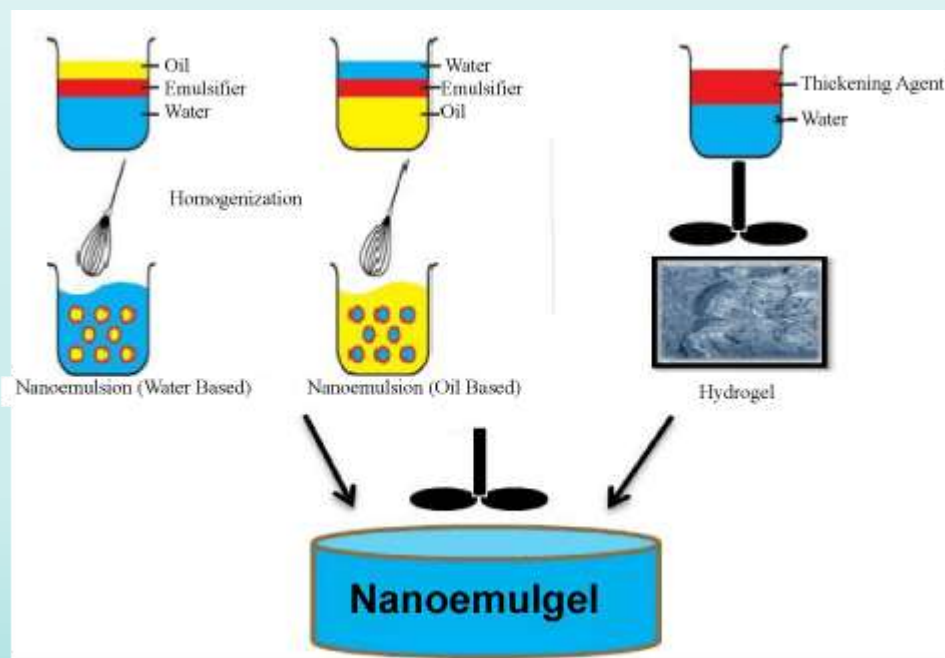
Az általam elvégzett kísérletek alapján kijelenthető, a vizsgált gyógynövények különböző szerkezetű és mennyiségű antioxidánst tartalmaznak.





**Jelen kutatás az MTA
Domus ösztöndíj
programja nélkül nem
valósulhatott volna meg.
Köszönöm, hogy
támogatták munkámat!**

Prof. Tóth Imre



**A növényi extraktumok felhasználása
mikro-és nanoemulziós rendszerek
előállítására**

**DE GYTK Gyógyszertechológiai
Tanszéken**

