

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

SIK BEATRIX

**MOSONMAGYARÓVÁR
2021**

**SZÉCHENYI ISTVÁN EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI KAR
ÉLELMISZERTUDOMÁNYI TANSZÉK**

**WITTMANN ANTAL NÖVÉNY-, ÁLLAT- ÉS ÉLELMISZER-
TUDOMÁNYI MULTIDISZCIPLINÁRIS
DOKTORI ISKOLA**

**PULAY GÁBOR ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI
PROGRAM**

**DOKTORI ISKOLAVEZETŐ:
PROF. DR. ÖRDÖG VINCE DSC
EGYETEMI TANÁR**

**PROGRAMVEZETŐ:
PROF. DR. VARGA LÁSZLÓ DSC
EGYETEMI TANÁR**

**TÉMAVEZETŐK:
DR. AJTONY ZSOLT
EGYETEMI DOCENS**

**DR. KAPCSÁNDI VIKTÓRIA
EGYETEMI ADJUNKTUS**

**ROZMARINGSAV-TARTALMÚ GYÓGYNÖVÉNYKIVONATOK
ELŐÁLLÍTÁSA ÉS TÁPLÁLÉKKIEGÉSZÍTŐKÉNT, VALAMINT
FUNKCIONÁLIS ÉLELMISZERKÉNT VALÓ FELHASZNÁLÁSA**

**KÉSZÍTETTE:
SIK BEATRIX**

**MOSONMAGYARÓVÁR
2021**

1 Bevezetés és célkitűzés

Napjainkban a nagy rozmaringsav tartalmú gyógynövény kivonatok egyre nagyobb figyelemnek örvendenek köszönhetően kedvező farmakológiai hatásaiknak. A komponens a fenolos-savak csoportjába tartozó növények által termelt másodlagos metabolit, melyet gyakran alkalmaznak marker vegyületként a Lamiaceae család Nepetoideae alcsaládjában. Kémiai szempontból a rozmaringsav a kávéssav és a 3,4-dihidroxi-fenil-tejsav észtere. A komponensnek elsősorban antioxidáns tulajdonságai jelentősek, ugyanakkor számos kutatás kimutatta, hogy jelentős szerepet tölt be a neurodegeneratív rendellenességek, a diabetes mellitus vagy a rákos megbetegedések prevenciójában és kiegészítő terápiájában. Ezen szemlélet alapján kutatómunkám alapvető célkitűzése a Lamiaceae család Nepetoideae alcsaládjába tartozó növények (*Melissa officinalis* L., *Mentha x piperita*, *Thymus vulgaris* L., *Origanum vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L.) rozmaringsav komponensének maximális kinyerése és felhasználása volt különféle étrend-kiegészítő és funkcionális élelmiszer fejlesztéséhez. A cél elérése érdekében a következő feladatokat végeztem el:

- Négy független változó vizsgálása az egy faktor egy időben megközelítés elv (OFAT) alapján három különböző extrakciós technikával.
- Víz-etanolos kivonatok (tinktúrák) hosszú távú stabilitásának vizsgálata környezeti hőmérsékleten, szokásos „otthoni” tárolást szimulálva.

- Rozmaringsavban gazdag liofilizált citromfűkivonat alkalmazása funkcionális összetevőként étcsokoládében.

2 Kísérletek

2.1 Vizsgált növények, termékek

Kísérleteimet a Kisalföldi Mezőgazdasági Zrt. (Nagyszentjános) által termesztett, általuk 2017 nyarán betakarított és megszáritott citromfű (*M. officinalis*), borsosmenta (*M. piperita*), kerti kakukkfű (*T. vulgaris*), rozmaring (*R. officinalis*), szurokfű (*O. vulgare*) és orvosi zsálya (*S. officinalis*) gyógynövényekkel végeztem. A csokoládétermék kifejlesztéséhez használt 54,5%-os étcsokoládépasztillát az Édeni Édességek Boltja (Szentendre, Magyarország) forgalmazta.

2.2 Extrakciós módszer fejlesztése folyékony kivonatok előállításához

A Lamiaceae növények különböző kivonataiból származó rozmaringsav extrakciós hozamait macerálásos kevertetéssel (MACs), forralásos visszafolyóztatással (HRE) és mikrohullámmal segített extrakciós (MAE) módszerekkel követtem nyomon a következő független paraméterek vizsgálatával: kivonószer savassága (0; 0,1 és 1 v/v% HCl), kivonószer típusa (H₂O, MeOH, EtOH), extrakció időtartama és hőmérséklete.

A MACs-t csiszolatos dugóval lezárt Erlenmeyer lombikban, szobahőmérsékleten, öt különböző extrakciós idő (30, 60, 120, 240 és 1440 min) alkalmazásával hajtottam végre laboratóriumi rázógép segítségével (120 rpm). A HRE kivitelezése 15, 30 és 60 perces kezelési

időkkel, forrásponton valósult meg. Az extrahálási idő letelte után a mintákat 10 percig állni hagytam.

A MAE eljárást zárt teflon edényben végeztem a mintáknak az alkalmazott hőmérsékleten (50°C és 80°C) történő 5 percig tartó előmelegítésével, majd ezt követően négy különböző időtartamig (5, 10, 15 és 30 min) történő extrahálásával 400 W-os teljesítmény alkalmazása mellett. Az extrakciós idő letelte után a MAE berendezés 15 perc alatt automatikusan visszahűtötte az edényben lévő keveréket. Ezt követően a mintákat további 5 percre hideg vízfürdőbe helyeztem.

2.2.1 HPLC-DAD elemzés

Állófázisul mindegyik vizsgált gyógynövény esetében egy Merck gyártmányú C18-as Purospher Star (250 mm, 4,6 mm, 5 µm) folyadékkromatográfiás oszlop szolgált, melynek hőmérsékletét elemzéseim során 35°C-on tartottam. A mozgófázist metanol (A), 0,25 v/v% TFA oldat (B) és nagy tisztaságú víz (C) elegye alkotta a következő gradiens programmal: 0-25 min: 15 v/v% (A), 25-30 min: 15-75 v/v% (A), 30-35 min: 75-15 v/v% (A), 35-40 min: 15 v/v% (A). Az elemzések során a B eluens összetételét állandó értéken (20 v/v%) tartottam. A kromatogramokat a rozmaringsav abszorpciós maximumán (330 nm) értékeltem ki. A HPLC elemzést megelőzően a mintákat minden esetben centrifugáltam (2500 × g, 10°C, 10 min), majd a felülúszóból 2 µL-t egy 0,22 µm-es PVDF membránon való szűrést követően közvetlenül a HPLC oszlopra injektáltam. A mozgófázis térfogatárama 1 mL/min volt.

2.3 Tinktúrák elemzése

2.3.1 Tinktúra készítése

Az egyes etanolos kivonatok (tinktúrák) 3 g aprított növényi anyag és 60 mL 50:50 v/v EtOH-H₂O elegy felhasználásával készültek MAC_S eljárással zárt Erlenmeyer lombikban (120 min, szobahőmérséklet). Az így elkészült extraktumokat 1-es típusú Whatman szűrőpapíron (Sigma-Aldrich) szűrtem, majd a szűrleteket, mint tinktúrákat használtam a további elemzésekhez.

2.3.2 Stabilitási teszt

Az előállított kivonatoknak az alikvot részét (4 mL) hat borostyánszínű, csavaros kupakkal ellátott mintatartóüvegbe adagoltam, majd a szokásos „otthoni” tárolási körülményeket szimulálva, fénytől védett helyen, szobahőmérsékleten hat hónapig tároltam. A tinktúrák rozmaringsav-tartalmának változását havi rendszerességgel (0, 27, 55, 86, 113, 141 és 168 nap) elemeztem. Az eltarthatósági időtartam megállapításához a marker vegyületnek (rozmaringsav) legfeljebb 10%-os hatóanyagbomlását tekintettem elfogadhatónak. Kontroll mintaként standard rozmaringsav (500 µg/mL) 50:50 v/v EtOH-H₂O elegyét használtam.

2.3.3 HPLC-DAD elemzés (ld. 2.2.1 alfejezet)

2.3.4 Összes polifenol-tartalom

A tinktúrák elemzése során az 50:50 v/v EtOH-H₂O eleggyel ötszörös térfogatra hígított extraktumok 50 µL térfogatú részéhez, 1,5 mL ionmentes vizet, 2,5 mL Folin-Ciocalteu reagenst, majd 2 mL Na₂CO₃ oldatot adtam. A mintákat fénytől védett helyen 90 percig,

szobahőmérsékleten tartottam, majd az abszorbanciát 725 nm-es hullámhosszúságon, gyógynövény extraktumot nem tartalmazó vakoldattal szemben spektrofotometriásan mértem. A galluszsavval (100-1000 µg/mL) végzett külső standard kalibrációs módszer segítségével meghatározott összes polifenol-tartalmat, a mért növényi szárazanyagra vonatkoztatva mg galluszsav/g (mg GAE/g) egyenértékben kifejezve adtam meg.

2.3.5 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil összantioxidáns vizsgálat

A gyök oldatát 3,9 mg DPPH-nak 100 mL metanolban való oldásával állítottam elő. Az eljárás során az 50:50 v/v EtOH-H₂O eleggyel megfelelően hígított extraktumok 50 µL-ét 5 mL-es barna mérőlombikba pipettáztam, majd metanos DPPH oldattal jelre állítottam. Az oldat abszorbanciájának csökkenését 517 nm-es hullámhosszon metanollal szemben spektrofotometriásan mértem. A µg/mL egységben kifejezett IC₅₀ értéket lineáris interpolációval határoztam meg. Az 1/IC₅₀ együtthatót az antioxidáns aktivitás és a vizsgált tinktúrák rozmaringsav, valamint összes polifenol-tartalma közti összefüggések szemléltetésére alkalmaztam. A kalibráláshoz L - aszkorbinsavat (400-800 µg/mL), pozitív kontrollként pedig kávésvat és rozmaringsavat alkalmaztam.

2.4 Csokoládé elemzése

2.4.1 Csokoládé előállítása, mintaelőkészítés

A rozmaringsavat tartalmazó (100 mg/25g) csokoládék előállítása kereskedelmi forgalomban kapható étcsokoládé-pasztillák (54,5%) segítségével valósult meg a következők szerint: 100,34 g

csokoládét vízgőz felett felolvasztottam ügyelve arra, hogy az olvasztott csokoládé hőmérséklete ne emelkedjen 45°C fölé. Ezt követően az olvasztott csokoládé 2/3 részét gránitlapon 27-28°C-ra hűtöttem 4,4936 g száraz citromfűkivonat hozzáadása közben. Ezt követően a besűrűsödött csokoládét a maradék olvasztott csokoládéval 31-32°C munkahőmérsékletűre kevertem, majd az ily módon egységesített és temperált csokoládémasszát polikarbonát formába öntöttem. Ezen irányú vizsgálataimhoz továbbá az előzőekben bemutatott lépések megismétlésével 0,4006 g standard rozmaringsavval adalékolt étcsokoládét, valamint standard hatóanyagot és növényi szárazkivonatot nem tartalmazó, kontroll mintaként szolgáló étcsokoládét is készítettem.

A rozmaringsavat tartalmazó csokoládék mintaelőkészítését kétlépéses mintaelőkészítési folyamat alkotta. Első lépésben a megszilárdult csokoládékat lereszeltem, majd dörzsmozsárban egységesítettem. A mintaelőkészítés második fázisa az egységesített csokoládék alikvot mennyiségének (500 mg) n-hexánnal (5 mL) történő zsírtalanításából állt négy, egymást követő lépésen keresztül. Ehhez a csokoládét egy 15 mL térfogatú osztott skálás, kúpos végű, csavaros zárókupakkal ellátott polipropilén centrifuga csőbe mértem, majd a hozzáadott n-hexánnal 1 percre kémcsőrázóval intenzíven kevertettem. A mintákat további 5 percre ultrahanggal rázattam, majd az így kapott elegyet centrifugáltam (2500 × g, 10°C, 5 min). A lipideket tartalmazó felülúszó eltávolítása után a visszamaradt nedves csokoládét a maradék hexán tartalmának eltávolítása végett 1 óra időtartamra 35°C-os szárítószekrénybe helyeztem.

2.4.2 Extrakciós módszer fejlesztése

Az adalékolt étcsokoládék rozmaringsav-tartalmának kinyeréséhez alkalmazott extrakciós módszereknek (MACs, MAE) a fejlesztése az OFAT elv alapján történt 1:20 g/mL mintatömeg: kivonószer-térfogat arány alkalmazása mellett a következő két tényezőnek (független változó) a figyelembe vételével: kivonószer típusa és extrakció időtartama. Az optimális kivonószer kiválasztásához EtOH-H₂O valamint MeOH-H₂O különböző arányú keverékeinek (100:0 és 50:50 v/v) hatását vizsgáltam. A MACs módszernél 30, 60, 120, 240 és 1440 perc, a MAE eljárásnál pedig 5, 10, 15 és 30 perces kivonási időtartamokat alkalmaztam. A MACs extrakciós módszernek a kivitelezése zárt Erlenmeyer lombikban valósult meg szobahőmérsékleten. A MAE eljárást zárt teflon edényben hajtottam végre a csokoládéknak az alkalmazott hőmérsékleten (60°C) történő 5 perces extrahálásával 400 W-os teljesítmény alkalmazása mellett.

2.4.3 HPLC-DAD elemzés

A csokoládék folyadékkromatográfiás elemzéséhez egy Supelco gyártmányú Ascentis Express C18-as (150 mm, 3 mm, 5 µm) mag-héj töltetű folyadékkromatográfiás oszlop szolgált segítségül, melynek hőmérsékletét elemzéseim során szintén 35°C-on tartottam. A mozgófázist acetonitril (A), 0,5 v/v% foszforsav oldat (B) és nagy tisztaságú víz (C) elegye alkotta a következő gradiens elúciós programmal: 0-15 min: 8 v/v% (A), 15-22,8 min: 8-25 v/v% (A), 22,8-24 min: 25-70 v/v% (A), 24-35 min: 70-8 v/v% (A). Az elemzések alatt a B eluens összetételét állandó, 20 v/v% értéken tartottam. A

mozgófázis térfogatára 0,5 mL/min, az injektált térfogat pedig 2 μ L volt. A kiértékelést 330 nm hullámhosszon végeztem.

2.4.4 Stabilitási teszt

Ezen irányú vizsgálataimhoz az elkészített csokoládék egy részét (40 g) alumínium fóliába csomagolva, hűtőszekrényben, 5°C-on hat hónapig tároltam. Az adalékolt étcsokoládék rozmaringsav-tartalmát 29 napos időközönként, 6 hónapon keresztül havi rendszerességgel elemeztem. A csokoládémintákat az elemzésekhez MAC_s eljárással extraháltam.

3 Eredmények

3.1 Extrakciós módszer fejlesztése

3.1.1 Kivonószer savassága

Az 1 v/v% HCl-nak az alkalmazása az összes alkalmazott kivonószer elegy extrakciós hatékonyságának a javulását eredményezte; a legjobb eredményeket pedig a 70:30 v/v EtOH-H₂O elegy esetében tapasztaltam. Az említett kivonószer alkalmazásával a citromfűben mért rozmaringsav-koncentrációja 12,5 mg/g-ról 28,6 mg/g-ra nőtt, azaz 129%-os hatóanyagtartalom növekedést értem el. Hasonló tendenciát tapasztaltam a borsosmenta (116%) és az orvosi zsálya (85%) esetében is, ezen növények rozmaringsav-tartalma ugyanis rendre 7,5 mg/g-ról 16,2 mg/g-ra illetve 10,6 mg/g-ról 19,6 mg/g-ra változott. A hatóanyagok 23,6 mg/g-ról 38,8 mg/g-ra, 12,5 mg/g-ról 19,6 mg/g-ra, illetve 7,1 mg/g-ról 9,7 mg/g-ra való növekedését rendre megfigyeltem a szurokfű (64%), a kerti kakukkfű (57%) és a rozmaring (37%) esetében is.

3.1.2 Alkalmazott kivonószer típusa

A mért rozmaringsav-koncentrációk egyértelműen mutatják, hogy az EtOH- H₂O elegyek ($7,9 \pm 0,5$ mg/g – $38,8 \pm 0,5$ mg/g) szignifikánsan hatékonyabbak ($p \leq 0,05$) a növényekben lévő rozmaringsav kinyerésére, mint MeOH-H₂O kivonószer rendszerek ($<LOQ - 37,1 \pm 1,7$ mg/g), valamint a víz ($2,5 \pm 0,2$ mg/g – $14,2 \pm 1,7$ mg/g). A rozmaringsav legnagyobb koncentrációját a citromfű ($28,6 \pm 1,2$ mg/g), a borsosmenta ($16,2 \pm 1,5$ mg/g), a szurokfű ($38,8 \pm 0,5$ mg/g), a rozmaring ($9,7 \pm 0,7$ mg/g), az orvosi zsálya ($19,6 \pm 1,2$ mg/g) és a kerti kakukkfű ($14,6 \pm 0,5$ mg/g) esetében a 70:30:1 v/v/v EtOH-H₂O-HCl elegy alkalmazásával mértem.

3.1.3 Extrakció időtartama és hőmérséklete

Eredményeim azt mutatják, hogy a MAC_S eljárás alkalmazásával meglehetősen rövid idő alatt, már 30 perc elteltével kinyerhető a növényekben lévő rozmaringsav, ennél hosszabb kivonási idők esetében ugyanis nem tapasztaltam szignifikáns különbséget ($p \leq 0,05$) egyik növény esetében sem. A MAC_S eljárás során kapott legjobb hatóanyag-tartalom kihozatalt eredményező kivonási időknél (120 min) a HRE és a MAE technikákkal való összehasonlítása esetén a szurokfű kivételével a MAC_S vagy a MAE módszerek alkalmazásával érhető el legjobb hatóanyag tartalom kihozatal. Ezen összehasonlító vizsgálatok esetében ugyanis a citromfűben, a kerti kakukkfűben és az orvosi zsályában található rozmaringsav-mennyiségének tekintetében hasonló eredményeket tapasztaltam a MAC_S eljárásnak a 60 és 120 perces, illetve a 80°C-on, 5 percig tartó MAE során. Hasonló tendenciát figyeltem meg a borsosmenta esetében, azaz a MAC_S ismét ugyanazt a

hatékonyságot eredményezte ($16,1 \pm 1,0$ mg/g), mint az 50°C -on végzett MAE 10 ($16,1 \pm 0,5$ mg/g) és 15 perces ($16,0 \pm 0,7$ mg/g) kezelési időtartamok mellett. Az extrakciós hőmérséklet kioldott rozmaringsav-mennyiségre gyakorolt hatásának vizsgálata során azt tapasztaltam, hogy a nagyobb hőmérsékleteknél, különösen hosszú extrakciós időtartamok alkalmazása mellett a rozmaringsav már számottevően bomlik. Ezt a jelenséget leginkább a szurokfű esetében figyeltem meg a 80°C -on végzett MAE eljárásnál az 5 perces kezelési idő 30 percre növelése során. Ez esetben ugyanis $12,5$ mg/g hatóanyag koncentráció csökkenést (34%) tapasztaltam. A HRE módszerrel az orvosi zsálya és a kerti kakukkfű esetében tapasztaltam hasonló tendenciát. Mindkét növénynél $2,5$ mg/g hatóanyag veszteséget ($>10\%$) konstatáltam a 15 perces extrakciós időnek 30 perces időtartamra való növelése következtében.

3.2 Tinktúrák elemzése

3.2.1 Rozmaringsav stabilitása

A tinktúrák kávésav-tartalma növekedni, rozmaringsav-tartalma pedig csökkenni kezdett 27 nap elteltével. A tárolási időszak alatt a legnagyobb hatóanyagbomlást $41,4\%$ -os veszteséggel az orvosi zsálya esetében, a legkisebbet pedig $14,1\%$ -al a rozmaring esetében mutattam ki. A kerti kakukkfűnél szintén nagyobb mértékű ($27,6\%$) bomlást konstatáltam, ugyanakkor a borsosmenta ($15,8\%$) és a szurokfű ($16,5\%$) rozmaringsav mennyiségének csökkenése is meghaladta a 10% -os elfogadhatósági szintet. A kávésav tekintetében a legnagyobb mértékű változást a citromfűnél ($-54,8\%$), majd a szurokfűnél ($-50,5\%$), a borsosmentánál ($-37,9\%$), az orvosi zsályánál ($-27,0\%$), a

rozmaringnál (-21,6%) és a kerti kakukkfűnél (-19,7%) mértem. A 168 napos tárolás során a standard rozmaringsav bomlási tendenciáját is nyomon követtem. Ebben az esetben azonban jóval kisebb mértékű bomlást figyeltem meg (9,6%), ráadásul a hat hónapos tárolási időszak alatt a rozmaringsav bomlásának értéke nem haladta meg a 10%-os elfogadhatósági szintet sem.

3.2.2 Összes polifenol és antioxidáns tulajdonságok

Az egyes tinktúrák Folin-Ciocalteu kolorimetriás módszerrel meghatározott kezdeti összes polifenol-tartalma $34,1 \pm 2,7$ mg GAE/g. illetve $93,4 \pm 5,5$ mg GAE/g között változott. A tinktúrák jóval kisebb mértékű ($IC_{50} \geq 19,2$ $\mu\text{g/mL}$) antioxidáns aktivitást mutattak a kalibráláshoz használt L-aszkorbinsavval ($IC_{50} \geq 3,97$ $\mu\text{g/mL}$) illetve a pozitív kontrollként szolgáló rozmaringsavval ($IC_{50} \geq 4,02$ $\mu\text{g/mL}$) és kávéssavval ($IC_{50} \geq 4,24$ $\mu\text{g/mL}$) szemben. A tinktúrák közül a legerősebb antioxidáns aktivitással a legnagyobb összes polifenol és rozmaringsav-tartalommal rendelkező szurokfű ($IC_{50} = 19,2$ $\mu\text{g/mL}$) rendelkezett, melyet a sorban a citromfű ($IC_{50} = 30,2$ $\mu\text{g/mL}$) és a borosmenta ($IC_{50} = 31,0$ $\mu\text{g/mL}$) követett. Gyenge antioxidáns aktivitást figyeltem meg ugyanakkor a kerti kakukkfű ($IC_{50} = 96,0$ $\mu\text{g/mL}$) és a rozmaring ($IC_{50} = 96,2$ $\mu\text{g/mL}$) esetében, de gyengébb aktivitás volt megfigyelhető az orvosi zsályánál ($IC_{50} = 77,2$ $\mu\text{g/mL}$) is. Lineáris korrelációt tártam fel ugyanakkor a tinktúrák antioxidáns aktivitása és összes polifenol ($R^2=0,92$), illetve rozmaringsav ($R^2=0,85$) tartalma között.

3.3 Csokoládé vizsgálata

3.3.1 Kivonószer hatása

A vizsgált kivonószeretek közül a MAC_s esetében a tiszta MeOH ($3,98 \pm 0,07$ mg/g) alkalmazásával mértem a legjobb rozmaringsav kihozattal, mely 5,5-szörös hatóanyagtartalom növekedést jelentett a tiszta EtOH-val mért legkisebb értékhez ($0,72 \pm 0,05$ mg/g) képest. Hasonló tendenciát figyeltem meg a MAE esetében is. Ezen módszernél azonban a legnagyobb rozmaringsav koncentrációt az 50:50 v/v EtOH - H₂O eleggyel mértem ($3,95 \pm 0,25$ mg/g), mely mintegy 6-szoros növekedést jelentett a szintén legkisebb hozamot eredményező tiszta EtOH-hoz képest ($0,64 \pm 0,02$ mg/g).

3.3.2 Kivonás időtartamának hatása

Ezen irányú vizsgálataim során eredményeim azt mutatták, hogy a MAC_s-val kinyerhető rozmaringsav-koncentrációja nő, ha az extrakciós időt 30 percről 120 percre növeljük. Ez esetben ugyanis a csokoládé mintaoldat rozmaringsav-koncentrációja $3,98 \pm 0,07$ mg/g volt, mely 99,5%-os extrakciós hatékonyságnak felelt meg. Hosszabb extrakciós időtartamok alkalmazása mellett azonban már a hatóanyag koncentrációjának csökkenését figyeltem meg. A MAE módszerrel kinyerhető rozmaringsav-koncentráció ugyanis nem mutatott szignifikáns különbségeket ($p \leq 0,05$) abban az esetben, ha az extrakciós időt 5 percről 30 percre növeltem. A 10 perces kezelési időnek az alkalmazása azonban ugyanakkora rozmaringsav-koncentrációt eredményezett ($3,98 \pm 0,05$ mg/g), mint a 120 min ideig tartó MAC_s.

3.3.3 Folyadékromatográfiás módszerfejlesztés

A rozmaringsav analízisének döntő fontosságú az alkalmazott eluens pH-ja azáltal, hogy ezen paraméter egyrészt befolyásolja a vegyület visszatartását az állófázison másrészt pedig, hogy hatást gyakorol a csúcsalakra. A rozmaringsav ionizációjának visszaszorítása végett, azaz, hogy az elemzés során neutrális formában legyen jelen, a pH hatását különböző koncentrációjú foszforsavat (0,1 és 0,5 v/v%) és hangyasavat (0,1 v/v%) tartalmazó rendszerekben vizsgáltam. A legjobb elválasztási teljesítmény a 0,5 v/v%, azaz körülbelül 0,07 M koncentrációjú (pH=1,72) foszforsavoldat esetében mutatkozott meg. Az optimalizálás további szakaszában vizsgáltam még az eluens áramlási sebességének (0,5 – 0,8 mL/min) a hatását is. Optimális áramlási sebességnek végül 0,5 mL/min-t választottam. A módszer érvényesítése során ugyancsak jónak találtam a reprodukálhatóságot, ugyanis az egy napon belül, illetve a napok között mért rozmaringsav koncentrációk RSD% értékei 2,3% alatt voltak. A módszer pontosságának meghatározásához használt százalékban kifejezett visszanyerés értékek – melyek $95,4 \pm 1,2$ és $94,6 \pm 0,9\%$ voltak rendre a MAC_S és a MAE esetében – szintén a módszer megfelelőségét támasztották alá.

3.3.4 Rozmaringsav stabilitása

Az adalékolt étcsokoládé kezdeti $3,98 \pm 0,07$ mg/g rozmaringsav-koncentrációját a tárolási idő nem befolyásolta szignifikánsan ($p \leq 0,05$). Ezen eredmények azt mutatják, hogy az étcsokoládé megfelelő hordozómátrix a citromfű szárazkivonat számára, hiszen bioaktív

hatással rendelkező hatóanyag-komponensének (rozmaringsav) koncentrációja nem változott a tárolás során.

4 Új tudományos eredmények (tézisek)

1. Megállapítottam, hogy a hagyományos (macerálás kevertetéssel, forralás visszafolyóztatással), valamint a mikrohullámmal segített folyadék extrakció paramétereinek helyes megválasztásával a növényi kivonatok rozmaringsav-tartalma, ezáltal minősége is nagymértékben növelhető. Ehhez kísérletekkel igazoltam, hogy a kihozatalt elsősorban az alkalmazott kivonószer típusa, összetétele és pH-ja, valamint kisebb mértékben az extrakció időtartama befolyásolja. Mindemellett megállapításra került, hogy a rozmaringsav növényekből történő kinyerésére a legjobb kivonószer a 70:30:1 v/v/v EtOH-H₂O-HCl elegy.
2. Vizsgálataimmal alátámasztottam, hogy a rozmaringsav kinyerését illetően a mikrohullámmal segített extrakciós technika a legtöbb gyógynövény esetében csupán az extrakciós idő tekintetében (5 min) produktívabb a hagyományos kivonatolási eljárásokhoz (macerálás kevertetéssel (120 min), forralás visszafolyóztatással (15 min)) képest.
3. Igazoltam, hogy szobahőmérsékleten a növényekből származó, terápiás hatással rendelkező rozmaringsav meglehetősen instabil, ennél fogva a komponens tinktúra formájában csak rövid idejű minőségmegőrzési idővel (≤ 113 nap) tudja közvetíteni az általa elvárt kedvező élettani hatásokat. Lineáris korrelációt tártam fel ugyanakkor a tinktúrák antioxidáns aktivitása, összes polifenol ($R^2=0,92$) és rozmaringsav ($R^2=0,85$) tartalma között.

4. A citromfű szárazkivonattal adalékolt étcsokoládé rozmaringsav-tartalmának kinyerésére szilárd-folyadék extrakciós eljárást dolgoztam ki. Bizonyítottam, hogy az eredetileg növényekből történő, rozmaringsav kivonására kidolgozott macerálás kevertetéssel (120 min, szobahőmérséklet, 120 rpm) és mikrohullámmal segített extrakció (5 min, 400 W, 60°C) a csokoládé esetében is alkalmazhatók.
5. Fordított fázisú folyadékkromatográfiás UV-spektrometriás (RP - HPLC-DAD) eljárást dolgoztam ki étcsokoládé mátrixban lévő rozmaringsav nagyérzékenységű szelektív meghatározására. A kifejlesztett analitikai módszerem alkalmazhatóságát a rendszeralkalmassági vizsgálatok elvégzése mellett a következő teljesítményjellemzők meghatározásával igazoltam: linearitás (5 - 800 µg/mL), visszanyerés ($R\% = \geq 94,6$), precizitás (0,5 - 2,4 RSD%), valamint meghatározási határ (LOQ= 0,0021 mg/mL).
6. A kifejlesztett RP-HPLC-DAD eljárással igazoltam, hogy az étcsokoládé funkcionalitása fagyasztva szárított citromfűkivonattal fokozható. Megállapítottam továbbá, hogy a kiváló hatóanyag eloszlás és stabilitás miatt (≥ 6 hónap) a csokoládé ideális hordozó mátrix szerepet tölthet be a növényi kivonatok bioaktív komponensének/komponenseinek szervezetbe történő juttatásához.

5 Publikációs jegyzék

5.1 Értekezés alapjául szolgáló közlemények

5.1.1 Idegen nyelvű lektorált folyóiratban

Sik B., Kapcsándi V, Székelyhidi R, Lakatos E, Ajtony Zs. (2019) Recent advances in the analysis of rosmarinic acid from herbs in the Lamiaceae family. *Nat. Prod. Comm.*, 14, 1-10. <https://doi.org/10.1177/1934578X19864216>

Impakt faktor: 0,468 (Q3) Hivatkozások száma: 10

Sik B., Lakatos E, Kapcsándi V, Ajtony Zs. (2020) Conventional and nonconventional extraction techniques for optimal extraction processes of rosmarinic acid from six Lamiaceae plants as determined by HPLC-DAD measurement. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 184, 113173. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113173>

Impakt faktor: 3,209 (Q1) Hivatkozások száma: 14

Sik B., Lakatos E, Kapcsándi V, Székelyhidi R, Ajtony Zs. (2021) Exploring the rosmarinic acid profile of dark chocolate fortified with freeze-dried lemon balm extract using conventional and non-conventional extraction techniques. *LWT-Food. Sci. Technol.*, 147, 111520. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111520>

Impakt faktor: 4,006 (D1) Hivatkozások száma: -

5.1.2 Magyar nyelvű konferencia tanulmánykötetben

Sik B. (2020) Lamiaceae családba tartozó tradicionális gyógynövények fő bioaktív hatóanyagának kinyerésére szolgáló extrakciós

eljárások kidolgozása. *Új Nemzeti Kiválósági Program 2019/2020 Konferencia Tanulmánykötet*, 181-188.

5.2 Egyéb, más témakörben megjelent közlemények

Kapcsándi V, Lakatos E, **Sik B**, Linka LÁ, Székelyhidi R. (2021) Characterization of fatty acid, antioxidant, and polyphenol content of grape seed oil from different *Vitis vinifera* L. varieties. *OCL*, 28:30. <https://doi.org/10.1051/ocl/2021017>.

Kapcsándi V, Barabás A, **Sik B**, Ajtony Zs. (2018) Különböző laktóz koncentrációk hatása *Kluyveromyces* élesztőtörzsek szaporodási tulajdonságaira és etanoltermelési képességére. *Acta Agronomica Óváriensis*, 59, 27-43.

Sik B, Kapcsándi V, Lakatos E, Ajtony Zs. (2018) Flavonolignánok máriatövisből (*Silybum marianum* L. Gaertner) történő oldószeres kinyerésének optimalizálása. In: Szalka É. (szerk.) XXXVII. Óvári Tudományos Napok, 2018. november 9-10.: Fenntartható agrárium és környezet, az Óvári Akadémia 200 éve – múlt, jelen, jövő. SZE-MÉK, Mosonmagyaróvár, 81-90.

Sik B, Lakatos E, Kapcsándi V, Ajtony Zs. (2018) Gyógy-és fűszernövények illóolaj tartalmának vizsgálata vízgőz-desztillációval. In: Szalka É. (szerk.) XXXVII. Óvári Tudományos Napok, 2018. november 9-10.: Fenntartható agrárium és környezet, az Óvári Akadémia 200 éve – múlt, jelen, jövő. SZE-MÉK, Mosonmagyaróvár, 70-80.

Sik B, Kovács AJ, Kapcsándi V, Lakatos E. (2016) *Kluyveromyces* élesztőtörzsek alkoholtermelésének vizsgálata a laktóztartalom

függvényében. In: Szalka É, Bali, Papp Á. (szerk.) XXXVI. Óvári Tudományos Nap: Hagyomány és innováció az agrár-és élelmiszergazdaságban I-II. SZE-MÉK, Mosonmagyaróvár, 143-152.